(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2013-542716
(P2013-542716A)
(43)公表日　平成25年11月28日(2013.11.28)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C07K 16/22	(2006.01)	C07K	16/22		4C076
A61K 9/08	(2006.01)	A61K	9/08		4C085
A61K 47/12	(2006.01)	A61K	47/12		4H045
A61K 47/10	(2006.01)	A61K	47/10		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 157 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2013-525008 (P2013-525008)
(86)(22)出願日　平成23年8月19日 (2011.8.19)
(85)翻訳文提出日　平成25年4月17日 (2013.4.17)
(86)国際出願番号　PCT/US2011/048518
(87)国際公開番号　WO2012/024650
(87)国際公開日　平成24年2月23日 (2012.2.23)
(31)優先権主張番号　61/375,193
(32)優先日　平成22年8月19日 (2010.8.19)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　391008788
アボット・ラボラトリーズ
ＡＢＢＯＴＴ　ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＩＥＳ
アメリカ合衆国　イリノイ州　アボツト　パーク　アボツト　パーク　ロード　１０００
(74)代理人　110001173
特許業務法人川口國際特許事務所
(72)発明者　レイシー，スーザン・イー
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０１５８１、ウエストボロー、グレン・ストリート・３８

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗ＮＧＦ抗体およびその使用

(57)【要約】
本開示は、ＮＧＦ結合タンパク質、特に、キメラ抗体、ＣＤＲグラフト化抗体およびイヌ化抗体である抗体ならびにそれを製造する方法およびその使用を包含する。本開示の抗体または抗体部分は、例えば、ＮＧＦ活性が有害である障害を患っている哺乳動物対象において、ＮＧＦを検出するのに、また、ＮＧＦ活性を阻害するのに有用である。

Figure 1
Mouse Anti-NGF Antibodies
SEQ ID NO: 1 (PR-1254972 VH nucleotide sequence)
GAAGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTTCC
TGATACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTGACTATTACATGTTTT
GGATTCGCCAGACTCCGCGAAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGA
TGGTGGTAGTTACACCTACTACACAGACAATGTAAAGGGCCGATTCACCATC
TCCAGAGACAATGTCAAGAACAACCTGTACCTGCAAATGAGCCATCTGAAGT
CTGCGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGATTGGAGTGACTCCGAGGG
GTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号２、配列番号６、配列番号１０、配列番号１４、配列番号１８、配列番号２２、配列番号２５、配列番号２７、配列番号２９、配列番号３１、配列番号３３、配列番号３５、配列番号３７、配列番号３９、配列番号４１、配列番号４３、配列番号１６５、配列番号１６６、配列番号１６７、配列番号１６８、配列番号１６９、配列番号１７０、配列番号１７７、配列番号１７９、配列番号１８０、配列番号１８２、配列番号１８４、配列番号１８５、配列番号１８７、配列番号１８９、配列番号１９０、配列番号１９２、配列番号１９５、配列番号１９７、配列番号１９９、配列番号２０１、配列番号２０３、配列番号２０６、配列番号２０７からなる群から選択される配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および
配列番号４、配列番号８、配列番号１２、配列番号１６、配列番号２０、配列番号２４、配列番号２６、配列番号２８、配列番号３０、配列番号３２、配列番号３４、配列番号３６、配列番号３８、配列番号４０、配列番号４２および配列番号４４、配列番号１７１、配列番号１７２、配列番号１７３、配列番号１７４、配列番号１７５、配列番号１７６、配列番号１８１、配列番号１８３、配列番号１８６、配列番号１８８、配列番号１９１、配列番号１９３、配列番号１９４、配列番号１９６、配列番号１９８、配列番号２００、配列番号２０２からなる群から選択される配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域
を含む、抗体またはその抗原結合断片。
【請求項２】
ａ）配列番号５５、５６、５７、６１、６２、６３、６７、６８、６９、７３、７４、７５、７９、８０、８１からなる重鎖ＣＤＲおよび前記配列のうち１つと少なくとも５０％の配列同一性を有する修飾ＣＤＲアミノ酸配列、ならびにｂ）配列番号５８、５９、６０、６４、６５、６６、７０、７１、７２、７６、７７、７８、８２、８３、８４からなる軽鎖ＣＤＲおよび前記配列のうち１つと少なくとも５０％の配列同一性を有する修飾ＣＤＲアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも１つのＣＤＲを含む、請求項１に記載の抗体。
【請求項３】
重鎖可変領域が、配列番号３７の配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が、配列番号３８の配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の抗体。
【請求項４】
重鎖可変領域が、配列番号１９２の配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が、配列番号１９３の配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の抗体。
【請求項５】
ＩｇＭ定常ドメイン、ＩｇＧ４定常ドメイン、ＩｇＧ１定常ドメイン、ＩｇＥ定常ドメイン、ＩｇＧ２定常ドメイン、ＩｇＧ３定常ドメインおよびＩｇＡ定常ドメインからなる群から選択される重鎖ヒト免疫グロブリン定常ドメインを含む、請求項１に記載の抗体。
【請求項６】
ＩｇＭ定常ドメイン、ＩｇＧ４定常ドメイン、ＩｇＧ１定常ドメイン、ＩｇＥ定常ドメイン、ＩｇＧ２定常ドメイン、ＩｇＧ３定常ドメインおよびＩｇＡ定常ドメインからなる群から選択される重鎖イヌ免疫グロブリン定常ドメインを含む、請求項１に記載の抗体。
【請求項７】
重鎖ネコ免疫グロブリン定常ドメインを含む、請求項１に記載の抗体。
【請求項８】
重鎖ウマ免疫グロブリン定常ドメインを含む、請求項１に記載の抗体。

【請求項９】
配列番号５２および配列番号５４からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する定常領域を含む、請求項１に記載の抗体。
【請求項１０】
免疫グロブリン分子、ジスルフィド結合されたＦｖ、モノクローナル抗体、ｓｃＦｖ、キメラ抗体、単一ドメイン抗体、ＣＤＲグラフト化抗体、ダイアボディー、ヒト化抗体、イヌ化ｍＡｂ、イヌｍＡｂ、ネコｍＡｂ、ネコ化ｍＡｂ、ウマｍＡｂ、ウマ化ｍＡｂ、多重特異性抗体、Ｆａｂ、二重特異性抗体、ＤＶＤ－Ｉｇ、Ｆａｂ’、二特異性抗体、Ｆ（ａｂ’）$_2$およびＦｖからなる群から選択される、請求項１に記載の抗体。
【請求項１１】
結合タンパク質が、ＮＧＦの生物学的機能を調節できる、請求項１に記載の抗体。
【請求項１２】
請求項１に記載の抗体をコードする単離核酸。
【請求項１３】
請求項３に記載の抗体をコードする単離核酸。
【請求項１４】
請求項４に記載の抗体をコードする単離核酸。
【請求項１５】
請求項１、３または４に記載の抗体および薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を含む医薬組成物または診断用組成物。
【請求項１６】
抗体の治療上有効な量を含む、請求項１５に記載の医薬組成物。
【請求項１７】
少なくとも１種の防腐剤を含み、防腐剤が、メチルパラベン、プロピルパラベン、ベンジルアルコール、クロロブタノールまたは塩化ベンザルコニウムである、請求項１５に記載の医薬組成物。
【請求項１８】
組成物のｐＨが、７．０から８．０の間である、請求項１５に記載の医薬組成物。
【請求項１９】
静脈内にまたは皮下に投薬された場合に、約８．０日から約１５．０日の半減期を有する、請求項１５に記載の医薬組成物。
【請求項２０】
対象に、請求項１、３または４に記載のその抗原結合断片の抗体の治療上有効な量を投与するステップを含む、ＮＧＦ活性が有害である障害を患っている対象においてＮＧＦ活性を低減する方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本開示は、抗ＮＧＦ抗体およびそれをコードするポリヌクレオチドならびにそれだけには限らないが、術後疼痛、関節リウマチ性疼痛、癌疼痛および変形性関節症性疼痛を含めた疼痛の治療および／または予防における、このような抗体および／またはポリヌクレオチドの使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
神経増殖因子（ＮＧＦ）は、感覚ニューロンおよび交感神経ニューロンの生存および分化を促進する分子として５０年以上前に発見された分泌タンパク質である（概説については、Ｌｅｖｉ－Ｍｏｎｔａｌｃｉｎｉ、Ｓｃｉｅｎｃｅ１８７：１１３頁（１９７５年）を参照のこと）。ＮＧＦおよびチロシンキナーゼＡ（ＴｒｋＡ）受容体との複合体中のＮＧＦの結晶構造は決定されている（ＭｃＤｏｎａｌｄら、Ｎａｔｕｒｅ　３５４：４１１（１９９１年）；Ｗｉｅｓｍａｎｎら、Ｎａｔｕｒｅ４０１：１８４－１８８頁（１９９

９年））。

【０００３】

末梢と中枢ニューロン両方の発達および生存におけるＮＧＦの役割は、十分に特性決定されている。ＮＧＦは、末梢交感神経ニューロンおよび胚性感覚ニューロンの、ならびに前脳基底核コリン作動性ニューロンの発達における重大な生存および維持因子であることがわかっている（例えば、Ｓｍｅｙｎｅら、Ｎａｔｕｒｅ３６８：２４６－９頁（１９９４年）；およびＣｒｏｗｌｅｙら、Ｃｅｌｌ、７６：１００１－１１頁（１９９４年）参照のこと）。ＮＧＦは、アルツハイマー病につながるアミロイド形成を阻害することがわかっている（Ｃａｌｉｓｓａｎｏら、Ｃｅｌｌ Ｄｅａｔｈ ａｎｄ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ、１７：１１２６－１１３３頁（２０１０年））。ＮＧＦは、感覚ニューロンにおけるニューロペプチドの発現を上方制御し（Ｌｉｎｄｓａｙら、Ｎａｔｕｒｅ、３３７：３６２－３６４頁（１９８９年））、その活性は、２種の異なる膜結合受容体、ＴｒｋＡ受容体およびｐ７５共通ニューロトロフィン受容体によって媒介される（Ｃｈａｏら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２３２：５１８－５２１頁（１９８６年）；Ｈｕａｎｇら、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．、２４：６７７－７３６頁（２００１年）；Ｂｉｂｅｌら、Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．、１４：２９１９－２９３７頁（２０００年））。

【０００４】

ＮＧＦは、肥満細胞（Ｌｅｏｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、９１：３７３９－３７４３頁（１９９４年））、Ｂ－リンパ球（Ｔｏｒｃｉａら、Ｃｅｌｌ、８５：３４５－３５６頁（１９９６年）、ケラチノサイト（Ｄｉ Ｍａｒｃｏら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２６８：２２８３８－２２８４６頁））、平滑筋細胞（Ｕｅｙａｍａら、Ｊ．Ｈｙｐｅｒｔｅｎｓ．、１１：１０６１－１０６５頁（１９９３年））、線維芽細胞（Ｌｉｎｄｈｏｌｍら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．、２：７９５－８０１頁（１９９０年））、気管支上皮細胞（Ｋａｓｓｅｌら、Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ａｌｌｅｒｇｙ、３１：１４３２－４０頁（２００１年））、腎メサンギウム細胞（Ｓｔｅｉｎｅｒら、Ａｍ．Ｊ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．、２６１：Ｆ７９２－７９８頁（１９９１年））および骨格筋筋管（Ｓｃｈｗａｒｔｚら、Ｊ Ｐｈｏｔｏｃｈｅｍ．Ｐｈｏｔｏｂｉｏｌ．、Ｂ６６：１９５－２００頁（２００２年））を含めたいくつかの細胞種によって産生される。さらに、ＮＧＦ受容体は、神経系の外側のさまざまな細胞種で見い出されている。

【０００５】

ＮＧＦは、神経系の外側のプロセスに関与している。例えば、ＮＧＦは、血管透過性を増強し（Ｏｔｔｅｎら、Ｅｕｒ Ｊ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．、１０６：１９９－２０１頁（１９８４年））、ＴおよびＢ細胞免疫応答を増強し（Ｏｔｔｅｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、ＵＳＡ８６：１００５９－１００６３頁（１９８９年））、リンパ球分化および肥満細胞増殖を誘導し、肥満細胞からの可溶性生物学的シグナルの放出を引き起こす（Ｍａｔｓｕｄａら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、８５：６５０８－６５１２頁（１９８８年）；Ｐｅａｒｃｅら、Ｊ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．、３７２：３７９－３９３頁（１９８６年）；Ｂｉｓｃｈｏｆｆら、Ｂｌｏｏｄ、７９：２６６２－２６６９頁（１９９２年）；Ｈｏｒｉｇｏｍｅら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２６８：１４８８１－１４８８７頁（１９９３年））ことがわかっている。

【０００６】

ＮＧＦの局所および全身投与の両方とも、痛覚過敏および異痛症を誘発することがわかっている（Ｌｅｗｉｎ，Ｇ．Ｒ．ら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．６：１９０３－１９１２頁（１９９４年））。ヒトにおけるＮＧＦの静脈内注入は、全身筋肉痛をもたらすのに対し、局所投与は、全身効果に加えて注射部位痛覚過敏および異痛症を惹起する（Ａｐｆｅｌ，Ｓ．Ｃ．ら、Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ、５１：６９５－７０２頁（１９９８年））。さらに、癌の特定の形態では、過剰のＮＧＦが、神経線維の成長および浸潤を促し、癌疼痛の誘導を伴う（Ｚｈｕ，Ｚ．ら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．、１７：２４１－２２８頁（１９９９年））。外因的に加えられるＮＧＦは、これらの効果のすべてを有することができることがわかっているが、内因性ＮＧＦが、インビボでこれらのプロセスのいず

れかにおいて重要であることは極めて稀にしか示されていないことに留意することが重要である（Ｔｏｒｃｉａら、Ｃｅｌｌ、８５（３）：３４５－５６頁（１９９６年））。

【０００７】

高レベルのＮＧＦは、ヒトおよび動物における特定の炎症状態、例えば、全身性エリテマトーデス（Ｂｒａｃｃｉ－Ｌａｕｄｉｅｒｏら、Ｎｅｕｒｏｒｅｐｏｒｔ、４：５６３－５６５頁（１９９３年））、多発性硬化症（Ｂｒａｃｃｉ－Ｌａｕｄｉｅｒｏら、Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．Ｌｅｔｔ．、１４７：９－１２頁（１９９２年））、乾癬（Ｒａｙｃｈａｕｄｈｕｒｉら、Ａｃｔａ Ｄｅｒｍ．Ｉ’ｅｎｅｒｅｏｌ．、７８：８４－８６頁（１９９８年））、関節炎（Ｆａｌｃｉｍら、Ａｎｎ．Ｒｈｅｕｍ．Ｄｉｓ．、５５：７４５－７４８頁（１９９６年））、間質性膀胱炎（Ｏｋｒａｇｌｙら、Ｊ．Ｕｒｏｌｏｇｙ、１６１：４３８－４４１頁（１９９９年））および喘息（Ｂｒａｕｎら、Ｅｕｒ．Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．、２８：３２４０－３２５１頁（１９９８年））に関与している。関節リウマチを患っている患者の滑膜は、高レベルのＮＧＦを発現するのに対し、非炎症の滑膜では、ＮＧＦは検出不能であると報告されている（Ａｌｏｅら、Ａｒｃｈ．Ｒｈｅｕｍ．、３５：３５１－３５５頁（１９９２年））。実験的に誘導された関節リウマチを有するラットにおいて同様の結果が見られた（Ａｌｏｅら、Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｒｈｅｕｍａｔｏｌ．、１０：２０３－２０４頁（１９９２年））。高レベルのＮＧＦは、トランスジェニック関節炎マウスにおいて、肥満細胞数の増大とともに報告されている（Ａｌｏｅら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｔｉｓｓｕｅ Ｒｅａｃｔｉｏｎｓ－Ｅｘｐ．Ｃｌｉｎ．Ａｓｐｅｃｔｓ、１５：１３９－１４３頁（１９９３年））。さらに、足の不自由なイヌにおいてイヌＮＧＦの高レベルの発現がわかっている（Ｉｓｏｌａ，Ｍ．、Ｆｅｒｒａｒｉ，Ｖ．、Ｓｔａｂｉｌｅ，Ｆ．、Ｂｅｒｎａｒｄｉｎｉ，Ｄ．、Ｃａｒｎｉｅｒ，Ｐ．、Ｂｕｓｅｔｔｏ，Ｒ．Ｎｅｒｖｅ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｉｏｎｓ ｉｎ ｔｈｅ ｓｙｎｏｖｉａｌ ｆｌｕｉｄ ｆｒｏｍ ｈｅａｌｔｈｙ ｄｏｇｓ ａｎｄ ｄｏｇｓ ｗｉｔｈ ｓｅｃｏｎｄａｒｙ ｏｓｔｅｏａｒｔｈｒｉｔｉｓ．Ｖｅｔ．Ｃｏｍｐ．Ｏｒｔｈｏｐ．Ｔｒａｕｍａｔｏｌ．４：２７９頁（２０１１年））。ＰＣＴ公開番号ＷＯ０２／０９６４５８には、炎症状態（例えば、関節リウマチ）などの種々のＮＧＦ関連障害の治療における特定の特性の抗ＮＧＦ抗体の使用が開示されている。ヒト腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）遺伝子を保持する関節炎トランスジェニックマウスに注射された精製抗ＮＧＦ抗体が、肥満細胞数の減少ならびに関節炎マウスの滑膜内のヒスタミンおよびサブスタンスＰレベルの低下を引き起こすことが報告されている（Ａｌｏｅら、Ｒｈｅｕｍａｔｏｌ．Ｉｎｔ．、１４：２４９－２５２頁（１９９５年））。ＮＧＦ抗体の外因性投与が、関節炎マウスにおいて生じる高レベルのＴＮＦを低下させることがわかっている（Ｍａｎｎｉら、Ｒｈｅｕｍａｔｏｌ．Ｉｎｔ．、１８：９７－１０２頁（１９９８年））。

【０００８】

ヒト変形性関節症軟骨細胞において、ＮＧＦおよび高親和性ＮＧＦ受容体（ＴｒｋＡ）の発現の増大が観察された（Ｉａｎｎｏｎｅら、Ｒｈｅｕｍａｔｏｌｏｇｙ、４１：１４１３－１４１８頁（２００２年））。げっ歯類抗ＮＧＦアンタゴニスト抗体が報告されている（Ｈｏｎｇｏら、Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ、１９（３）：２１５－２２７頁（２０００年）；Ｒｕｂｅｒｔｉら、Ｃｅｌｌ．Ｍｏｌｅｃ．Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ．、１３（５）：５５９－５６８頁（１９９３年））。しかし、非げっ歯類対象において、げっ歯類抗体が治療上使用される場合には、相当数の治療された対象において、抗マウス抗体反応が生じる。

【０００９】

慢性疼痛におけるＮＧＦの関与は、ＮＧＦの効果の阻害に基づく治療アプローチに大きな関心をもたらした（Ｓａｒａｇｏｖｉら、Ｔｒｅｎｄｓ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｓｃｉ．２１：９３－９８頁（２０００年））。例えば、ＮＧＦの活性を遮断するために、ＴｒｋＡ受容体の可溶性形態が使用され、これは、病変したニューロンの細胞体に損傷を与えることなく、神経因性疼痛に関与する神経腫の形成を大幅に低減することがわかった（Ｋ

ｒｙｇｅｒら、Ｊ．Ｈａｎｄ　Ｓｕｒｇ．（Ａｍ．）、２６：６３５－６４４頁（２００１年））。

【００１０】

特定の抗ＮＧＦ抗体は、記載されている（ＰＣＴ公開番号ＷＯ２００１／７８６９８、ＷＯ２００１／６４２４７、ＷＯ２００２／０９６４５８、ＷＯ２００４／０３２８７０、ＷＯ２００５／０６１５４０、ＷＯ２００６／１３１９５１、ＷＯ２００６／１１０８８３；米国公開番号ＵＳ２００５００７４８２１、ＵＳ２００８００３３１５７、ＵＳ２００８０１８２９７８およびＵＳ２００９００４１７１７；ならびに米国特許第７，４４９，６１６号）。神経因性疼痛の動物モデル（例えば、神経幹または脊髄神経結紮）では、ＮＧＦに対する中和抗体の全身注射は、異痛症および痛覚過敏の両方を防ぐ（Ｒａｍｅｒら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ、１１：８３７－８４６頁（１９９９年）；Ｒｏら、Ｐａｉｎ、７９：２６５－２７４頁（１９９９年））。さらに、中和抗ＮＧＦ抗体を用いる治療は、マウス癌疼痛モデルにおいて大幅な疼痛低減をもたらす（Ｓｅｖｃｉｋら、Ｐａｉｎ、１１５：１２８－１４１頁（２００５年））。したがって、ヒトおよび動物のための抗ＮＧＦアンタゴニスト抗体が大いに必要とされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１１】

【特許文献１】国際公開第２００２／０９６４５８号
【特許文献２】国際公開第２００１／７８６９８号
【特許文献３】国際公開第２００１／６４２４７号
【特許文献４】国際公開第２００２／０９６４５８号
【特許文献５】国際公開第２００４／０３２８７０号
【特許文献６】国際公開第２００５／０６１５４０号
【特許文献７】国際公開第２００６／１３１９５１号
【特許文献８】国際公開第２００６／１１０８８３号
【特許文献９】米国特許出願公開第２００５／００７４８２１号明細書
【特許文献１０】米国特許出願公開第２００８／００３３１５７号明細書
【特許文献１１】米国特許出願公開第２００８／０１８２９７８号明細書
【特許文献１２】米国特許出願公開第２００９／００４１７１７号明細書
【特許文献１３】米国特許第７，４４９，６１６号明細書

【非特許文献】

【００１２】

【非特許文献１】Ｌｅｖｉ－Ｍｏｎｔａｌｃｉｎｉ、Ｓｃｉｅｎｃｅ１８７：１１３頁（１９７５年）
【非特許文献２】ＭｃＤｏｎａｌｄら、Ｎａｔｕｒｅ　３５４：４１１（１９９１年）
【非特許文献３】Ｗｉｅｓｍａｎｎら、Ｎａｔｕｒｅ４０１：１８４－１８８頁（１９９９年）
【非特許文献４】Ｓｍｅｙｎｅら、Ｎａｔｕｒｅ３６８：２４６－９頁（１９９４年）
【非特許文献５】Ｃｒｏｗｌｅｙら、Ｃｅｌｌ、７６：１００１－１１頁（１９９４年）
【非特許文献６】Ｃａｌｉｓｓａｎｏら、Ｃｅｌｌ　Ｄｅａｔｈ　ａｎｄ　Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ、１７：１１２６－１１３３頁（２０１０年）
【非特許文献７】Ｌｉｎｄｓａｙら、Ｎａｔｕｒｅ、３３７：３６２－３６４頁（１９８９年）
【非特許文献８】Ｃｈａｏら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２３２：５１８－５２１頁（１９８６年）
【非特許文献９】Ｈｕａｎｇら、Ａｎｎｕ．　Ｒｅｖ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．、２４：６７７－７３６頁（２００１年）
【非特許文献１０】Ｂｉｂｅｌら、Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ．、１４：２９１９－２９３７頁（２０００年）

【非特許文献１１】Ｌｅｏｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、９１：３７３９－３７４３頁（１９９４年）
【非特許文献１２】Ｔｏｒｃｉａら、Ｃｅｌｌ、８５：３４５－３５６頁（１９９６年）
【非特許文献１３】Ｄｉ　Ｍａｒｃｏら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２６８：２２８３８－２２８４６頁）
【非特許文献１４】Ｕｅｙａｍａら、Ｊ．Ｈｙｐｅｒｔｅｎｓ．、１１：１０６１－１０６５頁（１９９３年）
【非特許文献１５】Ｌｉｎｄｈｏｌｍら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．、２：７９５－８０１頁（１９９０年）
【非特許文献１６】Ｋａｓｓｅｌら、Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ａｌｌｅｒｇｙ、３１：１４３２－４０頁（２００１年）
【非特許文献１７】Ｓｔｅｉｎｅｒら、Ａｍ．Ｊ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．、２６１：Ｆ７９２－７９８頁（１９９１年）
【非特許文献１８】Ｓｃｈｗａｒｔｚら、Ｊ　Ｐｈｏｔｏｃｈｅｍ．Ｐｈｏｔｏｂｉｏｌ．、Ｂ６６：１９５－２００頁（２００２年）
【非特許文献１９】Ｏｔｔｅｎら、Ｅｕｒ　Ｊ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．、１０６：１９９－２０１頁（１９８４年）
【非特許文献２０】Ｏｔｔｅｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、ＵＳＡ８６：１００５９－１００６３頁（１９８９年）
【非特許文献２１】Ｍａｔｓｕｄａら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、８５：６５０８－６５１２頁（１９８８年）
【非特許文献２２】Ｐｅａｒｃｅら、Ｊ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．、３７２：３７９－３９３頁（１９８６年）
【非特許文献２３】Ｂｉｓｃｈｏｆｆら、Ｂｌｏｏｄ、７９：２６６２－２６６９頁（１９９２年）
【非特許文献２４】Ｈｏｒｉｇｏｍｅら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２６８：１４８８１－１４８８７頁（１９９３年）
【非特許文献２５】Ｌｅｗｉｎ，Ｇ．Ｒ．ら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．６：１９０３－１９１２頁（１９９４年）
【非特許文献２６】Ａｐｆｅｌ，Ｓ．Ｃ．ら、Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ、５１：６９５－７０２頁（１９９８年）
【非特許文献２７】Ｚｈｕ，Ｚ．ら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．、１７：２４１－２２８頁（１９９９年）
【非特許文献２８】Ｂｒａｃｃｉ－Ｌａｕｄｉｅｒｏら、Ｎｅｕｒｏｒｅｐｏｒｔ、４：５６３－５６５頁（１９９３年）
【非特許文献２９】Ｂｒａｃｃｉ－Ｌａｕｄｉｅｒｏら、Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．Ｌｅｔｔ．、１４７：９－１２頁（１９９２年）
【非特許文献３０】Ｒａｙｃｈａｕｄｈｕｒｉら、Ａｃｔａ　Ｄｅｒｍ．Ｉ’ｅｎｅｒｅｏｌ．、７８：８４－８６頁（１９９８年）
【非特許文献３１】Ｆａｌｃｉｍら、Ａｎｎ．Ｒｈｅｕｍ．Ｄｉｓ．、５５：７４５－７４８頁（１９９６年）
【非特許文献３２】Ｏｋｒａｇｌｙら、Ｊ．Ｕｒｏｌｏｇｙ、１６１：４３８－４４１頁（１９９９年）
【非特許文献３３】Ｂｒａｕｎら、Ｅｕｒ．Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．、２８：３２４０－３２５１頁（１９９８年）
【非特許文献３４】Ａｌｏｅら、Ａｒｃｈ．Ｒｈｅｕｍ．、３５：３５１－３５５頁（１９９２年）
【非特許文献３５】Ａｌｏｅら、Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｒｈｅｕｍａｔｏｌ．、１０：２０３－２０４頁（１９９２年）
【非特許文献３６】Ａｌｏｅら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｔｉｓｓｕｅ　Ｒｅａｃｔｉｏｎｓ－Ｅｘ

ｐ．Ｃｌｉｎ．Ａｓｐｅｃｔｓ、１５：１３９－１４３頁（１９９３年）
【非特許文献３７】Ｉｓｏｌａ，Ｍ．、Ｆｅｒｒａｒｉ，Ｖ．、Ｓｔａｂｉｌｅ，Ｆ．、Ｂｅｒｎａｒｄｉｎｉ，Ｄ．、Ｃａｒｎｉｅｒ，Ｐ．、Ｂｕｓｅｔｔｏ，Ｒ．Ｎｅｒｖｅ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｉｏｎｓ ｉｎ ｔｈｅ ｓｙｎｏｖｉａｌ ｆｌｕｉｄ ｆｒｏｍ ｈｅａｌｔｈｙ ｄｏｇｓ ａｎｄ ｄｏｇｓ ｗｉｔｈ ｓｅｃｏｎｄａｒｙ ｏｓｔｅｏａｒｔｈｒｉｔｉｓ．Ｖｅｔ．Ｃｏｍｐ．Ｏｒｔｈｏｐ．Ｔｒａｕｍａｔｏｌ．４：２７９頁（２０１１年）
【非特許文献３８】Ａｌｏｅら、Ｒｈｅｕｍａｔｏｌ．Ｉｎｔ．、１４：２４９－２５２頁（１９９５年）
【非特許文献３９】Ｍａｎｎｉら、Ｒｈｅｕｍａｔｏｌ．Ｉｎｔ．、１８：９７－１０２頁（１９９８年）
【非特許文献４０】Ｉａｎｎｏｎｅら、Ｒｈｅｕｍａｔｏｌｏｇｙ、４１：１４１３－１４１８頁（２００２年）
【非特許文献４１】Ｈｏｎｇｏら、Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ、１９（３）：２１５－２２７頁（２０００年）
【非特許文献４２】Ｒｕｂｅｒｔｉら、Ｃｅｌｌ．Ｍｏｌｅｃ．Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ．、１３（５）：５５９－５６８頁（１９９３年）
【非特許文献４３】Ｓａｒａｇｏｖｉら、Ｔｒｅｎｄｓ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｓｃｉ．２１：９３－９８頁（２０００年）
【非特許文献４４】Ｋｒｙｇｅｒら、Ｊ．Ｈａｎｄ Ｓｕｒｇ．（Ａｍ．）、２６：６３５－６４４頁（２００１年）
【非特許文献４５】Ｒａｍｅｒら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ、１１：８３７－８４６頁（１９９９年）
【非特許文献４６】Ｓｅｖｃｉｋら、Ｐａｉｎ、１１５：１２８－１４１頁（２００５年）

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１３】
（発明の要旨）
本開示は、ＮＧＦと結合しそれを中和できる、結合タンパク質の新規ファミリー、ＣＤＲグラフト化抗体、哺乳動物化（例えば、ウシ化（ｂｏｖａｎｉｚｅｄ）、ラクダ化、イヌ化、ウマ化（ｅｑｕｉｎｉｚｅｄ）、ネコ化（ｆｅｌｉｎｉｚｅｄ）、ヒト化など）抗体およびその断片を提供する。本開示は、ＮＧＦを阻害するための治療手段を提供し、またＮＧＦのレベルの増大と関連している疾患、特に、炎症性障害を治療するための組成物および方法を提供する。
【課題を解決するための手段】
【００１４】
一態様では、本開示は、ドナー種から得た抗体に由来する配列と全体的にまたは実質的に同一である超可変領域配列および標的種から得た抗体の配列と全体的にまたは実質的に同一である定常領域配列を含む結合タンパク質またはその断片を提供し、ここで、ドナー種および標的種は異なっている。結合タンパク質は、例えばＮＧＦと特異的に結合し、重鎖可変領域を有する重鎖および軽鎖可変領域を有する軽鎖を有し得る。
【００１５】
別の態様では、本開示は、ＮＧＦと特異的に結合し、重鎖可変領域を有する重鎖および軽鎖可変領域を有する軽鎖を有する結合タンパク質を提供し、ここで、重鎖可変領域は、配列番号２、配列番号６、配列番号１０、配列番号１４、配列番号１８、配列番号２２、配列番号２５、配列番号２７、配列番号２９、配列番号３１、配列番号３３、配列番号３５、配列番号３７、配列番号３９、配列番号４１、配列番号４３、配列番号１６５、配列番号１６６、配列番号１６７、配列番号１６８、配列番号１６９、配列番号１７０、配列番号１７７、配列番号１７９、配列番号１８０、配列番号１８２、配列番号１８４、配列

番号１８５、配列番号１８７、配列番号１８９、配列番号１９０、配列番号１９２、配列番号１９５、配列番号１９７、配列番号１９９、配列番号２０１、配列番号２０３、配列番号２０６、配列番号２０７からなる群から選択される配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む。

【００１６】

別の態様では、本開示は、ＮＧＦと特異的に結合し、重鎖可変領域を有する重鎖および軽鎖可変領域を有する軽鎖を有する結合タンパク質を提供し、ここで、軽鎖可変領域は、配列番号４、配列番号８、配列番号１２、配列番号１６、配列番号２０、配列番号２４、配列番号２６、配列番号２８、配列番号３０、配列番号３２、配列番号３４、配列番号３６、配列番号３８、配列番号４０、配列番号４２および配列番号４４、配列番号１７１、配列番号１７２、配列番号１７３、配列番号１７４、配列番号１７５、配列番号１７６、配列番号１８１、配列番号１８３、配列番号１８６、配列番号１８８、配列番号１９１、配列番号１９３、配列番号１９４、配列番号１９６、配列番号１９８、配列番号２００、配列番号２０２からなる群から選択される配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む。

【００１７】

本開示の結合タンパク質は、ａ）配列番号５５、５６、５７、６１、６２、６３、６７、６８、６９、７３、７４、７５、７９、８０、８１からなる重鎖ＣＤＲおよび前記配列のうち１つと少なくとも５０％の配列同一性を有する修飾ＣＤＲアミノ酸配列、ならびにｂ）配列番号５８、５９、６０、６４、６５、６６、７０、７１、７２、７６、７７、７８、８２、８３、８４からなる軽鎖ＣＤＲおよび前記配列のうち１つと少なくとも５０％の配列同一性を有する修飾ＣＤＲアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも１つのＣＤＲを含み得る。あるいは、本開示の結合タンパク質は、ａ）配列番号５５、５６、５７、６１、６２、６３、６７、６８、６９、７３、７４、７５、７９、８０、８１からなる重鎖ＣＤＲおよび前記配列のうち１つと少なくとも７０％の配列同一性を有する修飾ＣＤＲアミノ酸配列、ならびにｂ）配列番号５８、５９、６０、６４、６５、６６、７０、７１、７２、７６、７７、７８、８２、８３、８４からなる軽鎖ＣＤＲおよび前記配列のうち１つと少なくとも７０％の配列同一性を有する修飾ＣＤＲアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも１つのＣＤＲを含み得る。本開示の結合タンパク質は、ａ）配列番号５５、５６、５７、６１、６２、６３、６７、６８、６９、７３、７４、７５、７９、８０、８１からなる重鎖ＣＤＲおよび前記配列のうち１つと少なくとも８０％の配列同一性を有する修飾ＣＤＲアミノ酸配列、ならびにｂ）配列番号５８、５９、６０、６４、６５、６６、７０、７１、７２、７６、７７、７８、８２、８３、８４からなる軽鎖ＣＤＲおよび前記配列のうち１つと少なくとも８０％の配列同一性を有する修飾ＣＤＲアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも１つのＣＤＲを含み得る。本開示の結合タンパク質は、ａ）配列番号５５、５６、５７、６１、６２、６３、６７、６８、６９、７３、７４、７５、７９、８０、８１からなる重鎖ＣＤＲおよび前記配列のうち１つと少なくとも９０％の配列同一性を有する修飾ＣＤＲアミノ酸配列、ならびにｂ）配列番号５８、５９、６０、６４、６５、６６、７０、７１、７２、７６、７７、７８、８２、８３、８４からなる軽鎖ＣＤＲおよび前記配列のうち１つと少なくとも９０％の配列同一性を有する修飾ＣＤＲアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも１つのＣＤＲを含み得る。

【００１８】

本開示の結合タンパク質は、ＩｇＭ定常ドメイン、ＩｇＧ４定常ドメイン、ＩｇＧｌ定常ドメイン、ＩｇＥ定常ドメイン、ＩｇＧ２定常ドメイン、ＩｇＧ３定常ドメインおよびＩｇＡ定常ドメインからなる群から選択される重鎖ヒト免疫グロブリン定常ドメインを含み得る。あるいは、本開示の結合タンパク質は、ＩｇＭ定常ドメイン、ＩｇＧ４定常ドメイン、ＩｇＧ１定常ドメイン、ＩｇＥ定常ドメイン、ＩｇＧ２定常ドメイン、ＩｇＧ３定

常ドメインおよびＩｇＡ定常ドメインからなる群から選択される重鎖イヌ免疫グロブリン定常ドメインを含み得る。あるいは、本開示の結合タンパク質は、重鎖ネコ免疫グロブリン定常ドメインを含み得る。あるいは、本開示の結合タンパク質は、重鎖ウマ免疫グロブリン定常ドメインを含み得る。本開示の結合タンパク質は、配列番号５２および配列番号５４からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する定常領域をさらに含み得る。

【００１９】

上記結合タンパク質のいずれも、免疫グロブリン分子、ジスルフィド結合されたＦｖ、モノクローナル抗体、ｓｃＦｖ、キメラ抗体、単一ドメイン抗体、ＣＤＲグラフト化抗体、ダイアボディー、ヒト化抗体、イヌ化ｍＡｂ、イヌｍＡｂ、ネコｍＡｂ、ネコ化ｍＡｂ、ウマｍＡｂ、ウマ化ｍＡｂ、多重特異性抗体、Ｆａｂ、二重特異性抗体、ＤＶＤ－Ｉｇ、Ｆａｂ’、二特異性抗体、Ｆ（ａｂ’）２およびＦｖからなる群から選択され得る。

【００２０】

上記結合タンパク質のいずれも、ＮＧＦの生物学的機能を調節できる、またはＮＧＦを中和できる可能性がある。

【００２１】

上記結合タンパク質のいずれも、ＴＦ－１細胞増殖アッセイまたはｐＥＲＫおよびＰａｔｈｈｕｎｔｅｒアッセイにおいて測定される、少なくとも約１０ｎＭ、少なくとも約５ｎＭ、少なくとも約１ｎＭ、少なくとも約０．５ｎＭ、少なくとも約０．１ｎＭ、少なくとも約０．０５ｎＭ、少なくとも約０．０１ｎＭまたは少なくとも約０．００１ｎＭの効力（IC_{50}）でＮＧＦを中和できる可能性がある。

【００２２】

上記結合タンパク質のいずれも、表面プラズモン共鳴によって測定される、少なくとも約$10^{2}M^{-1}s^{-1}$、少なくとも約$10^{3}M^{-1}s^{-1}$、少なくとも約$10^{4}M^{-1}s^{-1}$、少なくとも約$10^{5}M^{-1}s^{-1}$または少なくとも約$10^{6}M^{-1}s^{-1}$または少なくとも約$10^{7}M^{-1}s^{-1}$のＮＧＦの結合速度定数（K_{on}）を有し得る。

【００２３】

上記結合タンパク質のいずれも、表面プラズモン共鳴によって測定される、最大で約$10^{-3}s^{-1}$、最大で約$10^{-4}s^{-1}$、最大で約$10^{-5}s^{-1}$、最大で約$10^{-6}s^{-1}$および最大で約$10^{-7}s^{-1}$からなる群から選択されるＮＧＦの解離速度定数（K_{off}）を有し得る。

【００２４】

上記結合タンパク質のいずれも、最大で約$10^{-7}M$、最大で約$10^{-8}M$、最大で約$10^{-9}M$、最大で約$10^{-10}M$、最大で約$10^{-11}M$、最大で約$10^{-12}M$、最大で約$10^{-13}M$および最大で約$10^{-14}M$からなる群から選択されるＮＧＦの解離定数（K_{D}）を有し得る。解離定数（K_{D}）は、例えば、約$1\times10^{-9}M$、約$1\times10^{-10}M$、約$3.14\times10^{-10}M$、約$1\times10^{-11}M$、約$2.37\times10^{-11}M$、約$1\times10^{-12}M$、約$1\times10^{-13}M$および約$3.3\times10^{-14}M$であり得る。

【００２５】

上記結合タンパク質のいずれも、免疫接着分子、造影剤、治療薬および細胞傷害性薬剤からなる群から選択される薬剤をさらに含み得る。薬剤は、例えば、放射標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁性標識およびビオチンからなる群から選択される造影剤であり得る。造影剤は、３Ｈ、１４Ｃ、３５Ｓ、９０Ｙ、９９Ｔｃ、１１１Ｉｎ、１２５Ｉ、１３１Ｉ、１７７Ｌｕ、１６６Ｈｏおよび１５３Ｓｍからなる群から選択される放射標識であり得る。あるいは、薬剤は、例えば、代謝拮抗剤、アルキル化剤、抗生物質、増殖因子、サイトカイン、血管新生抑制薬、有糸分裂阻害剤、アントラサイクリン、毒素およびアポトーシス薬などの治療薬または細胞傷害性薬剤であり得る。

【００２６】

結合タンパク質のいずれも、マウス、イヌ、ネコ、ヒトまたはウマグリコシル化パターンを有し得る。

【００２７】

結合タンパク質のいずれも、結晶化結合タンパク質であり得る。結晶化結合タンパク質は、担体を含まない医薬放出制御結晶化結合タンパク質であり得る。

【００２８】

別の態様では、本開示は、上記結合タンパク質のいずれかをコードする単離核酸を提供する。単離核酸は、ＲＮＡまたはＤＮＡを含み得る。

【００２９】

別の態様では、本開示は、重鎖可変領域を有する重鎖および軽鎖可変領域を有する軽鎖を有する、ＮＧＦと特異的に結合する結合タンパク質をコードする核酸配列を含む、またはこれに相補的である単離核酸を提供し、ここで、重鎖可変領域は、配列番号１、５、９、１３、１７および２１からなる群から選択される配列と少なくとも９０％の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる。

【００３０】

別の態様では、本開示は、重鎖可変領域を有する重鎖および軽鎖可変領域を有する軽鎖を有する、ＮＧＦと特異的に結合する結合タンパク質をコードする核酸配列を含む、またはこれに相補的である単離核酸を提供し、ここで、軽鎖可変領域は、配列番号３、７、１１、１５、１９および２３からなる群から選択される配列と少なくとも９０％の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる。

【００３１】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載されたＮＧＦと特異的に結合する結合タンパク質をコードする単離核酸を含む組換えベクターを提供する。本開示に従う組換えベクターは、ｐｃＤＮＡ、ｐＴＴ、ｐＴＴ３、ｐＥＦＢＯＳ、ｐＢＶ、ｐＪＶまたはｐＢＪを含み得る。また、このような組換えベクターを含む宿主細胞も提供される。宿主細胞は、例えば、真核細胞または原核細胞であり得る。宿主細胞は、原生生物細胞；動物細胞、それだけには限らないが、哺乳動物細胞、鳥類細胞など；昆虫細胞、それだけには限らないが、昆虫Ｓｆ９細胞など；植物細胞；または真菌細胞であり得る。宿主細胞は、例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞であり得る。宿主細胞は、ＣＨＯ細胞またはＣＯＳ細胞であり得る。また、本明細書に記載されたＮＧＦと特異的に結合する結合タンパク質を産生する単離細胞株も提供される。

【００３２】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載されたＮＧＦと特異的に結合する結合タンパク質および薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を含む医薬組成物または診断用組成物を提供する。医薬組成物は、ＮＧＦ結合タンパク質の治療上有効な量を含み得る。

【００３３】

別の態様では、本開示は、結合タンパク質の放出のための組成物であって、（ａ）本明細書に記載されたＮＧＦと特異的に結合する結合タンパク質および薬学的に許容される担体、賦形剤または希釈剤を含む組成物、ならびに（ｂ）少なくとも１種のポリマー担体を含む組成物を提供する。

【００３４】

別の態様では、本開示は、対象に、本明細書に記載されたＮＧＦと特異的に結合する結合タンパク質の治療上有効な量を投与するステップを含む、ＮＧＦ活性が有害である障害を患っている対象（例えば、イヌ、ネコ、ウマ、フェレットなど）において、ＮＧＦ活性を低減する方法を提供する。

【００３５】

別の態様では、本開示は、（ａ）マウスモノクローナル抗体を製造するステップ、（ｂ）ハイブリドーマ上清をスクリーニングするステップ、（ｃ）ドナーＣＤＲを標的フレームワークへグラフトするステップおよび（ｄ）標的抗体のフレームワーク領域に復帰突然変異を導入するステップを含む、抗ＮＧＦ抗体を製造する方法を提供し、ここで、抗ＮＧＦ抗体は、ドナー種から得た抗体に由来する配列と全体的にまたは実質的に同一である超可変領域配列、標的種から得た抗体の配列と全体的にまたは実質的に同一である定常領域配列を含み、ドナー種および標的種は異なっている。本方法では、ドナーは、例えば、マ

ウスであり得、標的は、非マウス哺乳動物、それだけには限らないが、ウシ、イヌ、ウマまたはネコ哺乳動物、またはラクダヤギ、ヒトもしくはヒツジなどであり得る。

【００３６】

別の態様では、本開示は、ＮＧＦと特異的に結合する上記結合タンパク質のいずれかを含む試薬を提供するステップ、結合タンパク質がサンプル中の任意のＮＧＦと結合するのに十分な時間および条件下で、結合タンパク質をサンプルと組み合わせるステップ、結合タンパク質のＮＧＦとの特異的結合に基づいてサンプル中のＮＧＦの存在または量を決定するステップを含む、サンプル中のＮＧＦの存在または量を検出する方法を提供する。本方法では、結合タンパク質は、固相支持体上に固定されていてもよく、または固定化できてもよい。本方法では、結合タンパク質は、検出可能な標識、例えば、それだけには限らないが、放射標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁性標識およびビオチンなどの造影剤などにカップリングされ得る。造影剤は、例えば、３Ｈ、１４Ｃ、３５Ｓ、９０Ｙ、９９Ｔｃ、１１１Ｉｎ、１２５Ｉ、１３１Ｉ、１７７Ｌｕ、１６６Ｈｏおよび１５３Ｓｍからなる群から選択される放射標識であり得る。

【００３７】

別の態様では、本開示は、サンプル中のＮＧＦの存在または量を検出するためのイムノアッセイ装置であって、固相支持体上に固定化されている、ＮＧＦと特異的に結合する上記結合タンパク質のいずれかを含む装置を提供する。

【００３８】

別の態様では、本開示は、サンプル中のＮＧＦの存在または量を検出するためのキットであって、ＮＧＦと特異的に結合する上記結合タンパク質のいずれかを含む免疫試薬（ｉｍｍｕｎｏｒｅｇａｍｅｔ）および免疫試薬とＮＧＦとの特異的結合に基づいてサンプル中のＮＧＦの存在または量を決定するための使用説明書を含むキットを提供する。本キットでは、結合タンパク質は、固相支持体上に固定化されていてもよい。

【００３９】

なおさらに別の態様では、本開示は、

配列番号２、配列番号６、配列番号１０、配列番号１４、配列番号１８、配列番号２２、配列番号２５、配列番号２７、配列番号２９、配列番号３１、配列番号３３、配列番号３５、配列番号３７、配列番号３９、配列番号４１、配列番号４３、配列番号１６５、配列番号１６６、配列番号１６７、配列番号１６８、配列番号１６９、配列番号１７０、配列番号１７７、配列番号１７９、配列番号１８０、配列番号１８２、配列番号１８４、配列番号１８５、配列番号１８７、配列番号１８９、配列番号１９０、配列番号１９２、配列番号１９５、配列番号１９７、配列番号１９９、配列番号２０１、配列番号２０３、配列番号２０６、配列番号２０７からなる群から選択される配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および

配列番号４、配列番号８、配列番号１２、配列番号１６、配列番号２０、配列番号２４、配列番号２６、配列番号２８、配列番号３０、配列番号３２、配列番号３４、配列番号３６、配列番号３８、配列番号４０、配列番号４２および配列番号４４、配列番号１７１、配列番号１７２、配列番号１７３、配列番号１７４、配列番号１７５、配列番号１７６、配列番号１８１、配列番号１８３、配列番号１８６、配列番号１８８、配列番号１９１、配列番号１９３、配列番号１９４、配列番号１９６、配列番号１９８、配列番号２００、配列番号２０２からなる群から選択される配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域

を含む、抗体またはその抗原結合断片に関する。

【００４０】

より詳しくは、上記の抗体は、ａ）配列番号５５、５６、５７、６１、６２、６３、６７、６８、６９、７３、７４、７５、７９、８０、８１からなる重鎖ＣＤＲおよび前記配列のうち１つと少なくとも５０％の配列同一性を有する修飾ＣＤＲアミノ酸配列、ならび

にｂ）配列番号５８、５９、６０、６４、６５、６６、７０、７１、７２、７６、７７、７８、８２、８３、８４からなる軽鎖ＣＤＲおよび前記配列のうち１つと少なくとも５０％の配列同一性を有する修飾ＣＤＲアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも１つのＣＤＲを含み得る。あるいは、上記の抗体は、ａ）配列番号５５、５６、５７、６１、６２、６３、６７、６８、６９、７３、７４、７５、７９、８０、８１からなる重鎖ＣＤＲおよび前記配列のうち１つと少なくとも７０％の配列同一性を有する修飾ＣＤＲアミノ酸配列、ならびにｂ）配列番号５８、５９、６０、６４、６５、６６、７０、７１、７２、７６、７７、７８、８２、８３、８４からなる軽鎖ＣＤＲおよび前記配列のうち１つと少なくとも７０％の配列同一性を有する修飾ＣＤＲアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも１つのＣＤＲを含み得る。あるいは、上記の抗体は、ａ）配列番号５５、５６、５７、６１、６２、６３、６７、６８、６９、７３、７４、７５、７９、８０、８１からなる重鎖ＣＤＲおよび前記配列のうち１つと少なくとも８０％の配列同一性を有する修飾ＣＤＲアミノ酸配列、ならびにｂ）配列番号５８、５９、６０、６４、６５、６６、７０、７１、７２、７６、７７、７８、８２、８３、８４からなる軽鎖ＣＤＲおよび前記配列のうち１つと少なくとも８０％の配列同一性を有する修飾ＣＤＲアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも１つのＣＤＲを含み得る。あるいは、上記の抗体は、ａ）配列番号５５、５６、５７、６１、６２、６３、６７、６８、６９、７３、７４、７５、７９、８０、８１からなる重鎖ＣＤＲおよび前記配列のうち１つと少なくとも９０％の配列同一性を有する修飾ＣＤＲアミノ酸配列、ならびにｂ）配列番号５８、５９、６０、６４、６５、６６、７０、７１、７２、７６、７７、７８、８２、８３、８４からなる軽鎖ＣＤＲおよび前記配列のうち１つと少なくとも９０％の配列同一性を有する修飾ＣＤＲアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも１つのＣＤＲを含み得る。

【００４１】

上記の抗体は、ＩｇＭ定常ドメイン、ＩｇＧ４定常ドメイン、ＩｇＧ１定常ドメイン、ＩｇＥ定常ドメイン、ＩｇＧ２定常ドメイン、ＩｇＧ３定常ドメインおよびＩｇＡ定常ドメインからなる群から選択される重鎖ヒト免疫グロブリン定常ドメインを含み得る。より詳しくは、抗体は、ＩｇＭ定常ドメイン、ＩｇＧ４定常ドメイン、ＩｇＧ１定常ドメイン、ＩｇＥ定常ドメイン、ＩｇＧ２定常ドメイン、ＩｇＧ３定常ドメインおよびＩｇＡ定常ドメインからなる群から選択される重鎖イヌ免疫グロブリン定常ドメインを含み得る。あるいは、抗体は、重鎖ネコ免疫グロブリン定常ドメインを含む。さらにあるいは、抗体は、重鎖ウマ免疫グロブリン定常ドメインを含む。さらに、上記の抗体は、配列番号５２および配列番号５４からなる群から選択されたアミノ酸配列を有する定常領域を含み得る。さらに、上記の抗体は、免疫グロブリン分子、ジスルフィド結合されたＦｖ、モノクローナル抗体、ｓｃＦｖ、キメラ抗体、単一ドメイン抗体、ＣＤＲグラフト化抗体、ダイアボディー、ヒト化抗体、イヌ化ｍＡｂ、イヌｍＡｂ、ネコｍＡｂ、ネコ化ｍＡｂ、ウマｍＡｂ、ウマ化ｍＡｂ、多重特異性抗体、Ｆａｂ、二重特異性抗体、ＤＶＤ－Ｉｇ、Ｆａｂ’、二特異性抗体、Ｆ（ａｂ’）$_2$およびＦｖからなる群から選択される。

【００４２】

別の態様では、上記で同定された抗体は、ＮＧＦの生物学的機能を調節できる。

【００４３】

なおさらなる別の態様では、本開示は、上記の抗体をコードする単離核酸に関する。

【００４４】

別の態様では、本発明は、配列番号３７の配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号３８の配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体またはその抗原結合断片に関する。上記の抗体は、ＩｇＭ定常ドメイン、ＩｇＧ４定常ドメイン、ＩｇＧ１定常ドメイン、ＩｇＥ定常ドメイン、ＩｇＧ２定常ドメイン、ＩｇＧ３定常ドメインおよびＩｇＡ定常ドメインからなる群から選択される重鎖ヒト免疫グロブリン定常ドメインを含み得る。より詳しくは、抗体は、ＩｇＭ定常ドメイン、ＩｇＧ４定常ドメイン、ＩｇＧ１定常ドメイン、

ＩｇＥ定常ドメイン、ＩｇＧ２定常ドメイン、ＩｇＧ３定常ドメインおよびＩｇＡ定常ドメインからなる群から選択される重鎖イヌ免疫グロブリン定常ドメインを含み得る。あるいは、抗体は、重鎖ネコ免疫グロブリン定常ドメインを含む。さらにあるいは、抗体は、重鎖ウマ免疫グロブリン定常ドメインを含む。さらに、上記の抗体は、配列番号５２および配列番号５４からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する定常領域を含み得る。さらに、上記の抗体は、免疫グロブリン分子、ジスルフィド結合されたＦｖ、モノクローナル抗体、ｓｃＦｖ、キメラ抗体、単一ドメイン抗体、ＣＤＲグラフト化抗体、ダイアボディー、ヒト化抗体、イヌ化ｍＡｂ、イヌｍＡｂ、ネコｍＡｂ、ネコ化ｍＡｂ、ウマｍＡｂ、ウマ化ｍＡｂ、多重特異性抗体、Ｆａｂ、二重特異性抗体、ＤＶＤ－Ｉｇ、Ｆａｂ’、二特異性抗体、Ｆ（ａｂ’）$_2$およびＦｖからなる群から選択される。

【００４５】

別の態様では、上記で同定された抗体は、ＮＧＦの生物学的機能を調節できる。

【００４６】

なおさらなる別の態様では、本開示は、上記の抗体をコードする単離核酸に関する。

【００４７】

別の態様では、本発明は、配列番号１９２の配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号１９３の配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体またはその抗原結合断片に関する。上記の抗体は、ＩｇＭ定常ドメイン、ＩｇＧ４定常ドメイン、ＩｇＧ１定常ドメイン、ＩｇＥ定常ドメイン、ＩｇＧ２定常ドメイン、ＩｇＧ３定常ドメインおよびＩｇＡ定常ドメインからなる群から選択される重鎖ヒト免疫グロブリン定常ドメインを含み得る。より詳しくは、抗体は、ＩｇＭ定常ドメイン、ＩｇＧ４定常ドメイン、ＩｇＧ１定常ドメイン、ＩｇＥ定常ドメイン、ＩｇＧ２定常ドメイン、ＩｇＧ３定常ドメインおよびＩｇＡ定常ドメインからなる群から選択される重鎖イヌ免疫グロブリン定常ドメインを含み得る。あるいは、抗体は、重鎖ネコ免疫グロブリン定常ドメインを含む。さらにあるいは、抗体は、重鎖ウマ免疫グロブリン定常ドメインを含む。さらに、上記の抗体は、配列番号５２および配列番号５４からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する定常領域を含み得る。さらに、上記の抗体は、免疫グロブリン分子、ジスルフィド結合されたＦｖ、モノクローナル抗体、ｓｃＦｖ、キメラ抗体、単一ドメイン抗体、ＣＤＲグラフト化抗体、ダイアボディー、ヒト化抗体、イヌ化ｍＡｂ、イヌｍＡｂ、ネコｍＡｂ、ネコ化ｍＡｂ、ウマｍＡｂ、ウマ化ｍＡｂ、多重特異性抗体、Ｆａｂ、二重特異性抗体、ＤＶＤ－Ｉｇ、Ｆａｂ’、二特異性抗体、Ｆ（ａｂ’）$_2$およびＦｖからなる群から選択される。

【００４８】

別の態様では、上記で同定された抗体は、ＮＧＦの生物学的機能を調節できる。

【００４９】

なおさらなる別の態様では、本開示は、上記の抗体をコードする単離核酸に関する。

【００５０】

なおさらなる別の態様では、本開示は、上記の抗体のうち少なくとも１種および薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を含む医薬組成物または診断用組成物に関する。より詳しくは、医薬組成物または診断用組成物は、上記の抗体のうち少なくとも１種の治療上有効な量を含み得る。さらに、医薬組成物または診断用組成物は、少なくとも１種の防腐剤を含み得る。使用され得る少なくとも１種の防腐剤の例として、メチルパラベン、プロピルパラベン、ベンジルアルコール、クロロブタノールまたは塩化ベンザルコニウムがある。

【００５１】

医薬組成物は、約７．０より高いｐＨを有し得る。あるいは、医薬組成物は、約６．８から約８．２の間のｐＨを有し得る。あるいは、医薬組成物は、約７．２から約７．８の間のｐＨを有し得る。さらにあるいは、医薬組成物のｐＨは、約７．４から約７．６の間であり得る。さらにあるいは、医薬組成物のｐＨは、約６．８、６．９、７．０、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、８．０、８．１

または８．２であり得る。
【００５２】
本開示の医薬組成物は、静脈内にまたは皮下に投薬された場合に、約８．０日から約１５．０日の半減期を有し得る。あるいは、本発明の医薬組成物は、約１０．０日から約１３．０日の半減期を有し得る。さらにあるいは、本発明の医薬組成物は、約８．０日、約８．５日、約９．０日、約９．５日、約１０．０日、約１０．５日、約１１．０日、約１１．５日、約１２．０日、約１２．５日、約１３．０日、約１３．５日、約１４．０日、約１４．５日または約１５．０日の半減期を有し得る。
【００５３】
別の態様では、本開示は、上記の抗体またはその抗原結合断片のうち少なくとも１種のその抗原結合断片の抗体の治療上有効な量を対象に投与するステップを含む、ＮＧＦ活性が有害である障害を患っている対象において、ＮＧＦ活性を低減する方法に関する。
【図面の簡単な説明】
【００５４】
【図１】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９７２ＶＨヌクレオチド配列（配列番号１）を示す図である。
【図２】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９７２ＶＨアミノ酸配列（配列番号２）を示す図である。
【図３】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９７２ＶＬヌクレオチド配列（配列番号３）を示す図である。
【図４】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９７２ＶＬアミノ酸（配列番号４）を示す図である。
【図５】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９７３ＶＨヌクレオチド配列（配列番号５）を示す図である。
【図６】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９７３ＶＨアミノ酸（配列番号６）を示す図である。
【図７】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９７３ＶＬヌクレオチド配列（配列番号７）を示す図である。
【図８】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９７３ＶＬアミノ酸（配列番号８）を示す図である。
【図９】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９７７ＶＨヌクレオチド配列（配列番号９）を示す図である。
【図１０】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９７７ＶＨアミノ酸（配列番号１０）を示す図である。
【図１１】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９７７ＶＬヌクレオチド配列（配列番号１１）を示す図である。
【図１２】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９７７ＶＬアミノ酸配列（配列番号１２）を示す図である。
【図１３】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９８０ＶＨヌクレオチド配列（配列番号１３）を示す図である。
【図１４】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９８０ＶＨアミノ酸（配列番号１４）を示す図である。
【図１５】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９８０ＶＬヌクレオチド配列（配列番号１５）を示す図である。
【図１６】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９８０ＶＬアミノ酸配列（配列番号１６）を示す図である。
【図１７】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９８１ＶＨヌクレオチド配列（配列番号１７）を示す図である。
【図１８】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９８１ＶＨアミノ酸（配列番号１８）を示す図である。

【図１９】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９８１ＶＬヌクレオチド配列（配列番号１９）を示す図である。
【図２０】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９８１ＶＬアミノ酸（配列番号２０）を示す図である。
【図２１】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９８２ＶＨヌクレオチド配列（配列番号２１）を示す図である。
【図２２】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９８２ＶＨアミノ酸（配列番号２２）を示す図である。
【図２３】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９８２ＶＬヌクレオチド配列（配列番号２３）を示す図である。
【図２４】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９８２ＶＬアミノ酸配列（配列番号２４）を示す図である。
【図２５】イヌＩｇフレームワーク上にＣＤＲグラフト化することによってイヌ化されたマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂ（ＣＤＲには下線が引かれている）、配列番号２５（７２．１ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図２６】イヌＩｇフレームワーク上にＣＤＲグラフト化することによってイヌ化されたマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂ（ＣＤＲには下線が引かれている）、配列番号２６（７２．１ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図２７】イヌＩｇフレームワーク上にＣＤＲグラフト化することによってイヌ化されたマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂ（ＣＤＲには下線が引かれている）、配列番号２７（７３．１ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図２８】イヌＩｇフレームワーク上にＣＤＲグラフト化することによってイヌ化されたマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂ（ＣＤＲには下線が引かれている）、配列番号２８（７３．１ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図２９】イヌＩｇフレームワーク上にＣＤＲグラフト化することによってイヌ化されたマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂ（ＣＤＲには下線が引かれている）、配列番号２９（７７．１ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図３０】イヌＩｇフレームワーク上にＣＤＲグラフト化することによってイヌ化されたマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂ（ＣＤＲには下線が引かれている）、配列番号３０（７７．１ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図３１Ａ】イヌＩｇフレームワーク上にＣＤＲグラフト化することによってイヌ化されたマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂ（ＣＤＲには下線が引かれている）、配列番号３１（８１．１ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図３１Ｂ】イヌＩｇフレームワーク上にＣＤＲグラフト化することによってイヌ化されたマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂ（ＣＤＲには下線が引かれている）、配列番号１７７（８１．１Ｂ　ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図３２】イヌＩｇフレームワーク上にＣＤＲグラフト化することによってイヌ化されたマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂ（ＣＤＲには下線が引かれている）、配列番号３２（８１．１ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図３３】イヌＩｇフレームワーク上にＣＤＲグラフト化することによってイヌ化されたマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂ（ＣＤＲには下線が引かれている）、配列番号３３（８２．１ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図３４】イヌＩｇフレームワーク上にＣＤＲグラフト化することによってイヌ化されたマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂ（ＣＤＲには下線が引かれている）、配列番号３４（８２．１ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図３５】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号３５（７２．２ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図３６Ａ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号３６（７２．２ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図３６Ｂ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ

化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１７９（７２．３ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図３６Ｃ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１８０（７２．４ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図３６Ｄ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１８１（７２．４ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図３７】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号３７（７３．２ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図３８Ａ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号３８（７３．２ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図３８Ｂ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１８２（７３．４ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図３８Ｃ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１８３（７３．４ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図３９】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号３９（７７．２ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図４０Ａ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号４０（７７．２ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図４０Ｂ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１８４（７７．３ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図４０Ｃ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１８５（７７．４ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図４０Ｄ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１８６（７７．４ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図４１】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号４１（８１．２ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図４２Ａ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号４２（８１．２ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図４２Ｂ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１８７（８１．４ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図４２Ｃ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１８８（８１．４ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図４２Ｄ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１８９（８１．２Ｂ　ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図４２Ｅ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１９０（８１．４Ｂ　ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図４２Ｆ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号２０６（８１．５Ｂ　ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図４２Ｇ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号２０７（８１．６Ｂ　ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図４３】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号４３（８２．２ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図４４Ａ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号４４（８２．２ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図４４Ｂ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１９１（８２．３ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図４４Ｃ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１９２（８２．４ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図４４Ｄ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１９３（８２．４ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図４５】イヌＮＧＦをクローニングするためのプライマー配列、配列番号４５（ＮＧＦ

－Ｄｏｇ－Ｓプライマー）を示す図である。
【図４６】イヌＮＧＦをクローニングするためのプライマー配列、配列番号４６（ＮＧＦ－Ｄｏｇ－ＡＳプライマー）を示す図である。
【図４７】イヌＮＧＦをクローニングするためのプライマー配列、配列番号４７（ＮＧＦ－ｄ－Ｅｃ－Ｓプライマー）を示す図である。
【図４８】イヌＮＧＦをクローニングするためのプライマー配列、配列番号４８（ＮＧＦ－ｄ－Ｅｃ－ＡＳプライマー）を示す図である。
【図４９】イヌＮＧＦ　Ｃ末端６Ｈｉｓ融合ヌクレオチド配列、配列番号４９を示す図である。
【図５０】イヌＮＧＦ　Ｃ末端６－Ｈｉｓアミノ酸配列、配列番号５０を示す図である。
【図５１】イヌＩｇＧ定常領域ヌクレオチド配列、配列番号５１を示す図である。
【図５２】イヌＩｇＧ定常領域アミノ酸配列、配列番号５２を示す図である。
【図５３】イヌκ定常領域ヌクレオチド配列、配列番号５３を示す図である。
【図５４】イヌκ定常領域アミノ酸配列、配列番号５４を示す図である。
【図５５】相補性決定領域、配列番号５５（７２．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ１）を示す図である。
【図５６】相補性決定領域、配列番号５６（７２．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ２）を示す図である。
【図５７】相補性決定領域、配列番号５７（７２．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ３）を示す図である。
【図５８】相補性決定領域、配列番号５８（７２．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ１）を示す図である。
【図５９】相補性決定領域、配列番号５９（７２．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ２）を示す図である。
【図６０】相補性決定領域、配列番号６０（７２．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ３）を示す図である。
【図６１】相補性決定領域、配列番号６１（７３．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ１）を示す図である。
【図６２】相補性決定領域、配列番号６２（７３．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ２）を示す図である。
【図６３】相補性決定領域、配列番号６３（７３．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ３）を示す図である。
【図６４】相補性決定領域、配列番号６４（７３．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ１）を示す図である。
【図６５】相補性決定領域、配列番号６５（７３．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ２）を示す図である。
【図６６】相補性決定領域、配列番号６６（７３．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ３）を示す図である。
【図６７】相補性決定領域、配列番号６７（７７．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ１）を示す図である。
【図６８】相補性決定領域、配列番号６８（７７．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ２）を示す図である。
【図６９】相補性決定領域、配列番号６９（７７．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ３）を示す図である。
【図７０】相補性決定領域、配列番号７０（７７．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ１）を示す図である。
【図７１】相補性決定領域、配列番号７１（７７．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ２）を示す図である。
【図７２】相補性決定領域、配列番号７２（７７．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ３）を示す図である。

【図７３】相補性決定領域、配列番号７３（８１．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ１）を示す図である。
【図７４】相補性決定領域、配列番号７４（８１．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ２）を示す図である。
【図７５】相補性決定領域、配列番号７５（８１．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ３）を示す図である。
【図７６】相補性決定領域、配列番号７６（８１．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ１）を示す図である。
【図７７】相補性決定領域、配列番号７７（８１．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ２）を示す図である。
【図７８】相補性決定領域、配列番号７８（８１．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ３）を示す図である。
【図７９】相補性決定領域、配列番号７９（８２．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ１）を示す図である。
【図８０】相補性決定領域、配列番号８０（８２．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ２）を示す図である。
【図８１】相補性決定領域、配列番号８１（８２．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ３）を示す図である。
【図８２】相補性決定領域、配列番号８２（８２．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ１）を示す図である。
【図８３】相補性決定領域、配列番号８３（８２．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ２）を示す図である。
【図８４】相補性決定領域、配列番号８４（８２．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ３）を示す図である。
【図８５】ヒトβＮＧＦの配列（配列番号８５）を示す図である。
【図８６－１】表１２中に示される配列を示す図である。
【図８６－２】表１２中に示される配列を示す図である。
【図８６－３】表１２中に示される配列を示す図である。
【図８６－４】表１２中に示される配列を示す図である。
【図８６－５】表１２中に示される配列を示す図である。
【図８６－６】表１２中に示される配列を示す図である。
【図８７－１】表１３中に示される配列を示す図である。
【図８７－２】表１３中に示される配列を示す図である。
【図８７－３】表１３中に示される配列を示す図である。
【図８７－４】表１３中に示される配列を示す図である。
【図８８－１】表１４中に示される配列を示す図である。
【図８８－２】表１４中に示される配列を示す図である。
【図８８－３】表１４中に示される配列を示す図である。
【図８８－４】表１４中に示される配列を示す図である。
【図８８－５】表１４中に示される配列を示す図である。
【図８８－６】表１４中に示される配列を示す図である。
【図８８－７】表１４中に示される配列を示す図である。
【図８８－８】表１４中に示される配列を示す図である。
【図８９－１】表１５中に示される配列を示す図である。
【図８９－２】表１５中に示される配列を示す図である。
【図８９－３】表１５中に示される配列を示す図である。
【図８９－１】表１５Ａ中に示される配列を示す図である。
【図８９－２】表１５Ａ中に示される配列を示す図である。
【図８９－３】表１５Ａ中に示される配列を示す図である。
【図８９－４】表１５Ａ中に示される配列を示す図である。

【発明を実施するための形態】
【００５５】
本開示は、ＮＧＦ結合タンパク質、特に、抗ＮＧＦ抗体またはＮＧＦと結合するその抗原結合部分を記載する。本開示の種々の態様は、抗体および抗体断片およびこれらの医薬組成物ならびにこのような抗体および断片を作製するための核酸、組換え発現ベクターおよび宿主細胞に関する。インビトロまたはインビボのいずれかで、ヒトおよびイヌＮＧＦを検出するため、ヒトおよびイヌＮＧＦ活性を阻害するため、および遺伝子発現を調節するために本開示の抗体を使用する方法も、本開示によって包含される。
【００５６】
本明細書において別段の定義のない限り、本開示に関連して使用される科学用語および技術用語は、当業者によって一般に理解されている意味を有する。用語の意味および範囲は、明確でなければならないが、任意の潜在的に曖昧な事象では、本明細書において提供される定義は、任意の辞書の定義または外因性の定義を超える先例を取る。さらに、文脈によって別段に必要とされない限り、単数の用語は、複数を含むものとし、複数の用語は、単数を含むものとする。本出願では、「または」の使用は、別段の記述のない限り、「および／または」を意味する。さらに、用語「含んでいる（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」ならびに「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」および「含まれる（ｉｎｃｌｕｄｅｄ）」などのその他の形態の使用は、限定的ではない。また、「要素」または「成分」などの用語は、別段の記述のない限り、１つのユニットを含む要素および成分ならびに２以上のサブユニットを含む要素および成分の両方を包含する。
【００５７】
一般に、本明細書に記載される細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝子およびタンパク質および核酸化学ならびにハイブリダイゼーションに関連して使用される命名法ならびにその技術は、当技術分野で周知のものであり、当技術分野でよく使用されるものである。本開示の方法および技術は、別段の指示のない限り、当技術分野で周知の従来法に従って、また、本明細書を通じて引用され、論じられる種々の一般的な参考文献およびより特定の参考文献に記載されるように一般に実施される。酵素反応および精製技術は、製造業者の仕様書に従って、当技術分野で一般に遂行されるように、または本明細書に記載されるように実施される。本明細書に記載される分析化学、合成有機化学および医薬品および製薬化学に関連して使用される命名法ならびにその実験室手順および技術は、当技術分野で周知のものであり、当技術分野でよく使用されるものである。標準技術は、化学合成、化学分析、医薬品、製剤および送達ならびに患者の治療のために使用されている。
【００５８】
本開示がより容易に理解され得るように、選択用語および本明細書で使用される語句が以下に定義される。
【００５９】
Ａ．定義
用語「アクセプター」および「アクセプター抗体」とは、１つまたは複数のフレームワーク領域のアミノ酸配列の少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％または１００％を提供するまたはコードする抗体または核酸配列を指す。用語「アクセプター」とは、定常領域を提供するまたはコードする抗体アミノ酸または核酸配列を包含する。この用語はまた、１つまたは複数のフレームワーク領域および定常領域を提供するまたはコードする、抗体アミノ酸または核酸配列を包含する。例えば、用語「アクセプター」は、１つまたは複数のフレームワーク領域のアミノ酸配列の少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％または１００％を提供するまたはコードする、ヒト抗体アミノ酸または核酸配列を指すこともある。このようなアクセプターは、ヒト抗体の１つまたは複数の特定の位置で生じない、少なくとも１個、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも（ｌｅａｓｔ）４個、少なくとも５個または少なくとも１０個のアミノ酸残基を含有し得る

。アクセプターフレームワーク領域および／またはアクセプター定常領域は、例えば、生殖系列抗体遺伝子、成熟抗体遺伝子、機能性抗体（例えば、当技術分野で周知の抗体、開発中の抗体または市販の抗体）に由来するまたはそれらから得られる場合がある。

【００６０】

用語「アゴニスト」とは、対象とする分子と接触させると、アゴニストの不在下で観察された活性または機能の規模と比較して、分子の特定の活性または機能の規模の増大を引き起こすモジュレーターを指す。対象とする特定のアゴニストとして、それだけには限らないが、ＮＧＦポリペプチドまたはポリペプチド、核酸、炭水化物またはＮＧＦと結合する任意のその他の分子を挙げることができる。

【００６１】

用語「アンタゴニスト」または「阻害剤」とは、対象とする分子と接触させると、アンタゴニストの不在下で観察された活性または機能の規模と比較して、分子の特定の活性または機能の規模の減少を引き起こすモジュレーターを指す。対象とする特定のアンタゴニストとして、ＮＧＦの生物学的活性または免疫学的活性を遮断または調節するものが挙げられる。ＮＧＦのアンタゴニストおよび阻害剤として、それだけには限らないが、タンパク質、核酸、炭水化物またはＮＧＦと結合する任意のその他の分子を挙げることができる。

【００６２】

用語「抗体」とは、４つのポリペプチド鎖、２つの重（Ｈ）鎖、および２つの軽（Ｌ）鎖からなる任意の免疫グロブリン（Ｉｇ）分子またはＩｇ分子の本質的なエピトープ結合特徴を保持する、その任意の機能的断片、突然変異体、変異体または誘導体を広く指す。このような突然変異体、変異体または誘導体抗体形式は、当技術分野で公知である。限定されない実施例は本明細書で以下に論じられている。

【００６３】

全長抗体では、各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書において、ＨＣＶＲまたはＶＨと略される）および重鎖定常領域からなる。重鎖定常領域は、３つのドメイン、ＣＨ１、ＣＨ２およびＣＨ３からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書において、ＬＣＶＲまたはＶＬと略される）および軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は、１つのドメイン、ＣＬからなる。ＶＨおよびＶＬ領域は、フレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれるより保存された領域が散財している、相補性決定領域（ＣＤＲ）と呼ばれる超可変性の領域にさらに細かく分けることができる。各ＶＨおよびＶＬは、以下の順でアミノ末端からカルボキシ末端に配置される、３つのＣＤＲおよび４つのＦＲからなる：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４。免疫グロブリン分子は、任意の種類のもの（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡおよびＩｇＹ）、クラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１およびＩｇＡ２）またはサブクラスであり得る。

【００６４】

用語「抗体コンジュゲート」とは、治療用または細胞傷害性薬剤などの第２の化学的部分と化学的に連結された抗体などの結合タンパク質を指す。用語「薬剤」とは、本明細書において、化合物、化合物の混合物、生体高分子または生体物質から作られている抽出物を示すよう使用される。一態様では、治療用または細胞傷害性薬剤として、それだけには限らないが、百日咳毒素、タキソール、サイトカラシンＢ、グラミシジンＤ、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンＤ、１－デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシンならびにそれらの類似体または相同体が挙げられる。

【００６５】

用語「抗体構築物」とは、リンカーポリペプチドまたは免疫グロブリン定常ドメインと連結された１以上の抗原結合部分を含むポリペプチドを指す。リンカーポリペプチドは、

ペプチド結合によって結合された２個以上のアミノ酸残基を含み、１つまたは複数の抗原結合部分を連結するために使用される。このようなリンカーポリペプチドは、当技術分野で周知である（Ｈｏｌｌｉｇｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、９０：６４４４－６４４８頁（１９９３年）；Ｐｏｌｊａｋら、Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ２：１１２１－１１２３頁（１９９４年））。免疫グロブリン定常ドメインとは、重鎖または軽鎖定常ドメインを指す。ヒトＩｇＧ重鎖および軽鎖定常ドメインアミノ酸配列は、当技術分野で公知である。イヌ、ウマおよびネコＩｇＧ重鎖および軽鎖定常ドメインアミノ酸配列は、それよりは稀である。

【００６６】

用語「抗体断片」または「抗原結合部分」は、全長抗体の一部、一般に、その抗原結合ドメインまたは可変ドメインを含む。抗体断片の例として、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ）$_2$、Ｆｖ、ｓＦｖ断片、ダイアボディー、直鎖抗体、一本鎖抗体分子が挙げられる。

【００６７】

用語抗体の「抗原－結合部分」（または簡単に「抗体部分」）とは、抗原と（すなわち、ＮＧＦと）特異的に結合する能力を保持する抗体の１以上の断片を指す。抗体の抗原－結合機能は、全長抗体の断片によって実施され得るということがわかっている。これらはまた、２種以上の異なる抗原と特異的に結合する、二特異性、二重特異性または多重特異性形式であり得る。用語抗体の「抗原－結合部分」内に包含される結合断片の例として、（ｉ）Ｆａｂ断片、ＶＬ、ＶＨ、ＣＬおよびＣＨ１ドメインからなる一価断片；（ｉｉ）Ｆ（ａｂ’）$_2$断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された２つのＦａｂ断片を含む二価断片；（ｉｉｉ）ＶＨおよびＣＨ１ドメインからなるＦｄ断片；（ｉｖ）抗体の単一のアームのＶＬおよびＶＨドメインからなるＦｖ断片；（ｖ）単一の可変ドメインを含むｄＡｂ断片（Ｗａｒｄら、Ｎａｔｕｒｅ、３４１：５４４－５４６頁（１９８９年）；ＰＣＴ公開ＷＯ ９０／０５１４４）；および（ｖｉ）単離された相補性決定領域（ＣＤＲ）が挙げられる。さらに、Ｆｖ断片の２つのドメイン、ＶＬおよびＶＨは、別個の遺伝子によってコードされるが、それらは、組換え法を使用し、ＶＬおよびＶＨ領域対が一価分子を形成する単一のタンパク質鎖（一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）としても知られる（Ｂｉｒｄら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４２：４２３－４２６頁（１９８８年）；およびＨｕｓｔｏｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、８５：５８７９－５８８３頁（１９８８年））として製造されることを可能にする合成リンカーによって結合され得る。このような一本鎖抗体もまた、用語抗体の「抗原－結合部分」内に包含されるものとする。ダイアボディーなどの一本鎖抗体のその他の形態も包含される。ダイアボディーは、ＶＨおよびＶＬドメインが単一のポリペプチド鎖上に発現されるが、同一鎖上の２つのドメイン間の対形成を可能にするには短すぎるリンカーを使用し、それによって、ドメインが別の鎖の相補的ドメインと対形成するようにし、２つの抗原結合部位を作製する、二価の、二特異性抗体である（Ｈｏｌｌｉｇｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、９０：６４４４－６４４８頁（１９９３年）； Ｐｏｌｊａｋら、Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ２：１１２１－１１２３頁（１９９４年））。このような抗体結合部分は、当技術分野で公知である（ＫｏｎｔｅｒｍａｎｎおよびＤｕｂｅｌ編、Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ（２００１年） Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ． Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、７９０頁（ＩＳＢＮ ３－５４０－４１３５４－５））。

【００６８】

さらに、抗体またはその抗原－結合部分は、抗体または抗体部分の１以上のその他のタンパク質またはペプチドとの共有または非共有結合によって形成された、より大きな免疫接着分子の一部であり得る。このような免疫接着分子の例として、四量体ｓｃＦｖ分子を製造するためのストレプトアビジンコア領域の使用（Ｋｉｐｒｉｙａｎｏｖ，Ｓ．Ｍ．ら、Ｈｕｍａｎ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ、６：９３－１０１頁（１９９５年））ならびに二価の、ビオチン化ｓｃＦｖ分子を製造するためのシステイン残基、マーカーペプチドおよびＣ末端ポリヒスチジンタグの使用（Ｋｉｐｒｉｙａｎｏｖら、Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、３１：１０４７－１０５８頁（１９９４年））が挙

げられる。ＦａｂおよびＦ（ａｂ’）２断片などの抗体部分は、全抗体のそれぞれパパインまたはペプシン消化などの従来技術を使用して全抗体から調製され得る。さらに、抗体、抗体部分および免疫接着分子は、本明細書に記載されるように、標準の組換えＤＮＡ技術を使用して得られる。

【００６９】

用語「抗ＮＧＦ抗体」とは、神経増殖因子（ＮＧＦ）と結合でき、ＮＧＦ生物活性および／またはＮＧＦシグナル伝達によって媒介される下流経路を阻害できる抗体を指す。抗ＮＧＦ抗体は、ＮＧＦ生物活性を、受容体結合および／またはＮＧＦに対する細胞応答の誘発などのＮＧＦシグナル伝達によって媒介される下流経路を含めて、遮断し、アンタゴナイズし、抑制し、または低減する（「大幅に」を含めて）抗体を包含する。抗ＮＧＦ抗体は、ＮＧＦ生物活性を中和し、ＮＧＦと結合し、ＮＧＦ二量体化および／もしくはＮＧＦ受容体（ｐ７５および／またはｔｒｋＡなど）との結合を防ぎ、ならびに／またはＮＧＦと結合し、ｔｒｋＡ受容体二量体化および／もしくはｔｒｋＡ自己リン酸化を防ぐものを包含する。抗ＮＧＦ抗体の例は、本明細書に提供される。

【００７０】

用語「結合タンパク質」とは、抗原などの標的の任意の部分と特異的に結合する天然または合成ポリペプチドを指す。用語「結合タンパク質」は、単離抗体、その抗原結合部分またはその免疫学的に機能的な断片を含めた本明細書に記載された抗体を包含する。

【００７１】

用語「イヌ抗体」とは、種々の品種のイヌから単離された天然抗体を代表するアミノ酸配列からなる、天然に生じる、または組換えによって製造された免疫グロブリンを指す。イヌ抗体は、イヌ生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変および定常領域を有する抗体である。本開示のイヌ抗体は、例えば、ＣＤＲ中、特に、ＣＤＲ３中に、イヌ生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロでランダムもしくは部位特異的突然変異誘発によって、またはインビボで体細胞突然変異によって導入された突然変異）を含み得る。しかし、用語「イヌ抗体」は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖系列に由来するＣＤＲ配列が、イヌフレームワーク配列上にグラフトされている抗体を含まないものとする。

【００７２】

用語「イヌ化」は、ドナー抗体からイヌ抗体アクセプターフレームワークに非イヌ抗原結合アミノ酸を移して、イヌにおいて有用なタンパク質治療的処置を作製するための方法として定義される。

【００７３】

用語「イヌ化抗体」とは、非イヌ種（例えば、マウス）由来の重鎖および軽鎖可変領域配列を含むが、ＶＨおよび／またはＶＬ配列の少なくとも一部が、より「イヌ様」である、すなわち、イヌ生殖系列可変配列により類似しているよう変更されている抗体を指す。イヌ化抗体の１種として、非イヌＣＤＲ配列が、対応するイヌＣＤＲ配列を置き換えるようイヌＶＨおよびＶＬ配列中に導入されているＣＤＲグラフト化抗体がある。

【００７４】

本明細書において提供された非イヌ抗体のイヌ化形態は、非イヌ抗体に由来する配列を含有するイヌ抗体である。大部分について、イヌ化抗体は、レシピエントの超可変領域残基が、所望の特性を有するマウス、ラット、ウサギ、ネコ、ヤギ、ニワトリ、ウシ、ウマ、ラマ、ラクダ、ヒトコブラクダ、サメ、非ヒト霊長類、ヒト、ヒト化、組換え配列または遺伝子操作された配列などの非イヌ種（「ドナー抗体」）に由来する超可変領域残基によって置換されているイヌ抗体配列（「アクセプター」または「レシピエント」抗体）である。いくつかの場合には、イヌ抗体のフレームワーク領域（ＦＲ）残基は、対応する非イヌＦＲ残基によって置換されている。さらに、イヌ化抗体は、レシピエント抗体中またはドナー抗体中に見られない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体性能をさらに改良するために行われる。イヌ化抗体はまた、イヌ抗体の免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）の少なくとも一部を含み得る。抗体のイヌ化のための戦略として、それだけには限らないが、

ＷＯ２００３／０６００８０に開示された戦略が挙げられる。

【００７５】

イヌ化抗体は、対象とする抗原と免疫特異的に結合し、イヌ抗体のアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク（ＦＲ）領域および非イヌ抗体のアミノ酸配列を実質的に有する相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む抗体またはその変異体、誘導体、類似体または断片である。イヌ化抗体は、ＣＤＲ領域のすべてまたは実質的にすべてが、非イヌ免疫グロブリン（すなわち、ドナー抗体）のものに対応し、フレームワーク領域のすべてまたは実質的にすべてが、イヌ免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも１つの、通常、２つの可変ドメイン（Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、ＦａｂＣ、Ｆｖ）のうち実質的にすべてを含む。イヌ化抗体はまた、通常、イヌ免疫グロブリンのものである免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）の少なくとも一部を含む。イヌまたはイヌ化抗体は、軽鎖ならびに重鎖の少なくとも可変ドメインの両方を含有し得る。抗体はまた、重鎖のＣＨ１、ヒンジ、ＣＨ２、ＣＨ３およびＣＨ４領域を含み得る。イヌ化抗体は、イヌ化軽鎖のみを含有する場合もあり、またはイヌ化重鎖のみを含有する場合もある。例示的イヌ化抗体は、軽鎖のイヌ化可変ドメインおよび重鎖のイヌ化可変ドメインを含有する。

【００７６】

用語「標準」残基とは、Ｃｈｏｔｈｉａら（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１９６：９０１－９１７頁（１９８７年）；Ｃｈｏｔｈｉａら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２２７：７９９頁（１９９２年）によって定義される特定の標準ＣＤＲ構造を規定するＣＤＲまたはフレームワーク中の残基を指す。Ｃｈｏｔｈｉａらによれば、多数の抗体のＣＤＲの重要な部分は、アミノ酸配列のレベルでの大きな多様性にもかかわらず、ほぼ同一のペプチド骨格立体構造を有する。各標準構造は、ループを形成するアミノ酸残基の連続セグメントの１セットのペプチド骨格ねじれ角を主に規定する。

【００７７】

用語「ＣＤＲ」とは、抗体可変配列内の相補性決定領域を指す。重鎖および軽鎖の可変領域の各々中に３つのＣＤＲがあり、これらは、可変領域の各々のＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３と呼ばれる。用語「ＣＤＲセット」とは、抗原と結合することができる単一の可変領域中に生じる３つのＣＤＲの群を指す。これらのＣＤＲの正確な境界は異なるシステムに従って異なって定義されている。カバットによって記載されたシステム（Ｋａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、Ｍｄ．（１９８７年）および（１９９１年））は、抗体の任意の可変領域に適用可能な明白な残基番号付けシステムを提供するだけでなく、３つのＣＤＲを定義する正確な残基境界も提供する。これらのＣＤＲは、カバットＣＤＲと呼ばれることもある。Ｃｈｏｔｈｉａおよび共同研究者（ＣｈｏｔｈｉａおよびＬｅｓｋ、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１９６：９０１－９１７頁（１９８７年）、およびＣｈｏｔｈｉａら、Ｎａｔｕｒｅ、３４２：８７７－８８３頁（１９８９年））は、カバットＣＤＲ内の特定の下位部分が、アミノ酸配列のレベルで大きな多様性を有するにもかかわらず、ほぼ同一のペプチド骨格立体構造をとることを見出した。これらの下位部分は、Ｌ１、Ｌ２およびＬ３またはＨ１、Ｈ２およびＨ３と示され、ここで、「Ｌ」および「Ｈ」は、軽鎖および重鎖領域をそれぞれ示す。これらの領域は、コチア（Ｃｈｏｔｈｉａ）ＣＤＲと呼ばれることもあり、これは、カバットＣＤＲと重複する境界を有する。カバットＣＤＲと重複するＣＤＲを定義するその他の境界は、Ｐａｄｌａｎ（ＦＡＳＥＢ Ｊ．、９：１３３－１３９頁（１９９５年））およびＭａｃＣａｌｌｕｍ（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２６２（５）：７３２－７４５頁（１９９６年））によって記載されている。さらにその他のＣＤＲ境界定義は、上記のシステムの１つを厳密にたどらない場合もあるが、それでも、カバットＣＤＲと重複するが、それらは、特定の残基または残基の群または全ＣＤＲでさえ、抗原結合に大幅に影響を与えないという予測または実験的知見を踏まえて、短くされる場合も、長くされる場合もある。本明細書において使用される方法は、これらのシステムのいずれかに従って定義されたＣＤＲを使用し得るが、本明細書に記載される特定の方

法は、カバットまたはコチアによって定義されるＣＤＲを使用する。

【００７８】

用語「ＣＤＲグラフト化抗体」とは、１つの種に由来するが、ＶＨおよび／またはＶＬの１つまたは複数のＣＤＲ領域の配列が、別の種のＣＤＲ配列で置換されている重鎖および軽鎖可変領域配列を含む抗体、例えば、１つまたは複数のマウスＣＤＲ（例えば、ＣＤＲ３）がヒトＣＤＲ配列で置換されている、マウス重鎖および軽鎖可変領域を有する抗体を指す。

【００７９】

用語「キメラ抗体」とは、ある種に由来する重鎖および軽鎖可変領域配列ならびに別の種に由来する定常領域配列を含む抗体、例えば、ヒト、イヌ、ウマまたはネコ定常領域と連結しているマウス重鎖および軽鎖可変領域を有する抗体を指す。キメラ抗体は、特定の種に由来する、または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体から得た対応する配列と同一である、または相同である重鎖および／または軽鎖の一部を含むのに対し、鎖の残部は、所望の生物活性を示す、別の種に由来する、または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列ならびにこのような抗体の断片と同一である、または相同である（例えば、米国特許第４，８１６，５６７号およびＭｏｒｒｉｓｏｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１：６８５１－６８５５頁（１９８４年）参照のこと）。

【００８０】

用語「結晶」および「結晶化された」とは、結晶の形態で存在する抗体またはその抗原結合部分と指す。結晶は、物質の固体状態の１種の形態であり、非晶質固体状態または液晶状態などのその他の形態とは別個である。結晶は、原子、イオン、分子（例えば、抗体などのタンパク質）または分子集合体（例えば、抗原／抗体複合体）の、規則正しい、反復する３次元配置からなる。これらの３次元配置は、この分野で十分に理解されている特定の数学的関係に従って配列される。結晶中で反復される基本単位またはビルディングブロックは、非対称単位と呼ばれる。所与の、十分に定義された結晶学的対称と一致する配列中の非対称単位の反復は、結晶の「単位格子」を提供する。３次元すべてにおける規則正しい並進による単位格子の反復は結晶を提供する。Ｇｉｅｇｅ，ＲおよびＤｕｃｒｕｉｘ，Ａ．Ｂａｒｒｅｔｔ、Ｃｒｙｓｔａｌｌｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ、ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ、第２版、２０１－１６頁、Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、（１９９９年）参照のこと。

【００８１】

用語「ダイアボディー」とは、同一ポリペプチド鎖中に軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と接続している重鎖可変ドメイン（ＶＨ）（ＶＨ－ＶＬ）を含む、２つの抗原結合部位を有する小さい抗体断片を指す。同一鎖上の２つのドメイン間の対合を可能にするには短いリンカーを使用することによって、ドメインは、別の鎖の相補ドメインと対を形成して、２つの抗原結合部位を生成せざるを得なくなる。

【００８２】

用語「ドナー」および「ドナー抗体」とは、１つまたは複数のＣＤＲを提供する抗体を指す。ドナー抗体は、フレームワーク領域が得られるまたはそれに由来する抗体とは異なる種に由来する抗体であり得る。ヒト化抗体との関連で、用語「ドナー抗体」とは、１つまたは複数のＣＤＲを提供する非ヒト抗体を指す。イヌ化抗体との関連で、用語「ドナー抗体」とは、１つまたは複数のＣＤＲを提供する非イヌ抗体を指す。ネコ化抗体との関連で、用語「ドナー抗体」とは、１つまたは複数のＣＤＲを提供する非ネコ抗体を指す。ウマ化抗体との関連で、用語「ドナー抗体」とは、１つまたは複数のＣＤＲを提供する非ウマ抗体を指す。

【００８３】

用語「エピトープ」は、免疫グロブリンまたはＴ細胞受容体と特異的に結合できる任意のポリペプチド決定基を含む。エピトープ決定基は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリルまた

はスルホニルなどの分子の化学的に活性な表面基を含むことができ、特定の３次元構造特徴および／または特定の電荷特徴を有し得る。エピトープは、抗体によって結合される抗原の領域である。抗体は、タンパク質および／または高分子の複雑な混合物中で、その標的抗原を優先的に認識する場合に、抗原と特異的に結合するといわれる。

【００８４】

用語「ウマ抗体」とは、種々の品種のウマから単離された天然抗体を代表するアミノ酸配列からなる天然に生じるまたは組換えによって製造された免疫グロブリンを指す。ウマ抗体は、ウマ生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変および定常領域を有する抗体である。本開示のウマ抗体は、例えば、ＣＤＲ中、特に、ＣＤＲ３中に、ウマ生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロでランダムもしくは部位特異的突然変異誘発によって、またはインビボで体細胞突然変異によって導入された突然変異）を含み得る。しかし、用語「ウマ抗体」は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖系列に由来するＣＤＲ配列が、ウマフレームワーク配列上にグラフトされている抗体を含まないものとする。

【００８５】

用語「ウマ化（ｅｑｕｉｎｉｚａｔｉｏｎ）」は、ドナー抗体からウマ抗体アクセプターフレームワークに非ウマ抗原結合アミノ酸を移して、ウマにおいて有用なタンパク質治療的処置を作製するための方法として定義される。

【００８６】

用語「ウマ化抗体」とは、非ウマ種（例えば、マウス）由来の重鎖および軽鎖可変領域配列を含むが、ＶＨおよび／またはＶＬ配列の少なくとも一部が、より「ウマ様」である、すなわち、ウマ生殖系列可変配列により類似しているよう変更されている抗体を指す。ウマ化抗体の１種として、非ウマＣＤＲ配列が、対応するウマＣＤＲ配列を置き換えるようウマＶＨおよびＶＬ配列中に導入されているＣＤＲグラフト化抗体がある。

【００８７】

本明細書において提供された非ウマ抗体のウマ化形態は、非ウマ抗体に由来する配列を含有するウマ抗体である。大部分について、ウマ化抗体は、レシピエントの超可変領域残基が、所望の特性を有する、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヤギ、ニワトリ、ウシ、ウマ、ラマ、ラクダ、ヒトコブラクダ、サメ、非ヒト霊長類、ヒト、ヒト化、組換え配列または遺伝子操作された配列などの非ウマ種（「ドナー」抗体）に由来する超可変領域残基によって置換されているウマ抗体配列（「アクセプター」または「レシピエント」抗体）である。いくつかの場合には、ウマ抗体のフレームワーク領域（ＦＲ）残基は、対応する非ウマＦＲ残基によって置換されている。さらに、ウマ化抗体は、レシピエント抗体中またはドナー抗体中には見られない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体性能をさらに改良するために行われる。ウマ化抗体はまた、ウマ抗体の免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）の少なくとも一部を含み得る。

【００８８】

ウマ化抗体は、対象とする抗原と免疫特異的に結合し、ウマ抗体のアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク（ＦＲ）領域および非ウマ抗体のアミノ酸配列を実質的に有する相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む抗体またはその変異体、誘導体、類似体または断片である。ウマ化抗体は、ＣＤＲ領域のすべてまたは実質的にすべてが、非ウマ免疫グロブリン（すなわち、ドナー抗体）のものに対応し、フレームワーク領域のすべてまたは実質的にすべてが、ウマ免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも１つの、通常、２つの可変ドメイン（Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、ＦａｂＣ、Ｆｖ）の実質的にすべてを含む。ウマ化抗体はまた、通常、ウマ免疫グロブリンのものである、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）の少なくとも一部を含む。ウマまたはウマ化抗体は、例えば、軽鎖ならびに重鎖の少なくとも可変ドメインの両方を含み得る。抗体はまた、重鎖のＣＨ１、ヒンジ、ＣＨ２、ＣＨ３およびＣＨ４領域を含み得る。ウマ化抗体は、ウマ化軽鎖のみを含有する場合もあり、またはウマ化重鎖のみを含有する場合もある。例示的ウマ化抗体は、軽鎖のウマ化可変ドメイン重鎖のウマ化可変ドメインを含有する。ウマアイソタイ

プとして、例えば、ＩｇＧａ、ＩｇＧｂ、ＩｇＧｃ、ＩｇＧ（Ｔ）、ＩｇＭ、ＩｇＡが挙げられる。

【００８９】

用語「Ｆａｂ」とは、抗体断片を指す。抗体のパパイン消化によって、「Ｆａｂ」断片と呼ばれ、各々単一の抗原結合部位を有する２つの同一の抗原結合断片および残りの「Ｆｃ」断片（その名称は、容易に結晶化するその能力を反映している）が生じる。ペプシン処理によって、抗原を架橋する結合が得られる。Ｆａｂ断片はまた、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第１の定常ドメイン（ＣＨ１）も含有する。Ｆａｂ’断片は、抗体ヒンジ領域に由来する１個または複数のシステインを含む、重鎖ＣＨ１ドメインのカルボキシル末端での数個の残基の付加によってＦａｂ断片と異なる。Ｆａｂ’－ＳＨは、定常ドメインのシステイン残基が、遊離チオール基を有するＦａｂ’の本明細書における名称である。Ｆ（ａｂ’）$_2$抗体断片は、元々は、その間にヒンジシステインを有するＦａｂ’断片の対として生じた。抗体断片のその他の化学的カップリングも知られている。

【００９０】

用語「ネコ抗体」とは、種々の品種のネコから単離された天然抗体を代表するアミノ酸配列からなる天然に生じるまたは組換えによって製造された免疫グロブリンを指す。ネコ抗体は、ネコ生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変および定常領域を有する抗体である。本開示のネコ抗体は、例えば、ＣＤＲ中、特に、ＣＤＲ３中に、ネコ生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロでランダムもしくは部位特異的突然変異誘発によって、またはインビボで体細胞突然変異によって導入された突然変異）を含み得る。しかし、用語「ネコ抗体」は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖系列に由来するＣＤＲ配列が、ネコフレームワーク配列上にグラフトされている抗体を含まないものとする。

【００９１】

用語「ネコ化（ｆｅｌｉｎｉｚａｔｉｏｎ）」は、ドナー抗体からネコ抗体アクセプターフレームワークに非ネコ抗原結合アミノ酸を移して、ネコにおいて有用なタンパク質治療的処置を作製するための方法として定義される。

【００９２】

用語「ネコ化抗体」とは、非ネコ種（例えば、マウス）由来の重鎖および軽鎖可変領域配列を含むが、ＶＨおよび／またはＶＬ配列の少なくとも一部が、より「ネコ様」である、すなわち、ネコ生殖系列可変配列により類似しているよう変更されている抗体を指す。ネコ化抗体の１種として、非ネコＣＤＲ配列が、対応するネコＣＤＲ配列を置き換えるようネコＶＨおよびＶＬ配列中に導入されているＣＤＲグラフト化抗体がある。

【００９３】

本明細書において提供された非ネコ抗体のネコ化形態は、非ネコ抗体に由来する配列を含有するネコ抗体である。大部分について、ネコ化抗体は、レシピエントの超可変領域残基が、所望の特性を有する、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヤギ、ニワトリ、ウシ、ウマ、ラマ、ラクダ、ヒトコブラクダ、サメ、非ヒト霊長類、ヒト、ヒト化、組換え配列または遺伝子操作された配列などの非ネコ種（「ドナー」抗体）に由来する超可変領域残基によって置換されているネコ抗体配列（「アクセプター」または「レシピエント」抗体）である。いくつかの場合には、ネコ抗体のフレームワーク領域（ＦＲ）残基は、対応する非ネコＦＲ残基によって置換されている。さらに、ネコ化抗体は、レシピエント抗体中またはドナー抗体中には見られない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体性能をさらに改良するために行われる。ネコ化抗体はまた、ネコ抗体の免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）の少なくとも一部を含み得る。

【００９４】

ネコ化抗体は、対象とする抗原と免疫特異的に結合し、ネコ抗体のアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク（ＦＲ）領域と、非ネコ抗体のアミノ酸配列を実質的に有する相補性決定領域（ＣＤＲ）とを含む抗体またはその変異体、誘導体、類似体または断片である。ネコ化抗体は、ＣＤＲ領域のすべてまたは実質的にすべてが、非ネコ免疫グロブリ

ン（すなわち、ドナー抗体）のものに対応し、フレームワーク領域のすべてまたは実質的にすべてが、ネコ免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも１つの、通常、２つの可変ドメイン（Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、ＦａｂＣ、Ｆｖ）の実質的にすべてを含む。ネコ化抗体はまた、通常、ネコ免疫グロブリンのものである、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）の少なくとも一部を含む。ネコまたはネコ化抗体は、軽鎖ならびに重鎖の少なくとも可変ドメインの両方を含み得る。ネコ化抗体はまた、重鎖のＣＨ１、ヒンジ、ＣＨ２、ＣＨ３およびＣＨ４領域を含み得る。ネコ化抗体は、ネコ化軽鎖のみを含有する場合もあり、またはネコ化重鎖のみを含有する場合もある。例示的ネコ化抗体は、軽鎖のネコ化可変ドメインおよび重鎖のネコ化可変ドメインのみを含有する。

【００９５】

用語「フレームワーク」または「フレームワーク配列」とは、ＣＤＲを引いた可変領域の残りの配列を指す。ＣＤＲ配列の正確な定義は、種々のシステムによって決定できるので、フレームワーク配列の意味は、相応に異なる解釈次第である。６つのＣＤＲ（軽鎖のＣＤＲ－Ｌ１、－Ｌ２および－Ｌ３ならびに重鎖のＣＤＲ－Ｈ１、－Ｈ２および－Ｈ３）はまた、軽鎖および重鎖上のフレームワーク領域を各鎖上の４つの小領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３およびＦＲ４）に分け、これでは、ＣＤＲ１はＦＲ１およびＦＲ２の間に位置し、ＣＤＲ２は、ＦＲ２およびＦＲ３の間、ＣＤＲ３は、ＦＲ３およびＦＲ４の間に位置する。ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３またはＦＲ４として特定の小領域を規定するものではなく、その他のものによって呼ばれるフレームワーク領域は、単一の天然に存在する免疫グロブリン鎖の可変領域内の組み合わせたＦＲｓを表す。ＦＲは、４つの小領域のうち１つを表し、ＦＲｓは、フレームワーク領域を構成する４つの小領域のうち２以上を表す。ヒト重鎖および軽鎖アクセプター配列は、当技術分野で公知である。イヌ重鎖および軽鎖アクセプター配列も公知である（特許出願公開ＷＯ０３／０６００８０および米国特許７２６１８９０Ｂ２）。

【００９６】

用語「生殖系列抗体遺伝子」または「遺伝子断片」とは、特定の免疫グロブリンの発現のための遺伝子再配列および突然変異につながる成熟プロセスを受けていない、非リンパ系細胞によってコードされる免疫グロブリン配列を指す（Ｓｈａｐｉｒｏら、Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、２２（３）：１８３－２００頁（２００２年）；Ｍａｒｃｈａｌｏｎｉｓら、Ａｄｖ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．Ｂｉｏｌ．、４８４：１３－３０頁（２００１年））。本開示の結合タンパク質によって提供される利点の１つは、生殖系列抗体遺伝子は、成熟抗体遺伝子よりも、種において個体の特徴を示す必須アミノ酸配列構造を保存する可能性が高く、したがって、その種において治療上使用される場合に外来供給源に由来すると認識される可能性が低いという認識から生じる。

【００９７】

用語「Ｆｖ」とは、完全抗原認識および結合部位を含有する最小抗体断片を指す。この領域は、１つの重鎖および１つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。

【００９８】

用語「ヒト抗体」とは、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を指す。本開示のヒト抗体は、例えば、ＣＤＲ、特に、ＣＤＲ３中に、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロでランダムおよび部位特異的突然変異誘発によって、またはインビボ体細胞突然変異によって誘発される突然変異）を含み得る。しかし、用語「ヒト抗体」とは、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖系列に由来するＣＤＲ配列が、ヒトフレームワーク配列にグラフトされている抗体を含まないものとする。

【００９９】

用語「ヒト化抗体」とは、ＶＨおよび／またはＶＬ配列の少なくとも一部が、より「ヒト様」である、すなわち、ヒト生殖系列可変配列とより類似しているよう変更されている、非ヒト種（例えば、マウス）由来の重鎖および軽鎖可変領域配列を含む抗体を指す。ヒト化抗体の１種として、非ヒトＣＤＲ配列がヒトＶＨおよびＶＬ配列中に導入されて、対

応するヒトＣＤＲ配列を置換しているＣＤＲグラフト化抗体がある。

【０１００】

ヒト化抗体とは、対象とする抗原と免疫特異的に結合し、ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク（ＦＲ）領域および非ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有する相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む、抗体またはその変異体、誘導体、類似体もしくは断片である。ヒト化抗体は、ＣＤＲ領域のすべてまたは実質的にすべてが、非ヒト免疫グロブリン（すなわち、ドナー抗体）のものと対応し、フレームワーク領域のすべてまたは実質的にすべてが、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、実質的にすべての、または少なくとも１つの、通常２つの可変ドメイン（Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、ＦａｂＣ、Ｆｖ）を含む。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）、通常、ヒト免疫グロブリンのものの少なくとも一部を含む。ヒト化抗体またはイヌ化抗体は、軽鎖ならびに少なくとも重鎖の可変ドメインの両方を含有し得る。抗体はまた、重鎖のＣＨ１、ヒンジ、ＣＨ２、ＣＨ３およびＣＨ４領域も含み得る。または、ヒト化抗体は、ヒト化軽鎖のみ、またはヒト化重鎖のみを含有し得る。例示的ヒト化抗体は、軽鎖のヒト化可変ドメインおよび重鎖のヒト化可変ドメインを含有する。

【０１０１】

ウシ化、ラクダ化、イヌ化、ウマ化、ネコ化またはヒト化抗体は、ＩｇＭ、ＩｇＧ、ＩｇＤ、ＩｇＡおよびＩｇＥを含めた免疫グロブリンの任意のクラス、ならびに制限するものではないが、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４を含めた任意のアイソタイプから選択され得る。ウシ化、ラクダ化、イヌ化、ウマ化、ネコ化またはヒト化抗体は、２以上のクラスまたはアイソタイプ由来の配列を含んでもよく、特定の定常ドメインは、当技術分野で周知の技術を使用して、所望のエフェクター機能を最適化するよう選択され得る。

【０１０２】

ウシ化、ラクダ化、イヌ化、ウマ化、ネコ化またはヒト化抗体のフレームワーク領域およびＣＤＲ領域は、親配列と正確に対応する必要はなく、例えば、ドナー抗体ＣＤＲまたはコンセンサスフレームワークは、少なくとも１個のアミノ酸残基の置換、挿入、および／または欠失によって突然変異され、その結果、その部位でのＣＤＲまたはフレームワーク残基が、ドナー抗体またはコンセンサスフレームワークのいずれかと対応していなくてもよい。しかし、このような突然変異は、大規模なものではない。普通、ウシ化、ラクダ化、イヌ化、ウマ化、ネコ化またはヒト化抗体残基の少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、および少なくとも９５％は、親のＦＲおよびＣＤＲ配列のものと対応する。用語「コンセンサスフレームワーク」とは、コンセンサス免疫グロブリン配列中のフレームワーク領域を指す。用語「コンセンサス免疫グロブリン配列」とは、関連免疫グロブリン配列のファミリーにおいて最も頻繁に生じるアミノ酸（またはヌクレオチド）から形成される配列を指す（例えば、Ｗｉｎｎａｋｅｒ、Ｆｒｏｍ Ｇｅｎｅｓ ｔｏ Ｃｌｏｎｅｓ （Ｖｅｒｌａｇｓｇｅｓｅｌｌｓｃｈａｆｔ、Ｗｅｉｎｈｅｉｍ、Ｇｅｒｍａｎｙ、１９８７年）参照のこと）。免疫グロブリンのファミリーでは、コンセンサス配列中の各位置は、ファミリーにおいてその位置で最も頻繁に生じるアミノ酸によって占められている。２個のアミノ酸が等しく頻繁に生じる場合には、コンセンサス配列中にいずれかが含まれ得る。

【０１０３】

用語「超可変領域」とは、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、Ｋａｂａｔら、第５版、Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、Ｍｄ．（１９９１年）によって定義される、および／または（ＣｈｏｔｈｉａおよびＬｅｓｋ、Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７頁（１９８７年）によって定義される、および／またはＭａｒｔｉｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８６：９２６８－９２７２頁（１９８９年）によって「ＡｂＭループ」として定義される、および／またはｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＩｍＭｕｎｏＧｅｎｅＴｉｃｓ ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏ

ｎ ｓｙｓｔｅｍｓ ｄａｔａｂａｓｅ中のＬｅｆｒａｎｃら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ、２７：２０９－２１２頁（１９９９年）によって定義される、軽鎖可変ドメイン中および重鎖可変ドメイン中の「相補性決定領域」または「ＣＤＲ」に由来するアミノ酸残基を含む。「フレームワーク」または「ＦＲ」残基は、本明細書において定義されるような超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【０１０４】

用語「同一性」とは、それらの配列を比較することによって決定される、２種以上のポリペプチド分子または２種以上の核酸分子の配列間の関係を指し、ここで、「同一性」とは、より詳しくは、一続きの２種以上のヌクレオチドまたは２種以上のアミノ酸配列間のマッチによって決定される、核酸分子またはポリペプチド間の配列関連性の程度を指す。「同一性」は、特定の数学モデルまたはコンピュータプログラム（すなわち「アルゴリズム」）によって対処される、ギャップアラインメントを有する（もしあれば）２種以上の配列のうち小さいものの間の同一マッチパーセントを評価する。用語「類似性」は、２種以上の核酸分子または２種以上のポリペプチド分子の関係に関して関連概念を指すよう使用される。「類似性」は、「同一性」とは対照的に、関連性の尺度を指し、同一マッチおよび保存的置換マッチの両方を含む。例えば、５０／１００の同一アミノ酸を有し、残りは、すべて非保存的置換である２種のポリペプチド配列については、同一性および類似性パーセントは、両方とも５０％である。同一の２種の配列に関して、２５のさらなる位置が保存的置換を有している場合には、同一性パーセントは、５０％のままであるのに対し、類似性パーセントは７５％（７５／１００）である。関連核酸およびポリペプチドの同一性および類似性は、それだけには限らないが、ＣＯＭＰＵＴＡＴＩＯＮＡＬ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ、（Ｌｅｓｋ，Ａ．Ｍ．、編）、１９８８年、Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；ＢＩＯＣＯＭＰＵＴＩＮＧ：ＩＮＦＯＲＭＡＴＩＣＳ ＡＮＤ ＧＥＮＯＭＥ ＰＲＯＪＥＣＴＳ、（Ｓｍｉｔｈ，Ｄ．Ｗ．、編）、１９９３年、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；ＣＯＭＰＵＴＥＲ ＡＮＡＬＹＳＩＳ ＯＦ ＳＥＱＵＥＮＣＥ ＤＡＴＡ、Ｐａｒｔ１、（Ｇｒｉｆｆｉｎ，Ａ．Ｍ．およびＧｒｉｆｆｉｎ，ＩＩ．Ｇ．、編）、１９９４年、ＩＩｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ；ｖｏｎ ＩＩｅｉｎｊｅ，Ｇ．、ＳＥＱＵＥＮＣＥ ＡＮＡＬＹＳＩＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ、１９８７年、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ；ＳＥＱＵＥＮＣＥ ＡＮＡＬＹＳＩＳ ＰＲＩＭＥＲ、（Ｇｒｉｂｓｋｏｖ，Ｍ．およびＤｅｖｅｒｅｕｘ，Ｊ．、編）、１９９１年、Ｍ．Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；Ｃａｒｉｌｌｏら、１９８８年、ＳＩＡＭ Ｊ．Ａｐｐｌｉｅｄ Ｍａｔｈ．、４８：１０７３頁；およびＤｕｒｂｉｎら、１９９８年、ＢＩＯＬＯＧＩＣＡＬ ＳＥＱＵＥＮＣＥ ＡＮＡＬＹＳＩＳ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓに記載されるものを含めた当技術分野で周知の、容易に利用可能な方法によって容易に算出され得る。

【０１０５】

同一性を決定するための好ましい方法は、比較される配列間の最高マッチを提供するよう設計されており、容易に公的に入手可能なコンピュータプログラムに十分に記載されている。２種の配列間の同一性を決定するための好ましいこのようなコンピュータによる方法として、それだけには限らないが、ＧＡＰ（Ｄｅｖｅｒｅｕｘら、１９８４年、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ．Ｒｅｓ．、１２：３８７頁；Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ、Ｍａｄｉｓｏｎ、Ｗｉｓ．）、ＢＬＡＳＴＰ、ＢＬＡＳＴＮおよびＦＡＳＴＡ（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、１９９０年、Ｊ．Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．、２１５：４０３－４１０頁）を含めたＧＣＧプログラムパッケージが挙げられる。ＢＬＡＳＴＸプログラムは、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（ＮＣＢＩ）およびその他の供給源から公的に入手可能である（ＢＬＡＳＴ Ｍａｎｕａｌ、Ａｌｔｓｃｈｕｌら ＮＣＢ／ＮＬＭ／ＮＩＨ Ｂｅｔｈｅｓｄａ、Ｍｄ．２０８９４；Ａｌｔｓｃｈｕｌら、１９９０年、前掲）。周知のＳｍｉｔｈ Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズムも同一性を決定す

るために使用され得る。

【０１０６】

用語「個体」、「患者」および「対象」は、それだけには限らないが、ヒト、マウス、サル、ネコ、イヌ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、哺乳動物家畜および農業用動物、哺乳動物スポーツ用動物および哺乳動物ペットを含めた哺乳動物を指すよう本明細書において同義的に使用される。イヌ、ネコまたはウマなどの例示的対象コンパニオンアニマル。

【０１０７】

「単離された抗体」とは、異なる抗原特異性を有するその他の抗体を実質的に含まない抗体を指す（例えば、ＮＧＦと特異的に結合する単離された抗体は、ＮＧＦ以外の抗原と特異的に結合する抗体を実質的に含まない）。しかし、ＮＧＦと特異的に結合する単離された抗体は、その他の種に由来するＮＧＦ分子などのその他の抗原に対して交差反応性を有し得る。さらに、単離された抗体は、その他の細胞物質および／または化学物質を実質的に含まない場合がある。

【０１０８】

本明細書において同義的に使用される用語「単離ポリヌクレオチド」および「単離核酸」は、その起源に基づいて、単離されたポリヌクレオチドが天然に見られるポリヌクレオチドのすべてもしくは一部と会合していない、または天然には連結されていない、もしくはより大きな配列内で天然には見られない別のポリヌクレオチドと連結された、ゲノム、ｃＤＮＡまたは合成起源またはその一部の組合せのポリヌクレオチドを指す。

【０１０９】

用語「単離されたタンパク質」または「単離されたポリペプチド」は、その起源または供給源に基づいて、その天然状態でそれに付随する天然に会合している成分と会合していないタンパク質またはポリペプチドであり、実質的に、同一種に由来するその他のタンパク質を含まず、異なる種に由来する細胞によって発現されるか、または天然には生じない。したがって、化学的に合成されたまたはそれが天然に生じる細胞とは異なる細胞系において合成されたポリペプチドは、その天然に会合している成分から「単離」される。タンパク質はまた、当技術分野で周知のタンパク質精製技術を使用する単離によって天然に会合している成分を実質的に含まないようにされ得る。

【０１１０】

用語「K_d」とは、当技術分野で公知のように、特定の抗体抗原相互作用の解離定数を指す。

【０１１１】

用語「K_{on}」は、当技術分野で公知のように、抗体／抗原複合体を形成するための、抗体の抗原との会合の結合速度（ｏｎ　ｒａｔｅ）定数を指す。

【０１１２】

用語「K_{off}」とは、当技術分野で公知のように、抗体／抗原複合体からの抗体の解離の解離速度（ｏｆｆ　ｒａｔｅ）定数を指す。

【０１１３】

用語「カバット番号付け」、「カバット定義」および「カバット標識」は、本明細書において同義的に使用される。当技術分野で認識されるこれらの用語は、抗体の重鎖および軽鎖可変領域中のその他のアミノ酸残基よりも可変（すなわち、超可変）であるアミノ酸残基またはその抗原結合部分を番号付けるシステムを指す（Ｋａｂａｔら、Ａｎｎ．ＮＹ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、１９０：３８２－３９１頁（１９７１年）およびＫａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ、第５版、Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ　ａｎｄ　Ｈｕｍａｎ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ、ＮＩＨ　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ第９１－３２４２（１９９１年））。重鎖可変領域について、超可変領域は、ＣＤＲ１のアミノ酸位置３１－３５、ＣＤＲ２のアミノ酸位置５０－６５およびＣＤＲ３のアミノ酸位置９５－１０２の範囲である。軽鎖可変領域については、超可変領域は、ＣＤＲ１のアミノ酸位置２４－３

４、ＣＤＲ２のアミノ酸位置５０－５６およびＣＤＲ３のアミノ酸位置８９－９７の範囲である。

【０１１４】

用語「重要な残基」とは、抗体、特に、ヒト化、イヌ化、ウマ化またはネコ化抗体などの哺乳動物化抗体の結合特異性および／または親和性に対してより影響を与える可変領域内の特定の残基を指す。重要な残基として、それだけには限らないが、以下：ＣＤＲに隣接している残基、可能性あるグリコシル化部位（Ｎ－またはＯ－グリコシル化部位のいずれかであり得る）、稀な残基、抗原と相互作用できる残基、ＣＤＲと相互作用できる残基、標準残基、重鎖可変領域および軽鎖可変領域間の接触残基、バーニアゾーン内の残基および可変重鎖ＣＤＲ１のコチア定義および第１の重鎖フレームワークのカバット定義間で重複する領域中の残基のうち１種または複数が挙げられる。

【０１１５】

用語「標識された結合タンパク質」とは、結合タンパク質の同定を提供する組み込まれた標識を有するタンパク質を指す。一態様では、標識とは、検出可能なマーカー、例えば、放射標識されたアミノ酸の組み込みまたは標識をつけられたアビジン（例えば、光学的方法または比色法によって検出され得る蛍光マーカーまたは酵素活性を含有するストレプトアビジン）によって検出され得るビオチニル部分のポリペプチドとの結合である。ポリペプチドの標識の例として、それだけには限らないが、以下：放射性同位体また放射性核種（例えば、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{35}Ｓ、^{90}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{177}Ｌｕ、^{166}Ｈｏまたは^{153}Ｓｍ）；蛍光標識（例えば、ＦＩＴＣ、ローダミン、ランタニドホスホール（ｌａｎｔｈａｎｉｄｅ　ｐｈｏｓｐｈｏｒｓ））、酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）；化学発光マーカー；ビオチニル基；第２のリポーター（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）によって認識される所定のポリペプチドエピトープ；およびガドリニウムキレートなどの磁性物質が挙げられる。

【０１１６】

用語「哺乳動物化」とは、ドナー抗原結合情報を哺乳動物抗体アクセプターに移して、有用な治療的処置を作製するための方法を指す。より詳しくは、本発明は、抗体をネコ化、ウマ化およびイヌ化するための方法を提供する。

【０１１７】

用語「哺乳動物化された抗体」とは、哺乳動物種（例えば、マウス）に由来する重鎖および軽鎖可変領域配列を含むが、ＶＨおよび／またはＶＬ配列の少なくとも一部が、より「対象とする哺乳動物」様であるよう変更されている抗体を指す。例えば、本明細書において定義されるヒト化、イヌ化、ウマ化またはネコ化抗体を参照のこと。このような哺乳動物化された抗体として、それだけには限らないが、ウシ化（ｂｏｖａｎｉｚｅｄ）、ラクダ化（ｃａｍｅｌｉｚｅｄ）、イヌ化、ウマ化、ネコ化またはヒト化抗体が挙げられる。

【０１１８】

用語「調節する（ｍｏｄｕｌａｔｅ）」および「調節する（ｒｅｇｕｌａｔｅ）」は、対象とする分子の活性（例えば、ＮＧＦの生物活性）における変化または変更を指すよう同義的に使用される。調節は、対象とする分子の特定の活性または機能の規模の増大または減少であり得る。分子の例示的活性および機能として、それだけには限らないが、結合特徴、酵素活性、細胞受容体活性化およびシグナル伝達が挙げられる。

【０１１９】

用語「モジュレーター」は、対象とする分子の活性または機能（例えば、ＮＧＦの生物活性）を変化させる、または変更することができる化合物である。例えば、モジュレーターは、モジュレーターの不在下で観察される活性または機能の規模と比較して、分子の特定の活性または機能の規模の増大または低減を引き起こし得る。モジュレーターは、分子の少なくとも１つの活性または機能の規模を低減する阻害剤であり得る。例示的阻害剤として、それだけには限らないが、タンパク質、ペプチド、抗体、ペプチボディー、炭水化

物または小さい有機分子が挙げられる。ペプチボディーは、例えば、ＷＯ０１／８３５２５に記載されている。

【０１２０】

用語「モノクローナル抗体」とは、任意の真核生物クローン、原核生物クローンまたはファージクローンを含めた単一クローンに由来する抗体を指し、それが製造される方法ではなく、ハイブリドーマ技術によって製造された抗体に制限されない。

【０１２１】

用語「多価結合タンパク質」とは、２以上の抗原結合部位を含む結合タンパク質を示すよう本明細書において使用される。多価結合タンパク質は、３以上の抗原結合部位を有するよう操作され、一般に、天然に存在しない抗体である。用語「多重特異性結合タンパク質」とは、２以上の関連または非関連標的と結合できる結合タンパク質を指す。二重可変ドメイン（ＤＶＤ）結合タンパク質は、２以上の抗原結合部位を含み、四価または多価結合タンパク質である結合タンパク質である。このようなＤＶＤは、単一特異性であり得る、すなわち、１種の抗原と結合できるか、または多重特異性であり得る、すなわち、２種以上の抗原と結合できる。２つの重鎖ＤＶＤポリペプチドおよび２つの軽鎖ＤＶＤポリペプチドを含むＤＶＤ結合タンパク質は、ＤＶＤ　Ｉｇと呼ばれる。ＤＶＤ　Ｉｇの半分は各々、重鎖ＤＶＤポリペプチドおよび軽鎖ＤＶＤポリペプチドおよび２つの抗原結合部位を含む。各結合部位は、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含み、抗原結合部位あたり合計６つのＣＤＲが抗原結合に関与している。ＤＶＤ結合タンパク質およびＤＶＤ結合タンパク質を製造する方法は、米国特許出願第１１／５０７，０５０号に開示されており、参照により本明細書に組み込まれる。

【０１２２】

本開示の一態様は、ＮＧＦと結合できる結合タンパク質を含むＤＶＤ結合タンパク質に関する。別の態様では、ＤＶＤ結合タンパク質は、ＮＧＦおよび第２の標的と結合できる。

【０１２３】

用語「神経増殖因子」および「ＮＧＦ」とは、神経増殖因子およびＮＧＦの生物活性の少なくとも一部を保持するその変異体を指す。ＮＧＦは、マウス、ラット、ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、ウマまたはウシを含めたすべての哺乳動物種の天然配列ＮＧＦを含む。

【０１２４】

【表１】

表１：ＮＧＦの配列

タンパク質	配列識別子
イヌＮＧＦ　Ｃ末端６－Ｈｉｓ	配列番号　：50
ヒトNGF	配列番号　：85

【０１２５】

用語「ＮＧＦ受容体」とは、ＮＧＦに結合される、またはＮＧＦによって活性化されるポリペプチドを指す。ＮＧＦ受容体として、それだけには限らないが、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、霊長類またはウシを含めた任意の哺乳動物種のＴｒｋＡ受容体およびｐ７５受容体が挙げられる。

【０１２６】

用語「ＮＧＦが関連する疾患」および「ＮＧＦが関連する障害」は、ＮＧＦのレベルの増大またはＮＧＦに対する対象の感受性の増大の結果として起こり得る疾患または障害を患っている対象におけるＮＧＦの活性が、疾患もしくは障害の病態生理に関与しているとわかっているか、それと疑われる、または疾患もしくは障害の増悪に貢献する因子であるとわかっているか、それと疑われる任意の疾患または障害を包含する。したがって、ＮＧＦが関連する疾患またはＮＧＦが関連する障害は、ＮＧＦ活性の低下が、症状および／または疾患もしくは障害の進行を軽減すると予測される疾患または障害である。このような

疾患および障害は、例えば、障害を患っている対象の生体液におけるＮＧＦの濃度の増大（例えば、対象の血清、血漿、滑液などにおけるＮＧＦの濃度の増大）によって証明され得、これは、例えば、上記の抗ＮＧＦ抗体を使用して検出され得る。本開示の抗体を用いて治療され得る疾患および障害の限定されない例として、本開示の抗体の医薬組成物に関する以下の節において論じられている疾患および障害が挙げられ、例えば、手術またはその他の外傷に起因する急性疼痛および慢性疼痛を包含する。

【０１２７】

用語「中和」とは、結合タンパク質がＮＧＦと特異的に結合する場合の、ＮＧＦの生物活性の中和を指す。中和結合タンパク質とは、ＮＧＦとのその結合が、ＮＧＦの生物活性の阻害をもたらす中和抗体である。中和結合タンパク質は、ＮＧＦと結合し、ＮＧＦの生物学的活性を、少なくとも約２０％、４０％、６０％、８０％、８５％またはそれ以上低減する。中和結合タンパク質によるＮＧＦの生物活性の阻害は、細胞増殖、細胞形態学変化、細胞シグナル伝達またはＴｒｋＡ受容体とのＮＧＦの結合に起因する任意の検出可能な細胞応答を含めた、当技術分野で周知のＮＧＦ生物活性の１つまたは複数の指標を測定することによって評価され得る。

【０１２８】

用語「作動可能に連結された」とは、記載された成分が、それらがその意図される方法で機能するのを可能にする関係にある並置を指す。コード配列に「作動可能に連結された」制御配列は、コード配列の発現が、制御配列と適合する条件下で達成されるような方法でライゲーションされる。「作動可能に連結された」配列は、対象とする遺伝子と隣接している発現制御配列と、トランスで、または離れて作用して、対象とする遺伝子を制御する発現制御配列の両方を含む。用語「発現制御配列」とは、ライゲーションされているコード配列の発現およびプロセシングを達成するのに必要であるポリヌクレオチド配列を指す。発現制御配列として、適当な転写開始、終結、プロモーターおよびエンハンサー配列；スプライシングおよびポリアデニル化シグナルなどの効率的なＲＮＡプロセシングシグナル；細胞質ｍＲＮＡを安定化する配列；翻訳効率を増強する配列（すなわち、コザックコンセンサス配列）；タンパク質安定性を増強する配列；および望ましい場合には、タンパク質分泌を増強する配列が挙げられる。このような制御配列の性質は、宿主生物に応じて異なり；原核生物では、このような制御配列は、一般に、プロモーター、リボソーム結合部位および転写終結配列を含み；真核生物では、一般に、このような制御配列は、プロモーターおよび転写終結配列を含む。用語「制御配列」は、その存在が、発現およびプロセシングにとって不可欠である成分を含むものとし、また、その存在が有利であるさらなる成分、例えば、リーダー配列および融合パートナー配列も含み得る。

【０１２９】

用語「薬学的に許容される担体」としては、生理学的に適合される、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌薬および抗真菌薬、等張剤および吸収遅延剤などが挙げられる。薬学的に許容される担体の例として、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなどならびにそれらの組合せのうち１種または複数が挙げられる。多くの場合、組成物中に、等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコールまたは塩化ナトリウムを含むことが好ましい。薬学的に許容される担体は、抗体または抗体部分の有効期間または有効性を増強する、湿潤剤または乳化剤、防腐剤またはバッファーなどの微量の補助物質をさらに含み得る。

【０１３０】

用語「ポリヌクレオチド」とは、リボヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドいずれかまたはいずれかの種類のヌクレオチドの修飾された形態の２つ以上のヌクレオチドのポリマー形態を意味する。この用語は、ＤＮＡの一本鎖および二本鎖形態を含む。用語「単離されたポリヌクレオチド」とは、その起源によって、ポリヌクレオチド（例えば、ゲノムの、ｃＤＮＡの、または合成起源の、またはそれらのいくつかの組合せ）を意味するものとし、「単離されたポリヌクレオチド」は、天然に「単離されたポリヌクレオチド」が、それとともに見られるポリヌクレオチドのすべてまたは一部と会合しておらず；天然に

は連結していないポリヌクレオチドと作動可能に連結され；またはより長い配列の一部として天然には生じない。

【０１３１】

用語「ポリペプチド」とは、アミノ酸の任意のポリマー鎖を指す。用語「ペプチド」および「タンパク質」は、用語ポリペプチドと同義的に使用され、アミノ酸のポリマー鎖も指す。用語「ポリペプチド」は、天然または人工タンパク質、タンパク質断片およびタンパク質配列のポリペプチド類似体を包含する。ポリペプチドは、単量体であってもポリマーであってもよい。

【０１３２】

用語「予防上有効な量」とは、所望の予防結果を達成するのに必要な投与量で、期間で、有効な量を指す。

【０１３３】

用語「組換え宿主細胞」（または簡単に「宿主細胞」）とは、外因性ＤＮＡが導入されている細胞を指すものとする。このような用語は、特定の対象細胞だけでなくこのような細胞の後代をも指すものとして理解されなければならない。突然変異または環境の影響のいずれかによって後継の世代では特定の修飾が起こり得るので、このような後代は、実際は、親細胞と同一でない場合もあるが、依然として用語「宿主細胞」の範囲内に含まれる。一実施形態では、宿主細胞は、生物界のいずれかから選択される原核細胞および真核細胞を含む。真核細胞は、原生生物、真菌、植物および動物細胞を含む。別の実施形態では、宿主細胞として、それだけには限らないが、原核細胞株、大腸菌；哺乳動物細胞株、ＣＨＯ、ＨＥＫ　２９３およびＣＯＳ；昆虫細胞株Ｓｆ９；および真菌細胞、サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）が挙げられる。

【０１３４】

標準技術が、組換えＤＮＡ、オリゴヌクレオチド合成および組織培養および形質転換（例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション）のために使用され得る。酵素反応および精製技術は、製造業者の使用説明書に従って、または当技術分野でよく達成されるように、または本明細書に記載されるように実施され得る。前述の技術および手順は、当技術分野で周知の従来の方法に従って、本明細書を通じて引用され論じられる種々の一般的参考文献およびより特定の参考文献に記載されるように概して実施され得る。例えば、任意の目的のために参照により本明細書に組み込まれる、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ（第2版、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ、Ｎ．Ｙ．（１９８９年））参照のこと。

【０１３５】

用語「組換え抗体」とは、組換え手段によって調製、発現、作製もしくは単離されたすべての種の抗体または免疫グロブリン、例えば、宿主細胞にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを使用して発現された抗体、組換え、コンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体（Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ、ＴＩＢ　Ｔｅｃｈ．、１５：６２－７０頁（１９９７年）；Ａｚｚａｚｙら、Ｃｌｉｎ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ．、３５：４２５－４４５頁（２００２年）；Ｇａｖｉｌｏｎｄｏら、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、２９：１２８－１４５頁（２００２年）；Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍら、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　Ｔｏｄａｙ、２１：３７１－３７８頁（２０００年））、ヒト免疫グロブリン遺伝子にとってトランスジェニックである動物（例えば、マウス）から単離された抗体（例えば、Ｔａｙｌｏｒ，Ｌ．Ｄ．ら（１９９２年）　Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．、２０：６２８７－６２９５頁；Ｋｅｌｌｅｒｍａｎｎら、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｏｐｉｎｉｏｎ　ｉｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１３：５９３－５９７頁（２００２年）；Ｌｉｔｔｌｅら、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　Ｔｏｄａｙ、２１：３６４－３７０頁（２０００年）参照のこと）または免疫グロブリン遺伝子配列のその他のＤＮＡ配列へのスプライシングを含む任意のその他の手段によって調製、発現、作製もしくは単離された抗体を含むものとする。このような組換え抗体は、種特異的生殖系列免疫グロブリン配列由来の可変領域および定常

領域を有する。このような組換え抗体は、インビトロ突然変異誘発（または、ヒトＩｇ配列にとってトランスジェニックの動物が使用される場合には、インビボ体細胞突然変異誘発）に付されることがあり、したがって、組換え抗体のＶＨおよびＶＬ領域のアミノ酸配列は、種特異的生殖系列ＶＨおよびＶＬ配列に由来し、それと関連している一方で、インビボにおける抗体生殖系列レパートリー内には天然に存在しない配列である。

【０１３６】

用語「回収すること」とは、例えば、当技術分野で周知のタンパク質精製技術を使用する単離によって、ポリペプチドなどの化学種を、天然に会合している成分を実質的に含まないようにすることを指す。

【０１３７】

用語「試料」とは、その広い意味で使用される。「生体試料」とは、それだけには限らないが、生物または以前は生きていた物に由来する物質の任意の量を含む。このような生物として、それだけには限らないが、ヒト、マウス、ラット、サル、イヌ、ウサギおよびその他の動物が挙げられる。このような物質として、それだけには限らないが、血液、血清、尿、滑液、細胞、臓器、組織、骨髄、リンパ節および脾臓が挙げられる。

【０１３８】

用語「一本鎖Ｆｖ」または「ｓｃＦｖ」とは、抗体のＶＨおよびＶＬドメインを含む抗体断片を指し、ここで、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖中に存在する。一般に、Ｆｖポリペプチドは、ＶＨおよびＶＬドメインの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、これは、ｓＦｖが抗原結合のための所望の構造を形成するのを可能にする。ｓｃＦｖの概説については、Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ ｉｎ Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、第１１３巻、ＲｏｓｅｎｂｕｒｇおよびＭｏｏｒｅ編 Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、２６９－３１５頁（１９９４年）参照のこと。

【０１３９】

用語「特異的結合」または「特異的に結合すること」は、抗体、タンパク質またはペプチドの、第２の化学種との相互作用に関連して、相互作用が、化学種上の特定の構造（例えば、抗原決定基またはエピトープ）の存在に依存していること、例えば、抗体が、広くタンパク質とではなく、特定のタンパク質構造を認識し、結合することを意味する。抗体が、エピトープ「Ａ」に対して特異的である場合には、標識された「Ａ」および抗体を含有する反応物中のエピトープＡ（または遊離の、標識されていないＡ）を含有する分子の存在は、抗体と結合している標識されたＡの量を低減する。

【０１４０】

用語「実質的に」は、ＣＤＲとの関連で、非ヒト抗体ＣＤＲのアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％または少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を有するＣＤＲを指す。

【０１４１】

用語「表面プラズモン共鳴」とは、例えば、ＢＩＡｃｏｒｅシステム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｓｅｎｓｏｒ ＡＢ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ ａｎｄ Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）を使用して、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化の検出によってリアルタイム生体特異的相互作用の分析を可能にする光学現象を指す。さらなる説明のためには、（Ｊｏｎｓｓｏｎら、Ａｎｎ．Ｂｉｏｌ．Ｃｌｉｎ．５１：１９－２６頁（１９９３年）；Ｊｏｎｓｓｏｎら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １１：６２０－６２７頁（１９９１年）；Ｊｏｈｎｓｓｏｎら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｒｅｃｏｇｎｉｔ．８：１２５－１３１頁（１９９５年）；およびＪｏｈｎｓｓｏｎ，Ｂら、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、１９８：２６８－２７７頁（１９９１年））。

【０１４２】

用語「治療上有効な量」とは、所望の治療結果を達成するのに必要な投与量で、期間で、有効な量を指す。治療上有効な量とは、障害またはその１つもしくは複数の症状の重篤度および／または期間を低減する、または寛解させ、障害の進展を防ぎ、障害の退縮を引

き起こし、障害と関連する１つまたは複数の症状の再発、発生、発症または進行を防ぎ、障害を検出し、または別の治療（例えば、予防薬または治療薬）の予防もしくは治療効果を増強もしくは改善するのに十分である治療の量および／または期間であり得る。抗体または抗体部分の治療上有効な量は、当業者によって決定され得、個体の病状、年齢、性別および体重ならびに抗体または抗体部分の個体において所望の反応を誘発する能力などの因子に従って変わり得る。治療上有効な量はまた、治療上有益な効果が、抗体または抗体部分の任意の毒性または有害効果を上回るものである。

【０１４３】

用語「形質転換」とは、それによって外因性ＤＮＡが宿主細胞に入る任意のプロセスを指す。形質転換は、当技術分野で周知の種々の方法を使用して自然条件または人口条件下で起こり得る。形質転換は、原核細胞または真核細胞の宿主細胞中に外来核酸配列を挿入するための任意の公知の方法に依存し得る。方法は、形質転換されている宿主細胞に基づいて選択され、それだけには限らないが、ウイルス感染、エレクトロポレーション、リポフェクションおよび微粒子銃を挙げることができる。このような「形質転換された」細胞は、挿入されたＤＮＡが、自己複製プラスミドとして、または宿主染色体の一部としてのいずれかで複製できる安定に形質転換された細胞を含む。それらはまた、挿入されたＤＮＡまたはＲＮＡを限定された期間、一時的に発現する細胞を含む。

【０１４４】

用語「トランスジェニック生物」は、導入遺伝子を含有する細胞を有する生物を指し、ここで、生物（または生物の先祖）に導入された導入遺伝子は、生物では天然に発現されないポリペプチドを発現する。「導入遺伝子」は、トランスジェニック生物が発達する細胞のゲノム中に安定に、作動可能に組み込まれ、トランスジェニック生物の１種または複数の細胞種または組織においてコードされた遺伝子産物の発現を指示するＤＮＡ構築物である。

【０１４５】

用語「ベクター」は、連結されている別の核酸を輸送することができる核酸分子を指すものとする。ベクターの１つの種類は、「プラスミド」であり、その中にさらなるＤＮＡセグメントがライゲーションされ得る環状の二本鎖ＤＮＡループを指す。別の種類のベクターは、ウイルスベクターであり、これでは、さらなるＤＮＡセグメントがウイルスゲノム中にライゲーションされ得る。特定のベクターは、それらが導入されている宿主細胞において自己複製できる（例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター）。その他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入の際に宿主細胞のゲノム中に組み込まれることができ、それによって、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、特定のベクターは、それらが作動可能に連結されている遺伝子の発現を指示できる。このようなベクターは、本明細書において、「組換え発現ベクター」（または簡単、「発現ベクター」）と呼ばれる。一般に、組換えＤＮＡ技術において有用な発現ベクターは、プラスミドの形態であることが多い。本明細書では、「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドが、ベクターの最もよく使用される形態であるので同義的に使用され得る。しかし、本開示は、同等の機能を果たす、ウイルスベクター（例えば、複製欠陥レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）などの発現ベクターのこのようなその他の形態を含むものとする。

【０１４６】

用語「バーニアゾーン」とは、ＦｏｏｔｅおよびＷｉｎｔｅｒ（参照により本明細書に組み込む、１９９２年、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．　２２４：４８７－４９９頁）によって記載される、ＣＤＲ構造を調整し、抗原に対する適合度を微調整し得るフレームワーク残基のサブセットを指す。バーニアゾーン残基は、ＣＤＲの根底をなす層を形成し、ＣＤＲの構造および抗体の親和性に対して影響を及ぼし得る。

【０１４７】

Ｂ．抗ＮＧＦ結合タンパク質

本開示は、ＮＧＦを中和する能力を含めた、ＮＧＦの生物活性または機能を結合および

調節できる、結合タンパク質の新規ファミリー、マウス抗体、ＣＤＲグラフト化抗体、哺乳動物化（ウシ化、ラクダ化、イヌ化、ウマ化、ネコ化またはヒト化）抗体およびそれらの断片を提供する。したがって、本開示はまた、ＮＧＦを阻害する治療手段を提供し、ＮＧＦのレベルの増大と関連している疾患、特に、比較できる正常な対象において観察されたＮＧＦレベルと比較される、ＮＧＦのレベルの増大が有害である疾患、状態または障害を治療するための組成物および方法を提供する。

【０１４８】

本開示の結合タンパク質は、ＮＧＦと結合できる結合タンパク質を産生するのに十分な条件下、培養培地中で本明細書において記載された宿主細胞を培養することを含めた、当技術分野で公知であり、本明細書において記載された、いくつかの技術のうちいずれかによって作製され得る。

【０１４９】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマの使用、組換えおよびファージディスプレイ技術またはそれらの組合せを含めた、当技術分野で公知のさまざまな技術を使用して調製され得る。例えば、モノクローナル抗体は、当技術分野で公知であり、例えば、Ｈａｒｌｏｗら、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、第２版、１９８８年）；Ｈａｍｍｅｒｌｉｎｇら、Ｉｎ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ、５６３－６８１頁（Ｅｌｓｅｖｉｅｒ、Ｎ．Ｙ．、１９８１年）に教示されるものを含めたハイブリドーマ法を使用して製造され得る。

【０１５０】

ハイブリドーマ技術を使用して特異性抗体を製造およびスクリーニングする方法は、当技術分野で周知である。このような方法には、例えば、本開示の抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を培養することなどが挙げられ、ハイブリドーマは、本開示の抗原で免疫処置されたマウスから単離された脾細胞を、骨髄腫細胞と融合すること、次いで、本開示のポリペプチドと結合できる抗体を分泌するハイブリドーマクローンの融合から得られたハイブリドーマをスクリーニングすることによって作製される。手短には、例えば、マウスは、ＮＧＦ抗原を用いて免疫処置され得る。ＮＧＦ抗原は、免疫応答を刺激するようアジュバントとともにまたはアジュバントなしで投与され得る。このようなアジュバントとして、完全または不完全フロイントアジュバント、ＲＩＢＩ（ムラミルジペプチド）またはＩＳＣＯＭ（免疫刺激複合体）が挙げられる。このようなアジュバントは、ポリペプチドを局所沈着に隔離することによって、それが迅速分散することから保護し得る、またはそれらは、宿主を、マクロファージおよび免疫系のその他の成分にとって走化性である因子を分泌するよう刺激する物質を含有し得る。ポリペプチドが投与される場合には、免疫処置スケジュールは、数週間にわたって広がっているポリペプチドの２回以上の投与を含む。

【０１５１】

ＮＧＦ抗原を用いて動物を免疫処置した後、抗体および／または抗体を製造する細胞が動物から得られ得る。抗ＮＧＦ抗体を含有する血清が、動物を出血させるまたは屠殺することによって動物から得られる。動物から得られると血清が使用され得、免疫グロブリン画分が血清から得られ得るまたは抗ＮＧＦ抗体が血清から精製され得る。この方法で得られた血清または免疫グロブリンは、ポリクローナルであり、したがって、不均一な特性のアレイを有する。

【０１５２】

免疫応答が検出されると、例えば、抗原ＮＧＦに対して特異的な抗体を、マウス血清において検出し、マウス脾臓を回収し、脾細胞を単離することができる。次いで、周知の技術によって脾細胞を任意の適した骨髄腫細胞、例えば、ＡＴＣＣから入手可能である細胞株ＳＰ２０から得た細胞などに融合する。ハイブリドーマを選択し、限界希釈によってクローニングすることができる。次いで、ハイブリドーマクローンを、ＮＧＦと結合できる抗体を分泌する細胞について当技術分野で公知の方法によってアッセイすることができる

。一般に、高レベルの抗体を含有する腹水を、陽性ハイブリドーマクローンを用いてマウスを免疫処置することによって作製できる。

【０１５３】

抗体を産生する不死化されたハイブリドーマは、免疫処置された動物から調製され得る。免疫処置後、当技術分野で周知であるように、動物を屠殺し、脾臓Ｂ細胞を不死化された骨髄腫細胞と融合することができる（Ｈａｒｌｏｗら、上記）。または、骨髄腫細胞は非分泌細胞株由来でもよく、免疫グロブリンポリペプチドを分泌しない。融合し、抗生物質選択した後ハイブリドーマを、ＮＧＦまたはその部分またはＮＧＦを発現する細胞を使用してスクリーニングすることができる。初期スクリーニングは、例えば、酵素結合イムノアッセイ（ＥＬＩＳＡ）またはラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）を使用して実施され得る。ＥＬＩＳＡスクリーニングの例は、ＷＯ００／３７５０４に提供されている。

【０１５４】

抗ＮＧＦ抗体を産生するハイブリドーマを選択し、クローニングし、以下にさらに論じられる、頑強なハイブリドーマ増殖、高い抗体産生および望ましい抗体特徴と含めた望ましい特徴についてさらにスクリーニングすることができる。ハイブリドーマは、培養され、同系動物において、免疫系を欠く動物、例えば、ヌードマウスにおいてインビボで、またはインビトロで細胞培養において拡大され得る。ハイブリドーマを選択、クローニングおよび拡大する方法は、当業者に周知である。

【０１５５】

ハイブリドーマを調製するための例示的動物系として、マウスがある。マウスにおけるハイブリドーマ製造は、極めて十分に確立されており、融合のために免疫処置された脾細胞を単離するための免疫処置プロトコールおよび技術は周知である。融合パートナー（例えば、マウス骨髄腫細胞）および融合手順も公知である。あるいは、ハイブリドーマは、ラット、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシまたはウマなどの非ヒト、非マウス種において製造される場合もある。あるいは、ヒト非分泌性骨髄腫が抗ＮＧＦ抗体を発現するヒト細胞と融合されているヒトハイブリドーマが製造され得る。

【０１５６】

特定のエピトープを認識する抗体断片は、公知の技術によって作製され得る。例えば、本開示のＦａｂおよびＦ（ａｂ’）２断片は、パパイン（Ｆａｂ断片を製造するよう）またはペプシン（Ｆ（ａｂ’）２断片を製造するよう）などの酵素を使用する免疫グロブリン分子のタンパク質分解切断によって製造され得る。Ｆ（ａｂ’）２断片は、可変領域、軽鎖定常領域、および重鎖のＣＨ１ドメインを含有する。

【０１５７】

組換え抗体は、米国特許第５，６２７，０５２号；ＰＣＴ公開ＷＯ９２／０２５５１；およびＢａｂｃｏｏｋら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、９３：７８４３－７８４８頁１９９６年）に記載される、選択されたリンパ球抗体法（ｓｅｌｅｃｔｅｄ ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｍｅｔｈｏｄ）（ＳＬＡＭ）と当技術分野で呼ばれる手順を使用して、単一の、単離されたリンパ球から作製され得る。この方法では、セクション１に記載される、対象とする抗体を分泌する単細胞、例えば、免疫処置された動物のいずれか１種から得られたリンパ球は、抗原特異的溶血プラークアッセイを使用してスクリーニングされ、これでは、抗原ＮＧＦまたはその断片が、ビオチンなどのリンカーを使用してヒツジ赤血球にカップリングされ、ＮＧＦに対して特異性を有する抗体を分泌する単細胞を同定するために使用される。対象とする抗体を分泌する細胞を同定した後、重鎖および軽鎖可変領域ｃＤＮＡが逆転写酵素－ＰＣＲによって細胞からレスキューされ、次いで、これらの可変領域が、ＣＯＳまたはＣＨＯ細胞などの哺乳動物宿主細胞において、適当な免疫グロブリン定常領域（例えば、ヒト定常領域）との関連で発現され得る。インビボで選択されたリンパ球から得られた増幅された免疫グロブリン配列を用いてトランスフェクトされた宿主細胞は、インビトロでさらなる分析および選択を、例えば、トランスフェクトされた細胞をパニングし、ＮＧＦに対する抗体を発現する細胞を単離することによって受け得る。増幅された免疫グロブリン配列は、インビトロ親和性成熟法、

例えば、ＰＣＴ公開ＷＯ９７／２９１３１およびＰＣＴ公開ＷＯ００／５６７７２に記載されている方法などによってインビトロでさらに操作され得る。

【０１５８】

ＮＧＦ抗原を用いて非ヒト動物を免疫処置することによって、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の一部またはすべてを含む抗体が産生される。例えば、ＮＧＦに対して向けられたヒトモノクローナル抗体は、文献および本明細書において、「ＨｕＭａｂ」マウスと呼ばれ、内因性μおよびκ鎖遺伝子座を不活化する標的化された突然変異と一緒に、再編成されていないヒト重鎖（μおよびγ）およびκ軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座（ｍｉｎｉｌｏｃｕｓ）を含有するマウス系ではなくヒト免疫系の部分を保持するトランスジェニックマウスを使用して作製され得る（Ｌｏｎｂｅｒｇら、１９９４年、Ｎａｔｕｒｅ３６８：８５６－８５９頁）。これらのマウスは、免疫処置に応じて、マウスＩｇＭまたはκの発現の低減を示し、導入されたヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子は、クラススイッチおよび体細胞突然変異を受けて、高親和性ヒトＩｇＧκモノクローナル抗体を生成する。ＨｕＭａｂマウスの調製は、文献に十分に記載されている（例えば、Ｌｏｎｂｅｒｇら、１９９４年、Ｎａｔｕｒｅ ３６８：８５６－８５９頁；Ｌｏｎｂｅｒｇ、１９９４年、Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｅｘｐ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ１１３：４９－１０１頁；Ｔａｙｌｏｒら、１９９４年、Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ６：５７９－５９１頁；Ｌｏｎｂｅｒｇ ＆ Ｈｕｓｚａｒ、１９９５年、Ｉｎｔｅｒｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３：６５－９３頁；およびＨａｒｄｉｎｇ ＆ Ｌｏｎｂｅｒｇ、１９９５年、Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ７６４：５３６－５４６頁参照のこと）。あるいは、ヒト抗ＮＧＦ抗体を作製するために、ＨＣｏ７、ＨＣｏ１２およびＫＭトランスジェニックマウス株などのその他の既知マウス株が使用され得る。トランスジェニックマウスの別の適しているが、限定されない例として、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の大きな断片を含み、マウス抗体産生に欠陥のある操作されたマウス株である、ＸＥＮＯＭＯＵＳＥ（登録商標）トランスジェニックマウスがある。例えば、Ｇｒｅｅｎら Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、７：１３－２１頁（１９９４年）；および米国特許第５，９１６，７７１号、同５，９３９，５９８号、同５，９８５，６１５号、同５，９９８，２０９号、同６，０７５，１８１号、同６，０９１，００１号、同６，１１４，５９８号および同６，１３０，３６４号；ＷＯ９１／１０７４１、ＷＯ９４／０２６０２、ＷＯ９６／３４０９６、ＷＯ９６／３３７３５、ＷＯ９８／１６６５４、ＷＯ９８／２４８９３、ＷＯ９８／５０４３３、ＷＯ９９／４５０３１、ＷＯ９９／５３０４９、ＷＯ００／０９５６０およびＷＯ００／０３７５０４参照のこと。ＸＥＮＯＭＯＵＳＥ（登録商標）トランスジェニックマウスは、十分なヒト抗体の成人様ヒトレパートリーを産生し、抗原特異的ヒトＭａｂｓを作製する。ＸＥＮＯＭＯＵＳＥ（登録商標）トランスジェニックマウスは、ヒト重鎖遺伝子座および軽鎖遺伝子座のメガベースサイズの、生殖系列立体配置ＹＡＣ断片の導入によってヒト抗体レパートリーのおよそ８０％を含有する（Ｍｅｎｄｅｚら、Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ １５：１４６－１５６頁（１９９７年）、Ｇｒｅｅｎら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．、１８８：４８３－４９５頁（１９９８年））。

【０１５９】

本開示の抗体を作製するためにインビトロ法も使用され得、ここで、所望の結合特異性を有する抗体を同定するために、抗体ライブラリーがスクリーニングされる。このような組換え抗体ライブラリーをスクリーニングする方法は、当技術分野で周知であり、例えば、米国特許第５，２２３，４０９号；ＰＣＴ公開番号ＷＯ９２／１８６１９；ＷＯ９１／１７２７１；ＷＯ９２／２０７９１；ＷＯ９２／１５６７９；ＷＯ９３／０１２８８；ＷＯ９２／０１０４７；ＷＯ９２／０９６９０；Ｆｕｃｈｓら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｎｏｌｏｇｙ、９：１３７０－１３７２頁（１９９１年）；Ｈａｙら、Ｈｕｍ．Ａｎｔｉｂｏｄ．Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ、３：８１－８５頁（１９９２年）；Ｈｕｓｅら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４６：１２７５－１２８１頁（１９８９年）；ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙら、Ｎａｔｕｒｅ、３４８：５５２－５５４頁（１９９０年）；Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓら、ＥＭＢＯ Ｊ．、

１２：７２５－７３４頁（１９９３年）；Ｈａｗｋｉｎｓら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２２６：８８９－８９６頁（１９９２年）；Ｃｌａｃｋｓｏｎら、Ｎａｔｕｒｅ、３５２：６２４－６２８頁（１９９１年）；Ｇｒａｍら、ＰＮＡＳ、８９：３５７６－３５８０頁（１９９２年）；Ｇａｒｒａｒｄら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、９：１３７３－１３７７頁（１９９１年）；Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍら、Ｎｕｃ．Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．、１９：４１３３－４１３７頁（１９９１年）；およびＢａｒｂａｓら、ＰＮＡＳ、８８：７９７８－７９８２頁（１９９１年）；米国特許出願公開第２００３０１８６３７４号；およびＰＣＴ公開番号ＷＯ９７／２９１３１に記載される方法が挙げられる。

【０１６０】

組換え抗体ライブラリーは、ＮＧＦまたはＮＧＦの部分を用いて免疫処置された被験体に由来するものであり得る。または、組換え抗体ライブラリーは、イヌＮＧＦを用いて免疫処置されていないイヌ被験体から得たイヌ抗体ライブラリーなど、ＮＧＦを用いて免疫処置されていない天然被験体に由来し得る。本開示の抗体は、イヌＮＧＦを含むペプチドを用いて組換え抗体ライブラリーをスクリーニングし、それによってＮＧＦを認識する抗体を選択することによって選択される。このようなスクリーニングおよび選択を実施する方法は、前述の段落における参考文献に記載されるなど、当技術分野で周知である。特定のK_{off}速度定数でイヌＮＧＦから解離するものなど、ｈＮＧＦに対して特定の結合親和性を有する本開示の抗体を選択するために、表面プラズモン共鳴の当技術分野で公知の方法が使用されて、所望のK_{off}速度定数を有する抗体が選択され得る。特定のIC_{50}を有するものなど、ｈＮＧＦに対して特定の中和活性を有する本開示の抗体を選択するために、ｈＮＧＦ活性の阻害を評価するための当技術分野で公知の標準法が使用され得る。

【０１６１】

例えば、本開示の抗体はまた、当技術分野で公知の種々のファージディスプレイ法を使用して作製され得る。ファージディスプレイ法では、機能的抗体ドメインは、それらをコードするポリヌクレオチド配列を保持するファージ粒子の表面にディスプレイされる。特定の態様では、このようなファージは、レパートリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えば、イヌ、ヒトまたはマウス）から発現される抗原結合ドメインをディスプレイするために利用され得る。対象とする抗原と結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原を用いて、例えば、標識された抗原または固体表面もしくはビーズに結合もしくは捕獲された抗原を使用して選択または同定され得る。これらの方法において使用されるファージは、通常、ファージ遺伝子ＩＩＩまたは遺伝子ＶＩＩＩタンパク質のいずれかに組換えによって融合された、Ｆａｂ、Ｆｖまたはジスルフィドによって安定化されたＦｖ抗体ドメインを有するファージから発現されるｆｄおよびＭ１３結合ドメインを含む糸状ファージである。本開示の抗体を作製するために使用され得るファージディスプレイ法の例として、Ｂｒｉｎｋｍａｎｎら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ、１８２：４１－５０頁（１９９５年）；Ａｍｅｓら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ、１８４：１７７－１８６頁（１９９５年）；Ｋｅｔｔｌｅｂｏｒｏｕｇｈら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、２４：９５２－９５８頁（１９９４年）；Ｐｅｒｓｉｃら、Ｇｅｎｅ、１８７：９－１８頁（１９９７年）；Ｂｕｒｔｏｎら、Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、５７：１９１－２８０頁（１９９４年）；ＰＣＴ公開番号ＰＣＴ／ＧＢ９１／０１１３４；ＰＣＴ公開ＷＯ９０／０２８０９；ＷＯ９１／１０７３７；ＷＯ９２／０１０４７；ＷＯ９２／１８６１９；ＷＯ９３／１１２３６；ＷＯ９５／１５９８２；ＷＯ９５／２０４０１；および米国特許第５，６９８，４２６号；同５，２２３，４０９号；同５，４０３，４８４号；同５，５８０，７１７号；同５，４２７，９０８号；同５，７５０，７５３号；同５，８２１，０４７号；同５，５７１，６９８号；同５，４２７，９０８号；同５，５１６，６３７号；同５，７８０，２２５号；同５，６５８，７２７号；同５，７３３，７４３号；および同５，９６９，１０８号に開示されるものが挙げられる。

【０１６２】

上記の参考文献に記載されるように、ファージ選択後、ファージから抗体コーディング領域が単離され、ヒト抗体または任意のその他の所望の抗原結合断片を含む全抗体を作製するために使用され、例えば、以下に詳細に記載される哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母および細菌を含めた任意の所望の宿主において発現され得る。例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’およびＦ（ａｂ’）２断片を組換え製造するための技術も、ＰＣＴ公開ＷＯ９２／２２３２４；Ｍｕｌｌｉｎａｘら、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、１２（６）：８６４－８６９頁（１９９２年）；およびＳａｗａｉら、ＡＪＲＩ　３４：２６－３４頁（１９９５年）；およびＢｅｔｔｅｒら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４０：１０４１－１０４３頁（１９８８年）（前記文献は参照によりその全体が組み込まれる）に開示されるものなど、当技術分野で公知の方法を使用して使用され得る。一本鎖Ｆｖおよび抗体を製造するために使用され得る技術の例として、米国特許第４，９４６，７７８号および同５，２５８，４９８号；Ｈｕｓｔｏｎら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ、２０３：４６－８８頁（１９９１年）；Ｓｈｕら、ＰＮＡＳ、９０：７９９５－７９９９頁（１９９３年）；およびＳｋｅｒｒａら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４０：１０３８－１０４０頁（１９８８年）に記載されるものが挙げられる。

【０１６３】

ファージディスプレイによる組換え抗体ライブラリーのスクリーニングの代替方法は公知であり、本開示の二重特異性抗体の同定に適用され得る大きなコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングするためのその他の方法論が挙げられる。代替発現系の１つの種類として、ＰＣＴ公開番号ＷＯ９８／３１７００に、ならびにＲｏｂｅｒｔｓら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、９４：１２２９７－１２３０２頁（１９９７年）に記載される、組換え抗体ライブラリーが、ＲＮＡ－タンパク質融合物として発現されるものがある。この系では、ピューロマイシン、ペプチジルアクセプター抗生物質を３’末端に保持する合成ｍＲＮＡのインビトロ翻訳によって、ｍＲＮＡおよびそれがコードするペプチドまたはタンパク質間の共有結合融合物が作製される。したがって、特異的ｍＲＮＡは、コードされたペプチドまたはタンパク質、例えば、抗体またはその部分の特性、例えば、抗体またはその部分の二重特異性抗原との結合に基づいて、ｍＲＮＡの複雑な混合物（例えば、コンビナトリアルライブラリー）から濃縮され得る。このようなライブラリーのスクリーニングから回収される抗体またはその部分をコードする核酸配列は、上記の組換え手段によって（例えば、哺乳動物宿主細胞において）発現され得、さらに、突然変異が、最初に選択された配列中に導入されているｍＲＮＡ－ペプチド融合物のスクリーニングのさらなるラウンドによって、または上記の組換え抗体のインビトロでの親和性成熟のためのその他の方法によってのいずれかで、さらなる親和性成熟に付され得る。

【０１６４】

別のアプローチでは、本開示の抗体はまた、当技術分野で公知の酵母ディスプレイ法を使用して作製または親和性成熟され得る。酵母ディスプレイ法では、抗体ドメインを酵母細胞壁に繋ぎ止め、それらを酵母の表面上にディスプレイするために遺伝学的方法が使用される。特に、このような酵母は、レパートリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えば、ヒトまたはマウス）から発現される抗原結合ドメインをディスプレイするために利用され得る。本開示の抗体を作製するために使用され得る酵母ディスプレイ法の例として、参照により本明細書に組み込むＷｉｔｔｒｕｐら、米国特許第６，６９９，６５８号に開示されるものが挙げられる。

【０１６５】

本明細書において記載された抗体または抗原結合断片はまた、遺伝子操作によって製造され得る。例えば、大腸菌において重鎖および軽鎖遺伝子の両方を発現させるための技術は、ＰＣＴ特許出願：公開番号ＷＯ９０１４４３、ＷＯ９０１４４３およびＷＯ９０１４４２４およびＨｕｓｅら、１９８９年Ｓｃｉｅｎｃｅ２４６：１２７５－８１頁における主題である。したがって、本開示はまた、本明細書において記載された結合タンパク質のいずれかをコードする単離核酸ならびにこのような核酸分子を含む組換えベクターおよびこのような組換えベクターを含む宿主細胞も包含する。

【０１６６】
ベクターは、連結されている別の核酸を輸送することができる構築物であり得る核酸分子である。ベクターは、任意の好ましい、または必要なオペレーショナルエレメントを含み得る。好ましいベクターは、それについて制限部位が記載されており、核酸配列の転写に必要なオペレーショナルエレメントを含有するものである。このようなオペレーショナルエレメントとして、例えば、少なくとも１つの適したプロモーター、少なくとも１つのオペレーター、少なくとも１つのリーダー配列、少なくとも１つの終結コドンおよび核酸配列の適当な転写およびその後の翻訳にとって必要な、または好ましい任意のその他のＤＮＡ配列が挙げられる。このようなベクターは、宿主生物によって認識される少なくとも１つの複製起点を、少なくとも１つの選択可能なマーカーおよび核酸配列の転写を開始できる少なくとも１つのプロモーター配列とともに含有する。ベクターは、さらなるＤＮＡセグメントがライゲーションされ得るプラスミドであり得る。ベクターは、ウイルスゲノム中にさらなるＤＮＡセグメントがライゲーションされ得るウイルスベクターであり得る。特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞において自己複製できる（例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター）。その他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入の際に宿主細胞のゲノム中に組み込まれ得、それによって宿主ゲノムとともに複製される。さらに、特定のベクターは、それらが作動可能に連結されている遺伝子の発現を指示できる。このようなベクターは、本明細書において「組換え発現ベクター」（または簡単に「発現ベクター」）と呼ばれる。一般に、組換えＤＮＡ技術において有用な発現ベクターは、プラスミドの形態であることが多い。プラスミドが、ベクターの最もよく使用される形態であるので、本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は同義的に使用され得る。しかし、本開示は、同等の機能を果たす、ウイルスベクター（例えば、複製に欠陥のあるレトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）などのような発現ベクターのその他の形態を含むよう意図される。例として、制限するものではないが、適したベクターとして、ｐｃＤＮＡ、ｐＴＴ（Ｄｕｒｏｃｈｅｒら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、第３０巻、第２号（２００２年））；ｐＴＴ３（さらなる多重クローニング部位を有するｐＴＴ、ｐＥＦＢＯＳ（Ｍｉｚｕｓｈｉｍａら、Ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、第１８巻、第１７号（１９９０年））、ｐＢＶ、ｐＪＶ、ｐＢＪまたはｐＨｙｂＥ（特許公報番号：ＵＳ２００９／０２３９２５９Ａ１）が挙げられる。
【０１６７】
作動可能に連結されている配列は、それらが意図される方法で機能するのを可能にする関係にある。コード配列に作動可能に連結されている制御配列は、コード配列の発現が、制御配列に適合する条件下で達成されるような方法でライゲーションされる。作動可能に連結された配列は、対象とする遺伝子と隣接している発現制御配列と、トランスで、または離れて作用して、対象とする遺伝子を制御する発現制御配列の両方を含む。発現制御配列とは、ライゲーションされているコード配列の発現およびプロセシングを達成するのに必要であるポリヌクレオチド配列である。発現制御配列として、適当な転写開始、終結、プロモーターおよびエンハンサー配列；スプライシングおよびポリアデニル化シグナルなどの効率的なＲＮＡプロセシングシグナル；細胞質ｍＲＮＡを安定化する配列；翻訳効率を増強する配列（すなわち、コザックコンセンサス配列）；タンパク質安定性を増強する配列；および望ましい場合には、タンパク質分泌を増強する配列が挙げられる。このような制御配列の性質は、宿主生物に応じて異なり；原核生物では、このような制御配列は、一般に、プロモーター、リボソーム結合部位および転写終結配列を含み；真核生物では、一般に、このような制御配列は、プロモーターおよび転写終結配列を含む。制御配列は、その存在が、発現およびプロセシングにとって不可欠である成分を含み得、また、その存在が有利であるさらなる成分、例えば、リーダー配列および融合パートナー配列も含み得る。
【０１６８】
宿主細胞は、外因性ＤＮＡを宿主細胞中に導入するベクターで形質転換され得る。形質

転換は、当技術分野で周知の種々の方法を使用して天然または人工条件下で起こり得る。形質転換は、外来核酸配列を原核生物または真核生物の宿主細胞へ挿入するための任意の既知法によるものであり得る。方法は、形質転換されている宿主細胞に基づいて選択され、それだけには限らないが、ウイルス感染、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ＤＥＡＥ－デキストラントランスフェクション、微粒子銃などを挙げることができる。形質転換された細胞は、挿入されたＤＮＡが、自己複製プラスミドとしてか、または宿主染色体の一部としてのいずれかで複製できる安定に形質転換された細胞および挿入されたＤＮＡまたはＲＮＡを、限定された期間の間、一時的に発現する細胞を含む。

【０１６９】

宿主細胞などの宿主生物は、当技術分野で周知の、ベクターの増幅およびタンパク質の発現に適当な条件下で培養される。発現された組換えタンパク質は、同様に当技術分野で周知のいくつかの方法のいずれかによって検出され得る。

【０１７０】

適した宿主生物として、例えば、原核細胞または真核細胞系が挙げられる。真核細胞は、原生生物細胞、動物細胞、植物細胞または真菌細胞であり得る。真核細胞は、例えば、哺乳動物細胞、鳥類細胞または昆虫Ｓｆ９細胞などの昆虫細胞であり得る動物細胞である。それだけには限らないが、ＨｅＬａ、ＭＲＣ－５またはＣＶ－１などの確立された、容易に入手可能なものから得られる細胞が使用され得る。宿主細胞は、大腸菌細胞またはそれだけには限らないがサッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）などの酵母細胞であり得る。本開示の組換え抗体を発現させるための哺乳動物宿主細胞としてまた、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ細胞）（例えば、Ｋａｕｆｍａｎら、Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１５９：６０１－６２１頁（１９８２年）に記載されたＤＨＦＲ選択可能なマーカーとともに使用される、Ｕｒｌａｕｂら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、７７：４２１６－４２２０頁（１９８０年）に記載されたｄｈｆｒ－ＣＨＯ細胞を含む）、ＮＳ０骨髄腫細胞、ＣＯＳ細胞およびＳＰ２細胞が挙げられる。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターが哺乳動物宿主細胞中に導入される場合、抗体は、宿主細胞における抗体の発現を可能にするのに十分な期間、宿主細胞を培養することによって、または宿主細胞が増殖される培養培地への抗体の分泌によって製造される。抗体は、標準タンパク質精製法を使用して培養培地から回収され得る。

【０１７１】

宿主細胞はまた、機能的抗体断片、例えば、Ｆａｂ断片またはｓｃＦｖ分子を製造するために使用され得る。上記の手順に対する変法は、本開示の範囲内にあるということは理解されよう。例えば、本開示の抗体の軽鎖および／または重鎖のいずれかの機能的断片をコードするＤＮＡを用いて、宿主細胞をトランスフェクトすることが望ましいものであり得る。組換えＤＮＡ技術はまた、対象とする抗原との結合にとって必須ではない、軽鎖および重鎖のいずれかまたは両方をコードするＤＮＡの一部またはすべてを除去するためにも使用され得る。このような末端切断型ＤＮＡ分子から発現された分子もまた、本開示の抗体によって包含される。さらに、標準化学的架橋法によって本開示の抗体を第２の抗体に架橋することによって、一方の重鎖および一方の軽鎖が本開示の抗体であり、もう一方の重鎖および軽鎖が対象とする抗原以外の抗原に対して特異的である二機能性抗体も製造され得る。

【０１７２】

本開示の抗体またはその抗原結合部分の組換え発現のための系では、抗体重鎖および抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターが、リン酸カルシウム媒介トランスフェクションによってｄｈｆｒ－ＣＨＯ細胞に導入される。組換え発現ベクター内では、抗体重鎖および軽鎖遺伝子は、各々、この遺伝子の高レベルの転写を駆動するためにＣＭＶエンハンサー／ＡｄＭＬＰプロモーター調節エレメントに作動可能に連結されている。組換え発現ベクターはまた、メトトレキサート選択／増幅を使用してベクターでトランスフェクトされているＣＨＯ細胞を選択することを可能にするＤＨＦＲ遺伝子を保持する。選択さ

れた形質転換体宿主細胞は、抗体重鎖および軽鎖の発現を可能にするよう培養され、無傷の抗体が培養培地から回収される。組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞をトランスフェクトし、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養し、培養培地から抗体を回収するために、標準分子生物学技術が使用される。さらに、本開示は、本開示の宿主細胞を、本開示の組換え抗体が合成されるまで適した培養培地中で培養することによって、本開示の組換え抗体を合成する方法を提供する。この方法は、培養培地から組換え抗体を単離することをさらに含み得る。

【０１７３】

したがって、本開示は、活性ヒトＮＧＦを含めたＮＧＦポリペプチドに対して特異的であり、これを実質的に中和する抗ＮＧＦ結合タンパク質を提供する。また、ＮＧＦポリペプチドに対して実質的に特異的であり、ＮＧＦポリペプチドと結合すると実質的に中和する抗体重鎖および軽鎖アミノ酸配列も提供される。この特異性によって、同様の特異性を有する抗ヒトＮＧＦヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体が、ＮＧＦ関連疾患の有効な免疫療法であることが可能になる。

【０１７４】

本開示は、配列番号２、配列番号６、配列番号１０、配列番号１４、配列番号１８、配列番号２２、配列番号２５、配列番号２７、配列番号２９、配列番号３１、配列番号３３、配列番号３５、配列番号３７、配列番号３９、配列番号４１、配列番号４３、配列番号１６５、配列番号１６６、配列番号１６７、配列番号１６８、配列番号１６９、配列番号１７０、配列番号１７７、配列番号１７９、配列番号１８０、配列番号１８２、配列番号１８４、配列番号１８５、配列番号１８７、配列番号１８９、配列番号１９０、配列番号１９２、配列番号１９５、配列番号１９７、配列番号１９９、配列番号２０１、配列番号２０３、配列番号２０６、配列番号２０７および配列番号４、配列番号８、配列番号１２、配列番号１６、配列番号２０、配列番号２４、配列番号２６、配列番号２８、配列番号３０、配列番号３２、配列番号３４、配列番号３６、配列番号３８、配列番号４０、配列番号４２および配列番号４４、配列番号１７１、配列番号１７２、配列番号１７３、配列番号１７４、配列番号１７５、配列番号１７６、配列番号１８１、配列番号１８３、配列番号１８６、配列番号１８８、配列番号１９１、配列番号１９３、配列番号１９４、配列番号１９６、配列番号１９８、配列番号２００、配列番号２０２からなる群から選択され、ＮＧＦポリペプチドエピトープと、本明細書において記載されたとおり実質的に高親和性で結合し、ＮＧＦポリペプチド活性を実質的に調節する、例えば、実質的に低減する能力を有する、少なくとも１種のアミノ酸配列を含む抗ＮＧＦ結合タンパク質を包含する。

【０１７５】

このような結合タンパク質の例として、配列番号２、配列番号６、配列番号１０、配列番号１４、配列番号１８、配列番号２２、配列番号２５、配列番号２７、配列番号２９、配列番号３１、配列番号３３、配列番号３５、配列番号３７、配列番号３９、配列番号４１、配列番号４３、配列番号１６５、配列番号１６６、配列番号１６７、配列番号１６８、配列番号１６９、配列番号１７０、配列番号１７７、配列番号１７９、配列番号１８０、配列番号１８２、配列番号１８４、配列番号１８５、配列番号１８７、配列番号１８９、配列番号１９０、配列番号１９２、配列番号１９５、配列番号１９７、配列番号１９９、配列番号２０１、配列番号２０３、配列番号２０６および配列番号２０７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変鎖ポリペプチドならびに配列番号４、配列番号８、配列番号１２、配列番号１６、配列番号２０、配列番号２４、配列番号２６、配列番号２８、配列番号３０、配列番号３２、配列番号３４、配列番号３６、配列番号３８、配列番号４０、配列番号４２および配列番号４４、配列番号１７１、配列番号１７２、配列番号１７３、配列番号１７４、配列番号１７５、配列番号１７６、配列番号１８１、配列番号１８３、配列番号１８６、配列番号１８８、配列番号１９１、配列番号１９３、配列番号１９４、配列番号１９６、配列番号１９８、配列番号２００および配列番号２０２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変鎖ポリペプチドを含む結合タンパク質が挙げられる。

【０１７６】
重鎖可変鎖ポリペプチドおよび軽鎖可変鎖ポリペプチドの例示的対合は、以下の対合によって表される：配列番号２および配列番号４；配列番号６および配列番号８；配列番号１０および配列番号１２；配列番号１４および配列番号１６；配列番号１８および配列番号２０；配列番号２２および配列番号２４；配列番号２５および配列番号２６；配列番号２７および配列番号２８；配列番号２９および配列番号３０；配列番号３１および配列番号３２；配列番号１７７および配列番号３２；配列番号３３および配列番号３４、配列番号３５および配列番号３６；配列番号３７および配列番号３８；配列番号３９および配列番号４０；配列番号４１および配列番号４２；配列番号４３および配列番号４４；配列番号１８０および配列番号１８１、配列番号１８２および配列番号１８３；配列番号１８５および配列番号１８６；配列番号１８７および配列番号１８８；ならびに配列番号１９２および配列番号１９３。

【０１７７】
また、本明細書において記載されたＮＧＦと特異的に結合し、配列番号２、配列番号６、配列番号１０、配列番号１４、配列番号１８、配列番号２２、配列番号２５、配列番号２７、配列番号２９、配列番号３１、配列番号３３、配列番号３５、配列番号３７、配列番号３９、配列番号４１、配列番号４３、配列番号１６５、配列番号１６６、配列番号１６７、配列番号１６８、配列番号１６９、配列番号１７０、配列番号１７７、配列番号１７９、配列番号１８０、配列番号１８２、配列番号１８４、配列番号１８５、配列番号１８７、配列番号１８９、配列番号１９０、配列番号１９２、配列番号１９５、配列番号１９７、配列番号１９９、配列番号２０１、配列番号２０３、配列番号２０６、配列番号２０７のいずれかと少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％または少なくとも９９％の同一性を有する重鎖可変領域含む結合タンパク質も本開示中に包含される。また、本明細書において記載されたＮＧＦと特異的に結合し、配列番号４、配列番号８、配列番号１２、配列番号１６、配列番号２０、配列番号２４、配列番号２６、配列番号２８、配列番号３０、配列番号３２、配列番号３４、配列番号３６、配列番号３８、配列番号４０、配列番号４２および配列番号４４、配列番号１７１、配列番号１７２、配列番号１７３、配列番号１７４、配列番号１７５、配列番号１７６、配列番号１８１、配列番号１８３、配列番号１８６、配列番号１８８、配列番号１９１、配列番号１９３、配列番号１９４、配列番号１９６、配列番号１９８、配列番号２００、配列番号２０２のいずれかと少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％または少なくとも９９％の同一性を有する軽鎖可変領域を含む結合タンパク質も包含される。

【０１７８】
本明細書において記載されたＮＧＦと特異的に結合する例示的結合タンパク質は、好ましくは、以下のとおり重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む：
配列番号２と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号４と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域；
配列番号６と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号８と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域；
配列番号１０と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号１２と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域；

配列番号１４と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号１６と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域；

配列番号１８と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号２０と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域；

配列番号２２と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号２４と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域；

配列番号２５と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号２６と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域；

配列番号２７と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号２８と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域；

配列番号２９と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号３０と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域；

配列番号３１と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号３２と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域；

配列番号１７７と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号３２と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域；

配列番号３３と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号３４と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域；

配列番号３５と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号３６と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域；

配列番号３７と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号３８と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域；

配列番号３９と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号４０と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域；

配列番号４１と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号

４２と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域；
配列番号４３と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号４４と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域；
配列番号１８０と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号１８１と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域；
配列番号１８２と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号１８３と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域；
配列番号１８５と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号１８６と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域；
配列番号１８７と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号１８８と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域；
配列番号１８９と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号４２と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域；
配列番号１９０と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号１８８と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域；
配列番号２０６と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号４２と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域；
配列番号２０７と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号１８８と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域；および
配列番号１９２と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む重鎖可変領域、および配列番号１９３と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列またはその抗原結合断片もしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片を含む軽鎖可変領域。

【０１７９】

本明細書において開示されたような例示的結合タンパク質として、ａ）配列番号５５、５６、５７、６１、６２、６３、６７、６８、６９、７３、７４、７５、７９、８０、８１からなる重鎖ＣＤＲ；または前記配列のうち１つと少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％または少なくとも９０％の配列同一性を有する修飾ＣＤＲアミノ酸配列；ｂ）配列番号５８、５９、６０、６４、６５、６６、７０、７１、７２、７６、７７、７８、８２、８３、８４からなる軽鎖ＣＤＲ；または前記配列のうち１つと少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％

または少なくとも９０％の配列同一性を有する修飾ＣＤＲアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも１つのＣＤＲを挙げることができる。

【０１８０】

本明細書において記載された核酸およびアミノ酸配列のいずれにおいても変動が考えられるということは理解されなければならない。このような変動は、対応するＮＧＦ結合タンパク質の類似体の製造を指示することができる核酸配列をもたらすものを含む。遺伝暗号の縮重のために、対応するタンパク質またはその類似体の製造を依然として指示することができるＤＮＡ配列につながるヌクレオチドの多数の置換がなされ得るということは理解される。本明細書において記載された配列のいずれかと機能的に同等であるすべてのこのような変異体ＤＮＡ配列が、本開示によって包含される。

【０１８１】

本明細書において記載された結合タンパク質のいずれかの変異体は、アミノ酸の付加（例えば、挿入）、欠失または保存的置換によってアミノ酸配列において所与のタンパク質（例えば、抗ＮＧＦ抗体）とは異なるが、所与のタンパク質の生物活性を保持するタンパク質（またはポリペプチド）を意味する。アミノ酸の保存的置換、すなわち、アミノ酸を同様の特性（例えば、親水性ならびに荷電領域の程度および分布）の異なるアミノ酸と置換することは、当技術分野では、一般に、微小変化を伴うとして認識されている。これらの微小変化は、幾分かは、当技術分野で理解されるようなアミノ酸のハイドロパシー指数を考慮することによって同定され得る（例えば、Ｋｙｔｅら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５７：１０５－１３２頁（１９８２年）参照）。アミノ酸のハイドロパシー指数は、その疎水性および電荷の考慮に基づいている。同様のハイドロパシー指数のアミノ酸は、置換され得、依然としてタンパク質機能を保持し得るということは当技術分野で公知である。一態様では、±２のハイドロパシー指数を有するアミノ酸が置換される。アミノ酸の親水性も、生物学的機能を保持するタンパク質をもたらす置換を示すために使用され得る。ペプチドとの関連で、アミノ酸の親水性を考慮することによって、そのペプチドの最大局所平均親水性、抗原性および免疫原性と良好に相関すると報告されている有用な尺度の算出が可能となる（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第４，５５４，１０１号参照のこと）。当技術分野で理解されるように、同様の親水性値を有するアミノ酸の置換は、生物活性、例えば、免疫原性を保持するペプチドをもたらし得る。一態様では、置換は、互いに±２内の親水性値を有するアミノ酸を用いて実施される。アミノ酸の疎水性指数および親水性値の両方が、そのアミノ酸の特定の側鎖によって影響を受ける。その観察結果と一致して、生物学的機能と適合するアミノ酸置換は、疎水性、親水性、電荷、大きさおよびその他の特性によって示されるようなアミノ酸、特に、それらのアミノ酸の側鎖の相対的類似性によって異なると理解される。「変異体」はまた、タンパク質分解、リン酸化またはその他の翻訳後修飾などによって異なって処理されているが、その生物活性または抗原反応性、例えば、ＮＧＦと結合する能力を保持するポリペプチドまたはその断片を記載するためにも使用され得る。本明細書において、「変異体」の使用は、文脈によって別段に否定されない限り、変異体の断片を包含するものとする。

【０１８２】

本明細書において記載された結合タンパク質は、免疫グロブリン分子、ジスルフィド結合されたＦｖ、ｓｃＦｖ、モノクローナル抗体、マウス抗体、キメラ抗体、単一ドメイン抗体、ＣＤＲグラフト化抗体、ダイアボディー、哺乳動物化（ウシ化、ラクダ化、イヌ化、ウマ化、ネコ化またはヒト化）抗体、イヌ抗体、ネコ抗体、ウマ抗体、マウス抗体、多重特異性抗体、Ｆａｂ、二重特異性抗体、ＤＶＤ、Ｆａｂ’、二特異性抗体、Ｆ（ａｂ’）２または一本鎖Ｆｖ断片を含めたＦｖを包含する。

【０１８３】

結合タンパク質は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＭまたはＩｇＤ定常領域などの特定の重鎖定常領域を含む。例示的結合タンパク質は、ＩｇＧ１重鎖定常領域またはＩｇＧ４重鎖定常領域を含む。さらに、抗体は、軽鎖定常領域、例えばκ軽鎖定常領域またはλ軽鎖定常領域などを含み得る。例示的結合タンパク質は

、κ軽鎖定常領域を含む。

【０１８４】

抗体エフェクター機能を変更するためのＦｃ部分中のアミノ酸残基の置換は、当技術分野で公知である（Ｗｉｎｔｅｒら、米国特許第５，６４８，２６０号および同５，６２４，８２１号）。抗体のＦｃ部分は、いくつかの重要なエフェクター機能、例えば、サイトカイン誘導、ＡＤＣＣ、食作用、補体依存性細胞毒性（ＣＤＣ）ならびに抗体および抗原抗体複合体の半減期／クリアランス速度を媒介する。いくつかの場合には、これらのエフェクター機能は、治療用抗体にとって望ましいものであるが、別の場合には、治療目的によって、不必要またはさらに有害であることもある。特定のヒトＩｇＧアイソタイプ、特に、ＩｇＧ１およびＩｇＧ３は、それぞれ、ＦｃγＲｓおよび補体Ｃ１ｑとの結合によって、ＡＤＣＣおよびＣＤＣを媒介する。新生児Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）は、抗体の循環半減期を決定する重要な成分である。抗体のエフェクター機能が変更されるよう抗体の定常領域、例えば、抗体のＦｃ領域において少なくとも１個のアミノ酸残基が置換され得る。

【０１８５】

本開示の結合タンパク質は、例えば、ヒトまたはイヌまたはウマまたはネコＩｇＭ定常ドメイン、ヒトまたはイヌまたはウマまたはネコＩｇＧ４定常ドメイン、ヒトまたはイヌまたはウマまたはネコＩｇＧ１定常ドメイン、ヒトまたはイヌまたはウマまたはネコＩｇＥ定常ドメイン、ヒトまたはイヌまたはウマまたはネコＩｇＧ２定常ドメイン、ヒトまたはイヌまたはウマまたはネコＩｇＧ３定常ドメインおよびヒトまたはイヌまたはウマまたはネコＩｇＡ定常ドメインなどの重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含み得る。本明細書において記載された結合タンパク質は、それだけには限らないが、ヒト、イヌ、ウマまたはネコ、κもしくはλ定常ドメインのいずれかまたはイヌ、ウマまたはネコκもしくはλ等価定常ドメインのいずれかなどの軽鎖免疫グロブリン定常ドメインを含み得る。例示的なこのような結合タンパク質は、配列番号５２または配列番号５４のアミノ酸配列を有する定常領域を有する。

【０１８６】

本明細書において記載された結合タンパク質はまた、本開示の少なくとも１つのＮＧＦ結合タンパク質に対するＮＧＦ抗イディオタイプ抗体も包含し得る。抗イディオタイプ抗体は、それだけには限らないが、本開示の結合タンパク質中に組み込まれ得る、重鎖または軽鎖の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）またはそのリガンド結合部分、重鎖または軽鎖可変領域、重鎖または軽鎖定常領域、フレームワーク領域またはそれらの任意の部分などの免疫グロブリン分子の少なくとも一部を含む分子を含有する任意のタンパク質またはペプチドを含む。

【０１８７】

本開示の結合タンパク質は、ヒトおよびイヌＮＧＦと高い特異性で結合でき、さらに、生物または対象においてＮＧＦの生物活性または機能を調節できる、例えば、ヒトおよびイヌＮＧＦを実質的に中和できる。また、ＮＧＦと実質的に高親和性で結合し、遅い解離速度を有し、および／または実質的に高い中和能を有する単離マウスモノクローナル抗体またはその抗原結合部分が本開示によって包含される。本明細書において開示されたような例示的結合タンパク質は、ＴＦ－１細胞増殖アッセイまたはｐＥＲＫおよびＰａｔｈｈｕｎｔｅｒアッセイにおいて測定される、少なくとも約１０ｎＭ、少なくとも約５ｎＭ、少なくとも約１ｎＭ、少なくとも約０．５ｎＭ、少なくとも約０．１ｎＭ、少なくとも約０．０５ｎＭ、少なくとも約０．０１ｎＭまたは少なくとも約０．００１ｎＭの効力（IC_{50}）でＮＧＦを中和できる。本明細書において記載された結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定される、少なくとも約$10^{2}M^{-1}s^{-1}$；少なくとも約$10^{3}M^{-1}s^{-1}$；少なくとも約$10^{4}M^{-1}s^{-1}$；少なくとも約$10^{5}M^{-1}s^{-1}$；少なくとも約$10^{6}M^{-1}s^{-1}$または少なくとも約$10^{7}M^{-1}s^{-1}$の、ＮＧＦとの結合速度定数（K_{on}）を有し得る。本明細書において記載された結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定される、最大で約$10^{-3}s^{-1}$；最大で約$10^{-4}s^{-1}$；最大で約$10^{-5}s^{-1}$；最大で約$10^{-6}s^{-1}$または最大で約$10^{-7}s^{-1}$の

、ＮＧＦとの解離速度定数（K_{off}）を有し得る。本明細書において記載された結合タンパク質は、最大で約10^{-7}Ｍ；最大で約10^{-8}Ｍ；最大で約10^{-9}Ｍ；最大で約10^{-10}Ｍ；最大で約10^{-11}Ｍ；最大で約10^{-12}Ｍ；最大で約10^{-13}Ｍまたは最大で約10^{-14}Ｍの、ＮＧＦとの解離定数（K_D）を有し得る。例えば、本明細書において記載された結合タンパク質は、約1×10^{-9}Ｍ、約1×10^{-10}Ｍ、約3.14×10^{-10}Ｍ、約1×10^{-11}Ｍ、約2.37×10^{-11}Ｍ、約1×10^{-12}Ｍ、約1×10^{-13}Ｍまたは約3.3×10^{-14}Ｍの解離定数（K_D）を有し得る。

【０１８８】

単離された抗体またはその抗原結合部分またはその免疫学的に機能的な断片を含めた、本明細書において記載された結合タンパク質は、ＮＧＦと結合し得、表面プラズモン共鳴によって測定される、約０．１s^{-1}以下のk_{off}速度定数でＮＧＦから解離し得、またはＮＧＦ活性を約1×10^{-6}Ｍ以下のIC_{50}で阻害し得る。あるいは、抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴によって測定される、約1×10^{-2} s^{-1}以下のk_{off}速度定数でＮＧＦから解離し得、またはＮＧＦ活性を約1×10^{-7}Ｍ以下のIC_{50}で阻害し得る。あるいは、抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴によって測定される、約1×10^{-3} s^{-1}以下のk_{off}速度定数でＮＧＦから解離し得、またはＮＧＦ活性を約1×10^{-8}Ｍ以下のIC_{50}で阻害し得る。あるいは、抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴によって測定される、約1×10^{-4} s^{-1}以下のk_{off}速度定数でＮＧＦから解離し得、またはＮＧＦ活性を約1×10^{-9}Ｍ以下のIC_{50}で阻害し得る。あるいは、抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴によって測定される、約1×10^{-5} s^{-1}以下のk_{off}速度定数でＮＧＦから解離し得、またはＮＧＦ活性を約1×10^{-10}Ｍ以下のIC_{50}で阻害し得る。あるいは、抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴によって測定される、約1×10^{-5} s^{-1}以下のk_{off}速度定数でＮＧＦから解離し得、またはＮＧＦ活性を約1×10^{-11}Ｍ以下のIC_{50}で阻害し得る。

【０１８９】

本明細書において記載された結合タンパク質は、イヌＮＧＦと結合し得、ここで、抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴によって測定される、約０．１s^{-1}以下のk_{off}速度定数でイヌＮＧＦから解離し得、またはイヌＮＧＦ活性を約1×10^{-6}Ｍ以下のIC_{50}で阻害し得る。あるいは、抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴によって測定される、約1×10^{-2} s^{-1}以下のk_{off}速度定数でイヌＮＧＦから解離し得、またはイヌＮＧＦ活性を約1×10^{-7}Ｍ以下のIC_{50}で阻害し得る。あるいは、抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴によって測定される、約1×10^{-3} s^{-1}以下のk_{off}速度定数でイヌＮＧＦから解離し得、またはイヌＮＧＦ活性を約1×10^{-8}Ｍ以下のIC_{50}で阻害し得る。あるいは、抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴によって測定される、約1×10^{-4} s^{-1}以下のk_{off}速度定数でイヌＮＧＦから解離し得、またはイヌＮＧＦ活性を約1×10^{-9}Ｍ以下のIC_{50}で阻害し得る。あるいは、抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴によって測定される、約1×10^{-5} s^{-1}以下のk_{off}速度定数でイヌＮＧＦから解離し得、またはイヌＮＧＦ活性を約1×10^{-10}Ｍ以下のIC_{50}で阻害し得る。あるいは、抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴によって測定される、約1×10^{-5} s^{-1}以下のk_{off}速度定数でイヌＮＧＦから解離し得、またはイヌＮＧＦ活性を約1×10^{-11}Ｍ以下のIC_{50}で阻害し得る。

【０１９０】

本開示の結合タンパク質は、免疫接着分子、造影剤、治療薬または細胞傷害性薬剤とカップリングされた結合タンパク質をさらに包含する。適した造影剤の限定されない例として、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁性標識、ビオチンまたはそれだけには限らないが、３Ｈ、１４Ｃ、３５Ｓ、９０Ｙ、９９Ｔｃ、１１１Ｉｎ、１２５Ｉ、１３１Ｉ、１７７Ｌｕ、１６６Ｈｏおよび１５３Ｓｍを含めた放射標識が挙げられる。治療薬ま

たは細胞傷害性薬剤は、代謝拮抗剤、アルキル化剤、抗生物質、増殖因子、サイトカイン、血管新生抑制薬、有糸分裂阻害剤、アントラサイクリン、毒素およびアポトーシス薬であり得る。また、本開示の抗体またはその抗体部分が、誘導体化されている、または別の機能的分子（例えば、別のペプチドまたはタンパク質）と連結されている標識された結合タンパク質も本明細書において提供される。例えば、本開示の標識された結合タンパク質は、開示された結合タンパク質の抗体または抗体部分を（化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合による会合またはその他によって）、抗体または抗体部分の、別の分子（例えば、ストレプトアビジンコア領域またはポリヒスチジンタグ）との会合を媒介し得る、１つまたは複数のその他の分子実体、例えば、別の抗体（例えば、二特異性抗体またはダイアボディー）、検出可能な薬剤、細胞傷害性薬剤、医薬品および／またはタンパク質またはペプチドと機能的に連結することによって導かれ得る。

【０１９１】

それを用いて本開示の抗体または抗体部分が誘導体化され得る有用な検出可能な薬剤として、蛍光化合物が挙げられる。例示的蛍光検出可能薬剤として、例えば、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、５－ジメチルアミン－１－ナフタレンスルホニルクロリド、フィコエリトリンなどが挙げられる。抗体はまた、検出可能な酵素、例えば、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼなどを用いて誘導体化され得る。抗体は検出可能な酵素で誘導体化される場合には、酵素が使用して、検出可能な反応生成物を生じるさらなる試薬を加えることによって検出される。例えば、検出可能な薬剤西洋ワサビペルオキシダーゼが存在する場合には、過酸化水素およびジアミノベンジジンの添加が、着色された反応生成物につながり、これは、検出可能である。抗体はまた、ビオチンで誘導体化され、アビジンまたはストレプトアビジン結合の間接的測定によって検出され得る。

【０１９２】

本明細書に記載の結合タンパク質は結晶化形態であり得る。本開示による結晶化結合タンパク質は、例えばＷＯ０２０７２６３６に開示されているように、当技術分野で公知の方法に従って製造され得る。好ましくは、結晶化結合タンパク質は、結晶化後に生物活性を保持する。したがって、結合タンパク質は、本明細書において開示されたような全抗ＮＧＦ抗体またはその一部または断片の結晶として提供され得る。このような結晶は、診断用組成物および治療用組成物を含めた、抗ＮＧＦ結合タンパク質を組み込む製剤および組成物を調製するために使用され得る。例示的なこのような結晶化結合タンパク質として、担体を含まない放出制御結晶化結合タンパク質がある。例示的な結晶化結合タンパク質は、結合タンパク質の可溶性対応物よりも長いインビボ半減期を示す。

【０１９３】

本明細書において記載された抗ＮＧＦ結合タンパク質は、グリコシル化され得る。グリコシル化は、例えば、ウシ、ラクダ、イヌ、マウス、ウマ、ネコまたはヒトグリコシル化パターンを示し得る。本明細書に記載されているグリコシル化結合タンパク質は、抗体もしくは１個または複数の炭水化物残基にカップリングされている抗原結合部分を含む。新生インビボタンパク質製造は、翻訳後修飾として知られるさらなるプロセシングを受け得る。糖（グリコシル）残基が、酵素的に添加され得る、グリコシル化として知られるプロセス。共有結合によって連結しているオリゴ糖側鎖を有する得られたタンパク質は、グリコシル化タンパク質または糖タンパク質として知られる。タンパク質グリコシル化は、対象とするタンパク質のアミノ酸配列ならびにタンパク質が発現される宿主細胞に応じて変わる。種々の生物が、種々のグリコシル化酵素（例えば、グリコシルトランスフェラーゼおよびグリコシダーゼ）を産生し、入手可能な種々の基質（ヌクレオチド糖）を有し得る。このような因子のために、タンパク質グリコシル化パターンおよびグリコシル残基の組成物は、特定のタンパク質が発現される宿主系に応じて異なり得る。本開示において有用なグリコシル残基として、それだけには限らないが、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、ｎ－アセチルグルコサミンおよびシアル酸が挙げられる。グリコシル化結合タンパク質は、グリコシル化パターンがヒト、マウス、イヌ、ネコ、ウシまたはウマ

であるようなグリコシル残基を含む。

【０１９４】

異なるタンパク質グリコシル化が、異なるタンパク質特徴をもたらし得ることは、当業者にとって公知である。例えば、酵母などの微生物宿主において製造され、宿主内因性経路を利用してグリコシル化された治療用タンパク質の有効性は、ＣＨＯ細胞株などの哺乳動物細胞において発現された同一タンパク質のものと比較して、低減され得る。このような糖タンパク質はまた、ヒトにおいて免疫原性であり得、投与後のインビボ半減期の減少を示す。ヒトおよびその他の動物における特定の受容体は、特定のグリコシル残基を認識し、血流からのタンパク質の迅速なクリアランスを促進し得る。その他の有害作用として、タンパク質フォールディングにおける変化、溶解度、プロテアーゼに対する感受性、輸送、運搬、区画化、分泌、その他のタンパク質または因子による認識、抗原性またはアレルゲン性が挙げられる。したがって、開業医は、特定の組成およびグリコシル化のパターン、例えば、ヒト細胞においてまたは意図される対象動物の種特異的細胞において産生されるものと同一のまたは少なくとも同様のグリコシル化組成およびパターンを有する治療用タンパク質を好み得る。

【０１９５】

宿主細胞のものとは異なるグリコシル化タンパク質を発現することは、異種グリコシル化酵素を発現するよう宿主細胞を遺伝的に修飾することによって達成され得る。開業医は、当技術分野で公知の技術を使用して、ヒトタンパク質グリコシル化を示す抗体またはその抗原結合部分を作製し得る。例えば、酵母株は、天然に存在しないグリコシル化酵素を発現するよう遺伝的に修飾されており、その結果、これらの酵母株において産生されたグリコシル化されたタンパク質（糖タンパク質）は、動物細胞、特に、ヒト細胞のものと同一であるタンパク質グリコシル化を示す（米国特許出願第２００４００１８５９０号および同２００２０１３７１３４号）。

【０１９６】

さらに、対象とするタンパク質は、種々のグリコシル化酵素を発現し、その結果、ライブラリーのメンバー宿主細胞が、変異体グリコシル化パターンを有する対象とするタンパク質を産生するよう遺伝子操作された宿主細胞のライブラリーを使用して発現され得るということは当業者によって理解されよう。次いで、開業医は、特定の新規グリコシル化パターンを有する対象とするタンパク質を選択および単離し得る。特に選択された新規グリコシル化パターンを有するタンパク質は、生物学的特性の改善または変更を示す。

【０１９７】

抗ＮＧＦキメラ抗体

キメラ抗体は、マウスモノクローナル抗体および非マウス免疫グロブリン定常領域に由来する可変領域を有する抗体などの抗体の異なる部分が異なる動物種に由来する分子である。キメラ抗体を製造する方法は当技術分野で公知であり、例えば、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２２９：１２０２頁（１９８５年）；Ｏｉら、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、４：２１４頁（１９８６年）；Ｇｉｌｌｉｅｓら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ、１２５：１９１－２０２頁（１９８９年）；米国特許第５，８０７，７１５号；同４，８１６，５６７号；および同４，８１６，３９７号参照のこと。さらに、適当な生物活性のヒト抗体分子に由来する遺伝子と一緒に、適当な抗原特異性のマウス抗体分子から遺伝子をスプライシングすることによって「キメラ抗体」（Ｍｏｒｒｉｓｏｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８１：８５１－８５５頁（１９８４年）；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ、３１２：６０４－６０８頁（１９８４年）；Ｔａｋｅｄａら、Ｎａｔｕｒｅ、３１４：４５２－４５４頁（１９８５年）を製造するために開発された技術が使用され得る。

【０１９８】

抗ＮＧＦ　ＣＤＲグラフト化抗体

本開示のＣＤＲグラフト化抗体は、V_Hおよび／またはV_Lの１つまたは複数のＣＤＲ領域が、本開示のマウス抗体のＣＤＲ配列で置換されている非マウス抗体由来の重鎖およ

び軽鎖可変領域配列を含み得る。任意の非マウス抗体由来のフレームワーク配列が、ＣＤＲグラフト化のための鋳型として働き得る。しかし、このようなフレームワーク上の直鎖置換は、抗原に対する結合親和性の幾分かの喪失につながる。元のマウス抗体に対して、より相同な非マウス抗体であるほど、マウスＣＤＲを非マウスフレームワークと組み合わせることが、ＣＤＲに歪みを導入し、これが親和性を低減し得る可能性が低い。

【０１９９】

ＣＤＲは別として、マウス可変フレームワークを置換するために選択される非マウス可変フレームワークは、マウス抗体可変領域フレームワークと少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％または少なくとも９０％の配列同一性を有し得る。ＣＤＲは別として、マウス可変フレームワークを置換するために選択される非マウス可変フレームワークは、ＣＤＲは別として、ウシ、ラクダ、イヌ、ウマ、ネコまたはヒト可変フレームワークであり得る。例えば、ＣＤＲは別として、マウス可変フレームワークを置換するために選択される非マウス可変フレームワークは、イヌ可変フレームワークであり、マウス抗体可変領域フレームワークと少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％または少なくとも９９％の配列同一性を有する。

【０２００】

ＣＤＲグラフト化抗体を製造する方法は、当技術分野で公知であり（ＥＰ２３９，４００；ＰＣＴ公開ＷＯ９１／０９９６７；米国特許第５，２２５，５３９号；同５，５３０，１０１号；および同５，５８５，０８９号参照のこと）、ベニアリングまたは再表面形成（ＥＰ５９２，１０６；ＥＰ５１９，５９６；Ｐａｄｌａｎ、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２８（４／５）：４８９－４９８頁（１９９１年）；Ｓｔｕｄｎｉｃｋａら、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ、７（６）：８０５－８１４頁（１９９４年）；Ｒｏｇｕｓｋａら、ＰＮＡＳ、９１：９６９－９７３頁（１９９４年））および鎖シャッフリング（米国特許第５，５６５，３５２号）が挙げられる。

【０２０１】

抗ＮＧＦヒト化抗体

ヒトへの治療的投与のために、免疫原性を低くさせるために、動物から得たモノクローナル抗体を修飾するプロセス（ヒト化）は、積極的に推し進められてきており、いくつかの刊行物に記載されている（Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ：Ａ ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ．Ｃａｒｌ Ａ．Ｋ．Ｂｏｒｒｅｂａｅｃｋ編Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ、１９９２年；および上記で引用された参考文献）。ヒト化抗体は、非ヒト種に由来する１つまたは複数の相補性決定領域（ＣＤＲ）およびヒト免疫グロブリン分子に由来するフレームワーク領域を有する所望の抗原と結合する非ヒト種抗体に由来する抗体分子である。既知ヒトＩｇ配列は、インターネット上で利用可能なさまざまなウェブサイト（例えば、ＮＣＢＩウェブサイト、Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｒｅｓｏｕｒｃｅ、および当業者に公知のもの、ならびにＫａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ、Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ（１９８３年）（参照により本明細書に組み込む）に開示されている。追加の配列を以下の表１Ａに示す。免疫原性を低減するまたは結合、親和性、結合速度、解離速度、アビディティー、特異性、半減期もしくは当技術分野で公知の任意のその他の適した抗体の特徴を低減、増強もしくは改変するために、このような移入された配列が使用され得る。

【０２０２】

【表２】

表１Ａ：ヒトＩｇフレームワーク上にグラフトされたマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂ　ＣＤＲ（ＣＤＲグラフト化抗ＮＧＦ　Ａｂ（この表１Ａは、実施例中の表１５と同一である）

名称	配列（ＣＤＲに下線が引かれている）
HU72 VH (CDR-GRAFT VH3-13/JH5)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMFWVRQATGKGLEWVSTISDGGSYTYYTDNVKGRFTISRENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCARDWSDSEGFAYWGQGTLVTVSS (配列番号 : 165)
Hu73 VH (CDR-GRAFT VH1-18/JH6)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPYGGGTKHNEKFKRRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSGYDYYFDVWGQGTTVTVSS (配列番号 : 166)
HU77 VH (CDR-GRAFT VH1-69/JH6)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYIYWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNTIYASKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYGYYAYWGQGTTVTVSS (配列番号 : 167)
HU80 VH (CDR-GRAFT VH1-18/JH6)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIYWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNTIYASKFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARYGYYAYWGQGTTVTVSS (配列番号 : 168)
HU81 VH (CDR-GRAFT VH3-15/JH1)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNHYMYWVRQAPGKGLEWVGSISDGGAYTFYPDTVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTEESANNGFAFWGQGTLVTVSS (配列番号 : 169)
HU82 VH (CDR-GRAFT VH2-26/JH6)	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLTGYNINWIRQPPGKALEWLAMIWGYGDTDYNSALKSRLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYCARDHYGGNDWYFDVWGQGTTVTVSS (配列番号 : 170)
HU72 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVQSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPFTFGQGTKLEIKR (配列番号 : 171)
HU73 VL	DIQMIQSPSFLSASVGDRVSIICRASENIYSFLAWYLQKPGKSPKLFLYN

(CDR-GRAFT L22/JK2)	ANTLAEGVSSRFSGRGSGTDFTLTIISLKPEDFAAYYCQHHFGTPFTFG QGTKLEIKR (配列番号 : 172)
HU77 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCKSTKSLLNGDGFTYLDWYLQKPGQSP QLLIYLVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFESNY LFTFGQGTKLEIKR (配列番号 : 173)
HU80 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCKSTKSLLNGDGFTYLDWYLQKPGQSP QLLIYLVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFESNY LFTFGQGTKLEIKR (配列番号 : 174)
HU81 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSILHSNGNTYLEWYLQKPGQSP QLLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGA HVPFTFGQGTKLEIKR (配列番号 : 175)
HU82 VL (CDR-GRAFT 08/JK2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLI YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQGKTLPRTF GQGTKLEIKR (配列番号 : 176)

【０２０３】

ヒトフレームワーク領域中のフレームワーク残基は、抗原結合を変更または改善するためにＣＤＲドナー抗体に由来する対応する残基で置換され得る。これらのフレームワーク置換は、当技術分野で周知の方法によって、例えば、抗原結合にとって重要であるフレームワーク残基を同定するためのＣＤＲおよびフレームワーク残基の相互作用のモデリングおよび特定の位置の通常のフレームワーク残基を同定するための配列比較によって同定される（例えば、参照によってその全文が本明細書に組み込まれる、Ｑｕｅｅｎら、米国特許第５，５８５，０８９号；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎら、Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３頁（１９８８年）参照のこと）。３次元免疫グロブリンモデルはよく利用され、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列のあり得る３次元立体構造を例示し、示すコンピュータプログラムが利用可能である。これらのディスプレイの観察によって、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のあり得る役割の分析、すなわち、候補免疫グロブリンのその抗原と結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、ＦＲ残基は、標的抗原に対する親和性の増大などの所望の抗体特徴が達成されるようにコンセンサス配列および移入配列から選択され、組み合わされ得る。一般に、ＣＤＲ残基は、抗原結合に影響を及ぼすことに直接に、最も実質的に関与する。抗体は、それだけには限らないが、Ｊｏｎｅｓら、Ｎａｔｕｒｅ、３２１：５２２頁（１９８６年）；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３９：１５３４頁（１９８８年）、Ｓｉｍｓら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１５１：２２９６頁（１９９３年）；ＣｈｏｔｈｉａおよびＬｅｓｋ、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１９６：９０１頁（１９８７年）、Ｃａｒｔｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８９：４２８５頁（１９９２年）；Ｐｒｅｓｔａら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１５１：２６２３頁（１９９３年）、Ｐａｄｌａｎ、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、２８（４／５）：４８９－４９８頁（１９９１年）；Ｓｔｕｄｎｉｃｋａら、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ、７（６）：８０５－８１４頁（１９９４年）；Ｒｏｇｕｓｋａら、ＰＮＡＳ ９１：

９６９－９７３頁（１９９４年）；ＰＣＴ公開ＷＯ９１／０９９６７、ＰＣＴ／：ＵＳ９８／１６２８０、ＵＳ９６／１８９７８、ＵＳ９１／０９６３０、ＵＳ９１／０５９３９、ＵＳ９４／０１２３４、ＧＢ８９／０１３３４、ＧＢ９１／０１１３４、ＧＢ９２／０１７５５、ＷＯ９０／１４４４３、ＷＯ９０／１４４２４およびＷＯ９０／１４４３０；ＥＰ２２９２４６、ＥＰ５９２，１０６、ＥＰ５１９，５９６およびＥＰ２３９，４００；米国特許第５，５６５，３３２号、同５，７２３，３２３号、同５，９７６，８６２号、同５，８２４，５１４号、同５，８１７，４８３号、同５，８１４，４７６号、同５，７６３，１９２号、同５，７２３，３２３号、同５，７６６，８８６号、同５，７１４，３５２号、同６，２０４，０２３号、同６，１８０，３７０号、同５，６９３，７６２号、同５，５３０，１０１号、同５，５８５，０８９号、同５，２２５，５３９号、および同４，８１６，５６７号に記載されるものなど当技術分野で公知の種々の技術を使用してヒト化され得る。

【０２０４】

抗ＮＧＦイヌ化抗体

イヌへの治療的投与のために、免疫原性を低くさせるために、動物から得たモノクローナル抗体を修飾するプロセス（イヌ化）は、ＵＳ７，２６１，８９０　Ｂ２　２００７年）に記載されている。イヌＩｇＧ１のアミノ酸配列は、ＧｅｎＢａｎｋ（ＡＦ３５４２６４）において提供されている。イヌＩｇＭおよびイヌＩｇＡ重鎖両方の可変領域のアミノ酸配列の決定（Ｗａｓｓｅｒｍａｎら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．、１６、３１６０（１９７７年）、イヌＩｇＡからのκ軽鎖のアミノ酸配列の決定（Ｗａｓｓｅｒｍａｎら、Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍ．、１５、３０３（１９７８年））、イヌμ鎖の完全アミノ酸配列（ＭｃＣｕｍｂｅｒら、Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１６、５６５頁（１９７９年））が開示されており、単一イヌＩｇＧ－Ａγ鎖ｃＤＮＡおよび４つのイヌＩｇＧ－Ａγ鎖タンパク質配列が開示された（Ｔａｎｇら、Ｖｅｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　Ｉｍｍｕｎｏｐａｔｈｏｌｏｇｙ、８０、２５９（２００１年））。ヒト、マウス、ブタおよびウシＩｇＧの保存された領域から設計された縮重オリゴヌクレオチドプライマーを用いるイヌ脾臓ｃＤＮＡライブラリーのＰＣＲ増幅が記載されている。イヌ免疫グロブリン可変ドメイン、イヌ化抗体およびそれらを製造し、使用する方法が、米国特許出願第２００４／０１８１０３９号および米国特許第７，２６１，８９０号；同６，５０４，０１３号；同５，８５２，１８３号；同５，５２２５，５３９号に開示されている。

【０２０５】

以下の表２は、本開示の選択されたイヌ化抗ＮＧＦ抗体のＶＨおよびＶＬ領域のアミノ酸配列の一覧である。

【０２０６】

【表３】

表２

配列番号：	領域
25	72.1 VH
26	72.1 VL
27	73.1 VH
28	73.1 VL
29	77.1 VH
30	77.1 VL
31	81.1 VH
32	81.1 VL
33	82.1 VH
34	82.1 VL
35	72.2 VH
36	72.2 VL
37	73.2 VH
38	73.2 VL
39	77.2 VH
40	77.2 VL
41	81.2 VH
42	81.2 VL
43	82.2 VH
44	82.2 VL
177	81.1B VH
179	72.3 VH
180	72.4 VH
181	72.4 VL
182	73.4 VH
183	73.4 VL
184	77.3 VH
185	77.4 VH
186	77.4 VL
187	81.4 VH
188	81.4 VL
189	81.2B VH
190	81.4B VH

191	82.3 VL
192	82.4 VH
193	82.4 VL
206	81.5B VH
207	81.6B VH

【０２０７】
Ｃ．抗ＮＧＦ抗体の使用
本明細書において記載された結合タンパク質は、インビボまたはインビトロでサンプル中（例えば、血清、血漿、組織、生検などの生体サンプル中）のＮＧＦの存在を検出するための方法において使用され得る。インビトロ法は、例えば、疾患または障害、例えば、ＮＧＦ関連障害を診断するために使用され得る。本方法は、（ｉ）サンプルまたは対照サンプルを、本明細書において記載された抗ＮＧＦ抗体またはその断片と接触させるステップ、および（ｉｉ）抗ＮＧＦ抗体またはその断片と、サンプルまたは対照サンプル間の複合体の形成を検出するステップを含み、ここで、対照サンプルに対する、サンプルにおける複合体の形成における統計上有意な変化が、サンプル中のＮＧＦの存在を示す。
【０２０８】
本明細書において記載された結合タンパク質は、インビボでＮＧＦの存在を検出するための方法（例えば、対象におけるインビボイメージング）において使用され得る。本方法は、障害、例えば、ＮＧＦ関連障害を診断するために使用され得る。本方法は、（ｉ）本明細書において記載された抗ＮＧＦ抗体またはその断片を、抗体または断片のＮＧＦとの結合を可能にする条件下で対象または対照対象に投与するステップ、および（ｉｉ）抗体または断片およびＮＧＦ間の複合体の形成を検出するステップを含み、ここで、対照対象に対する、対象における複合体の形成における統計上有意な変化が、ＮＧＦの存在を示す。
【０２０９】
ＮＧＦと結合するその能力を考えると、本明細書に記載されている抗ＮＧＦ抗体またはその部分、もしくはその組合せが、ＮＧＦ（例えば、生体試料、例えば、血清もしくは血漿中の）を検出するために、従来のイムノアッセイ、例えば、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）または組織免疫組織化学で、免疫試薬として使用され得る。生体サンプルにおいてＮＧＦを検出するための方法は、生体サンプルを、本開示の抗体または抗体部分と接触させるステップおよびＮＧＦと結合している抗体（または抗体部分）または結合してない抗体（または抗体部分）のいずれかを検出し、それによって、生体サンプル中のＮＧＦを検出するステップを含む。結合タンパク質は、結合している抗体または結合していない抗体の検出を促すために、検出可能な物質で直接的に、または間接的に標識され得る。適した検出可能な物質として、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質および放射性物質が挙げられる。適した酵素の例として、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適した補欠分子族複合体の例として、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンが挙げられ；適した蛍光物質の例として、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例として、ルミノールが挙げられ；適した放射性物質の例として、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{35}Ｓ、^{90}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{177}Ｌｕ、^{166}Ｈｏまたは^{153}Ｓｍが挙げられる。
【０２１０】
あるいは、ＮＧＦは、検出可能な物質で標識された組換えＮＧＦ標準および非標識抗ＮＧＦ抗体を使用する競合イムノアッセイによって生体液中でアッセイされ得る。このアッ

セイでは、生体サンプル、標識された組換えＮＧＦ標準および抗ＮＧＦ抗体を組み合わせ、非標識抗体と結合している標識されたｒＮＧＦ標準の量を求める。生体サンプル中のＮＧＦの量は、抗ＮＧＦ抗体と結合している標識されたｒＮＧＦ標準の量と反比例する。同様に、ＮＧＦはまた、検出可能な物質で標識されたｒＮＧＦ標準および非標識抗ＮＧＦ抗体を使用する競合イムノアッセイによって生体液中でアッセイされ得る。

【０２１１】

したがって、本開示はまた、サンプル中のＮＧＦの存在または量を検出するための、ここで開示されている結合タンパク質の１種または複数を含むイムノアッセイ試薬、装置およびキットも考慮する。例えば、１種または複数の目下開示された結合タンパク質を含む免疫試薬が、１つまたは複数のバイアルまたは瓶などの容器を有し、各容器が、アッセイにおいて使用される、抗ＮＧＦ結合タンパク質などの別個の試薬または抗ＮＧＦ結合タンパク質のカクテル、検出試薬および洗浄試薬を含有するキットの形態で提供され得ることが考えられる。免疫試薬は、免疫試薬が、それだけには限らないが、キュベット、チューブ、マイクロタイタープレートまたはウェル、ストリップ、チップまたはビーズなどの固相支持体上に固定化されている装置において提供され得ることが有利である。キットは、アッセイを行うための少なくとも１個の容器および／またはそれらのいずれか１種が、濃縮溶液、検出可能な標識（例えば、酵素標識）のための基質溶液または停止溶液として提供され得る、アッセイバッファーまたは洗浄バッファーなどのバッファーを含み得る。好ましくは、キットは、アッセイを実施するために必要であるすべての成分、すなわち、試薬、標準、バッファー、希釈剤などを含む。キットは、免疫試薬のＮＧＦとの特異的結合に基づいてサンプル中のＮＧＦの存在または量を決定するための使用説明書を、紙形態またはディスク、ＣＤ、ＤＶＤなどといったコンピュータによって読み取り可能な形態で含有してもよく、および／またはオンラインで利用可能にされてもよい。

【０２１２】

キット中の結合タンパク質は、フルオロフォア、放射活性部分、酵素、ビオチン／アビジン標識、発色団、化学発光標識などを含めた上記のものなどの検出可能な標識で標識され得るか、またはキットは、検出可能な標識を実施するための試薬を含み得る。抗体、標準物質および／または対照は、別個の容器中で提供されてもよく、または適当なアッセイ形式、例えば、マイクロタイタープレート中に予め分散されてもよい。

【０２１３】

キットは、場合により、品質管理成分（例えば、感受性パネル、標準物質および陽性対照）を含む。品質管理試薬の調製は、当技術分野で周知であり、さまざまな免疫診断薬の説明書に記載されている。感受性パネルメンバーは、場合により、アッセイ性能特徴を確立するために使用され、さらに場合により、イムノアッセイキット試薬およびアッセイの標準化の完全性の有用な指標である。

【０２１４】

キットはまた、場合により、バッファー、塩、酵素、酵素補因子、酵素基質、検出試薬などといった、診断アッセイを実施するために、または品質管理評価を容易にするために必要なその他の試薬を含み得る。試験サンプルの単離および／または処理のためのバッファーおよび溶液（例えば、前処理試薬）などのその他の成分も、キット中に含まれ得る。キットは、１種または複数のその他の対照をさらに含み得る。キットの１種または複数の成分は、凍結乾燥されてもよく、この場合には、キットは、凍結乾燥した成分の再構成に適した試薬をさらに含み得る。

【０２１５】

キットの種々の成分は、場合により、必要に応じて適した容器、例えば、マイクロタイタープレート中で提供される。キットは、サンプルを保持または保存するための容器（例えば、尿サンプルのための容器またはカートリッジ）をさらに含み得る。必要に応じて、キットはまた、場合により、反応容器、混合容器および試薬または試験サンプルの調製を容易にするその他の成分を含有し得る。キットはまた、シリンジ、ピペット、鉗子、計量スプーンなどといった試験サンプルを得ることを補助するための１種または複数の機器を

含み得る。

【０２１６】

使用説明書：

本開示の抗体および抗体部分は、インビトロおよびインビボの両方でＮＧＦ活性を実質的に中和できるということが認められる。したがって、本開示のこのような抗体および抗体部分はまた、例えば、本開示の抗体が交差反応するＮＧＦを含有する細胞培養物中で、本開示の抗体が交差反応するＮＧＦを有する哺乳動物対象において、ＮＧＦ活性を実質的に阻害するために使用され得る。したがって、本開示は、ＮＧＦを、本開示の抗体または抗体部分と接触させ、その結果、ＮＧＦ活性が実質的に阻害されるステップを含む、ＮＧＦ活性を阻害する方法を提供する。例えば、ＮＧＦを含有する、または含有すると疑われる細胞培養物において、培養物においてＮＧＦ活性を阻害するために本開示の抗体または抗体部分が培養培地に添加され得る。

【０２１７】

したがって、本開示はまた、ＮＧＦを、結合タンパク質と接触させ、その結果、ＮＧＦ活性が実質的に阻害されるステップを含むＮＧＦ活性を阻害する方法を提供する。別の態様では、本開示は、対象に、上記で開示された結合タンパク質を投与し、その結果、対象においてＮＧＦ活性が、実質的に阻害され、治療が達成されるステップを含む、ＮＧＦ活性が有害である障害を患っている対象においてＮＧＦ活性を阻害する方法を提供する。

【０２１８】

本開示はまた、ＮＧＦ活性が有害である疾患または障害を患っている対象などの対象においてＮＧＦ活性を低減する方法を提供する。本開示は、対象に、本開示の抗体または抗体部分を投与し、その結果、対象においてＮＧＦ活性が低減されるステップを含む、このような疾患または障害を患っている対象においてＮＧＦ活性を低減する方法を提供する。対象は、本開示の抗体が結合できるＮＧＦを発現する哺乳動物であり得る。さらに、対象は、ＮＧＦが導入されている（例えば、ＮＧＦの投与によって、またはＮＧＦ導入遺伝子の発現によって）哺乳動物であり得る。本開示の抗体は、それを必要とする対象に治療目的で投与され得る。

【０２１９】

本開示の抗体は、抗体が結合できるＮＧＦを発現する非ヒト哺乳動物に、獣医学目的で投与され得る。例えば、本開示の抗体は、抗体が結合できるＮＧＦを発現する、イヌ、ウマ、ネコまたは家畜（肉牛および乳牛、ブタ、ヒツジ、ヤギ、家禽など）などの非ヒト哺乳動物に、獣医学目的で投与され得る。

【０２２０】

別の態様では、本開示は、対象においてＮＧＦ関連障害を治療（例えば、治癒、抑制し、寛解、遅延させる、またはその発症、再発または再燃のリスクを防止もしくは減少させる）または予防する方法を提供する。本方法は、対象に、ＮＧＦ関連障害を治療または予防するのに十分な量の、開示されたＮＧＦ結合タンパク質（特に、アンタゴニスト）、例えば、本明細書において記載された抗ＮＧＦ抗体またはその断片を投与するステップを含む。ＮＧＦアンタゴニスト、例えば、抗ＮＧＦ抗体またはその断片は、対象に、単独で、または本明細書に記載されたその他の治療様式と組み合わせて投与され得る。

【０２２１】

本開示の抗体は、ヒト疾患の動物モデルとしての、抗体が結合できるＮＧＦを発現する非ヒト哺乳動物に投与され得る。このような動物モデルは、本開示の抗体の治療効力を評価するのに有用であり得る（例えば、投与量のおよび投与の経時的推移の試験）。

【０２２２】

別の態様では、本開示の抗体および結合タンパク質は、急性または慢性疼痛を含むまたは伴うＮＧＦが関連する疾患および障害を治療するのに有用である。ＮＧＦが関連する疾患および障害の限定されない例として、全身炎症、切断術に起因する疼痛を含めた手術および術後疼痛、歯痛、外傷に起因する疼痛、骨折痛、膿瘍に起因する疼痛、神経因性疼痛、痛覚過敏および異痛症、神経因性疼痛、帯状疱疹後神経痛、それだけには限らないが、

糖尿病性ニューロパチー疼痛を含めた糖尿病、卒中、視床痛症候群、痛風関節痛、変形性関節症または関節リウマチ性疼痛、リウマチ性疾患、ループス、乾癬、坐骨神経痛、それだけには限らないが、慢性腰背部痛を含めた筋骨格疾患と関連している疼痛、繊維筋痛症、捻挫、鎌状赤血球クリーゼと関連している疼痛、一般的な頭痛、片頭痛、群発頭痛、緊張型頭痛、三叉神経痛、月経困難症、子宮内膜症、卵巣嚢胞、内臓痛、前立腺炎、膀胱炎、間質性膀胱炎、紅痛症または膵炎または腎結石によって引き起こされる疼痛、それだけには限らないが、大腸炎、胃潰瘍および十二指腸潰瘍を含めた一般的な胃腸障害、胃食道逆流症、消化不良、炎症性腸障害、過敏性腸症候群、炎症性膀胱障害、切開痛、熱傷および／または創傷に起因する疼痛、強直性脊椎炎（ａｎｋｙｌｏｓｉｎｇ　ｓｐｏｎｄｉｌｉｔｉｓ）、関節周囲の病状、それだけには限らないが、骨転移に起因する疼痛および癌治療に起因する疼痛を含めた癌性疼痛ならびにＨＩＶまたはＡＩＤＳに起因する疼痛が挙げられる。ＮＧＦが関連する疾患および状態のその他の例として、悪性黒色腫、シェーグレン症候群、鼻炎、気管支障害および重篤な気道応答性亢進を伴うコントロール不良喘息などの喘息、難治性の咳；およびそれだけには限らないが、日焼け、アレルギー性皮膚反応、皮膚炎、そう痒症および白斑などの炎症性成分を有する皮膚疾患または障害に起因する疼痛が挙げられる。

【０２２３】

本開示はまた、結合タンパク質を、第２の薬剤の投与前、投与と同時にまたは投与後に投与するステップを含む、ＮＧＦが有害である障害を患っている対象を治療する方法を提供する。別の態様では、１種または複数のＮＧＦアンタゴニスト（例えば、抗ＮＧＦ抗体またはその断片）と同時投与および／または同時製剤できる追加の治療薬として、それだけには限らないが、ＴＮＦアンタゴニスト；ＴＮＦ受容体の可溶性断片；エンブレル（登録商標）；ＴＮＦ酵素アンタゴニスト；ＴＮＦ変換酵素（ＴＡＣＥ）阻害剤；ムスカリン受容体アンタゴニスト；ＴＧＦ－βアンタゴニスト；インターフェロンガンマ；パーフェニドン（ｐｅｒｆｅｎｉｄｏｎｅ）；化学療法薬、メトトレキサート；レフルノミド；シロリムス（ラパマイシン）またはその類似体、ＣＣＩ－７７９；ＣＯＸ２またはｃＰＬＡ２阻害剤；ＮＳＡＩＤ；免疫調節物質；ｐ３８阻害剤；ＴＰＬ－２、ＭＫ－２およびＮＦκＢ阻害剤；ブデノシド（ｂｕｄｅｎｏｓｉｄｅ）；上皮増殖因子；副腎皮質ステロイド；シクロスポリン；スルファサラジン；アミノサリチル酸；６－メルカプトプリン；アザチオプリン；メトロニダゾール；リポキシゲナーゼ阻害剤；メサラミン；オルサラジン；バルサラジド；抗酸化物質；トロンボキサン阻害剤；抗ＩＬ－６抗体；増殖因子；エラスターゼ阻害剤；ピリジニル－イミダゾール化合物；ＴＮＦ、ＣＧＲＰ、サブスタンスＰ、ブラジキニン、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－９、ＭＭＰ－１３、ＬＴ、ＩＬ－１ａ、ＩＬ－１β、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１４、ＩＬ－１５、ＩＬ－１６、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－１９、ＩＬ－２０、ＩＬ－２１、ＩＬ－２２、ＩＬ－２３、ＩＬ－２４、ＩＬ－２５、ＩＬ－２６、ＩＬ－２７、ＩＬ－２８、ＩＬ－２９、ＩＬ－３０、ＩＬ－３１、ＩＬ－３２、ＩＬ－３３、ＥＭＡＰ－ＩＩ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＦＧＦまたはＰＤＧＦの抗体またはアゴニスト；ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＣＤ２８、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤ４５、ＣＤ６９、ＣＤ９０またはそれらのリガンドの抗体；ＦＫ５０６；ラパマイシン；ミコフェノール酸モフェチル；イブプロフェン；プレドニゾロン；ホスホジエステラーゼ阻害剤；アデンソシン（ａｄｅｎｓｏｓｉｎｅ）アゴニスト；抗血栓剤；補体阻害剤；アドレナリン作動性薬剤；ＩＲＡＫ、ＮＩＫ、ＩＫＫ、ｐ３８またはＭＡＰキナーゼ阻害剤；ＩＬ－１β変換酵素阻害剤；ＴＮＦα変換酵素阻害剤；Ｔ細胞シグナル伝達阻害剤；メタロプロテイナーゼ阻害剤；６－メルカプトプリン；アンジオテンシン変換酵素阻害剤；可溶性サイトカイン受容体；可溶性ｐ５５　ＴＮＦ受容体；可溶性ｐ７５　ＴＮＦ受容体；ｓＩＬ－１ＲＩ；ｓＩＬ－１ＲＩＩ；ｓＩＬ－６Ｒ；抗炎症性サイトカイン；ＩＬ－４；ＩＬ－１０；ＩＬ－１１；およびＴＧＦβが挙げられる。

【０２２４】

Ｄ．医薬組成物

本開示の抗体および抗体部分は、対象への投与に適した医薬組成物中に組み込むことができる。一般に、医薬組成物は、少なくとも１種の本開示の抗体または抗体部分および薬学的に許容される担体を含む。このような組成物は、例えば、哺乳動物に、組成物の有効量を投与することによって、ＮＧＦのレベルの上昇を伴う疾患または障害について、哺乳動物を治療するための方法において使用され得る。医薬組成物は、抗体または抗体部分の治療上有効な量を含み得る。本明細書において記載された医薬組成物は、障害またはその１つもしくは複数の症状を診断、検出またはモニタリングするため、障害またはその１つもしくは複数の症状を予防、治療、管理し、または寛解させるため、および／または研究のために使用され得る。本明細書において、語句「ＮＧＦのレベルの上昇」とは、確立されたまたは予め決定されたＮＧＦのベースラインレベル、例えば、前記対象についてこれまでに確立されたレベルまたは対象の群から平均化されたレベルなどよりも大きいまたは高い、哺乳動物などの対象におけるＮＧＦのレベルを指す。

【０２２５】

医薬組成物は、例えば、結合タンパク質および薬学的に許容される担体、賦形剤または希釈剤を含み得る。例えば、医薬組成物は、本明細書において開示されたような１種または複数の結合タンパク質の治療上有効な量を、薬学的に許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、防腐剤および／またはアジュバントと一緒に含み得る。医薬組成物は、組成物または組成物の特性、例えば、組成物の色、粘稠性、等張性、匂い、浸透圧、ｐＨ、無菌性、安定性、粘性およびその他の特性を修飾、維持または保存するために１種または複数の種々の製剤材料を含有し得る。このような製剤材料は、一般に周知であり、多数の適した製剤材料が、例えば、ＲＥＭＩＮＧＴＯＮ’Ｓ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ　ＳＣＩＥＮＣＥＳ、第１８版（Ａ．Ｒ．Ｇｅｎｎａｒｏ編）１９９０年、Ｍａｃｋ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏｍｐａｎｙに記載されている。適した製剤材料の限定されない例として、アミノ酸（グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリシンなど）；抗菌剤；抗酸化物質（アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウムまたは亜硫酸水素ナトリウムなど）；バッファー（ホウ酸、重炭酸、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、クエン酸、リン酸またはその他の有機酸など）；充填剤（マンニトールまたはグリシンなど）；キレート化剤（エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）など）；錯化剤（カフェイン、ポリビニルピロリドン、β－シクロデキストリンまたはヒドロキシプロピル－β－シクロデキストリンなど）；増量剤；単糖、二糖およびその他の炭水化物（グルコース、マンノースまたはデキストリンなど）；タンパク質（血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなど）；着色剤、嬌味剤および希釈剤；乳化剤；親水性ポリマー（ポリビニルピロリドンなど）；低分子量ポリペプチド；塩形成対イオン（ナトリウムなど）；防腐剤（塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサール、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸または過酸化水素など）；溶媒（グリセリン、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなど）；糖アルコール（マンニトールまたはソルビトールなど）；懸濁剤；界面活性剤または湿潤剤（プルロニック類、ＰＥＧ、ソルビタンエステル、ポリソルベート２０およびポリソルベート８０などのポリソルベート、Ｔｒｉｔｏｎ、トロメタミン、レシチン、コレステロールまたはチロキサパル（ｔｙｌｏｘａｐａｌ）など）；安定性増強剤（スクロースまたはソルビトールなど）；張性増強剤（ハロゲン化アルカリ金属、好ましくは、塩化ナトリウムまたは塩化カリウム、マンニトールソルビトールなど）；送達媒体；希釈剤；賦形剤および／または医薬アジュバントが挙げられる。さらに、医薬組成物はまた、１種または複数の防腐剤を含有し得る。使用してもよい適した防腐剤の例として、それだけには限らないが、メチルパラベン、プロピルパラベン、ベンジルアルコール、クロロブタノールおよび塩化ベンザルコニウムが挙げられる。最適医薬製剤は、例えば、意図される投与経路、送達形式および所望の投与量に応じて、当業者によって容易に決定され得る。

【０２２６】

医薬組成物は、ＮＧＦ活性が有害である障害を治療するための少なくとも１種のさらな

る治療薬を含み得る。さらなる薬剤は、例えば、治療薬、造影剤、細胞傷害性薬剤、血管新生抑制剤、キナーゼ阻害剤、共刺激分子遮断薬、接着分子遮断薬、抗サイトカイン抗体またはその機能的断片、メトトレキサート、シクロスポリン、ラパマイシン、ＦＫ５０６、検出可能な標識またはリポーター、ＴＮＦアンタゴニスト、抗リウマチ薬、筋弛緩薬、麻薬、非ステロイド系抗炎症剤（ＮＳＡＩＤ）、鎮痛薬、麻酔薬、鎮静薬、局所麻酔薬、神経筋遮断薬、抗菌剤、抗乾癬薬、コルチコステロイド；アナボリックステロイド、エリスロポエチン、免疫グロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン置換薬、放射性医薬品、抗鬱薬、抗精神病薬、刺激薬、喘息薬物、βアゴニスト、吸入ステロイド、経口ステロイド、エピネフリンまたは類似体、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストであり得る。

【０２２７】

本開示の医薬組成物は、約７．０より高いまたは約７．０から約８．０の間のｐＨを有し得る。あるいは、医薬組成物は、約７．２から約７．８の間のｐＨを有し得る。さらに、あるいは、医薬組成物のｐＨは、約７．４から約７．６の間であり得る。さらに、あるいは、医薬組成物のｐＨは、約７．０、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６　７．７、７．８、７．９または８．０であり得る。本開示の医薬組成物に関して、６．０以下のｐＨでは、分解の増大、断片化の増大または分解の増大および断片化の増大がある。ヒト化抗体を含む多数の医薬組成物は、５．０より低いｐＨで、やはり、約６．０より高いｐＨで、分解の増大、断片化の増大をまたは分解の増大および断片化の増大を示すので、この知見は驚くべきものであった。したがって、ヒト化抗体を含有するほとんどの医薬組成物は、約５．０から約６．０の間のｐＨで安定である。

【０２２８】

結合タンパク質の放出のための組成物は、例えば、上記で開示された結晶化結合タンパク質、結晶化抗体構築物または結晶化抗体コンジュゲートのある量を含む製剤を含み得る。組成物は、担体、賦形剤または希釈剤および少なくとも１種のポリマー担体などの追加の成分をさらに含み得る。ポリマー担体は、以下：ポリ（アクリル酸）、ポリ（シアノアクリレート）、ポリ（アミノ酸）、ポリ（無水物）、ポリ（デプシペプチド）、ポリ（エステル）、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸－グリコール酸）共重合体またはＰＬＧＡ、ポリ（ｂ－ヒドロキシ酪酸）、ポリ（カプロラクトン）、ポリ（ジオキサノン）、ポリ（エチレングリコール）、ポリ（（ヒドロキシプロピル）メタクリルアミド、ポリ［（オルガノ）ホスファゼン］、ポリ（オルトエステル）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、マレイン酸無水物－アルキルビニルエーテル共重合体、プルロニックポリオール、アルブミン、アルギン酸塩、セルロースおよびセルロース誘導体、コラーゲン、フィブリン、ゼラチン、ヒアルロン酸、オリゴ糖、グリコサミノグリカン（ｇｌｙｃａｍｉｎｏｇｌｙｃａｎ）、硫酸化多糖、それらのブレンドおよび共重合体から選択される１種または複数のポリマーを含み得る。追加の成分は、例えば、アルブミン、スクロース、トレハロース、ラクチトール、ゼラチン、ヒドロキシプロピル－β－シクロデキストリン、メトキシポリエチレングリコールおよびポリエチレングリコールであり得る。

【０２２９】

ポリマー担体は、本明細書において以下にさらに記載されるように、組成物からの結合タンパク質の放出に影響を及ぼすことができる場合がある。開示されている結合タンパク質の制御放出または持続放出を達成するために、開示されている結合タンパク質を含む医薬組成物の製剤にポリマー材料が使用され得る（Ｍｅｄｉｃａｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　ｏｆ　Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　Ｒｅｌｅａｓｅ、ＬａｎｇｅｒおよびＷｉｓｅ（編）、ＣＲＣ　Ｐｒｅｓ．、Ｂｏｃａ　Ｒａｔｏｎ、Ｆｌａ．（１９７４年）；Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　Ｄｒｕｇ　Ｂｉｏａｖａｉｌａｂｉｌｉｔｙ、Ｄｒｕｇ　Ｐｒｏｄｕｃｔ　Ｄｅｓｉｇｎ　ａｎｄ　Ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ、ＳｍｏｌｅｎおよびＢａｌｌ（編）、Ｗｉｌｅｙ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（１９８４年）；Ｒａｎｇｅｒｅｔら、Ｊ．Ｍａｃｒｏｍｏｌ．Ｓｃｉ．Ｒｅｖ．Ｍａｃｒｏｍｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２３：６１頁（１９８３年）；Ｌｅｖｙら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２２８：１９０頁（１９８５年）；Ｄｕｒｉｎｇら、Ａｎ

ｎ．Ｎｅｕｒｏｌ．、２５：３５１頁（１９８９年）；Ｈｏｗａｒｄら、Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｕｒｇ．、７１：１０５頁（１９８９年）；米国特許第５，６７９，３７７号；同５，９１６，５９７号；同５，９１２，０１５号；同５，９８９，４６３号；同５，１２８，３２６号；ＰＣＴ公開番号ＷＯ９９／１５１５４およびＷＯ９９／２０２５３）。持続放出製剤において使用されるポリマーの例として、それだけには限らないが、ポリ（２－ヒドロキシエチルメタクリレート）、ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（アクリル酸）、ポリ（エチレン－コ－酢酸ビニル）、ポリ（メタクリル酸）、ポリグリコリド（ＰＬＧ）、ポリ無水物、ポリ（Ｎ－ビニルピロリドン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリアクリルアミド、ポリ（エチレングリコール）、ポリラクチド（ＰＬＡ）、ポリ（ラクチド－コ－グリコリド）（ＰＬＧＡ）およびポリオルトエステルが挙げられる。持続放出製剤において使用されるポリマーは、不活性であり、漏出性の不純物を含まず、保存に対して安定であり、無菌であり、生分解性であり得る。制御放出または持続放出系は、予防標的または治療標的に近接して配置され得、したがって、全身用量の画分のみを必要とする（例えば、Ｇｏｏｄｓｏｎ、Ｉｎ Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ、上記、第２巻、１１５－１３８頁（１９８４年）参照のこと）。

【０２３０】

制御放出系は、Ｌａｎｇｅｒによる概説（Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４９：１５２７－１５３３頁（１９９０年））において論じられている。本開示の１種または複数の治療薬を含む持続放出製剤を製造するために当業者に公知の任意の技術が使用され得る（米国特許第４，５２６，９３８号；ＰＣＴ公開番号ＷＯ９１／０５５４８およびＷＯ９６／２０６９８；Ｎｉｎｇら、Ｒａｄｉｏｔｈｅｒａｐｙ ＆ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ、３９：１７９－１８９頁（１９９６年）；Ｓｏｎｇら、ＰＤＡ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ ＆ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、５０：３７２－３９７頁（１９９５年）；Ｃｌｅｅｋら、Ｐｒｏ．Ｉｎｔ’ｌ．Ｓｙｍｐ．Ｃｏｎｔｒｏｌ．Ｒｅｌ．Ｂｉｏａｃｔ．Ｍａｔｅｒ．、２４：８５３－８５４頁（１９９７年）およびＬａｍら、Ｐｒｏｃ．Ｉｎｔ’ｌ．Ｓｙｍｐ．Ｃｏｎｔｒｏｌ Ｒｅｌ．Ｂｉｏａｃｔ．Ｍａｔｅｒ．，２４：７５９－７６０頁（１９９７年））。

【０２３１】

本開示の結合タンパク質は、当技術分野で公知のさまざまな方法によって投与され得る。例えば、本開示の結合タンパク質は、皮下注射、静脈内注射または注入によって投与され得る。投与は、全身であっても、局所であってもよい。当業者には当然であろうが、投与経路および／または投与様式は、所望の結果に応じて変わり得る。インプラント、経皮パッチおよびマイクロカプセル化された送達系を含めた放出制御製剤など、活性化合物は、化合物を急速放出から保護する担体を用いて調製され得る。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸などの生分解性、生体適合性ポリマーが使用され得る。このような製剤の調製のための多数の方法が、当業者に公知である。例えば、Ｓｕｓｔａｉｎｅｄ ａｎｄ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｊ．Ｒ．Ｒｏｂｉｎｓｏｎ編、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ、Ｉｎｃ．、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１９７８年参照のこと。

【０２３２】

例えば、このような医薬組成物は、非経口、皮内、皮下、筋肉内、静脈内、動脈内、気管支内、腹腔内、関節内、軟骨内、腔内（ｉｎｔｒａｃａｖｉｔａｒｙ）、腔内（ｉｎｔｒａｃｅｌｉａｌ）、小脳内、脳室内、結腸内、頸部内、胃内、肝内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑膜内、胸腔内、子宮内、膀胱内、ボーラス、経膣、直腸、頬側、舌下、鼻腔内または経皮によって対象に投与され得る。本開示の予防薬または治療薬を投与する方法として、それだけには限らないが、硬膜外投与、腫瘍内投与および粘膜投与（例えば、鼻腔内および経口経路）も挙げられる。さらに、例えば、吸入器または噴霧器およびエアロゾル化剤を有

する製剤の使用による肺投与も使用され得る（米国特許第６，０１９，９６８号；同５，９８５，３２０号；同５，９８５，３０９号；同５，９３４，２７２号；同５，８７４，０６４号；同５，８５５，９１３号；同５，２９０，５４０号；および同４，８８０，０７８号：ならびにＰＣＴ公開番号ＷＯ９２／１９２４４、ＷＯ９７／３２５７２、ＷＯ９７／４４０１３、ＷＯ９８／３１３４６およびＷＯ９９／６６９０３）。本明細書において記載された抗体および抗体部分は、例えば、Ａｌｋｅｒｍｅｓ　ＡＩＲ（登録商標）肺薬物送達技術（Ａｌｋｅｒｍｅｓ，Ｉｎｃ．、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、Ｍａｓｓ．）を使用して投与され得る。予防薬または治療薬は、任意の好都合な経路によって投与されてよく、その他の生物学的に活性な薬剤と一緒に投与されてもよい。

【０２３３】

種々の送達系が公知であり、１種もしくは複数の開示された結合タンパク質または１種もしくは複数の開示された結合タンパク質と、障害またはその１つもしくは複数の症状を予防、管理、治療し、または寛解させるのに有用な予防薬もしくは治療薬の組合せを投与するために使用され得る。例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセルにおけるカプセル封入、抗体または抗体断片を発現できる組換え細胞、受容体媒介性エンドサイトーシス（例えば、Ｗｕら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２６２：４４２９－４４３２頁（１９８７年）参照のこと）、レトロウイルスベクターまたはその他のベクターの一部としての核酸の構築など。開示されている結合タンパク質を、治療を必要とする領域に局所的に投与することが望ましいものであり得、これは、例えば、制限するものではないが、局所注入として、注射によって、またはインプラントによって達成され得、前記インプラントは、サイラスティックメンブラン、ポリマー、繊維性マトリックス（例えば、Ｔｉｓｓｕｅｌ（登録商標））またはコラーゲンマトリックスなどのメンブランおよびマトリックスを含めた多孔性または非多孔性材料である。有効量の１種または複数の開示されている結合タンパク質が、障害またはその症状を予防、治療、管理および／または寛解させるために被験体に罹患領域に局所的に投与され得る。または、有効量の１種または複数の開示されている結合タンパク質が、有効量の開示されている結合タンパク質以外の１種または複数の治療（例えば、１種または複数の予防薬または治療薬）と組み合わせて、障害またはその１種もしくは複数の症状を予防、治療、管理および／または寛解させるために被験体の罹患領域に局所的に投与される。

【０２３４】

開示されている結合タンパク質は、制御放出または持続放出系、例えば開示されている結合タンパク質の制御放出または持続放出を達成するように操作可能な注入ポンプ装置で送達され得る（Ｌａｎｇｅｒ、上記；Ｓｅｆｔｏｎ、ＣＲＣ　Ｃｒｉｔ．Ｒｅｆ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｅｎｇ．、１４：２０頁（１９８７年）；Ｂｕｃｈｗａｌｄら、Ｓｕｒｇｅｒｙ、８８：５０７頁（１９８０年）；Ｓａｕｄｅｋら、Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．、３２１：５７４頁（１９８９年）を参照のこと）。

【０２３５】

本明細書に記載されている組成物が、予防薬または治療薬として本明細書に記載されている結合タンパク質をコードする核酸を含む場合には、そのコードされる予防薬または治療薬の発現を促進するために、適当な核酸発現ベクターの一部として構築することおよび細胞内になるようにそれを投与することによって、例えば、レトロウイルスベクターを使用することによって（米国特許第４，９８０，２８６号参照のこと）、または直接注射によって、または微粒子銃を使用することによって（例えば、遺伝子銃；Ｂｉｏｌｉｓｔｉｃ、ＤｕＰｏｎｔ）、または脂質もしくは細胞表面受容体もしくはトランスフェクト剤を用いてコーティングすることによって、または核に入ると知られているホメオボックス様ペプチドと関連して投与することによって（Ｊｏｌｉｏｔら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，８８：１８６４－１８６８頁（１９９１年）参照のこと）、核酸はインビボで投与され得る。または、核酸は、相同組換えによる発現のために細胞内に導入され、宿主細胞ＤＮＡ内に組み込まれ得る。

【０２３６】

本開示の医薬組成物は、その意図される投与経路と適合するよう製剤される。投与経路の例として、それだけには限らないが、非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口、鼻腔内（例えば、吸入）、経皮（例えば、局所）、経粘膜および直腸投与が挙げられる。例えば、組成物は、ヒトおよびコンパニオンアニマルへの静脈内、皮下、筋肉内、経口、鼻腔内または局所投与に適している医薬組成物として、常法に従って製剤され得る。通常、静脈内投与用の組成物は、滅菌等張性水性バッファー中の溶液である。必要に応じて、組成物はまた、可溶化剤および注射の部位での疼痛を和らげるためリグノカムン（ｌｉｇｎｏｃａｍｎｅ）などの局所麻酔薬も含み得る。

【０２３７】

本開示の組成物が、局所的に投与される場合には、組成物は、軟膏、クリーム、経皮パッチ、ローション、ゲル、シャンプー、スプレー、エアゾール、溶液、エマルジョンの形態または当業者に周知のその他の形態で製剤され得る（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ａｎｄ Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｔｏ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ、第１９版、Ｍａｃｋ Ｐｕｂ．Ｃｏ．、Ｅａｓｔｏｎ、Ｐａ．（１９９５年））。噴霧できない局所投与形には、局所適用に適合する担体または１種もしくは複数の賦形剤を含み、水より大きい動粘性係数を有する粘性から半固体または固体形態が、通常使用される。適した製剤として、制限するものではなく、溶液、懸濁液、エマルジョン、クリーム、軟膏（ｏｉｎｔｍｅｎｔ）、散剤、リニメント剤、軟膏（ｓａｌｖｅｓ）などが挙げられ、これらは、必要に応じて、例えば、浸透圧などの種々の特性に影響を及ぼすために、滅菌され、または補助剤（例えば、保存料、安定化剤、湿潤剤、バッファーまたは塩）と混合される。その他の適した局所投与形として、固体または液体不活性担体と組み合わせた有効成分が、加圧された揮発性物質（例えば、ガス状噴射剤、例えば、Ｆｒｅｏｎ）との混合物中にまたはスクイーズボトル中にパッケージされている噴霧性エアゾール製剤が挙げられる。必要に応じて、保湿剤または保水剤も、医薬組成物および投与形に添加され得る。このようなさらなる成分の例は、当技術分野で周知である。

【０２３８】

本開示の医薬組成物は、静脈内または皮下に投薬された場合に、約８日から約１５日の半減期を有し得る。あるいは、本発明の医薬組成物は、約１０日から約１３日の半減期を有し得る。さらに、あるいは、本発明の医薬組成物は、約８日、例えば、約８．５日、約９日、例えば、約９．５日、約１０日、例えば、約１０．５日、約１１日、例えば、約１１．５日、約１２日、約１２．５日、約１３日、例えば、約１３．５日、約１４日、例えば、約１４．５日または約１５日の半減期を有し得る。

【０２３９】

本開示の方法が、組成物の鼻腔内投与を含む場合には、組成物は、エアゾール形態、スプレー、ミストまたは液滴の形態で製剤され得る。特に、本開示に従って使用するための予防薬または治療薬は、適した噴射剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素またはその他の適したガス）を使用して、加圧パックまたは噴霧器からエアゾールスプレーの体裁という形態で送達され得ることが好都合である。加圧エアゾールの場合には、投与単位は、定量を送達するためのバルブを提供することによって決定され得る。化合物およびラクトースまたはデンプンなどの適した散剤基剤の散剤ミックスを含有する、吸入器（ｉｎｈａｌｅｒ）または吸入器（ｉｎｓｕｆｆｌａｔｏｒ）において使用するためのカプセル剤およびカートリッジ（例えば、ゼラチンからなる）が製剤され得る。

【０２４０】

本開示の方法が、経口投与を含む場合には、組成物は、錠剤、カプセル剤、カシェ剤、ジェルキャップ、溶液、懸濁液などの形態で経口的に製剤され得る。錠剤またはカプセル剤は、結合剤（例えば、アルファ化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）；増量剤（例えば、ラクトース、微晶質セルロースまたはリン酸水素カルシウム）；滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク

またはシリカ）；崩壊剤（例えば、ジャガイモデンプンまたはグリコール酸ナトリウムデンプン）；または湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム）などの薬学的に許容される賦形剤を用い、従来の手段によって調製され得る。錠剤は、当技術分野で周知の方法によってコーティングされてもよい。経口投与のための液体製剤は、それだけには限らないが、溶液、シロップ剤または懸濁液の形態をとり得る、またはそれらは使用前に水もしくはその他の適した媒体で構成するための乾燥製剤として調製され得る。このような液体製剤は、懸濁剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体、または硬化食用脂肪）；乳化剤（例えば、レシチンまたはアラビアガム）；非水性媒体（例えば、アーモンドオイル、油性エステル、エチルアルコールまたは精留植物油）；および保存料（例えば、メチルまたはプロピル－ｐ－ヒドロキシベンゾエートまたはソルビン酸）などの薬学的に許容される添加剤を用い、従来の手段によって調製され得る。製剤はまた、必要に応じて、バッファー塩、矯味剤、着色剤および甘味剤も含有し得る。経口投与用製剤は、予防薬または治療薬の徐放、制御放出または持続放出のために適宜製剤され得る。

【０２４１】

本開示の方法は、例えば、エアロゾル化剤を用いて製剤された組成物の吸入器または噴霧器の使用による肺の投与を含み得る（米国特許第６，０１９，９６８号、同５，９８５，３２０号、同５，９８５，３０９号、同５，９３４，２７２号、同５，８７４，０６４号、同５，８５５，９１３号、同５，２９０，５４０号、および同４，８８０，０７８号、およびＰＣＴ公開番号ＷＯ９２／１９２４４、ＷＯ９７／３２５７２、ＷＯ９７／４４０１３、ＷＯ９８／３１３４６およびＷＯ９９／６６９０３）。例えば、本開示の抗体、併用療法および／または本開示の組成物は、Ａｌｋｅｒｍｅｓ　ＡＩＲ（登録商標）肺薬剤送達技術（Ａｌｋｅｒｍｅｓ、Ｉｎｃ．、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、Ｍａｓｓ．）を使用して投与され得る。

【０２４２】

本開示の方法は、注射による（例えば、ボーラス注射または連続注入による）非経口投与用に製剤された組成物の投与を含み得る。注射用製剤は、防腐剤を加えた単位投与形で（例えば、アンプル中で、または複数用量容器中で）提示され得る。組成物は、油性または水性媒体中の懸濁液、溶液またはエマルジョンなどの形態をとり得、懸濁剤、安定化剤および／または分散剤などの処方剤（ｆｏｒｍｕｌａｔｏｒｙ　ａｇｅｎｔｓ）を含有し得る。または、有効成分は、使用前に適した媒体（例えば、滅菌発熱物質不含水）を用いて構成するための散剤形態であり得る。

【０２４３】

本開示の方法は、デポー製剤として製剤された組成物の投与をさらに含み得る。このような長時間作用型製剤は、移植（例えば、皮下にまたは筋肉内に）によって、または筋肉注射によって投与され得る。したがって、例えば、組成物は、適したポリマー物質または疎水性物質を用いて（例えば、許容されるオイル中のエマルジョンとして）またはイオン交換樹脂を用いて、または難溶性誘導体として（例えば、難溶性塩として）製剤され得る。

【０２４４】

本開示の方法は、中性のまたは塩の形態として製剤された組成物の投与を包含する。薬学的に許容される塩として、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などから誘導されるものなどの陰イオンを用いて形成されるもの、ならびにナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、２－エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するものなどの陽イオンを用いて形成されるものが挙げられる。

【０２４５】

開示されている組成物の成分は、別個に、または単位投与形中に一緒に混合されて、例えば、活性薬剤の量を示し得るアンプルまたはサシェなどの密閉された容器中の無水凍結乾燥散剤または実質的に無水の濃縮物として供給され得る。投与様式が注入である場合には、開示されている組成物は、水または生理食塩水などの滅菌医薬等級溶液を含有する注

入溶液を用いて分配され得る。投与様式が注射によってである場合には、水または生理食塩水などの滅菌溶液のアンプルは、成分が投与に先立って混合され得るように提供され得る。

【０２４６】

特に、本開示はまた、開示されている結合タンパク質またはその医薬組成物のうち１種または複数が、薬剤の量を示し得るアンプルまたはサシェなどの密閉された容器中にパッケージングされることを提供する。開示されている結合タンパク質またはその医薬組成物のうち１種または複数が、密閉された容器中の無水滅菌凍結乾燥散剤または実質的に無水の濃縮物として供給され得、（例えば、水または生理食塩水を用いて）被験体に投与するための適当な濃度に再構成され得る。開示されている結合タンパク質またはその医薬組成物のうち１種または複数は、少なくとも約０．５ｍｇ、１ｍｇ、２ｍｇ、４ｍｇ、５ｍｇ、１０ｍｇ、１５ｍｇ、２５ｍｇ、３５ｍｇ、４５ｍｇ、５０ｍｇ、７５ｍｇまたは１００ｍｇの単位投与量で密閉された容器中の無水滅菌凍結乾燥散剤として供給される。開示されている凍結乾燥結合タンパク質またはその医薬組成物は、任意の適切な温度で、例えば、約２℃から約８℃の間で保存されればよく、その元の容器中で保存されればよい。開示されている結合タンパク質またはその医薬組成物は、再構成された後、約１週間以内に、約５日以内に、約７２時間以内に、約４８時間以内に、約２４時間以内に、約１２時間以内に、約６時間以内に、約５時間以内に、約３時間以内にまたは約１時間以内に投与されればよい。または、開示されている結合タンパク質またはその医薬組成物のうち１種または複数が、薬剤の量および濃度を示し得る密閉された容器中の液体形態で供給され得る。投与される組成物の液体形態は、密閉された容器中で、少なくとも約０．０１ｍｇ／ｍＬ、少なくとも約０．０５ｍｇ／ｍＬ、少なくとも約０．１ｍｇ／ｍＬ、少なくとも約０．２ｇ／ｍＬ、少なくとも約０．２５ｍｇ／ｍｌ、少なくとも約０．５ｍｇ／ｍｌ、少なくとも約１ｍｇ／ｍｌ、少なくとも約２．５ｍｇ／ｍｌ、少なくとも約５ｍｇ／ｍｌ、少なくとも約８ｍｇ／ｍｌ、少なくとも約１０ｍｇ／ｍｌ、少なくとも約１５ｍｇ／ｍｌ、少なくとも約２５ｍｇ／ｍｌ、少なくとも約５０ｍｇ／ｍｌ、少なくとも約７５ｍｇ／ｍｌまたは少なくとも約１００ｍｇ／ｍｌの濃度で供給されればよい。液体形態は、任意の適切な温度で、例えば、約２℃から約８℃の間で保存されればよく、その元の容器中で保存されればよい。

【０２４７】

本開示の結合タンパク質は、非経口投与に適した医薬組成物中に組み込まれ得る。一態様では、結合タンパク質は、約０．１－約２５０ｍｇ／ｍｌの抗体を含有する注射用溶液として調製される。注射用溶液は、フリントまたはアンバーバイアル、アンプルまたは薬剤充填済みシリンジ中の液体または凍結乾燥投与形のいずれかからなり得る。バッファーは、約１－５０ｍＭまたは約５－１０ｍＭの濃度の、Ｌ－ヒスチジンまたはリン酸バッファー生理食塩水などの任意の適切なバッファーであり得る。その他の適したバッファーとして、それだけには限らないが、コハク酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウムおよびリン酸カリウムが挙げられる。医薬組成物の毒性を改変するために、バッファーを使用することができる。例えば、結合タンパク質溶液の毒性を改変するために、塩化ナトリウムが、約０．１－約３００ｍＭの濃度で、例えば、液体投与形の毒性を改変するために約１５０ｍＭの生理食塩水が、使用され得る。凍結乾燥投与形には、スクロースなどの凍結保護物質が、約０．１から約１０％の濃度で含まれてもよく、または約０．５から約１．０％が使用され得る。その他の適した凍結保護物質として、それだけには限らないが、トレハロースおよびラクトースが挙げられる。凍結乾燥投与形には、マンニトールなどの充填剤が、約１から約１０％または約２から約４％の濃度で含まれ得る。液体および凍結乾燥投与形の両方において、Ｌ－メチオニンなどの安定化剤が、約１から約５０ｍＭまたは約５から約１０ｍＭ）の濃度で使用され得る。その他の適した充填剤として、それだけには限らないが、グリシンおよびアルギニンが挙げられる。液体および凍結乾燥投与形の両方において、ポリソルベート－８０などの界面活性剤が、約０．００１から約０．０５％または約０．００５から約０．０１％の濃度で含まれ得る。さらなる界面活性

剤として、それだけには限らないが、ポリソルベート２０およびＢＲＩＪ界面活性剤が挙げられる。

【０２４８】

本開示の例示的医薬製剤または組成物は、約７．４から約８．０の間のｐＨを有する液体医薬組成物であり得る。液体医薬組成物は、約５ｍｇ／ｍｌから約５０ｍｇ／ｍｌの、配列番号３７の配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号３８の配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体を含む。液体医薬組成物は、少なくとも１種のバッファー（リン酸バッファー生理食塩水、Ｔｒｉｓまたはヒスチジンなど）をさらに含む。使用してもよいバッファーのモル濃度は、約１ｍＭから約６０ｍＭであり得る。場合により、前記医薬組成物または製剤はまた、メチルパラベン、プロピルパラベン、ベンジルアルコール、クロロブタノールまたは塩化ベンザルコニウムなどの少なくとも１種の防腐剤を含有し得る。使用してもよい防腐剤の量は、使用される防腐剤に応じて、約０．０１容量パーセントから約５．０容量パーセントであり得る。

【０２４９】

本開示の別の例示的医薬製剤または組成物は、約７．４から約８．０の間のｐＨを含む液体医薬組成物であり得る。液体医薬組成物は、約５ｍｇ／ｍｌから約５０ｍｇ／ｍｌの、配列番号１９２の配列を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号１９３の配列を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体を含む。液体医薬組成物は、少なくとも１種のバッファー（リン酸バッファー生理食塩水、Ｔｒｉｓまたはヒスチジンなど）をさらに含む。使用してもよいバッファーのモル濃度は、約１ｍＭから約６０ｍＭであり得る。場合により、前記医薬組成物または製剤はまた、メチルパラベン、プロピルパラベン、ベンジルアルコール、クロロブタノールまたは塩化ベンザルコニウムなどの少なくとも１種の防腐剤を含有し得る。使用してもよい防腐剤の量は、使用される防腐剤に応じて、約０．０１容量パーセントから約５．０容量パーセントであり得る。

【０２５０】

本開示の組成物は、種々の形態であり得る。これらとして、例えば、液体溶液（例えば、注射用溶液および注入用溶液）、分散物または懸濁液、錠剤、丸剤、散剤、リポソームおよび坐剤などの液体、半固体および固体投与形が挙げられる。開示されている組成物の形態は、意図される投与様式および治療適用に応じて変わる。開示されている組成物は、その他の抗体を用いるヒトの受動免疫処置に使用されるものと類似の組成物などの注射用溶液または注入用溶液の形態であり得る。投与様式は、非経口（例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内）であり得る。開示されている結合タンパク質は、静脈内注入または注射、または筋肉内注射または皮下注射によって投与され得る。

【０２５１】

治療用組成物は、通常、無菌で、製造および保存の条件下で安定でなくてはならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散物、リポソームまたは高い薬物濃度に適した組成物などのその他の適した秩序構造として製剤され得る。滅菌注射用溶液は、適当な溶媒中の必要な量で活性化合物（すなわち、抗体または抗体部分）を、必要に応じて上記で列挙された成分のうち１種またはそれらの組合せとともに組み込むこと、続いて、濾過滅菌することによって調製され得る。分散物は、活性化合物を、基本分散媒および上記で列挙されたもののうち必要なその他の成分を含有する滅菌媒体に組み込むことによって調製され得る。滅菌注射用溶液を調製するための滅菌凍結乾燥散剤の場合には、調製方法は、それだけには限らないが、真空乾燥ならびに有効成分および先に滅菌濾過したその溶液に由来する任意のさらなる所望の成分の散剤が得られる噴霧乾燥を含む。溶液の適切な流動度は、例えば、レシチンなどのコーティングを使用することによって、分散物の場合には必要な粒径を維持することによって、および界面活性剤を使用することによって維持され得る。注射用組成物の長期吸収は、組成物中に、吸収を遅延する薬剤、例えば、モノステアリン酸塩およびゼラチンを含めることによってもたらされ得る。

【０２５２】

本開示の抗体または抗体部分は、例えば、不活性希釈液または同化食用担体とともに経

口投与され得る。化合物（および必要に応じて、その他の成分）はまた、ハードまたはソフトシェルゼラチンカプセル剤中に封入される、錠剤に打錠される、または被験体の食事に直接組み込まれ得る。経口治療的投与には、化合物は、賦形剤とともに組み込まれ、摂取可能な錠剤、頬側錠剤、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁液、シロップ、ウェーハなどの形態で使用され得る。本開示の化合物を、非経口投与以外によって投与するには、化合物をその不活化を防ぐ物質とコーティングするまたは化合物をその不活化を防ぐ物質と同時投与する必要があり得る。

【０２５３】

開示されている結合タンパク質は、開示されている組成物中にも組み込まれ得る他の活性化合物と同時投与され得る。本開示の抗体または抗体部分は、ＮＧＦ活性が有害である障害を治療するために有用である１種または複数のさらなる治療薬と同時製剤および／または同時投与され得る。例えば、本開示の抗ＮＧＦ抗体または抗体部分は、その他の標的と結合する１種または複数のさらなる抗体（例えば、その他のサイトカインと結合する抗体または細胞表面分子と結合する抗体）と同時製剤および／または同時投与され得る。さらに、１種または複数の開示されている結合タンパク質は、前述の治療薬のうち２種以上と組み合わせて使用され得る。このような併用療法は、例えば、投与される治療薬の低い投与量を可能にし、したがって、種々の単剤療法と関連している潜在的な毒性または複雑性を避けることができる。

【０２５４】

ＮＧＦに対する抗体またはその断片は、結合タンパク質の半減期を延長する媒体と製剤し得る。当技術分野で公知の適切な媒体として、それだけには限らないが、Ｆｃドメイン、ポリエチレングリコールおよびデキストランが挙げられる。このような媒体は、例えば、米国出願第０９／４２８，０８２号および公開されたＰＣＴ出願番号ＷＯ９９／２５０４４に記載されている。

【０２５５】

開示されている結合タンパク質または本開示の別の予防薬または治療薬をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸配列が、遺伝子療法によって、障害またはその１種もしくは複数の症状を治療、予防、管理または寛解させるために投与され得る。遺伝子療法とは、発現されたまたは発現可能な核酸を被験体に投与することによって実施される治療を指し、核酸はそのコードされた抗体または予防効果もしくは治療効果を媒介する本開示の予防薬もしくは治療薬を生成する。

【０２５６】

当技術分野で入手可能な遺伝子療法のための方法のいずれかも、本開示に従って使用され得る。遺伝子療法の方法の一般的な概説については、Ｇｏｌｄｓｐｉｅｌら、Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｐｈａｒｍａｃｙ、１２：４８８－５０５頁（１９９３年）；Ｗｕら、Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ、３：８７－９５頁（１９９１年）；Ｔｏｌｓｔｏｓｈｅｖ、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．、３２：５７３－５９６頁（１９９３年）；Ｍｕｌｌｉｇａｎ、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２６０：９２６－９３２頁（１９９３年）；およびＭｏｒｇａｎら、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、６２：１９１－２１７頁（１９９３年）；ＴＩＢＴＥＣＨ、１１（５）：１５５－２１５頁（１９９３年）を参照のこと。使用され得る組換えＤＮＡ技術の当技術分野でよく知られている方法は、例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら（編）、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ、ＮＹ（１９９３年）；およびＫｒｉｅｇｌｅｒ、Ｇｅｎｅ　Ｔｒａｎｓｆｅｒ　ａｎｄ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ、Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ、Ｓｔｏｃｋｔｏｎ　Ｐｒｅｓｓ、ＮＹ（１９９０年）に記載されている。遺伝子療法の種々の方法の詳細な説明は、ＵＳ２００５００４２６６４　Ａ１に開示されている。

【０２５７】

本開示の抗体またはその抗原結合部分は、ＮＧＦが関連する疾患を治療するために、単独で使用されても、組み合わせて使用されてもよい。本開示の抗体またはその抗原結合部

分は、単独で使用されても、その意図される目的のために当業者によって選択される追加の薬剤、例えば、治療薬と組み合わせて使用されてもよいということは理解されなければならない。例えば、追加の薬剤は、本開示の抗体によって治療されている疾患または状態を治療するのに有用であると当技術分野で認識されている治療薬であり得る。追加の薬剤はまた、治療用組成物に有益な性質を付与する薬剤、例えば、組成物の粘性に影響を及ぼす薬剤であり得る。

【０２５８】

本開示内に含まれる組合せは、その意図される目的にとって有用な組合せであるということは理解されなければならない。以下に示された薬剤は例示目的であって、制限であるとは意図されない。本開示の一部である組合せは、本開示の抗体および以下の一覧から選択される少なくとも１種のさらなる薬剤であり得る。組合せはまた、形成された組成物がその意図される機能を遂行し得るようなものであれば、２種以上のさらなる薬剤、例えば、２種または３種のさらなる薬剤を含み得る。

【０２５９】

組合せは、イブプロフェンのような薬物を含むＮＳＡＩＤＳとも呼ばれる非ステロイド系抗炎症薬を含む。その他の組合せは、プレドニゾロンを含めた副腎皮質ステロイドである；ステロイド使用の周知の副作用は、本開示の抗ＮＧＦ抗体と組み合わせて患者を治療する場合には、必要なステロイド用量を漸減することによって低減され得るか、またはさらには排除され得る。本開示の抗体または抗体部分と組み合わせてもよい、関節リウマチまたは疼痛のための治療薬の限定されない例として、以下：サイトカイン抑制性抗炎症薬（ＣＳＡＩＤ）；サイトカインまたは増殖因子に対する抗体またはそのアンタゴニスト、例えば、ＴＮＦ、ＬＴ、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－１５、ＩＬ－１６、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、インターフェロン、ＥＭＡＰ－ＩＩ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＦＧＦおよびＰＤＧＦが挙げられる。本開示の抗体またはその抗原結合部分は、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＣＤ２８、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤ４５、ＣＤ６９、ＣＤ８０（Ｂ７．１）、ＣＤ８６（Ｂ７．２）、ＣＤ９０、ＣＴＬＡなどの細胞表面分子またはＣＤ１５４（ｇｐ３９またはＣＤ４０Ｌ）を含めたそれらのリガンドに対する抗体と組み合わせてもよい。

【０２６０】

治療薬の組合せは、自己免疫およびその後の炎症カスケードにおいて異なる点で干渉し得る；例として、キメラ、ヒト化またはヒトＴＮＦ抗体のようなＴＮＦアンタゴニスト、Ｄ２Ｅ７、（ＰＣＴ公開番号ＷＯ９７／２９１３１）、ＣＡ２（レミケード（商標））、ＣＤＰ５７１および可溶性ｐ５５またはｐ７５ＴＮＦ受容体、その誘導体（ｐ７５ＴＮＦＲ１ｇＧ（Ｅｎｂｒｅｌ（商標）またはｐ５５ＴＮＦＲ１ｇＧ（レネルセプト）およびまたＴＮＦα変換酵素（ＴＡＣＥ）阻害剤が挙げられ；同様に、その他のＩＬ－１阻害剤（インターロイキン－１－変換酵素阻害剤、ＩＬ－１ＲＡなど）も、同じ理由で有効であり得る。その他の組合せは、インターロイキン１１を含む。

【０２６１】

本開示の抗体またはその抗原結合タンパク質はまた、メトトレキサート、６－ＭＰ、アザチオプリンスルファサラジン、メサラジン、オルサラジンクロロキニン／ヒドロキシクロロキン、ペニシラミン（ｐｅｎｃｉｌｌａｍｉｎｅ）、金チオリンゴ酸（筋肉内および経口）、アザチオプリン、コルヒチン、コルチコステロイド（経口、吸入および局所注射）、β－２アドレナリン受容体アゴニスト（サルブタモール、テルブタリン、サルメテラール（ｓａｌｍｅｔｅｒａｌ））、キサンチン（テオフィリン、アミノフィリン）、クロモグリク酸、ネドクロミル、ケトチフェン、イプラトロピウムおよびオキシトロピウム、シクロスポリン、ＦＫ５０６、ラパマイシン、ミコフェノール酸モフェチル、レフルノミド、ＮＳＡＩＤ、例えば、イブプロフェン、プレドニゾロンなどのコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓薬、補体阻害剤、アドレナリン作動薬、ＴＮＦαまたはＩＬ－１（例えば、ＩＲＡＫ、ＮＩＫ、ＩＫＫ、ｐ３８またはＭＡＰキナーゼ阻害剤）などの炎症性サイトカインによるシグナル伝達を干渉する薬剤

、ＩＬ－１β変換酵素阻害剤、ＴＮＦα変換酵素（ＴＡＣＥ）阻害剤、Ｔ－細胞シグナル伝達阻害剤、例えば、キナーゼ阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、６－メルカプトプリン、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびその誘導体（例えば、可溶性ｐ５５またはｐ７５ＴＮＦ受容体および誘導体ｐ７５ＴＮＦＲＩｇＧ（Ｅｎｂｒｅｌ（商標）およびｐ５５ＴＮＦＲＩｇＧ（レネルセプト））、ｓＩＬ－１ＲＩ、ｓＩＬ－１ＲＩＩ、ｓＩＬ－６Ｒ）、抗炎症性サイトカイン（例えば、ＩＬ－４、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１３およびＴＧＦβ）、セレコキシブ、葉酸、硫酸ヒドロキシクロロキン、ロフェコキシブ、エタネルセプト、インフリキシマブ、ナプロキセン、バルデコキシブ、スルファサラジン、メチルプレドニゾロン、メロキシカム、酢酸メチルプレドニゾロン、金チオリンゴ酸ナトリウム、アスピリン、トリアムシノロンアセトニド、ナプシル酸プロポキシフェン／アパップ、葉酸、ナブメトン、ジクロフェナク、ピロキシカム、エトドラック、ジクロフェナクナトリウム、オキサプロジン、オキシコドンｈｃｌ、酒石酸水素ヒドロコドン／アパップ、ジクロフェナクナトリウム／ミソプロストール、フェンタニル、アナキンラ、ヒト組換え型、トラマドールｈｃｌ、サルサレート、スリンダック、シアノコバラミン／ｆａ／ピリドキシン、アセトアミノフェン、アレンドロネートナトリウム、プレドニゾロン、硫酸モルヒネ、塩酸リドカイン、インドメタシン、グルコサミンｓｕｌｆ／コンドロイチン、アミトリプチリンＨＣｌ、スルファジアジン、オキシコドンＨＣｌ／アセトアミノフェン、オロパタジンｈｃｌ、ミソプロストール、ナプロキセンナトリウム、オメプラゾール、シクロホスファミド、リツキシマブ、ＩＬ－１　ＴＲＡＰ、ＭＲＡ、ＣＴＬＡ４－ＩＧ、ＩＬ－１８　ＢＰ、抗ＩＬ－１８、抗ＩＬ１５、ＢＩＲＢ－７９６、ＳＣＩＯ－４６９、ＶＸ－７０２、ＡＭＧ－５４８、ＶＸ－７４０、ロフルミラスト、ＩＣ－４８５、ＣＤＣ－８０１およびメソプラムなどの薬剤と組み合わせ得る。その他の組合せは、メトトレキサートまたはレフルノミドおよび中程度または重篤な関節リウマチの場合には、シクロスポリンを含む。本開示の抗体またはその抗原結合部分はまた、動物において使用される癌化学療法薬、抗菌剤、抗炎症薬および駆虫剤などの薬剤と組み合わされ得る。

【０２６２】

ＮＳＡＩＤとは、任意の非ステロイド系抗炎症性化合物であり得る。ＮＳＡＩＤは、シクロオキシゲナーゼを阻害するその能力によって分類される。シクロオキシゲナーゼ１およびシクロオキシゲナーゼ２は、シクロオキシゲナーゼの２種の主要なアイソフォームであり、ほとんどの標準ＮＳＡＩＤは、２種のアイソフォームの混合阻害剤である。ほとんどの標準ＮＳＡＩＤは、以下の５つの構造カテゴリーのうち１つに入る：（１）イブプロフェン、ナプロキセン、ナプロシン、ジクロフェナクおよびケトプロフェンなどのプロピオン酸誘導体；（２）トルメチンおよびスリンダック（ｓｌｉｎｄａｃ）などの酢酸誘導体；（３）メフェナム酸およびメクロフェナム酸などのフェナム酸誘導体；（４）ジフルニサルおよびフルフェニサルなどのビフェニルカルボン酸誘導体；ならびに（５）ピロキシム（ｐｉｒｏｘｉｍ）、スドキシカムおよびイソキシカムなどのオキシカム。シクロオキシゲナーゼ２を選択的に阻害する別のクラスのＮＳＡＩＤが記載されている。Ｃｏｘ－２阻害剤が記載されている（米国特許第５，６１６，６０１号；同５，６０４，２６０号；同５，５９３，９９４号：同５，５５０，１４２号；同５，５３６，７５２号；同５，５２１，２１３号；同５，４７５，９９５号；同５，６３９，７８０号；同５，６０４，２５３号；同５，５５２，４２２号；同５，５１０，３６８号；同５，４３６，２６５号；同５，４０９，９４４号；および同５，１３０，３１１号）。特定の例示的ＣＯＸ－２阻害剤として、セレコキシブ（ＳＣ－５８６３５）、ロフェコキシブ、ＤＵＰ－６９７、フロスリド（ＣＧＰ－２８２３８）、メロキシカム、６－メトキシ－２ナフチル酢酸（６－ＭＮＡ）、ＭＫ－９６６、ナブメトン（６－ＭＮＡのプロドラッグ）、ニメスリド、ＮＳ－３９８、ＳＣ－５７６６、ＳＣ－５８２１５、Ｔ－６１４；またはそれらの組合せが挙げられる。

【０２６３】

ＮＧＦアンタゴニストおよび／またはＮＳＡＩＤなどの追加の治療薬は、任意の適した

経路によって対象に投与され得る。例えば、それらは、一緒に、または別個に、および／または同時に、および／または連続して、経口的に、静脈内に、舌下に、皮下に、動脈内に、筋肉内に、直腸性に、脊髄内、胸腔内に、腹腔内に、脳室内に、舌下に、経皮的にまたは吸入によって投与され得る。投与は全身、例えば、静脈内であっても、局所化されてもよい。神経増殖因子アンタゴニストおよび追加の治療薬は、１種または複数の薬学的に許容される担体または賦形剤と一緒に存在する場合も、別個の組成物中に存在する場合もある。別の態様では、本発明は、ＮＧＦアンタゴニストおよびＮＳＡＩＤの相乗的組成物を提供する。

【０２６４】

本開示の医薬組成物は、本開示の抗体または抗体部分の「治療上有効な量」または「予防上有効な量」を含み得る。投与計画は、最適な所望の反応（例えば、治療反応または予防反応）を提供するよう調整され得る。例えば、単回ボーラスが投与される場合も、いくつかの分割用量が経時的に投与される場合も、または治療状況の危急によって、用量が比例的に減少または増加される場合もある。投与の容易さおよび投与量の均一性のために、非経口組成物を単位投与形で製剤することは特に有利である。単位投与形とは、治療される哺乳動物被験体のための単位投与量として適合している、物理的に別個の単位を指し；各単位は、必要な医薬担体と関連して所望の治療効果を生じるよう算出された所定の量の活性化合物を含有する。本開示の単位投与形の仕様は、（ａ）活性化合物の独特の特徴および達成される特定の治療効果または予防効果および（ｂ）個体における感受性の治療のための、このような活性化合物の配合の技術分野に固有の制限によって決定され、それらによって直接的に依存する。

【０２６５】

本開示の抗体または抗体部分の治療上または予防上有効な量の例示的な、限定されない範囲は、約０．００１－約２０ｍｇ／ｋｇ、または約０．００１－約１０ｍｇ／ｋｇである。投与量の値は、軽減される状態の種類および重篤度に応じて変わり得るということは留意されたい。任意の特定の被験体にとって、特定の投与計画は、個体の必要性および組成物を投与し、組成物の投与を監督している人の専門科の判断に従って、経時的に調整されなければならないということおよび本明細書に示される投与量範囲は、単に例示的なものであって、特許請求される組成物の範囲または実施を制限しようとするものではないということはさらに理解されなくてはならない。

【０２６６】

本明細書に記載された本開示の方法のその他の適した改変および適合は、明らかであり、本開示の範囲または本明細書に記載された実施形態から逸脱することなく、適した等価物を使用して行われ得るということは、当業者には容易に明らかとなるであろう。ここで、本開示を詳細に記載したが、これは、単に例示目的で含まれるのであって、本開示を制限するものではない以下の実施例を参照することによってより明確に理解されるであろう。

【実施例】

【０２６７】

以下の実施例は、本発明の主題に従う開示された結合タンパク質およびその医薬組成物を製造および使用するための例示的手引きのために提供される。しかし、本明細書において提示される本発明の概念から逸脱することなく多数の改変を行うことができるということが認識されるべきである。

【０２６８】

［実施例１］：ＮＧＦを用いるマウスの免疫処置

マウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂを作製するために、雌のＡ／Ｊマウスを、ＣＦＡ中、２５μｇのヒトβＮＧＦ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓカタログ番号２５６－ＧＦ／ＣＦ）を用いて皮下に免疫処置した。動物に、ＩＦＡ中、２５μｇのヒトβＮＧＦを用いて３週間毎に追加免疫した。融合の４日前に、マウスに、滅菌生理食塩水中、１０μｇのヒトβＮＧＦを用いて静脈内に追加免疫した。免疫処置したマウスから得た脾臓細胞を、標準技術を使用し

てＳＰ２／０－Ａｇ１４骨髄腫細胞と、５：１比の脾臓対ＳＰ２／０細胞で融合した。融合の７から１０日後、肉眼で見えるコロニーが観察された時点で、上清を、ビオチニル化ヒトまたはラットβＮＧＦとの結合について捕捉ＥＬＩＳＡ形式で調べた。ＥＬＩＳＡ陽性ウェルは２４ウェルプレートに拡大し、ビオチン化ラットβＮＧＦとの結合について調べた。ヒトおよびラットＮＧＦの両方について試験陽性のハイブリドーマ細胞株から得られた上清を、バイオアッセイ形式で評価した。対象とする細胞株を、限界希釈によってクローニングし、ＮＧＦ特異的マウスモノクローナル抗体を単離した。

【０２６９】

［実施例２］：分泌された抗ＮＧＦ　ＭＡｂを同定するためのハイブリドーマ上清のスクリーニング

【０２７０】

Ａ．間接結合ＥＬＩＳＡ

ハイブリドーマ上清中に抗ＮＧＦ　ｍＡｂが存在するかどうかを調べるために、ＥＬＩＳＡプレートを、ヤギ抗マウスＩｇＧ　Ｆｃ（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ、カタログ番号１１５－００５－１６４）でコーティングし、４℃で一晩インキュベートした。プレートを洗浄バッファーで３回洗浄した。プレートを２００μｌの２％乳でブロッキングし、室温で１時間インキュベートした。プレートを上記のとおりに洗浄した。ハイブリドーマ上清を、ＰＢＳで５倍、２５倍、１２５倍および１６２５倍希釈し、次いで、プレートウェルに添加し、室温で１時間インキュベートした。陽性対照は、βＮＧＦ免疫処置マウスから単離した粗血清とし（ＰＢＳで１：５００希釈した）、陰性対照は、ＮＧＦ以外の抗原で免疫処置したマウスに由来するハイブリドーマ上清とした。プレートを洗浄し、次いで、５０ｎｇ／ｍｌのビオチン化ヒトまたはラットβＮＧＦ５０μｌを添加し、室温で１時間インキュベートした。プレートを洗浄した。ストレプトアビジン－ＨＲＰ（Ｔｈｅｒｍｏ、カタログ番号２１１２６）コンジュゲートを１０，０００で希釈し、プレートに添加した。プレートを、室温で３０分間インキュベートした。プレートを洗浄し、次いで、ＴＭＢ基質（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号００－２０２３）を添加した。反応を２ＮのH_2SO_4（ＶＷＲ、カタログ番号ＢＤＨ３５００－１）を使用して停止させた。４５０ｎＭの吸光度を、Ｓｐｅｃｔｒｏｍａｘ　２Ｅプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）で読み取った；これらの吸光度読み取り値を、表１および２に示す。数値は、マウス抗ＮＧＦ抗体のビオチン化ヒトまたはラットβＮＧＦとの結合を示す。このデータは、いくつかのハイブリドーマ上清が、抗ＮＧＦ抗体を含有していたことを示す。

【０２７１】

【表４】

表１：ビオチン化ヒトＮＧＦ間接結合ＥＬＩＳＡデータ

上清希釈（倍）	30F11	23F1	22E1	3C3	16B9	17G6	23H2	25E5	29E6	7H1	19C1	30A1
5	1.066	1.143	1.288	1.137	0.821	1.122	0.913	1.299	1.196	1.155	0.936	1.090
25	1.005	1.171	1.255	1.108	0.644	1.127	0.529	1.254	1.127	1.159	0.555	0.926
125	0.873	0.979	0.772	0.948	0.340	1.017	0.191	0.988	0.889	1.002	0.234	0.507
625	0.436	0.696	0.296	0.571	0.107	0.713	0.085	0.512	0.426	0.673	0.100	0.223

上清希釈（倍）	29A7	27A5	26D5	26H12	23D7	22A9	22G3	21D4	3E9	3F9	2G11	1D6
5	1.198	1.116	0.954	0.943	1.087	0.707	0.662	1.154	1.167	0.974	1.038	0.545
25	1.092	0.887	0.903	0.794	1.060	0.549	0.498	1.042	0.996	0.694	0.992	0.457
125	0.762	0.395	0.823	0.381	0.857	0.348	0.240	0.899	0.655	0.323	0.819	0.164
625	0.293	0.174	0.542	0.135	0.489	0.168	0.126	0.543	0.298	0.145	0.486	0.066

上清希釈（倍）	4B6	8E4	9E2	9H2	20B10	14G6	12H12	11D1
5	1.252	1.294	1.126	1.167	1.098	1.274	1.222	0.642
25	1.131	1.076	1.085	0.915	0.997	1.206	1.083	0.497
125	0.768	0.595	0.938	0.395	0.576	0.956	0.741	0.275
625	0.341	0.250	0.605	0.171	0.143	0.598	0.363	0.117

上清希釈（倍）	陽性対照	4E2	12D6	1D10	2D8	3F7	4F11	4H2	5D8	5G9	6B2	6F10
3	1.018	1.078	0.985	1.105	1.046	1.282	1.192	1.013	0.790	1.052	1.231	1.096
15	0.981	0.991	0.844	0.963	0.868	1.166	1.016	0.800	0.654	0.919	0.939	1.045
75	1.020	0.705	0.501	0.655	0.436	1.049	0.702	0.447	0.420	0.534	0.505	0.999

上清希釈（倍）	6H2	7C10	7G1	8G9	10A12	10B6	11A9	12A5	12F6	13E3	14A9	陰性対照
3	1.322	0.745	0.233	0.849	0.192	1.135	0.056	0.725	1.003	1.003	1.107	0.054
15	1.221	0.378	0.106	0.548	0.089	1.088	0.051	0.401	0.944	0.881	1.082	0.053
75	0.791	0.151	0.066	0.220	0.060	0.872	0.050	0.183	0.681	0.463	0.951	0.051

【０２７２】

【表５】

表２：ビオチン化ラットＮＧＦ間接結合ＥＬＩＳＡデータ

上清希釈（倍）	30F11	23F1	22E1	3C3	16B9	17G6	23H2	25E5	29E6	7H1	19C1	30A1
5	0.694	0.764	1.054	0.698	0.443	0.749	0.670	1.091	0.677	0.733	0.660	0.690
25	0.734	0.767	0.936	0.729	0.350	0.758	0.412	1.099	0.655	0.664	0.462	0.681
125	0.603	0.737	0.557	0.628	0.218	0.751	0.176	0.803	0.523	0.603	0.197	0.445
625	0.361	0.528	0.229	0.520	0.094	0.567	0.083	0.396	0.261	0.401	0.088	0.180

上清希釈（倍）	29A7	27A5	26D5	26H12	23D7	22A9	22G3	21D4	3E9	3F9	2G11	1D6
5	0.967	0.610	0.611	0.538	0.684	0.508	0.521	0.787	1.098	0.633	0.705	0.327
25	0.907	0.514	0.571	0.368	0.775	0.417	0.384	0.760	0.945	0.502	0.669	0.278
125	0.441	0.236	0.516	0.169	0.654	0.240	0.209	0.671	0.530	0.264	0.588	0.132
625	0.224	0.113	0.413	0.082	0.396	0.117	0.107	0.453	0.219	0.117	0.353	0.063

上清希釈（倍）	4B6	8E4	9E2	9H2	20B10	14G6	12H12	11D1
5	0.607	0.685	0.632	0.453	0.472	0.755	0.676	0.122
25	0.508	0.518	0.559	0.310	0.431	0.739	0.571	0.095
125	0.438	0.317	0.529	0.157	0.261	0.665	0.357	0.076
625	0.234	0.150	0.382	0.085	0.108	0.424	0.173	0.060

上清希釈（倍）	陽性対照	4E2	12D6	1D10	2D8	3F7	4F11	4H2	5D8	5G9	6B2	6F10
3	0.773	0.777	0.459	1.023	0.590	1.097	0.952	0.945	0.565	0.952	1.122	0.937
15	0.736	0.651	0.379	0.877	0.599	1.125	0.690	0.684	0.467	0.767	0.876	1.005
75	0.760	0.471	0.210	0.548	0.323	1.044	0.576	0.348	0.294	0.406	0.453	0.849

上清希釈（倍）	6H2	7C10	7G1	8G9	10A12	10B6	11A9	12A5	12F6	13E3	14A9	陰性対照
3	1.108	0.541	0.197	0.681	0.145	0.440	0.058	0.521	0.904	0.786	0.845	0.055
15	0.860	0.275	0.093	0.396	0.077	0.784	0.052	0.334	0.810	0.737	0.777	0.053
75	0.603	0.115	0.061	0.155	0.060	0.727	0.051	0.153	0.565	0.413	0.582	0.052

【０２７３】

Ｂ．ＴｒｋＡ結合ＥＬＩＳＡ

ハイブリドーマ上清において抗ＮＧＦ　ｍＡｂが、ＮＧＦがＴｒｋＡ受容体と結合するのを遮断するかどうかを調べるために、ＥＬＩＳＡプレートを、ＰＢＳ中、２μｇ／ｍｌ

のヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ、カタログ番号１０９－００５－００８）でコーティングし、４℃で一晩インキュベートした。プレートをＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎで３回洗浄した。プレートを２００μｌ／ウェルのＰＢＳ中２％乳を用い、室温で１時間ブロッキングした。プレートを上記のとおりに３回洗浄した。ＰＢＳ／０．１％　ＢＳＡ中、１μｇ／ｍｌ（５０μｌ／ウェル）のラットＴｒｋＡ／Ｆｃキメラ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号１０５６－ＴＫ）を添加し、次いで、室温で１時間インキュベートした。ビオチン化ヒトＮＧＦを力価測定し、１倍、５倍および２５倍希釈した抗ＮＧＦ抗体上清または０．０８、０．４、２もしくは１０μｇ／ｍｌに希釈した精製抗ＮＧＦ　ｍＡｂとともに、プレートシェーカー上で室温で１時間プレインキュベートした。陰性対照は、無関係のコンディショニングされた上清とした。陽性対照は、ＮＧＦで免疫処置されたマウスから得た血清とした。プレートを洗浄し、次いで、５０μｌの各ビオチン化ＮＧＦ／Ａｂ混合物を、適当なウェルに添加した。プレートを室温で１時間インキュベートした。プレートを洗浄した。５０μｌのストレプトアビジン－ＨＲＰ（Ｔｈｅｒｍｏ、カタログ番号２１１２６）を１０，０００希釈で添加した。プレートを室温で３０分間インキュベートした。プレートを洗浄した。５０μｌのＴＭＢ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号００－２０２３）を添加し、２ＮのH_2SO_4（ＶＷＲ、カタログ番号ＢＤＨ３５００－１）を使用して反応を停止させた。４５０ｎｍの吸光度を、Ｓｐｅｃｔｒｏｍａｘ　２Ｅプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）で読み取り、吸光度読み取り値を、表３に示す。数値は、ビオチン化ヒトβＮＧＦのラットＴｒｋＡ／Ｆｃキメラとの結合を示す。このデータは、いくつかのハイブリドーマ上清が抗ＮＧＦ受容体遮断抗体を含有していたことを示す。

【０２７４】

【表６】

表３：抗ＮＧＦハイブリドーマ上清のラットＴｒｋＡ阻害結合ＥＬＩＳＡデータ

上清希釈（倍）	陰性対照	陽性対照	30F1 1	23F1	22E1	3C3	16B9	17G6	23H2	25E5	29E6	7H1
1	0.465	0.050	0.158	0.108	0.357	0.146	0.142	0.091	0.379	0.304	0.291	0.217
5	0.456	0.055	0.210	0.140	0.429	0.195	0.249	0.123	0.622	0.354	0.600	0.419
25	0.462	0.102	0.331	0.276	0.558	0.345	0.409	0.210	0.418	0.505	0.881	0.758

上清希釈（倍）	19C1	30A1	29A7	27A5	26D5	26H12	23D7	22A9	22G3	21D4	3E9	3F9
1	0.285	0.148	0.427	0.444	0.063	0.344	0.131	0.322	0.150	0.133	0.328	0.186
5	0.567	0.281	0.462	0.800	0.076	0.621	0.212	0.362	0.211	0.242	0.416	0.295
25	0.686	0.464	0.502	0.680	0.101	0.665	0.393	0.453	0.337	0.404	0.682	0.498

上清希釈（倍）	Neg	Pos	2G11	1D6	4B6	8E4	9E2	9H2
1	0.372	0.052	0.138	0.226	0.169	0.273	0.103	0.380
5	0.336	0.073	0.205	0.281	0.287	0.669	0.125	0.604
25	0.318	0.228	0.328	0.343	0.424	0.693	0.151	0.521

上清希釈（倍）	20B10	14G6	12H12	11D1	19A12	2B12	PBS	PBS
1	0.166	0.113	0.060	0.101	0.100	0.065	0.295	0.315
5	0.200	0.192	0.099	0.152	0.170	0.070	0.334	0.297
25	0.289	0.334	0.190	0.264	0.295	0.095	0.306	0.289

上清希釈（倍）	-ve contrl	+ve contrl	+ve contrl	+ve contrl	13E3	14A9	4E2	12D6	1D10	2D8	3F7	4F11
1	0.386	0.112	0.145	0.104	0.400	0.121	0.283	0.145	0.248	0.359	0.056	0.286
5	0.388	0.164	0.234	0.140	0.383	0.208	0.290	0.211	0.312	0.588	0.083	0.356
25	0.386	0.308	0.488	0.216	0.497	0.376	0.334	0.364	0.447	0.497	0.149	0.541

上清希釈（倍）	4H2	5D8	5G9	6B2	6F10	6H2	7C10	8G9	10B6	12A5	12F6	PBS
1	0.396	0.363	0.344	0.096	0.206	0.400	0.230	0.409	0.329	0.306	0.172	0.436
5	0.457	0.398	0.387	0.215	0.212	0.523	0.489	0.473	0.364	0.328	0.227	0.351
25	0.606	0.504	0.473	0.451	0.242	0.738	0.487	0.413	0.399	0.406	0.324	0.338

【０２７５】

Ｃ．ＳｕｒｅＦｉｒｅ細胞Ｐｈｏｓｐｈｏ－ＥＲＫ（ｐＥＲＫ）アッセイ

ハイブリドーマ上清において抗ＮＧＦ ｍＡｂが、ＮＧＦがＴｒｋＡと結合するのを遮断した結果として下流シグナル伝達を遮断したかどうかを調べるために、Ｎｅｕｒｏｓｃｒｅｅｎ－１細胞（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を、１０％ウマ血清、５％ＦＢＳ、１００ユニット／ｍｌのペニシリン／ストレプトマイシン、２ｍＭのＬ－グルタミンおよび１０ｍＭのＨＥＰＥＳを補給したＲＰＭＩ培地中、コラーゲンＩでコーティングしたフラスコ上で、３７℃で、９５％空気および５％CO_2の加湿雰囲気中で増殖させた。ＥＲＫリン酸化アッセイのために、５×１０^{4}個細胞を、コラーゲンＩ（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）でコーティングした９６ウェルプレートの各ウェルに播種した。次いで、細胞を、２４時間血清を欠乏させ、その後刺激した。１３０ｐＭのヒトβＮＧＦ（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓカタログ番号２５６－ＧＦ／ＣＦ）を、希釈したハイブリドーマ上清中に混合し（１０倍、１００倍、５００倍または１，０００倍の最終上清希釈（倍）を達成する）、混合物を３７℃で１５分間プレインキュベートし、その後細胞に添加した。希釈したハイブリドーマ上清各々を４連で試験した。５分刺激した後、培地を除去し、ＳｕｒｅＦｉｒｅ（商標）ＡｌｐｈａＳｃｒｅｅｎ細胞溶解（Ｐｅｒｋ

ｉｎＥｌｍｅｒ）で置換した。次いで、細胞溶解物を、製造業者の使用説明書に従って処理し、ＥｎＶｉｓｉｏｎプレートリーダー（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を使用して蛍光シグナルを定量化した；蛍光データを表４に要約する。数値は、ヒトβＮＧＦの存在下でのＴｒｋＡシグナル伝達によるＥＲＫリン酸化を示し、最大シグナルに対するシグナルのパーセンテージとして表されている。最大シグナルは、βＮＧＦのみの存在下（ハイブリドーマ上清なし）でＥＲＫリン酸化を示す細胞からの１００％の応答として定義される。このデータは、いくつかのハイブリドーマ上清が、中和抗ＮＧＦ抗体を含有していたことを示す。

【０２７６】

【表７】

表４：抗ＮＧＦ　ｍＡｂハイブリドーマ上清を用いて作製されたＳｕｒｅＦｉｒｅ　ｐＥＲＫアッセイデータ

上清希釈（倍）	23F1				17G6				30F11				3C3			
100	5	2	4	2	2	0	1	1	5	2	2	0	5	2	5	3
1000	5	3	4	3	2	2	2	1	4	2	4	3	6	3	5	4
5000	8	7	8	8	13	7	15	8	30	26	28	25	24	25	22	23
10000	35	33	32	32	44	25	43	23	65	45	56	42	57	52	68	62

上清希釈（倍）	2B12				21D4				4B6				22G3			
100	0	0	-1	0	4	3	5	2	5	4	1	0	13	7	7	2
1000	0	0	0	0	5	3	5	3	1	0	2	1	3	2	4	2
5000	18	16	21	17	11	7	12	8	8	8	7	8	23	18	25	20
10000	51	43	49	41	38	23	37	23	30	34	30	35	51	45	47	43

上清希釈（倍）	2G11				14G6				16B9				19A12			
100	5	2	6	3	4	3	0	-1	3	3	3	2	2	1	2	1
1000	6	3	6	3	-1	0	0	0	65	57	70	60	3	2	3	2
5000	14	8	14	8	7	7	8	7	72	63	73	62	47	36	46	32
10000	44	30	74	48	38	36	36	36	76	62	77	62	69	55	81	65

上清希釈（倍）	30A1				26D5				23D7				23H2			
100	0	0	1	0	0	0	0	0	2	2	-1	0	47	41	44	44
1000	1	2	2	2	1	1	1	1	1	0	1	1	86	80	79	82
5000	40	41	42	40	37	30	35	30	59	48	56	54	85	80	85	83
10000	62	67	63	64	64	52	80	71	74	63	70	60	85	84	82	84

上清希釈（倍）	9E2				20B10				12H12				11D1			
100	3	3	3	4	2	1	1	1	3	3	3	2	69	75	70	78
1000	5	7	5	8	1	1	1	0	30	30	30	32	71	84	72	85
5000	37	57	36	55	20	28	19	29	62	64	60	61	76	78	80	76
10000	55	69	56	67	55	71	73	84	69	78	76	77	89	95	102	101

【０２７７】

Ｄ．ＰａｔｈＨｕｎｔｅｒアッセイ

ハイブリドーマ上清において抗ＮＧＦ　ｍＡｂが、ＮＧＦがＴｒｋＡと結合するのを遮断した結果として下流シグナル伝達を遮断するかどうかを調べるために、ＮＧＦ受容体ＴｒｋＡおよびβ－ガラクトシダーゼの相補断片と融合しているコアクチベータータンパク質　ＳＨＣ１を安定に発現するＰａｔｈＨｕｎｔｅｒ　Ｕ２ＯＳ安定細胞株をＤｉｓｃｏｖｅＲｘから購入した。細胞を１０％　ＦＢＳ、１００ユニット／ｍｌのペニシリン／ストレプトマイシン、２ｍＭのＬ－グルタミン、５００μｇ／ｍｌのジェネティシンＧ４１８および２５０μｇ／ｍｌのハイグロマイシンを補給したＭＥＭ培地中、３７℃で、９５％空気および５％　CO_2の加湿雰囲気中で増殖させた。アッセイの１６時間前に、２×10^4個細胞を、４０μｌの、０．５％ウマ血清を補給したＭＥＭ培地中、９６ウェル半容積ブラックプレートの各ウェルに播種した。４４０ｐＭのヒトβＮＧＦ（Ｒ　ａｎｄ　Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓカタログ番号２５６－ＧＦ／ＣＦ）を、希釈したハイブリドーマ上清中に混合し（１０倍、１００倍、５００倍または１，０００倍の最終上清希釈を達成する）、混合物を３７℃で１５分間プレインキュベートし、その後、細胞に添加した。細胞プレートを室温で５分間インキュベートし、その後、ウェルあたり１０μｌのＮＧＦ／抗体混合物を用いて刺激した。室温で３時間細胞誘導した後、製造業者の使用説明書に従って各ウェルに２５μｌのＰａｔｈＨｕｎｔｅｒ検出試薬を添加した。１時間後に、ＴｏｐＣｏｕｎｔプレートリーダー（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を使用して化学発光シグナルを検出した；化学発光シグナルデータは、表５に示されている。数値は、ヒトβＮＧＦの存在下でのＴｒｋＡシグナル伝達によるβ－ガラクトシダーゼ生成を示し、最大シグナルに対するシグナルのパーセンテージとして表されている。最大シグナルは、βＮＧＦのみの存在下（ハイブリドーマ上清なし）でのβ－ガラクトシダーゼ生成の存在下で示す細胞からの１００％の応答として定義される。このデータは、いくつかのハイブリドーマ上清が、中和抗ＮＧＦ抗体を含有していたことを示す。

【０２７８】

【表８】

表５：ハイブリドーマ上清を用いて作製されたＰａｔｈＨｕｎｔｅｒデータ

上清希釈（倍）	30F11		23F1		3C3		16B9		17G6		19A12	
100	21	22	5	5	16	29	19	24	10	14	25	28
1000	42	37	23	13	40	46	117	114	23	24	21	30
5000	97	99	69	70	71	81	120	127	100	115	93	92
10000	94	93	92	91	78	84	114	129	115	120	89	98

上清希釈（倍）	2B12		30A1		26D5		23D7		23H2		22G3	
100	89	90	21	24	83	84	31	28	142	176	16	16
1000	64	70	50	57	49	51	54	53	88	134	20	23
5000	128	127	126	139	92	96	112	131	117	120	89	99
10000	128	133	133	129	95	84	124	148	111	136	86	101

上清希釈（倍）	21D4		2G11		4B6		9E2		20B10	
100	9	10	22	22	24	31	102	104	6	5
1000	16	17	29	27	46	49	77	91	0	4
5000	107	100	66	72	88	94	137	152	25	31
10000	108	112	66	72	102	109	137	143	52	58

上清希釈（倍）	14G6		12H12		11D1		26H12		無関係のハイブリドーマ	
100	18	17	26	23	117	101	106	119	156	185
1000	27	27	46	56	127	118	124	115	136	144
5000	105	83	145	137	109	99	137	166	126	132
10000	113	109	122	145	91	98	151	167	138	137

【０２７９】

［実施例３］：ハイブリドーマサブクローニング

ハイブリドーマ細胞株を、標準限界希釈技術を使用してサブクローニングした。細胞を、５０、５または０．５個細胞／ｍＬの濃度に希釈した。２００μＬの希釈された細胞懸濁液を、９６ウェル組織培養プレートにプレーティングした。プレートを、５％ CO_2 および約９０％の相対湿度を用いて３７℃でインキュベートした。７日目に肉眼で見えるコロニーについて増殖を視覚的に調べた。コロニー増殖が目に見える場合には、ウェルから得た上清を抗体製造についてスクリーニングした。表６は、サブクローン同定命名法および俗称を示す。このデータは、いくつかの抗ＮＧＦ抗体が、細胞のクローン集団から単離され得ることを示す。

【０２８０】

【表９】

表６：ハイブリドーマサブクローン同定および俗称

ハイブリドーマ上清名称	サブクローニングされたハイブリドーマ名称	俗称	ロット番号
14G6	ML129-14G6.3H3	PR-1254970	1734671
2G11	ML129-2G11.3B1	PR-1254971	1734673
20B10	ML129-20B10.3F4	PR-1254972	1734675
2B12	ML129-2B12.5G9	PR-1254973	1734676
17G6	ML129-17G6.3E7	PR-1254974	1734677
21D4	ML129-21D4.4A11	PR-1254977	1734678
4B6	ML129-4B6.4H3	PR-1254978	1734679
22G3	ML129-22G3.3F3	PR-1254979	1734680
23F1	ML129-23F1.4G3	PR-1254980	1734681
14A9	ML130-14A9.5B12	PR-1254981	1734682
3F7	ML130-3F7.4A8	PR-1254982	1734683

【０２８１】

［実施例４］：モノクローナル抗体のスケールアップおよび精製

サブクローニングされたハイブリドーマ細胞株を、５％低ＩｇＧウシ胎仔血清（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎカタログ番号１６２５０－０７８）を用いてハイブリドーマＳＦＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎカタログ番号１２０４５）に拡大した。上清を回収し、遠心分離し、濾過して細胞細片を除去し、濃縮した。抗体を、Ｐｉｅｒｃｅ結合バッファーＡ（Ｔｈｅｒｍｏ、カタログ番号２１００１）と１の比で混合した。抗体を組換えプロテインＡセファロース（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、カタログ番号１７－１２７９－０４）クロマトグラフィーカラムにロードし、Ｐｉｅｒｃｅ溶出バッファー（Ｔｈｅｒｍｏ、カタログ番号２１００４）を使用して溶出し、２ＭのＴｒｉｓ　ｐＨ７．５を使用して中和し、次いで、ＰＢＳに透析した。この作業によって、特性決定研究のための抗ＮＧＦ　ｍＡｂの単離が可能になった。

【０２８２】

［実施例５］：イヌＮＧＦのクローニング

イヌＮＧＦのコーディング領域を、配列番号４５および配列番号４６のプライマーまたは配列番号４７および配列番号４８のプライマーを使用してイヌユニバーサルｃＤＮＡ（Ｂｉｏｃｈａｉｎ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ、カタログ番号４７３４５６５）から増幅し、哺乳動物または細菌発現ベクターに、それぞれクローニングした。ＰＣＲ反応は、製造業者（Ｎｏｖａｇｅｎ、ＫＯＤ　Ｈｏｔ　Ｓｔａｒｔ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ、カタログ番号７１８４２－３）によって推奨されるように設定した。ＰＣＲ産物を、ＫｐｎＩ／ＸｂａＩ制限部位でｐＴＴ６ベクター（Ａｂｂｏｔｔ）とライゲーションすることによって、哺乳動物クローンをＣ末端６－Ｈｉｓ融合タンパク質として作製した。鋳型として哺乳動物クローンを使用し、ＮｄｅＩ／ＸｈｏＩ制限部位でｐＥＴ１５Ｂ（Ｎｏｖａｇｅｎ）とライゲーションすることによって、プロ－ＮＧＦ配列を有する細菌クローンを作製した。単離されたイヌＮＧＦのＤＮＡ配列およびアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号４９および配列番号５０として列挙されている。この作業によって、精製のためのイヌＮＧＦタンパク質の発現が可能になった。

【０２８３】

［実施例６］：イヌＮＧＦの発現

細菌発現ベクター中のイヌＮＧＦクローンを、２Ｌのバッフルなしフラスコにおいて、

Ｒｏｓｅｔｔａ２（ＤＥ３）大腸菌宿主（ＥＭＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）中、ｏｖｅｒｎｉｇｈｔ　ｅｘｐｒｅｓｓ　ａｕｔｏ　ｉｎｄｕｃｉｎｇ　Ｔｅｒｒｉｆｉｃ　Ｂｒｏｔｈ（Ｎｏｖａｇｅｎ）中で３７℃で一晩増殖させた。細胞を遠沈させ、細胞ペーストを、１００ｍＬのリソナーゼ（ｌｙｓｏｎａｓｅ）を含む溶解バッファー（２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、１０％グリセロール、０．１％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ　１００　ｐＨ８．０）に再懸濁し、氷上で２分間超音波処理した。サンプルを１５０００ＲＰＭで遠心分離し、５０ｍＬの２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ、６Ｍ　ＧｄＨＣｌ　ｐＨ８．０中でペレットを可溶化した。サンプルを１５０００ｒｐｍで３０分間遠心分離し、上清を１０ｍｌのＩＭＡＣ樹脂上にロードした。

【０２８４】

Ａ．ＩＭＡＣクロマトグラフィー

１０ｍｌのＧＥ－Ｎｉ　ＦＦカラムを調製した。バッファーＡ：２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ、６Ｍ　ＧｄＨＣｌ　ｐＨ８．０、バッファーＢ：Ａ＋５００ｍＭイミダゾール。樹脂を平衡化し、再循環を用いてロードし、一晩、４℃で完全結合を可能にした（約１０回の通過）。カラムをバッファーＡで洗浄した。４０ｍｌのバッファーＡと、それに続く、３０ｍｌのバッファーＡを用いてバッチ溶出を実施した。５ｍｌの画分を集め、プールした。

【０２８５】

Ｂ．急速希釈による再折りたたみ

プールした画分を、５０ｍＭ　ＤＴＴを添加することによって還元し、ＥＤＴＡを１０ｍＭまで添加し、室温で１時間インキュベートした。６Ｍ　ＨＣｌをｐＨ４．０まで添加することによってサンプルを酸性化し、６Ｍ　ＧｄＨＣｌ　ｐＨ５．０中で透析して過剰のＤＴＴを除去した。還元／酸性化されたサンプルを、１Ｌの１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ、１Ｍ　アルギニン、５ｍＭ　ＥＤＴＡ、５ｍＭ　ＧＳＨ、１ｍＭ　ＧＳＳＧ　ｐＨ９．５中、４℃で４時間希釈することによって再折りたたみを実施した。再折りたたみされたタンパク質を、２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ、２００ｍＭ　ＮａＣｌ、１０％グリセロールｐＨ８．０に対して透析した。濾過によって沈殿を清澄化した。清澄化されたサンプルを濃縮し、１０Ｋメンブレンを使用して２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ、２００ｍＭ　ＮａＣｌ、１０％グリセロールｐＨ８．０中にダイアフィルトレーションを行った。

【０２８６】

Ｃ．Ｎｉ－ＩＭＡＣ

再折りたたみされたプロ－ＮＧＦを、５ｍｌのＮｉ－ＩＭＡＣ上にロードした。バッファーＡ：２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、１０％グリセロールｐＨ８．０。バッファーＢ：Ａ＋５００　ｍＭイミダゾール。カラムをバッファーＡで洗浄した。８ｍｌの画分を集めた。直線勾配０－１００％バッファーＢを用いて溶出を実施した。５ｍｌの画分を集めた。各画分のサンプルを、非還元性ＮｕＰａｇｅ　ＳＬＢ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と混合し、分析のために４－１２％　ＮｕＰＡＧＥ　Ｎｏｖｅｘ　Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ　Ｍｉｄｉゲル上で分離した。タンパク質を含有する画分をプールし、２０ｍＭ　リン酸Ｎａ、５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１０％グリセロールｐＨ７．４に対して透析した。

【０２８７】

Ｄ．トリプシン消化

プロ－βＮＧＦを、再懸濁バッファー中のトリプシンと混合し、氷上で３０分間インキュベートした。固定された阻害剤を添加し、１５分間インキュベートし、次いで、濾過した。

【０２８８】

Ｅ．セファロース陽イオン交換クロマトグラフィー

サンプルを、５ｍｌのＳＰセファロース高性能クロマトグラフィーカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）上にロードした。バッファーＡ：２０ｍＭ　リン酸Ｎａ、５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１０％グリセロールｐＨ７．４。バッファーＢ：Ａ＋１Ｍ　ＮａＣｌ。カラムを、バッファーＡで洗浄した。溶出は、直線勾配０－１００％バッファーＢを用いて実施した。５ｍｌの画分を集めた。画分を、分析のために４－１２％　Ｃｒｉｔｅｒｉｏｎ

ＸＴ　Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ　Ｍｉｄｉゲル上で分離した。タンパク質を含有する画分をプールし、ＰＢＳ　ｐＨ７．４中で透析し、濃縮した。

【０２８９】

この作業の結果、特性決定研究のためおよび抗ＮＧＦイヌ抗体の研究のための数ミリグラムの精製イヌＮＧＦが製造された。

【０２９０】

［実施例７］：サブクローニングされた、精製ハイブリドーマ抗体の特性決定

Ａ．イヌＮＧＦ直接結合ＥＬＩＳＡ

精製マウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂが、イヌβＮＧＦと結合するかどうかを調べるために、ＥＬＩＳＡプレートを、５０μｌ／ウェルのイヌＮＧＦ（Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を、ＰＢＳ中、１μｇ／ｍｌで用いてコーティングし、４℃で一晩インキュベートした。プレートを、ＰＢＳ＋Ｔｗｅｅｎバッファーを用いて３回洗浄した。プレートを、２００μｌ／ウェルのＰＢＳ中の２％乳を用いて室温で１時間ブロッキングした。プレートを上記のとおりに３回洗浄した。精製抗体を０．４、２または１０μｇ／ｍｌに希釈した。各濃度の精製抗体５０μｌを、プレートに添加した。プレートを室温で１時間インキュベートした。プレートを洗浄した。５０００倍希釈したヤギ抗マウスＩｇＧ　Ｆｃ－ＨＲＰ（Ｔｈｅｒｍｏ、カタログ番号　３１４３９）５０μｌを添加した。プレートを室温で１時間インキュベートした。５０μｌのＴＭＢ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号００－２０２３）を添加し、２ＮのH_2SO_4（ＶＷＲ、カタログ番号ＢＤＨ３５００－１）を使用して反応を停止させた。４５０ｎｍの吸光度を、Ｓｐｅｃｔｒｏｍａｘ　２Ｅプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）で読み取った。結果を表７に示しており、数値は、マウス抗ＮＧＦ抗体のイヌβＮＧＦとの結合を示す。

【０２９１】

【表１０】

表７：精製抗ＮＧＦ　ｍＡｂを使用するイヌＮＧＦ直接結合ＥＬＩＳＡデータ

μg/ml Mab	PR-125497 0	PR-125497 1	PR-125497 2	PR-125497 3	PR-125497 4	PR-125497 7	PR-125497 8	PR-125497 9	PR-125498 0	PR-125498 1	PR-125498 2
10	0.530	0.497	0.154	0.905	0.552	0.552	0.579	0.683	0.491	0.610	0.208
2	0.342	0.324	0.091	0.836	0.383	0.414	0.458	0.566	0.334	0.458	0.142
0.4	0.176	0.165	0.071	0.769	0.209	0.223	0.253	0.313	0.168	0.229	0.095

【０２９２】

Ｂ．ＴＦ－１細胞増殖効力アッセイ

ＴＦ－１は、ヒトＴｒｋＡを発現し、組換えβＮＧＦに応じて増殖するヒト赤血白血病細胞株である。精製抗ＮＧＦ　ｍＡｂが、ＮＧＦ誘導性増殖を遮断するかどうかを調べるために、ＴＦ－１細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＲＬ－２００３）を、組換えヒトＧＭ－ＣＳＦを２ｎｇ／ｍＬ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号２１５－ＧＭ）およびウシ胎仔血清（ＦＢＳ、Ｈｙｃｌｏｎｅ、カタログ番号ＳＨ　３００７０．０３）を含有するＲＰＭＩ（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号１１８７５－０９３）培地中、３７℃および５％　CO_2で維持した。ＧＭ－ＣＳＦおよびＦＢＳは、アッセイの２４時間前に除去した。アッセイの１日目に、各抗ＮＧＦ　ｍＡｂを力価測定し（３３．３ｎＭから１．７ｆＭの範囲の濃度）、ＲＰＭＩ＋４％　ＦＢＳ中の、固定濃度の組換えイヌＮＧＦ（７０ｐＭ）および、ＴＦ－１細胞（２．５×10^4個細胞／ウェル）に７２時間添加した。細胞増殖は、Ｃｅｌｌ　Ｔｉｔｅｒ－ｇｌｏ（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号Ｇ７５７１）を使用して測定した。イヌＮＧＦ誘導性ＴＦ－１細胞増殖に対する各抗ＮＧＦ　ｍＡｂのIC_{50}値を表８に示しており、データは、７０ｐＭのイヌＮＧＦの存在下では、ほとんどの抗ＮＧＦ抗体が、ｎＭ未満の効力を示し、一部が５０ｐＭ未満の効力を示すことを示す。

【０２９３】

【表１１】

表８：イヌＮＧＦ誘導性ＴＦ－１細胞増殖に対するマウス抗ＮＧＦ抗体の効力

俗称	ロット	IC50 (nM)
PR-1254970	1734671	0.662
PR-1254971	1734673	1.088
PR-1254972	1734675	0.303
PR-1254973	1734676	0.039
PR-1254974	1734677	0.230
PR-1254977	1734678	0.217
PR-1254978	1734679	0.978
PR-1254979	1734680	0.288
PR-1254980	1734681	0.343
PR-1254981	1734682	0.046
PR-1254982	1734683	0.025

【０２９４】

Ｃ．ＳｕｒｅＦｉｒｅ細胞ｐＥＲＫおよびＰａｔｈＨｕｎｔｅｒアッセイ

精製マウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂが、イヌＮＧＦ誘発性細胞応答を遮断するかどうかを調べるために、実施例２のＣ、およびＤ節に記載されるように、ＳｕｒｅＦｉｒｅ細胞ｐＥＲＫ（各試験ウェルにおいて１２８ｐＭのイヌβＮＧＦを使用する）およびＰａｔｈＨｕｎｔｅｒアッセイ（各試験ウェルにおいて４４１ｐＭのイヌＮＧＦを使用する）において力価測定することによって精製抗体を特性決定した。イヌβＮＧＦ誘導性細胞応答に対する各抗ＮＧＦ　ｍＡｂのＩＣ$_{50}$が、表９に要約され、データは、１２８ｐＭのイヌＮＧＦの存在下で、すべての抗ＮＧＦ抗体がｎＭ未満の効力を示し、一部が５０ｐＭ未満の効力を示すことを示す（ｐＥＲＫアッセイ）。また、４４１ｐＭのイヌＮＧＦの存在下で、すべての抗ＮＧＦ抗体は、ｎＭ未満の効力を示し、一部は１５０ｐＭ未満の効力を示す（ＰａｔｈＨｕｎｔｅｒアッセイ）。

【０２９５】

【表１２】

表９：精製抗ＮＧＦ　ｍＡｂのｐＥＲＫおよびＰａｔｈ　Ｈｕｎｔｅｒアッセイデータの概要

抗体	SureFire pERK IC_{50} (nM)	PathHunter IC_{50} (nM)
PR-1254970	0.02711	0.3346
PR-1254971	0.04750	0.4986
PR-1254972	0.2282	0.3133
PR-1254973	0.01876	0.1428
PR-1254974	0.01561	0.2464
PR-1254977	0.01759	0.1810
PR-1254978	0.02466	0.3559
PR-1254979	0.01627	0.2414
PR-1254980	0.01371	0.3812
PR-1254981	0.02135	0.2794
PR-1254982	0.005804	0.1505

【０２９６】

［実施例８］：ハイブリドーマサブクローニング後の精製抗ＮＧＦ抗体の特性決定

Ａ．抗ＮＧＦ抗体に対する質量分光光度法（ＭＳ）およびサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）分析

１Ｍ　ＤＴＴを使用してマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂを還元し、６２２４ＴＯＦ質量分析計およびＶｙｄａｃ　Ｃ４、ＩＭＭｘ１５０ｍｍカラム（カタログ番号２１４ＴＰ５１１５、ｔｈｅ　Ｎｅｓｔ　Ｇｒｏｕｐ）を５０μｌ／分の流速で使用する１２００　ＨＰＬＣ（Ａｇｉｌｅｎｌ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）でＨＰＬＣ／ＭＳを使用して分析した。バッファーＡ：９９．９％　ＨＰＬＣ水＋０．１％　ＦＡ＋０．０１％　ＴＦＡおよびバッファーＢ：９９．９％　ＡＣＮ＋０．１％　ＦＡ＋０．０１％　ＴＦＡ。ＬＣ平衡およびサンプル脱塩は、５％バッファーＢを使用して７分間実施した。分離勾配は、３０％から５０％のバッファーＢを使用して１０分間実施し、洗浄ステップは、９５％バッファーＢで１０分間実施した。ＴＯＦ獲得パラメータは、３５０Ｃのガス温度および７５０ＶのＯＣＴ／ＲＦとした。質量範囲は、６００－３２００ｍ／ｚとし、特定化された速度は、１．０３スペクトル／ｓとした。定性分析ソフトウェア（Ａｇｉｌｅｎｔ）を使用して、抗体分子量をデコンボリューションした。

【０２９７】

抗体は、Ｓｈｉｍａｄｚｕ　ＬＣ－１０ＡＶＰシステム（Ｓｈｉｍａｄｚｕ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で分析した。使用したＳＥＣカラムは、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ－２００　１０／３００Ｌ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）であった。流速は、０．７５ｍｌ／分とし、ＵＶ２８０を使用して、ピークをモニタリングした。使用したバッファーは、Na_2SO_4＋９２ｍＭ　$NaPO_4$＋５ｍＭ　NaZ_3、ｐＨ７．０であった。試薬抗体は、１０μＬ（１０μｇ）で注入した。ＳＥＣでのゲルタンパク質マーカーは、Ｂｉｏ－Ｒａｄ製のもの（カタログ番号１５１－１９０１）であった。ＭＳおよびＳＥＣ結果を、表１０に要約する。このデータは、ハイブリドーマ由来抗体が、精製後に高度にモノマーであることを決定した。さらに、ハイブリドーマ由来抗体を含む重鎖および軽鎖の分子量を決定した。

【０２９８】

Ｂ．抗体アイソタイプ決定

抗ＮＧＦ　ｍＡｂのアイソタイプを、Ｚｙｍｅｄ　Ｍｏｕｓｅ　ＭｏｎｏＡｂ－ＩＤキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎカタログ番号９０－６５５０ロット番号１４０７５８９）を使用して決定した。アイソタイプ決定の結果を、表１０に要約する。このデータは、マウスＩｇＧ１／ｋ、ＩｇＧ２ａ／ｋおよびＩｇＧ２ｂ／ｋマウス抗体が、ＮＧＦと結合し、中和できることを示す。

【０２９９】

【表１３】
表１０：抗ＮＧＦ抗体のアイソタイプ決定、サイズ排除クロマトグラフィーおよび質量分析

ハイブリドーマ名称	俗称	ロット	アイソタイプ	モノマー%	分子量(Dal) 軽鎖	分子量(Dal) 重鎖
ML129-14G6.3H3	PR-1254970	1734671	IgG1 κ	96.9	24221.43	49479.67
ML129-2G11.3B1	PR-1254971	1734673	IgG1 κ	96.8	24156.26	49491.69
ML129-20B10.3F4	PR-1254972	1734675	IgG2b κ	99.0	24159.34	50329.24
ML129-2B12.5G9	PR-1254973	1734676	IgG2b κ	99.4	23539.38	51102.21
ML129-17G6.3E7	PR-1254974	1734677	IgG1 κ	98.8	24221.43	49479.45
ML129-21D4.4A11	PR-1254977	1734678	IgG1 κ	98.4	24221.46	49479.70
ML129-4B6.4H3	PR-1254978	1734679	IgG1 κ	96.7	24170.40	49533.92
ML129-22G3.3F3	PR-1254979	1734680	IgG2a κ	99.0	24221.42	50123.17
ML129-23F1.4G3	PR-1254980	1734681	IgG1 κ	99.5	24221.42	49493.95
ML130-14A9.5B12	PR-1254981	1734682	IgG1 κ	99.1	24180.28	50241.85
ML130-3F7.4A8	PR-1254982	1734683	IgG1 κ	99.4	23708.54	50289.13

【０３００】
［実施例９］：抗ＮＧＦ抗体の結合速度論
生体分子タンパク質相互作用分析を使用して、精製抗ＮＧＦハイブリドーマ抗体および組換えイヌβＮＧＦ間の相互作用の結合速度論を評価した。抗体は、アミンカップリング手順を製造業者の使用説明書（Ｂｉａｃｏｒｅ）に従って使用してＣＭ５チップに直接的に固定された、ヤギ抗マウスＩｇＧ　ＦＣ（１００００ＲＵ）表面を使用して捕捉した。１μｇ／ｍｌの濃度の抗体５μｌというサンプルの大きさが、１０μｌ／分で捕捉された。抗原として組換えイヌＮＧＦを使用した。マウス抗体に対して、イヌＮＧＦを７５μｌ／分で注入した（濃度範囲：５－０．０３９ｎＭ）。会合速度を３．３分間モニタリングし、解離速度を１０分間モニタリングした。イヌＮＧＦのアリコートはまた、参照反応ＣＭ表面中に同時に注入して、任意の非特異的結合バックグラウンドを記録した。結合速度の機器感度は、1×10^{7}とし、その結果、1×10^{7}より速い任意の結合速度は正確に測定されない可能性があり、解離速度の機器感度は、1×10^{-6}とし、その結果、1×10^{-6}より遅い解離速度は正確に測定されない可能性がある。したがって、1×10^{7}より速い結合速度は、$>1\times10^{7}$として記録され、1×10^{-6}より遅い解離速度は、$<1\times10^{-6}$として記録されている。生体分子タンパク質相互作用分析結果を、表１１に要約する。このデータは、単離マウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂが、速い結合速度（7×10^{6}超から）および遅い解離速度（1×10^{-3}未満から）を有することを示す。マウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂのＫＤ全体は、約３００ｐＭから０．１ｐＭの範囲であり、これは、精製抗ＮＧＦハイブリドーマ抗体の組換えイヌβＮＧＦとの効率的な結合を示す。
【０３０１】

【表１４】

表１１：抗ＮＧＦ　ｍＡｂのイヌＮＧＦとの結合速度論

抗体		結合速度 (1/Ms)	解離速度 (1/s)	全体親和性 (M)
PR-1254972 ロット: 1734675	実験 1	$>1x10^{7}$	$3.14x10^{-3}$	$<3.14x10^{-10}$
	実験 2	$>1x10^{7}$	$3.21x10^{-3}$	$<3.21x10^{-10}$
	平均	$>1x10^{7}$	$3.18x10^{-3}$	$<3.18x10^{-10}$
PR-1254973 ロット: 1734676	実験 1	$>1x10^{7}$	$1.21x10^{-4}$	$<1.21x10^{-11}$
	実験 2	$>1x10^{7}$	$1.38x10^{-4}$	$<1.38x10^{-11}$
	平均	$>1x10^{7}$	$1.30x10^{-4}$	$<1.30x10^{-11}$
PR-1254977 ロット: 1734678	実験 1	$>1x10^{7}$	$1.39x10^{-4}$	$<1.39x10^{-11}$
	実験 2	$>1x10^{7}$	$1.60x10^{-4}$	$<1.6x10^{-11}$
	平均	$>1x10^{7}$	$1.50 x10^{-4}$	$<1.5x10^{-11}$
PR-1254980 ロット: 1734681	実験 1	$>1x10^{7}$	$2.37 x10^{-4}$	$<2.37x10^{-11}$
	実験 2	$>1x10^{7}$	$2.25x10^{-4}$	$<2.25x10^{-11}$
	平均	$>1x10^{7}$	$2.31x10^{-4}$	$<2.31x10^{-11}$
PR-1254981 ロット: 1734682	実験 1	$8.67x10^{6}$	$1.27x10^{-4}$	$1.47x10^{-11}$
	実験 2	$7.48x10^{6}$	$1.40x10^{-4}$	$1.87x10^{-11}$
	平均	$8.08x10^{6}$	$1.34x10^{-4}$	$1.67x10^{-11}$
PR-1254982 ロット: 1734683	実験 1	$>1x10^{7}$	$<1x10^{-6}$	$<1x10^{-13}$
	実験 2	$>1x10^{7}$	$<1x10^{-6}$	$<1x10^{-13}$
	平均	$>1x10^{7}$	$<1ex10^{-6}$	$<1x10^{-13}$

【０３０２】

［実施例１０］：クローニングおよび配列決定によってハイブリドーマから抗ＮＧＦ抗体配列を同定する方法

表１１に示された６種のサブクローニングされたハイブリドーマｍＡｂのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を同定するために、Ｑｉａｇｅｎ　ＲＮｅａｓｙキット（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ番号７４１０４）を用いて個々のハイブリドーマ培養物からＲＮＡを抽出した。ＲＮＡを逆転写し、Ｑｉａｇｅｎ　Ｏｎｅ－Ｓｔｅｐ　ＲＴ－ＰＣＲキット（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ番号２１０２１２）を使用してｃＤＮＡ抗体配列を増幅した。フォワードプライマーを縮重させ、可変領域とアニールするよう設計した（重鎖プライマー：１ＨＡ、１ＨＢ、１ＨＣ、１ＨＤ、１ＨＥ、１ＨＦ；および軽鎖プライマー：１ＬＡ、１ＬＢ、１ＬＣ、１ＬＤ、１ＬＥ、１ＬＦ、１ＬＧ）（ＥＭＤ４　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓカタログ番号６９８９６）。リバースプライマーもまた、縮重させ、γ（重鎖）およびκ（軽鎖）定常領域に対して作製した。およそ４００－４５０塩基対のＰＣＲ産物を、ゲル単離し、Ｑｉａｇｅｎ　Ｇｅｌ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎキット（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ番号２８７０６）を用いて精製した。

【０３０３】

精製されたＰＣＲ産物を、ＴＯＰＯ　ＴＡクローニングベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号Ｋ４５００－０１ＳＣ）にクローニングした。各トポイソメラーゼ反応混合物を使用して、ＴＯＰ　１０化学的にコンピテントな細菌を形質転換し、７５μｇ／ｍｌアンピシリンおよび６０μｌの２％　Ｂｌｕｏ－Ｇａｌ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号１５５１９－０２８）を有するＬＢプレートにプレーティングした。単離されたコロニーをＬＢプレートから選び取り、２０μｌのＬＢブロス／１００μｇ／カルベニシリン１ｍｌに播種した。このミニ培養物１μｌを、Ｍ１３フォワードおよびリバースプライマーとともにＰＣＲ反応において使用して、ＴＯＰＯベクター中のインサートを増幅

した。ＰＣＲ産物を２％アガロースゲル上で分離し、ベクター中のおおよその大きさのインサートを示すサンプルを、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ モデル３７３０ＳＤＮＡシークエンサーを使用して配列決定した。すべてのマウスｍＡｂ重鎖および軽鎖可変ドメインの同定から得られたＤＮＡ配列を、タンパク質配列に翻訳し、図１から図２４に示す。

【０３０４】

［実施例１１］：マウス抗ＮＧＦ抗体の相同性モデリング

各抗ＮＧＦ抗体の重鎖および軽鎖可変領域の配列を、ＩｎｓｉｇｈｔＩＩ（Ａｃｃｅｌｒｙｓ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）中に移入した。各配列をＢＬＡＳＴの鋳型として使用し、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄａｔａ Ｂａｎｋ（ｗｗｗ．ｒｃｓｂ．ｏｒｇ）から、同一性において最も近いＸ線結晶構造を見い出した。同一性パーセントおよびすべてのＣＤＲループの正確な長さを対応させることの両方に基づいて、重鎖および軽鎖各々について１つの構造を選択した。各鋳型および各クエリー配列の配列をアラインし、標準相同性モデリング技術を使用して、各鎖の相同性モデルを構築した。次いで、ＤＩＳＣＯＶＥＲプログラム（Ａｃｃｅｌｒｙｓ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）において、５０サイクルのＣＶＦＦ力場を使用する拘束された（すべての重原子について５００Ｋｃａｌ／オングストローム）共役勾配最小化の間、モデル化された両鎖の複合体を最小化した。

【０３０５】

所与のフレームワーク残基が、抗体の結合特性に影響を及ぼす可能性は、ＣＤＲ残基とのその近接性に応じて変わる。したがって、モデル構造を使用して、任意のＣＤＲ原子の５Å以内に入る残基を、最も重要として同定し、イヌ化抗体配列中にマウス残基を保持する候補であると推奨した。元の配列を回復する突然変異遺伝子におけるヌクレオチドの変化、したがって、元の表現型は、復帰突然変異と呼ばれることが多い。したがって、本発明者らは、イヌ化抗体配列中にマウス残基を保持する候補である残基を、復帰突然変異と呼ぶ。

【０３０６】

［実施例１２］：イヌＰＢＭＣに由来するイヌ重鎖および軽鎖抗体配列の同定

イヌＩｇ重鎖およびλ軽鎖抗体可変ドメインアミノ酸配列を同定するために、ＲＮＥａｓｙキット（Ｑｉａｇｅｎ番号７４１０４）を使用して、雑種イヌ末梢血単核球（ＰＢＭＣ）からＲＮＡを単離した。イヌＰＢＭＣ ｍＲＮＡをスーパースクリプトＩＩＩ逆転写酵素（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎカタログ番号１８０８０－０９３）を用いて逆転写（ＲＴ）し、５’ＲＡＣＥシステム（Ｒａｐｉｄ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｃＤＮＡ Ｅｎｄｓ）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ番号１８３７４－０５８）を使用してｃＤＮＡを増幅した。ＲＴおよびＰＣＲプライマー（ＲＫ３２３、ＲＫ３２４、ＲＫ１２２、ＬＧ０１０、ＬＧ０１１、ＬＧ０１２）は、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｕｓｉｎｇ Ｃａｎｉｎｅ Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｌｉｎ Ｖａｒｉａｂｌｅ Ｄｏｍａｉｎｓ ａｎｄ Ｃａｎｉｎｉｚｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓと題された特許公開番号ＵＳ７，２６１，８９０Ｂ２に記載されている。イヌＩｇＧ逆転写と、それに続くＲＫ３２６およびＡｂｒｉｄｇｅｄアンカープライマー（ＡＡＰ）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いるネステッドＰＣＲのために、プライマーＲＫ３２３およびＲＫ３２４を使用した。イヌλ軽鎖ＲＴ ＰＣＲと、それに続くＬＧ０１０およびＬＧ０１２およびＡＡＰを用いるネステッドＰＣＲのために、ＬＧ０１１を使用した。

【０３０７】

得られたＰＣＲ産物をアガロースゲル電気泳動によって分離した。６００塩基対（イヌλおよびκ軽鎖）および８００塩基対（イヌＩｇ重鎖）ＰＣＲ産物を、ゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ番号２８７０６）を使用してアガロースから精製し、ＴＯＰＯ－ＴＡクローニングシステム（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ番号Ｋ４５００－０１ＳＣ）を使用してｐＣＲ２．１ ＴＯＰＯベクターのＴＡ部位中にクローニングした。形質転換されたＴＯＰ １０細菌を選択し、Ｑｉａｐｒｅｐ Ｓｐｉｎ Ｍｉｎｉ－Ｐｒｅｐキット（Ｑｉａｇｅｎ番号２７１０４）を使用してプラスミドＤＮＡを単離した。２５個の重鎖、３８個のκ軽鎖

および２３個のλ軽鎖コロニーから得たプラスミドＤＮＡを配列決定して、ヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列を同定した。２５個の重鎖、３８個のκ軽鎖および１９個のλ軽鎖クローンから完全可変ドメイン配列データを得た。リーダーペプチドを含む可変ドメイン配列データ（同定されている場合）が、表１２、１３および１４に示されている。すべての導かれた重鎖および軽鎖配列は、特許公開番号：ＵＳ７，２６１，８９０　Ｂ２に開示されたものと比較して独特である。

【０３０８】

【表１５】

表１２：イヌＰＢＭＣ　ＲＮＡから導かれたイヌ重鎖可変ドメイン配列

名称	配列
Ca-1005	EVQLEESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFSIGSYGMSWVRQSPGKGLQWVAWIK YDGSRTFYADAVKGRFTISRDNAKNTLFLQMNSLRAEDTAVYFCVKGPNSSW LPSTYFASWGQGTLVTVSS (配列番号 :178)
Ca-2301	EMQLVESGGDLVRPGGSLRLSCVASGFTFSTYGMTWVRQSPGKGLQWVATIG PGGRNTYYADAVKGRFTISRDDAENTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAQAFDATY YTSFDCWGRGSLVAVSS (配列番号 : 86)
Ca-2302	MESVLSWVFLVALLQGIQGEIRLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFIFGNYDM SWVRQAPGKGLQWVAAVRYDGSSTYYSDAVKGRITISRDDPGNTVYLQLDSL RAEDTATYYCVRGGYYSSSFYIGGAFGHWGPGTLITVSS (配列番号 : 87)
Ca-2303	MECVLGWVFLVAILRGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSDYY MSWIRQAPGKGLQWVADISDGGDGTGYAGAVKGRFTVSRENVKNTLYLQMN DLRAEDTAIYYCTKAREMYGYRDFDSWGPGTLVTVSS (配列番号 : 88)
Ca-2304	MESVLGLVALLTILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNYYM TWVRQAPGKGLEWVGYIHNGGTYTYYADAVKGRFTISRDDAKNTLYLEMNS LRAEDTAVYYCGKMIFDYWGQGTLVTVSS (配列番号 : 89)
Ca-2305	MESALSWVFLVTILKGVQGEVLLVESGGDLVKPGGSLRLSCLTSGFTFNTYDW GWVRQAPGKGLQWIAYIKKGGSDVRYADAVKGRFTISRDDAKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARSAWDSFDYWGQGTLVTVSS (配列番号 : 90)
Ca-2306	MESVFCWVFLVAILKGVRGVQGEVQLVESGGDLVKPAGSLRLSCVASGFTFT DYSMNWVRQAPGKGLQWVATISNDGTSTDYTDAVKGRFTVSRDSARNTVYL QMTSLRADDTATYYCVSRHSYSLLADYWGQGTLVTVSS (配列番号 : 91)
Ca-2307	MQMPWSLLCLLAAPLGVLSEVTLQESGPGLVKPSQTLSLTCAVSGGSVIRNYY WHWIRQRPGRGLEWMGCWSETTYYSPAFRGRISITIDAATDQFSLHLNSMTTD DTAVYYCARALYPTSSWYDGMDYWGHGASVVVSS (配列番号 : 92)
Ca-2308	EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCESSGFIFSQYAMNWVRQAPGKGLQWVAYIG GAGFITYHADDVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLTINDTAVYYCVRSNSRIPD YWGQGTLVAVSS (配列番号 : 93)

Ca-2309	MESVFCWVFLVAILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSSVY MSWVRQAPGKGLQWVARITTDGTDTFYADAVKGRFTISRDNVKNMLYLEMN SLRAEDTAIYYCGDPWQPAYPDLWGQGTMVTVSS (配列番号 : 94)
Ca-2310	MESVLCWVFLVAILKGVQGEVHLVESGGDLVKPGGTLRLSCVASGFTFSQYD MSWVRQSPGKGLQWVALSRYHGGGTYYADAVKGRFTISRDNAKNMLYLQM NSLRAEDTAVYYCVKEGSRWDLRGDYDYWGQGTLVTVSS (配列番号 : 95)
Ca-2311	MQMPWSLLCLLAAPLGVLSELTLQESGPGLVKPSQTLSLTCVVSGGSVTSSHY WNWIRQRPGRGLEWMGYWTGNVNYNPAFQGRISIIGDAAKNQFSLHLSSMTT DDTAVYYCARCGIVAPGFLPIGDFDFWGQGTLVTVSS (配列番号 : 96)
Ca-2312	MESVFCWVFLVAILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFSFSNYFM FWGRQAPGKGLQWVARIRSDGGSTYYADAVKGRFTISRDNARNTLYLQMNSL RAEDTATYYCAKADIIKLPEYRGQGTLVTVSS (配列番号 : 97)
Ca-2401	ESVLGWIFLATILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVGSGFTFSSSWMN WVRQAPGKGLQWIAEISGTGSSTNYADAVKGRFTISRDNDKNTLYLQMNSLR AEDTAMYYCARAAYYGNYRNDLDYWGQGTLVTVSS (配列番号 : 98)
Ca-2402	KPAGSLRLSCVASGFTFSSHSVTWVRQAPGKGLQFVAGITSGGNNRYYTDAVR GRFTLSRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAMYFCALGSYEWLSGEFDYWGQGTL VTVSS (配列番号 : 99)
Ca-2403	MESVFCWVFLVAILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTLNNYF MYWVRQAPGKGLQWVARLNSNGDSTFYADAVKGRFTISRDNAKNTLYLQM NSLRAEDTSMYYCAKDLIYGYTLWGQGTLVTVSS (配列番号 : 100)
Ca-2404	MASVLSWVFLVAIVKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFIFNKYEV YWVRQAPGKGLEWVARILESGNPTYYAEAVEGRFTISRDNAKNMAYLQMNS LRADDTAVYYCATPSVSSTVAIDYWGQGALVTVSS (配列番号 : 101)
Ca-2405	MQMPWSLLCLLATPLGVLSELTLQESGPGLVKPSQTLSLTCVVSRGSVTSDYY WNWIRQRPGRGLEWMGHWIGSTAYNPAFQGRISITADTAKNQLSLQLRSMTT EDTAVYFCARGSSWTPSGDSWGQGTLVTVSS (配列番号 : 102)
Ca-2406	MASVLKLGFSCRYCKKVSRVRCNXVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFIFNKYE VYWVRQAPGKGLEWVARILESGNPTYYAEAVEGRFTISRDNAKNMAYLQMN SLRADDTAVYYCATPSVSSTVAIDYWGQGALVTVSS (配列番号 : 103)

Ca-2407	MDCSWRIFFLLALATGVHSEVQLVQSAAEVKKPGASVKVSCKTSGYTLTDYYI HWVQQAPGTGLHWMGWIDPEXGTTDYAQKFQGXVTLTADTSTNTAYMELS GLRAEDTAVYYCARFPRSLDYGSFPFDYWGQGTLVTVSS (配列番号 : 104)
Ca-2408	MESVLCWVFLVAILKGVQGEVRLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFRNYG MSWVRQRPGKGLQWVAAIRSDGVTYYADDLKVRFTVSRDDARNTLYLQLNS LGAEDTAVYYCAKAPWGLYDAWGQGTLVTVSS (配列番号 : 105)
Ca-2409	MESVLSWVFLVAILQGVQGEVQVVESGGDLVKPAGSLRLSCVASGYSISTYTM TWVRQVPGKGLQLVAGINGDGSSTYYTDAVKGRFTISRDNARNTVYLQMNSL RAEDTAMYYCLGEYSWFYYWGQGTLVTVSS (配列番号 : 106)
Ca-2410	MQMPWSLLCLLAAPLGVLSELTLQESGPRLVKPSQTLSLTCAVSGGSVTTTSY WSWIRQRPGRGLEWVGYWTGTTNYSPAFQGRISISADTAKNQFSLIILSSVTTE DTALYFCASKSASTSWYFSLFESWGQGTLVTVSS (配列番号 : 107)
Ca-2411	MESVLGLVFLLTILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSSYSM SWVRQAPGKGLQWVGYIDNGGTSTYYADAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCGRGSYGMEYWGIIGTSLFVSS (配列番号 : 108)
Ca-2412	MESVLGLLFLVAILKGVQGEIQLVESGGDLLKPGGSLRLSCVASGFTFSGSDMN WIRQAPGKGLQWVAHITHEGIGTSYVGSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNDLR AEDTAMYYCAYSPWNYYSFDSWGQGTLVTVSS (配列番号 : 109)

【０３０９】

【表１６】

表１３：イヌＰＢＭＣ　ＲＮＡから導かれたイヌλ軽鎖可変ドメイン配列

名称	配列
Ca-1001	MTSTMAWSPLLLTLLTHCTVSWAQTVLTQSPSVSAVLGRRVTISCTGSDT NIGSHRDVQWYQLVPGKSPKTLIYGTDNRPSGIPVRFSGSKSGNSGTLTIT GIQAEDEADYYCQSYDDDLSMNVFGGGTHLTVLG (配列番号 : 110)
Ca-1002	MDWVPFYILPFIFSTGFCALPVLTQPTNASASLEESVKLTCTLSSEHSNYIV RWYQQQPGKAPRYLMYVRSDGSYKRGDGIPSRFSGSSSGADRYLTISNIK SEDEDDYYYCGADYTISGQYGSVFGGGTHLTVLG (配列番号 :111)
Ca-1003	LWISGGSALGTPTMAWTHLLLPVLTLCTGSVASSVLTQPPSVSVSLGQTA TISCSGESLSKYYAQWFQQKAGQVPVLVIYKDTERPSGIPDRFSGSSSGNT HTLTISRARAEDEADYYCESEVSTGTYCVRRRHPSNRPRSAQGLPLGHTLP ALL (配列番号 :204)
Ca-1006	MTSTMAWSPLLLTLLTHCTGSWAQSVLTQPASLSGSLGQRVTISCTGSSS NIGGYSVNWLQQLPGTGPRTIIYNNSNRPSGVPDRFSGSRSGTTATLTISGL QAEDEADYYCSTWDSNLRTIVFGGGTHLTVLG (配列番号 : 112)
Ca-1007	MTSTMDWSPLLLTLLAHCTGSWAQSVLTQPASVSGSLGQRVTISCTGSTS NLGTYNVGWLQQVPGTGPRTVIYTNIYRPSGVPDRFSGSESGSTATLTISD LQAEDEAEYYCTAWDSSLNAYVFGSGTQLTVLG (配列番号 : 113)
Ca-1008	MTSNMAWCPFLLTLLAYCTGSWAQSVLTQPTSVSGSLGQRVTISCSGSTN NIGIVGASWYQQLPGKAPKLLVYSDGDRPSGVPDRFSGSNSGNSDTLTITG LQAEDEADYYCQSFDTTLDAAVFGGGTHLTVLG (配列番号 : 114)
Ca-1009	MTSTMAWSPLLLTLLAHCTVSWAQAVLTQPPSVSAALGQRVTISCTGSDT NIGSGYEVHWYRQVPGKSPAIIIYGNSNRPSGVPVRFSGSKSGSTATLTITG IEAEDEADYHCQSYDGNLDGGVFGGGTHLTVLG (配列番号 : 115)
Ca-1010	MTSTMGWFPLILTLLAHCAGSWAQSVLTQPASVSGSLGQRVTISCTGSSP NVGYGDFVAWYQQVPGTSPRTLIYNTRSRPSGVPDRFSASRSGNTATLTIS GLQAEDEADYYCSSYDNTLIGIVFGGGTHLTVLG (配列番号 : 116)
Ca-1011	MTSTMGWSPLLLTLLAHCTGSWAQSVLTQPASVSGSLGQRVTITCTGSSS NIGRANVAWFQQVPGTGPRTVIYTSVKRPSGVPDRFSGSKSGSTATLTISG LQAEDEADYYCSSWDNSLDAGVFGGGTHLTVLG (配列番号 : 117)
Ca-1012	MTSTMGWFPLLLTLLAHSTGSWAQSVLTQPASVSGSLGQRVTITCTGGTS NIGRGFVSWFQQVPGIGPKILIFDAYRRPSGVPDRFSGSRSGNTATLTISGL QAEDEADYYCAVYDSRLDVGVFGSGSQLTVLS (配列番号 : 118)

Ca-1202	MTSNMAWCPFLLTLLTYCTGSWARSVLTQPASVSGSPGQKVTIYCSGTM SDIGVLGANWYQQLPGKAPKLLVDNDGDRPSGVPDRFSASKSGHSDTLTI TGLQPEDEGDYYCQSFDSSLDAAIFGEGTHLTVLG (配列番号 : 119)
Ca-1203	SVASYVLTQSPSQNVTLRQAAHITCEGHNIGTKSVHWYQQKQGQAPVLII YDDKSRPSGIPERFSGANSGNTATLTISGALAEDEADYYCLVWDSSAIWV FGEGTHLTVLG (配列番号 : 120)
Ca-1204	MTSTMAWSPLLLTLLAHFTGSWAQSVLTQPTSVSGSLGQRVTISCTASSS NIDRDYVAWYQQLPGTRPRALIYANSNRPSGVPDRFSGSKSGSTATLTISG LQAEDEADYYCSTWDNSLTYVFGSGTQLTVLG (配列番号 : 121)
Ca-1205	SVASYVLTQVPSVSVNLGKTATITCEGDNVGEKYTHWYQQEYGQAPVLII YEDSRRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGARAEDETDYYCQVWDDSGNVF GGGTHLTVLG (配列番号 : 122)
Ca-1206	MTSTMGWFPLILTLLAHCAGSWAQSVLTQPASVSGSLGQRVTISCTGSDS NVGYGDSIAYGDSVAWYQQVPGTSPRTLIYDVTSRPSGVPDRFSGSRSGT TATLTISGLQAEDEADYYCSSFDKTLNGLIVGGGTHLTVLG (配列番号 : 123)
Ca-1207	MTSNMAWSPLLLTLLAYCTGSWAQSALTQPTSVSGSLGQRVSISCSGGIH NIGSVGATWYQQLPGKAPKLLVSSDGDRPSGIPDRFSGSRSGNSVTLTITG LQAEDEAEYYCQSFDSTLGVHVVFGGGTHLTVLG (配列番号 : 124)
Ca-1208	LCSAVGPPKTESVMTSTMGWSPLLLTLLAHCTGSWAQSVLTQPASVSGSL GQRVTIPCTGSSSNIDRYNVAWFQQLPGTGPKPSSIVLLTDPQGSLIDSLAP SQAA (配列番号 :205)
Ca-1209	MTSTMAWFPLLLTLLAHYTGSWARSDLTQPASVSGSLGQRITISCTGSSSN IGRNYVGWYQQLPGRGPRTVVYGINSRPSGVPDRFSGSKSGSTVTLTISGL QAEDEADYYCSTWDDSLSVVVFGGGTHLTVLG (配列番号 : 125)
Ca-1210	MTSTMGWSPLLLTLTHWTGSWAQSVLSQPASMSGSLGLRITICCTGKNSN INNSYVDWNQPLAGTGPRTVIHDDGDRPSGVPDQFSGSKSGNTATLTISRL QAEDEADYNGASFETSFNAVFGGGTHVTVLG (配列番号 : 126)

【０３１０】

【表１７】

表１４：イヌＰＢＭＣ　ＲＮＡから導かれたイヌκ軽鎖可変ドメイン配列

Ca Ka016-A1	LSWLRQKPGHSPQRLIHQVSSRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRVEADDGGV YYCGQGSQSIPTFG QGTKVEIKR (配列番号 127)

Ca Ka016-A2	MRFPSQLLGLLMLWIPGSAGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLHSN GNTYLYWFRQKPGQSPQRLIYKVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVET DDAGVYYCGQVIQDPWTFGVGTKLELKR (配列番号 128)
Ca Ka016-A3	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQTLLYSN GKNYLFWYRQKPGQSPQRLIDLASNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEA DDAGVYYCGQGMEIPWTFGAGTKVELKR (配列番号 129)
Ca Ka016-A4	MKFPSLLLGLLMLWIPGSTGEAVMTQTPLSLAVTPGEVATISCRASQSLLIISD GKSYLNWYLQKPGQTPRPLIYEASKRFSGVSDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAE DVGVYYCQQSLHFPPTFGPGTKVELKR (配列番号 130)
Ca Ka016-A5	PDRFSGSGSGTDFTLTISRVEADDAGIYYCGQATQTPPTFGAGTKLDLKR (配列番号 131)
Ca Ka016-A6	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVRPGESASISCKASQSLLHSG GGTYLNWFRQRPGQSPQRLIYEVSKRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRITRVEA DDTGIYYCGQNTQLPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 132)
Ca Ka016-A7	MRFPSQLLGLLMLWIPGSTGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLHSN GNTYLFWLRQKPGQSPQRLIYRVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEA DDAGVYYCGQRVRSPWTFGAGTKVEVKR (配列番号 133)
Ca Ka016-A8	MRFPSQLLGLLMLWIPGSAGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLHSN GNTYLYWFRQKPGQSPQRLIYKVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVET DDAGVYYCGQVIQDPWTFGVGTKLELKR (配列番号 134)
Ca Ka016-A9	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDVVMAQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLLHSN GNTFLFWFRQKPGQSPQRLINFLSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRINRVEAD DAGLYYCGQGLQAPLTFGQGTKLEIKR (配列番号 135)
Ca Ka016-A10	MRFPSQLLGLLMLWIPGSNGDDVLTQTPLSLSVRPGETVSILCKASESLLHSD GNTYLSWVRQKAGQSPQRLMYRVSDRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISGVE ADDAGIYYCGQATHYPLEFGQGTRVEIKR (配列番号 136)
Ca Ka016-A11	LMLWIPGSTGEIVLTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLHPNGVTYLYWFRQ KPGQSPQRLIYKVSNRDPGVPDRFSGSGSEIDFTLIISRVEADDGGIYYCGQGI QNPFTFGQGTKLEIKR (配列番号 137)

Ca Ka016-A12	MRFPSQLLGLLMLWIPGSIGDIVMTQTPLSLSVSPGESASISCKASQSLLHSNG NTYLYWFRQKPGHSPQRLIHQVSSRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAD DAGLYYCGQGTQFPFTFGQGTKVEIKR (配列番号 138)
Ca Ka016-B1	MRFPSQLLGLLMLWIPGSIGDIVMTQTPLSLSVSPGESASISCKASQSLLHSNG NTYLYWFRQKPGH SPQRLIHQVSSRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGLYYCGQGTQFP FTFGQGTKVEIKR (配列番号 139)
Ca Ka016-B2	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLLHSN GNTYSFWFRQKPGQSPQRLINLVSSRGPGVPDRFSGSGSGTDFTLIISRVEAD DAGVYYCGHGKEAPYTFSQGTKLEIKR (配列番号 140)
Ca Ka016-B3	MRFPSQLLGLLMLWIPGSVGDIVMTQSPMSLSVGPGESASMSCKANQSLLYS DGITYLSWFLQRPGQSPQRLIYEVSKRDTGVPGRFIGSGAGTDFTLRISRVEA DDAGVYYCGQALQFPLTFSQGAKLEIER (配列番号 141)

Ca Ka016-B4	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDVVMTQTPLSLSVRPGETASISCRASQSLLHSS GITKLFWYRQKPGQSPQRLVYWVSNRDPGVPDRFTGSGSGTDFTLRISRLEA DDAGIYYCGHAIGFPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 142)
Ca Ka016-B5	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVRPGESASISCKASQSLLHSG GGTYLNWFRQRPGQSPQRLIYEVSKRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRITRVEA DDTGIYYCGQNTQFPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 143)
Ca Ka016-B6	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGGIVMTQTPLSLSVRPGETASISCRASQSLLYSD GNTYLFWFRQKPGQSPQRLMYRVSDRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISGVEA DDAGIYYCGQATHYPLEFGQGTXVEIKR (配列番号 144)
Ca Ka016-B7	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVRPGESASISCKASQSLLHSG GGTYLNWFRQRPGQSPQRLIYEVSKRDTGVPDRFIGSGAGTDFTLRISRVEA DDAGVYYCGQGVQGPWTIGAGTKLELQR (配列番号 145)
Ca Ka016-B8	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSVSVSPGETASISCKASQSLLSHD GNTYLHWFRQKPGQSPQRLIYKVSNRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA DDTGVYYCGQITQDPFTFGQGTKLEIKR (配列番号 146)

Ca Ka016-B9	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLLHSN GNTYLFWFRQKPGQSPQRLINWVSNRDPGVPDRFGGSGSGTDFTLRISRVEA DDAGIYYCGQGIQGPYTFSQGTKLEIKR (配列番号 147)
Ca Ka016-B10	MRFPSQFLGLLMLWIPGSSGDIAMTQTPLSLSVGPGETASITCKASQSLLHSN GNTYLFWFRQKPGQSPQRLIYLVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRVEAD DAGIYYCGQATQTPPTFGAGTKLDLKR (配列番号 148)
Ca Ka016-B11	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMAQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLHSD GRTCLSWFRQKSGQSPQRLIYEVSNRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAD DTGIYYCGQTVQFPLTFGQGTKLEIKR (配列番号 149)
Ca Ka016-B12	GQSPQRLIYKVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEPEDVGVYYCGQGT LNPWTFGAGTKVELK R (配列番号 150)
Ca Ka017-1	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDVVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLLHSN GNTFLFWFRQ*PGQSPQRLINFVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAD DAGIYYCGQGLLAPPTFGQGTKVEIRR (配列番号 151) 注記：＊は、停止コドンを示す
Ca Ka017-2	MRFPSQLLGLLMLWIPGSGGDIVMTQTPPSLSVSPREPASISCKASQSLLRSN GNTYLYWFRQKPGQSPEGLIYRVSNRFTGVSDRFSGSGSGTDFTLRISTVEAD DAGVYYCGQATQFPSTFSQGTKLEIKR (配列番号 152)
Ca Ka017-3	MRFPSQLLGLLMLWIPGSXGDIVLTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLHSNG ITYLNWYRQRPGQSPQXLIYKVSNRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRXSKVEAD DTGIYYCGQDTQFPLTLGXGTHXEIKR (配列番号 153)
Ca Ka017-5	MRFPSQLLGLLMLWIPGSTGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASIYCKASQSLLHSN GKTFLYWFRQKPGQS PQRLIYRVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGIYYCGQGIQDPT FGQGTKVEIKR (配列番号 154)
Ca Ka017-6	MRFPSQLLGLLMLWIPGSGGDIVMTQTPPSLSVSPREAASISCKASQSLLKSN GNTYFYWFRQKPG QVSEGLIYKVSSRFTGVSDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVYFCGQALQF PYTFSQGTKLDIKR (配列番号 155)

Ca Ka017-10	MRFPSQLLGLLMLWIPESGGDVVLTQTPPSLSLSPGETASISCKASRSLLNSD GSTYLDWYLQKPGQSPRLLIYLVSNRFSGVSDRFSGSGSGTDFTLTISRVEAD DAGVYYCGQGSRVPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 156)

Ca Ka017-11	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLLHRN GITYLSWFRQRPGQSP QRLINLVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDVGVYYCGIIGLQTPY TFGQGTSLEIER (配列番号 157)
Ca Ka017-12	MRFPSQLLGLLVLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETVSISCRASQSLLYSDG NIYLFWFRRKPGQSP QHLINLVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVYYCGQGTQPPY TFSQGTKVEIKR (配列番号 158)
Ca Ka017-13	MRFPSQLLGLLMLWIPESGGDVVLTQTPPSLSLSPGETASISCKASRSLLNSD GSTYLDWYLQKPGQS PRLLIYLVSNRFSGVSDRFSGSGSGTDFTLTISRVEADDAGVYYCGQGSRVPL TFGQGTKVEIKR (配列番号 159)
Ca Ka017-14	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMAQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLLHSN GITYLFWYRQKPGQS PQRLISMVFNRDPGVPDRFGGSGSGTDFTLRISRVEADDAGLYFCGHGTQIPY SFSQGTKLEIKR (配列番号 160)
Ca Ka017-16	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSISPGEPASISCKASQSLLHSGG DTYLNWFRQRPGQS PQLLINRVSSRKKGVPDRFSGSGSGTEFTLRISRVEADDAGIYFCGQGTQFPY TFSQGTKLEIKR (配列番号 161)
Ca Ka017-20	MRFPSQLLGLLMLWIPGSGGDIVMTQTPPSLSVSPGEPASMSCKASQSLLHSN GNTYLYWFRQKP GQSPEALIYKVSNRFTGVSDRFSGSGSGTDFTLRINRVEADDVGVYYCGQGI QIPYTFSQGTKLEIKR (配列番号 162)

Ca Ka017-23	MRFPSQLLGLLMLWIPGSTGEIVLTQTPLSLSVSPGESASISCKASQSLLYSNG NTYLYWFRQKAGQSP QRVIYRVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISSVENDDAGVYYCGQGSEDPP TFGAGTKVELKR (配列番号 163)
Ca Ka017-24	MRFPSQLLGLLTLWIPGSTGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLHSNG NTYLYWFRQKPGQS PQRLIYKVSNRDPGVPXRFSGSGSGTDFTLRVSXVEADDAGVYYCGQGVQD PFTFGQGTKLEIKR (配列番号 164)

【０３１１】

［実施例１３］：イヌ化モノクローナル抗体を作製するためのＣＤＲグラフト化

マウス抗ＮＧＦ抗体からイヌ化抗体配列を作製するために、各マウス重鎖可変鎖抗体遺伝子配列を、ベクターＮＴＩソフトウェアを使用して３６種のイヌＩｇ生殖系列重鎖可変鎖配列に対して別個にアラインした。１１種のイヌＩｇ生殖系列重鎖可変鎖配列は、その開示が、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第７，２６１，８９０　Ｂ２号、（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｆｏｒ　Ｕｓｉｎｇ　Ｃａｎｉｎｅ　Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ　Ｖａｒｉａｂｌｅ　Ｄｏｍａｉｎｓ　ａｎｄ　Ｃａｎｉｎｉｚｅｄ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ）に由来するものであり、２５種のイヌＩｇ生殖系列重鎖可変鎖配列は、表１２（イヌ　ＰＢＭＣ　ＲＮＡから導かれたイヌ重鎖可変ドメイン配列）に由来するものであった。各マウス軽鎖可変鎖遺伝子配列を、ベクターＮＴＩソフトウェアを使用して、６８種の生殖系列軽鎖可変鎖配列（米国特許第７，２６１，８９０　Ｂ２号に由来する）に対して別個にアラインした。元のマウス配列に対して最高の全体相同性を有するイヌ可変ドメイン配列を、各重鎖および軽鎖配列のために選択して、フレームワーク配列を提供した。イヌ可変ドメインＣＤＲ配列をマウスＣＤＲ配列（サブクローニングされた抗ＮＧＦ抗体ハイブリドーマｍＡｂから導かれた）で置換することによって、完全ＣＤＲグラフト化抗体のコンピュータによる構築を達成した。各配列中の残基を同定するために、列挙された配列各々の第１のアミノ酸を、１と定義し、カバット（Ｋａｂａｔ）番号付けシステムを使用して、すべての残りの残基を、その後に引き続いて番号付けした。

【０３１２】

ＰＲ－１２５４９７２から得た重鎖ＣＤＲ配列を、以下のとおりにイヌ８９４にコンピュータによってグラフトした：（１）これらの提案された構築物中に、１つのＮ連結型グリコシル化パターン（Ｎ－｛Ｐ｝－Ｓ／Ｔ）が見られた。（２）６つの復帰突然変異（Ｑ３Ｈ、Ｖ３７Ｉ、Ｑ４６Ｅ、Ｄ７３Ｎ、Ｔ７７Ｎ、Ｒ８３Ｋ）を導入して、７２．２ＶＨ配列を作製した。（３）ｍＡｂ７２．２のイヌ化後にＮＧＦに対する抗体親和性を維持するために、上記で開示された復帰突然変異のうち１、２、３、４、５または６つが、７２．２ＶＨに導入され得る。（４）これらの復帰突然変異のうち１、２、３、４、５または６つが、７２．２ＶＨのその後の親和性成熟の間に置換され得る。Ｈ３９Ｑ復帰突然変異を付加して、７２．２ＶＨに復帰突然変異を導入することによって７２．３ＶＨを作製した。７２．４ＶＨは、復帰突然変異Ｑ３Ｈ、Ｈ３９Ｑ、Ｑ４６Ｅ、Ｄ７３Ｎを導入することによって作製した。ＰＲ－１２５４９７２から得た軽鎖ＣＤＲ配列を、以下のとおりにイヌ１００１にコンピュータによってグラフトした：（１）これらの提案された構築物中に、Ｎ連結型グリコシル化パターン（Ｎ－｛Ｐ｝－Ｓ／Ｔ）は見られなかった。（２）４つの復帰突然変異（Ｉ２Ｖ、Ｖ３Ｌ、Ｑ４５Ｋ、Ｓ５９Ｐ）を導入して、７２．２ＶＬ配列を作製した。（３）ｍＡｂ７２．２のイヌ化後にＮＧＦに対する抗体親和性を維持するために、これらの復帰突然変異のうち１、２、３または４つが、７２．２ＶＬに導入され得る。（４）これらの復帰突然変異のうち１、２、３または４つが、７２．２ＶＬのその

後の親和性成熟の間に置換され得る。７２．４ＶＬは、復帰突然変異Ｑ４５ＫおよびＳ５９Ｐを導入することによって作製した。

【０３１３】

ＰＲ－１２５４９７３から得た重鎖ＣＤＲ配列を、以下のとおりにイヌ８９４にコンピュータによってグラフトした：（１）これらの提案された構築物中に、Ｎ連結型グリコシル化パターン（Ｎ－｛Ｐ｝－Ｓ／Ｔ）は見られなかった。（２）８つの復帰突然変異（Ｔ２４Ａ、Ｍ４８Ｉ、Ｖ６７Ａ、Ｌ６９Ｖ、Ｔ７３Ｋ、Ｎ７６Ｓ、Ｖ７８Ａ、Ａ９３Ｔ）を導入して７３．２ＶＨ配列を作製した。（３）ｍＡｂ７３．２のイヌ化後にＮＧＦに対する抗体親和性を維持するために、これらの復帰突然変異のうち１、２、３、４、５、６、７または８つが、７３．２ＶＨに導入され得る。（４）これら８つの復帰突然変異のうち１、２、３、４、５、６、７または８つが、７３．２ＶＨのその後の親和性成熟の間に置換され得る。７３．４ＶＨは、復帰突然変異Ｔ２４Ａ、Ｔ７３Ｋ、Ａ９３Ｔを導入することによって作製した。ＰＲ－１２５４９７３から得た軽鎖ＣＤＲ配列を、以下のとおりにイヌ１０３４にコンピュータによってグラフトした：（１）これらの提案された構築物中に、Ｎ連結型グリコシル化パターン（Ｎ－｛Ｐ｝－Ｓ／Ｔ）は見られなかった。（２）８つの復帰突然変異（Ｉ１Ｄ、Ｖ３Ｑ、Ｓ２２Ｔ、Ｆ３６Ｈ、Ｒ４６Ｌ、Ｉ４８Ｖ、Ｄ６０Ｓ、Ｄ７０Ｑ）を導入して、７３．２ＶＬ配列を作製した。（３）ｍＡｂ７３．２のイヌ化後にＮＧＦに対する抗体親和性を維持するために、これらの復帰突然変異のうち１、２、３、４、５、６、７または８つが、７３．２ＶＬに導入され得る。（４）これら８つの復帰突然変異のうち１、２、３、４、５、６、７または８つが、７３．２ＶＬのその後の親和性成熟の間に置換され得る。７３．４ＶＬは、復帰突然変異Ｉ１Ｄ、Ｖ３Ｑ、Ｆ３６Ｈ、Ｒ４６Ｌ、Ｄ６０Ｓ、Ｄ７０Ｑを導入することによって作製した。

【０３１４】

ＰＲ－１２５４９７７から得た重鎖ＣＤＲ配列を、以下のとおりにイヌ８９４にコンピュータによってグラフトした：（１）これらの提案された構築物中に、Ｎ連結型グリコシル化パターン（Ｎ－｛Ｐ｝－Ｓ／Ｔ）は見られなかった。（２）８つの復帰突然変異（Ｔ２４Ａ、Ｑ３８Ｋ、Ｍ４８Ｉ、Ｒ６６Ｋ、Ｖ６７Ａ、Ｔ６８Ｓ、Ｌ６９Ｉ、Ｖ７８Ａ）を導入して、７７．２ＶＨ配列を作製した。（３）ｍＡｂ７７．２のイヌ化後にＮＧＦに対する抗体親和性を維持するために、これらの復帰突然変異のうち１、２、３、４、５、６、７または８つが、７７．２ＶＨに導入され得る。（４）これら復帰突然変異のうち１、２、３、４、５、６、７または８つが、７７．２ＶＨのその後の親和性成熟の間に置換され得る。Ｒ９４Ｇ復帰突然変異を付加して復帰突然変異を７７．２ＶＨに導入することによって７７．３ＶＨを作製した。７７．４ＶＨは、復帰突然変異Ｔ２４Ａ、Ｑ３８ＫおよびＲ９４Ｇを導入することによって作製した。ＰＲ－１２５４９７７から得た軽鎖ＣＤＲ配列を、以下のとおりにイヌ９９７にコンピュータによってグラフトした：（１）これらの提案された構築物中に、Ｎ連結型グリコシル化パターン（Ｎ－｛Ｐ｝－Ｓ／Ｔ）は見られなかった。（２）４つの復帰突然変異（Ｌ２Ｖ、Ｆ３６Ｙ、Ｒ４６Ｌ、Ｓ９８Ｇ）を導入して、７７．２ＶＬ配列を作製した。（３）ｍＡｂ７７．２のイヌ化後にＮＧＦに対する抗体親和性を維持するために、これらの復帰突然変異のうち１、２、３または４つが、７７．２ＶＬに導入され得る。（４）これらの復帰突然変異のうち１、２、３または４つが、７７．２ＶＬのその後の親和性成熟の間に置換され得る。７７．４ＶＬは、復帰突然変異Ｆ３６ＹおよびＲ４６Ｌを導入することによって作製した。

【０３１５】

ＰＲ－１２５４９８１から得た重鎖ＣＤＲ配列を、以下のとおりにイヌ８７６にコンピュータによってグラフトした：（１）これらの提案された構築物中に、Ｎ連結型グリコシル化パターン（Ｎ－｛Ｐ｝－Ｓ／Ｔ）は見られなかった。（２）６つの復帰突然変異（Ｑ４６Ｅ、Ｇ４９Ａ、Ｔ７７Ｎ、Ｒ８３Ｋ、Ｌ９１Ｙ、Ｅ９３Ｔ）を導入して８１．２ＶＨ配列を作製した。（３）ｍＡｂ８１．２のイヌ化後にＮＧＦに対する抗体親和性を維持するために、これらの復帰突然変異のうち１、２、３、４、５または６つが、８１．２ＶＨに導入され得る。（４）これら６つの復帰突然変異のうち１、２、３、４、５または６つ

が、８１．２ＶＨのその後の親和性成熟の間に置換され得る。８１．４ＶＨは、復帰突然変異Ｑ４６Ｅ、Ｇ４９Ａ、Ｌ９１ＹおよびＥ９３Ｔを導入することによって作製した。

【０３１６】

ＰＲ－１２５４９８１から得た軽鎖ＣＤＲ配列を、以下のとおりにイヌ１０１１にコンピュータによってグラフトした：（１）これらの提案された構築物中に、Ｎ連結型グリコシル化パターン（Ｎ－｛Ｐ｝－Ｓ／Ｔ）は見られなかった。（２）４つの復帰突然変異（Ｖ３Ｌ、Ａ７Ｔ、Ｆ３６Ｙ、Ｒ４６Ｌ）を導入して８１．２ＶＬ配列を作製した。（３）ｍＡｂ８１．２のイヌ化後にＮＧＦに対する抗体親和性を維持するために、これらの復帰突然変異のうち１、２、３または４つが、８１．２ＶＬに導入され得る。（４）これら４つの復帰突然変異のうち１、２、３または４つが、８１．２ＶＬのその後の親和性成熟の間に置換され得る。８１．４ＶＬは、復帰突然変異Ａ７Ｔ、Ｆ３６ＹおよびＲ４６Ｌを導入することによって作製した。

【０３１７】

あるいは、ＰＲ－１２５４９８１から得た重鎖ＣＤＲ配列を、以下のとおりにイヌ１００５ＶＨにコンピュータによってグラフトした：（１）これらの提案された構築物中に、Ｎ連結型グリコシル化パターン（Ｎ－｛Ｐ｝－Ｓ／Ｔ）は見られなかった。（２）７つの復帰突然変異（Ｑ４６Ｅ、Ｔ７７Ｎ、Ｆ７９Ｙ、Ｒ８３Ｋ、Ｆ９１Ｙ、Ｖ９３Ｔ、Ｋ９４Ｒ）を導入して８１．５Ｂ　ＶＨ配列を作製した。（３）ｍＡｂ８１．５Ｂのイヌ化後にＮＧＦに対する抗体親和性を維持するために、これらの復帰突然変異のうち１、２、３、４、５、６または７つが、８１．５Ｂ　ＶＨに導入され得る。（４）これら７つの復帰突然変異のうち１、２、３、４、５、６または７つが、８１．５Ｂ　ＶＨのその後の親和性成熟の間に置換され得る。８１．６Ｂは、復帰突然変異Ｑ４６Ｅ、Ｆ７９Ｙ、Ｆ９１ＹおよびＶ９３Ｔを導入することによって作製した。変異体８１．２Ｂおよび８１．４Ｅは、Ａ８４Ｋ突然変異を８１．５Ｂおよび８１．６Ｂに、それぞれ導入することによって作製した。

【０３１８】

ＰＲ－１２５４９８２から得た重鎖ＣＤＲ配列を、以下のとおりにイヌ８９２にコンピュータによってグラフトした：（１）これらの提案された構築物中に、Ｎ連結型グリコシル化パターン（Ｎ－｛Ｐ｝－Ｓ／Ｔ）は見られなかった。（２）１２の復帰突然変異（Ｉ３Ｑ、Ｉ３７Ｖ、Ｍ４８Ｌ、Ｉ６７Ｌ、Ｔ７０Ｓ、Ａ７１Ｋ、Ｇ７３Ｎ、Ｎ７６Ｓ、Ｈ７７Ｑ、Ｌ７８Ｖ、Ｓ７９Ｆ、Ｔ９３Ａ）を導入して８２．２ＶＨ配列を作製した。（３）ｍＡｂ８２．２のイヌ化後にＮＧＦに対する抗体親和性を維持するために、これらの復帰突然変異のうち１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２が、８２．２ＶＨに導入され得る。（４）これらの復帰突然変異のうち１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２が、８２．２ＶＨのその後の親和性成熟の間に置換され得る。８２．４ＶＨは、復帰突然変異Ｉ３Ｑ、Ａ７１Ｋ、Ｈ７７Ｑ、Ｓ７９ＦおよびＴ９３Ａを導入することによって作製した。ＰＲ－１２５４９８２から得た軽鎖ＣＤＲ配列を、以下のとおりにイヌ１０３４にコンピュータによってグラフトした：（１）これらの提案された構築物中に、Ｎ連結型グリコシル化パターン（Ｎ－｛Ｐ｝－Ｓ／Ｔ）は見られなかった。（２）１０の復帰突然変異（Ｉ１Ｄ、Ｖ３Ｑ、Ｓ２２Ｔ、Ｆ３６Ｙ、Ｑ４５Ｋ、Ｒ４６Ｌ、Ｄ６０Ｓ、Ｆ７１Ｙ、Ｔ７２Ｓ、Ｙ８７Ｆ）を導入して、８２．２ＶＬ配列を作製した。（３）ｍＡｂ８２．２のイヌ化後にＮＧＦに対する抗体親和性を維持するために、これらの復帰突然変異のうち１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０が、８２．２ＶＬに導入され得る。（４）これら復帰突然変異のうち１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０が、８２．２ＶＬのその後の親和性成熟の間に置換され得る。８２．３ＶＨは、Ｐ４４Ｖ復帰突然変異を付加して８２．２ＶＨに復帰突然変異を導入することによって作製した。８２．４ＶＬは、復帰突然変異Ｉ１Ｄ、Ｖ３Ｑ、Ｆ３６Ｙ、Ｑ４５Ｋ、Ｒ４６Ｌ、Ｄ６０Ｓ、Ｆ７１ＹおよびＹ８７Ｆを導入することによって作製した。

【０３１９】

［実施例１４］：イヌフレームワークアミノ酸の等電点

イヌ化ＩｇＧ１κ抗体の重鎖フレームワークアミノ酸（すなわち、非ＣＤＲアミノ酸）は、８．０未満の算出された等電点をもたらす。軽鎖フレームワークアミノ酸は、軽鎖がκである場合には、６．５未満の算出された等電点をもたらす。イヌ化抗体の等電点は、全体、すなわち、組み合わされた重鎖および軽鎖として、フレームワークアミノ酸のために、軽鎖がκである場合には、８．０未満である。それに比べて、ヒトＩｇＧ１重鎖のフレームワークアミノ酸は、通常、８．０を超える等電点をもたらす。ヒトκ軽鎖のフレームワークアミノ酸は、通常、６．５を超える等電点をもたらす。ヒトＩｇＧ１／ｋ抗体全体のフレームワークアミノ酸は、通常、８．０を超える等電点をもたらす。

【０３２０】

［実施例１５］：ヒト化モノクローナル抗体を作製するためのＣＤＲグラフト化

各マウス重鎖可変および軽鎖可変鎖抗体遺伝子配列（表１４に示されるような）を、ベクターＮＴＩソフトウェアを使用して４４種のヒト免疫グロブリン生殖系列重鎖可変鎖または４６種の生殖系列軽鎖可変鎖配列（当業者に周知である、ＮＣＢＩ　Ｉｇ　Ｂｌａｓｔウェブサイトに由来する）に対して別個にアラインした。ＣＤＲグラフト化目的で、元のマウス配列に対して最高の全体相同性を有するヒト可変ドメイン配列を、各重鎖および軽鎖抗体配列のために選択して、フレームワーク（ＦＷ）１、２および３配列を提供した。適したヒト重鎖可変および軽鎖ＦＷ４領域（「連結」領域としても知られる）の同定を、ＮＣＢＩデータベースにおいて、各マウス重鎖および軽鎖ＦＷ４領域を、重鎖を連結する６種のヒト免疫グロブリン生殖系列および軽鎖配列を連結する５種の生殖系列と別個にアラインすることによって達成した。ヒト可変ドメインＣＤＲ配列（ＮＣＢＩウェブサイトに由来する）をマウスＣＤＲ配列（マウス抗体に由来する）で置換し、各３’末端にＦＷ４領域（ＮＣＢＩウェブサイトに由来する）を付加することによって、完全ＣＤＲグラフト化可変ドメインのコンピュータによる構築を達成した。復帰突然変異の同定によって、さらなるヒト化も達成され得る。全長ヒトＩｇは、各ＣＤＲグラフト化ｍＡｂの可変ドメインを、インフレームのヒトＩｇＧ定常ドメインとともに発現させることによって製造され得る。製造されたヒトＩｇフレームワークにグラフトされたマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂＣＤＲ（ＣＤＲグラフト化抗ＮＧＦ　Ａｂ）が表１５に列挙されている。

【０３２１】

【表１８】
表１５：ヒトＩｇフレームワークでのＣＤＲグラフト化によるマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂ　ＣＤＲヒト化

名称	配列（ＣＤＲには下線が引かれている）
HU72 VH (CDR-GRAFT VH3-13/JH5)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMFWVRQATGKGLE WVSTISDGGSYTYYTDNVKGRFTISRENAKNSLYLQMNSLRAGDT AVYYCARDWSDSEGFAYWGQGTLVTVSS (配列番号 : 165)
Hu73 VH (CDR-GRAFT VH1-18/JH6)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGL EWMGRIDPYGGGTKHNEKFKRRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTA VYYCARSGYDYYFDVWGQGTTVTVSS (配列番号 : 166)
HU77 VH (CDR-GRAFT VH1-69/JH6)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYIYWVRQAPGQGLEW MGRIDPANGNTIYASKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARYGYYAYWGQGTTVTVSS (配列番号 : 167)
HU80 VH (CDR-GRAFT VH1-18/JH6)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIYWVRQAPGQGLE WMGRIDPANGNTIYASKFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAV YYCARYGYYAYWGQGTTVTVSS (配列番号 : 168)
HU81 VH (CDR-GRAFT VH3-15/JH1)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNHYMYWVRQAPGKGLE WVGSISDGGAYTFYPDTVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAV YYCTTEESANNGFAFWGQGTLVTVSS (配列番号 : 169)
HU82 VH (CDR-GRAFT VH2-26/JH6)	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLTGYNINWIRQPPGKALEWL AMIWGYGDTDYNSALKSRLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYY CARDHYGGNDWYFDVWGQGTTVTVSS (配列番号 : 170)
HU72 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVQSNGNTYLEWYLQKPGQSP QLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGS HVPFTFGQGTKLEIKR (配列番号 : 171)

HU73 VL (CDR-GRAFT L22/JK2)	DIQMIQSPSFLSASVGDRVSIICRASENIYSFLAWYLQKPGKSPKLFLYNANTLAEGVSSRFSGRGSGTDFTLTIISLKPEDFAAYYCQHHFGTPFTFGQGTKLEIKR (配列番号 : 172)
HU77 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCKSTKSLLNGDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFESNYLFTFGQGTKLEIKR (配列番号 : 173)
HU80 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCKSTKSLLNGDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFESNYLFTFGQGTKLEIKR (配列番号 : 174)
HU81 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSILHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGAHVPFTFGQGTKLEIKR (配列番号 : 175)
HU82 VL (CDR-GRAFT 08/JK2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQGKTLPRTFGQGTKLEIKR (配列番号 : 176)

【０３２２】

［実施例１６］：全長マウス／イヌキメラ抗体およびイヌ化抗体を構築する方法

従来の分子生物学技術を使用して、イヌＩｇＧ１定常領域（Ｍａｒｉｅ－Ｐａｕｌｅ Ｌｅｆｒａｎｃ （Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｅ Ｍｏｎｔｅｐｅｌｌｉｅｒ ２ ａｎｄ ＣＮＲＳ）によって作成された、免疫遺伝学および免疫情報学におけるグローバルリファレンスである、ＩＭＧＴ（登録商標）、ｔｈｅ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＩｍＭｕｎｏＧｅｎｅＴｉｃｓ ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ ｓｙｓｔｅｍから得られた）をコードするｃＤＮＡ断片を、合成し、マウス抗ＮＧＦモノクローナル抗体ＰＲ－１２５４９７２、ＰＲ－１２５４９７３、ＰＲ－１２５４９７７、ＰＲ－１２５４９８１、ＰＲ－１２５４９８２に由来する重鎖可変ドメインの各々の３’末端にライゲーションした。これらの同一抗ＮＧＦ ｍＡｂについて、米国特許第５，８５２，１８３Ａ号、（配列番号５４）から得られたイヌκ定常領域をコードするｃＤＮＡ断片を、合成し、軽鎖可変ドメインの各々の３’末端にライゲーションした。完全イヌＩｇＧ重鎖定常ドメインヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、配列番号５１および配列番号５２として、それぞれ示されている。完全イヌκ軽鎖定常ドメインヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、配列番号５３および配列番号５４として、それぞれ示されている。完全重鎖および軽鎖キメラｃＤＮＡを、ｐＨｙｂＥ発現プラスミド中にライゲーションした；これらのキメラｍＡｂの配列は、以下の表１５Ａ中にある。

【０３２３】

【表１９】

表１５Ａ：マウス／イヌキメラ抗体配列

名称	配列（ＣＤＲには下線が引かれている）
PR-1290646 軽鎖アミノ酸配列	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVQSNGNTYLEWYLQKPGQS PKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISREAEDLGVYYCFQGSH VPFTFGSGTKLEIKRNDAQPAVYLFQPSPDQLHTGSASVVCLLNSFYPK DINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYSLSSTLTMSSTEYLSHEL YSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD (配列番号 :194)
PR-1290646 重鎖アミノ酸配列	EVHLVESGGGLVKPGGFLILSCAASGFTFSDYYMFWIRQTPGKRLEWV ATISDGGSYTYYTDNVKGRFTISRDNVKNNLYLQMSHLKSADTAMYY CARDWSDSEGFAYWGQGTLVTVSAASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTV ALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLHSLSSMVTV PSSRWPSETFTCNVVHPASNTKVDKPVFNECRCTDTPPCPVPEPLGGPS VLIFPPKPKDILRITRTPEVTCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHTAK TQSREQQFNGTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIDLPSPIERTIS KARGRAHKPSVYVLPPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNG QQEPERKHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMH ETLQNHYTDLSLSHSPGK (配列番号 :195)
PR-1290654 軽鎖アミノ酸配列	DIQMTQSPASLSASVGETVTVTCRASENIYSFLAWHQQKQGKSPQLLV YNANTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYCQHHFGTPFT FGSGTKLEIKRNDAQPAVYLFQPSPDQLHTGSASVVCLLNSFYPKDIN VKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYSLSSTLTMSSTEYLSHELYSC EITHKSLPSTLIKSFQR SECQRVD (配列番号 :196)
PR-1290654 重鎖アミノ酸配列	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMHWVKQRPGQGL EWIGRIDPYGGGTKHNEKFKRKATVTADKSSSTAYILLSSLTSEDSAV YYCTRSGYDYYFDVWGTGTTVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTV ALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLHSLSSMVTV PSSRWPSETFTCNVVHPASNTKVDKPVFNECRCTDTPPCPVPEPLGGPS VLIFPPKPKDILRITRTPEVTCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHTAK TQSREQQFNGTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIDLPSPIERTIS KARGRAHKPSVYVLPPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNG QQEPERKHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMH

	ETLQNHYTDLSLSHSPGV (配列番号 :197)
PR-1290656 軽鎖アミノ酸配列	DVVLTQTPLSLPVNIGDQASISCKSTKSLLNGDGFTYLDWYLQKPGQS PQLLIYLVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFESN YLFTFGSGTKLEMKRNDAQPAVYLFQPSPDQLHTGSASVVCLLNSFYP KDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYSLSSTLTMSSTEYLSHE LYSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD (配列番号 :198)
PR-1290656 重鎖アミノ酸配列	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIYWVKQRPEQGLEWI GRIDPANGNTIYASKFQGKASITADTSSNTAYMQLSSLTSGDTAVYYC AGYGYYAYWGQGTTLTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLV SGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLHSLSSMVTVPSSRWPS ETFTCNVVHPASNTKVDKPVFNECRCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFPPK PKDILRITRTPEVTCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHTAKTQSREQ QFNGTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIDLPSPIERTISKARGRA HKPSVYVLPPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNGQQEPERK HRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHETLQNHY TDLSLSHSPGK (配列番号 :199)
PR-1290657 軽鎖アミノ酸配列	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSILHSNGNTYLEWYLQKPGQSP NLLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGA HVPFTFGSGTKLEIKRNDAQPAVYLFQPSPDQLHTGSASVVCLLNSFYP KDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYSLSSTLTMSSTEYLSHE LYSCEITHKSLPSTLI KSFQRSECQRVD (配列番号 :200)
PR-1290657 重鎖アミノ酸配列	EVQLVESGGGAVKPGGSLTLSCAASGFTFSNHYMYWVRQTPEKRLE WVASISDGGAYTFYPDTVKGRFTISRDNVNNNLYLQMRHLKSEDTAM YYCTREESANNGFAFWGQGTLVTVSAASTTAPSVFPLAPSCGSTSGST VALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLHSLSSMVT VPSSRWPSETFTCNVVHPASNTKVDKPVFNECRCTDTPPCPVPEPLGG PSVLIFPPKPKDILRITRTPEVTCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHTA KTQSREQQFNGTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIDLPSPIERTI SKARGRAHKPSVYVLPPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSN GQQEPERKHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVM HETLQNHYTDLSLSHSPGV (配列番号 :201)

PR-1290658 軽鎖アミノ酸配列	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTITCRASQDITNYLNWYQQKPDGTVKLLI YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLDQEDIATYFCQQGKTLPRT FGGGTKLEIKRNDAQPAVYLFQPSPDQLHTGSASVVCLLNSFYPKDIN VKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYSLSSTLTMSSTEYLSHELYSC EITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD (配列番号 :202)
PR-1290658 重鎖アミノ酸配列	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTGYNINWVRQPPGKGLEWL GMIWGYGDTDYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTARYYC ARDHYGGNDWYFDVWGTGTTVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGST VALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLHSLSSMVT VPSSRWPSETFTCNVVHPASNTKVDKPVFNECRCTDTPPCPVPEPLGG PSVLIFPPKPKDILRITRTPEVTCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHTA KTQSREQQFNGTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIDLPSPIERTI SKARGRAHKPSVYVLPPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSN GQQEPERKHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVM HETLQNHYTDLSLSHSPGK (配列番号 :203)

【０３２４】

上記のイヌＩｇＧ１定常領域ヌクレオチド配列をまた、イヌ化抗ＮＧＦモノクローナル抗体７２．２ＶＨ、７２．３ＶＨ、７２．４ＶＨ、７３．２ＶＨ、７３．４ＶＨ、７７．２ＶＨ、７７．３ＶＨ、７７．４ＶＨ、８１．２ＶＨ、８１．４ＶＨ、８１．２Ｂ、８１．４Ｂ、８１．５Ｂ、８１．６Ｂ、８２．２ＶＨ、８２．４ＶＨに由来する重鎖可変ドメインをコードするｃＤＮＡ各々の３’末端にライゲーションした。上記のイヌκ軽鎖定常ドメインヌクレオチド配列はまた、イヌ化抗ＮＧＦモノクローナル抗体７２．２ＶＬ、７２．４、７３．２ＶＬ、７３．４ＶＬ、７７．２ＶＬ、７７．４ＶＬ、８１．２ＶＬ、８１．４ＶＬ、８２．２ＶＬに由来する軽鎖可変ドメインをコードするｃＤＮＡ各々の３’末端にライゲーションした。

【０３２５】

全長キメラまたはイヌ化抗体を、重鎖および軽鎖ｐＨｙｂＥプラスミドの組合せの同時トランスフェクションによって、２９３－６Ｅ細胞において一過性に発現させた。表１７Ａは、表中の名称につき、イヌ化抗体を製造するために組み合わせることができるイヌ化重鎖および軽鎖のすべてのあり得る組合せを強調する（表１７Ａ）。表１７Ａでは、マウス重鎖のイヌ化版をコードする重鎖プラスミドが、一番上の行に列挙され、右方向に進む。マウス軽鎖のイヌ化版をコードする軽鎖プラスミドが、左側の列に列挙されており下方向に進む。可能性ある得られたイヌ化抗体を説明するために、これらのボックスが交わる各時点で、名称が示されている。

【０３２６】

［実施例１７］：イヌ化モノクローナル抗体発現および精製

選択された重鎖および軽鎖マウス／イヌキメラ抗体およびイヌ化抗体プラスミドを、懸濁液中の２９３－６ｅ細胞に同時トランスフェクトし、７－８日間増殖させた。細胞上清を回収し、遠心分離し、濾過した。各発現された抗体について、上清を等容積のＰｉｅｒｃｅ結合バッファーと混合し、製造業者の使用説明書（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ番号１７－１２７９－０４）に従ってプロテインＡセファロース親和性クロマトグラフィーを実施した。いくつかの供給源によれば、イヌＩｇＧは、プロテインＡと中程度に十分に直接的に結合するが（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｐａｃｋａｇｅ ｉｎｓｅｒｔ；Ｓｃｏｔｔ，Ｍ．Ａ．ら

、Ｖｅｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ－Ｉｍｍｕｎｏｐａｔｈｏ、５９：２０５頁、１９９７年；Ｗａｒｒ，Ｇ．ＷおよびＨａｒｔ，ＩＲ．、Ａｍ Ｊ Ｖｅｔ Ｒｅｓ、４０：９２２頁、１９７９年；Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｐｉｅｒｃｅ Ａｎｔｉｂｏｄｙ ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｉｃａｌ Ｈａｎｄｂｏｏｋ）、モノクローナルイヌｍＡｂは、プロテインＡと定量的に結合せず、したがって、プロテインＡ精製方法論に修飾を行わずに、上清から精製することができない。

【０３２７】

イヌＩｇＧのプロテインＡとの定量的結合を可能にするために、上清を濃縮し、等容量のＰｉｅｒｃｅ結合バッファー（Ｔｈｅｒｍｏ番号２１００７）と混合した。濃縮され、希釈された上清に、ＮａＣｌを２．５Ｍの最終濃度に添加した。ＮａＣｌで調整した上清を、連続一晩ローディングによってプロテインＡ セファロースにロードし、Ｐｉｅｒｃｅ結合バッファーで洗浄し、Ｐｉｅｒｃｅ溶出バッファー（Ｔｈｅｒｍｏ番号２１００４）を使用して溶出した。溶出物を１Ｍ Ｔｒｉｓ ｐＨ８．０を滴加することによって中性化し；この後、中性化された抗体をＰＢＳ中に透析し、抗体の量を、OD_{280}によって分光光度法で定量した。精製された量を、精製された細胞上清の総容量で数学的に除して、全体的に推定される発現レベルをμｇ／ｍＬで求めた。これらのイヌＩｇＧ１／ｋ ｍＡｂの単離および精製によって、完全にされるｍＡｂの分析的特徴決定研究が可能となる。

【０３２８】

大規模細胞上清（１０－１５Ｌ）の精製のために、細胞上清を濃縮し、次いで、Ｐｉｅｒｃｅ結合バッファーＡ（Ｔｈｅｒｍｏ、カタログ番号２１００１）と、１対１比で混合した。この混合物に、５Ｍ ＮａＣｌを１．３Ｍ最終濃度まで添加した。混合物のｐＨは、１０Ｎ ＮａＯＨを用いて８．５に調整した。ｐＨが調整された細胞上清を、プロテインＡ ＭａｂＳｅｌｅｃｔ ＳｕＲｅ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、カタログ番号１７－５４３８－０３）クロマトグラフィーカラムにロードし、２段階を使用して溶出した。溶出の第１段階は、２０ｍＭ Ｔｒｉｓ、２５ｍＭ ＮａＣｌ、ｐＨ８．０、７．４ｍＳ／ｃｍを使用して実施した。抗体を含有する画分をOD_{280}およびサイズ排除クロマトグラフィーによって同定した。プロテインＡカラムと結合している残存する抗体を定量的に単離するために、Ｐｉｅｒｃｅ溶出バッファー（Ｔｈｅｒｍｏ、カタログ番号、２１００４）、ｐＨ２．７、３．７ｍＳ／ｃｍを使用して第２段階の溶出を実施し、抗体を含有する画分を、OD_{280}およびサイズ排除クロマトグラフィーによって同定した。抗体を含有するすべての画分を２Ｍ Ｔｒｉｓ ｐＨ８．５を使用して中性化し、次いで、ＰＢＳ中で透析した。イヌモノクローナル抗体を含有する大容量の細胞上清（例えば、１０－１５Ｌ）を精製するために使用される方法は、大容積からヒト抗体を精製するために通常使用される方法とは異なっている。ヒト抗体のために、プロテインＡ精製は、通常、ｐＨ７．０から８．３および１５から２０ｍＳ／ｃｍの細胞上清結合条件、同様の条件（１×ＰＢＳ）を用いる洗浄および１５から２０ｍＳ／ｃｍで０．１Ｍ酢酸、０．１５Ｍ塩化ナトリウム、ｐＨ２．７または１５ｍＳ／ｃｍでＴｈｅｒｍｏ ＩｇＧ溶出バッファー、ｐＨ２．７を用いるヒト抗体の１段階溶出を用いて達成される。

【０３２９】

精製されたイヌ抗体を、質量分析（ＭＳ）によって分析し、発現された抗体タンパク質分子量が、アミノ酸配列に基づいて予測される質量に対応していたことを確認した。さらに、サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）によってイヌ抗体を分析して、モノマーパーセントを求めた。このデータは、マウス／イヌキメラＩｇＧ１／ｋ ｍＡｂは、２９３－６ｅ細胞において一過性に発現され得、精製後に８１％以上がモノマーであることを示した。このデータはまた、イヌ化ＩｇＧ１／ｋ ｍＡｂが、２９３－６ｅ細胞において一過性に発現され得、ほとんどの場合において、精製後に８０％以上がモノマーであることを示した。一部の場合には、タンパク質の発現は検出され得ず、一部の場合には、精製イヌ化ｍＡｂは、２４から３４％の間がモノマーである。このデータは、表１６および１７Ｂに要約されている。

【０３３０】
【表２０】
表１６：マウス／イヌキメラモノクローナル抗体特性決定データ

ハイブリドーマ俗称	マウス／イヌキメラ版の名称	マウス／イヌキメラ版の俗称	細胞上清中の推定される発現レベル（μｇ／ｍＬ）	モノマーｍＡｂ％
PR-1254972	Mu72 イヌＩｇＧ１／ｋキメラ	PR-1290646	3.2	97
PR-1254973	Mu73 イヌＩｇＧ１／ｋキメラ	PR-1290654	7	88.3
PR-1254977	Mu77 イヌＩｇＧ１／ｋキメラ	PR-1290656	0.3	82.4
PR-1254981	Mu81 イヌＩｇＧ１／ｋキメラ	PR-1290657	0.9	81
PR-1254982	Mu82 イヌＩｇＧ１／ｋキメラ	PR-1290658	11.9	92.3

【０３３１】

【表２１】

表１７Ａ：イヌ化重鎖および軽鎖の組み合わせによるイヌ化抗体の製造

重鎖／軽鎖	72.2 VH	72.3 VH	72.4 VH	73.2 VH	73.4 VH	77.2 VH	77.3 VH	77.4 VH	81.2 VH	81.4 VH	82.2 VH	82.4 VH
72.2 VL	72VHv2 / 72VLv2	72.3 CalgG1/k	72VHv4 / 72VLv2	73.5 CalgG1/k	73VHv4 / 72VLv2	77VHv2 / 72VLv2	77.5 CalgG1/k	77VHv4 / 72VLv2	81.5 CalgG1/k	81VHv4 / 72VLv2	82.5 CalgG1/k	82VHv4 / 72VLv2
72.4 VL	72VHv2 / 72VLv4	72VHv3 / 72VLv4	72.4 CalgG1/k	73VHv2 / 72VLv4	73VHv4 / 72VLv4	77VHv2 / 72VLv4	77VHv3 / 72VLv4	77VHv4 / 72VLv4	81VHv2 / 72VLv4	81VHv4 / 72VLv4	82VHv2 / 72VLv4	82VHv4 / 72VLv4
73.2 VL	72VHv2 / 73VLv2	72.5 CalgG/k	72VHv4 / 73VLv2	73.2 CalgG1/k	73VHv4 / 73VLv2	77VHv2 / 73VLv2	77.6 CalgG1/k	77VHv4 / 73VLv2	81.6 CalgG1/k	81VHv4 / 73VLv2	82.6 CalgG1/k	82VHv4 / 73VLv2
73.4 VL	72VHv2 / 73VLv4	72VHv3 / 73VLv4	72VHv4 / 73VLv4	73VHv2 / 73VLv4	73.4 CalgG/k	77VHv2 / 73VLv4	77VHv3 / 73VLv4	77VHv4 / 73VLv4	81VHv2 / 73VLv4	81VHv4 / 73VLv4	82VHv2 / 73VLv4	82VHv4 / 73VLv4
77.2 VL	72VHv2 / 77VLv2	72.6 CalgG/k	72VHv4 / 77VLv2	73.6 CalgG1/k	73VHv4 / 77VLv2	77VHv2 / 77VLv2	77.3 CalgG1/k	77VHv4 / 77VLv2	81.7 CalgG1/k	81VHv4 / 77VLv2	82.7 CalgG1/k	82VHv4 / 77VLv2
77.4 VL	72VHv2 / 77VLv4	72VHv3 / 77VLv4	72VHv4 / 77VLv4	73VHv2 / 77VLv4	73VHv4 / 77VLv4	77VHv2 / 77VLv4	77VHv3 / 77VLv4	77.4 CalgG1/k	81VHv2 / 77VLv4	81VHv4 / 77VLv4	82VHv2 / 77VLv4	82VHv4 / 77VLv4
81.2 VL	72VHv2 / 81VLv2	72.7 CalgG/k	72VHv4 / 81VLv2	73.7 CalgG1/k	73VHv4 / 81VLv2	77VHv2 / 81VLv2	77.7 CalgG1/k	77VHv4 / 81VLv2	81.2 CalgG1/k	81VHv4 / 81VLv2	82.8CalgG1/k	82VHv4 / 81VLv2
81.4 VL	72VHv2 / 81VLv4	72VHv3 / 81VLv4	72VHv4 / 81VLv4	73VHv2 / 81VLv4	73VHv4 / 81VLv4	77VHv2 / 81VLv4	77VHv3 / 81VLv4	77VHv4 / 81VLv4	81VHv2 / 81VLv4	81.4 CalgG1/k	82VHv2 / 81VLv4	82VHv4 / 81VLv4
82.2 VL	72VHv2 / 82VLv2	72VHv3 / 82VLv2	72VHv4 / 82VLv2	73VHv2 / 82VLv2	73VHv4 / 82VLv2	77VHv2 / 82VLv2	77VHv3 / 82VLv2	77VHv4 / 82VLv2	81VHv2 / 82VLv2	81VHv4 / 82VLv2	82VHv2 / 82VLv2	82VHv4 / 82VLv2
82.3 VL	72VHv2 / 82VLv3	72.8 CalgG/k	72VHv4 / 82VLv3	73.8 CalgG1/k	73VHv4 / 82VLv3	77VHv2 / 82VLv3	77.8 CalgG1/k	77VHv4 / 82VLv3	81.8 CalgG1/k	81VHv4 / 82VLv3	82.3 CalgG1/k	82VHv4 / 82VLv3
82.4 VL	72VHv2 / 82VLv4	72VHv3 / 82VLv4	72VHv4 / 82VLv4	73VHv2 / 82VLv4	73VHv4 / 82VLv4	77VHv2 / 82VLv4	77VHv3 / 82VLv4	77VHv4 / 82VLv4	81VHv2 / 82VLv4	81VHv4 / 82VLv4	82VHv2 / 82VLv4	82.4 CalgG1/k

【０３３２】

【表２２】

表１７Ｂ：イヌ化モノクローナル抗体特性決定データ

名称	俗称	ロット	細胞上清中の推定される発現レベル (ug/mL)	モノマーｍＡｂ%
72.3イヌＩｇＧ１／ｋ	PR-1313524	1804091	2.63	88.3
72.4イヌＩｇＧ１／ｋ	PR-1314949	1805928	1.6	81.5
73.2イヌＩｇＧ１／ｋ	PR-1313520	1810546	13.4	96.5
73.4イヌＩｇＧ１／ｋ	PR-1314950	1805932	1.8	90
77.3イヌＩｇＧ１／ｋ	N/A	N/A	0.7	24.8
77.4イヌＩｇＧ１／ｋ	N/A	N/A	1	34.6
81.2イヌＩｇＧ１／ｋ	N/A	ｍＡｂは検出されない	ｍＡｂは検出されない	N/A
81.4イヌＩｇＧ１／ｋ	N/A	ｍＡｂは検出されない	ｍＡｂは検出されない	N/A
82.3イヌＩｇＧ１／ｋ	PR-1313519	1810585	4.4	80.7
82.4イヌＩｇＧ１／ｋ	PR-1313521	1816320	9.8	94.2

【０３３３】

［実施例１８］：イヌ抗体の親和性分析

精製マウス／イヌキメラ抗体およびイヌ化抗体を、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００機器を使用してイヌＮＧＦとの親和性について分析した。ヤギ抗イヌＩｇＧ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）を、アミンカップリング手順を製造業者の使用説明書（Ｂｉａｃｏｒｅ）に従って使用して５０００－１００００ＲＵでＣＭ５チップ上に固定化した。イヌＮＧＦを、マウス／イヌキメラ抗体に対して５０－０．１５６ｎＭまたはイヌ化抗体に対して１０－０．１５６ｎＭの濃度範囲で、５０μＬ／分で注入した。会合速度を５分間モニタリングし、解離速度を１０－２０分間モニタリングした。５０－７５μＬの１０ｍＭグリシンｐＨ１．５を５０－１００μＬ／分の流速で使用してチップ表面を再生した。データは、Ｂｉａｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　Ｔ１００ソフトウェアバージョン２．０．２、ソフトウェア、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）を使用して分析した。マウス／イヌキメラ抗体について確立されている全体親和性パラメータが、表１８に要約されており、イヌ化抗体については、表１９に要約されている。このデータは、単離マウス／イヌキメラ抗ＮＧＦ　ｍＡｂは、急速な結合速度（2×10^{6}超から）および遅い解離速度（3×10^{-3}未満から）を有することを示す。マウス／イヌ抗ＮＧＦ　ｍＡｂの全体K_Dは、約１３００ｐＭから１．６ｐＭに及ぶ。このデータはまた、単離イヌ化キメラ抗ＮＧＦ　ｍＡｂが、急速な結合速度（6×10^{6}超から）および遅い解離速度（2×10^{-4}未満から）を有することを示す。イヌ化抗ＮＧＦ　ｍＡｂの全体K_Dは、約４２ｐＭから１．２ｐＭに及ぶ。

【０３３４】

【表２３】

表１８：イヌＮＧＦに対するマウス／イヌキメラモノクローナル抗体の親和性パラメータ

名称	俗称	結合速度 (1/M·S)	解離速度 (1/S)	全体親和性 (M)
Mu72イヌＩｇＧ１／ｋ	PR-1290646	$2.9x10^{6}$	$3.8x10^{-3}$	$1.3x10^{-9}$
Mu73イヌＩｇＧ１／ｋ	PR-1290654	$6.3x10^{6}$	$9x10^{-5}$	$1.4x10^{-11}$
Mu77イヌＩｇＧ１／ｋ	PR-1290656	$9.1x10^{6}$	$1.9x10^{-4}$	$2.1x10^{-11}$
Mu81イヌＩｇＧ１／ｋ	PR-1290657	$4.2x10^{6}$	$3.5x10^{-4}$	$8.2x10^{-11}$
Mu82イヌＩｇＧ１／ｋ	PR-1290658	$8.7x10^{6}$	$1.4x10^{-5}$	$1.6x10^{-12}$

【０３３５】

【表２４】

表１９：イヌＮＧＦに対するイヌ化モノクローナル抗体の親和性パラメータ

名称		結合速度 (1/M·s)	解離速度 (1/s)	全体親和性 (M)
73.2 イヌＩｇＧ１／ｋ PR-13113520	実験 1	$6.3x10^{6}$	$2.8x10^{-4}$	$4.4x10^{-11}$
	実験 2	$6.9x10^{6}$	$2.9x10^{-4}$	$4.2x10^{-11}$
	平均	$6.6x10^{6}$	$2.9x10^{-4}$	$4.3x10^{-11}$
82.3 イヌＩｇＧ１／ｋ PR-13113519	実験 1	$8.2x10^{6}$	$2x10^{-5}$	$2.4x10^{-12}$
	実験 2	$8.5x10^{6}$	$1.3x10^{-5}$	$1.6x10^{-12}$
	平均	$8.4x10^{6}$	$1.7x10^{-5}$	$2x10^{-12}$
82.4 イヌＩｇＧ１／ｋ PR-13113521	実験 1	$8.6x10^{6}$	$1.1x10^{-5}$	$1.2x10^{-12}$
	実験 2	$7.7x10^{6}$	$1.2x10^{-5}$	$1.5x10^{-12}$
	平均	$8.2x10^{6}$	$1.2x10^{-5}$	$1.4x10^{-12}$

【０３３６】

［実施例１９］：ＴＦ－１細胞増殖効力アッセイによるイヌ抗体の特性決定

精製マウス／イヌキメラ抗体およびイヌ化抗体を、アッセイにおいて７０ｐＭイヌＮＧＦを使用するＴＦ－１細胞増殖効力アッセイ（先に記載された）を使用して特性決定した。要約された効力データが、表２０および２１にある。データは、７０ｐＭのイヌＮＧＦの存在下で、マウス／イヌキメラ抗ＮＧＦ抗体のすべてが、ｎＭ未満の効力を示し、すべてが５０ｐＭ未満の効力を示すことを示す。データは、７０ｐＭのイヌＮＧＦの存在下で、イヌ化抗ＮＧＦ抗体の一部が、７０ｐＭイヌＮＧＦに対して中和効力を有さないことを示す。一部のイヌ化ｍＡｂは、ｎＭ未満の効力を有し、一部は、２０ｐＭ未満の効力を有する。

【０３３７】

【表２５】

表２０：イヌＮＧＦ誘導性ＴＦ－１細胞増殖に対するマウス／イヌキメラＮＧＦモノクローナル抗体の効力

名称	俗称	ロット	IC_{50} (nM)
Mu72 イヌＩｇＧ１／ｋ キメラ	PR-1290646	1785614	0.041
Mu73 イヌＩｇＧ１／ｋ キメラ	PR-1290654	1785658	0.008
Mu77 イヌＩｇＧ１／ｋ キメラ	PR-1290656	1785699	0.028
Mu81 イヌＩｇＧ１／ｋ キメラ	PR-1290657	1778832	0.012
Mu82 イヌＩｇＧ１／ｋ キメラ	PR-1290658	1785732	0.007

【０３３８】

【表２６】

表２１：イヌＮＧＦ誘導性ＴＦ－１細胞増殖（Ｎ／Ａ＝該当なし）に対するイヌ化ＮＧＦモノクローナル抗体の効力

名称	俗称	ロット	IC_{50} (nM)
72.3 イヌＩｇＧ１／ｋ	PR-1313524	1804091	0
72.4 イヌＩｇＧ１／ｋ	PR-1314949	1805928	0
73.2 イヌＩｇＧ１／ｋ	PR-1313520	1810546	0.422
73.4 イヌＩｇＧ１／ｋ	PR-1314950	1805932	0
77.3 イヌＩｇＧ１／ｋ	N/A	N/A	0.625
77.4 イヌＩｇＧ１／ｋ	N/A	N/A	0
82.3 イヌＩｇＧ１／ｋ	PR-1313519	1810585	0.017
82.4 イヌＩｇＧ１／ｋ	PR-1313521	1816320	0.016

【０３３９】

［実施例２０］：イヌ化抗ＮＧＦ抗体の溶解度および安定性の特性決定

２種のイヌ化抗ＮＧＦ抗体の保存溶液（７３．２イヌＩｇＧ１／ｋおよび８２．４イヌＩｇＧ１／ｋ）を入手した。［これらは実施例１３で製造したイヌ化Ａｂ？］抗体を５ｍｇ／ｍｌ未満の濃度で、リン酸バッファー生理食塩水（ＰＢＳ）で製剤した（ＰＢＳは、それだけには限らないが、以下の成分：ｐＨ７．４の１５ｍＭリン酸バッファーおよび１５０ｍＭ塩化ナトリウムを含有する）。

【０３４０】

溶解度：

ＰＢＳにおける高濃度でのイヌ化抗体の溶解度を、抗体をＡｍｉｃｏｎ３０Ｋ分子量カットオフ遠心分離スピンフィルターを用いて濃縮することによって評価した。最終濃度は、ＵＶ吸光度によって決定した。

【０３４１】

室温で、７３．２イヌＩｇＧ１／ｋは、少なくとも５４ｍｇ／ｍｌまで可溶性であり、８２．４イヌＩｇＧ１／ｋは、少なくとも８３ｍｇ／ｍｌまで可溶性であった。それらの濃度で５℃で５時間保存された場合、７３．２イヌＩｇＧ１／ｋは、容器の底にゲル層を形成し、一方で、８２．４イヌＩｇＧ１／ｋは、均一溶液のままであるようであった。室温に再平衡化すると、７３．２イヌＩｇＧ１／ｋは均一溶液になった。７３．２イヌＩｇＧ１／ｋを２７ｍｇ／ｍｌに希釈すると、５℃で均一溶液のままであるようであった。

【０３４２】

それに比べて、アダリムマブ、ヒト抗体は、５℃および室温で、少なくとも１５０ｍｇ／ｍｌの溶解度を示した。これは、７のｐＨおよび１５０ｍＭの塩化ナトリウム濃度を有する製剤中で観察された。観察結果は、表２２に記載する。

【０３４３】

【表２７】

表２２：ＰＢＳにおける、７３．２イヌＩｇＧ１／ｋ、８２．４イヌＩｇＧ１／ｋおよびヒト抗体アダリムマブの溶解度

抗体	室温溶解度（ｍｇ／ｍｌ）	5℃に静置した場合の観察結果
７３．２イヌＩｇＧ１／ｋ	≧５４	容器の底で形成されたゲル層＊
８２．４イヌＩｇＧ１／ｋ	≧８３	溶液のままであるようであった
アダリムマブ	≧１５０	溶液のままであるようであった
＊室温に戻すと、均一な溶液に戻り；２７ｍｇ／ｍｌに希釈すると、5℃で均一な溶液のままであるようであった		

【０３４４】

７３．２イヌＩｇＧ１／ｋ　８２．４イヌＩｇＧ１／ｋの溶解度をまた、１５ｍＭヒスチジンバッファーｐＨ６．０において評価した。これは、ヒト治療用抗体を製剤するために通常使用されるバッファーである。７３．２イヌＩｇＧ１／ｋおよび８２．４イヌＩｇＧ１／ｋの保存溶液を含むＰＢＳバッファーを、Ａｍｉｃｏｎ　３０Ｋ分子量カットオフ遠心分離スピンフィルターを使用してヒスチジンバッファーと交換した。バッファー交換後、抗体は白色沈殿を示し、室温で２ｍｇ／ｍｌ未満の溶解度であると、ＵＶ吸光度によって決定された。それに比べて、ヒト抗体アダリムマブは、１５ｍＭヒスチジンバッファーｐＨ６．０中、室温で少なくとも１５０ｍｇ／ｍｌの濃度に達すると観察された。これらの観察結果を表２３に要約する。

【０３４５】

【表２８】

表２３：１５mMヒスチジンバッファーｐＨ６．０における抗ＮＧＦイヌ化抗体７３．２イヌＩｇＧ１／ｋ、８２．４イヌＩｇＧ１／ｋおよびヒト抗体アダリムマブの溶解度

抗体	室温溶解度（ｍｇ／ｍｌ）	観察結果
７３．２イヌＩｇＧ１／ｋ	≧２	白色沈殿が観察された
８２．４イヌＩｇＧ１／ｋ	≧２	白色沈殿が観察された
アダリムマブ	≧１５０	溶液のままであるようであった

【０３４６】

凍結解凍安定性

ＰＢＳを用いて１ｍｇ／ｍｌに希釈した後の、ＰＢＳ中の７３．２イヌＩｇＧ１／ｋおよび８２．４イヌＩｇＧ１／ｋの凍結解凍（ＦＴ）安定性の評価を実施した。両抗体とも－８０℃で少なくとも４時間凍結した。次いで、それらを３０℃の水浴中解凍した（これが１凍結解凍サイクルを構成する）。サイズ排除ＨＰＬＣ（ＳＥＣ）によって４凍結解凍サイクルについて安定性を評価した。凍結解凍分析を表２４に要約する。

【０３４７】

【表２９】

表２４：PBS中、1mg／ｍｌでの７３．２イヌＩｇＧ１／ｋおよび８２．４イヌＩｇＧ１／ｋの凍結解凍安定性

抗体	種類	種類のパーセンテージ			
		ＦＴ前	ＦＴ１回後	ＦＴ２回後	ＦＴ４回後
73.2イヌＩｇＧ１／ｋ	モノマー	97.4	97.3	97.3	97.2
	凝集体	1.7	1.8	1.8	1.8
	断片	0.9	0.9	0.9	1
82.4イヌＩｇＧ１／ｋ	モノマー	96.6	96.6	96.6	96.1
	凝集体	2.9	2.9	2.9	3.2
	断片	0.5	0.5	0.5	0.7

【０３４８】

保存安定性および加速安定性：

１０ｍｇ／ｍＬの濃度および５から８のｐＨ範囲内ならびに低（約７．５ｍＭ）および高（＞約１５０ｍＭ）イオン強度で製剤された場合の７３．２イヌＩｇＧ１／ｋおよび８２．４イヌＩｇＧ１／ｋの安定性を評価した。以下のバッファーおよび塩濃度において抗体の安定性をモニタリングすることによってこれらの条件での安定性を評価した：（Ａ）１５ｍＭ酢酸ｐＨ５；（Ｂ）１５ｍＭ酢酸ｐＨ５＋１５０ｍＭ　ＮａＣｌ；（Ｃ）１５ｍＭヒスチジンｐＨ６＋１５０ｍＭ　ＮａＣｌ；（Ｄ）１５ｍＭリン酸ｐＨ７．４；（Ｅ）ＰＢＳ　ｐＨ７．４；（Ｆ）１５ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ７．５；（Ｇ）１５ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ８．０。抗菌薬としてナトリウムアジド（０．０２％）をすべてのバッファーに添加した。

【０３４９】

ＰＢＳ中の、７３．２イヌＩｇＧ１／ｋおよび８２．３イヌＩｇＧ１／ｋの保存溶液を、３０Ｋ分子量カットオフ遠心分離スピンフィルターを使用して最大１５ｍｇ／ｍｌに濃縮した。次いで、ミニ透析１ｋＤａ分子量カットオフ透析チューブ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して、上記で列挙されたバッファーに対してそれらを１８時間透析した。透析後、サンプルを、それぞれのバッファーで１０ｍｇ／ｍｌの最終濃度に希釈した。

１５０μｌの各サンプルをクライオバイアルに分注し、次いで、これを４０℃または５℃で保存した。サンプルを、時間＝０時間（ＴＯ）、７日（Ｔ７ｄ）および２１日（Ｔ２１ｄ）で分析し、安定性をＳＥＣによって評価した。

【０３５０】

４０℃で２１日後、加速安定性試験は、７３．２イヌＩｇＧ１／ｋおよび８２．３イヌＩｇＧ１／ｋは、７．４より高いｐＨ値よりも７．４未満のｐＨ値でかなり多い断片化を有することを示した。それに比べて、ヒト抗体アダリムマブは、４０℃で２１日にわたって、４から８のｐＨ範囲内で少ない断片化を示した。特に、ｐＨ６でのアダリムマブの断片化は、ｐＨ６での７３．２イヌＩｇＧ１／ｋまたは８２．４イヌＩｇＧ１／ｋの断片化よりもかなり少ない。また、ｐＨ４の高ストレス条件でのアダリムマブは、ｐＨ５の低ストレス条件の７３．２イヌＩｇＧ１／ｋまたは８２．４イヌＩｇＧ１／ｋと比較して同等以下の断片化を示した。安定性分析の結果および断片化プロフィールをそれぞれ、表２５および２６に示す。これらのデータは、イヌＩｇＧ１／ｋモノクローナル抗体が、ヒトＩｇＧ１／ｋモノクローナル抗体のものと比較して異なる分解プロフィールを有することを示唆する。具体的には、断片化は、ｐＨ６以下でヒト抗体についてよりもイヌＩｇＧ１／ｋ抗体についてより大規模であると思われる。

【０３５１】

【表３０】

表２５：５℃および４０℃での、７および２１日での、種々の製剤中での、７３．２イヌＩｇＧ１／ｋ、８２．４イヌＩｇＧ１／ｋおよびヒト抗体アダリムマブについてのＳＥＣから得た安定性データ

５℃での７３．２イヌＩｇＧ１／ｋ									
	モノマーパーセンテージ			凝集体パーセンテージ			断片パーセンテージ		
バッファー	T0	T7d	T21d	T0	T7d	T21d	T0	T7d	T21d
A (pH 5)	94.6	91.4	90.3	2.9	3.1	3.4	2.6	5.5	6.2
B (pH 5)	95.2	98.2	98.2	3.4	0.4	0.5	1.4	1.4	1.3
C (pH 6)	93.9	98.0	97.8	4.4	0.5	0.7	1.8	1.5	1.5
D (pH 7.4)	94.3	97.9	97.7	4.7	0.6	0.8	1.0	1.5	1.5
E (pH 7.4)	94.5	97.9	97.8	4.5	0.5	0.8	1.0	1.6	1.5
F (pH 7.5)	94.5	98.0	97.8	4.0	0.5	0.8	1.6	1.5	1.5
G (pH 8.0)	93.7	97.8	97.6	4.6	0.7	0.9	1.7	1.5	1.5
４０℃での７３．２イヌＩｇＧ１／ｋ									
	モノマーパーセンテージ			凝集体パーセンテージ			断片パーセンテージ		
バッファー	T0	T7d	T21d	T0	T7d	T21d	T0	T7d	T21d
A (pH 5)	94.6	81.3	79.0	2.9	4.5	5.1	2.6	14.2	15.9
B (pH 5)	95.2	92.1	90.9	3.4	0.6	1.2	1.4	7.4	7.8
C (pH 6)	93.9	94.4	91.6	4.4	0.6	1.1	1.8	5.0	7.3
D (pH 7.4)	94.3	97.5	96.6	4.7	0.9	1.6	1.0	1.5	1.8
E (pH 7.4)	94.5	98.0	97.3	4.5	0.6	1.1	1.0	1.4	1.6
F (pH 7.5)	94.5	97.5	96.3	4.0	0.9	1.8	1.6	1.6	1.9
G (pH 8.0)	93.7	97.0	95.2	4.6	1.2	2.6	1.7	1.8	2.2

５℃での８２．４イヌＩｇＧ１／ｋ									
	モノマーパーセンテージ			凝集体パーセンテージ			断片パーセンテージ		
バッファー	T0	T7d	T21d	T0	T7d	T21d	T0	T7d	T21d
A (pH 5)	96.7	98.1	98.7	2.3	1.3	.8	1.0	0.5	0.5
B (pH 5)	96.3	97.2	97.3	2.4	2.3	2.3	1.3	0.5	0.4
C (pH 6)	97.0	97.1	97.1	2.6	2.3	2.3	0.4	0.6	0.6
D (pH 7.4)	96.4	97.0	97.1	2.5	2.4	2.5	1.0	0.5	0.4
E (pH 7.4)	96.7	96.8	96.8	2.8	2.5	2.6	0.5	0.7	0.6
F (pH 7.5)	96.8	97.1	96.9	2.9	2.5	2.5	0.2	0.5	0.6
G (pH 8.0)	96.6	96.9	96.9	2.5	2.5	2.5	0.9	0.6	0.6
４０℃での８２．４イヌＩｇＧ１／ｋ									
	モノマーパーセンテージ			凝集体パーセンテージ			断片パーセンテージ		
バッファー	T0	T7d	T21d	T0	T7d	T21d	T0	T7d	T21d
A (pH 5)	96.7	93.1	87.8	2.3	2.8	4.2	1.0	4.1	8.0
B (pH 5)	96.3	93.3	91.3	2.4	2.5	3.1	1.3	4.3	5.6
C (pH 6)	97.0	94.1	92.5	2.6	2.3	2.7	0.4	3.5	4.8
D (pH 7.4)	96.4	93.5	93.8	2.5	3.4	3.3	1.0	3.1	2.9
E (pH 7.4)	96.7	95.1	93.6	2.8	2.4	2.6	0.5	2.5	3.8
F (pH 7.5)	96.8	93.4	923.6	2.9	2.6	3.0	0.2	4.0	0.5
G (pH 8.0)	96.6	94.8	92.7	2.5	2.8	3.5	0.9	2.4	0.4

４０℃でのアダリムマブ									
	モノマーパーセンテージ			凝集体パーセンテージ			断片パーセンテージ		
pH	T0	T7d	T21d	T0	T7d	T21d	T0	T7d	T21d
4	99	98	95	<1	<2	0.5	<1	<2	4.5
6	99	99	99	<1	<1	0.3	<1	<1	0.7
8	99	98	98	<1	<2	1.2	<1	<2	0.8

【０３５２】

【表３１】

表２６：４０℃での、２１日での、種々の製剤中での、７３．２イヌＩｇＧ１／ｋ、８２．４イヌＩｇＧ１／ｋおよびヒト抗体アダリムマブについてのＳＥＣから得た断片化プロフィール

抗体	バッファー	４０℃で２１日にわたる断片化パーセントの増大
73.2 イヌＩｇＧ１／ｋ	A (pH 5)	13.3
	B (pH 5)	6.4
	C (pH 6)	5.5
	D (pH 7.4)	0.8
	E (pH 7.4)	0.6
	F (pH 7.5)	0.3
	G (pH 8.0)	0.5
82.4 イヌＩｇＧ１／ｋ	A (pH 5)	7.0
	B (pH 5)	4.3
	C (pH 6)	4.4
	D (pH 7.4)	1.9
	E (pH 7.4)	3.3
	F (pH 7.5)	0.3
	G (pH 8.0)	-0.5
アダリムマブ	pH 4	< 4.5
	pH 6	< 0.7
	pH 8	< 0.8

【０３５３】

［実施例２１］：ＰＫ血清サンプル分析のイヌ単回用量ＰＫ研究および抗原架橋アッセイ

雑種イヌにおいて、４．５ｍｇ／ｋｇ（静脈内または皮下）の単回用量後に７３．２イヌＩｇＧ１／ｋおよび８２．４イヌＩｇＧ１／ｋの血清レベルを分析した。注射後、６７２時間にわたって静脈血の１３サンプルを採取した。血液サンプルを凝固させ、抗体定量化のために血清を回収した。

【０３５４】

ＮＧＦ架橋アッセイを開発して、血清中のイヌ抗ＮＧＦ　ｍＡｂを定量化した。ストレプトアビジンでコーティングした９６ウェルプレート（ＭＳＤ番号Ｌ１１ＳＡ－１）をブロッカーＡ（ＭＳＤ番号Ｒ９３ＢＡ－４）を用いてブロッキングした。血清中（またはＰＢＳ中）に存在するイヌ抗ＮＧＦ抗体を、等モル比のビオチンタグをつけたＮＧＦおよびＳｕｌｆｏタグをつけたＮＧＦ（Ｓｕｌｆｏ試薬ＭＳＤ番号Ｒ９１ＡＮ－１）と混合し、インキュベートして、ＮＧＦ＋抗体複合体を形成した。アッセイにおけるビオチンタグをつけたＮＧＦおよびｓｕｌｆｏタグをつけたＮＧＦの最終濃度は、１－２ｎＭの間とした。ＮＧＦ－抗体複合体をストレプトアビジンでコーティングしたプレートに添加し、６０分間結合させた。インキュベートした後、プレートをＰＢＳおよび０．０５％　Ｔｗｅｅｎ－２０で洗浄し、Ｒｅａｄ　Ｂｕｆｆｅｒ　Ｔ（ＭＳＤ番号Ｒ９２ＴＣ－１）中で、結合しているＮＧＦ抗体複合体を、ＭＳＤ　ＳＥＣＴＯＲ　Ｉｍａｇｅｒ　６０００で検出した。データを定量化して、μｇ／サンプル液体１ｍＬで抗体の総量を推定し、表２７－３０において以下に提供する。

【０３５５】

【表３２】

表２７：単回皮下用量後の８２．４イヌＩｇＧ１／ｋの血清濃度

イヌ番号	1073305	1072602	1072104	1072306	1072105
注射後時間	ug/mL				
0	0.0	0.0	0	0	0.1
0.25	2.6	0.4	0.0	2.24	0.1
1	9.0	2.2	0.9	9.07	0.4
8	31.5	17.7	13.8	32.55	12.8
12	41.1	20.5	18.7	33.31	24.5
24	42.2	25.6	23.2	35.73	23.8
48	52.3	37.2	36.3	41.35	35.3
72	51.2	41.1	34.4	38.91	36.8
144	47.1	42.6	35.2	33.46	36.7
240	39.0	32.4	29.0	26.03	31.7
336	30.9	28.2	24.1	19.99	26.8
504	20.1	18.3	16.0	11.03	18.6
672	16.3	12.8	10.4	5.81	5.4

【０３５６】

【表３３】

表２８：単回静脈内用量後の８２．４イヌＩｇＧ１／ｋの血清濃度

イヌ番号	1072705	1073804	1073303	1073903	1074502
注射後時間	ug/mL				
0	0	0	0	0	0
0.25	102.6	83.1	84.0	80.1	81.7
1	106.7	70.1	87.4	74.1	81.9
8	88.4	65.7	68.1	67.4	68.9
12	91.5	61.6	62.6	62.1	59.3
24	87.4	60.0	57.2	53.9	53.0
48	76.6	49.9	52.6	50.9	50.2
72	60.3	49.1	46.0	40.8	44.6
144	45.7	43.1	36.1	35.7	36.0
240	37.2	34.4	32.6	24.3	32.6
336	31.7	32.7	24.8	20.6	20.1
504	23.5	17.4	18.5	12.2	12.8
672	15.2	10.7	12.5	7.3	8.3

【０３５７】

【表３４】

表２９：単回皮下用量後の７３．２イヌＩｇＧ１／ｋの血清濃度

イヌ番号	1072607	1074307	1072606	1074503
注射後時間	ug/mL			
0	0	0	0	0
0.25	0	0	2.1	0
1	1.0	5.9	4.7	0.0
8	18.6	31.3	18.7	7.4
12	22.7	32.5	21.3	8.7
24	26.8	33.2	24.2	12.0
48	33.7	35.9	28.4	16.2
72	35.0	37.6	30.7	19.4
144	34.9	37.4	30.2	21.8
240	31.6	31.8	26.8	22.0
336	24.4	24.7	22.6	16.5
504	15.3	14.3	13.8	10.6
672	6.8	9.2	5.1	5.4

【０３５８】
【表３５】

表３０：単回静脈内用量後の７３．２イヌＩｇＧ１／ｋの血清濃度

イヌ番号	1072804	1073304	1072604
注射後時間	ug/mL		
0	0	0	0
0.25	93.6	33.2	108.5
1	86.3	30.8	103.1
8	76.9	22.1	85.4
12	72.1	21.4	80.5
24	63.0	17.1	68.0
48	54.6	14.6	56.8
72	49.4	13.5	50.8
144	41.4	10.2	41.4
240	35.4	8.9	30.8
336	30.5	6.3	20.9
504	22.2	4.0	3.4
672	14.8	3.4	0.0

【０３５９】
［実施例２２］：血清濃度データの薬物動態分析
非コンパートメント分析によってＷｉｎＮｏｎｌｉｎソフトウェア（Ｐｈａｒｓｉｇｈｔ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ｖｉｅｗ、ＣＡ）を使用して、各動物について、静脈内（ＩＶ）および皮下（ＳＣ）両投薬経路の薬物動態パラメータを算出した。その他の算出、例えば、平均、標準偏差（ＳＤ）および皮下バイオアベイラビリティパーセント（Ｆ：％）を、マイクロソフトエクセルソフトウェア（Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ　Ｒｅｄｍｏｎｄ、ＷＡ）を使用して実施した。データを、表３１および３２に示す。
【０３６０】
【表３６】

表３１：単回静脈内用量後の７３．２イヌＩｇＧ１／ｋの薬物動態分析

IV			SC			
T1/2（日）	Vss (mL/kg)	Cl (mL/h/kg)	T1/2（日）	Cmax (ug/mL)	Tmax（日）	%F
14.8*	71	0.15	8.0*	31.3	4.8	51

*調和平均

【０３６１】
【表３７】

表３２：単回静脈内用量後の８２．４イヌＩｇＧ１／ｋの薬物動態分析

IV			SC			
T1/2（日）	Vss (mL/kg)	Cl (mL/h/kg)	T1/2（日）	Cmax (ug/mL)	Tmax（日）	%F
10.9*	73	0.19	11.6*	41.9	3.0	94

*調和平均

【０３６２】
データは、イヌｍＡｂ７３．２および８２．４は、ＩＶまたはＳＣ投薬された場合に約８から約１５日の半減期を有することを示し、これは、これらの分子が哺乳動物抗体様半減期および全体ＰＫパラメータを示すことを示唆する。

【０３６３】
［実施例２３］：イヌ抗体を力価測定するためのＥＬＩＳＡ
細胞上清（またはその他の液体）中のイヌ抗体を定量化するために、高結合ＥＩＡプレート（Ｃｏｓｔａｒ番号９０１８）を、ＰＢＳ中、４μｇ／ｍｌのポリクローナルヤギ抗イヌＩｇＧ抗体（Ｒｏｃｋｌａｎｄ番号６０４－１１０２）でコーティングした。ＰＢＳ中、２％の脱脂乳でブロッキングした後、プレートにイヌモノクローナル抗体を添加し、プレートをＰＢＳおよび０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０で洗浄した。０．１μｇ／ｍｌの、ＨＲＰタグをつけたヤギ抗イヌＩｇＧ抗体（Ｒｏｃｋｌａｎｄ番号６０４－１３０２）を用いて、結合しているイヌｍＡｂを検出した。プレートをＰＢＳおよび０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０で洗浄した。ＴＭＢ基質（Ｎｅｏｇｅｎ番号３０８１７７）の添加によってイヌｍＡｂを検出し、１ＮのＨＣｌを用いて反応を停止した。４５０ｎＭでの吸収によって結合しているイヌ抗体を定量化し、抗体の総量をμｇ／サンプル液体１ｍＬで推定した。
【０３６４】
本開示は、分子生物学の分野で周知のそれらの全技術を参照により組み込む。これらの技術として、限定ではなく、以下の刊行物に記載された技術が挙げられる：
【０３６５】
【表３８】
Ausubel, F.M. et al. eds., Short Protocols In Molecular Biology (4th Ed. 1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X).

Lu and Weiner eds., Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysis (2001) BioTechniques Press. Westborough, MA. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X).

Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

Old, R.W. & S.B. Primrose, Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V.2:409 pp. (ISBN 0-632-01318-4).

Sambrook, J. et al. eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6).

Winnacker, E.L. From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology (1987) VCH Publishers, NY (translated by Horst Ibelgaufts). 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4).

【０３６６】
本明細書において開示されたすべての参考文献、刊行物および特許出願は、参照によりそれらの全文が本明細書に組み込まれる。
【０３６７】
いくつかの実施形態、態様および特徴が上記で記載されたが、当業者ならば、本開示または添付の特許請求の範囲において定義されるような開示から逸脱することなく、記載された実施形態および特徴の改変および変法を行うことができるということは理解される。

【図１】

Figure 1

マウス抗NGF抗体
配列番号1(PR-1254972VHヌクレオチド配列)

GAAGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTTCC
TGATACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTGACTATTACATGTTTT
GGATTCGCCAGACTCCGGGAAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGA
TGGTGGTAGTTACACCTACTACACAGACAATGTAAAGGGCCGATTCACCATC
TCCAGAGACAATGTCAAGAACAACCTGTACCTGCAAATGAGCCATCTGAAGT
CTGCGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGATTGGAGTGACTCCGAGGG
GTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

【図２】

Figure 2

配列番号2(PR-1254972VHアミノ酸)

EVHLVESGGGLVKPGGFLILSCAASGFTFSDYYMFWIRQTPGKRLEWVATISDGG
SYTYYTDNVKGRFTISRDNVKNNLYLQMSHLKSADTAMYYCARDWSDSEGFA
YWGQGTLVTVSA

【図３】

Figure 3

配列番号3(PR-1254972VLヌクレオチド配列)

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA
AGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGTATTGTACAAAGTAATGGAAAC
ACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGA
TCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGT
GGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATC
TGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACATGTTCCATTCACGTTCGGCTCG
GGGACAAAGTTGGAAATAAAACGG

【図４】

Figure 4

配列番号4(PR-1254972VLアミノ酸)

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVQSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPFTFGSGTKLEI
KRC

【図５】

Figure 5

配列番号5(PR-1254973VHヌクレオチド配列)

CAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTTCAG
TGAAGCTGTCCTGTAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACTGGATGCAC
TGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAGGATTGATC
CTTATGGTGGTGGTACTAAGCACAATGAGAAGTTCAAGAGGAAGGCCACAGT
GACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATCCTGCTCAGCAGCCTGACA
TCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTACAAGATCTGGTTACGACTATTACTT
CGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

【図６】

Figure 6

配列番号6(PR-1254973VHアミノ酸)

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMHWVKQRPGQGLEWIGRIDP
YGGGTKLNEKFKRKATVTADKSSSTAYILLSSLTSEDSAVYYCTRSGYDYYFDV
WGTGTTVTVSS

【図７】

Figure 7

配列番号7(PR-1254973VLヌクレオチド配列)

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAAA
CTGTCACCGTCACATGTCGAGCAAGTGAAAATATTTACAGTTTTTTAGCATGG
CATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAATGCAAATA
CCTTAGCAGAGGGTGTGCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACA
GTTTTCTCTGAAGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAGTTATTACT
GTCAACATCATTTTGGGACTCCATTCACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGA
AATAAAACGG

【図８】

Figure 8

配列番号8(PR-1254973VLアミノ酸)

DIQMTQSPASLSASVGETVTVTCRASENIYSFLAWHQQKQGKSPQLLVYNANTL
AEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYCQHHFGTPFTFGSGTKLEIKR

【図９】

Figure 9

配列番号9(PR-1254977VHヌクレオチド配列)

GAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAG
TCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATATAC
TGGGTGAAACAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGAT
CCTGCGAATGGAAATACTATATATGCCTCAAAGTTCCAGGGCAAGGCCTCTA
TAACAGCAGACACATCATCCAACACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGAC
ATCTGGGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTGGTTATGGTTACTACGCCTACT
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

【図１０】

Figure 10

配列番号10(PR-1254977VHアミノ酸)

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIYWVKQRPEQGLEWIGRIDPAN
GNTIYASKFQGKASITADTSSNTAYMQLSSLTSGDTAVYYCAGYGYYAYWGQG
TTLTVSS

【図１１】

Figure 11

配列番号11(PR-1254977VLヌクレオチド配列)

GATGTTGTTCTGACCCAAACTCCACTCTCTCTGCCTGTCAATATTGGAGATCA
AGCCTCTATCTCTTGCAAGTCTACTAAGAGTCTTCTGAATGGTGATGGATTCA
CTTATTTGGACTGGTACTTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTAATA
TATTTGGTTTCTAATCGATTTTCTGGAGTTCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGG
GTCAGGAACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTG
GGAGTTTATTATTGCTTCGAGAGTAACTATCTATTCACGTTCGGCTCGGGGAC
AAAGTTGGAAATGAAACGG

【図１２】

Figure 12

配列番号12(PR-1254977VLアミノ酸)

DVVLTQTPLSLPVNIGDQASISCKSTKSLLNGDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYL
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFESNYLFTFGSGTKLEM
KR

【図１３】

Figure 13

配列番号13(PR-1254980VHヌクレオチド配列)

GAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAG
TCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATATAT
TGGGTGAAACAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGAAGGATTGAT
CCTGCGAATGGAAATACTATATATGCCTCAAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTA
TAACAGCAGACACATCATCCAACACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGAC
ATCTGGGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTGGTTATGGTTACTACGCCTACT
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

【図１４】

Figure 14

配列番号14(PR-1254980VH7ミノ酸)

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIYWVKQRPEQGLEWIGRIDPAN
GNTIYASKFQGKATITADTSSNTAYMQLSSLTSGDTAVYYCAGYGYYAYWGQG
TTLTVSS

【図１５】

Figure 15

配列番号15(PR-1254980VLヌクレオチド配列)

GATGTTGTTCTGACCCAAACTCCACTCTCTCTGCCTGTCAATATTGGAGATCA
AGCCTCTATCTCTTGCAAGTCTACTAAGAGTCTTCTGAATGGTGATGGATTCA
CTTATTTGGACTGGTACTTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTAATA
TATTTGGTTTCTAATCGATTTTCTGGAGTTCCGGACAGGTTCAGTGGCAGTGG
GTCAGGAACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTG
GGAGTTTATTATTGCTTCGAGAGTAACTATCTATTCACGTTCGGCTCGGGGAC
AAAGTTGGAAATGAAACGG

【図１６】

Figure 16

配列番号16(PR-1254980VL7ミノ酸)

DVVLTQTPLSLPVNIGDQASISCKSTKSLLNGDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYL
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFESNYLFTFGSGTKLEM
KR

【図１７】

Figure 17

配列番号17(PR-1254981VHヌクレオチド配列)

GAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGCAGTGAAGCCTGGAGGGTCC
CTGACACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACCATTACATGTA
TTGGGTTCGCCAGACTCCGGAAAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCGTCCATTAGT
GATGGTGGTGCTTACACCTTCTATCCAGACACTGTCAAGGGCCGATTCACCAT
CTCCAGAGACAATGTCAACAACAACCTGTACCTGCAAATGCGCCATCTGAAG
TCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTACAAGAGAGGAGAGTGCTAACAACG
GGTTTGCTTTCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

【図１８】

Figure 18

配列番号18(PR-1254981VH7ミノ酸)

EVQLVESGGGAVKPGGSLTLSCAASGFTFSNHYMYWVRQTPEKRLEWVASISD
GGAYTFYPDTVKGRFTISRDNVNNNLYLQMRHLKSEDTAMYYCTREESANNGF
AFWGQGTLVTVSA

【図１９】

Figure 19

配列番号19(PR-1254981VLヌクレオチド配列)

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA
AGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTCTACATAGTAATGGAAACA
CCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAACCTCCTGAT
CTACAGAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCCGACAGGTTCAGTGGCAGTG
GATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCT
GGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTGCACATGTTCCATTCACGTTCGGCTCGG
GGACAAAGTTAGAAATAAAACGG

【図２０】

Figure 20

配列番号20(PR-1254981VL7ミノ酸)

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSILHSNGNTYLEWYLQKPGQSPNLLIYRV
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGAHVPFTFGSGTKLEIK
R

【図２１】

Figure 21

配列番号21(PR-1254982VHヌクレオチド配列)

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCC
TGTCCATCACATGCACCGTCTCAGGGTTCTCATTAACCGGCTATAATATAAAC
TGGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGG
GTTATGGAGACACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAG
CAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACT
GATGACACAGCCAGGTATTATTGTGCCAGAGATCACTATGGTGGTAACGACT
GGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

【図２２】

Figure 22

配列番号22(PR-1254982VH7ミノ酸)

QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTGYNINWVRQPPGKGLEWLGMIWGY
GDTDYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTARYYCARDIIYGGNDWYF
DVWGTGTTVTVSS

【図２３】

Figure 23

配列番号23(PR-1254982VLヌクレオチド配列)

GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACA
GAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTACCAATTATTTAAACTG
GTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTACTACACATCA
AGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAG
ATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGATCAAGAAGATATTGCCACTTACTTT
TGCCAACAGGGTAAAACGCTTCCTCGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGG
AAATCAAACGG

【図２４】

Figure 24

配列番号24(PR-1254982VL7ミノ酸)

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTITCRASQDIINYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLH
SGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLDQEDIATYFCQQGKTLPRTFGGGTKLEIKR

イヌIgフレームワークにCDRグラフトされたマウス抗NGF mAb(CDRグラフト化抗NGF Ab):CDRには下線が引かれている

【図２５】

Figure 25

配列番号25(72.1VH7ミノ酸)

EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSDYYMFWVRHSPGKGLQWVATISD
GGSYTYYTDNVKGRFTISRDDANNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDWSDSEGF
AYWGQGTLVTVSS

【図２６】

Figure 26

配列番号26(72.1VL7ミノ酸)

DIVMTQTPPSLSVSPREPASISCRSSQSIVQSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVS
NRFSGVSDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDTGVYYCFQGSHVPFTFGAGTKVELK
R

【図２７】

Figure 27

配列番号27(73. 1VH7ミノ酸)

EVQLVQSAAEVKKPGASVKVSCKTSGYIFINYWMHWVQQAPGAGLEWMGRIDP
YGGGTKHNEKFKRRVTLTADTSTNTVYMELSNLRTEDTAVYYCARSGYDYYFD
VWGQGTLVTVSS

【図２８】

Figure 28

配列番号28(73. 1VL7ミノ酸)

IIVMTQTPLSLSASPGESASISCRASENIYSFLAWFRQKPGQSPQRLIYNANTLAEG
VPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEDEDAGLYYCQHHFGTPFTFGQGTKLEIKR

【図２９】

Figure 29

配列番号29(77. 1VH7ミノ酸)

EVQLVQSAAEVKKPGASVKVSCKTSGYIFIDTYIYWVQQAPGAGLEWMGR
IDPANGNTIYASKFQGRVTLTADTSTNTVYMELSNLRTEDTAVYYCARYGYYAY
WGQGTLVTVSS

【図３０】

Figure 30

配列番号30(77. 1VL7ミノ酸)

DLVLTQTPRSLSVSPGETASISCKSTKSLLNGDGFTYLDWFRQKPGQSPQRLIYLV
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDTGLYYCFESNYLFTFSQGTNLEMK
R

【図３１Ａ】

Figure 31A

配列番号31(81. 1VH7ミノ酸)

EVQLVESGGDLMKPGGSLRLSCVASGFTFSNHYMYWVRQAPGKGLQWVGSISD
GGAYTFYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRTEDTGRVLLCEGEESANNGF
AFWGHGTLVTVSS

【図３１Ｂ】

Figure 31B

配列番号177(81. 1B VH7ミノ酸)

EVQLEESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNHYMYWVRQSPGKGLQWVASISD
GGAYTFYPDTVKGRFTISRDNAKNTLFLQMNSLRAEDTAVYFCVKEESANNGFA
FWGQGTLVTVSS

【図３２】

Figure 32

配列番号32(81. 1VL7ミノ酸)

DVVMTQAPPSLSVSPREPASISCRSSQSILHSNGNTYLEWFRQKPGQSPQRLIYRV
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDLGVYYCFQGAHVPFTFGQGTKLEI
KR

【図３３】

Figure 33

配列番号33(82. 1VH7ミノ酸)

EVILQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSVTGYNINWIRQRPDRGLEWMGMIWGY
GDTDYNSALKSRISITADGTKNHLSLQLTSTTTEDTAVYYCTRDHYGGNDWYFD
VWGQGTLVTVSS

【図３４】

Figure 34

配列番号34(82. 1VL7ミノ酸)

IIVMTQTPLSLSASPGESASISCRASQDITNYLNWFRQKPGQSPQRLIYYTSRLHSG
VPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEDEDAGLYYCQQGKTLPRTFGQGTKLEIKR

復帰突然変異残基を含有するイヌ化抗NGF抗体
(復帰突然変異残基は太字で示されている)

【図３５】

Figure 35

配列番号35(72. 2VH7ミノ酸)

EVHLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSDYYMFWIRHSPGKGLEWVATISDG
GSYTYYTDNVKGRFTISRDNANNNLYLQMNSLKAEDTAVYYCAKDWSDSEGF
AYWGQGTLVTVSS

【図３６Ａ】

Figure 36A

配列番号36(72. 2VL7ミノ酸)

DVLMTQTPPSLSVSPREPASISCRSSQSIVQSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKV
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDTGVYYCFQGSHVPFTFGAGTKVEL
KR

【図３６Ｂ】

Figure 36B

配列番号179(72. 3VH7ミノ酸)

EVHLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSDYYMFWIRQSPGKGLEWVATISDG
GSYTYYTDNVKGRFTISRDNANNNLYLQMNSLKAEDTAVYYCAKDWSDSEGFA
YWGQGTLVTVSS

【図３６Ｃ】

Figure 36C

配列番号180(72. 4VH7ミノ酸)

EVHLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSDYYMFWVRHSPGKGLEWVATISD
GGSYTYYTDNVKGRFTISRDNANNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDWSDSEGF
AYWGQGTLVTVSS

【図３６Ｄ】

Figure 36D

配列番号181(72. 4VL7ミノ酸)

DIVMTQTPPSLSVSPREPASISCRSSQSIVQSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDTGVYYCFQGSHVPFTFGAGTKVELK
R

【図３７】

Figure 37

配列番号37(73. 2VH7ミノ酸)

QVQLVQSAAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVQQAPGAGLEWIGRID
PYGGGTKHNEKFKRRATVTADKSTSTAYMELSNLRTEDTAVYYCTRSGYDYYF
DVWGQGTLVTVSS

【図３８Ａ】

Figure 38A

配列番号38(73. 2VL7ミノ酸)

DIQMTQTPLSLSASPGESASITCRASENIYSFLAWHRQKPGQSPQLLVYNANTLA
EGVPSRFSGSGSGTQFTLRISRVEDEDAGLYYCQHHFGTPFTFGQGTKLEIKR

【図３８Ｂ】

Figure 38B

配列番号182(73. 4VH7ミノ酸)

EVQLVQSAAEVKKPGASVKVSCKASGYIFINYWMHWVQQAPGAGLEWMGRID
PYGGGTKHNEKFKRRVTLTADKSTSTVYMELSNLRTEDTAVYYCTRSGYDYYF
DVWGQGTLVTVSS

【図３８Ｃ】

Figure 38C

配列番号183(73. 4VL7ミノ酸)

DIQMTQTPLSLSASPGESASISCRASENIYSFLAWHRQKPGQSPQLLIYNANTLAE
GVPSRFSGSGSGTQFTLRISRVEDEDAGLYYCQHHFGTPFTFGQGTKLEIKR

【図３９】

Figure 39

配列番号39(77. 2VH7ミノ酸)

EVQLVQSAAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIYWVKQAPGAGLEWIGRIDPA
NGNTIYASKFQGKASITADTSTNTAYMELSNLRTEDTAVYYCARYGYYAYWGQ
GTLVTVSS

【図４０Ａ】

Figure 40A

配列番号40(77.2VL7ミノ酸)

DVVLTQTPRSLSVSPGETASISCKSTKSLLNGDGFTYLDWYRQKPGQSPQLLIYL
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDTGLYYCFESNYLFTFGQGTNLEM
KR

【図４０Ｂ】

Figure 40B

配列番号184(77.3VH7ミノ酸)

EVQLVQSAAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIYWVKQAPGAGLEWIGRIDPA
NGNTIYASKFQGKASITADTSTNTAYMELSNLRTEDTAVYYCAGYGYYAYWGQ
GTLVTVSS

【図４０Ｃ】

Figure 40C

配列番号185(77.4VH7ミノ酸)

EVQLVQSAAEVKKPGASVKVSCKASGYIFIDTYIYWVKQAPGAGLEWMGRIDPA
NGNTIYASKFQGRVTLTADTSTNTVYMELSNLRTEDTAVYYCAGYGYYAYWG
QGTLVTVSS

【図４０Ｄ】

Figure 40D

配列番号186(77.4VL7ミノ酸)

DLVLTQTPRSLSVSPGETASISCKSTKSLLNGDGFTYLDWYRQKPGQSPQLLIYLV
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDTGLYYCFESNYL
FTFSQGTNLEMKR

【図４１】

Figure 41

配列番号41(81.2VH7ミノ酸)

EVQLVESGGDLMKPGGSLRLSCVASGFTFSNHYMYWVRQAPGKGLEWVASISD
GGAYTFYPDTVKGRFTISRDNAKNNLYLQMNSLKTEDTGRVLYCTGEESANNG
FAFWGHGTLVTVSS

【図４２Ｆ】

Figure 42F

配列番号206(81.5B VH7ミノ酸)

EVQLEESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNIIYMYWVRQSPGKGLEWVASISDG
GAYTFYPDTVKGRFTISRDNAKNNLYLQMNSLKAEDTAVYYCTREESANNGFA
FWGQGTLVTVSS

【図４２Ｇ】

Figure 42G

配列番号207(81.6B VH7ミノ酸)

EVQLEESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNHYMYWVRQSPGKGLEWVASISD
GGAYTFYPDTVKGRFTISRDNAKNTLVLQMNSLRAEDTAVYYCTKEESANNGF
AFWGQGTLVTVSS

【図４３】

Figure 43

配列番号43(82.2VH7ミノ酸)

EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTGYNINWVRQRPDRGLEWLGMIWGY
GDTDYNSALKSRLSISKDNTKSQVFLQLTSTTTEDTAVYYCARDHYGGNDWYF
DVWGQGTLVTVSS

【図４４Ａ】

Figure 44A

配列番号44(82.2VL7ミノ酸)

DIQMTQTPLSLSASPGESASITCRASQDITNYLNWYRQKPGQSPKLLIYYTSRLHS
GVPSRFSGSGSGTDYSLRISRVEDEDAGLYFCQQGKTLPRTFGQGTKLEIKR

【図４４Ｂ】

Figure 44B

配列番号191(82.3VL7ミノ酸)

DIQMTQTPLSLSASPGESASITCRASQDITNYLNWYRQKPGQSVKLLIYYTSRLHS
GVPSRFSGSGSGTDYSLRISRVEDEDAGLYFCQQGKTLPRTFGQGTKLEIKR

【図４２Ａ】

Figure 42A

配列番号42(81.2VL7ミノ酸)

DVLMTQTPPSLSVSPREPASISCRSSQSILIISNGNTYLEWYRQKPGQSPQLLIYRV
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGAHVPFTFGQGTKLEI
KR

【図４２Ｂ】

Figure 42B

配列番号187(81.4VH7ミノ酸)

EVQLVESGGDLMKPGGSLRLSCVASGFTFSNHYMYWVRQAPGKGLEWVASISD
GGAYTFYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRTEDTGRVLYCTGEESANNGF
AFWGHGTLVTVSS

【図４２Ｃ】

Figure 42C

配列番号188(81.4VL7ミノ酸)

DVLMTQAPPSLSVSPREPASISCRSSQSILHSNGNTYLEWYRQKPGQSPQLLIYRV
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDLGVYYCFQGAHVPFTFGQGTKLEI
KR

【図４２Ｄ】

Figure 42D

配列番号189(81.2B VH7ミノ酸)

EVQLEESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNHYMYWVRQSPGKGLEWVASISDG
GAYTFYPDTVKGRFTISRDNAKNNLYLQMNSLKKEDTAVYYCTREESANNGFA
FWGQGTLVTVSS

【図４２Ｅ】

Figure 42E

配列番号190(81.4B VH7ミノ酸)

EVQLEESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNHYMYWVRQSPGKGLEWVASISD
GGAYTFYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRKEDTAVYYCTKEESANNGF
AFWGQGTLVTVSS

【図４４Ｃ】

Figure 44C

配列番号192(82.4VH7ミノ酸)

EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSVTGYNINWIRQRPDRGLEWMGMIWGY
GDTDYNSALKSRISITKDNTKSQLFLQLTSTTTEDTAVYYCARDHYGGNDWYFD
VWGQGTLVTVSS

【図４４Ｄ】

Figure 44D

配列番号193(82.4VL7ミノ酸)

DIQMTQTPLSLSASPGESASISCRASQDITNYLNWYRQKPGQSPKLLIYYTSRLHS
GVPSRFSGSGSGTDYTLRISRVEDEDAGLYFCQQGKTLPRTFGQGTKLEIKR

イヌ NGF

【図４５】

Figure 45

配列番号45(NGF-Dog-S7' ライマー)

5'-GGC AGG GTA CCG CCG CCA CCATGT CCATGT TGT TCT ACA C-3'

【図４６】

Figure 46

配列番号46(NGF-Dog-AS7' ライマー)

5'-GGC AGT CTA GAT CAGTGA TGA TGA TGA TGATGG GCT CGT CTC CCG
GCCTTC C-3'

【図４７】

Figure 47

配列番号47(NGF-d-Ec-S7' ライマー)

5'-GGC AGC ATA TGG AAC CGC ATC CAG AGA GCC AT-3'

【図４８】

Figure 48

配列番号48(NGF-d-Ec-AS7' ライマー)

5'-GGC AGC TCG AGC TAG GCT CGT CTC CCG GCC TTC CT-3'

【図４９】

Figure 49

配列番号49（ｲﾇNGF C末端6His融合ﾇｸﾚｵﾁﾄﾞ配列）

ATGTCCATGTTGTTCTACACTCTGATCACAGCTCTTCTGATCGGCATCCGGGC
AGAACCGCATCCAGAGAGCCATGTCCCAGCAGGACACGCCATCCCCCACGCC
CACTGGACTAAGCTTCAGCATTCCCTTGACACAGCCCTCCGCAGAGCCCGCA
GCGCCCCGGCCGGGGCAATAGCTGCCAGGGTGACAGGGCAGACCCGCAACA
TCACTGTGGATCCCAAACTCTTTAAAAAGCGGCGACTGCGTTCGCCCCGCGT
GCTGTTCAGCACGCACCCCCCACCTGTGGCTGCGGACGCTCAGGACCTGGAC
CTGGAGGCCGGCAGCACCGCCTCCGTCAACAGGACTCACAGGAGCAAGCGG
TCTTCGTCCCACCCTGTCTTCCACCGGGGGGAGTTCTCGGTGTGCGACAGCGT
CAGCGTGTGGGTGGGCGACAAGACCACAGCCACCGACATCAAGGGCAAGGA
GGTGATGGTGCTGGGAGAGGTGAACATTAACAACAGTGTGTTCAAACAGTAC
TTCTTTGAGACCAAGTGCCGGGACCCCACCCCCGTGGACAGCGGGTGCAGGG
GCATCGACTCCAAGCACTGGAACTCCTACTGCACCACCACCCACACCTTCGTC
AAGGCGCTGACCATGGACGGCAAGCAGGCTGCCTGGCGGTTCATCCGGATCG
ACACGGCCTGCGTGTGCGTGCTCAGCAGGAAGGCCGGGAGACGAGCCCATC
ATCATCATCATCAC

【図５０】

Figure 50

配列番号50（ｲﾇNGF C末端6-Hisｱﾐﾉ酸配列）

MSMLFYTLITALLIGIRAEPHPESHVPAGHAIPHAHWTKLQHSLDTALRRARSAP
AGAIAARVTGQTRNITVDPKLFKKRRLRSPRVLFSTHPPPVAADAQDLDLEAGST
ASVNRTHRSKRSSSHPVFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEV
NINNSVFKQYFFETKCRDPTPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQ
AAWRFIRIDTACVCVLSRKAGRRAHHHHHH

ｲﾇ重鎖および軽鎖定常ﾄﾞﾒｲﾝ

【図５１】

Figure 51

配列番号51（ｲﾇIgG定常領域ﾇｸﾚｵﾁﾄﾞ配列）

GCGTCGACCACAGCCCCGTCAGTCTTCCCATTGGCCCCCAGCTGCGGGTCAA
CTAGCGGGTCTACCGTCGCTCTGGCTTGTCTGGTGTCCGGCTACTTCCCTGAG
CCTGTGACCGTCAGCTGGAACTCTGGTAGCCTGACCAGCGGCGTGCATACTTT
TCCAAGCGTCCTTCAGAGCTCCGGACTCCACTCCCTTAGTTCCATGGTAACCG
TGCCAAGTAGTCGGTGGCCATCCGAGACATTTACCTGTAACGTGGTCCATCCC
GCTAGTAATACCAAGGTGGATAAGCCTGTCTTTAACGAGTGCCGGTGCACAG
ACACACCACCTTGTCCCGTGCCTGAGCCTCTCGGCGGCCCCTCAGTCCTGATC
TTTCCTCCAAAGCCAAAAGATATCCTCCGGATTACCCGGACTCCTGAAGTGA
CATGTGTAGTTCTGGACTTGGGCCGGGAAGACCCAGAGGTACAGATTAGCTG
GTTCGTAGACGGCAAAGAGGTGCACACAGCCAAAACGCAATCAAGGGAACA
GCAGTTCAATGGTACTTATCGGGTCGTGTCAGTACTGCCGATCGAACATCAG
GATTGGCTTACTGGCAAGGAATTCAAATGCCGCGTGAACCACATTGACCTGC
CAAGCCCCATCGAGAGGACCATATCAAAGGCCAGGGGGCGGGCACACAAGC
CGAGCGTTTATGTCCTGCCCCCTTCCCCTAAGGAACTTAGCTCTTCAGACACT
GTGAGCATTACATGTCTGATCAAGGATTTCTATCCACCGGACATAGATGTAG
AGTGGCAGTCCAACGGGCAACAGGAGCCTGAACGGAAACATAGAATGACTC
CTCCACAGCTCGATGAGGATGGTTCTTACTTTCTTTACTCCAAACTGTCAGTG
GACAAATCACGATGGCAGCAGGGCGATCCATTCACATGTGCCGTTATGCACG
AGACGCTTCAGAACCACTATACTGATCTGTCCCTCTCACATAGCCCGGGCAA
ATGA

【図５２】

Figure 52

配列番号52（ｲﾇIgG定常領域ｱﾐﾉ酸配列）

ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSV
LQSSGLHSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVVHPASNTKVDKPVFNECRCTDTPPCP
VPEPLGGPSVLIFPPKPKDILRITRTPEVTCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVIIT
AKTQSREQQFNGTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIDLPSPIERTISKARG
RAHKPSVYVLPPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNGQQEPERKHRMT
PPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHETLQNHYTDLSLSHSPGK

【図５３】

Figure 53

配列番号53（ｲﾇκ定常領域ﾇｸﾚｵﾁﾄﾞ配列）

AATGATGCCCAGCCTGCAGTGTACCTGTTCCAACCTAGCCCTGACCAGCTCCA
CACAGGCTCTGCTAGCGTCGTCTGCCTGCTCAATTCTTTCTACCCAAAGGATA
TCAACGTGAAGTGGAAGGTCGATGGCGTGATTCAAGACACCGGCATTCAAGA
GTCAGTGACCGAACAGGATAAAGATTCTACATATAGCTTGAGCAGCACACTG
ACCATGAGCTCCACCGAGTATCTCAGTCATGAGCTGTATTCCTGCGAGATCAC
ACACAAGTCATTGCCCAGTACGCTCATAAAAAGCTTCCAGAGGTCCGAATGC
CAGCGCGTGGATTGA

【図５４】

Figure 54

配列番号54（ｲﾇκ定常領域ｱﾐﾉ酸配列）

NDAQPAVYLFQPSPDQLHTGSASVVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQES
VTEQDKDSTYSLSSTLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD

ｲﾇ化mAb可変ﾄﾞﾒｲﾝCDR

【図５５】

Figure 55

配列番号55（72.1VH7ﾐﾉ酸：CDR1）

DYYMF

【図５６】

Figure 56

配列番号56（72.1VH7ﾐﾉ酸：CDR2）

TISDGGSYTYYTDNVKG

【図５７】

Figure 57

配列番号57（72.1VH7ﾐﾉ酸：CDR3）

DWSDSEGFAY

【図５８】

Figure 58

配列番号58（72.1VL7ﾐﾉ酸：CDR1）

RSSQSIVQSNGNTYLE

【図５９】

Figure 59

配列番号59（72.1VL7ﾐﾉ酸：CDR2）

KVSNRFS

【図６０】

Figure 60

配列番号60（72.1VL7ﾐﾉ酸：CDR3）

FQGSHVPFT

【図６１】

Figure 61

配列番号61（73.1VH7ﾐﾉ酸：CDR1）

NYWMH

【図６２】

Figure 62

配列番号62（73.1VH7ﾐﾉ酸：CDR2）

RIDPYGGGTKHNEKFKR

【図６３】

Figure 63

配列番号63（73.1VH7ﾐﾉ酸：CDR3）

SGYDYYFDV

【図６４】

Figure 64

配列番号64（73.1VL7ﾐﾉ酸：CDR1）

RASENIYSFLA

【図６５】

Figure 65

配列番号65（73.1VL7ﾐﾉ酸：CDR2）

NANTLAE

【図６６】

Figure 66

配列番号66(73. 1VL7ミノ酸:CDR3)

QHHFGTPFT

【図６７】

Figure 67

配列番号67(77. 1VH7ミノ酸:CDR1)

DTYIY

【図６８】

Figure 68

配列番号68(77. 1VH7ミノ酸:CDR2)

RIDPANGNTIYASKFQG

【図６９】

Figure 69

配列番号69(77. 1VH7ミノ酸:CDR3)

YGYYAY

【図７０】

Figure 70

配列番号70(77. 1VL7ミノ酸:CDR1)

KSTKSLLNGDGFTYLD

【図７１】

Figure 71

配列番号71(77. 1VL7ミノ酸:CDR2)

LVSNRFS

【図７２】

Figure 72

配列番号72(77. 1VL7ミノ酸:CDR3)

FESNYLFT

【図７３】

Figure 73

配列番号73(81. 1VH7ミノ酸:CDR1)

NHYMY

【図７４】

Figure 74

配列番号74(81. 1VH7ミノ酸:CDR2)

SISDGGAYTFYPDTVKG

【図７５】

Figure 75

配列番号75(81. 1VH7ミノ酸:CDR3)

EESANNGFAF

【図７６】

Figure 76

配列番号76(81. 1VL7ミノ酸:CDR1)

RSSQSILHSNGNTYLE

【図７７】

Figure 77

配列番号77(81. 1VL7ミノ酸:CDR2)

RVSNRFS

【図７８】

Figure 78

配列番号78(81. 1VL7ミノ酸:CDR3)

FQGAHVPFT

【図７９】

Figure 79

配列番号79(82. 1VH7ミノ酸:CDR1)

GYNIN

【図８０】

Figure 80

配列番号80(82. 1VH7ミノ酸:CDR2)

MIWGYGDTDYNSALKS

【図８１】

Figure 81

配列番号81(82. 1VH7ミノ酸:CDR3)

DHYGGNDWYFDV

【図８２】

Figure 82

配列番号82(82. 1VL7ミノ酸:CDR1)

RASQDITNYLN

【図８３】

Figure 83

配列番号83(82. 1VL7ミノ酸:CDR2)

YTSRLHS

【図８４】

Figure 84

配列番号84(82. 1VL7ミノ酸:CDR3)

QQGKTLPRT

ヒNGF

【図８５】

Figure 85

配列番号85(ヒトβNGF)

SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQYFFE
TKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFIRIDTACV
CVLSRKAVRRA

【図８６－１】

Figure 86 - 表

イヌPBMCに由来するイヌ重鎖可変ドメイン配列

表12

配列番号 :178 (Ca-1005)

EVQLEESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFSIGSYGMSWVRQSPGKGLQWVAWIKY
DGSRTFYADAVKGRFTISRDNAKNTLFLQMNSLRAEDTAVYFCVKGPNSSWLPS
TYFASWGQGTLVTVSS

表12

配列番号 : 86 (Ca-2301)

EMQLVESGGDLVRPGGSLRLSCVASGFTFSTYGMTWVRQSPGKGLQWVATIGP
GGGRNTYYADAVKGRFTISRDDAENTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAQAFDATYYT
SFDCWGRGSLVAVSS

表12

配列番号 : 87 (Ca-2302)

MESVLSWVFLVALLQGIQGEIRLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFIFGNYDMS
WVRQAPGKGLQWVAAVRYDGSSTYYSDAVKGRITISRDDPGNTVYLQLDSLRA
EDTATYYCVRGGYYSSSFYIGGAFGHWGPGTLITVSS

表12

配列番号 : 88 (Ca-2303)

MECVLGWVFLVAILRGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSDYYM
SWIRQAPGKGLQWVADISDGGDGTGYAGAVKGRFTVSRENVKNTLYLQMNDL
RAEDTAIYYCTKAREMYGYRDFDSWGPGTLVTVSS

【図８６－２】

表12

配列番号：89 (Ca-2304)

MESVLGLVALLTILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNYYMT
WVRQAPGKGLEWVGYIHNGGTYTYYADAVKGRFTISRDDAKNTLYLEMNSLR
AEDTAVYYCGKMIFDYWGQGTLVTVSS

表12

配列番号：90 (Ca-2305)

MESALSWVFLVTILKGVQGEVLLVESGGDLVKPGGSLRLSCLTSGFTFNTYDWG
WVRQAPGKGLQWIAYIKKGGSDVRYADAVKGRFTISRDDAKNTLYLQMNSLRA
EDTAVYYCARSAWDSFDYWGQGTLVTVSS

表12

配列番号：91 (Ca-2306)

MESVFCWVFLVAILKGVRGVQGEVQLVESGGDLVKPAGSLRLSCVASGFTFTDY
SMNWVRQAPGKGLQWVATISNDGTSTDYTDAVKGRFTVSRDSARNTVYLQMT
SLRADDTATYYCVSRHSYSLLADYWGQGTLVTVSS

表12

配列番号：92 (Ca-2307)

MQMPWSLLCLLAAPLGVLSEVTLQESGPGLVKPSQTLSLTCAVSGGSVIRNYYW
HWIRQRPGRGLEWMGCWSETTYYSPAFRGRISITIDAATDQFSLHLNSMTTDDT
AVYYCARALYPTSSWYDGMDYWGHGASVVVSS

表12

配列番号：93 (Ca-2308)

EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCESSGFIFSQYAMNWVRQAPGKGLQWVAYIGG
AGFITYHADDVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLTINDTAVYYCVRSNSRIPDYW
GQGTLVAVSS

【図８６－３】

表12

配列番号：94 (Ca-2309)

MESVFCWVFLVAILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSSVYMS
WVRQAPGKGLQWVARITTDGTDTFYADAVKGRFTISRDNVKNMLYLEMNSLR
AEDTAIYYCGDPWQPAYPDLWGQGTMVTVSS

表12

配列番号：95 (Ca-2310)

MESVLCWVFLVAILKGVQGEVHLVESGGDLVKPGGTLRLSCVASGFTFSQYDM
SWVRQSPGKGLQWVALSRYHGGGTYYADAVKGRFTISRDNAKNMLYLQMNSL
RAEDTAVYYCVKEGSRWDLRGDYDYWGQGTLVTVSS

表12

配列番号：96 (Ca-2311)

MQMPWSLLCLLAAPLGVLSELTLQESGPGLVKPSQTLSLTCVVSGGSVTSSHYW
NWIRQRPGRGLEWMGYWTGNVNYNPAFQGRISIIGDAAKNQFSLHLSSMTTDDT
AVYYCARCGIVAPGFLPIGDFDFWGQGTLVTVSS

表12

配列番号：97 (Ca-2312)

MESVFCWVFLVAILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFSFSNYFMF
WGRQAPGKGLQWVARIRSDGGSTYYADAVKGRFTISRDNARNTLYLQMNSLRA
EDTATYYCAKADIIKLPEYRGQGTLVTVSS

表12

配列番号：98 (Ca-2401)

ESVLGWIFLATILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVGSGFTFSSSWMNW
VRQAPGKGLQWIAEISGTGSSTNYADAVKGRFTISRDNDKNTLYLQMNSLRAED
TAMYYCARAAYYGNYRNDLDYWGQGTLVTVSS

【図８６－４】

表12

配列番号：99 (Ca-2402)

KPAGSLRLSCVASGFTFSSHSVTWVRQAPGKGLQFVAGITSGGNNRYYTDAVRG
RFTLSRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAMYFCALGSYEWLSGEFDYWGQGTLVT
VSS

表12

配列番号：100 (Ca-2403)

MESVFCWVFLVAILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTLNNYFM
YWVRQAPGKGLQWVARLNSNGDSTFYADAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSL
RAEDTSMYYCAKDLIYGYTLWGQGTLVTVSS

表12

配列番号：101 (Ca-2404)

MASVLSWVFLVAIVKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFIFNKYEVY
WVRQAPGKGLEWVARILESGNPTYYAEAVEGRFTISRDNAKNMAYLQMNSLRA
DDTAVYYCATPSVSSTVAIDYWGQGALVTVSS

表12

配列番号：102 (Ca-2405)

MQMPWSLLCLLATPLGVLSELTLQESGPGLVKPSQTLSLTCVVSRGSVTSDYYW
NWIRQRPGRGLEWMGHWIGSTAYNPAFQGRISITADTAKNQLSLQLRSMTTEDT
AVYFCARGSSWTPSGDSWGQGTLVTVSS

【図８６－５】

表12

配列番号：103 (Ca-2406)

MASVLKLGFSCRYCKKVSRVRCNXVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFIFNKYEV
YWVRQAPGKGLEWVARILESGNPTYYAEAVEGRFTISRDNAKNMAYLQMNSLR
ADDTAVYYCATPSVSSTVAIDYWGQGALVTVSS

表12

配列番号：104 (Ca-2407)

MDCSWRIFFLLALATGVHSEVQLVQSAAEVKKPGASVKVSCKTSGYTLTDYYIH
WVQQAPGTGLIHWMGWIDPEXGTTDYAQKFQGXVTLTADTSTNTAYMELSGLR
AEDTAVYYCARFPRSLDYGSFPFDYWGQGTLVTVSS

表12

配列番号：105 (Ca-2408)

MESVLCWVFLVAILKGVQGEVRLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFRNYGM
SWVRQRPGKGLQWVAAIRSDGVTYYADDLKVRFTVSRDDARNTLYLQLNSLGA
EDTAVYYCAKAPWGLYDAWGQGTLVTVSS

表12

配列番号：106 (Ca-2409)

MESVLSWVFLVAILQGVQGEVQVVESGGDLVKPAGSLRLSCVASGYSISTYTMT
WVRQVPGKGLQLVAGINGDGSSTYYTDAVKGRFTISRDNARNTVYLQMNSLRA
EDTAMYYCLGEYSWFYYWGQGTLVTVSS

表12

配列番号：107 (Ca-2410)

MQMPWSLLCLLAAPLGVLSELTLQESGPRLVKPSQTLSLTCAVSGGSVTTTSYW
SWIRQRPGRGLEWVGYWTGTTNYSPAFQGRISISADTAKNQFSLHLSSVTTEDTA
LYFCASKSASTSWYFSLFESWGQGTLVTVSS

【図８６－６】

表12

配列番号：108 (Ca-2411)

MESVLGLVFLLTILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSSYSMS
WVRQAPGKGLQWVGYIDNGGTSTYYADAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLR
AEDTAVYYCGRGSYGMEYWGHGTSLFVSS

表12

配列番号：109 (Ca-2412)

MESVLGLLFLVAILKGVQGEIQLVESGGDLLKPGGSLRLSCVASGFTFSGSDMN
WIRQAPGKGLQWVAHITIIEGIGTSYVGSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNDLRAE
DTAMYYCAYSPWNYYSFDSWGQGTLVTVSS

【図８７－１】

Figure 87

イヌPBMC RNAに由来するイヌλ軽鎖可変ドメイン配列

表13

配列番号：110 (Ca-1001)

MTSTMAWSPLLLTLLTHCTVSWAQTVLTQSPSVSAVLGRRVTISCTGSDTNIGSH
RDVQWYQLVPGKSPKTLIYGTDNRPSGIPVRFSGSKSGNSGTLTITGIQAEDEAD
YYCQSYDDDLSMNVFGGGTHLTVLG

表13

配列番号：111 (Ca-1002)

MDWVPFYILPFIFSTGFCALPVLTQPTNASASLEESVKLTCTLSSEHSNYIVRWYQ
QQPGKAPRYLMYVRSDGSYKRGDGIPSRFSGSSSGADRYLTISNIKSEDEDDYYY
CGADYTISGQYGSVFGGGTHLTVLG

表13

配列番号：204 (Ca-1003)

LWISGGSALGTPTMAWTHLLLPVLTLCTGSVASSVLTQPPSVSVSLGQTATISCSG
ESL
SKYYAQWFQQKAGQVPVLVIYKDTERPSGIPDRFSGSSSGNTHTLTISRARAEDE
ADYYCESEVSTGTYCVRRRHPSNRPRSAQGLPLGHTLPALL

表13

配列番号：112 (Ca-1006)

MTSTMAWSPLLLTLLTHCTGSWAQSVLTQPASLSGSLGQRVTISCTGSSSNIGGY
SVNWLQQLPGTGPRTIIYNNSNRPSGVPDRFSGSRSGTTATLTISGLQAEDEADYY
CSTWDSNLRTIVFGGGTHLTVLG

【図８７－２】

表13

配列番号：113 (Ca-1007)

MTSTMDWSPLLLTLLAHCTGSWAQSVLTQPASVSGSLGQRVTISCTGSTSNLGT
YNVGWLQQVPGTGPRTVIYTNIYRPSGVPDRFSGSESGSTATLTISDLQAEDEAE
YYCTAWDSSLNAYVFGSGTQLTVLG

表13

配列番号：114 (Ca-1008)

MTSNMAWCPFLLTLLAYCTGSWAQSVLTQPTSVSGSLGQRVTISCSGSTNNIGIV
GASWYQQLPGKAPKLLVYSDGDRPSGVPDRFSGSNSGNSDTLTITGLQAEDEAD
YYCQSFDTTLDAAVFGGGTHLTVLG

表13

配列番号：115 (Ca-1009)

MTSTMAWSPLLLTLLAHCTVSWAQAVLTQPPSVSAALGQRVTISCTGSDTNIGS
GYEVHWYRQVPGKSPAIIIYGNSNRPSGVPVRFSGSKSGSTATLTITGIEAEDEAD
YHCQSYDGNLDGGVFGGGTHLTVLG

表13

配列番号：116 (Ca-1010)

MTSTMGWFPLILTLLAHCAGSWAQSVLTQPASVSGSLGQRVTISCTGSSPNVGY
GDFVAWYQQVPGTSPRTLIYNTRSRPSGVPDRFSASRSGNTATLTISGLQAEDEA
DYYCSSYDNTLIGIVFGGGTHLTVLG

表13

配列番号：117 (Ca-1011)

MTSTMGWSPLLLTLLAHCTGSWAQSVLTQPASVSGSLGQRVTITCTGSSSNIGRA
NVAWFQQVPGTGPRTVIYTSVKRPSGVPDRFSGSKSGSTATLTISGLQAEDEADY
YCSSWDNSLDAGVFGGGTHLTVLG

【図８７－３】

表13

配列番号：118 (Ca-1012)

MTSTMGWFPLLLTLLAHSTGSWAQSVLTQPASVSGSLGQRVTITCTGGTSNIGRG
FVSWFQQVPGIGPKILIFDAYRRPSGVPDRFSGSRSGNTATLTISGLQAEDEADYY
CAVYDSRLDVGVFGSGSQLTVLS

表13

配列番号：119 (Ca-1202)

MTSNMAWCPFLLTLLTYCTGSWARSVLTQPASVSGSPGQKVTIYCSGTMSDIGV
LGANWYQQLPGKAPKLLVDNDGDRPSGVPDRFSASKSGHSDTLTITGLQPEDEG
DYYCQSFDSSLDAAIFGEGTHLTVLG

表13

配列番号：120 (Ca-1203)

SVASYVLTQSPSQNVTLRQAAHITCEGHNIGTKSVHWYQQKQGQAPVLIIYDDK
SRPSGIPERFSGANSGNTATLTISGALAEDEADYYCLVWDSSAIWVFGEGTHLTV
LG

表13

配列番号：121 (Ca-1204)

MTSTMAWSPLLLTLLAHFTGSWAQSVLTQPTSVSGSLGQRVTISCTASSSNIDRD
YVAWYQQLPGTRPRALIYANSNRPSGVPDRFSGSKSGSTATLTISGLQAEDEADY
YCSTWDNSLTYVFGSGTQLTVLG

表13

配列番号：122 (Ca-1205)

SVASYVLTQVPSVSVNLGKTATITCEGDNVGEKYTHWYQQEYGQAPVLIIYEDS
RRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGARAEDETDYYCQVWDDSGNVFGGGTHLTVL
G

【図８７－４】

表13

配列番号 ：123 (Ca-1206)

MTSTMGWFPLILTLLAHCAGSWAQSVLTQPASVSGSLGQRVTISCTGSDSNVGY
GDSIAYGDSVAWYQQVPGTSPRTLIYDVTSRPSGVPDRFSGSRSGTTATLTISGLQ
AEDEADYYCSSFDKTLNGLIVGGGTHLTVLG

表13

配列番号 ：124 (Ca-1207)

MTSNMAWSPLLLTLLAYCTGSWAQSALTQPTSVSGSLGQRVSISCSGGIHNIGSV
GATWYQQLPGKAPKLLVSSDGDRPSGIPDRFSGSRSGNSVTLTITGLQAEDEAEY
YCQSFDSTLGVHVVFGGGTHLTVLG

表13

配列番号 ：205 (Ca-1208)

LCSAVGPPKTESVMTSTMGWSPLLLTLLAHCTGSWAQSVLTQPASVSGSLGQRV
TIPCTGSSSNIDRYNVAWFQQLPGTGPKPSSIVLLTDPQGSLIDSLAPSQAA

表13

配列番号 ：125 (Ca-1209)

MTSTMAWTPLLLTLLAIIYTGSWARSDLTQPASVSGSLGQRITISCTGSSSNIGRN
YVGWYQQLPGRGPRTVVYGINSRPSGVPDRFSGSKSGSTVTLTISGLQAEDEADY
YCSTWDDSLSVVVFGGGTHLTVLG

表13

配列番号 ：126 (Ca-1210)

MTSTMGWSPLLLTLTHWTGSWAQSVLSQPASMSGSLGLRITICCTGKNSNINNS
YVDWNQPLAGTGPRTVIHDDGDRPSGVPDQFSGSKSGNTATLTISRLQAEDEAD
YNGASFETSFNAVFGGGTHVTVLG

【図８８－１】

Figure 88

イヌPBMC RNAに由来するイヌκ軽鎖可変ドメイン配列

PBMC RNA

表14

配列番号 127 (Ca Ka016-A1)

LSWLRQKPGHSPQRLIHQVSSRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRVEADDGGVYY
CGQGSQSIPTFGQGTKVEIKR

表14

配列番号 128 (Ca Ka016-A2)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSAGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLHSNGNT
YLYWFRQKPGQSPQRLIYKVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVETDDAGVY
YCGQVIQDPWTFGVGTKLELKR

表14

配列番号 129 (Ca Ka016-A3)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQTLLYSNGKN
YLFWYRQKPGQSPQRLIDLASNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVY
YCGQGMEIPWTFGAGTKVELKR

表14

配列番号 130 (Ca Ka016-A4)

MKFPSLLLGLLMLWIPGSTGEAVMTQTPLSLAVTPGEVATISCRASQSLLHSDGK
SYLNWYLQKPGQTPRPLIYEASKRFSGVSDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDVGV
YYCQQSLHFPPTFGPGTKVELKR

表14

配列番号 131 (Ca Ka016-A5)

PDRFSGSGSGTDFTLTISRVEADDAGIYYCGQATQTPPTFGAGTKLDLKR

【図８８－２】

表14

配列番号 132 (Ca Ka016-A6)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVRPGESASISCKASQSLLHSGGGT
YLNWFRQRPGQSPQRLIYEVSKRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRITRVEADDTGIY
YCGQNTQLPLTFGQGTKVEIKR

表14

配列番号 133 (Ca Ka016-A7)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSTGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLHSNGNT
YLFWLRQKPGQSPQRLIYRVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVY
YCGQRVRSPWTFGAGTKVEVKR

表14

配列番号 134 (Ca Ka016-A8)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSAGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLIISNGNT
YLYWFRQKPGQSPQRLIYKVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVETDDAGVY
YCGQVIQDPWTFGVGTKLELKR

表14

配列番号 135 (Ca Ka016-A9)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDVVMAQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLLHSNGN
TFLFWFRQKPGQSPQRLINFLSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRINRVEADDAGL
YYCGQGLQAPLTFGQGTKLEIKR

表14

配列番号 136 (Ca Ka016-A10)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSNGDDVLTQTPLSLSVRPGETVSILCKASESLLHSDGN
TYLSWVRQKAGQSPQRLMYRVSDRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISGVEADDAG
IYYCGQATHYPLEFGQGTRVEIKR

【図８８－３】

表14

配列番号 137 (Ca Ka016-A11)

LMLWIPGSTGEIVLTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLHPNGVTYLYWFRQKPG
QSPQRLIYKVSNRDPGVPDRFSGSGSEIDFTLIISRVEADDGGIYYCGQGIQNPFTF
GQGTKLEIKR

表14

配列番号 138 (Ca Ka016-A12)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSIGDIVMTQTPLSLSVSPGESASISCKASQSLLHSNGNT
YLYWFRQKPGHSPQRLIHQVSSRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGLY
YCGQGTQFPFTFGQGTKVEIKR

表14

配列番号 139 (Ca Ka016-B1)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSIGDIVMTQTPLSLSVSPGESASISCKASQSLLIISNGNT
YLYWFRQKPGHSPQRLIHQVSSRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGLY
YCGQGTQFPFTFGQGTKVEIKR

表14

配列番号 140 (Ca Ka016-B2)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLLHSNGNT
YSFWFRQKPGQSPQRLINLVSSRGPGVPDRFSGSGSGTDFTLIISRVEADDAGVYY
CGHGKEAPYTFSQGTKLEIKR

表14

配列番号 141 (Ca Ka016-B3)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSVGDIVMTQSPMSLSVGPGESASMSCKANQSLLYSDGI
TYLSWFLQRPGQSPQRLIYEVSKRDTGVPGRFIGSGAGTDFTLRISRVEADDAGV
YYCGQALQFPLTFSQGAKLEIER

【図８８－４】

表14

配列番号 142 (Ca Ka016-B4)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDVVMTQTPLSLSVRPGETASISCRASQSLLHSSGIT
KLFWYRQKPGQSPQRLVYWVSNRDPGVPDRFTGSGSGTDFTLRISRLEADDAGI
YYCGIHAIGFPLTFGQGTKVEIKR

表14

配列番号 143 (Ca Ka016-B5)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVRPGESASISCKASQSLLHSGGGT
YLNWFRQRPGQSPQRLIYEVSKRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRITRVEADDTGIY
YCGQNTQFPLTFGQGTKVEIKR

表14

配列番号 144 (Ca Ka016-B6)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGGIVMTQTPLSLSVRPGETASISCRASQSLLYSDGNT
YLFWFRQKPGQSPQRLMYRVSDRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISGVEADDAGI
YYCGQATHYPLEFGQGTXVEIKR

表14

配列番号 145 (Ca Ka016-B7)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVRPGESASISCKASQSLLHSGGGT
YLNWFRQRPGQSPQRLIYEVSKRDTGVPDRFIGSGAGTDFTLRISRVEADDAGVY
YCGQGVQGPWTIGAGTKLELQR

表14

配列番号 146 (Ca Ka016-B8)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSVSVSPGETASISCKASQSLLSHDGNT
YLHWFRQKPGQSPQRLIYKVSNRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDTGV
YYCGQITQDPFTFGQGTKLEIKR

【図８８－５】

表14

配列番号 147 (Ca Ka016-B9)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLLHSNGNT
YLFWFRQKPGQSPQRLINWVSNRDPGVPDRFGGSGSGTDFTLRISRVEADDAGIY
YCGQGIQGPYTFSQGTKLEIKR

表14

配列番号 148 (Ca Ka016-B10)

MRFPSQFLGLLMLWIPGSSGDIAMTQTPLSLSVGPGETASITCKASQSLLHSNGNT
YLFWFRQKPGQSPQRLIYLVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRVEADDAGIY
YCGQATQTPPTFGAGTKLDLKR

表14

配列番号 149 (Ca Ka016-B11)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMAQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLHSDGRT
CLSWFRQKSGQSPQRLIYEVSNRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDTGIYY
CGQTVQFPLTFGQGTKLEIKR

表14

(配列番号 150) (Ca Ka016-B12)

GQSPQRLIYKVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEPEDVGVYYCGQGTLNP
WTFGAGTKVELKR

表14

配列番号 151 (Ca Ka017-1)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDVVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLLHSNGN
TFLFWFRQ*PGQSPQRLINFVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGIY
YCGQGLLAPPTFGQGTKVEIRR 注記：*は、停止ｺﾄﾞﾝを示す

【図８８－６】

表14

配列番号 152 (Ca Ka017-2)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSGGDIVMTQTPPSLSVSPREPASISCKASQSLLRSNGNT
YLYWFRQKPGQSPEGLIYRVSNRFTGVSDRFSGSGSGTDFTLRISTVEADDAGVY
YCGQATQFPSTFSQGTKLEIKR

表14

配列番号 153 (Ca Ka017-3)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSXGDIVLTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLHSNGITY
LNWYRQRPGQSPQXLIYKVSNRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRXSKVEADDTGIY
YCGQDTQFPLTLGXGTHXEIKR

表14

配列番号 154 (Ca Ka017-5)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSTGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASIYCKASQSLLHSNGKT
FLYWFRQKPGQSPQRLIYRVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGIY
YCGQGIQDPTFGQGTKVEIKR

表14

配列番号 155 (Ca Ka017-6)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSGGDIVMTQTPPSLSVSPREAASISCKASQSLLKSNGNT
YFYWFRQKPGQVSEGLIYKVSSRFTGVSDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVY
FCGQALQFPYTFSQGTKLDIKR

表14

配列番号 156 (Ca Ka017-10)

MRFPSQLLGLLMLWIPFSGGDVVLTQTPPSLSLSPGETASISCKASRSLLNSDGST
YLDWYLQKPGQSPRLLIYLVSNRFSGVSDRFSGSGSGTDFTLTISRVEADDAGVY
YCGQGSRVPLTFGQGTKVEIKR

【図８８－７】

表14

配列番号 157 (Ca Ka017-11)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLLHRNGIT
YLSWFRQRPGQSPQRLINLVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDVGVY
YCGHGLQTPYTFGQGTSLEIER

表14

配列番号 158 (a Ka017-12)

MRFPSQLLGLLVLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETVSISCRASQSLLYSDGNIY
LFWFRRKPGQSPQHLINLVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVYY
CGQGTQPPYTFSQGTKVEIKR

表14

配列番号 159 (Ca Ka017-13)

MRFPSQLLGLLMLWIPESGGDVVLTQTPPSLSLSPGETASISCKASRSLLNSDGST
YLDWYLQKPGQSPRLLIYLVSNRFSGVSDRFSGSGSGTDFTLTISRVEADDAGVY
YCGQGSRVPLTFGQGTKVEIKR

表14

配列番号 160 (Ca Ka017-14)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMAQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLLHSNGIT
YLFWYRQKPGQSPQRLISMVFNRDPGVPDRFGGSGSGTDFTLRISRVEADDAGL
YFCGHGTQIPYSFSQGTKLEIKR

表14

配列番号 161 (Ca Ka017-16)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSISPGEPASISCKASQSLLHSGGDTY
LNWFRQRPGQSPQLLINRVSSRKKGVPDRFSGSGSGTEFTLRISRVEADDAGIYFC
GQGTQFPYTFSQGTKLEIKR

【図８８－８】

表14

配列番号　162 (Ca Ka017-20)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSGGDIVMTQTPPSLSVSPGEPASMSCKASQSLLHSNGN
TYLYWFRQKPGQSPEALIYKVSNRFTGVSDRFSGSGSGTDFTLRINRVEADDVGV
YYCGQGIQIPYTFSQGTKLEIKR

表14

配列番号　163 (Ca Ka017-23)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSTGEIVLTQTPLSLSVSPGESASISCKASQSLLYSNGNT
YLYWFRQKAGQSPQRVIYRVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISSVENDDAGV
YYCGQGSEDPPTFGAGTKVELKR

表14

配列番号　164 (Ca Ka017-24)

MRFPSQLLGLLTLWIPGSTGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLHSNGNT
YLYWFRQKPGQSPQRLIYKVSNRDPGVPXRFSGSGSGTDFTLRVSXVEADDAGV
YYCGQGVQDPFTFGQGTKLEIKR

【図８９－１】

Figure 89

ヒトIgフレームワーク上にCDRグラフトされたマウス抗NGF mAb(CDRグラフト化抗NGF Ab)：CDRには下線が引かれている

表15

配列番号：165 (Hu72 VH; CDR-GRAFT VH3-13/JH5)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMFWVRQATGKGLEWVSTISD
GGSYTYYTDNVKGRFTISRENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCARDWSDSEGF
AYWGQGTLVTVSS

表15

配列番号：166 (Hu73 VH (CDR-GRAFT VH1-18/JH6)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGRI
DPYGGGTKHNEKFKRRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSGYDYY
FDVWGQGTTVTVSS

表15

配列番号：167 (HU77 VH (CDR-GRAFT VH1-69/JH6)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYIYWVRQAPGQGLEWMGRIDP
ANGNTIYASKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYGYYAYWG
QGTTVTVSS

表15

配列番号：168 HU80 VH (CDR-GRAFT VH1-18/JH6)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIYWVRQAPGQGLEWMGRIDP
ANGNTIYASKFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARYGYYAYWG
QGTTVTVSS

【図８９－２】

表15

配列番号：169 HU81 VH (CDR-GRAFT VH3-15/JH1)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNHYMYWVRQAPGKGLEWVGSISD
GGAYTFYPDTVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTEESANNGFA
FWGQGTLVTVSS

表15

配列番号：170 HU82 VH (CDR-GRAFT VH2-26/JH6)

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLTGYNINWIRQPPGKALEWLAMIWGY
GDTDYNSALKSRLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYCARDHYGGNDWY
FDVWGQGTTVTVSS

表15

配列番号：171 HU72 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVQSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKV
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPFTFGQGTKLEIK
R

表15

配列番号：172 HU73 VL (CDR-GRAFT L22/JK2)

DIQMIQSPSFLSASVGDRVSIICRASENIYSFLAWYLQKPGKSPKLFLYNANTLAE
GVSSRFSGRGSGTDFTLTISSLKPEDFAAYYCQHHFGTPFTFGQGTKLEIKR

表15

配列番号：173 HU77 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCKSTKSLLNGDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLV
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFESNYLFTFGQGTKLEIKR

【図８９－３】

表15

配列番号：174 HU80 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCKSTKSLLNGDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLV
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFESNYLFTFGQGTKLEIKR

表15

配列番号：175 HU81 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSILHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYRVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGAHVPFTFGQGTKLEIK
R

表15

配列番号：176 HU82 VL (CDR-GRAFT 08/JK2)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLH
SGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQGKTLPRTFGQGTKLEIKR

【図９０－１】

Figure 90

マウス/イヌキメラ抗体配列

表15A

PR-1290646 軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 :194)

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVQSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISREAEDLGVYYCFQGSHVPFTFGSGTKLEIK
RNDAQPAVYLFQPSPDQLHTGSASVVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQE
SVTEQDKDSTYSLSSTLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD
(配列番号 :194)

表15A

PR-1290646 重鎖アミノ酸配列 (配列番号 :195)

EVHLVESGGGLVKPGGFLILSCAASGFTFSDYYMFWIRQTPGKRLEWVATISDGG
SYTYYTDNVKGRFTISRDNVKNNLYLQMSHLKSADTAMYYCARDWSDSEGFA
YWGQGTLVTVSAASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNS
GSLTSGVHTFPSVLQSSGLHSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVVHPASNTKVDKPV
FNECRCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILRITRTPEVTCVVLDLGREDPEVQI
SWFVDGKEVHTAKTQSREQQFNGTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIDLP
SPIERTISKARGRAHKPSVYVLPPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNG
QQEPERKHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHETLQNHY
TDLSLSHSPGK (配列番号 :195)

表15A

PR-1290654 軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 :196)

DIQMTQSPASLSASVGETVTVTCRASENIYSFLAWHQQKQGKSPQLLVYNANTL
AEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYCQHHFGTPFTFGSGTKLEIKRND
AQPAVYLFQPSPDQLHTGSASVVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTE
QDKDSTYSLSSTLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQR SECQRVD (配列
番号 :196)

【図９０－２】

表15A

PR-1290654 重鎖アミノ酸配列 (配列番号 :197)

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMHWVKQRPGQGLEWIGRIDP
YGGGTKHNEKFKRKATVTADKSSSTAYILLSSLTSEDSAVYYCTRSGYDYYFDV
WGTGTTVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSG
SLTSGVHTFPSVLQSSGLHSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVVHPASNTKVDKPVF
NECRCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILRITRTPEVTCVVLDLGREDPEVQIS
WFVDGKEVHTAKTQSREQQFNGTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIDLPS
PIERTISKARGRAHKPSVYVLPPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNGQ
QEPERKHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHETLQNHYT
DLSLSHSPGV (配列番号 :197)

表15A

PR-1290656 軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 :198)

DVVLTQTPLSLPVNIGDQASISCKSTKSLLNGDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYL
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFESNYLFTFGSGTKLEM
KRNDAQPAVYLFQPSPDQLHTGSASVVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQ
ESVTEQDKDSTYSLSSTLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD
(配列番号 :198)

表15A

PR-1290656 重鎖アミノ酸配列 (配列番号 :199)

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIYWVKQRPEQGLEWIGRIDPAN
GNTIYASKFQGKASITADTSSNTAYMQLSSLTSGDTAVYYCAGYGYYAYWGQG
TTLTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSG
VHTFPSVLQSSGLHSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVVHPASNTKVDKPVFNECRC
TDTPPCPVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILRITRTPEVTCVVLDLGREDPEVQISWFVD
GKEVHTAKTQSREQQFNGTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIDLPSPIERT
ISKARGRAHKPSVYVLPPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNGQQEPER
KHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHETLQNHYTDLSLS
HSPGK (配列番号 :199)

【図９０－３】

表15A

PR-1290657 軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 :200)

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSILHSNGNTYLEWYLQKPGQSPNLLIYRV
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGAHVPFTFGSGTKLEIK
RNDAQPAVYLFQPSPDQLHTGSASVVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQE
SVTEQDKDSTYSLSSTLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD
(配列番号 :200)

表15A

PR-1290657 重鎖アミノ酸配列 (配列番号 :201)

EVQLVESGGGAVKPGGSLTLSCAASGFTFSNHYMYWVRQTPEKRLEWVASISD
GGAYTFYPDTVKGRFTISRDNVNNNLYLQMRHLKSEDTAMYYCTREESANNGF
AFWGQGTLVTVSAASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWN
SGSLTSGVHTFPSVLQSSGLHSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVVHPASNTKVDKP
VFNECRCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILRITRTPEVTCVVLDLGREDPEV
QISWFVDGKEVHTAKTQSREQQFNGTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHID
LPSPIERTISKARGRAHKPSVYVLPPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSN
GQQEPERKHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHETLQNH
YTDLSLSHSPGV (配列番号 :201)

表15A

PR-1290658 軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 :202)

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTITCRASQDITNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLH
SGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLDQEDIATYFCQQGKTLPRTFGGGTKLEIKRNDA
QPAVYLFQPSPDQLHTGSASVVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQ
DKDSTYSLSSTLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD (配列番号
:202)

【図９０－４】

表15A

PR-1290658 重鎖アミノ酸配列 (配列番号 :203)

QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTGYNINWVRQPPGKGLEWLGMIWGY
GDTDYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTARYYCARDHYGGNDWYF
DVWGTGTTVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWN
SGSLTSGVHTFPSVLQSSGLHSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVVHPASNTKVDKP
VFNECRCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILRITRTPEVTCVVLDLGREDPEV
QISWFVDGKEVHTAKTQSREQQFNGTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHID
LPSPIERTISKARGRAHKPSVYVLPPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSN
GQQEPERKHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHETLQNH
YTDLSLSHSPGK (配列番号 :203)

【配列表】
2013542716000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成25年4月19日(2013.4.19)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００５４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００５４】
【図１】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９７２ＶＨヌクレオチド配列（配列番号１）を示す図である。
【図２】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９７２ＶＨアミノ酸配列（配列番号２）を示す図である。
【図３】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９７２ＶＬヌクレオチド配列（配列番号３）を示す図である。
【図４】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９７２ＶＬアミノ酸（配列番号４）を示す図である。
【図５】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９７３ＶＨヌクレオチド配列（配列番号５）を示す図である。
【図６】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９７３ＶＨアミノ酸（配列番号６）を示す図である。
【図７】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９７３ＶＬヌクレオチド配列（配列番号７）を示す図である。
【図８】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９７３ＶＬアミノ酸（配列番号８）を示す図である。
【図９】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９７７ＶＨヌクレオチド配列（配列番号９）を示す図である。
【図１０】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９７７ＶＨアミノ酸（配列番号１０）を示す図である。
【図１１】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９７７ＶＬヌクレオチド配列（配列番号１１）を示す図である。
【図１２】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９７７ＶＬアミノ酸配列（配列番号１２）を示す図である。
【図１３】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９８０ＶＨヌクレオチド配列（配列番号１３）を示す図である。
【図１４】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９８０ＶＨアミノ酸（配列番号１４）を示す図である。
【図１５】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９８０ＶＬヌクレオチド配列（配列番号１５）を示す図である。
【図１６】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９８０ＶＬアミノ酸配列（配列番号１６）を示す図である。
【図１７】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９８１ＶＨヌクレオチド配列（配列番号１７）を示す図である。
【図１８】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９８１ＶＨアミノ酸（配列番号１８）を示す図である。
【図１９】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９８１ＶＬヌクレオチド配列（配列番号１９）を示す図である。
【図２０】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９８１ＶＬアミノ酸（配列番号２０）を示す図である。

【図２１】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９８２ＶＨヌクレオチド配列（配列番号２１）を示す図である。
【図２２】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９８２ＶＨアミノ酸（配列番号２２）を示す図である。
【図２３】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９８２ＶＬヌクレオチド配列（配列番号２３）を示す図である。
【図２４】マウス抗ＮＧＦ抗体のＰＲ－１２５４９８２ＶＬアミノ酸配列（配列番号２４）を示す図である。
【図２５】イヌＩｇフレームワーク上にＣＤＲグラフト化することによってイヌ化されたマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂ（ＣＤＲには下線が引かれている）、配列番号２５（７２．１ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図２６】イヌＩｇフレームワーク上にＣＤＲグラフト化することによってイヌ化されたマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂ（ＣＤＲには下線が引かれている）、配列番号２６（７２．１ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図２７】イヌＩｇフレームワーク上にＣＤＲグラフト化することによってイヌ化されたマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂ（ＣＤＲには下線が引かれている）、配列番号２７（７３．１ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図２８】イヌＩｇフレームワーク上にＣＤＲグラフト化することによってイヌ化されたマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂ（ＣＤＲには下線が引かれている）、配列番号２８（７３．１ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図２９】イヌＩｇフレームワーク上にＣＤＲグラフト化することによってイヌ化されたマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂ（ＣＤＲには下線が引かれている）、配列番号２９（７７．１ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図３０】イヌＩｇフレームワーク上にＣＤＲグラフト化することによってイヌ化されたマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂ（ＣＤＲには下線が引かれている）、配列番号３０（７７．１ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図３１Ａ】イヌＩｇフレームワーク上にＣＤＲグラフト化することによってイヌ化されたマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂ（ＣＤＲには下線が引かれている）、配列番号３１（８１．１ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図３１Ｂ】イヌＩｇフレームワーク上にＣＤＲグラフト化することによってイヌ化されたマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂ（ＣＤＲには下線が引かれている）、配列番号１７７（８１．１Ｂ　ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図３２】イヌＩｇフレームワーク上にＣＤＲグラフト化することによってイヌ化されたマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂ（ＣＤＲには下線が引かれている）、配列番号３２（８１．１ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図３３】イヌＩｇフレームワーク上にＣＤＲグラフト化することによってイヌ化されたマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂ（ＣＤＲには下線が引かれている）、配列番号３３（８２．１ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図３４】イヌＩｇフレームワーク上にＣＤＲグラフト化することによってイヌ化されたマウス抗ＮＧＦ　ｍＡｂ（ＣＤＲには下線が引かれている）、配列番号３４（８２．１ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図３５】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号３５（７２．２ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図３６Ａ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号３６（７２．２ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図３６Ｂ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１７９（７２．３ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図３６Ｃ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１８０（７２．４ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図３６Ｄ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ

化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１８１（７２．４ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図３７】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号３７（７３．２ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図３８Ａ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号３８（７３．２ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図３８Ｂ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１８２（７３．４ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図３８Ｃ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１８３（７３．４ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図３９】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号３９（７７．２ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図４０Ａ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号４０（７７．２ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図４０Ｂ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１８４（７７．３ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図４０Ｃ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１８５（７７．４ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図４０Ｄ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１８６（７７．４ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図４１】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号４１（８１．２ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図４２Ａ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号４２（８１．２ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図４２Ｂ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１８７（８１．４ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図４２Ｃ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１８８（８１．４ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図４２Ｄ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１８９（８１．２Ｂ　ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図４２Ｅ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１９０（８１．４Ｂ　ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図４２Ｆ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号２０６（８１．５Ｂ　ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図４２Ｇ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号２０７（８１．６Ｂ　ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図４３】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号４３（８２．２ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図４４Ａ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号４４（８２．２ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図４４Ｂ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１９１（８２．３ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図４４Ｃ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１９２（８２．４ＶＨアミノ酸）を示す図である。
【図４４Ｄ】復帰突然変異残基（太字で示されている復帰突然変異残基）を含有するイヌ化抗ＮＧＦ抗体、配列番号１９３（８２．４ＶＬアミノ酸）を示す図である。
【図４５】イヌＮＧＦをクローニングするためのプライマー配列、配列番号４５（ＮＧＦ－Ｄｏｇ－Ｓプライマー）を示す図である。
【図４６】イヌＮＧＦをクローニングするためのプライマー配列、配列番号４６（ＮＧＦ－Ｄｏｇ－ＡＳプライマー）を示す図である。
【図４７】イヌＮＧＦをクローニングするためのプライマー配列、配列番号４７（ＮＧＦ

－ｄ－Ｅｃ－Ｓプライマー）を示す図である。
【図４８】イヌＮＧＦをクローニングするためのプライマー配列、配列番号４８（ＮＧＦ－ｄ－Ｅｃ－ＡＳプライマー）を示す図である。
【図４９】イヌＮＧＦ　Ｃ末端６Ｈｉｓ（配列番号２０８）融合ヌクレオチド配列、配列番号４９を示す図である。
【図５０】イヌＮＧＦ　Ｃ末端６－Ｈｉｓ（配列番号２０８）アミノ酸配列、配列番号５０を示す図である。
【図５１】イヌＩｇＧ定常領域ヌクレオチド配列、配列番号５１を示す図である。
【図５２】イヌＩｇＧ定常領域アミノ酸配列、配列番号５２を示す図である。
【図５３】イヌκ定常領域ヌクレオチド配列、配列番号５３を示す図である。
【図５４】イヌκ定常領域アミノ酸配列、配列番号５４を示す図である。
【図５５】相補性決定領域、配列番号５５（７２．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ１）を示す図である。
【図５６】相補性決定領域、配列番号５６（７２．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ２）を示す図である。
【図５７】相補性決定領域、配列番号５７（７２．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ３）を示す図である。
【図５８】相補性決定領域、配列番号５８（７２．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ１）を示す図である。
【図５９】相補性決定領域、配列番号５９（７２．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ２）を示す図である。
【図６０】相補性決定領域、配列番号６０（７２．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ３）を示す図である。
【図６１】相補性決定領域、配列番号６１（７３．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ１）を示す図である。
【図６２】相補性決定領域、配列番号６２（７３．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ２）を示す図である。
【図６３】相補性決定領域、配列番号６３（７３．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ３）を示す図である。
【図６４】相補性決定領域、配列番号６４（７３．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ１）を示す図である。
【図６５】相補性決定領域、配列番号６５（７３．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ２）を示す図である。
【図６６】相補性決定領域、配列番号６６（７３．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ３）を示す図である。
【図６７】相補性決定領域、配列番号６７（７７．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ１）を示す図である。
【図６８】相補性決定領域、配列番号６８（７７．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ２）を示す図である。
【図６９】相補性決定領域、配列番号６９（７７．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ３）を示す図である。
【図７０】相補性決定領域、配列番号７０（７７．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ１）を示す図である。
【図７１】相補性決定領域、配列番号７１（７７．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ２）を示す図である。
【図７２】相補性決定領域、配列番号７２（７７．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ３）を示す図である。
【図７３】相補性決定領域、配列番号７３（８１．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ１）を示す図である。
【図７４】相補性決定領域、配列番号７４（８１．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ２）を示す図

である。
【図７５】相補性決定領域、配列番号７５（８１．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ３）を示す図である。
【図７６】相補性決定領域、配列番号７６（８１．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ１）を示す図である。
【図７７】相補性決定領域、配列番号７７（８１．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ２）を示す図である。
【図７８】相補性決定領域、配列番号７８（８１．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ３）を示す図である。
【図７９】相補性決定領域、配列番号７９（８２．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ１）を示す図である。
【図８０】相補性決定領域、配列番号８０（８２．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ２）を示す図である。
【図８１】相補性決定領域、配列番号８１（８２．１ＶＨアミノ酸；ＣＤＲ３）を示す図である。
【図８２】相補性決定領域、配列番号８２（８２．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ１）を示す図である。
【図８３】相補性決定領域、配列番号８３（８２．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ２）を示す図である。
【図８４】相補性決定領域、配列番号８４（８２．１ＶＬアミノ酸；ＣＤＲ３）を示す図である。
【図８５】ヒトβＮＧＦの配列（配列番号８５）を示す図である。
【図８６－１】表１２中に示される配列を示す図である。
【図８６－２】表１２中に示される配列を示す図である。
【図８６－３】表１２中に示される配列を示す図である。
【図８６－４】表１２中に示される配列を示す図である。
【図８６－５】表１２中に示される配列を示す図である。
【図８６－６】表１２中に示される配列を示す図である。
【図８７－１】表１３中に示される配列を示す図である。
【図８７－２】表１３中に示される配列を示す図である。
【図８７－３】表１３中に示される配列を示す図である。
【図８７－４】表１３中に示される配列を示す図である。
【図８８－１】表１４中に示される配列を示す図である。
【図８８－２】表１４中に示される配列を示す図である。
【図８８－３】表１４中に示される配列を示す図である。
【図８８－４】表１４中に示される配列を示す図である。
【図８８－５】表１４中に示される配列を示す図である。
【図８８－６】表１４中に示される配列を示す図である。
【図８８－７】表１４中に示される配列を示す図である。
【図８８－８】表１４中に示される配列を示す図である。
【図８９－１】表１５中に示される配列を示す図である。
【図８９－２】表１５中に示される配列を示す図である。
【図８９－３】表１５中に示される配列を示す図である。
【図９０－１】表１５Ａ中に示される配列を示す図である。
【図９０－２】表１５Ａ中に示される配列を示す図である。
【図９０－３】表１５Ａ中に示される配列を示す図である。
【図９０－４】表１５Ａ中に示される配列を示す図である。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１２４

【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１２４】
【表１】
表１：ＮＧＦの配列

タンパク質	配列識別子
イヌＮＧＦ　Ｃ末端６－Ｈｉｓ(配列番号208)	配列番号 ：50
ヒトＮＧＦ	配列番号 ：85

【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２８２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２８２】
［実施例５］：イヌＮＧＦのクローニング
イヌＮＧＦのコーディング領域を、配列番号４５および配列番号４６のプライマーまたは配列番号４７および配列番号４８のプライマーを使用してイヌユニバーサルｃＤＮＡ（Ｂｉｏｃｈａｉｎ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ、カタログ番号４７３４５６５）から増幅し、哺乳動物または細菌発現ベクターに、それぞれクローニングした。ＰＣＲ反応は、製造業者（Ｎｏｖａｇｅｎ、ＫＯＤ　Ｈｏｔ　Ｓｔａｒｔ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ、カタログ番号７１８４２－３）によって推奨されるように設定した。ＰＣＲ産物を、ＫｐｎＩ／ＸｂａＩ制限部位でｐＴＴ６ベクター（Ａｂｂｏｔｔ）とライゲーションすることによって、哺乳動物クローンをＣ末端６－Ｈｉｓ融合タンパク質（配列番号２０８）として作製した。鋳型として哺乳動物クローンを使用し、ＮｄｅＩ／ＸｈｏＩ制限部位でｐＥＴ１５Ｂ（Ｎｏｖａｇｅｎ）とライゲーションすることによって、プロ－ＮＧＦ配列を有する細菌クローンを作製した。単離されたイヌＮＧＦのＤＮＡ配列およびアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号４９および配列番号５０として列挙されている。この作業によって、精製のためのイヌＮＧＦタンパク質の発現が可能になった。
【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２８５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２８５】
Ｂ．急速希釈による再折りたたみ
プールした画分を、５０ｍＭ　ＤＴＴを添加することによって還元し、ＥＤＴＡを１０ｍＭまで添加し、室温で１時間インキュベートした。６Ｍ　ＨＣｌをｐＨ４．０まで添加することによってサンプルを酸性化し、６Ｍ　ＧｄＨＣｌ　ｐＨ５．０中で透析して過剰のＤＴＴを除去した。還元／酸性化されたサンプルを、１Ｌの１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ、１Ｍ　アルギニン、５ｍＭ　ＥＤＴＡ、５ｍＭ　ＧＳＨ、１ｍＭ　ＧＳＳＧ（配列番号２０９）　ｐＨ９．５中、４℃で４時間希釈することによって再折りたたみを実施した。再折りたたみされたタンパク質を、２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ、２００ｍＭ　ＮａＣｌ、１０％グリセロールｐＨ８．０に対して透析した。濾過によって沈殿を清澄化した。清澄化されたサンプルを濃縮し、１０Ｋメンブレンを使用して２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ、２００ｍＭ　ＮａＣｌ、１０％グリセロールｐＨ８．０中にダイアフィルトレーションを行った。
【手続補正５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３１０

【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３１０】
【表１７】

表１４：イヌＰＢＭＣ　ＲＮＡから導かれたイヌκ軽鎖可変ドメイン配列

Ca Ka016-A1	LSWLRQKPGHSPQRLIHQVSSRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRVEADDGGV YYCGQGSQSIPTFG QGTKVEIKR (配列番号 127)

Ca Ka016-A2	MRFPSQLLGLLMLWIPGSAGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLHSN GNTYLYWFRQKPGQSPQRLIYKVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVET DDAGVYYCGQVIQDPWTFGVGTKLELKR (配列番号 128)
Ca Ka016-A3	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQTLLYSN GKNYLFWYRQKPGQSPQRLIDLASNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEA DDAGVYYCGQGMEIPWTFGAGTKVELKR (配列番号 129)
Ca Ka016-A4	MKFPSLLLGLLMLWIPGSTGEAVMTQTPLSLAVTPGEVATISCRASQSLLIISD GKSYLNWYLQKPGQTPRPLIYEASKRFSGVSDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAE DVGVYYCQQSLHFPPTFGPGTKVELKR (配列番号 130)
Ca Ka016-A5	PDRFSGSGSGTDFTLTISRVEADDAGIYYCGQATQTPPTFGAGTKLDLKR (配列番号 131)
Ca Ka016-A6	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVRPGESASISCKASQSLLHSG GGTYLNWFRQRPGQSPQRLIYEVSKRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRITRVEA DDTGIYYCGQNTQLPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 132)
Ca Ka016-A7	MRFPSQLLGLLMLWIPGSTGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLHSN GNTYLFWLRQKPGQSPQRLIYRVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEA DDAGVYYCGQRVRSPWTFGAGTKVEVKR (配列番号 133)
Ca Ka016-A8	MRFPSQLLGLLMLWIPGSAGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLHSN GNTYLYWFRQKPGQSPQRLIYKVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVET DDAGVYYCGQVIQDPWTFGVGTKLELKR (配列番号 134)
Ca Ka016-A9	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDVVMAQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLLHSN GNTFLFWFRQKPGQSPQRLINFLSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRINRVEAD DAGLYYCGQGLQAPLTFGQGTKLEIKR (配列番号 135)
Ca Ka016-A10	MRFPSQLLGLLMLWIPGSNGDDVLTQTPLSLSVRPGETVSILCKASESLLHSD GNTYLSWVRQKAGQSPQRLMYRVSDRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISGVE ADDAGIYYCGQATHYPLEFGQGTRVEIKR (配列番号 136)
Ca Ka016-A11	LMLWIPGSTGEIVLTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLHPNGVTYLYWFRQ KPGQSPQRLIYKVSNRDPGVPDRFSGSGSEIDFTLIISRVEADDGGIYYCGQGI QNPFTFGQGTKLEIKR (配列番号 137)

Ca Ka016-A12	MRFPSQLLGLLMLWIPGSIGDIVMTQTPLSLSVSPGESASISCKASQSLLHSNG NTYLYWFRQKPGHSPQRLIHQVSSRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAD DAGLYYCGQGTQFPFTFGQGTKVEIKR (配列番号 138)
Ca Ka016-B1	MRFPSQLLGLLMLWIPGSIGDIVMTQTPLSLSVSPGESASISCKASQSLLHSNG NTYLYWFRQKPGH SPQRLIHQVSSRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGLYYCGQGTQFP FTFGQGTKVEIKR (配列番号 139)
Ca Ka016-B2	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLLHSN GNTYSFWFRQKPGQSPQRLINLVSSRGPGVPDRFSGSGSGTDFTLIISRVEAD DAGVYYCGHGKEAPYTFSQGTKLEIKR (配列番号 140)
Ca Ka016-B3	MRFPSQLLGLLMLWIPGSVGDIVMTQSPMSLSVGPGESASMSCKANQSLLYS DGITYLSWFLQRPGQSPQRLIYEVSKRDTGVPGRFIGSGAGTDFTLRISRVEA DDAGVYYCGQALQFPLTFSQGAKLEIER (配列番号 141)

Ca Ka016-B4	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDVVMTQTPLSLSVRPGETASISCRASQSLLHSS GITKLFWYRQKPGQSPQRLVYWVSNRDPGVPDRFTGSGSGTDFTLRISRLEA DDAGIYYCGHAIGFPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 142)
Ca Ka016-B5	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVRPGESASISCKASQSLLHSG GGTYLNWFRQRPGQSPQRLIYEVSKRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRITRVEA DDTGIYYCGQNTQFPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 143)
Ca Ka016-B6	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGGIVMTQTPLSLSVRPGETASISCRASQSLLYSD GNTYLFWFRQKPGQSPQRLMYRVSDRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISGVEA DDAGIYYCGQATHYPLEFGQGTXVEIKR (配列番号 144)
Ca Ka016-B7	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVRPGESASISCKASQSLLHSG GGTYLNWFRQRPGQSPQRLIYEVSKRDTGVPDRFIGSGAGTDFTLRISRVEA DDAGVYYCGQGVQGPWTIGAGTKLELQR (配列番号 145)
Ca Ka016-B8	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSVSVSPGETASISCKASQSLLSHD GNTYLHWFRQKPGQSPQRLIYKVSNRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA DDTGVYYCGQITQDPFTFGQGTKLEIKR (配列番号 146)

Ca Ka016-B9	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLLHSN GNTYLFWFRQKPGQSPQRLINWVSNRDPGVPDRFGGSGSGTDFTLRISRVEA DDAGIYYCGQGIQGPYTFSQGTKLEIKR (配列番号 147)
Ca Ka016-B10	MRFPSQFLGLLMLWIPGSSGDIAMTQTPLSLSVGPGETASITCKASQSLLHSN GNTYLFWFRQKPGQSPQRLIYLVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRVEAD DAGIYYCGQATQTPPTFGAGTKLDLKR (配列番号 148)
Ca Ka016-B11	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMAQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLIISD GRTCLSWFRQKSGQSPQRLIYEVSNRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAD DTGIYYCGQTVQFPLTFGQGTKLEIKR (配列番号 149)
Ca Ka016-B12	GQSPQRLIYKVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEPEDVGVYYCGQGT LNPWTFGAGTKVELK R (配列番号 150)
Ca Ka017-1	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDVVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLLHSN GNTFLFWFRQ*PGQSPQRLINFVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAD DAGIYYCGQGLLAPPTFGQGTKVEIRR (配列番号 151、配列番号210) 注記 : ＊は、停止コドンを示す
Ca Ka017-2	MRFPSQLLGLLMLWIPGSGGDIVMTQTPPSLSVSPREPASISCKASQSLLRSN GNTYLYWFRQKPGQSPEGLIYRVSNRFTGVSDRFSGSGSGTDFTLRISTVEAD DAGVYYCGQATQFPSTFSQGTKLEIKR (配列番号 152)
Ca Ka017-3	MRFPSQLLGLLMLWIPGSXGDIVLTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLHSNG ITYLNWYRQRPGQSPQXLIYKVSNRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRXSKVEAD DTGIYYCGQDTQFPLTLGXGTHXEIKR (配列番号 153)
Ca Ka017-5	MRFPSQLLGLLMLWIPGSTGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASIYCKASQSLLHSN GKTFLYWFRQKPGQS PQRLIYRVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGIYYCGQGIQDPT FGQGTKVEIKR (配列番号 154)
Ca Ka017-6	MRFPSQLLGLLMLWIPGSGGDIVMTQTPPSLSVSPREAASISCKASQSLLKSN GNTYFYWFRQKPG QVSEGLIYKVSSRFTGVSDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVYFCGQALQF PYTFSQGTKLDIKR (配列番号 155)

Ca Ka017-10	MRFPSQLLGLLMLWIPESGGDVVLTQTPPSLSLSPGETASISCKASRSLLNSD GSTYLDWYLQKPGQSPRLLIYLVSNRFSGVSDRFSGSGSGTDFTLTISRVEAD DAGVYYCGQGSRVPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 156)

Ca Ka017-11	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLLHRN GITYLSWFRQRPGQSP QRLINLVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDVGVYYCGIIGLQTPY TFGQGTSLEIER (配列番号 157)
Ca Ka017-12	MRFPSQLLGLLVLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETVSISCRASQSLLYSDG NIYLFWFRRKPGQSP QHLINLVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVYYCGQGTQPPY TFSQGTKVEIKR (配列番号 158)
Ca Ka017-13	MRFPSQLLGLLMLWIPESGGDVVLTQTPPSLSLSPGETASISCKASRSLLNSD GSTYLDWYLQKPGQS PRLLIYLVSNRFSGVSDRFSGSGSGTDFTLTISRVEADDAGVYYCGQGSRVPL TFGQGTKVEIKR (配列番号 159)
Ca Ka017-14	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMAQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLLHSN GITYLFWYRQKPGQS PQRLISMVFNRDPGVPDRFGGSGSGTDFTLRISRVEADDAGLYFCGHGTQIPY SFSQGTKLEIKR (配列番号 160)
Ca Ka017-16	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSISPGEPASISCKASQSLLHSGG DTYLNWFRQRPGQS PQLLINRVSSRKKGVPDRFSGSGSGTEFTLRISRVEADDAGIYFCGQGTQFPY TFSQGTKLEIKR (配列番号 161)
Ca Ka017-20	MRFPSQLLGLLMLWIPGSGGDIVMTQTPPSLSVSPGEPASMSCKASQSLLHSN GNTYLYWFRQKP GQSPEALIYKVSNRFTGVSDRFSGSGSGTDFTLRINRVEADDVGVYYCGQGI QIPYTFSQGTKLEIKR (配列番号 162)

Ca Ka017-23	MRFPSQLLGLLMLWIPGSTGEIVLTQTPLSLSVSPGESASISCKASQSLLYSNG NTYLYWFRQKAGQSP QRVIYRVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISSVENDDAGVYYCGQGSEDPP TFGAGTKVELKR (配列番号 163)
Ca Ka017-24	MRFPSQLLGLLTLWIPGSTGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLHSNG NTYLYWFRQKPGQS PQRLIYKVSNRDPGVPXRFSGSGSGTDFTLRVSXVEADDAGVYYCGQGVQD PFTFGQGTKLEIKR (配列番号 164)

【手続補正６】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図４９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【図４９】
Figure 49
配列番号49(ｲﾇNGF C末端6His(配列番号208)融合ﾇｸﾚｵﾁﾄﾞ配列)

ATGTCCATGTTGTTCTACACTCTGATCACAGCTCTTCTGATCGGCATCCGGGC
AGAACCGCATCCAGAGAGCCATGTCCCAGCAGGACACGCCATCCCCCACGCC
CACTGGACTAAGCTTCAGCATTCCCTTGACACAGCCCTCCGCAGAGCCCGCA
GCGCCCCGGCCGGGGCAATAGCTGCCAGGGTGACAGGGCAGACCCGCAACA
TCACTGTGGATCCCAAACTCTTTAAAAAGCGGCGACTGCGTTCGCCCCGCGT
GCTGTTCAGCACGCACCCCCCACCTGTGGCTGCGGACGCTCAGGACCTGGAC
CTGGAGGCCGGCAGCACCGCCTCCGTCAACAGGACTCACAGGAGCAAGCGG
TCTTCGTCCCACCCTGTCTTCCACCGGGGGGGAGTTCTCGGTGTGCGACAGCGT
CAGCGTGTGGGTGGGCGACAAGACCACAGCCACCGACATCAAGGGCAAGGA
GGTGATGGTGCTGGGAGAGGTGAACATTAACAACAGTGTGTTCAAACAGTAC
TTCTTTGAGACCAAGTGCCGGGACCCCACCCCCGTGGACAGCGGGTGCAGGG
GCATCGACTCCAAGCACTGGAACTCCTACTGCACCACCACCCACACCTTCGTC
AAGGCGCTGACCATGGACGGCAAGCAGGCTGCCTGGCGGTTCATCCGGATCG
ACACGGCCTGCGTGTGCGTGCTCAGCAGGAAGGCCGGGAGACGAGCCCATC
ATCATCATCATCAC

【手続補正７】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図５０
【補正方法】変更
【補正の内容】

【図５０】
Figure 50
配列番号50(ｲﾇNGF C末端6-His(配列番号208)ｱﾐﾉ酸配列)

MSMLFYTLITALLIGIRAEPHPESHVPAGHAIPHAHWTKLQHSLDTALRRARSAP
AGAIAARVTGQTRNITVDPKLFKKRRLRSPRVLFSTHPPPVAADAQDLDLEAGST
ASVNRTHRSKRSSSHPVFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEV
NINNSVFKQYFFETKCRDPTPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQ
AAWRFIRIDTACVCVLSRKAGRRAHHHHHH

ｲﾇ重鎖および軽鎖定常ﾄﾞﾒｲﾝ

【手続補正８】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図８８－５
【補正方法】変更
【補正の内容】

【図８８－５】

表14

配列番号　147 (Ca Ka016-B9)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLLHSNGNT
YLFWFRQKPGQSPQRLINWVSNRDPGVPDRFGGSGSGTDFTLRISRVEADDAGIY
YCGQGIQGPYTFSQGTKLEIKR

表14

配列番号　148 (Ca Ka016-B10)

MRFPSQFLGLLMLWIPGSSGDIAMTQTPLSLSVGPGETASITCKASQSLLHSNGNT
YLFWFRQKPGQSPQRLIYLVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRVEADDAGIY
YCGQATQTPPTFGAGTKLDLKR

表14

配列番号　149 (Ca Ka016-B11)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMAQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLHSDGRT
CLSWFRQKSGQSPQRLIYEVSNRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDTGIYY
CGQTVQFPLTFGQGTKLEIKR

表14

(配列番号　150) (Ca Ka016-B12)

GQSPQRLIYKVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEPEDVGVYYCGQGTLNP
WTFGAGTKVELKR

表14

配列番号　151および配列番号210 (Ca Ka017-1)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDVVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLLHSNGN
TFLFWFRQ*PGQSPQRLINFVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGIY
YCGQGLLAPPTFGQGTKVEIRR　注記:*は、停止ｺﾄﾞﾝを示す

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/048518

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/22
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/096458 A1 (GENENTECH INC [US]; SHELTON DAVID L [US]) 5 December 2002 (2002-12-05) examples	1-20
A	WO 2004/058184 A2 (RINAT NEUROSCIENCE CORP [US]; SHELTON DAVID L [US]; PONS JAUME [US]; R) 15 July 2004 (2004-07-15) examples	1-20
A	WO 2009/150623 A1 (PFIZER [US]; SHELTON DAVID LOUIS [US]) 17 December 2009 (2009-12-17) examples	1-20
A	US 2009/041717 A1 (MACDONALD LYNN [US] ET AL) 12 February 2009 (2009-02-12) examples	1-20

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"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)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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
"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
"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.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
8 March 2012	12/04/2012

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Vadot, Pierre

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/048518

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 03/060080 A2 (IDEXX LAB INC [US]; KRAH EUGENE REGIS III [US]; GUO HONGLIANG [US]; AI) 24 July 2003 (2003-07-24) examples -----	1-20

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2011/048518

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1-4(completely); 5-20(partially)

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2011/048518

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02096458 A1	05-12-2002	AT 522229 T	15-09-2011
		AU 2007207881 A1	06-09-2007
		AU 2010200170 A1	04-02-2010
		BR 0210231 A	14-09-2004
		CA 2448956 A1	05-12-2002
		CN 1684708 A	19-10-2005
		CN 101653604 A	24-02-2010
		DK 1401498 T3	21-11-2011
		EP 1401498 A1	31-03-2004
		EP 2340849 A1	06-07-2011
		ES 2371748 T3	09-01-2012
		IL 158921 A	29-12-2008
		JP 4567944 B2	27-10-2010
		JP 2004536072 A	02-12-2004
		JP 2010043089 A	25-02-2010
		KR 20080103610 A	27-11-2008
		KR 20100132559 A	17-12-2010
		MX PA03010911 A	17-02-2004
		NZ 529612 A	31-03-2006
		NZ 544410 A	30-04-2008
		PT 1401498 E	24-11-2011
		US 2004219144 A1	04-11-2004
		US 2010254990 A1	07-10-2010
		US 2011268725 A1	03-11-2011
		WO 02096458 A1	05-12-2002
		ZA 200308999 A	19-11-2004
WO 2004058184 A2	15-07-2004	AU 2003299898 A1	22-07-2004
		BR 0317738 A	22-11-2005
		CA 2511598 A1	15-07-2004
		EP 1575517 A2	21-09-2005
		EP 2263692 A1	22-12-2010
		EP 2270048 A2	05-01-2011
		JP 4134170 B2	13-08-2008
		JP 4336728 B2	30-09-2009
		JP 2006525955 A	16-11-2006
		JP 2008148710 A	03-07-2008
		JP 2009159977 A	23-07-2009
		KR 20050096101 A	05-10-2005
		MX PA05006854 A	12-12-2005
		NZ 540730 A	30-09-2010
		WO 2004058184 A2	15-07-2004
WO 2009150623 A1	17-12-2009	CA 2727852 A1	17-12-2009
		EP 2291403 A1	09-03-2011
		US 2011097341 A1	28-04-2011
		WO 2009150623 A1	17-12-2009
		WO 2009150635 A1	17-12-2009
US 2009041717 A1	12-02-2009	AU 2008287037 A1	19-02-2009
		CA 2695997 A1	19-02-2009
		CN 101827609 A	08-09-2010
		CO 6261383 A2	22-03-2011
		CR 11298 A	23-03-2010
		DO P2010000054 A	15-03-2010
		EC SP10010029 A	30-04-2010
		EP 2187964 A1	26-05-2010
		JP 2010535509 A	25-11-2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2011/048518

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		KR 20100058537 A	03-06-2010
		MA 31695 B1	01-09-2010
		US 2009041717 A1	12-02-2009
		US 2011256587 A1	20-10-2011
		WO 2009023540 A1	19-02-2009
WO 03060080 A2	24-07-2003	AU 2002359851 A1	30-07-2003
		CA 2469833 A1	24-07-2003
		EP 1485126 A2	15-12-2004
		JP 2005514063 A	19-05-2005
		WO 03060080 A2	24-07-2003

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

International Application No. PCT/US2011/048518

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 2, 5-20(all partially)

An antibody or antigen binding fragment thereof comprising:a heavy chain variable region comprises an amino acid sequence having at least 90% identity with a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, or an antigen-binding or an immunologically functional immunoglobulin fragment thereof; and the matching light chain variable region comprises an amino acid sequence having at least 90% identity or an antigen-binding or an immunologically functional immunoglobulin fragment thereof;
An isolated nucleic acid encoding an antibody thereof?;
A pharmaceutical or diagnostic composition comprising an antibody thereof and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient;
A method for reducing NGF activity in a subject suffering from a disorder in which NGF activity is detrimental, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody thereof.

2-12. claims: 1, 2, 5-20(all partially)

An antibody or antigen binding fragment thereof comprising : a heavy chain variable region comprises an amino acid sequence having at least 90% identity with a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 6,10,14,18,22,25,27,29,31,33,35, or an antigen-binding or an immunologically functional immunoglobulin fragment thereof;and the matching light chain variable region comprises an amino acid sequence having at least 90% identity or an antigen-binding or an immunologically functional immunoglobulin fragment thereof;
An isolated nucleic acid encoding an antibody thereof?;
A pharmaceutical or diagnostic composition comprising an antibody thereof and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient;
A method for reducing NGF activity in a subject suffering from a disorder in which NGF activity is detrimental, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody thereof.

---

13. claims: 3(completely); 1, 2, 5-20(partially)

An antibody or antigen binding fragment thereof comprising:a heavy chain variable region comprises an amino acid sequence having at least 90% identity with a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 37 or an antigen-binding or an immunologically functional immunoglobulin fragment thereof; and a light chain variable region comprises an amino acid sequence having at least 90% identity with a

sequence selected from the group consisting of SED ID NO: 38 or an antigen-binding or an immunologically functional immunoglobulin fragment thereof;
An isolated nucleic acid encoding an antibody thereof?;
A pharmaceutical or diagnostic composition comprising an antibody thereof and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient;
A method for reducing NGF activity in a subject suffering from a disorder in which NGF activity is detrimental, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody thereof.

14-31. claims: 1, 2, 5-20(all partially)

An antibody or antigen binding fragment thereof comprising:a heavy chain variable region comprises an amino acid sequence having at least 90% identity with a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 39,41,43,165,166,167,168,169,171,177,179,180,182,184,185,187 ,189,190 , or an antigen-binding or an immunologically functional immunoglobulin fragment thereof;and the matching light chain variable region comprises an amino acid sequence having at least 90% identity or an antigen-binding or an immunologically functional immunoglobulin fragment thereof;
An isolated nucleic acid encoding an antibody thereof;
A pharmaceutical or diagnostic composition comprising an antibody thereof and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient;
A method for reducing NGF activity in a subject suffering from a disorder in which NGF activity is detrimental, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody thereof.

---

32. claims: 4(completely); 1, 2, 5-20(partially)

An antibody or antigen binding fragment thereof comprising:a heavy chain variable region comprises an amino acid sequence having at least 90% identity with a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 192 or an antigen-binding or an immunologically functional immunoglobulin fragment thereof; and a light chain variable region comprises an amino acid sequence having at least 90% identity with a sequence selected from the group consisting of SED ID NO: 193 or an antigen-binding or an immunologically functional immunoglobulin fragment thereof;
An isolated nucleic acid encoding an antibody thereof?;
A pharmaceutical or diagnostic composition comprising an antibody thereof and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient;
A method for reducing NGF activity in a subject suffering from a disorder in which NGF activity is detrimental, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody thereof.

International Application No. PCT/US2011/048518

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

33-39. claims: 1, 2, 5-20(all partially)

An antibody or antigen binding fragment thereof comprising:a heavy chain variable region comprises an amino acid sequence having at least 90% identity with a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 195,197,199,201,203,206,207, or an antigen-binding or an immunologically functional immunoglobulin fragment thereof; and the matching light chain variable region comprises an amino acid sequence having at least 90% identity or an antigen-binding or an immunologically functional immunoglobulin fragment thereof;
An isolated nucleic acid encoding an antibody thereof;
A pharmaceutical or diagnostic composition comprising an antibody thereof and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient;
A method for reducing NGF activity in a subject suffering from a disorder in which NGF activity is detrimental, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody thereof.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*47/18*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/18		
Ａ６１Ｐ	*25/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/04		
Ａ６１Ｋ	*39/395*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	
Ｇ０１Ｎ	*33/53*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ	
Ｇ０１Ｎ	*33/531*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｄ	
			Ｇ０１Ｎ	33/531	Ａ	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM

(72)発明者 バーボン，ジエフリー・エイ
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０１４５０、グロツトン、メイン・ストリート・４１５
(72)発明者 チヤーヤ，メア
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０１５４５、シユルーズベリー、ビタースイート・サークル・１２
(72)発明者 フアン，エマ
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０１５３２、ノースバラ、ストラツトン・ウエイ・３１
(72)発明者 ハツチンス，チヤールズ・ダブリユ
アメリカ合衆国、イリノイ・６００４８、グリーン・オークス、プレイリー・リツジ・ウエイ・３１００５
(72)発明者 ラング，ダイアン・エム
アメリカ合衆国、ロード・アイランド・０２８３２、ホープ・バレー、ガーネツト・レイン・５
(72)発明者 バーロウ，イブ・エイチ
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０２４８１、ウエルスレイ、ジエフアーソン・ロード・４
(72)発明者 レデイー，メアリー
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０２７６０、ノース・アトルボロ、ピーターズ・ウエイ・７２
(72)発明者 チヤーリ，ラビ
アメリカ合衆国、コネチカツト・０６３６０、ノーウイツチ、ギフオード・ストリート・７２

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA43 CA04 DA03 EA04 GA11
4C076 AA12 BB13 BB16 CC01 DD37R DD43R DD49R FF39
4C085 AA13 BB11 EE01 GG02 GG04
4H045 AA11 AA30 BA10 DA76 EA20 EA50 FA74 GA23 GA26

专利名称(译)	抗NGF抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2013542716A	公开(公告)日	2013-11-28
申请号	JP2013525008	申请日	2011-08-19
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药		
[标]发明人	レイシースーザンイー バーボンジエフリーエイ チヤーヤメア フアンエマ ハツチンスチヤールズダブリユ ラングダイアンエム バーロウイブエイチ レデイーメアリー チヤーリラビ		
发明人	レイシー,スーザン·イー バーボン,ジエフリー·エイ チヤーヤ,メア フアン,エマ ハツチンス,チヤールズ·ダブリユ ラング,ダイアン·エム バーロウ,イブ·エイチ レデイー,メアリー チヤーリ,ラビ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/22 A61K9/08 A61K47/12 A61K47/10 A61K47/18 A61P25/04 A61K39/395 G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	A61P19/02 A61P25/04 A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K16/22 C07K2317/24 C07K2317/73 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2317/94 A61K39/3955 A61K2039/505 C07K2317/31 C07K2317/50 C07K2317/51 C07K2317/515 C07K2317/54 C07K2317/55 C07K2317/565 C07K2317/569 C07K2317/60 C07K2317/622 C07K2317/624 C07K2317/626 C07K2317/64 G01N33/566		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/22 A61K9/08 A61K47/12 A61K47/10 A61K47/18 A61P25/04 A61K39/395.N A61K39/395.D G01N33/53.D G01N33/531.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/CA04 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4C076/AA12 4C076/BB13 4C076/BB16 4C076/CC01 4C076/DD37R 4C076/DD43R 4C076/DD49R 4C076/FF39 4C085/AA13 4C085/BB11 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG04 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA23 4H045/GA26		
优先权	61/375193 2010-08-19 US		
其他公开文献	JP6121903B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开内容包括作为NGF结合蛋白的抗体，特别是嵌合抗体，CDR嫁接的抗体和犬抗体，以及其制备方法和用途。本公开内容的抗体或抗体部分可用于检测NGF和抑制NGF活性，例如，在患有NGF活性有害的病症的哺乳动物受试者中。

タンパク質	配列識別子
イヌNGF C末端6-His	配列番号：50
ヒトNGF	配列番号：85