

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-176178

(P2017-176178A)

(43) 公開日 平成29年10月5日(2017.10.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A C 4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/22 (2006.01)	C 0 7 K 16/22	4 C 0 7 6
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N 4 C 0 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D 4 H 0 4 5
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
審査請求 有 請求項の数 13 O L (全 137 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-65029 (P2017-65029)
 (22) 出願日 平成29年3月29日 (2017. 3. 29)
 (62) 分割の表示 特願2013-525008 (P2013-525008) の分割
 原出願日 平成23年8月19日 (2011. 8. 19)
 (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 513140802
 ゼエティス・ベルジャム・エス・アー
 ベルギー国 ベー-1348 ルーヴァン
 -ラーヌープ, リュ・レ・ピュルニア 1
 (74) 代理人 110001173
 特許業務法人川口国際特許事務所
 (72) 発明者 スーザン・イー・レイシー
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01
 581、ウエストボロー、グレン・ストリ
 ート・38
 (72) 発明者 ジェフリー・エイ・バーボン
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01
 450、グロツトン、メイン・ストリート
 ・415

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】 (修正有)

【課題】 疼痛などNGF活性が有害である障害を患っている哺乳動物を対象とした、NGFを阻害するための治療手段、又NGFのレベルの増大と関連している疾患を治療するための組成物及び方法、NGFを検出する方法の提供。

【解決手段】 マウス抗NGF抗体を、CDRグラフト化することにより製造した、哺乳動物化、特にイヌ化、ヒト化抗体。

【選択図】 図1

Figure 1

マウス抗NGF抗体
 配列番号1 (PR-1254972) の部分配列
 GAAGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTTCC
 TGATACTCTCCTGTGGAGCCTCTGGATTACATTTCAGTACTATTACATGTTTT
 GGATTCGCCAGACTCCGGAAAGAGGCTGGAGTGGTGCACAACATTAGTGA
 TGGTGGTAGTTACACCTACTACACAGACAATGTAAGGGCCGATTCCACATC
 TCCAGAGACAAIGTCAAGAACAACCTGTACCTGCAATGAGCCAICTGAAGT
 CTGGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGATTGGAGTGACTCCGAGGG
 GTTGTCTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

【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

10

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

20

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。

30

【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。

40

【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。

50

【請求項 9】

配列番号 5 2 および配列番号 5 4 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、Science 187: 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、Nature 401: 184 - 188 頁 (1999

10

20

30

40

50

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、Nature 368:246-9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))。

10

【0004】

NGFは、肥満細胞(Leonら、Proc. Natl. Acad. Sci.、91:3739-3743頁(1994年))、B-リンパ球(Torciana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。

20

【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.、USA 86:10059-10063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。

30

40

【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

50

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. Venereol.、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 (Hongora、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の効果の障害に基づく治療アプローチに大きな関心をもたらした (Saragovira、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

10

20

30

40

50

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。

10

【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

20

【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

30

【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、Science 187: 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、Nature 401: 184 - 188頁(1999年)

【非特許文献4】Smeyneら、Nature 368: 246 - 9頁(1994年)

【非特許文献5】Crowleyら、Cell, 76: 1001 - 11頁(1994年)

40

【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)

50

- 【非特許文献11】Leon \bar{b} 、Proc. Natl. Acad. Sci.、91:3739-3743頁(1994年)
- 【非特許文献12】Torcia \bar{b} 、Cell、85:345-356頁(1996年)
- 【非特許文献13】Di Marco \bar{b} 、J. Biol. Chem.、268:22838-22846頁)
- 【非特許文献14】Ueyama \bar{b} 、J. Hypertens.、11:1061-1065頁(1993年)
- 【非特許文献15】Lindholm \bar{b} 、Eur. J. Neurosci.、2:795-801頁(1990年)
- 【非特許文献16】Kassel \bar{b} 、Clin. Exp. Allergy、31:1432-40頁(2001年) 10
- 【非特許文献17】Steiner \bar{b} 、Am. J. Physiol.、261:F792-798頁(1991年)
- 【非特許文献18】Schwartz \bar{b} 、J. Photochem. Photobiol.、B66:195-200頁(2002年)
- 【非特許文献19】Ottens \bar{b} 、Eur. J. Pharmacol.、106:199-201頁(1984年)
- 【非特許文献20】Ottens \bar{b} 、Proc. Natl. Acad. Sci.、USA 86:10059-10063頁(1989年)
- 【非特許文献21】Matsuda \bar{b} 、Proc. Natl. Acad. Sci.、85:6508-6512頁(1988年) 20
- 【非特許文献22】Pearce \bar{b} 、J. Physiol.、372:379-393頁(1986年)
- 【非特許文献23】Bischoff \bar{b} 、Blood、79:2662-2669頁(1992年)
- 【非特許文献24】Horigome \bar{b} 、J. Biol. Chem.、268:14881-14887頁(1993年)
- 【非特許文献25】Lewin, G. R. \bar{b} 、Eur. J. Neurosci. 6:1903-1912頁(1994年)
- 【非特許文献26】Apfel, S. C. \bar{b} 、Neurology、51:695-702頁(1998年) 30
- 【非特許文献27】Zhu, Z. \bar{b} 、J. Clin. Oncol.、17:241-228頁(1999年)
- 【非特許文献28】Bracci-Laudiero \bar{b} 、Neuroreport、4:563-565頁(1993年)
- 【非特許文献29】Bracci-Laudiero \bar{b} 、Neurosci. Lett.、147:9-12頁(1992年)
- 【非特許文献30】Raychaudhuri \bar{b} 、Acta Derm. Venereol.、78:84-86頁(1998年)
- 【非特許文献31】Falcim \bar{b} 、Ann. Rheum. Dis.、55:745-748頁(1996年) 40
- 【非特許文献32】Okragly \bar{b} 、J. Urology、161:438-441頁(1999年)
- 【非特許文献33】Braun \bar{b} 、Eur. J. Immunol.、28:3240-3251頁(1998年)
- 【非特許文献34】Aloe \bar{b} 、Arch. Rheum.、35:351-355頁(1992年)
- 【非特許文献35】Aloe \bar{b} 、Clin. Exp. Rheumatol.、10:203-204頁(1992年)
- 【非特許文献36】Aloe \bar{b} 、Int. J. Tissue Reactions - Ex 50

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】Hongora、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

10

20

30

40

50

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。

10

【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。

20

30

40

【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、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。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

50

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。

10

【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(IC₅₀)でNGFを中和できる可能性がある。

20

【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 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ または少なくとも約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ または少なくとも約 $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 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。

30

【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 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、約 $3.14 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、約 $2.37 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-13} \text{ M}$ および約 $3.3 \times 10^{-14} \text{ M}$ 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。

40

【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】

50

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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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ヘ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

50

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。

10

【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を含む免疫試薬（*i*
*m**m**u**n**o**r**e**g**a**m**e**t*）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。

20

【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

30

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

40

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、6
7、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

50

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、

I g E 定常ドメイン、I g G 2 定常ドメイン、I g G 3 定常ドメインおよびI g A 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F v、モノクローナル抗体、s c F v、キメラ抗体、単ドメイン抗体、C D R グラフト化抗体、ダイアボディー、ヒト化抗体、イヌ化m A b、イヌm A b、ネコm A b、ネコ化m A b、ウマm A b、ウマ化m A b、多重特異性抗体、F a b、二重特異性抗体、D V D - I g、F a b'、二特異性抗体、F (a b')₂ およびF v からなる群から選択される。

10

【0045】

別の態様では、上記で同定された抗体は、N G F 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、I g M 定常ドメイン、I g G 4 定常ドメイン、I g G 1 定常ドメイン、I g E 定常ドメイン、I g G 2 定常ドメイン、I g G 3 定常ドメインおよびI g A 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、I g M 定常ドメイン、I g G 4 定常ドメイン、I g G 1 定常ドメイン、I g E 定常ドメイン、I g G 2 定常ドメイン、I g G 3 定常ドメインおよびI g A 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F v、モノクローナル抗体、s c F v、キメラ抗体、単ドメイン抗体、C D R グラフト化抗体、ダイアボディー、ヒト化抗体、イヌ化m A b、イヌm A b、ネコm A b、ネコ化m A b、ウマm A b、ウマ化m A b、多重特異性抗体、F a b、二重特異性抗体、D V D - I g、F a b'、二特異性抗体、F (a b')₂ およびF v からなる群から選択される。

20

30

【0048】

別の態様では、上記で同定された抗体は、N G F 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。

40

【0051】

医薬組成物は、約7.0より高いp H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p H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p Hを有し得る。さらには、医薬組成物のp Hは、約7.4から約7.6の間であり得る。さらには、医薬組成物のp H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

50

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 - 1254972 VH 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 - 1254972 VH 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 - 1254972 VL 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 - 1254972 VL 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 - 1254973 VH 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 - 1254973 VH 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 - 1254973 VL 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 - 1254973 VL 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 - 1254977 VH 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 - 1254977 VH 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 - 1254977 VL 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 - 1254977 VL 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 - 1254980 VH 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 - 1254980 VH 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 - 1254980 VL 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 - 1254980 VL 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 - 1254981 VH 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 - 1254981 VH アミノ酸 (配列番号 18) を示す図である。

10

20

30

40

50

【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

10

20

30

40

50

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 V H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 V H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 V H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 V H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

10

20

30

40

50

- 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 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 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

10

20

30

40

50

である。

【図 7 3】相補性決定領域、配列番号 7 3 (8 1 . 1 V H アミノ酸 ; C D R 1) を示す図である。

【図 7 4】相補性決定領域、配列番号 7 4 (8 1 . 1 V H アミノ酸 ; C D R 2) を示す図である。

【図 7 5】相補性決定領域、配列番号 7 5 (8 1 . 1 V H アミノ酸 ; C D R 3) を示す図である。

【図 7 6】相補性決定領域、配列番号 7 6 (8 1 . 1 V L アミノ酸 ; C D R 1) を示す図である。

【図 7 7】相補性決定領域、配列番号 7 7 (8 1 . 1 V L アミノ酸 ; C D R 2) を示す図である。

【図 7 8】相補性決定領域、配列番号 7 8 (8 1 . 1 V L アミノ酸 ; C D R 3) を示す図である。

【図 7 9】相補性決定領域、配列番号 7 9 (8 2 . 1 V H アミノ酸 ; C D R 1) を示す図である。

【図 8 0】相補性決定領域、配列番号 8 0 (8 2 . 1 V H アミノ酸 ; C D R 2) を示す図である。

【図 8 1】相補性決定領域、配列番号 8 1 (8 2 . 1 V H アミノ酸 ; C D R 3) を示す図である。

【図 8 2】相補性決定領域、配列番号 8 2 (8 2 . 1 V L アミノ酸 ; C D R 1) を示す図である。

【図 8 3】相補性決定領域、配列番号 8 3 (8 2 . 1 V L アミノ酸 ; C D R 2) を示す図である。

【図 8 4】相補性決定領域、配列番号 8 4 (8 2 . 1 V L アミノ酸 ; C D R 3) を示す図である。

【図 8 5】ヒト N G F の配列 (配列番号 8 5) を示す図である。

【図 8 6 - 1】表 1 2 中に示される配列を示す図である。

【図 8 6 - 2】表 1 2 中に示される配列を示す図である。

【図 8 6 - 3】表 1 2 中に示される配列を示す図である。

【図 8 6 - 4】表 1 2 中に示される配列を示す図である。

【図 8 6 - 5】表 1 2 中に示される配列を示す図である。

【図 8 6 - 6】表 1 2 中に示される配列を示す図である。

【図 8 7 - 1】表 1 3 中に示される配列を示す図である。

【図 8 7 - 2】表 1 3 中に示される配列を示す図である。

【図 8 7 - 3】表 1 3 中に示される配列を示す図である。

【図 8 7 - 4】表 1 3 中に示される配列を示す図である。

【図 8 8 - 1】表 1 4 中に示される配列を示す図である。

【図 8 8 - 2】表 1 4 中に示される配列を示す図である。

【図 8 8 - 3】表 1 4 中に示される配列を示す図である。

【図 8 8 - 4】表 1 4 中に示される配列を示す図である。

【図 8 8 - 5】表 1 4 中に示される配列を示す図である。

【図 8 8 - 6】表 1 4 中に示される配列を示す図である。

【図 8 8 - 7】表 1 4 中に示される配列を示す図である。

【図 8 8 - 8】表 1 4 中に示される配列を示す図である。

【図 8 9 - 1】表 1 5 中に示される配列を示す図である。

【図 8 9 - 2】表 1 5 中に示される配列を示す図である。

【図 8 9 - 3】表 1 5 中に示される配列を示す図である。

【図 9 0 - 1】表 1 5 A 中に示される配列を示す図である。

【図 9 0 - 2】表 1 5 A 中に示される配列を示す図である。

【図 9 0 - 3】表 1 5 A 中に示される配列を示す図である。

10

20

30

40

50

【図 90 - 4】表 15 A 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ぬが、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4

10

20

30

40

50

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。

10

【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。

20

【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。

30

【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、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキソルピシン、ダウノルピシン、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。

40

【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

50

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、ダイアポディー、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。ダイアポディーなどの一本鎖抗体のその他の形態も包含される。ダイアポディーは、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(Kipriyan

10

20

30

40

50

ov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ピ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。

10

【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。

20

【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。

30

【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

40

50

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、誘導體、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。イヌ化抗体は、イヌ化軽鎖のみを含み得る場合もあり、またはイヌ化重鎖のみを含み得る場合もある。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み得る。

10

【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。

20

【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内の特定の低位部分が、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。これらの低位部分は、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

30

40

50

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Morrissonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855頁(1984年)参照のこと)。

10

【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。

20

30

【0081】

用語「ダイアポディー」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。

40

【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

50

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。

10

【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。

20

【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。

30

【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、誘導體、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

40

50

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、I g G a、I g G b、I g G c、I g G (T)、I g M、I g A が挙げられる。

【 0 0 8 9 】

用語「F a b」とは、抗体断片を指す。抗体のパパイン消化によって、「F a b」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「F c」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。F a b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（C H 1）も含有する。F a b'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C H 1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F a b断片と異なる。F a b' - S H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F a b'の本明細書における名称である。F (a b')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F a b'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。

10

【 0 0 9 0 】

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、C D R中、特に、C D R 3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C D R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。

20

【 0 0 9 1 】

用語「ネコ化 (f e l i n i z a t i o n)」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。

【 0 0 9 2 】

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、V Hおよび/またはV L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C D R配列が、対応するネコC D R配列を置き換えるようネコV HおよびV L配列中に導入されているC D Rグラフト化抗体がある。

30

【 0 0 9 3 】

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（F R）残基は、対応する非ネコF R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（F c）の少なくとも一部を含み得る。

40

【 0 0 9 4 】

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（F R）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（C D R）とを含む抗体またはその変異体、誘導體、類似体または断片で

50

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。

10

【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）。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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、誘導體、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。

10

【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に選択され得る。

20

【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。

30

40

【0103】

用語「超可変領域」とは、抗原結合に關与する抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、Kabata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

50

は international Immunogenetics information 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、Part 1、(Griffin, A.M.およびGriffin, I.I.G.、編)、1994年、IIT Press、New Jersey; von Ieije, 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、Nucleic 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 NCBI/NLM/NIH Bethesda、Md. 20894; Altschulら、1

10

20

30

40

50

990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对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。

10

【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、

20

【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。

30

【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（Kabata, Ann. NY Acad. Sci., 190: 382-391頁（1971年）およびKabata, 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

40

50

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 - 34、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。

10

【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ピ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、³H、¹⁴C、³⁵S、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁷⁷Lu、¹⁶⁶Hoまたは¹⁵³Sm）；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；ピオチニル基；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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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、W O 0 1 / 8 3 5 2 5 に記載されている。

【 0 1 2 0 】

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。

【 0 1 2 1 】

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。

10

20

【 0 1 2 2 】

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。

【 0 1 2 3 】

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。

30

【 0 1 2 4 】

【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

【 0 1 2 5 】

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。

40

【 0 1 2 6 】

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かわっているか、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

50

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。

10

【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ッ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プロセッシングシグナル；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、発現およびプロセッ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。

20

30

【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む得る。

40

【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

50

、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 Cloning: 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よ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

10

20

30

40

50

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。

10

【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。

20

【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。

30

【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とも80%、少なくともとも85%、少なくともとも90%、少なくともとも95%、少なくともとも98%または少なくともとも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））。

40

【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

50

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。

10

【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。

20

【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。

30

40

【0146】

用語「パーニアゾン」とは、Foot e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。パーニアゾン残基は、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

50

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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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髓腫細胞と融合することができる(Harlowら、上記)。または、骨髓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、マウス骨髓腫細胞)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、ヒト非分泌性骨髓腫が抗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Babcock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、抗原特異的溶血ブラン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

10

20

30

40

50

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)および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、Nature 368: 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IgG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. Pharmacology 113: 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、HC07、HC012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、WO0009560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/Technology、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

10

20

30

40

50

、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 Barbasa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、レポ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VII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。

10

20

30

40

50

【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。

10

【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。

20

30

【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、レポータ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Witttrupら、米国特許第6,699,658号に開示されるものが挙げられる。

40

【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Science 246:1275-81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

50

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。

10

20

30

【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ッ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プロセッシングシグナル；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、発現およびプロセッ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。

40

【0168】

50

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。

10

【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切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、チャニーズハムスター卵巣(CHO細胞)(例えば、Kauffman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骨髓腫細胞、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。

20

30

【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。

40

【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

50

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。

10

【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。

20

30

【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

40

50

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。

10

【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。

20

30

【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；

40

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

50

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

10

20

30

40

50

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しものを含む。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。

10

【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し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。

20

30

【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。

40

【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

50

、例えば 軽鎖定常領域または 軽鎖定常領域などを含み得る。例示的結合タンパク質は、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、FcRs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。

10

【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、もしくは定常ドメインのいずれかまたはイヌ、ウマまたはネコもしくは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。

20

【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。

30

【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(IC₅₀)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10²M⁻¹s⁻¹; 少なくとも約10³M⁻¹s⁻¹; 少なくとも約10⁴M⁻¹s⁻¹; 少なくとも約10⁵M⁻¹s⁻¹; 少なくとも約10⁶M⁻¹s⁻¹または少なくとも約10⁷M⁻¹s⁻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10⁻³s⁻¹; 最大で約10⁻⁴s⁻¹

40

50

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 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、約 $3.14 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、約 $2.37 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-13} \text{ M}$ または約 $3.3 \times 10^{-14} \text{ M}$ 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 0.1 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 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 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 $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 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 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 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 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 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 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 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 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 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 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 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 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 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 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ 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 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 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 $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ 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 0.1 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 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 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 $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 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 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 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 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 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 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 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 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 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 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 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 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 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 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ 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 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 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 $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ 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、131

10

20

30

40

50

I、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ポディー）、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。

10

【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な薬剤として、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、ピ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。

20

【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。

30

【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ッシングを受け得る。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

40

50

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ギー性が挙げられる。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じ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。

10

【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じ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）。

20

【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。

30

【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、Morrisson、Science、229：1202頁（1985年）；Oira、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」（Morrisson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。

40

【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

50

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。

10

【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）、ペ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。

20

【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Kabata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。

30

40

【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)	EVQLVESGGGLVQP <u>GGSLRLSCAASGFTFSDYYM</u> FWVRQATGKGLE WVSTISDGGSYTYITDNVKGRFTISRENAKNSLYLQMNSLRAGDT AVYYCARDWSD <u>SEGFAYWGQ</u> GLTVTVSS (配列番号 : 165)	10
Hu73 VH (CDR-GRAFT VH1-18/JH6)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV <u>SCKASGYTFTNYWMH</u> WVRQAPGQGL EWMGRIDPYGGGTKHNEKFKRRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTA VYYCARS <u>GYDYFDV</u> WGQGTTVTVSS (配列番号 : 166)	
HU77 VH (CDR-GRAFT VH1-69/JH6)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV <u>SCKASGFNIKDTYIY</u> WVRQAPGQGLEW MGRIDPANGNTIYASKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARY <u>GYAY</u> WGQGTTVTVSS (配列番号 : 167)	20
HU80 VH (CDR-GRAFT VH1-18/JH6)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV <u>SCKASGFNIKDTYIY</u> WVRQAPGQGLE WMGRIDPANGNTIYASKFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAV YYCARY <u>GYAY</u> WGQGTTVTVSS (配列番号 : 168)	
HU81 VH (CDR-GRAFT VH3-15/JH1)	EVQLVESGGGLVKP <u>GGSLRLSCAASGFTFSNHYMY</u> WVRQAPGKGLE WVGSISDGGAYTFYPDTVKGRTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAV YYCTTEESANNGFA <u>FWGQ</u> GLTVTVSS (配列番号 : 169)	30
HU82 VH (CDR-GRAFT VH2-26/JH6)	QVTLKESGPVLVKPTETLTLCTVSGFSL <u>TGYNIN</u> WIRQPPGKALEWL AMIWGYGDTDYNSALKSRLTISKDTSKSQVVLTMNMDPVDATYY CARDHYGGNDWY <u>FDV</u> WGQGTTVTVSS (配列番号 : 170)	
HU72 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)	DIVMTQTPLSLPVT <u>PGEPASISCRSSQSIVQSNGNTYLE</u> WYLQKPGQSP QLLIYKVSNRFS <u>GV</u> PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCF <u>QGS</u> <u>HVPFTFGQ</u> GTKLEIKR (配列番号 : 171)	40
HU73 VL	DIQMIQSPSFLSASVGD <u>RVSIICRA</u> SENIYSFLAWYLQKPGKSPKLF <u>LYN</u>	

(CDR-GRAFT L22/JK2)	<u>ANTLAE</u> GVSSRFSGRGS GTDF TLTIISLKPEDFAAYYC <u>QH</u> HFGT <u>PFT</u> FG QGTKLEIKR (配列番号 : 172)
HU77 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASIS <u>CKSTKS</u> LLNGDGFTYLDWYLQKPGQSP QLLIY <u>L</u> VS <u>NRF</u> SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYYC <u>FES</u> NY <u>LFT</u> FGQGTKLEIKR (配列番号 : 173)
HU80 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASIS <u>CKSTKS</u> LLNGDGFTYLDWYLQKPGQSP QLLIY <u>L</u> VS <u>NRF</u> SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYYC <u>FES</u> NY <u>LFT</u> FGQGTKLEIKR (配列番号 : 174)
HU81 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASIS <u>CRSSQ</u> SILHSNGNTYLEWYLQKPGQSP QLLIY <u>R</u> VS <u>NRF</u> SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYYC <u>FQGA</u> <u>HVP</u> FTFGQGTKLEIKR (配列番号 : 175)
HU82 VL (CDR-GRAFT 08/JK2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTIT <u>CRASQ</u> DITNYLNWYQQKPGKAPKLLI YY <u>T</u> SRL <u>H</u> SGVPSRFSGSGSGTDFTFITSSLPEDIATYYC <u>QO</u> GKTL <u>PR</u> TF GQGTKLEIKR (配列番号 : 176)

10

20

30

40

50

【 0 2 0 3 】

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、組み合わせられ得る。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。

10

【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-A鎖cDNAおよび4つのイヌIgG-A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。

20

30

【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

10

20

30

40

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

【 0 2 0 7 】

C . 抗 N G F 抗体の使用

10

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 N G F 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、N G F 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 N G F 抗体またはその断片と接触させるステップ、および（ i i ）抗 N G F 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 N G F の存在を示す。

【 0 2 0 8 】

20

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 N G F 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、N G F 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 N G F 抗体またはその断片を、抗体または断片の N G F 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（ i i ）抗体または断片および N G F 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、N G F の存在を示す。

【 0 2 0 9 】

30

N G F 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 N G F 抗体またはその部分、もしくはその組合せが、N G F （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（E L I S A）、ラジオイムノアッセイ（R I A）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 N G F 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 N G F と結合している抗体（または抗体部分）または結合していない抗体（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 N G F 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、 α -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、 ^3H 、 ^{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。

40

【 0 2 1 0 】

あるいは、N G F は、検出可能な物質で標識された組換え N G F 標準および非標識抗 N G F 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

50

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。

10

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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、

50

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、紅痛症または膀胱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 spondylitis)、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。

10

【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- α 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NFB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；エラストラーゼ阻害剤；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-1、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(adenosine)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-1変換酵素阻害剤；TNF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p55TNF受容体；可溶性p75TNF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TGF β が挙げられる。

20

30

40

【0224】

50

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。

10

【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、REMI NGTON ' S PHARMA CEUTICA L SCI ENCES、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、-シクロデキストリンまたはヒドロキシプロピル- -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、矯味剤および希釈剤 ; 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、クロロヘキシジン、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(ブルニック類、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。

20

30

40

【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

50

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、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。

10

【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。

20

【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(デブシペプチド)、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-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。

30

【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 Press, Boca Raton, Fla.(1974年); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, SmolenおよびBall(編)、Wiley, New York(1984年); Ranger et al., J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem., 23:61頁(1983年); Levyら, Science, 228:190頁(1985年); Duringら, An

40

50

n. Neurology, 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)。

10

【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、Proc. 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))。

20

【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。

30

40

【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(intracellic)、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、ポラス、経腔、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

50

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、Tissue 1（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）、核酸はインピボで投与され得る。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（*lignocaine*）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

10

20

30

40

50

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。

10

20

30

40

50

【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 WO 92 / 19244、WO 97 / 32572、WO 97 / 44013、WO 98 / 31346 および WO 99 / 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ブルは、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、薬剤の量を示し得るアンブ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、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、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。

10

20

30

【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、アンブ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生理食塩水などの任意の適切なバッファであり得る。その他の適したバッファとして、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100mM)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

40

50

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BRJ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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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る得る。

【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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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。

10

【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。

20

【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、その誘導體(p75TNFR1gG(Enbrel(商標))またはp55TNFR1gG(レネルセプト))およびまたTNF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。

30

【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、オルサラジククロキニン/ヒドロキシクロキニン、ペニシラミン(pencilamine)、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、サルメテロール(salmeterol))、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、TNF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

40

50

、 I L - 1 変換酵素阻害剤、 T N F 変換酵素 (T A C E) 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 p 5 5 または p 7 5 T N F 受容体および誘導体 p 7 5 T N F R I g G (E n b r e 1 (商標) および p 5 5 T N F R I g G (レネルセプト))、 s I L - 1 R I、 s I L - 1 R I I、 s I L - 6 R)、抗炎症性サイトカイン (例えば、 I L - 4、 I L - 1 0、 I L - 1 1、 I L - 1 3 および T G F)、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、ナブシル酸プロボキシフェン / 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 h c l、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 h c l、サルサレート、スリンダック、シアノコバラミン / f a / 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 s u l f / コンドロイチン、アミトリプチリン H C l、スルファジアジン、オキシコドン H C l / アセトアミノフェン、オロパタジン h c l、ミソプロストール、ナプロキセンナトリウム、オメブラゾール、シクロホスファミド、リツキシマブ、 I L - 1 T R A P、 M R A、 C T L A 4 - I G、 I L - 1 8 B P、抗 I L - 1 8、抗 I L 1 5、 B I R B - 7 9 6、 S C I O - 4 6 9、 V X - 7 0 2、 A M G - 5 4 8、 V X - 7 4 0、ロフルミラスト、 I C - 4 8 5、 C D C - 8 0 1 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せられ得る。

【 0 2 6 2 】

N S A I D とは、任意の非ステロイド系抗炎症性化合物であり得る。 N S A I D 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 N S A I D 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 N S A I D 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 (s l i n d a c) 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ピフェニルカルボン酸誘導体；ならびに (5) ピロキシム (p i r o x i m)、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 N S A I D が記載されている。 C o x - 2 阻害剤が記載されている (米国特許第 5 , 6 1 6 , 6 0 1 号；同 5 , 6 0 4 , 2 6 0 号；同 5 , 5 9 3 , 9 9 4 号；同 5 , 5 5 0 , 1 4 2 号；同 5 , 5 3 6 , 7 5 2 号；同 5 , 5 2 1 , 2 1 3 号；同 5 , 4 7 5 , 9 9 5 号；同 5 , 6 3 9 , 7 8 0 号；同 5 , 6 0 4 , 2 5 3 号；同 5 , 5 5 2 , 4 2 2 号；同 5 , 5 1 0 , 3 6 8 号；同 5 , 4 3 6 , 2 6 5 号；同 5 , 4 0 9 , 9 4 4 号；および同 5 , 1 3 0 , 3 1 1 号)。特定の例示的 C O X - 2 阻害剤として、セレコキシブ (S C - 5 8 6 3 5)、ロフェコキシブ、 D U P - 6 9 7、フロスリド (C G P - 2 8 2 3 8)、メロキシカム、6 - メトキシ - 2 ナフチル酢酸 (6 - M N A)、 M K - 9 6 6、ナブメトン (6 - M N A のプロドラッグ)、ニメスリド、 N S - 3 9 8、 S C - 5 7 6 6、 S C - 5 8 2 1 5、 T - 6 1 4；またはそれらの組合せが挙げられる。

【 0 2 6 3 】

N G F アンタゴニストおよび / または N S A I D 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

10

20

【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20 mg/kg、または約0.001 - 約10 mg/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。

30

【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の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。

40

【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、25 µgのヒトNGF (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、25 µgのヒトNGF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、10 µgのヒトNGF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

50

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NGF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NGF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NGFMAb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NGFMAb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で一晚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200 μ l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、NGF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NGF50 μ l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H₂SO₄ (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NGF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)	30F1 1	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

10

20

30

40

上清希釈 (倍)	26H1											
	29A7	27A5	26D5	2	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

10

上清希釈 (倍)	26H1								
	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	

20

上清希釈 (倍)	陽性対照	26H1										
		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

30

上清希釈 (倍)	10A1											陰性対照
	6H2	7C10	7G1	8G9	2	10B6	11A9	12A5	12F6	13E3	14A9	
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

【 0 2 7 2 】

【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)	30F1 1	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

10

上清希釈 (倍)	29A7	27A5	26D5	26H1 2	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

20

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

30

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

40

上清希釈 (倍)	6H2	7C10	7G1	8G9	10A1 2	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、 $2 \mu\text{g/ml}$

50

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200 μ l/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3回洗浄した。PBS/0.1% BSA中、1 μ g/ml (50 μ l/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10 μ g/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、50 μ l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。50 μ l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。50 μ lのTMB (Invitrogen、カタログ番号00-2023)を添加し、2NのH₂SO₄ (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NGF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。

10

20

【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

30

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

40

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

10

上清希釈 (倍)	-ve ctrl	+ve ctrl	+ve ctrl	+ve ctrl	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

20

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

30

【 0 2 7 5 】

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%CO₂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、5×10⁴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NGF(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

40

50

i n E l m e r) 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、E n V i s i o n プレートリーダー (P e r k i n E l m e r) 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 N G F の存在下での T r k A シグナル伝達による E R K 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、N G F のみの存在下 (ハイブリドーマ上清なし) で E R K リン酸化を示す細胞からの 1 0 0 % 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 N G F 抗体を含有していたことを示す。

【 0 2 7 6 】

【 表 7 】

表 4 : 抗 N G F m A b ハイブリドーマ上清を用いて作製された S u r e F i r e p E R K 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

10

20

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

30

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

10

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

20

【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 -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°Cで、95%空気および5% CO₂の加湿雰囲気中で増殖させた。アッセイの16時間前に、2×10⁴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NGF (Rand 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°C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NGFの存在下でのTrkAシグナル伝達による -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、NGFのみの存在下(ハイブリドーマ上清なし)での -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。

30

40

【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
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

10

上清希釈 (倍)	2B12		30A1		26D5		23D7		23H2		22G3	
	100	89	90	21	24	83	84	31	28	142	176	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

20

上清希釈 (倍)	21D4		2G11		4B6		9E2		20B10	
	100	9	10	22	22	24	31	102	104	6
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

30

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
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

40

【0279】

[実施例3]：ハイブリドーマサブクロニング

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。200 μ L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% CO₂および約90%の相対湿度を用いて37 $^{\circ}$ C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】

50

【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

10

20

【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（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。

30

【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（Abbot）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。鑄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。

40

【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、

50

R o s e t t a 2 (D E 3) 大腸菌宿主 (E M D B i o s c i e n c e s) 中、 o v e r n i g h t e x p r e s s a u t o i n d u c i n g T e r r i f i c B r o t h (N o v a g e n) 中 で 3 7 ° で 一 晩 増 殖 さ せ た 。 細 胞 を 遠 沈 さ せ 、 細 胞 ペ ー ス ト を 、 1 0 0 m L の リ ソ ナ ー ゼ (l y s o n a s e) を 含 む 溶 解 バ ッ フ ァ ー (2 5 m M T r i s 、 3 0 0 m M N a C l 、 1 0 % グ リ セ ロ ー ル 、 0 . 1 % T r i t o n X 1 0 0 p H 8 . 0) に 再 懸 濁 し 、 氷 上 で 2 分 間 超 音 波 処 理 し た 。 サ ン プ ル を 1 5 0 0 0 R P M で 遠 心 分 離 し 、 5 0 m L の 2 5 m M T r i s 、 6 M G d H C l p H 8 . 0 中 で ペ レ ッ ト を 可 溶 化 し た 。 サ ン プ ル を 1 5 0 0 0 r p m で 3 0 分 間 遠 心 分 離 し 、 上 清 を 1 0 m l の I M A C 樹 脂 上 に ロ ー ド し た 。

【 0 2 8 4 】

10

A . I M A C ク ロ マ ト グ ラ フ ィ ー

1 0 m l の G E - N i F F カ ラ ム を 調 製 し た 。 バ ッ フ ァ ー A : 2 5 m M T r i s 、 6 M G d H C l p H 8 . 0 、 バ ッ フ ァ ー B : A + 5 0 0 m M イ ミ ダ ゴ 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 1 0 回 の 通 過) 。 カ ラ ム を バ ッ フ ァ ー A で 洗 浄 し た 。 4 0 m l の バ ッ フ ァ ー A と 、 そ れ に 続 く 、 3 0 m l の バ ッ フ ァ ー A を 用 い て パ ッ チ 溶 出 を 実 施 し た 。 5 m l の 画 分 を 集 め 、 プ ー ル し た 。

【 0 2 8 5 】

B . 急 速 希 釈 に よ る 再 折 り た た み

プ ー ル し た 画 分 を 、 5 0 m M D T T を 添 加 す る こ と に よ っ て 還 元 し 、 E D T A を 1 0 m M ま で 添 加 し 、 室 温 で 1 時 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た 。 6 M H C l を p H 4 . 0 ま で 添 加 す る こ と に よ っ て サ ン プ ル を 酸 性 化 し 、 6 M G d H C l p H 5 . 0 中 で 透 析 し て 過 剰 の D T T を 除 去 し た 。 還 元 / 酸 性 化 さ れ た サ ン プ ル を 、 1 L の 1 0 0 m M T r i s 、 1 M ア ル ギ ニ ン 、 5 m M E D T A 、 5 m M G S H 、 1 m M G S S G (配 列 番 号 2 0 9) p H 9 . 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 、 2 5 m M T r i s 、 2 0 0 m M N a C l 、 1 0 % グ リ セ ロ ー ル p H 8 . 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 、 1 0 K メ ン ブ レ ン を 使 用 し て 2 5 m M T r i s 、 2 0 0 m M N a C l 、 1 0 % グ リ セ ロ ー ル p H 8 . 0 中 に ダ イ ア フ ィ ル ト レ ー シ ョ ン を 行 っ た 。

20

【 0 2 8 6 】

C . N i - I M A C

30

再 折 り た た み さ れ た プ ロ - N G F を 、 5 m l の N i - I M A C 上 に ロ ー ド し た 。 バ ッ フ ァ ー A : 2 5 m M T r i s 、 3 0 0 m M N a C l 、 1 0 % グ リ セ ロ ー ル p H 8 . 0 。 バ ッ フ ァ ー B : A + 5 0 0 m M イ ミ ダ ゴ ー ル 。 カ ラ ム を バ ッ フ ァ ー A で 洗 浄 し た 。 8 m l の 画 分 を 集 め た 。 直 線 勾 配 0 - 1 0 0 % バ ッ フ ァ ー B を 用 い て 溶 出 を 実 施 し た 。 5 m l の 画 分 を 集 め た 。 各 画 分 の サ ン プ ル を 、 非 還 元 性 N u P a g e S L B (I n v i t r o g e n) と 混 合 し 、 分 析 の た め に 4 - 1 2 % N u P A G E N o v e x B i s - T r i s M i d i 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 、 2 0 m M リ ン 酸 N a 、 5 0 m M N a C l 、 1 0 % グ リ セ ロ ー ル p H 7 . 4 に 対 し て 透 析 し た 。

【 0 2 8 7 】

D . ト リ プ シ ン 消 化

40

プ ロ - N G F を 、 再 懸 濁 バ ッ フ ァ ー 中 の ト リ プ シ ン と 混 合 し 、 氷 上 で 3 0 分 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た 。 固 定 さ れ た 阻 害 剤 を 添 加 し 、 1 5 分 間 イ ン キュベートし、次いで、濾過した。

【 0 2 8 8 】

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 、 5 m l の S P セ フ ァ ロ ー ス 高 性 能 ク ロ マ ト グ ラ フ ィ ー カ ラ ム (G E H e a l t h c a r e) 上 に ロ ー ド し た 。 バ ッ フ ァ ー A : 2 0 m M リ ン 酸 N a 、 5 0 m M N a C l 、 1 0 % グ リ セ ロ ー ル p H 7 . 4 。 バ ッ フ ァ ー B : A + 1 M N a C l 。 カ ラ ム を 、 バ ッ フ ァ ー A で 洗 浄 し た 。 溶 出 は 、 直 線 勾 配 0 - 1 0 0 % バ ッ フ ァ ー B を 用 い て 実 施 し た 。 5 m l の 画 分 を 集 め た 。 画 分 を 、 分 析 の た め に 4 - 1 2 % C r i t e r i o n

50

X T B i s - T r i s M i d i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、P B S p H 7 . 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 NGFと結合するかどうかを調べるために、ELISAプレートを、50 μ l / ウェルのイヌNGF (Abbott Laboratories) を、PBS中、1 μ g / 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、200 μ l / 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3回洗浄した。精製抗体を0.4、2または10 μ g / ml に希釈した。各濃度の精製抗体50 μ l 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) 50 μ l 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。50 μ l のTMB (Invitrogen、カタログ番号00 - 2023) を添加し、2NのH₂SO₄ (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 NGFとの結合を示す。

10

20

【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

μ g/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

30

【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 NGFに応じて増殖するヒト赤血白血球細胞株である。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2 ng / 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% CO₂ 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 . 3 nMから1 . 7 fMの範囲の濃度)、RPMI + 4% FBS中の、固定濃度の組換えイヌNGF (70 pM) および、TF - 1細胞 (2 . 5 \times 10⁴ 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IC₅₀ 値を表8に示しており、データは、70 pM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50 pM未満の効力を示すことを示す。

40

【0293】

50

【表 1 1】

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

10

【0294】

C. SureFire細胞pERKおよびPathHunterアッセイ

20

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NGF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NGF誘導性細胞応答に対する各抗NGF mAbのIC₅₀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）。

30

【0295】

【表 1 2】

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

<u>抗体</u>	<u>SureFire pERK</u> IC ₅₀ (nM)	<u>PathHunter</u> 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

40

50

【0296】

[実施例 8] : ハイブリドーマサブクロニング後の精製抗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

1 M DTTを使用してマウス抗NGF mAbを還元し、6224 TOF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50 μ l / 分の流速で使用する1200 HPLC (Agilent technologies) でHPLC / MSを使用して分析した。バッファ-A : 99.9% HPLC水 + 0.1% FA + 0.01% TFAおよびバッファ-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-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-Bを使用して10分間実施し、洗浄ステップは、95%バッファ-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 - 3200 m / 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。

10

【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、0.75 ml / 分とし、UV280を使用して、ピークをモニタリングした。使用したバッファは、Na₂SO₄ + 92 mM NaPO₄ + 5 mM NaZ₃、pH7.0であった。試薬抗体は、10 μ L (10 μ g) 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。

20

【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。

30

【0299】

【表 1 3】

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

10

20

【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 NGF 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。1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の抗体 5 μl というサンプルの大きさが、10 $\mu\text{l}/\text{分}$ 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75 $\mu\text{l}/\text{分}$ で注入した(濃度範囲：5 - 0.039 nM)。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、 $> 1 \times 10^{-7}$ として記録され、 1×10^{-6} より遅い解離速度は、 $< 1 \times 10^{-6}$ 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300 pMから0.1 pM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 NGF との効率的な結合を示す。

30

40

【0301】

【表 1 4】

表 1 1 : 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	$>1 \times 10^7$	3.14×10^{-3}	$<3.14 \times 10^{-10}$
	実験 2	$>1 \times 10^7$	3.21×10^{-3}	$<3.21 \times 10^{-10}$
	平均	$>1 \times 10^7$	3.18×10^{-3}	$<3.18 \times 10^{-10}$
PR-1254973 ロット: 1734676	実験 1	$>1 \times 10^7$	1.21×10^{-4}	$<1.21 \times 10^{-11}$
	実験 2	$>1 \times 10^7$	1.38×10^{-4}	$<1.38 \times 10^{-11}$
	平均	$>1 \times 10^7$	1.30×10^{-4}	$<1.30 \times 10^{-11}$
PR-1254977 ロット: 1734678	実験 1	$>1 \times 10^7$	1.39×10^{-4}	$<1.39 \times 10^{-11}$
	実験 2	$>1 \times 10^7$	1.60×10^{-4}	$<1.6 \times 10^{-11}$
	平均	$>1 \times 10^7$	1.50×10^{-4}	$<1.5 \times 10^{-11}$
PR-1254980 ロット: 1734681	実験 1	$>1 \times 10^7$	2.37×10^{-4}	$<2.37 \times 10^{-11}$
	実験 2	$>1 \times 10^7$	2.25×10^{-4}	$<2.25 \times 10^{-11}$
	平均	$>1 \times 10^7$	2.31×10^{-4}	$<2.31 \times 10^{-11}$
PR-1254981 ロット: 1734682	実験 1	8.67×10^6	1.27×10^{-4}	1.47×10^{-11}
	実験 2	7.48×10^6	1.40×10^{-4}	1.87×10^{-11}
	平均	8.08×10^6	1.34×10^{-4}	1.67×10^{-11}
PR-1254982 ロット: 1734683	実験 1	$>1 \times 10^7$	$<1 \times 10^{-6}$	$<1 \times 10^{-13}$
	実験 2	$>1 \times 10^7$	$<1 \times 10^{-6}$	$<1 \times 10^{-13}$
	平均	$>1 \times 10^7$	$<1 \times 10^{-6}$	$<1 \times 10^{-13}$

10

20

【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 1 1 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、(重鎖) および (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。

30

40

【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-O1SC) 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、75 μ g/ml アンピシリンおよび 60 μ l の 2% Blu-o-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、20 μ l の LB プロス / 100 μ g / カルベニシリン 1 ml に播種した。このミニ培養物 1 μ l 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

50

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3730S DNAシーケ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の鑄型として使用し、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に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。各鑄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。

10

【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依りて変わる。したがって、モデル構造を使用して、任意のCDR原子の5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。

20

【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립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 Immunoglobulin 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。

30

40

【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 (イヌおよび軽鎖) 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TOP10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個の軽鎖

50

および 23 個の 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 軽鎖および 19 個の 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：US 7, 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	EVQLEESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFSIGSYGMSWVRQSPGKGLQWVAVIK YDGSRTFYADAVKGRFTISRDNANTLFLQMNSLRAEDTAVYFCVKGPNSSW LPSTYFASWGQGLVTVSS (配列番号 :178)
Ca-2301	EMQLVESGGDLVRPGGSLRLSCVASGFTFSTYGMTWVRQSPGKGLQWVATIG PGGRNTYYADAVKGRFTISRDDAENTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAQAFDATY YTSFDCWGRGSLVAVSS (配列番号 :86)
Ca-2302	MESVLSWVFLVALLQGIQGEIRLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFIFGNYDM SWVRQAPGKGLQWVAARYDGSSTYYSDAVKGRITISRDDPGNTVYLQLDSL RAEDTATYYCVRGGYSSSFYIGGAFGHWGPGLITVSS (配列番号 :87)
Ca-2303	MECVLGWVFLVAILRGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSDYY MSWIRQAPGKGLQWVADISDGGDGTGYAGAVKGRFTVSRENVKNTLYLQMN DLRAEDTATYYCTKAREMYGYRDFDSWGPGLVTVSS (配列番号 :88)
Ca-2304	MESVLGLVALLTILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNYM TWVRQAPGKGLEWVGYIHNGGTYTYADAVKGRFTISRDDAKNTLYLEMNS LRAEDTAVYYCGKMIFDYWGQGLVTVSS (配列番号 :89)
Ca-2305	MESALSWVFLVTILKGVQGEVLLVESGGDLVKPGGSLRLSCLTSGFTFNTYDW GWVRQAPGKGLQWIAIYIKKGGSDVRYADAVKGRFTISRDDAKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARSAWDSFDYWGQGLVTVSS (配列番号 :90)
Ca-2306	MESVFCWVFLVAILKGVQGEVQLVESGGDLVKPAGSLRLSCVASGFTFT DYSMNWVRQAPGKGLQWVATISNDGTSTDYTDVAVKGRFTVSRDSARNTVYL QMTSLRADDATYYCVSRHSYSLLDYWGQGLVTVSS (配列番号 :91)
Ca-2307	MQMPWSLLCLLAAPLGVLSEVTLQESGPKLVKPSQTLTCAVSGGSVIRNYY WHWIRQRPGRGLEWMGCWSETTYYSAPFRGRISITIDAATDQFSLHLNSMTTD DTAVYYCARALYPTSSWYDGMWYWGASVVVSS (配列番号 :92)
Ca-2308	EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVSSGFIQSQYAMNWVRQAPGKGLQWVAYIG GAGFITYHADDVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLTINDTAVYYCVRSNSRIPD YWGQGLVAVSS (配列番号 :93)

10

20

30

40

Ca-2309	MESVFCWVFLVAILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSSVY MSWVRQAPGKGLQWVARITTDGTDTFYADAVKGRFTISRDNVKNMLYLEMN SLRAEDTAIYYCGDPWQPAYPDLWGQGTMTVTVSS (配列番号 :94)
Ca-2310	MESVLCWVFLVAILKGVQGEVHVESGGDLVKPGGTLRLSCVASGFTFSQYD MSWVRQSPGKGLQWVALSRYHGGGTYADAVKGRFTISRDNKNMLYLQMN NSLRAEDTAVYYCVKEGSRWDLRGDYDYWGQGTMLTVTVSS (配列番号 :95)
Ca-2311	MQMPWLLCLLAAPLGVLSELTLQESGPGLVKPSQTLSTCVVSGGSVTSSHY WNWIRQRPGRGLEWMGYWTGNVYNPAFQGRISIIGDAAKNQFSLHLSMTT DDTAVYYCARCGIVAPGFLPIGDFDFWGQGTMLTVTVSS (配列番号 :96)
Ca-2312	MESVFCWVFLVAILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFSFSNYFM FWGRQAPGKGLQWVARIRSDGGSTYYADAVKGRFTISRDNARNTLYLQMN SLRAEDTATYYCAKADIKLEPEYRGQGTMLTVTVSS (配列番号 :97)
Ca-2401	ESVLGWIFLATILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVSGFTFSSWMN WVRQAPGKGLQWIAEISGTGSSTNYADAVKGRFTISRDNNDKNTLYLQMN SLRAEDTAMYYCARAAYYGNRNDLDYWGQGTMLTVTVSS (配列番号 :98)
Ca-2402	KPAGSLRLSCVASGFTFSSHSVTWVRQAPGKGLQFVAGITSGGNNRYTDAVR GRFTLSRDNAKNTVYLQMNLSLRAEDTAMYFCALGSYEWLSGEFDYWGQGT MLTVTVSS (配列番号 :99)
Ca-2403	MESVFCWVFLVAILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTLNNYF MYWVRQAPGKGLQWVARLNSNGDSTFYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMN NSLRAEDTSMYYCAKDLYGYTLWGQGTMLTVTVSS (配列番号 :100)
Ca-2404	MASVLSWVFLVAIVKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFIFNKYEV YWVRQAPGKGLEWVARILESGNPTYAAEAVEGRFTISRDNKNMAYLQMN SLRADDTAVYYCATPSVSSTVAIDYWGQGTMLTVTVSS (配列番号 :101)
Ca-2405	MQMPWLLCLLATPLGVSELTLQESGPGLVKPSQTLSTCVVSRGVSVDY WNWIRQRPGRGLEWMGHWIGSTAYNPAFQGRISITADAKNQLSLQLRSM TTEDTAVYFCARGSSWTPSGDSWGQGTMLTVTVSS (配列番号 :102)
Ca-2406	MASVLKLGFSRCRYCKKVSRCNXVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFIFNKYE VYWVRQAPGKGLEWVARILESGNPTYAAEAVEGRFTISRDNKNMAYLQMN SLRADDTAVYYCATPSVSSTVAIDYWGQGTMLTVTVSS (配列番号 :103)

10

20

30

40

Ca-2407	MDCSWRIFLLALATGVHSEVQLVQSAAEVKKPGASVKVSCKTSGYTLTDYYI HWVQQAPGTGLHWMGWIDPEXGTTDYAQKFQGXVTLTADTSTNTAYMELS GLRAEDTAVYYCARFPRSLDYGSFPFDYWGQGLVTVSS (配列番号 : 104)
Ca-2408	MESVLCWVFLVAILKGVQGEVRLVESGGDLVKPGSLRLSCVASGFTFRNYG MSWVRQRPKGGLQWVAAIRSDGVTTYADDLKVRFTVSRDDARNTLYLQLNS LGAEDTAVYYCAKAPWGLYDAWGQGLVTVSS (配列番号 : 105)
Ca-2409	MESVLSWVFLVAILQGVQGEVQVVESSGGDLVKPAGSLRLSCVASGYSISTYTM TWVRQVPKGGLQLVAGINGDGSSTYYTDAVKGRFTISRDNARNTVYLQMNSL RAEDTAMYYCLGEYSWFYYWGQGLVTVSS (配列番号 : 106)
Ca-2410	MQMPWSLLCLLAAPLGVLSLTLQESGPRLVKPSQTLSTCAVSGGSVTTTSY WSWIRQRPGRGLEWVGWYWTGTTNYSPAFQGRISISADTAKNQFSLIILSSVTTE DTALYFCASKSASTSWYFSLFESWGQGLVTVSS (配列番号 : 107)
Ca-2411	MESVLGLVFLLTILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGSLRLSCVASGFTFSSYSM SWVRQAPGKGLQWVGYIDNGGTSTYYADAVKGRFTISRDNANTLYLQMNS LRAEDTAVYYCGRGSYMEYWGIIGTSLFVSS (配列番号 : 108)
Ca-2412	MESVLGLLFLVAILKGVQGEIQLVESGGDLLKPGSLRLSCVASGFTFSGSDMN WIRQAPGKGLQWVAHITHEGIGTSYVGSVKGRFTISRDNANTLYLQMNDLR AEDTAMYYCAYSWNYYSFDSWGQGLVTVSS (配列番号 : 109)

10

20

【 0 3 0 9 】

30

【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	MTSTMAWSPLLLTLTHCTVSWAQTVLTQSPSVSAVLGRRVTISCTGSDT NIGSHRDVQWYQLVPGKSPKTLIYGTDNRPSGIPVRFSGSKSGNSGTLTIT GIQAEDADYYCQSYDDDL SMNVFGGGTHLTVLG (配列番号 :110)	
Ca-1002	MDWVPFYILPFIFSTGFCALPVLTPQTNASASLEESVKLTCTLSSEHSNYIV RWYQQQPGKAPRYLMYVRS DGSYKRGDGP SRFSGSSSGADRYLTISNIK SEDEDDYYCYGADYTISGQYGSVFGGGTHLTVLG (配列番号 :111)	10
Ca-1003	LWISGGSALGPTMAWTHLLLPVLTLC TGSVASSVLTQPPSVSVSLGQTA TISCSGESLSKYA QWFQKAGQVPVLVIYKDTERPSGIPDRFSGSSSGNT HTLTISRARAEDADYYCESEVSTGT YCVRRRHPSNRPRSAQGLPLGHTLP ALL (配列番号 :204)	
Ca-1006	MTSTMAWSPLLLTLTHCTGSWAQS VLTQPASLSGSLGQRVTISCTGSSS NIGGYSVNWLQQLPGTGPRTHIYNN SNRPSGVPDRFSGSRSGTTATLTISGL QAEDADYYCSTWDSNLRTIVFGGGTHLTVLG (配列番号 :112)	20
Ca-1007	MTSTMDWSPLLLTLAHCTGSWAQS VLTQPASVSGSLGQRVTISCTGSTS NLGTYNVGWLQQVPGTGPRTVIY TNIRPSGVPDRFSGSESGSTATLTISD LQAEDAEYYCTAWDSSLNAYVFGSGTQLTVLG (配列番号 :113)	
Ca-1008	MTSNMAWC PFLLTLLAYCTGSWAQS VLTQPTS VSGSLGQRVTISCSGSTN NIGIVGASWYQQLPGKAPKLLVYSDGDRPSGVPDRFSGSNSGNSDTLTITG LQAEDADYYCQSFDTLDAAVFGGGTHLTVLG (配列番号 :114)	
Ca-1009	MTSTMAWSPLLLTLAHCTVSWAQA VLTQPPSVSAALGQRVTISCTGSDT NIGSGYEVHWYRQVPGKSPAI IYGN SNRPSGVPVRFSGSKSGSTATLTITG IEAEDADYHCQSYDGNLDGGVFGGGTHLTVLG (配列番号 :115)	30
Ca-1010	MTSTMGWFP LILTLLAHCAGSWAQS VLTQPASVSGSLGQRVTISCTGSSP NVGYGDFVAWYQQVPGTSPRTL IYNTRSRPSGVPDRFSASRSGNTATLTIS GLQAEDADYYCSSYDNTLIGIVFGGGTHLTVLG (配列番号 :116)	
Ca-1011	MTSTMGWSPLLLTLAHCTGSWAQS VLTQPASVSGSLGQRVTITCTGSSS NIGRANVAWFQQVPGTGPRTVIY TSVKRPSGVPDRFSGSKSGSTATLTISG LQAEDADYYCSSWDNSLDAGVFGGGTHLTVLG (配列番号 :117)	
Ca-1012	MTSTMGWFP LLLLTLAHSTGSWAQS VLTQPASVSGSLGQRVTITCTGGTS NIGRGFVSWFQQVPGIGPKILIF DAYRRPSGVPDRFSGSRSGNTATLTISGL QAEDADYYCAVYDSRLDVGVFGSGSQLTVLS (配列番号 :118)	40

Ca-1202	MTSNMAWCPFLLTLLTYCTGSWARSVLTQPASVSGSPGQKVTIYCSGTM SDIGVLGANWYQQLPGKAPKLLVDNDGDRPSGVPDRFSASKSGHSDTLTI TGLQPEDEGDYYCQSFSSLDAAIFGEGTHLTVLG (配列番号 : 119)	
Ca-1203	SVASYVLTQSPSQNVTLRQAAHITCEGHNIGTKSVHWYQQKQGQAPVLII YDDKSRPSGIPERFSGANSNTATLTISGALAEDEADYYCLVWDSSAIWV FGEGTHLTVLG (配列番号 : 120)	
Ca-1204	MTSTMAWSPLLLTLLAHFTGSWAQSFLTQPTSVSGSLGQRVTISCTASSS NIDRDYVAWYQQLPGTRPRALIYANSNRPSGVPDRFSGSKSGSTATLTISG LQAEDEADYYCSTWDNSLTYVFGSGTQLTVLG (配列番号 : 121)	10
Ca-1205	SVASYVLTQVPSVSVNLGKTATITCEGDNVGEKYTHWYQQEYQAPVLII YEDSRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGARAEDTDYYCQVWDDSGNVF GGGTHLTVLG (配列番号 : 122)	
Ca-1206	MTSTMGWFPPLILTLLAHCAGSWAQSFLTQPASVSGSLGQRVTISCTGSDS NVGYGDSIAYGDSVAWYQQVPGTSPRTLIVDVTSRPSGVPDRFSGSRSGT TATLTISGLQAEDEADYYCSSFDKTLNGLIVGGGTHLTVLG (配列番号 : 123)	20
Ca-1207	MTSNMAWSPLLLTLLAYCTGSWAQSALTQPTSVSGSLGQRVSISCSGGI NIGSVGATWYQQLPGKAPKLLVSSDGDPRPSGIPDRFSGSRSGNSVTLTITG LQAEDEAEYYCQSFSTLGVHVVFGGGTHLTVLG (配列番号 : 124)	
Ca-1208	LCSAVGPPKTESVMTSTMGWSPLLLTLLAHCTGSWAQSFLTQPASVSGSL GQRVTIPCTGSSSNIDRYNVAWFQQLPGTGPKPSSIVLLTDPQGLIDSLAP SQAA (配列番号 :205)	
Ca-1209	MTSTMAWFPLLLTLLAHYTGWARDLTQPASVSGSLGQRITISCTGSSSN IGRNYVGWYQQLPGRGPRTVVYGINSRPSGVPDRFSGSKSGSTVTLTISGL QAEDEADYYCSTWDDSLSVVVFVGGGTHLTVLG (配列番号 : 125)	30
Ca-1210	MTSTMGWSPLLLTLTHWTGSWAQSFLSQPASMGSGLRITICCTGKNSN INNSYVDWNQPLAGTGPRTVIHDDGDRPSGVPDQFSGSKSGNTATLTISRL QAEDEADYNGASFETSFNAVFGGGTHVTVLG (配列番号 : 126)	

【 0 3 1 0 】

【 表 1 7 】

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)	40
-------------	---	----

Ca Ka016-A2	MRFPSQLLGLLMLWIPGSAGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLHNS GNTYLYWFRQKPGQSPQRLIYKVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVE DDAGVYYCGQVIQDPWTFGVGKLELKR (配列番号 128)
Ca Ka016-A3	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQTLHNS GKNYLFWYRQKPGQSPQRLIDLASNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVE DDAGVYYCGQMEIPWTFGAGTKVELKR (配列番号 129)
Ca Ka016-A4	MKFPSLLLGLLMLWIPGSTGEAVMTQTPLSLAVTPGEVATISCRASQSLHNS GKSYLNWYLQKPGQTPRPLIYEASKRFSGVSDRFSGSGSGTDFTLRISRVE DVGYYCQQLHFPPTFGPGTKVELKR (配列番号 130)
Ca Ka016-A5	PDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGIYYCGQATQTPPTFGAGTKLDLKR (配列番号 131)
Ca Ka016-A6	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVRPGESASISCKASQSLHNS GGTYLNWFRQKPGQSPQRLIYEVSKRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVE DDTGIYYCGQNTQLPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 132)
Ca Ka016-A7	MRFPSQLLGLLMLWIPGSTGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLHNS GNTYLFWLRQKPGQSPQRLIYRVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVE DDAGVYYCGQVRSPWTFGAGTKVEIKR (配列番号 133)
Ca Ka016-A8	MRFPSQLLGLLMLWIPGSAGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLHNS GNTYLYWFRQKPGQSPQRLIYKVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVE DDAGVYYCGQVIQDPWTFGVGKLELKR (配列番号 134)
Ca Ka016-A9	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDVMAQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLHNS GNTFLWFRQKPGQSPQRLINFLSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVE DAGLYYCGQLQAPLTFGQGTKLEIKR (配列番号 135)
Ca Ka016-A10	MRFPSQLLGLLMLWIPGSNGDDVLTQTPLSLSVRPGETVSILCKASESLHNS GNTYLSWVRQKAGQSPQRLMYRVSRRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVE ADDAGIYYCGQATHYPLEFGQTRVEIKR (配列番号 136)
Ca Ka016-A11	LMLWIPGSTGEIVLTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLHNS KPGQSPQRLIYKVSNRDPGVPDRFSGSGSEIDFTLRISRVEADDGGIYYCGQGI QNPFTFGQGTKLEIKR (配列番号 137)

10

20

30

40

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 GNTYSFWFRQKPGQSPQRLINLVSSRGPVPDRFSGSGSGTDFTLISRVEAD DAGVYYCGHGKEAPYTFSQGTKLEIKR (配列番号 140)
Ca Ka016-B3	MRFPSQLLGLLMLWIPGSVDIVMTQSPMSLSVGPGESASMSCKANQSLLYS DGITYLSWFLQRPQSPQRLIYEVSKRDTGVPGRFIGSGAGTDFTLRISRVEA DDAGVYYCGQALQFPLTFSQGAKEIER (配列番号 141)

10

20

Ca Ka016-B4	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDVMTQTPLSLSVRPGETASISCRASQSLLHSS GITKLFWYRQKPGQSPQRLVYVWSNRDPGVPDRFTGSGSGTDFTLRISRLEA DDAGIYYCGHAIGFPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 142)
Ca Ka016-B5	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVRPGESASISCKASQSLLHSG GGTYLWFRQRPQSPQRLIYEVSKRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRITRVEA DDTGIIYCGQNTQFPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 143)
Ca Ka016-B6	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGGIVMTQTPLSLSVRPGETASISCRASQSLLYS GNTYLFWFRQKPGQSPQRLMYRVSDRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISGVEA DDAGIYYCGQATHYPLEFGQGTXVEIKR (配列番号 144)
Ca Ka016-B7	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVRPGESASISCKASQSLLHSG GGTYLWFRQRPQSPQRLIYEVSKRDTGVPDRFIGSGAGTDFTLRISRVEA DDAGVYYCGQGVQGPWTIGAGTKLELQR (配列番号 145)
Ca Ka016-B8	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSVSPGETASISCKASQSLLSHD GNTYLHWFRQKPGQSPQRLIYKVSNRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA DDTGVIYCGQITQDPFTFGQGTKLEIKR (配列番号 146)

30

40

Ca Ka016-B9	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLLSHN GNTYLFWFRQKPGQSPQRLINWVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEA DDAGIYYCGQGIQGPYTFSSQGTKLEIKR (配列番号 147)	
Ca Ka016-B10	MRFPSQFLGLLMLWIPGSSGDIAMTQTPLSLSVGPGETASITCKASQSLLSHN GNTYLFWFRQKPGQSPQRLIYLVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRVEAD DAGIYYCGQATQTPPTFGAGTKLDLKR (配列番号 148)	
Ca Ka016-B11	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMAQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLIISD GRTCLSWFRQKSGQSPQRLIYEVSNRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAD DTGIYYCGQTVQFPLTFGQGTKLEIKR (配列番号 149)	10
Ca Ka016-B12	GQSPQRLIYKVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEPEDVGVYYCGQGT LNPWTFGAGTKVELK R (配列番号 150)	
Ca Ka017-1	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDVVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLLSHN GNTFLFWFRQ*PGQSPQRLINFVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAD DAGIYYCGQGLLAPPTFGQGTKVEIRR (配列番号 151、配列番号210) 注記：*は、停止コドンを示す	20
Ca Ka017-2	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTTPSLSVSPREPASISCKASQSLLSRN GNTYLYWFRQKPGQSPGLIYRVSNRFTGVSDRFSGSGSGTDFTLRISTVEAD DAGVYYCGQATQFPSTFSQGTKLEIKR (配列番号 152)	
Ca Ka017-3	MRFPSQLLGLLMLWIPGSXGDIVLTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLSHNG ITYLNWYRQRPGQSPQXLIYKVSNRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRXSKVEAD DTGIYYCGQDTQFPLTLGXGTHXEIKR (配列番号 153)	30
Ca Ka017-5	MRFPSQLLGLLMLWIPGSTGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASIYCKASQSLLSHN GKTFLYWFRQKPGQS PQRLIYRVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGIYYCGQIQDPT FGQGTKVEIKR (配列番号 154)	
Ca Ka017-6	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTTPSLSVSPREAASISCKASQSLLSKN GNTYFYWFRQKPG QVSEGLIYKVSRRFTGVSDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVYFCGQALQF PYTFSQGTKLDIKR (配列番号 155)	40

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

Ca Ka017-11	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLHRN GITYLSWFRQRPQSP QRLINLVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDVGVYYCGIIGLQTPY TFGQGTSLEIER (配列番号 157)
-------------	--

10

Ca Ka017-12	MRFPSQLLGLLVLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETVVISCRASQSLLYSDG NIYLFWFRRKPGQSP QHLINLVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVYYCGQGTQPPY TFSQGTKVEIKR (配列番号 158)
-------------	---

Ca Ka017-13	MRFPSQLLGLLMLWIPESGGDVVLTQTTPPSLSLSPGETASISCKASRSLNSD GSTYLDWYLQKPGQS PRLLIYLVSNRFSGVSDRFSGSGSGTDFTLTISRVEADDAGVYYCGQGSRVPL TFGQGTKVEIKR (配列番号 159)
-------------	---

20

Ca Ka017-14	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMAQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLHNS GITYLFWYRQKPGQS PQRLISMVFNRPDGPVDRFGGSGSGTDFTLRISRVEADDAGLYFCGHGTQIPY SFSQGTKLEIKR (配列番号 160)
-------------	--

30

Ca Ka017-16	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSISPGEPAISCKASQSLHSGG DTYLNWFRQRPQSP PQLLINRVSSRKKGVPDRFSGSGSGTEFTLRISRVEADDAGIYFCGQGTQFPY TFSQGTKLEIKR (配列番号 161)
-------------	---

Ca Ka017-20	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTTPPSLSVSPGEPASMSCKASQSLHNS GNTYLYWFRQKP GQSPEALYKVSNRFTGVSDRFSGSGSGTDFTLRINRVEADDVGVYYCGQGI QIPYTFSQGTKLEIKR (配列番号 162)
-------------	--

40

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

10

【 0 3 1 1 】

[実施例 1 3] : イヌ化モノクローナル抗体を作製するための C D R グラフト化

マウス抗 N G F 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 N T I ソフトウェアを使用して 3 6 種のイヌ I g 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 I g 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, 2 6 1, 8 9 0 B 2 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 I g 生殖系列重鎖可変鎖配列は、表 1 2 (イヌ P B M C R N A 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 N T I 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, 2 6 1, 8 9 0 B 2 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 C D R 配列をマウス C D R 配列 (サブクローニングされた抗 N G F 抗体ハイブリドーマ m A b から導かれた) で置換することによって、完全 C D R 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 (K a b a t) 番号付けシステムを使用して、すべての残りの残基を、その後引き続き番号付けした。

20

30

【 0 3 1 2 】

P R - 1 2 5 4 9 7 2 から得た重鎖 C D R 配列を、以下のとおりにイヌ 8 9 4 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 (Q 3 H、V 3 7 I、Q 4 6 E、D 7 3 N、T 7 7 N、R 8 3 K) を導入して、7 2 . 2 V H 配列を作製した。(3) m A b 7 2 . 2 のイヌ化後に N G F 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、7 2 . 2 V H 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、7 2 . 2 V H のその後の親和性成熟の間に置換され得る。H 3 9 Q 復帰突然変異を付加して、7 2 . 2 V H に復帰突然変異を導入することによって 7 2 . 3 V H を作製した。7 2 . 4 V H は、復帰突然変異 Q 3 H、H 3 9 Q、Q 4 6 E、D 7 3 N を導入することによって作製した。P R - 1 2 5 4 9 7 2 から得た軽鎖 C D R 配列を、以下のとおりにイヌ 1 0 0 1 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 (I 2 V、V 3 L、Q 4 5 K、S 5 9 P) を導入して、7 2 . 2 V L 配列を作製した。(3) m A b 7 2 . 2 のイヌ化後に N G F 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、7 2 . 2 V L 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、7 2 . 2 V L のその

40

50

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。

10

20

【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。

30

40

【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

50

が、81.2 V Hのその後の親和性成熟の間に置換され得る。81.4 V H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81.2 V L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、81.2 V L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、81.2 V Lのその後の親和性成熟の間に置換され得る。81.4 V L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。

10

【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1005 V H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81.5 B V H配列を作製した。(3)mAb81.5 B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、81.5 B V H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、81.5 B V Hのその後の親和性成熟の間に置換され得る。81.6 B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81.2 Bおよび81.4 Eは、A84K突然変異を81.5 Bおよび81.6 Bに、それぞれ導入することによって作製した。

20

【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82.2 V H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、82.2 V H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、82.2 V Hのその後の親和性成熟の間に置換され得る。82.4 V H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、82.2 V L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、82.2 V L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、82.2 V Lのその後の親和性成熟の間に置換され得る。82.3 V Hは、P44V復帰突然変異を付加して82.2 V Hに復帰突然変異を導入することによって作製した。82.4 V L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。

30

40

【0319】

[実施例14]：イヌフレームワークアミノ酸の等電点

50

イヌ化 I g G 1 抗体の重鎖フレームワークアミノ酸（すなわち、非 C D R 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、軽鎖がである場合には、8.0 未満である。それに比べて、ヒト I g G 1 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 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 I g G 1 / 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 C D R 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 1 4 に示されるような）を、ベクター N T I ソフトウェアを使用して 4 4 種のヒト免疫グロブリン生殖系列重鎖可変鎖または 4 6 種の生殖系列軽鎖可変鎖配列（当業者に周知である、N C B I I g B l a s t ウェブサイトに由来する）に対して別個にアラインした。C D R 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（F W）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 F W 4 領域（「連結」領域としても知られる）の同定を、N C B I データベースにおいて、各マウス重鎖および軽鎖 F W 4 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 C D R 配列（N C B I ウェブサイトに由来する）をマウス C D R 配列（マウス抗体に由来する）で置換し、各 3' 末端に F W 4 領域（N C B I ウェブサイトに由来する）を付加することによって、完全 C D R 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 I g は、各 C D R グラフト化 m A b の可変ドメインを、インフレームのヒト I g G 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 I g フレームワークにグラフトされたマウス抗 N G F m A b C D R（C D R グラフト化抗 N G F A b）が表 1 5 に列挙されている。

【0321】

10

20

【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)	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSDYYM FWVRQATGKGLE WVSTISD GGSYTY YTDNVKGRFTISRENAKNSLYLQMNSLRAGDT AVYYCARD WSDSEGFAY WGQGLTVTVSS (配列番号 : 165)
Hu73 VH (CDR-GRAFT VH1-18/JH6)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYWM HWVRQAPGQGL EWMGRIDPYGGG TKHNEKFKRR VTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTA VYYCAR SGYDYYFDV WGQGTTVTVSS (配列番号 : 166)
HU77 VH (CDR-GRAFT VH1-69/JH6)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGFNIKDTYIY WVRQAPGQGLEW MGRIDPANGNTIY ASKFQGR VTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYY CARY GYYAY WGQGTTVTVSS (配列番号 : 167)
HU80 VH (CDR-GRAFT VH1-18/JH6)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGFNIKDTYIY WVRQAPGQGLE WMGRIDPANGNTIY ASKFQGR VTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTA YYCARY GYYAY WGQGTTVTVSS (配列番号 : 168)
HU81 VH (CDR-GRAFT VH3-15/JH1)	EVQLVESGGGLVK PGSLRLSCAASGFTFSNH MYWVRQAPGKGLE WVGSISD GGAYTFYP DTVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAV YYCTTEESAN NGFAFW GQGLTVTVSS (配列番号 : 169)
HU82 VH (CDR-GRAFT VH2-26/JH6)	QVTLKESGPV LVKPTETLTLCTVSGFSLTGYNIN WIRQPPGKALEWL AMIWGYGDTDYN SALKSRLTISK DTSKSKVVLMTNMDPVD TATYY CARD HYGGNDWYFDV WGQGTTVTVSS (配列番号 : 170)
HU72 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)	DIVMTQTPLSLP VTPGEPASISCRSSQSIVQSNGNTYLEW YLQKPGQSP QLLIYK VSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV VYYCFQGS HVPFTFGQ GTKLEIKR (配列番号 : 171)

10

20

30

40

HU73 VL (CDR-GRAFT L22/JK2)	DIQMIQSPSFLSASVGD RVSIIC <u>RASENIYSFLA</u> WYLQKPGKSPKLF LYN <u>ANTLAEGVSSRFSGRSGTDFTLTIISLKPEDFAAYYCQH</u> HFGT <u>PFTFG</u> QGTKLEIKR (配列番号 : 172)
HU77 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)	DIVMTQTPLSLPVT <u>PGEPASISCKSTKSLLNGDGFTYLD</u> WYLQKPGQSP QLLIY <u>LVS</u> NR <u>FSGV</u> PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC <u>FESNY</u> <u>LFTFG</u> QGTKLEIKR (配列番号 : 173)
HU80 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)	DIVMTQTPLSLPVT <u>PGEPASISCKSTKSLLNGDGFTYLD</u> WYLQKPGQSP QLLIY <u>LVS</u> NR <u>FSGV</u> PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC <u>FESNY</u> <u>LFTFG</u> QGTKLEIKR (配列番号 : 174)
HU81 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)	DIVMTQTPLSLPVT <u>PGEPASISCRSSQSILHSNGNTYLE</u> WYLQKPGQSP QLLIY <u>RVS</u> NR <u>FSGV</u> PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC <u>FQGA</u> <u>HVPFTFG</u> QGTKLEIKR (配列番号 : 175)
HU82 VL (CDR-GRAFT 08/JK2)	DIQMTQSPSSLSASVGD RV <u>TITCRASQDITNYLNWY</u> QQKPGKAPKLLI <u>YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTF</u> TISSLQPEDIATYYC <u>QQGKTLPRTF</u> GQGTKLEIKR (配列番号 : 176)

10

20

【 0 3 2 2 】

[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 (Université Montpellier 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 5,852,183 A 号、(配列番号 54) から得られたイヌ 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 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 15 A 中にある。

30

40

【 0 3 2 3 】

【表 19】

表15A：マウス/イヌキメラ抗体配列

名称	配列 (CDR1には下線が引かれている)	
PR-1290646 軽鎖アミノ酸配列	DVLMQTPLSLPVSLGDQASISCR <u>SSQSIVQSNGNTYLEWYLQKPGQS</u> PKLLIYKVS <u>NRFS</u> GVDPDRFSGSGSGTDFTLKISREAE <u>DLGVVYCFQGS</u> H <u>VPFTFGSGTKLEIKR</u> ND <u>AQPAVYLFQSPDQLHTGSASVVCLLNSFY</u> PK DINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYLSSTLTMSSTEYLSHEL YSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD (配列番号 :194)	10
PR-1290646 重鎖アミノ酸配列	EVHLLVESGGGLVKPGGFLILSCAASGFTFSD <u>YYMF</u> WIRQTPGKRLEWV ATISDGGSYTYYYTDNVKGRFTISRDNVKNLNLQMSHLKSADTAMYY CARD <u>WSDSEGFAYWGQ</u> GLVTVSAASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTV ALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLHSLSSMVTV PSSRWPSETFTCNVVHPASNTKVDKPVFNECRCTDTPPCPVPEPLGGPS VLIFPPKPKDILRITRTPEVTCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHTAK TQSREQQFNQTYRVSVLPPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIDLPSPIERTIS KARGRAHKPSVYVLPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNG QQEPERKHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMH ETLQNHYYTDLSSLHSPGK (配列番号 :195)	20
PR-1290654 軽鎖アミノ酸配列	DIQMTQSPASLSASVGETVTVTCRASENIYSFLAWHQKQKQKSPQLLV YNANTLAE <u>GVPSRFS</u> SGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYCQH <u>HF</u> GT <u>PFT</u> FGSGTKLEIKRND <u>AQPAVYLFQSPDQLHTGSASVVCLLNSFY</u> PKDIN VKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYLSSTLTMSSTEYLSHELISC EITHKSLPSTLIKSFQR SECQRVD (配列番号 :196)	30
PR-1290654 重鎖アミノ酸配列	QVQLQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT <u>NYWMH</u> WVKQRPQGGL EWIGRIDPYGGGTKHNEKFKRKATVTADKSSSTAYILLSSLTSEDSAV YYCTR <u>SGYDYYFDV</u> WGTGTTVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTV ALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLHSLSSMVTV PSSRWPSETFTCNVVHPASNTKVDKPVFNECRCTDTPPCPVPEPLGGPS VLIFPPKPKDILRITRTPEVTCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHTAK TQSREQQFNQTYRVSVLPPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIDLPSPIERTIS KARGRAHKPSVYVLPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNG QQEPERKHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMH	40

PR-1290658 軽鎖アミノ酸配列	DIQMTQTSSLSASLGDRVTITCRASQDITNYLNWYQQKPDGTVKLLI YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLDQEDIATYFCQOGKTLPR FGGGTKLEIKRNDAPAVYLFQSPDQLHTGSASVVCLLNSFYPKDIN VKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYLSSTLTMSSTEYLSHELYSC EITHKSLPSTLIKSQRVVD (配列番号 :202)
PR-1290658 重鎖アミノ酸配列	QVQLKESGPGLVAPSQSLTCTVSGFSLTGYNINWVRQPPGKGLEWL GMIWGYGDDYNSALKSRLSISKDNSKSVFLKMNSLQDDTARYYC ARDHYGGNDWYFDVWGTGTTVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGST VALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLHSLSSMVT VPSSRWSETFTCNVHPASNTKVDKPVFNECRCTDTPPCVPEPLGG PSVLIFPPKPKDILRITRTPVTCVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHTA KTQSREQQFNQTYRVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIDLPSPIERTI SKARGRAHKPSVYVLPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSN GQQEPERKHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVM HETLQNHYTDLSSLHSPGK (配列番号 :203)

10

20

【 0 3 2 4 】

上記のイヌ I g G 1 定常領域ヌクレオチド配列をまた、イヌ化抗 N G F モノクローナル抗体 7 2 . 2 V H、7 2 . 3 V H、7 2 . 4 V H、7 3 . 2 V H、7 3 . 4 V H、7 7 . 2 V H、7 7 . 3 V H、7 7 . 4 V H、8 1 . 2 V H、8 1 . 4 V H、8 1 . 2 B、8 1 . 4 B、8 1 . 5 B、8 1 . 6 B、8 2 . 2 V H、8 2 . 4 V H に由来する重鎖可変ドメインをコードする c D N A 各々の 3 ' 末端にライゲーションした。上記のイヌ 軽鎖定常ドメインヌクレオチド配列はまた、イヌ化抗 N G F モノクローナル抗体 7 2 . 2 V L、7 2 . 4、7 3 . 2 V L、7 3 . 4 V L、7 7 . 2 V L、7 7 . 4 V L、8 1 . 2 V L、8 1 . 4 V L、8 2 . 2 V L に由来する軽鎖可変ドメインをコードする c D N A 各々の 3 ' 末端にライゲーションした。

30

【 0 3 2 5 】

全長キメラまたはイヌ化抗体を、重鎖および軽鎖 p H y b E 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、2 9 3 - 6 E 細胞において一過性に発現させた。表 1 7 A 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 1 7 A)。表 1 7 A 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。

40

【 0 3 2 6 】

[実施例 1 7] : 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ノ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 2 9 3 - 6 e 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 P i e r c e 結合バッファと混合し、製造業者の使用説明書 (G E H e a l t h c a r e 番号 1 7 - 1 2 7 9 - 0 4) に従ってプロテイン A セファローズ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 I g G は、プロテイン A と中程度に十分に直接的に結合するが (G E H e a l t h c a r e A n t i b o d y P u r i f i c a t i o n H a n d b o o k p a c k a g e i n s e r t ; S c o t t , M . A . ら

50

、Vet Immunol - Immunopatho、59:205頁、1997年；Warr, G.WおよびHart, I.R., 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IgM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、OD₂₈₀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/kmAb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。

10

【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 Mab Select 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OD₂₈₀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、OD₂₈₀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(1xPBS)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。

20

30

【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、モノマーセントを求めた。このデータは、マウス/イヌキメラIgG1/kmAb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/kmAb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 경우에는、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。

40

50

【 0 3 3 0 】

【 表 2 0 】

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 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	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

10

【 0 3 3 1 】

【表 2 1】

表 1 7 A : 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	82.8 CalgG1/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

10

20

30

40

【 0 3 3 2 】

【表 2 2】

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

10

【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。

20

30

【0334】

【表 2 3】

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	2.9×10^6	3.8×10^{-3}	1.3×10^{-9}
Mu73 イヌ IgG1/k	PR-1290654	6.3×10^6	9×10^{-5}	1.4×10^{-11}
Mu77 イヌ IgG1/k	PR-1290656	9.1×10^6	1.9×10^{-4}	2.1×10^{-11}
Mu81 イヌ IgG1/k	PR-1290657	4.2×10^6	3.5×10^{-4}	8.2×10^{-11}
Mu82 イヌ IgG1/k	PR-1290658	8.7×10^6	1.4×10^{-5}	1.6×10^{-12}

40

【0335】

【表 2 4】

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

10

【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70 pM 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、70 pM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50 pM未満の効力を示すことを示す。データは、70 pMのイヌNGFの存在下で、イヌ化抗NGF抗体の一部が、70 pM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、20 pM未満の効力を有する。

20

【0337】

【表 2 5】

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

30

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 2 6】

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

40

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

50

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°C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°C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、Amicon30K分子量カットオフ遠心分離スピ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】

10

20

30

40

【表 2 8】

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】

10

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 2 9】

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

20

30

【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。

40

【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。

50

150 μ l 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 (T0)、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、pH 6 でのアダリムマブの断片化は、pH 6 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、pH 4 の高ストレス条件でのアダリムマブは、pH 5 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、pH 6 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 3 0】

表 25 : 5°Cおよび40°C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°C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°C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

10

20

5°C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°C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

30

40

40°C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

【 0 3 5 2 】

【表 3 1】

表 2 6 : 4 0 ° C での、 2 1 日 での、 種 々 の 製 剤 中 での、 7 3 . 2 イ ヌ I g G 1 / k、 8 2 . 4 イ ヌ I g G 1 / 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	4 0 ° C での 2 1 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

10

20

【 0 3 5 3 】

[実施例 2 1] : P K 血清サンプル分析のイヌ単回用量 P K 研究および抗原架橋アッセイ 雑種イヌにおいて、 4 . 5 m g / k g (静脈内または皮下) の単回用量後に 7 3 . 2 イヌ I g G 1 / k および 8 2 . 4 イヌ I g G 1 / k の血清レベルを分析した。注射後、 6 7 2 時間にわたって静脈血の 1 3 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。

【 0 3 5 4 】

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 9 6 ウェルプレート (MSD 番号 L 1 1 S A - 1) をブロッカー A (MSD 番号 R 9 3 B A - 4) を用いてブロッキングした。血清中 (または P B S 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 S u l f o タグをつけた NGF (S u l f o 試薬 MSD 番号 R 9 1 A N - 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 s u l f o タグをつけた NGF の最終濃度は、 1 - 2 n M 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、 6 0 分間結合させた。インキュベートした後、プレートを P B S および 0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 で洗浄し、R e a d B u f f e r T (MSD 番号 R 9 2 T C - 1) 中で、結合している NGF 抗体複合体を、MSD S E C T O R I m a g e r 6 0 0 0 で検出した。データを定量化して、 μg / サンプル液体 1 m L で抗体の総量を推定し、表 2 7 - 3 0 において以下に提供する。

30

40

【 0 3 5 5 】

【表 3 2】

表 27 : 単回皮下用量後の 82. 4 イヌ I g G 1 / 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

10

【 0 3 5 6 】

【表 3 3】

表 28 : 単回静脈内用量後の 82. 4 イヌ I g G 1 / 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

20

30

【 0 3 5 7 】

【表 3 4】

表 29 : 単回皮下用量後の 73. 2 イヌ I g G 1 / 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

40

50

【 0 3 5 8 】

【 表 3 5 】

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

10

【 0 3 5 9 】

[実施例 2 2] : 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。

20

【 0 3 6 0 】

【 表 3 6 】

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

30

【 0 3 6 1 】

【 表 3 7 】

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

40

【 0 3 6 2 】

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。

50

【 0 3 6 3 】

[実施例 2 3] : イヌ抗体を力価測定するための E L I S A

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 E I A プレート(C o s t a r 番号 9 0 1 8)を、P B S 中、4 μ g / m l のポリクロールヤギ抗イヌ I g G 抗体(R o c k l a n d 番号 6 0 4 - 1 1 0 2)でコーティングした。P B S 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 P B S および 0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 で洗浄した。0 . 1 μ g / m l の、H R P タグをつけたヤギ抗イヌ I g G 抗体(R o c k l a n d 番号 6 0 4 - 1 3 0 2)を用いて、結合しているイヌ m A b を検出した。プレートを P B S および 0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 で洗浄した。T M B 基質(N e o g e n 番号 3 0 8 1 7 7)の添加によってイヌ m A b を検出し、1 N の H C l を用いて反応を停止した。4 5 0 n M 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 μ g / サンプル液体 1 m l で推定した。

10

【 0 3 6 4 】

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：

【 0 3 6 5 】

【 表 3 8 】

Ausubel, F.M. et al. eds., Short Protocols In Molecular Biology (4th Ed. 1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X).

20

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).

30

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

【 0 3 6 6 】

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。

【 0 3 6 7 】

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。

40

【 図 1 】

Figure 1

マウス抗NDF抗体
配列番号1 (PR-1254972VH7L73/酸)

GAAGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTTC
TGATACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTACTTTCAGTGACTATTACATGTTT
GGATTCGCCAGACTCCGGGAAGAGGCTGGAGTGGGTGCGCAACCATTAGTGA
TGGTGGTAGTTACACCTACTACACAGACAATGTAAGGGCCGATTACCATC
ICCAGAGACAAIGTCAAGAACACCTGTACCTGCAAAIGAGCCAICTGAAGT
CTGCCGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGATTGGAGTGACTCCGAGGG
GTTTGCTTACTGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGCTCTGCA

【 図 2 】

Figure 2

配列番号2 (PR-1254972VH73/酸)

EVHLVESGGGLVPGGFLILSCAASGFTSDY~~Y~~MF~~W~~IRQTPGKRL~~E~~WVATISDGG
SYTY~~Y~~TDN~~V~~K~~G~~RFTISRDNVKNLNLYLQMSHLK~~S~~ADTAMYYCARD~~W~~SD~~E~~GE~~F~~A
YWGQGLTVT~~S~~A

【 図 3 】

Figure 3

配列番号3 (PR-1254972VL7L73/酸)

GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTGAGTCTGGAGATCA
AGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGTATTGTACAAAGTAATGGAAAC
ACCTATTAGAATGGTACCTGCAAGAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGA
TCTACAAAGTTTCCAACCGATTCTCGGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGT
GGATCAGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATC
TGGGAGTTTATTACTGCTTCAAGTTCACATGTTCCATTACGTTCCGGCTCG
GGGACAAAGTTGAAATAAAACGG

【 図 7 】

Figure 7

配列番号7 (PR-1254973VL7L73/酸)

GACATCCAGATGACTAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGAGAAA
CTGTACCCGTACATGTCTGAGCAAGTGAATAATTTACAGTTTTTATGATGG
CATCAGCAGAAACAGGGAAATCTCTCAGCTCCTGGTCTATAATGCAATA
CCTTAGCAGAGGGTGTGCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGCACACA
GTTTTCTGAAAGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTGGGAGTTATTACT
GTCAACATCATTTTGGGACTCCATTACGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGGA
AATAAAACGG

【 図 8 】

Figure 8

配列番号8 (PR-1254973VL73/酸)

DIQMTQSPASLSASVGETVTVTC~~R~~ASE~~N~~I~~Y~~S~~F~~LA~~W~~HQ~~K~~Q~~K~~SP~~Q~~LV~~Y~~N~~A~~N~~T~~L
AEGVPSRFSGSGSGTQ~~F~~SLK~~I~~N~~S~~L~~Q~~P~~E~~DFGS~~Y~~Y~~C~~Q~~I~~I~~I~~EG~~T~~P~~E~~I~~F~~FGSGTKLEIKR

【 図 9 】

Figure 9

配列番号9 (PR-1254977VH7L73/酸)

GAGGTTCACTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGCCCTCAG
TCAAGTTGTCTGACAGCTCTGGCTTCAACATTAAGACACCTATATATAC
TGGGTGAACAGAGGCTGAACAGGGCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGAT
CCTGCGAATGGAATACTATATATGCTCAAAGTTCAGGGCAAGGCTCTA
TAACAGCAGACACATCAACACACAGCCTACAIGCAGCTCAGCAGCCIGAC
ATCTGGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTGGTTATGGTTACTACGCCTACT
GGGGCCAAGGCACCCTCTCACAGTCTCTCTA

【 図 10 】

Figure 10

配列番号10 (PR-1254977VH73/酸)

EVQLQQSGAELYPGASV~~K~~LSCTASGFNIK~~D~~TY~~I~~Y~~V~~Y~~V~~K~~Q~~RPEQGLEWIG~~R~~IPAN
GN~~T~~I~~Y~~ASK~~F~~Q~~G~~KASITADTSNTAYMQLSSLTSGDTAVYYCAGY~~G~~Y~~A~~YWGQ
TTLTVSS

【 図 4 】

Figure 4

配列番号4 (PR-1254972VL73/酸)

DVLMITQIPLSLPVSLGDDQASISCRSSQSIVQSN~~G~~NY~~L~~E~~W~~Y~~L~~Q~~R~~PGQSPKLLIY~~K~~
~~Y~~SN~~R~~F~~S~~GV~~P~~DR~~F~~SGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYY~~C~~FQ~~S~~I~~V~~P~~T~~FGSGTKLEI
KRC

【 図 5 】

Figure 5

配列番号5 (PR-1254973VH7L73/酸)

CAGGTCCAAC~~T~~GCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTT~~C~~AG
TGAAGCTGTCTGTAAAGCCTTCTGGCTACACCTTCAACACTACTGGATGCAC
TGGGTGAAGCAGAGGCTGGACAAGGCTTGAAGTGGATTGGAAGGATTGATG
CTTATGGTGGTGGTACTAAGCACAATGAGAAAGTTCAAGAGGAAGGCCACAGT
GACIGCAGACAAATCCTCCAGCAGCCTACACTCTGCTCAGCAGCCTGACA
TCTGAGGACTCTGGGCTCTATTATGTACAAGATCTGGTTACGACTATTACTT
CGATGCTGGGGCACAGGGACCACGGTCCACCGTCTCTCTA

【 図 6 】

Figure 6

配列番号6 (PR-1254973VH73/酸)

QVQLQPGAE~~L~~V~~K~~PGASV~~K~~LSCKASGYTFT~~N~~Y~~W~~M~~H~~W~~V~~K~~R~~PGQGLEWIG~~R~~IP
Y~~G~~G~~G~~T~~K~~I~~N~~E~~K~~F~~K~~R~~K~~ATV~~T~~ADKSSSTAYILLSSLTSEDSAVYYCT~~R~~S~~G~~D~~Y~~Y~~T~~D~~Y~~
WGTGTTVT~~V~~SS

【 図 11 】

Figure 11

配列番号11 (PR-1254977VL7L73/酸)

GATGTTGTTCTGACCCAACTCCACTCTCTGCTGTCAATTTGGAGATCA
AGCCTCTATCTTGTGCAAGTCTACTAAGAGTCTTCTGAATGGTGTGGATTCA
CTTATTTGGACTGGTACTTGCAGAAAGCCAGGCAGTCTCCACAGCTCTCAATA
TATTTGGTTTCTAATCGATTTCTGGAGTTCCAGCAGGTTCACTGGCAGTGG
GTCAGGAACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTG
GGAGTTTATTGCTTGCAGAGTAACTATCTATTCACGTTCCGGCTCGGGGAC
AAAGTTGAAATGAAACGG

【 図 12 】

Figure 12

配列番号12 (PR-1254977VL73/酸)

DVVLTQIPLSLPVNIGDQASISCK~~S~~I~~K~~SL~~N~~GD~~G~~F~~I~~Y~~L~~D~~W~~Y~~L~~Q~~R~~PGQSPQLLIY~~L~~
~~Y~~SN~~R~~F~~S~~GV~~P~~DR~~F~~SGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYY~~C~~F~~E~~S~~N~~Y~~L~~F~~T~~FGSGTKLEI
KR

【 図 13 】

Figure 13

配列番号13 (PR-1254980VH7L73/酸)

GAGGTTCACTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGCCCTCAG
TCAAGTTGTCTGACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACACCTATATATAT
TGGGTGAACAGAGGCTGAACAGGGCTGGAATGGATTGGAAGGATTGAT
CCTGCGAATGGAATACTATATATGCTCAAAGTTCAGGGCAAGGCTCTA
TAACAGCAGACACATCAACACACAGCCTACATGACGCTCAGCAGCCIGAC
ATCTGGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTGGTTATGGTTACTACGCCTACT
GGGGCCAAGGCACCCTCTCACAGTCTCTCTA

【 図 1 4 】

Figure 14
配列番号14 (PR-1254980VH73/酸)

EVQLQQSGAELVYPGASVKLSCTASGFNIKDTIYIYVVKQRPEQGLEWIGRIDPAN
GNTIYASKFQGKATHTADTSSNTAYMQLSSLTSGDTAVYYCAGYGYAYWGQG
TTLTVSS

【 図 1 5 】

Figure 15
配列番号15 (PR-1254980VL73/酸)

GATGTTGTTCTGACCCAACTCCACTCTCTGCTGCTCAATATGGAGATCA
AGCCTCTATCTCTGCAAGTCTACTAAGAGCTTCTGAATGGTGATGGATTCA
CTTATTGGACTGGTACTTGCAGAAAGCCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTAATA
TATTTGGTTCTAATCGATTTCTGGAGTCCGGACAGGTTTCAGTGGCAGTGG
GTCAGGAACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTG
GGAGTTTATTATGCTTCGAGAGTAATCTATTCACGTTCCGCTCGGGGAC
AAAGTTGGAAATGAAACGG

【 図 1 6 】

Figure 16
配列番号16 (PR-1254980VL73/酸)

DVVLITQIPLSLPVNIGDQASISCKSIKSLNLNGDGFYLDWYLVKPGQSPQLLIYLV
YSNRFSGVSPDRFSGSGSDTFTLKISRVEAEDLGVYYCFESNYLFTFGSGTKLEML
KR

【 図 2 0 】

Figure 20
配列番号20 (PR-1254981VL73/酸)

DVLMIQIPLSLPVSLGDQASISCRSSQSILHSNGNIYLEWYLVKPGQSPNLLIYRV
SNRFSGVSPDRFSGSGSDTFTLKISRVEAEDLGVYYCFQAHVPTFGSGTKLEIK
R

【 図 2 1 】

Figure 21
配列番号21 (PR-1254982VH73/酸)

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAAGACTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCC
TGCCATCACATGCACCGTCTCAGGGTCTCATTACCCGGCTATAATATAAAC
TGGGTTCCGACGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGG
GTTATGGAGACACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAG
CAAGGACAACCTCAAGAGCCAAGTTTCTTAAAAATGAACAGICTGCAAACT
GATGACACAGCCAGGTATTATTGGCCAGAGATCACTATGGTGGTAACGACT
GGTACTTCGATGCTGGGGCACAGGACCACGGTCAACCTCTCTCA

【 図 2 2 】

Figure 22
配列番号22 (PR-1254982VH73/酸)

QVQLKESGPGLVAPSSQLSITCTVSGFSLTGYNINWVRQPPGKLEWLGMIWGY
GDTDYNSALKSRLSISKDNSKSVQLKMNLSLQTDRTARYYCARDIHYGGNDWYF
DYWGTTGTTVTVSS

【 図 1 7 】

Figure 17
配列番号17 (PR-1254981VH73/酸)

GAAGTCAACTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGCAGTGAAGCCTGGAGGGTCC
CTGACACTCTCTGTCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACCATACATGTA
TTGGGTTCCGACAGCTCCGAAAAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCGTCCATTAGT
GATGGTGGTCTTACACCTTCTATCCAGACTGTCAAGGGCCGATTACCAT
CTCCAGAGACAATGTCAACAACAACCTGTACCTIGCAAAIGCGCCATCIGAAG
TCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTACAAGAGAGGAGAGTGTAAACAACG
GGTTTGTCTTCTGGGGCCAAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

【 図 1 8 】

Figure 18
配列番号18 (PR-1254981VH73/酸)

EVQLVESGGGAVKPGGSLTSLCAASGFTFSNHYMYWVRQTPKRLWVVASISD
GGAYTFYPDIVKGRFTISRDNVNNLYLQMRILKSEDTAMYYCTREFSANNGE
AFWGGQTLVTVSA

【 図 1 9 】

Figure 19
配列番号19 (PR-1254981VL73/酸)

GATGTTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTGAGTCTGGAGATCA
AGCCTCCATCTCTGACAGTCTAGTCAGAGCATTACATAGTAATGGAAACA
CCTATTTAGAATGGTACTGACAGAAACCAGGCCAGTCTCAAACCTCTGAT
CTACAGAGTTTCAACCGATTTCTGGGGTCCCGACAGGTTTCAAGTGGCAGTG
GATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCT
GGGAGTTTATTACTGCTTTCAGGTTGCACATGTTCCATTACAGTTCGGCTCGG
GGACAAAGTTAGAAATAAACGG

【 図 2 3 】

Figure 23
配列番号23 (PR-1254982VL73/酸)

GATATCCAGATGACACAGACTACATCTCCCTGTCTGCTCTCTGGGAGACA
GAGTCAACATCACTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTACCAATATTTAAACTG
GTATCAGCAGAAACAGATGGAAGTGTAACTCTGATCTACTACACATCA
AGATTACACTCAGGAGTCCATCAAGGTTCTAGTGGCAGTGGGCTGGAACAG
ATTATCTCTCACCATTAAGCAACCTGGATCAAGAAGATATTGCCACTTACTTT
TGCCAACAGGGTAAACGCTTCTCGGACGTTCTGGTGGAGGACCAAGCTGG
AAATCAAACGG

【 図 2 4 】

Figure 24
配列番号24 (PR-1254982VL73/酸)

DIQMIQTISLSASLGDVRIITCRASQDITNYLNWYQKPDGIVKLLIYYSRLH
SGVPSRFSGSGSDYSLTISNLDQEDIATYFCQGGKTLPRTFGGGKLEIKR

イシグレ-67-ケにCDRがラトされたマウス抗 mAb (CDRがラト化抗NGF Ab) :CDRIには下線が引かれている

【 図 2 5 】

Figure 25
配列番号25 (72.1VH73/酸)

EVQLVESGGDLVVKPGGSLRLSCVAVSGFTFSDYYMEWVRHSPGKGLQVVAITSD
GGSYYTYTDNVKGRFTISRDDANNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDWSDSEGF
AVWGQGITLVTVSS

【 図 2 6 】

Figure 26
配列番号26 (72.1VL73/酸)

DIVMTQTTPSLVSPREPASISCRSSQSIVQSNNGNTYLEWYLVKPGQSPQLLIYKVS
NRFSGVSDRFSGSGSDTFTLRISRVEADDTGVYYCFQGSHPYPTFGAGTKVELK
R

【 図 2 7 】

Figure 27

配列番号27 (73. 1VH7s/酸)

EVQLVQSAAEVKKPGASVKVSKCTSGYIFIN~~Y~~WMHWVQAPGAGLEWMGRIDP
YGGGTKHNEKFKRRRVTLTADTSTNTVYMELSNLRTEDTAVYYCARSGYDYYFD
 YWGQGLTVTVSS

【 図 2 8 】

Figure 28

配列番号28 (73. 1VL7s/酸)

IIVMTQTPLSLSPGESASISCRASENIYSFLAWFRQKPGQSPQRLIYNANTLAEG
 VPDFRFGSGSGDTFTLRISRVEDEDAGLYYCQHFGTPTFGQGTKEIKR

【 図 2 9 】

Figure 29

配列番号29 (77. 1VH7s/酸)

EVQLVQSAAEVKKPGASVKVSKCTSGYIFID~~I~~YIYVWVQAPGAGLEWMGR
IDPANGNTIYASKFQGRRVTLTADTSTNTVYMELSNLRTEDTAVYYCARYGYAY
 WGQGLTVTVSS

【 図 3 0 】

Figure 30

配列番号30 (77. 1VL7s/酸)

DLVLTQTPRSLSPGETASISCKSTKSLNGDGFTYLDWFRQKPGQSPQRLIYLV
SNRFGVDPDRFSGSGDTFTLRISRVEADDTGLYCFESNYLFTFSQGTNLEMK
 R

【 図 3 1 A 】

Figure 31A

配列番号31 (81. 1VH7s/酸)

EVQLVESGGDLMKPGGSLRLSCVASGFTFSNIYMYWVRQAPGKGLQWVGSJSD
 GGAYTEYPTDVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRTEDTGRVLLCEGEESANNGF
 AEWGHGTLTVTVSS

【 図 3 5 】

Figure 35

配列番号35 (72. 2VH7s/酸)

EVHLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSDYYMEWIRHSPGKGLWVATISDG
 GSYTYTNDNVKGRFTISRDNANNLYLQMNSLKAEDTAVYYCAKDWSDSEGE
 AYWGQGLTVTVSS

【 図 3 6 A 】

Figure 36A

配列番号36 (72. 2VL7s/酸)

DVLMTQTPPPLSVSPREPASISCRSSQSIQSNNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKV
SNRFGVDPDRFSGSGDTFTLRISRVEADDTGVYYCFQGSHVPPTFGAGTKVEL
 KR

【 図 3 6 B 】

Figure 36B

配列番号179 (72. 3VH7s/酸)

EVHLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSDYYMEWIRQSPGKGLWVATISDG
 GSYTYTNDNVKGRFTISRDNANNLYLQMNSLKAEDTAVYYCAKDWSDSEGE
 YWGQGLTVTVSS

【 図 3 6 C 】

Figure 36C

配列番号180 (72. 4VH7s/酸)

EVHLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSDYYMFVWRHSPGKGLWVATISD
 GGSYTYTNDNVKGRFTISRDNANNLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDWSDSEGE
 AYWGQGLTVTVSS

【 図 3 6 D 】

Figure 36D

配列番号181 (72. 4VL7s/酸)

DIVMTQTPFSLSVSPREPASISCRSSQSIQSNNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS
 NRFGVDPDRFSGSGDTFTLRISRVEADDTGVYYCFQGSHVPPTFGAGTKVELK
 R

【 図 3 1 B 】

Figure 31B

配列番号177 (81. 1B VH7s/酸)

EVQLEESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNHYYMYWVRQSPGKGLQWVASJSD
 GGAYTEYPTDVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCVKEESANNNGFA
 EWGQGLTVTVSS

【 図 3 2 】

Figure 32

配列番号32 (81. 1VL7s/酸)

DVVMTQAPPPLSVSPREPASISCRSSQSIHNSNGNTYLEWFRQKPGQSPQRLIYRV
SNRFGVDPDRFSGSGDTFTLRISRVEADDTGVYYCFQGAHVPPTFGQGTKEIKR

【 図 3 3 】

Figure 33

配列番号33 (82. 1VH7s/酸)

EVILQESGPGLVKPSQILSLICTVSGGSVIGYINWIRQRPDRGLEWMGMWGY
GDTDYNSALKSRISITADGKTNHLSLQLTSTTTEDTAVYYCTRDHYGGNDWYFD
 YWGQGLTVTVSS

【 図 3 4 】

Figure 34

配列番号34 (82. 1VL7s/酸)

IIVMTQTPPLSLSPGESASISCRASQDITNYLNWFRQKPGQSPQRLIYYSRLHSG
 VPDFRFGSGSGDTFTLRISRVEDEDAGLYYCQQGKTLPRITFGQGTKEIKR

復帰突然変異残基を含有する43化抗NGF抗体
 (復帰突然変異残基は太字で示されている)

【 図 3 7 】

Figure 37

配列番号37 (73. 2VH7s/酸)

QVQLVQSAAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTNYWMHWVQAPGAGLEWIGRID
PYGGGTKHNEKFKRRATVITADKSTSTAYMELSNLRTEDTAVYYCTRSGDYDYYFD
 DVWGQGLTVTVSS

【 図 3 8 A 】

Figure 38A

配列番号38 (73. 2VL7s/酸)

DIQMTQTPPLSLSPGESASITCRASENIYSFLAWHRQKPGQSPQLLYNANTLAE
EGVPSRFSGSGSGDTFTLRISRVEDEDAGLYYCQHFGTPTFGQGTKEIKR

【 図 3 8 B 】

Figure 38B

配列番号182 (73. 4VH7s/酸)

EVQLVQSAAEVKKPGASVKVSKASGYIFIN~~Y~~WMHWVQAPGAGLEWMGRID
PYGGGTKHNEKFKRRRVTLTADKSTSTVYMELSNLRTEDTAVYYCTRSGDYDYYFD
 DVWGQGLTVTVSS

【 図 3 8 C 】

Figure 38C

配列番号183 (73. 4VL7s/酸)

DIQMTQTPPLSLSPGESASISCRASENIYSFLAWHRQKPGQSPQLLYNANTLAE
 GVPDRFSGSGSGDTFTLRISRVEDEDAGLYYCQHFGTPTFGQGTKEIKR

【 図 3 9 】

Figure 39

配列番号39 (77. 2VH7s/酸)

EVQLVQSAAEVKKPGASVKVSKASGFNIKDTIYIYVWVQAPGAGLEWIGRIDPA
NGNTIYASKFQKASITADTSTNTAYMELSNLRTEDTAVYYCARYGYAYYWGQ
 GLTVTVSS

【 4 0 A】

Figure 40A

配列番号40 (77. 2VL73/酸)

DVYVLTQTPRSLVSPGETASISCKSTKSLNLDGFTYLDWYRQKPGQSPQLLIYL
VSNRFSGVPDRFSGSGSDTFLRISRVEADDTGLYYCFESNYLFTFGQGTNLEM
KR

【 4 0 B】

Figure 40B

配列番号184 (77. 3VH73/酸)

EVQLVQSAAEVKKPGASVKVSCASGFNIKDTIYIYVWKQAPGAGLEWGRIDPA
NGNTIYASKFQGGKASITADTSTNTAYMELSNLRTEDTAVYYCAGYGYAYWGW
GTLVTVSS

【 4 0 C】

Figure 40C

配列番号185 (77. 4VH73/酸)

EVQLVQSAAEVKKPGASVKVSCASGFIFIDIYIYVWKQAPGAGLEWGRIDPA
NGNTIYASKFQGRVTLTADTSTNTVMELSNLRTEDTAVYYCAGYGYAYWGW
QGTLVTVSS

【 4 0 D】

Figure 40D

配列番号186 (77. 4VL73/酸)

DLVLTQTPRSLVSPGETASISCKSTKSLNLDGFTYLDWYRQKPGQSPQLLIYLV
SNRFSGVPDRFSGSGSDTFLRISRVEADDTGLYYCFESNYL
EIFSQGTNLEMKR

【 4 1】

Figure 41

配列番号41 (81. 2VH73/酸)

EVQLEESGGDLVMPGGSLRLSCVASGFTFSNHMYMWVRQAPGKLEWVASISD
GGAYTFYPTVKGRTISRDNKNNLYLQMNLSLKTEDTAVYYCTGEESANNG
FAFWGGTLVTVSS

【 4 2 F】

Figure 42F

配列番号206 (81. 5B. VH73/酸)

EVQLEESGGDLVMPGGSLRLSCVASGFTFSNHMYMWVRQSPGKLEWVASISD
GGAYTFYPTVKGRTISRDNKNNLYLQMNLSLKAEDTAVYYCTREESANNGFA
FWGQGTLVTVSS

【 4 2 G】

Figure 42G

配列番号207 (81. 6B. VH73/酸)

EVQLEESGGDLVMPGGSLRLSCVASGFTFSNHMYMWVRQSPGKLEWVASISD
GGAYTFYPTVKGRTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCTKEESANNGF
AFWGGTLVTVSS

【 4 3】

Figure 43

配列番号43 (82. 2VH73/酸)

FVQIQESGPGIVKPSQTLSTCTVSGFSITGYNINWVRQRPDRGLFWLGMWGW
GDDTDYNSALKSRISIKDNKTSQVFLQLTSTTTEDTAVYYCARDHYGGNDWYF
DYWGQGTLVTVSS

【 4 4 A】

Figure 44A

配列番号44 (82. 2VL73/酸)

DIQMTQTPLSLSPGASASITCRASQDINYLWYRQKPGQSPKLIYYISRLHS
GVPSRFSGSGSDYSLRISRVEDEAGLYFCQQGKTLPRIFGQGTKEIKR

【 4 4 B】

Figure 44B

配列番号191 (82. 3VL73/酸)

DIQMTQTPLSLSPGASASITCRASQDINYLWYRQKPGQSPKLIYYISRLHS
GVPSRFSGSGSDYSLRISRVEDEAGLYFCQQGKTLPRIFGQGTKEIKR

【 4 2 A】

Figure 42A

配列番号42 (81. 2VL73/酸)

DVLMTQTPPSSLVSPREPASISCRSSQILHSNGNTYLEWYRQKPGQSPQLLIYRV
SNRFSGVPDRFSGSGSDTFLKISRVEAEDLVVYCFQGAHVPTFGQGTKEI
KR

【 4 2 B】

Figure 42B

配列番号187 (81. 4VH73/酸)

EVQLVESGGDLMPGGSLRLSCVASGFTFSNHMYMWVRQAPGKLEWVASISD
GGAYTFYPTVKGRTISRDNKNTLYLQMNLSLRTEDTGRVLYCTGEESANNGF
AELWGHGTLVTVSS

【 4 2 C】

Figure 42C

配列番号188 (81. 4VL73/酸)

DVLMTQAPPSSLVSPREPASISCRSSQILHSNGNTYLEWYRQKPGQSPQLLIYRV
SNRFSGVPDRFSGSGSDTFLRISRVEADLVVYCFQGAHVPTFGQGTKEI
KR

【 4 2 D】

Figure 42D

配列番号189 (81. 2B. VH73/酸)

EVQLEESGGDLVMPGGSLRLSCVASGFTFSNHMYMWVRQSPGKLEWVASISD
GGAYTFYPTVKGRTISRDNKNNLYLQMNLSLKTEDTAVYYCTREESANNGFA
FWGQGTLVTVSS

【 4 2 E】

Figure 42E

配列番号190 (81. 4B. VH73/酸)

EVQLEESGGDLVMPGGSLRLSCVASGFTFSNHMYMWVRQSPGKLEWVASISD
GGAYTFYPTVKGRTISRDNKNTLYLQMNLSLKTEDTAVYYCTKEESANNGF
AFWGGTLVTVSS

【 4 4 C】

Figure 44C

配列番号192 (82. 4VH73/酸)

EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGSVTGYNINWIRQRPDRGLEWGMWGW
GDDTDYNSALKSRISITKDNKTSQVFLQLTSTTTEDTAVYYCARDHYGGNDWYF
VWGQGTLVTVSS

【 4 4 D】

Figure 44D

配列番号193 (82. 4VL73/酸)

DIQMTQTPLSLSPGASASISCRASQDITNYLWYRQKPGQSPKLIYYISRLHS
GVPSRFSGSGSDYTLRISRVEDEAGLYFCQQGKTLPRIFGQGTKEIKR

及び NGF

【 4 5】

Figure 45

配列番号45 (NGF-Dog-S7 5(7-))

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

【 4 6】

Figure 46

配列番号46 (NGF-Dog-AS7 5(7-))

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

【 4 7】

Figure 47

配列番号47 (NGF-d-Ec-S7 5(7-))

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

【 4 8】

Figure 48

配列番号48 (NGF-d-Ec-AS7 5(7-))

5'-GGC AGC TCG AGC TAG GCT CGT CTC CCG GCC TIC CI-3'

【 図 4 9 】

Figure 49

配列番号49 (λN6F C末端His (配列番号208) 融合効力増' 配列)

ATGTCCATGTTGTTTACACTCTGATACAGCTCTTCTGATCGGCATCCGGGCG
AGAACCGCATCCAGAGAGCCATGTCAGCAGGACACGCCATCCCCACGGC
CACTGGACTAAGCTTACAGATTCCCTTGACACAGCCCTCCGACAGAGCCCGCA
GCGCCCCGGCCGGGCAATAGCTGCCAGGGTGACAGGGCAGACCCGCAACA
TCACTGTGGATCCCAAACCTTTAAAAAGCGCGACTGCGTTCGCCCCGCGT
GCTGTTACGACGACCCCCCACTGTGGCTGCGGACGCTCAGGACTGGAC
CTGGAGGCCGGCAGCACCCTCCGTCACAGGACTCACAGGAGCAAGCGG
TCTTCGTCCACCCTGCTTCCACCAGGGGGAGTTCGCGGTGCGACAGCGT
CAGCGTGTGGTGGGCGACAGACCACAGCCACCGACATCAAGGCAAGGA
GGTGATGGTGGGAGAGGTTGAACATTAACAACAGTGTGTTCAAACAGTAC
TTCCTTTGAGACCAAGTGCCGGGACCCACCCCGTGGACAGCGGGTGCAGG
GCATCGACTCAAGCACTGGAACCTCTACTGCACCACCCACACCTTCGTC
AAGGCGCTGACCATGACGGCAAGCAGGCTGCTGCGGTTATCCGGATCG
ACACGGCTGCGTGTGCGTCTCAGCAGGAAGCCGGGAGACGAGCCATC
ATCATCATCATC

【 図 5 0 】

Figure 50

配列番号50 (λN6F C末端His (配列番号208) 73/酸配列)

MSMLFYTLITALLIGRAEPPHESHVPAGHAIPHAWTKLQHSLDLARRARSAP
AGAIAARVTGQTRNITVDPKLFKRRRLSPRVLFSTHPPVAADAQDLLEAGST
ASVNRITIRSKRSSIIPVFIIRGEFSVCDVSVVWVGDKTTATDIKGEVMVLGEV
NINNSVFKQYFFETKCRDPTPVDGSCRGIDSKHWSYCTTHTFVKALTMDGKQ
AAWRFIRIDTACVCLSRKAGRRARHHHHHH

λ重鎖および軽鎖定常ドメイン

【 図 5 3 】

Figure 53

配列番号53 (λκ 定常領域効力増' 配列)

AATGATGCCAGCCTGCAGTGTACCTGTTCCAACCTAGCCCTGACCAGCTCCA
CACAGGCTCTGCTAGCGTCGCTGCTGCTGCTCAATCTTTCIACCCAAAGGAI
TCAACGTGAAGTGAAGGTCGATGGCGTGATTCAAGACACCGGCATTCAAGA
GTCAGTACCCAAACAGGATAAAGATTCTACATATAGCTTGAGCAGCACACTG
ACCATGAGCTCCACCGAGTATCTCAGTCAAGCTGATTCCTGCGGAGATCAC
ACAAAGTCAATTGCCAGTACGCTCATAAAAAGCTTCCAGAGTCCGAATGC
CAGCGCGTGGATTGA

【 図 5 4 】

Figure 54

配列番号54 (λκ 定常領域73/酸配列)

NDAQPAVYLFQSPDQLHTGSASVCLLNSFYPKDINVKWVVDGVIQDTGIQES
VTEQDKDSTYSLSSTLMTSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECRVD

λ化Ab可変ドメインCDR

【 図 5 5 】

Figure 55

配列番号55 (72. 1VH73/酸:CDR1)

DYYMF

【 図 5 6 】

Figure 56

配列番号56 (72. 1VH73/酸:CDR2)

TISDGGSYFYTDNVKG

【 図 5 7 】

Figure 57

配列番号57 (72. 1VH73/酸:CDR3)

DWSDSEGFAY

【 図 5 1 】

Figure 51

配列番号51 (λIgB定常領域効力増' 配列)

GCGTCGACCACAGCCCCGTCAGTCTTCCCATTTGGCCCCAGCTGCGGGTCAA
CIAGCGGGICTACCGTCGCTTGGCTGCTGCTGGTGTGCTGGGCTACTTCCCIGAG
CCTGTGACCGTCAGCTGGAACCTGTGTAGCTGACCAGCGGGCTGCATACTTT
TCCAAGCGTCTTCAAGAGCTCCGGACTCCACTTCTTAGTTCATGTAATACCG
TGCAAGTAGTGGTGGCCATCCGAGACATTTACTGTAACGTGGTCCATCC
GCTAGTAATACCAAGGTGGATAAGCCTGTCTTTAACGAGTCCCGGTGCACAG
ACACACCCTTGTCCGTGCTGAGCTCTCCTGCGGCCCTCAGTCTCTGATC
TTTCTCCAAAGCCAAAAGATATCTCCGGATTACCCGGACTCCTGAAAGTGA
CATGTGTAGTTCTGGACTTGGCCGGGAAGCCAGAGGTACAGATTAGCTG
GTTCGTAGACGGCAAAGAGGTGCACACGCCAAAACGCAATCAAGGGAACA
GCAGTTCAATGGTACTTATCCGGTCTGTCAGTACTGCCGATCGAACATCAG
GATTGGCTTACTGGCAAGGAATTCAAATGCCGCGTGAACACATTGACTGTC
CAAGCCCCATCGAGAGGACATATCAAAGGCCAGGGGGCGGGCACACAAGC
CGAGCGTTTATGTCTGCCCCCTCCCTAAGGAACTTAGCTCTCAGACACT
GTGAGCATTACATGCTGATCAAGGATTTCTATCCACCGGACATAGATGTAG
AGTGGCAGTCCAACGGGCAACAGGAGCCTGAACGGAAACATAGAATGACTC
TCCACAGCTCGATGAGGATGGTCTTACTTTTCTTACTCCAAACTGTCAGTG
GCAAAATCAGATGCGAGCAGGGCGATCCATTCACATGTCCCTTATGCACG
AGACGCTTCAAGCACTATACTGATCTGCTCCCTCTCACATAGCCCCGGCAA
ATGA

【 図 5 2 】

Figure 52

配列番号52 (λIgB定常領域73/酸配列)

ASITAPSVHPLAPSCGTSIGSIVALACLVSQYFPEPVTVSWNSGLISGVHIFPSV
LQSSGLHSLSSMVTVPSSRWPESETFCNVVHPASNTKVDKPVFNECRCTDTPPCP
VPEPLGGPSVLIFPPKPKDILRITRTPVTCVVDLGDREDPEVQISVWFVDGKEVIT
AKTQSRQFNGTYRVVSVLPIEQDWTGKFKCRVNHIDLPSPERTISKARG
RAHKPSVYVLPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNQGEPEKHRMT
PPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQGDPTCAVMHETLQNHVYDLSLSHSPGK

【 図 5 8 】

Figure 58

配列番号58 (72. 1VL73/酸:CDR1)

RSSQSIVQSNNGNTYLE

【 図 5 9 】

Figure 59

配列番号59 (72. 1VL73/酸:CDR2)

KVSNRFIS

【 図 6 0 】

Figure 60

配列番号60 (72. 1VL73/酸:CDR3)

FQGSHPFT

【 図 6 1 】

Figure 61

配列番号61 (73. 1VH73/酸:CDR1)

NYWMH

【 図 6 2 】

Figure 62

配列番号62 (73. 1VH73/酸:CDR2)

RIDPYGGGKHNKFKR

【 図 6 3 】

Figure 63

配列番号63 (73. 1VH73/酸:CDR3)

SGYDYFDV

【 図 6 4 】

Figure 64

配列番号64 (73. 1VL73/酸:CDR1)

RASENIYSFLA

【 図 6 5 】

Figure 65

配列番号65 (73. 1VL73/酸:CDR2)

NANILAE

【 図 6 6 】

Figure 66
配列番号66(73.1VL73/酸:CDR3)
QHFFGTPT

【 図 6 7 】

Figure 67
配列番号67(77.1VH73/酸:CDR1)
DTYIY

【 図 6 8 】

Figure 68
配列番号68(77.1VH73/酸:CDR2)
RIDPANGNTIYASKFQG

【 図 6 9 】

Figure 69
配列番号69(77.1VH73/酸:CDR3)
YGYAY

【 図 7 0 】

Figure 70
配列番号70(77.1VL73/酸:CDR1)
KSTKSLNGDGFYLD

【 図 7 1 】

Figure 71
配列番号71(77.1VL73/酸:CDR2)
LVSNRFS

【 図 7 2 】

Figure 72
配列番号72(77.1VL73/酸:CDR3)
FESNYLFT

【 図 7 3 】

Figure 73
配列番号73(81.1VH73/酸:CDR1)
NHMY

【 図 8 2 】

Figure 82
配列番号82(82.1VL73/酸:CDR1)
RASQDITNYLN

【 図 8 3 】

Figure 83
配列番号83(82.1VL73/酸:CDR2)
YTSRLHS

【 図 8 4 】

Figure 84
配列番号84(82.1VL73/酸:CDR3)
QQGKTLPRTEHNGF

【 図 8 5 】

Figure 85
配列番号85(ε+βNGF)
SSSHPIFHRGEFSVCDVSVVWGDKTATDIKGEVMVLGEVNINNSVFKQYFE
TKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTHTFVKALTMGKQAAWRFIRIDTACV
CVLSRKAVRRA

【 図 7 4 】

Figure 74
配列番号74(81.1VH73/酸:CDR2)
SISDGGAYTFYPTVKG

【 図 7 5 】

Figure 75
配列番号75(81.1VH73/酸:CDR3)
EESANNGFAF

【 図 7 6 】

Figure 76
配列番号76(81.1VL73/酸:CDR1)
RSSQSLHSNGNTYLE

【 図 7 7 】

Figure 77
配列番号77(81.1VL73/酸:CDR2)
RVSNRFS

【 図 7 8 】

Figure 78
配列番号78(81.1VL73/酸:CDR3)
FQGAHVPFT

【 図 7 9 】

Figure 79
配列番号79(82.1VH73/酸:CDR1)
GYNIN

【 図 8 0 】

Figure 80
配列番号80(82.1VH73/酸:CDR2)
MIWGYGDTDYNALKS

【 図 8 1 】

Figure 81
配列番号81(82.1VH73/酸:CDR3)
DHYGGNDWYFDV

【 図 8 6 - 1 】

Figure 86 - 表
43PBMに由来する43重鎖可変ドメイン配列

表12

配列番号: 178 (Ca-1005)
EVQLEESGGDLVKPGSLRLSCVASGFSIGSYGMSWVRQSPGKGLQWVAWIKY
DGSRTFYADAVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYFCVKGPNSSWLPSTYFASWQGLVTVSS

表12

配列番号: 86 (Ca-2301)
EMQLVESGGDLVLRPGSLRLSCVASGFTFSTYGMTWVRQSPGKGLQWVATIGP
GGRNTYYADAVKGRFTISRDDAENTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAQAFDATYYTSFDCWGRGSLVAVSS

表12

配列番号: 87 (Ca-2302)
MESVLSWVFLVALLQGIQGEIRLVESGGDLVKPGSLRLSCVASGFIFGNYDMS
WVRQAPGKGLQWVAARVYDGSSTYYSDAVKGRITISRDDPGNTVYLQDLSLRAEDTATYYCVRGYSSSFYIGGAFGHWGPGLTITVSS

表12

配列番号: 88 (Ca-2303)
MECVLWVFLVAILRGVQGEVQLVESGGDLVKPGSLRLSCVASGFTFSDYYMS
SWIRQAPGKGLQWVADISDGGDGTGYAGAVKGRFTVSRNENKNTLFLQMNDLRAEDTATYYCTKAREMYGYRDFDSWGPGLTITVSS

【 図 8 6 - 2 】

表12

配列番号 : 89 (Ca-2304)

MESVGLGLVALLTILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNYMT
WVRQAPGKGLEWVGYIHHNGGTYYADAVKGRFTISRDDAKNTLYLEMNSLR
AEDTAVYYCGKMFIDYWGQGLTVTVSS

表12

配列番号 : 90 (Ca-2305)

MESALSWVFLVTLKGVQGEVLLVESGGDLVKPGGSLRLSCLTSGFTFNXYDWG
WVRQAPGKGLQWVAYIKKGGSDVRYADAVKGRFTISRDDAKNTLYLQMNSLRA
EDTAVYYCARSAWDSFDYWGQGLTVTVSS

表12

配列番号 : 91 (Ca-2306)

MESVFCWVFLVAILKGVQGEVQLVESGGDLVKPAGSLRLSCVASGFTFTDY
SMNVWRQAPGKGLQWVATISNDGTSTDYDAVKGRFTVSRDSARNTVYLQMT
SLRADDATATYCVSRHSYSLLDYWGQGLTVTVSS

表12

配列番号 : 92 (Ca-2307)

MQMPWSLLCLLAAPLGVLSEVTLQESGPGLVKPSQTLSTCAVSGGSVIRNYYW
HWIRQRPGRGLEWMCWSETTYSPAFRGRISITIDAATDQFSIHLNSMTTDDT
AVYYCARALYPTSSWYDGMVYDYGHWGASVVVSS

表12

配列番号 : 93 (Ca-2308)

EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCESSGFIFSYAMNVWRQAPGKGLQWVAYIGG
AGFITVHADVDKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLTINDTAVYYCVRSNSRIPDYW
GQGLTVAVVSS

【 図 8 6 - 4 】

表12

配列番号 : 99 (Ca-2402)

KPAGSLRLSCVASGFTSSHSVTVWRQAPGKGLQFVAGITSGGNNRYTDAVRG
RFTLSRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAMYFCALGSYEWLSGEFDYWGQGLTVT
VSS

表12

配列番号 : 100 (Ca-2403)

MESVFCWVFLVAILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTLNYYFM
YVWRQAPGKGLQWVARLNSNGDSTFYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL
RAEDTSMYYCAKDLIYGYTLWGQGLTVTVSS

表12

配列番号 : 101 (Ca-2404)

MASVLSWVFLVAIVKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFIFNKYEVY
WVRQAPGKGLEWVARIEBNGPTYAFAVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA
DDTAVYYCATPVSSTVAIDYWGQGLTVTVSS

表12

配列番号 : 102 (Ca-2405)

MQMPWSLLCLLATPLGVLSLTLQESGPGLVKPSQTLSTCAVSGGSVTTTSYW
NWIRQRPGRGLEWVGHWIGSTAYNPAFQGRISITADTAKNQLSLQLRSMTTEDT
AVYFCARGSSWTPSGDSWGQGLTVTVSS

【 図 8 6 - 3 】

表12

配列番号 : 94 (Ca-2309)

MESVFCWVFLVAILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSVYMS
WVRQAPGKGLQWVARITTDGTDTFYADAVKGRFTISRDNKNTLYLEMNSLR
AEDTAVYYCGDPWPQAYPDLWGQGLTVTVSS

表12

配列番号 : 95 (Ca-2310)

MESVLCWVFLVAILKGVQGEVHLVESGGDLVKPGGTLRLSCVASGFTFSQYDM
SWVRQSPGKGLQWVALSRVYHGGGTYYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL
RAEDTAVYYCVKEGSRWDLRGDYDYWGQGLTVTVSS

表12

配列番号 : 96 (Ca-2311)

MQMPWSLLCLLAAPLGVLSLTLQESGPGLVKPSQTLSTCAVSGGSVTSYHW
NWIRQRPGRGLEWVWGTGNTVYPAFQGRISIHGDAAKNQFSLHLSMTTDDT
AVYYCARCGIVAPGFLPIGDFDFWGQGLTVTVSS

表12

配列番号 : 97 (Ca-2312)

MESVFCWVFLVAILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFSFSNYFMF
WGRQAPGKGLQWVARIRSDGGSTYYADAVKGRFTISRDNARNTLYLQMNSLRA
EDTATYCYAKADIILPEYRGGGLTVTVSS

表12

配列番号 : 98 (Ca-2401)

FSVI.GWIFL.ATIL.KGVQGEVQL.VFSGGDI.VKPGGSI.RI.SCVGSGFTSSSWMNW
VRQAPGKGLQWVAEISGTGSSTNYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED
TAMYYCARAAAYYGNRNDLDYWGQGLTVTVSS

【 図 8 6 - 5 】

表12

配列番号 : 103 (Ca-2406)

MASVLLKLGFCRYCKVSRVRCNXVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFIFNKYEV
YVWRQAPGKGLEWVARILESGNPTYAFAVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR
ADDTAVYYCATPVSSTVAIDYWGQGLTVTVSS

表12

配列番号 : 104 (Ca-2407)

MDCSWRIFLLALATGVHSEVQLVQSAAEVKKPGASVKVCKTSGYTLTDYYIH
WVQQAPGTGLIHWGMWIDPEXGTTDYAQKFGQXVTLTADTSTNTAYMELSGLR
AEDTAVYYCARFPRSLDYGSGFFDYWGQGLTVTVSS

表12

配列番号 : 105 (Ca-2408)

MESVLCWVFLVAILKGVQGEVRLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFRNYGM
SWVRQRPKGLQWVAAIRSDGVTYADDLKVRFTVSRDDARNTLYLQNLGLRA
EDTAVYYCAKAPWGLYDAWGQGLTVTVSS

表12

配列番号 : 106 (Ca-2409)

MESVLSWVFLVAILQGVQGEVQVVEGSDLVKPGGSLRLSCVASGYSISTYMT
WVRQVPGKGLQLVAGINGDGSSTYYTDAVKGRFTISRDNARNTVYLQMNSLRA
EDTAMYYCLGEYSWFYWGQGLTVTVSS

表12

配列番号 : 107 (Ca-2410)

MQMPWSLLCLLAAPLGVLSLTLQESGPRLVKPSQTLSTCAVSGGSVTTTSYW
SWIRQRPGRGLEWVWGTGNTVYPAFQGRISISADTAKNQFSLHLSVTTEDTA
LYFCASKSASTSWYFSLFESWGQGLTVTVSS

【 図 8 6 - 6 】

表12

配列番号 : 108 (Ca-2411)

MESVGLVFLTLTKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSSYSMS
WVRQAPGKGLQWVGYIDNGGTSTYYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLR
AEDTAVYYCGRGSYGMIEYWGHTSLFVSS

表12

配列番号 : 109 (Ca-2412)

MESVGLLFLVAILKGVQGEIQLVESGGDLKPGGSLRLSCVASGFTFSGSDMN
WIRQAPGKGLQWVAHITIEGIGTSYVGVKGRFTISRDNKNTLYLQMNDRAE
DTAMYCAVSPWNYYSFDSWQGTLVTVSS

【 図 8 7 - 1 】

Figure 87

イPBMG RNAIに由来するイλ経鎖可変ドメイン配列

表13

配列番号 : 110 (Ca-1001)

MTSTMAWSPLLLTLTHCTVSWAQTVLTQSPVSAVLGRRVTISCTGSDTNIGSH
RDVQWYQLVPGKSPKTLIYGTDNRPSPGIPVRFSGSKSGNSGLTITIGIAEDEAD
YYCQSYDDDI.SMNVFSGGTHLTVLG

表13

配列番号 : 111 (Ca-1002)

MDWVPFYLPFIETGFCALPVLTPQPTNASASLEESVKLTCTLSSEHSNYIVRWYQ
QQPGKAPRYLMYVRSDDGSYKRGDGPSPRFSGSSGADRYLTISNIKSEDEDDYY
CGADYTISGQYGVFSGGTHLTVLG

表13

配列番号 : 204 (Ca-1003)

LVISGGSAIGTIPMAWTHLJL.PVLTICTGVSASSVLTQPPSVSVSLGQTAITISCSG
ESL
SKYYAQWFQKAGQVPVLYIKDTERPSGIPDRFSGSSGNTHLTISRARAED
ADYYCESEVSTGTVCVRRRHPSPRPSAQGLPLGHTLPALL

表13

配列番号 : 112 (Ca-1006)

MTSTMAWSPLLLTLTHCTGWSAQSVLTQPSVSGSLGQRVTISCTGSSNIGGY
SVNWLQQLPGTGPRTIHYNSNRPSGVPDRFSGSRSGTTATLTISGLQAEDEADYY
CSTWDSNLRITVFGGTHLTVLG

【 図 8 7 - 2 】

表13

配列番号 : 113 (Ca-1007)

MTSTMDWSPLLLTLAHCCTGWSAQSVLTQPSVSGSLGQRVTISCTGTSNLGT
YNVWGLQVPGTGPRTVIVYNIYRPSGVPDRFSGSESGSTATLTISDLQAEDEAE
YYCTAWDSSLKAYVFGSGTQLTVLG

表13

配列番号 : 114 (Ca-1008)

MTSNMAWCPFLLTLAYCTGWSAQSVLTQPTSVSGSLGQRVTISCSGSTNNIGIV
GASWYQQLPGKAPKLLVYSDGDRPSGVPDRFSGSNSGSDTLTITGLQAEDEAD
YYCQSFDTLDAAVFGGTHLTVLG

表13

配列番号 : 115 (Ca-1009)

MTSTMAWSPLLLTLAHCCTVSWAQAVLTQPPSVSAALGQRVTISCTGSDTNIGS
GYEVHWYRQVPGKSPAIHIIYGNNSNRPSGVPDRFSGSKSGSTATLTITIGIAEDEAD
YHCQSYDGNLDGGVFGGTHLTVLG

表13

配列番号 : 116 (Ca-1010)

MTSTMGWFPLLTLAHCAGSWAQSVLTQPSVSGSLGQRVTISCTGSSPNVGY
GDFVAWYQVPGTGPRTIYNTSRPSGVPDRFSASRSGNTATLTISGLQAEDEAD
DYCYSSYDNTLIGVFGGTHLTVLG

表13

配列番号 : 117 (Ca-1011)

MTSTMGWSPLLLTLAHCCTGWSAQSVLTQPSVSGSLGQRVTITCTGSSSNIGRA
NVAWFQVPGTGPRTVIVYTSVGRPSGVPDRFSGSKSGSTATLTISGLQAEDEADY
YCSDWNSLDAGVFGGTHLTVLG

【 図 8 7 - 3 】

表13

配列番号 : 118 (Ca-1012)

MTSTMGWFPLLTLAHCCTGWSAQSVLTQPSVSGSLGQRVTITCTGSSNIGRG
FVSWFQVPGIGPKILIFDAYRRPSGVPDRFSGSRSGNTATLTISGLQAEDEADYY
CAVYDSRLDVGDFGSGQLTVLS

表13

配列番号 : 119 (Ca-1202)

MTSNMAWCPFLLTLTYCTGWSARVLTQPSVSGSPGQKVTIYCSGTMSDIGV
LGNWYQQLPGKAPKLLVDNDGDRPSGVPDRFSASKSGHSDTLITGLQPEDEG
DYCYQSFSSSLDAAIFGEGTHLTVLG

表13

配列番号 : 120 (Ca-1203)

SVASYVLTQSPSQNVTLRQAHAHITCEGHNIGTKSVHWYQKQQAAPVLIHDDK
SRPSGIPERFSGANSNTATLTISGALAEDEADYYCLVWDSASAIWVFGGTHLTV
LG

表13

配列番号 : 121 (Ca-1204)

MTSTMAWSPLLLTLAHCCTGWSAQSVLTQPTSVSGSLGQRVTISCTASSNIDRD
YVAWYQQLPGTRPRALIIYANSNRPSGVPDRFSGSKSGSTATLTISGLQAEDEADY
YCSTWDSNLTIVFGGTHLTVLG

表13

配列番号 : 122 (Ca-1205)

SVASYVLTQVPSVSNLKGKATITCEGDNVGEKYTHWYQVEYQAPVLIHEDS
RRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGARAEDTDYCYQVWDDSGNVFGGTHLTVL
G

【 図 8 7 - 4 】

表13

配列番号 : 123 (Ca-1206)

MTSTMGWFPILLTLAHCAGSWAQSVLTPASVSGSLGQRVTISCTGSDSNVGY
GDSIAYGDSVAWYQQVPGTSPRTLIYDVTSRPSGVDRFSGSRSGTTATLTISGLQ
AEDEADYYCSSFDKTLNGLIVGGGTHLTVLG

表13

配列番号 : 124 (Ca-1207)

MTSNMAWSPILLTLAYCTGSWAQSALTPQTSVSGSLGQRVSISCSGGIHNIGSV
GATWYQQLPGKAPKLLYSSDGRPSGIPDRFSGSRSGNSVTLTITGLQAEDEAEY
YQSFDSLTVGVHVVFGGTHLTVLG

表13

配列番号 : 205 (Ca-1208)

LCSAVGPPKTESVMTSTMGWSPILLTLAHCAGSWAQSVLTPASVSGSLGQRV
TIPCTGSSSNIDRYNVAWVQQLPGTGPKPSVILLTDPOGSLIDSLAPSAAA

表13

配列番号 : 125 (Ca-1209)

MTSTMAWFPILLTLAIYTGSWARSDLTQASVSGSLGQRITISCTGSSSNIGRN
YVGWYQQLPGRGPRTVVYGINSRPSPVDRFSGSKSGSTVTLTISGLQAEDEADY
YCSTWDDSI.SVVVFGGTHLTVLG

表13

配列番号 : 126 (Ca-1210)

MTSTMGWSPILLTLHTWTSWAQSVLSPASMSGSLGLRITICGKNSNINNS
YVDWNQPLAGTGPRTVIHDDGDRPSGVDPDFSGSKSGNTATLTISRLQAEDEAD
YNGASFETSFNAVFGGTHVTVLG

【 図 8 8 - 2 】

表14

配列番号 : 132 (Ca Ka016-A6)

MRFPSSLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGESASISCKASQSLHSGGGT
YLNWFRQKPGQSPQRLIYVSKRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDTGIY
YCCQNTQLPLTFGQGTKVEIKR

表14

配列番号 : 133 (Ca Ka016-A7)

MRFPSSLGLLMLWIPGSGDIVMTQTPLSLSVSPGESASISCKASQSLHNSGNT
YLFWLRQKPGQSPQRLIYVSNRDPGVDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVY
YCCQVRVSPWTFGAGTKVEIKR

表14

配列番号 : 134 (Ca Ka016-A8)

MRFPSSLGLLMLWIPGSGDIVMTQTPLSLSVSPGESASISCKASQSLHNSGNT
YLYWFRQKPGQSPQRLIYVSNRDPGVDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVY
YCCQVIQDPWTFVGVGKLEIKR

表14

配列番号 : 135 (Ca Ka016-A9)

MRFPSSLGLLMLWIPGSSGDVMAQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLHNSGN
TFLFWFRQKPGQSPQRLINLNSRDPGVDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGL
YYCGQLQAPLTFGQGTKLEIKR

表14

配列番号 : 136 (Ca Ka016-A10)

MRFPSSLGLLMLWIPGSSGDVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLHNSGN
TYLSWVFRQKAGQSPQRLMYRVSRRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISGVEADDAG
IYYCCQATHYPLEFGQGTKVEIKR

【 図 8 8 - 1 】

Figure 88

イPBMC RNAに由来するイε軽鎖可変ドメイン配列

PBMC RNA

表14

配列番号 : 127 (Ca Ka016-A1)

LSWLRQKPGHSPQRLIHQVSSRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDGGVY
CGQGSQSIPTFGQGTKVEIKR

表14

配列番号 : 128 (Ca Ka016-A2)

MRFPSSLGLLMLWIPGAGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLHNSGNT
YLYWFRQKPGQSPQRLIYKVSNRDPGVDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVY
YCCQVIQDPWTFVGVGKLEIKR

表14

配列番号 : 129 (Ca Ka016-A3)

MRFPSSLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLHNSGKN
YLFWRQKPGQSPQRLIDLASNRDPGVDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVY
YCCQGMPIWTFGAGTKVELKR

表14

配列番号 : 130 (Ca Ka016-A4)

MKFPSSLGLLMLWIPGSGTEAVMTQTPLSLAVTPGEVATISCRASQSLHSDGK
SYLNWYLRQKPGQTPRPLIYEASKRFSVSDRFSGSGSGTDFTLKINRVEADVG
YCYCQSLHFPPTFGPGTKVELKR

表14

配列番号 : 131 (Ca Ka016-A5)

PDFRSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGIYCCQATQTPPTFGAGTKLDLKR

【 図 8 8 - 3 】

表14

配列番号 : 137 (Ca Ka016-A11)

LMLWIPGSGTEIVLIQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLHNPNGVYLYWFRQKPG
QSPQRLIYKVSNRDPGVDRFSGSGSEIDFTLIISRVEADDGGIYCCQGIQNPFTF
GQGTKLEIKR

表14

配列番号 : 138 (Ca Ka016-A12)

MRFPSSLGLLMLWIPGSGDIVMTQTPLSLSVSPGESASISCKASQSLHNSGNT
YLYWFRQKPGIISQRLIIHQVSSRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGL
YCCQGTQFPPTFGQGTKVEIKR

表14

配列番号 : 139 (Ca Ka016-B1)

MRFPSSLGLLMLWIPGSGDIVMTQTPLSLSVSPGESASISCKASQSLHNSGNT
YLYWFRQKPGHSPQRLIHQVSSRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGL
YCCQGTQFPPTFGQGTKVEIKR

表14

配列番号 : 140 (Ca Ka016-B2)

MRFPSSLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLHNSGNT
YSFWFRQKPGQSPQRLINLNSRDPGVDRFSGSGSGTDFTLISRVEADDAGVY
CGHGKEAPYTFGQGTKLEIKR

表14

配列番号 : 141 (Ca Ka016-B3)

MRFPSSLGLLMLWIPGSSGDIVMTQSPMSI.SVGPFSASMSCKANQSLIYSDGI
TYLSWFLQKPGQSPQRLIYEVSKRDTGVPDRFSGSGAGTDFTLRISRVEADDAG
YCYCQALQFPLTFGQGTKLEIKR

【 図 8 8 - 4 】

表14

配列番号 142 (Ca Ka016-B4)

MRFPSSLGLLMLWIPGSSGDVMTQTPLSLSVRPGETASISCRASQSLHSSGIT
KLFWYRQKPGQSPQRLVYVWSNRDPGVDRFSGSGSDFTLRISRLEADDAGI
YYCGIIAIGFPLTFGQGTKVEIKR

表14

配列番号 143 (Ca Ka016-B5)

MRFPSSLGLLMLWIPGSSGDVMTQTPLSLSVRPGESASISCKASQSLHSSGGT
YLNWFRQKPGQSPQRLIYVSKRDTGVPDRFSGSGSDFTLRISRVEADDAGIY
YCGQNTQFPLTFGQGTKVEIKR

表14

配列番号 144 (Ca Ka016-B6)

MRFPSSLGLLMLWIPGSSGDVMTQTPLSLSVRPGETASISCRASQSLLYSDGNT
YLFWFRQKPGQSPQRLMYRVSRRDTGVPDRFSGSGSDFTLTISGVEADDAGI
YYCGQATHYPLEFGQGTKVEIKR

表14

配列番号 145 (Ca Ka016-B7)

MRFPSSLGLLMLWIPGSSGDVMTQTPLSLSVRPGESASISCKASQSLHSSGGT
YLNWFRQKPGQSPQRLIYVSKRDTGVPDRFIGSGAGTDFTLRISRVEADDAGY
YCGQGVQGPWTIGAGTKLELQR

表14

配列番号 146 (Ca Ka016-B8)

MRFPSSLGLLMLWIPGSSGDVMTQTPLSLSVRPGETASISCKASQSLI.SHDGNT
YLHWFRQKPGQSPQRLIYVSNRDTGVPDRFSGSGSDFTLRISRVEADDAGIY
YYCGQITQDPFTFGQGTKLEIKR

【 図 8 8 - 6 】

表14

配列番号 152 (Ca Ka017-2)

MRFPSSLGLLMLWIPGSSGDVMTQTPPLSVSPREPASISCKASQSLRNSGNT
YLWYFRQKPGQSPQRLIYVSNRDTGVPDRFSGSGSDFTLRISRVEADDAGVY
YCGQATQFPSTFSQGTKLEIKR

表14

配列番号 153 (Ca Ka017-3)

MRFPSSLGLLMLWIPGSSGDVMTQTPPLSVSPGEPASISCKASQSLHNSGITY
LNWYFRQKPGQSPQRLIYVSNRDTGVPDRFSGSGSDFTLRXSKVEADDAGIY
YCGQDTQFPLTLGXGTHXEIKR

表14

配列番号 154 (Ca Ka017-5)

MRFPSSLGLLMLWIPGSSGDVMTQTPPLSVSPGEPASISCKASQSLHNSGNT
FLYWFRQKPGQSPQRLIYVSNRDTGVPDRFSGSGSDFTLRISRVEADDAGIY
YCGQGIQDPTFGQGTKVEIKR

表14

配列番号 155 (Ca Ka017-6)

MRFPSSLGLLMLWIPGSSGDVMTQTPPLSVSPREASISCKASQSLKNSGNT
YFYWFRQKPGQVSEGLIYKVSRRFTGVPDRFSGSGSDFTLRISRVEADDAGVY
FCGQALQFPYTFSGTKLDIKR

表14

配列番号 156 (Ca Ka017-10)

MRFPSSLGLLMLWIPGSSGDVMTQTPPLSVSPGFTASISCKASRSI.LNSDGST
YLDWYLQKPGQSPRLIYVSNRFGVSDRFSGSGSDFTLRISRVEADDAGVY
YCGQGSRVPLTFGQGTKVEIKR

【 図 8 8 - 5 】

表14

配列番号 147 (Ca Ka016-B9)

MRFPSSLGLLMLWIPGSSGDVMTQTPPLSVSPGETASISCRASQSLHNSGNT
YLFWFRQKPGQSPQRLINWVSNRDPGVDRFSGSGSDFTLRISRVEADDAGIY
YCGQGIQGPYTFSGQGTKLEIKR

表14

配列番号 148 (Ca Ka016-B10)

MRFPSSLGLLMLWIPGSSGDVMTQTPPLSVSPGEPASISCKASQSLHNSGNT
YLFWFRQKPGQSPQRLIYVSNRDPGVDRFSGSGSDFTLRISRVEADDAGIY
YCGQATQTPPTFGAGTKLDLKR

表14

配列番号 149 (Ca Ka016-B11)

MRFPSSLGLLMLWIPGSSGDVMTQTPPLSVSPGEPASISCKASQSLIISDGRT
CLSWFRQKSGQSPQRLIYVSNRDTGVPDRFSGSGSDFTLRISRVEADDAGIY
CGQTVQFPLTFGQGTKLEIKR

表14

配列番号 150 (Ca Ka016-B12)

GQSPQRLIYKVSNRDPGVDRFSGSGSDFTLRISRVEPEDVGVYCGQGLN
WTFGAGTKVELKR

表14

配列番号 151 および配列番号210 (Ca Ka017-1)

MRFPSSLGLLMLWIPGSSGDVMTQTPPLSVSPGEPASISCRASQSLHNSGN
TFLWFRQKPGQSPQRLINWVSNRDPGVDRFSGSGSDFTLRISRVEADDAGIY
YCGQGLLAPPTFGQGTKVEIKR 注記: *は、停止を示す

【 図 8 8 - 7 】

表14

配列番号 157 (Ca Ka017-11)

MRFPSSLGLLMLWIPGSSGDVMTQTPPLSVSPGEPASISCRASQSLHRNGIT
YLSWFRQKPGQSPQRLINWVSNRDPGVDRFSGSGSDFTLRISRVEADDAGVY
YCGHGLQTPYTFGQGTKLEIKR

表14

配列番号 158 (Ca Ka017-12)

MRFPSSLGLLMLWIPGSSGDVMTQTPPLSVSPGEPASISCRASQSLHNSGNT
LFWFRKPGQSPQRLINWVSNRDPGVDRFSGSGSDFTLRISRVEADDAGVY
CGQGTQPPYTFSGQGTKVEIKR

表14

配列番号 159 (Ca Ka017-13)

MRFPSSLGLLMLWIPGSSGDVMTQTPPLSVSPGEPASISCKASRLLNSDGST
YLDWYLQKPGQSPRLIYVSNRFGVSDRFSGSGSDFTLRISRVEADDAGVY
YCGQGSRVPLTFGQGTKVEIKR

表14

配列番号 160 (Ca Ka017-14)

MRFPSSLGLLMLWIPGSSGDVMTQTPPLSVSPGEPASISCRASQSLHNSGNT
YLFWYRQKPGQSPQRLISMVFNDRDPGVDRFSGSGSDFTLRISRVEADDAGL
YFCGHGTQIPYFSQGTKLEIKR

表14

配列番号 161 (Ca Ka017-16)

MRFPSSLGLLMLWIPGSSGDVMTQTPPLSVSPGEPASISCKASQSLHSSGGDTY
LNWFRQKPGQSPQLINRVSRRKGVDRFSGSGSDFTLRISRVEADDAGIYFC
GQGTQFPYTFSGQGTKLEIKR

【 図 8 8 - 8 】

表14

配列番号 : 162 (Ca Ka017-20)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSGGDIVMTQTTPPSLSVSPGEPASMSCKASQSLHLSNGN
TYLYWFRQKPGQSPALIKVSNRFTGVSDRFSGSGSGTDFTLRINRVEADDVGV
YYCGQGIQIPYTFSGQTKLEIKR

表14

配列番号 : 163 (Ca Ka017-23)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSTGDIIVLTQTPLSLSVSPGESASISCKASQSLHLSNGNT
YLYWFRQKAGQSPQRVIYRVSNRDPGVDRFSGSGSGTDFTLRISSEVENDDAGV
YYCGQGSSEDPPTFGAGTKVELKR

表14

配列番号 : 164 (Ca Ka017-24)

MRFPSQLLGLLTLWIPGSTGDIIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLHLSNGNT
YLYWFRQKPGQSPQRVIYRVSNRDPGVDRFSGSGSGTDFTLRVSVXVEADDAGV
YYCGQGVQDPPTFGQTKLEIKR

【 図 8 9 - 1 】

Figure 89

ヒトIgG4-47-47上にCDRがラットされたマウス抗NGF mAb (CDRがラット化抗NGF Ab) : CDR1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)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYDMFVWRQATGKGLVWVSTISD
GGSYTYITDNLVGRFTISRDKAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCARDWSDSEGE
AYWGQGLTVTVSS

表15

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

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGRI
DPYGGGTHNEKFKRRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSGYDY
FDVWGQGLTVTVSS

表15

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

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFNIKDTIYIYVWRQAPGQGLEWMGRIDP
ANGNTIYASKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSRSEDVAVYYCARYGYAYYWG
QGTITVTVSS

表15

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

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNIKDTIYIYVWRQAPGQGLEWMGRIDP
ANGNTIYASKFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSIRSDDTAVYYCARYGYAYYWG
QGTITVTVSS

【 図 8 9 - 2 】

表15

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNHYMYVWRQAPGKLEWVGSISD
GGAYTFYPTIVKGRFTISRDKAKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTEESANNGEA
FWGQGLTVTVSS

表15

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

QVTLKESGPVIVKPTETLTLCTVSGFSLTGYNINWIRQPPGKALEWLAAMIWGY
GDTIDYNSALKSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATYVCARDHYGGNDWY
FDVWGQGLTVTVSS

表15

配列番号 : 171 HU72 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIQVQSNQNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKY
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFGQGTKLEIK
R

表15

配列番号 : 172 HU73 VL (CDR-GRAFT L22/JK2)

DIQMIQSPSFLSASVGDVRSIICRASENYSFLAWYLQKPGKSPKFLYANANTLAE
GVSSRFSGRSGTDFTLTIISLKPEDFAAYYCCQIHFGTPTETFGQGTKLEIKR

表15

配列番号 : 173 HU77 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCKSTKSLINGDGFTYLDWYIYKPGQSPQLLIYLY
SNRISGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFESNYLFTFGQGTKLEIKR

【 図 8 9 - 3 】

表15

配列番号 : 174 HU80 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCKSTKSLINGDGFTYLDWYIYKPGQSPQLLIYLY
SNRISGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFESNYLFTFGQGTKLEIKR

表15

配列番号 : 175 HU81 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIQVQSNQNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYRVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGAHVPVPTFGQGTKLEIK
R

表15

配列番号 : 176 HU82 VL (CDR-GRAFT 08/JK2)

DIQMTQSPSSLSASVGDVRSITICRASQDITNYLNWYQQKPKGAPKLLIYYTSRLH
SGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDIAITYCCQGGKTLPRVTFGQGTKLEIKR

【 図 9 0 - 1 】

Figure 90

702/4特許抗体配列

表15A

PR-1290646 軽鎖73/酸配列 (配列番号 :194)

DVLMQTPLSLPVSLGDAQISCRSSOSIVQSNQNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHTVPTFGSGTKLEIK
RNDAAQPAVYLFQPSDQLHTGSASVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQE
SVTEQDKDSTYLSSTLMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD
(配列番号 :194)

表15A

PR-1290646 重鎖73/酸配列 (配列番号 :195)

EVILVESGGGLVKGPGFLJLSCAASGFTTSDYVMFWIRQTPGKRLEWVATISDGG
SYTYITDNVKGRTISRDNVNNLYLQMSHLKSSADTAMYCARDWSDSEGEA
YWGQGLTVVSAASTTAPSVFPLAPSCGSGTVALACLVSQYFPEPVTVSWNS
GSLTSGVHTFPPSVLQSSGLHLSLMMVTPSSRWPESETFTCNVHHPASNTKVDKPV
VFNECRCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFFPKPKDILRITRTPVETCVVLDLGREDPVQI
SWFVDGKEVHTAKTQSRQQFNGTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIDL
SPIERTISKARGRAHKPSVYVLPSPKELSSDTSITCLIKDFYPPDIDVEWQSN
GQEPERKHRMTPPQLDEDEGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHETLQNH
YTDLSLSHSPGK (配列番号 :195)

表15A

PR-1290654 軽鎖73/酸配列 (配列番号 :196)

DIQMTQSPASISASVGETIVTTCRASENIYSLAWHQKQKSPQILVYNNANTL
AEGVPSRFSGSGSGTDFSLKINLQPEDFGSYQCQHFEGTPTFGSGTKLEIKRND
AQPAVYLFQPSDQLHTGSASVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTE
QDKDSTYLSSTLMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD (配列
番号 :196)

【 図 9 0 - 3 】

表15A

PR-1290657 軽鎖73/酸配列 (配列番号 :200)

DVLMQTPLSLPVSLGDAQISCRSSQILHSGNNTYLEWYLQKPGQSPNLLIYRV
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCQGAHIVPTFGSGTKLEIK
RNDAAQPAVYLFQPSDQLHTGSASVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQE
SVTEQDKDSTYLSSTLMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD
(配列番号 :200)

表15A

PR-1290657 重鎖73/酸配列 (配列番号 :201)

EVQLVESGGGAVKPGGSLTSCAASGFTFSNHYMYWVRQTPEKRLEWVASISD
GGAYIFYPDIVKGRFTISRDNVNNLYLQMRHLKSEDTAMYCYCTREESANNGE
AFWGQGLTVVSAASTTAPSVFPLAPSCGSGTVALACLVSQYFPEPVTVSWN
SGSLTSGVHTFPPSVLQSSGLHLSLMMVTPSSRWPESETFTCNVHHPASNTKVDK
PVFNECRCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFFPKPKDILRITRTPVETCVVLDLGREDP
VQISWFDGKEVHTAKTQSRQQFNGTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHID
LPSPIERTISKARGRAHKPSVYVLPSPKELSSDTSITCLIKDFYPPDIDVEWQSN
GQEPERKHRMTPPQLDEDEGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHETLQNH
YTDLSLSHSPGV (配列番号 :201)

表15A

PR-1290658 軽鎖73/酸配列 (配列番号 :202)

DIQMTQTTSSLSASLGDRTITCRASODITNYLNWYQKPDGTVKLLIYYSRLH
SGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLDQEDIATYFCQOGKTLRPTFGGKTKLEIKRND
AQPAVYLFQPSDQLHTGSASVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQ
DKDSTYLSSTLMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD (配列番号
:202)

【 図 9 0 - 2 】

表15A

PR-1290654 重鎖73/酸配列 (配列番号 :197)

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFITNYWMHWVKRQPGGLEWIGRIDP
YGGGTKHNEKFKRKAIVTADKSSSTAYILLSSLTSEDSAVYYCTRSQYDYEDV
WGTGTTVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSGTVALACLVSQYFPEPVTVSWNSG
SLTSGVHTFPPSVLQSSGLHLSLMMVTPSSRWPESETFTCNVHHPASNTKVDKPV
FNECRCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFFPKPKDILRITRTPVETCVVLDLGREDPVQIS
WFVDGKEVHTAKTQSRQQFNGTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIDLPS
PIERTISKARGRAHKPSVYVLPSPKELSSDTSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNQ
QEPERKIIRMTTPQLDEDEGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHETLQNIHY
TDLSSLHSPGV (配列番号 :197)

表15A

PR-1290656 軽鎖73/酸配列 (配列番号 :198)

DVVLQTPLSLPVNIGDQASISCKSTKSLNNGDGFITYLDWYLQKPGQSPQLLIYL
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFESNYLFTFGSGTKLEM
KRNDAAQPAVYLFQPSDQLHTGSASVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQ
ESVTEQDKDSTYLSSTLMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD
(配列番号 :198)

表15A

PR-1290656 重鎖73/酸配列 (配列番号 :199)

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIYVVKRQPEQGLEWIGRIDPAN
GNTIYASKFQGKASITADTSNTAYMQLSSLTSGDTAVVYCAAGYGYAYWGQG
TTLTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSGTVALACLVSQYFPEPVTVSWNSGSLTSG
VHTFPPSVLQSSGLHLSLMMVTPSSRWPESETFTCNVHHPASNTKVDKPVFNECR
CTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFFPKPKDILRITRTPVETCVVLDLGREDPVQISWFD
GKEVHTAKTQSRQQFNGTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIDLPSPIERT
ISKARGRAHKPSVYVLPSPKELSSDTSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNQQEPER
KHRMTPPQLDEDEGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHETLQNHYTDLSSL
HSPGK (配列番号 :199)

【 図 9 0 - 4 】

表15A

PR-1290658 重鎖73/酸配列 (配列番号 :203)

QVQLKESGPGLVAPSQSLFITCVSGFSLIGYININWVRQPPGKGLEWLGMIWGY
GDTDYNSALKSRLSISKDNKSQVFLKMNLSQTDDTARYYCARDHYGGNDWYF
DYWGTGTTVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSGTVALACLVSQYFPEPVTVSWN
SGSLTSGVHTFPPSVLQSSGLHLSLMMVTPSSRWPESETFTCNVHHPASNTKVDK
PVFNECRCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFFPKPKDILRITRTPVETCVVLDLGREDP
VQISWFDGKEVHTAKTQSRQQFNGTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHID
LPSPIERTISKARGRAHKPSVYVLPSPKELSSDTSITCLIKDFYPPDIDVEWQSN
GQEPERKIIRMTTPQLDEDEGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHETLQNH
YTDLSLSHSPGV (配列番号 :203)

【配列表】

2017176178000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年4月28日(2017.4.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

神経増殖因子(NGF)に特異的に結合する単離された抗原結合タンパク質であって、

(a)

(i) 配列番号61のアミノ酸配列を含むCDR1；

(ii) 配列番号62のアミノ酸配列を含むCDR2；および

(iii) 配列番号63のアミノ酸配列を含むCDR3；

を含む、重鎖可変領域(VH)、並びに

(b)

(i) 配列番号64のアミノ酸配列を含むCDR1；

(ii) 配列番号65のアミノ酸配列を含むCDR2；および

(iii) 配列番号66のアミノ酸配列を含むCDR3；

を含む、軽鎖可変領域(VL)、

を含む、前記抗原結合タンパク質。

【請求項2】

抗原結合タンパク質が、NGFの生物学的機能を低減、阻害、または中和する、請求項1に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項3】

抗原結合タンパク質が、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、単ドメイン抗体、CDRグラフト化抗体、ダイアボディー、ヒト化mAb、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'、二重特異性抗体、F(ab')₂およびFvからなる群より選択される、請求項1または請求項2に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項4】

抗原結合タンパク質が、モノクローナル抗体である、請求項3に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項5】

抗原結合タンパク質が、イヌ化mAbである、請求項3に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項6】

抗原結合タンパク質が、ヒト化mAbである、請求項3に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項7】

治療上有効な量の請求項1から6のいずれか一項に記載の抗原結合性タンパク質、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。

【請求項8】

非ヒト対象におけるNGFを阻害する方法であって、請求項7に記載の組成物を非ヒト対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項9】

NGF関連障害を患っている非ヒト対象におけるNGF活性を低減させる方法であって、請求項7に記載の組成物を非ヒト対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項10】

非ヒト対象が、イヌまたはネコを含む、請求項 8 または 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】

対象における N G F を阻害するための、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 2】

N G F 関連障害を患っている対象における N G F 活性を低減させるための、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 3】

対象が、ヒト、イヌまたはネコを含む、請求項 1 1 または 1 2 に記載の医薬組成物。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/14	(2006.01)	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 K 47/10	(2006.01)	A 6 1 K 47/14	
A 6 1 K 47/18	(2006.01)	A 6 1 K 47/10	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	A 6 1 K 47/18	
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	N
		C 1 2 P 21/08	

- (72)発明者 メア・チャーヤ
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01545、シユルーズベリー、ピターズスイート・サークル・12
- (72)発明者 エマ・ファン
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01532、ノースバラ、ストラットン・ウェイ・31
- (72)発明者 チャールズ・ダブリユ・ハツチンス
アメリカ合衆国、イリノイ・60048、グリーン・オックス、プレイリー・リッジ・ウェイ・31005
- (72)発明者 ダイアン・エム・ラング
アメリカ合衆国、ロード・アイランド・02832、ホープ・バレー、ガーネット・レイン・5
- (72)発明者 イブ・エイチ・バーロウ
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02481、ウエルスレイ、ジエフアーンソン・ロード・4
- (72)発明者 メアリー・レディー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02760、ノース・アトルボロ、ピーターズ・ウェイ・72
- (72)発明者 ラビ・チャーリ
アメリカ合衆国、コネチカット・06360、ノーウイツチ、ギフオード・ストリート・72

F ターム(参考) 4B064 AG27 BH07 CA10 CA19 CA20 CC03 CC06 CC12 CC15 CC24
CD21 CE03 CE06 CE10 CE12 DA01 DA13
4C076 AA94 BB13 BB16 CC03 DD37R DD44R FF31 FF39
4C085 AA13 AA14 EE01 GG02 GG04
4H045 AA11 AA30 DA76 EA20 EA50 FA74 GA10 GA15 GA21 GA26

专利名称(译)	抗ngf抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2017176178A	公开(公告)日	2017-10-05
申请号	JP2017065029	申请日	2017-03-29
[标]申请(专利权)人(译)	佐伊·贝尔塞维利亚ES果酱啊		
申请(专利权)人(译)	Zoetisu-Berujamu上课啊		
[标]发明人	スーザンイーレイシー ジエフリーエイバーボン メアチャーヤ エマフアン チャールズダブリユハツチンス ダイアンエムラング イブエイチパーロウ メアリーレディー ラビチャーリ		
发明人	スーザン・イー・レイシー ジエフリー・エイ・バーボン メア・チャーヤ エマ・フアン チャールズ・ダブリユ・ハツチンス ダイアン・エム・ラング イブ・エイチ・パーロウ メアリー・レディー ラビ・チャーリ		
IPC分类号	C12N15/02 C07K16/22 A61K39/395 A61P43/00 A61P25/04 A61K47/14 A61K47/10 A61K47/18 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	A61P19/02 A61P25/04 A61P29/00 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.C C07K16/22 A61K39/395.N A61K39/395.D A61P43/00.111 A61P25/04 A61K47/14 A61K47/10 A61K47/18 G01N33/53.N C12P21/08 C12N15/00.C C12N15/00.CZN.A		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/BH07 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC03 4B064/CC06 4B064/CC12 4B064/CC15 4B064/CC24 4B064/CD21 4B064/CE03 4B064/CE06 4B064/CE10 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4C076/AA94 4C076/BB13 4C076/BB16 4C076/CC03 4C076/DD37R 4C076/DD44R 4C076/FF31 4C076/FF39 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG04 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA10 4H045/GA15 4H045/GA21 4H045/GA26		
优先权	61/375193 2010-08-19 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

如疼痛甲NGF活性旨在用于哺乳动物的病症，其是有害的痛苦，处理是指用于抑制NGF，还组合物用于治疗与增加的NGF水平相关的疾病目的和方法，以及检测NGF的方法。的小鼠抗NGF抗体通过CDR移植来制备，mammalized，特别caninized，人源化抗体。背景技术

Figure 1

抗抗NGF抗体

配列番号1 (PR-1254972VH3d1序列)

GAAGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTTCC
TGATACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTGACTATTACATGTTT
GGATTCGCCAGACTCCGGAAAGAGGCTGGAGTGGTCGCAACCATTAGTGA
TGGTGGTAGTTACACCTACTACACAGACAATGTAAGGGCCGATTACCATC
TCCAGAGACAATGTCAAGAACAACCTGTACCTGCAAAATGAGCCAATCTGAAGT
CTGCGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGATTGGAGTGACTCCGAGGG
GTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA