

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-521461  
(P2015-521461A)

(43) 公表日 平成27年7月30日(2015.7.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 16/22 (2006.01)	C07K 16/22	4B065
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4C085
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4H045
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 102 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-516189 (P2015-516189)  
 (86) (22) 出願日 平成25年6月6日 (2013.6.6)  
 (85) 翻訳文提出日 平成27年2月4日 (2015.2.4)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/044430  
 (87) 国際公開番号 W02013/184871  
 (87) 国際公開日 平成25年12月12日 (2013.12.12)  
 (31) 優先権主張番号 61/656,056  
 (32) 優先日 平成24年6月6日 (2012.6.6)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 512261355  
 ゼエティス・エルエルシー  
 アメリカ合衆国ニュージャージー州079  
 32, フローラム・パーク, キャンパス・  
 ドライブ 100  
 (74) 代理人 100140109  
 弁理士 小野 新次郎  
 (74) 代理人 100075270  
 弁理士 小林 泰  
 (74) 代理人 100101373  
 弁理士 竹内 茂雄  
 (74) 代理人 100118902  
 弁理士 山本 修  
 (74) 代理人 100107386  
 弁理士 泉谷 玲子

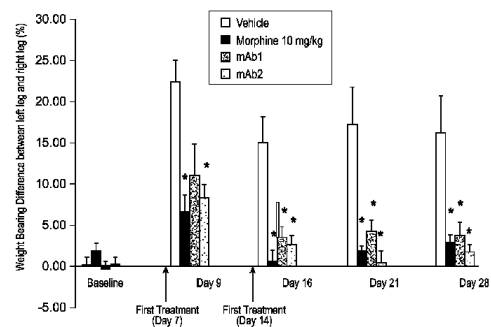
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イヌ化抗NGF抗体およびその方法

(57) 【要約】

本発明は、新規なイヌ化抗NGF抗体（イヌ化抗NGFアンタゴニスト抗体および抗原結合タンパク質など）、およびそれらをコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明はさらに、NGF関連障害、特に痛みの治療および/または予防におけるこの抗体または抗原結合タンパク質および/またはヌクレオチドの使用を提供する。  
 【選択図】 なし

FIG. 18



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

アミノ酸配列 L I G Y D I N (配列番号 1) ; L I Q Y D I N (配列番号 7) または L I E Y D I N (配列番号 8) を有する相補性決定領域 1 ( C D R 1 ) を備える可変重鎖 ( V H ) ;

アミノ酸配列 M I W G D G T T D Y N S A L K S (配列番号 2) ; または M I W G T G T T D Y N S A L K S (配列番号 13) を有する相補性決定領域 2 ( C D R 2 ) を備える可変重鎖 ( V H ) ;

アミノ酸配列 G G Y Y Y G T S Y Y F D Y (配列番号 3) ; または G G Y W Y A T S Y Y F D Y (配列番号 9) を有する相補性決定領域 3 ( C D R 3 ) を備える可変重鎖 ( V H ) ; および

C D R 1、C D R 2、または C D R 3 の少なくとも 1 つにおける 1 つ以上の保存性アミノ酸置換を有するこれらの変異型

からなる群より選択される少なくとも 1 つの相補性決定領域 ( C D R ) を備えるイヌ神経成長因子 ( N G F ) に特異的に結合する、単離されたイヌ化抗原結合タンパク質。

## 【請求項 2】

アミノ酸配列 R A S Q D I S N H L N (配列番号 4) ; または R A S Q S I S N N L N (配列番号 10) を有する相補性決定領域 1 ( C D R 1 ) を備える可変軽鎖 ( V L ) ;

アミノ酸配列 Y I S R F H S (配列番号 5) または Y I S S F H S (配列番号 11) を有する相補性決定領域 2 ( C D R 2 ) を備える可変軽鎖 ( V L ) ;

アミノ酸配列 Q Q S K T L P Y T (配列番号 6) または Q Q S H T L P Y T (配列番号 12) を有する相補性決定領域 3 ( C D R 3 ) を備える可変軽鎖 ( V L ) ; および

C D R 1、C D R 2、または C D R 3 の少なくとも 1 つにおける 1 つ以上の保存性アミノ酸置換を有するこれらの変異型

からなる群より選択される少なくとも 1 つの相補性決定領域 ( C D R ) を備えるイヌ神経成長因子 ( N G F ) に特異的に結合する、単離されたイヌ化抗原結合タンパク質。

## 【請求項 3】

アミノ酸配列 L I G Y D I N (配列番号 1) ; L I Q Y D I N (配列番号 7) または L I E Y D I N (配列番号 8) を有する相補性決定領域 1 ( C D R 1 ) を備える可変重鎖 ( V H ) ;

アミノ酸配列 M I W G D G T T D Y N S A L K S (配列番号 2) ; または M I W G T G T T D Y N S A L K S (配列番号 13) を有する相補性決定領域 2 ( C D R 2 ) を備える可変重鎖 ( V H ) ;

アミノ酸配列 G G Y Y Y G T S Y Y F D Y (配列番号 3) ; または G G Y W Y A T S Y Y F D Y (配列番号 9) を有する相補性決定領域 3 ( C D R 3 ) を備える可変重鎖 ( V H ) ; および

C D R 1、C D R 2、または C D R 3 の少なくとも 1 つにおける 1 つ以上の保存性アミノ酸置換を有するこれらの変異型

からなる群より選択される少なくとも 1 つの相補性決定領域をさらに備える、請求項 2 に記載のイヌ化抗原結合タンパク質。

## 【請求項 4】

E V Q L V E S G G D L A R P G G S L K L S C V V S G F S L I G Y D I N W V R Q  
A P G K G L Q W V T M I W G D G T T D Y N S A L K S R F T V S R D N A M N T V Y  
L Q M N S L R V E D T A V Y Y C A R G G Y Y Y G T S Y Y F D Y W G Q G T L V T V  
S S ( S E Q I D N O : 17 : C A N - N 2 G 9 - V H ) ;

E V Q L V E S G G D L A R P G G S L K L S C V V S G F S L I G Y D I N W V R Q  
A P G K G L Q W V T M I W G D G T T D Y N S A L K S R F T V S R D N A M N T V Y  
L Q M N S L R V E D T A V Y Y C A R G G Y W Y A T S Y Y F D Y W G Q G T L V T V  
S S ( S E Q I D N O : 25 : C A N - L T M 109 - V H ) ;

E V Q L V E S G G D L A R P G G S L K L S C V V S G F S L I Q Y D I N W V R Q

10

20

30

40

50

A P G K G L Q W V T M I W G D G T T D Y N S A L K S R F T V S R D N A M N T V Y  
L Q M N S L R V E D T A V Y Y C A R G G Y W Y A T S Y Y F D Y W G Q G T L V T V  
S S ( S E Q I D N O : 2 7 : C A N - S S M 5 7 - V H ) ;

E V Q L V E S G G D L A R P G G S L K L S C V V S G F S L I E Y D I N W V R Q  
A P G K G L Q W V T M I W G D G T T D Y N S A L K S R F T V S R D N A M N T V Y  
L Q M N S L R V E D T A V Y Y C A R G G Y W Y A T S Y Y F D Y W G Q G T L V T V  
S S ( S E Q I D N O : 2 8 : C A N - S S M 5 8 - V H ) ;

E V Q L V E S G G D L A R P G G S L K L S C V V S G F S L I E Y D I N W V R Q  
A P G K G L Q W V T M I W G T G T T D Y N S A L K S R F T V S R D N A M N T V Y  
L Q M N S L R V E D T A V Y Y C A R G G Y W Y A T S Y Y F D Y W G Q G T L V T V  
S S ( S E Q I D N O : 2 9 : C A N - S S M 6 6 - V H ) ;

10

および

1つ以上の保存性アミノ酸置換を有するこれらの変異型  
からなる群より選択される可変重鎖を備えるイヌ神経成長因子(NGF)に特異的に結合  
する、単離されたイヌ化抗原結合タンパク質。

【請求項5】

D I V M T Q T P L S L S V S P G E T A S I S C R A S Q D I S N H L N W F R Q K  
P G Q S P Q R L I Y Y I S R F H S G V P D R F S G S G S G T D F T L R I S R V E  
A D D T G V Y Y C Q Q S K T L P Y T F G A G T K L E I K ( S E Q I D N O . 1  
6 : C A N - E 3 M - V L ) ;

20

D I V M T Q T P L S L S V S P G E P A S I S C R A S Q D I S N H L N W F R Q K  
P G Q S P Q R L I Y Y I S R F H S G V P S R F S G S G S G T D F T L R I S R V E  
A D D A G V Y Y C Q Q S K T L P Y T F G Q G T K L E I K ( S E Q I D N O . 1  
8 : C A N - 6 1 8 - V L ) ;

D I V M T Q T P L S L S V S P G E P A S I S C R A S Q D I S N H L N W F R Q K  
P D G T V K L L I Y Y I S R F H S G V P S R F S G S G S G T D F T L R I S R V E  
A D D A G V Y Y C Q Q S K T L P Y T F G Q G T K L E I K ( S E Q I D N O . 1  
9 : C A N - Q C 2 3 - V L ) ;

D I V M T Q T P L S L S V S P G E P A S I S C R A S Q D I S N H L N W Y Q Q K  
P D G T V K L L I Y Y I S R F H S G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I S N L E  
Q E D I A T Y F C Q Q S K T L P Y T F G G G T K L E I ( S E Q I D N O . 2 0  
: C A N - 6 1 8 F W 1 - V L ) ;

30

D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S C R A S Q D I S N H L N W F R Q K  
P G Q S P Q R L I Y Y I S R F H S G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I S N L E  
Q E D I A T Y F C Q Q S K T L P Y T F G G G T K L E I ( S E Q I D N O . 2 1  
: C A N - 6 1 8 F W 2 - V L ) ;

D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S C R A S Q D I S N H L N W Y Q Q K  
P D G T V K L L I Y Y I S R F H S G V P S R F S G S G S G T D F T L R I S R V E  
A D D A G V Y Y C Q Q S K T L P Y T F G G G T K L E I ( S E Q I D N O . 2 2  
: C A N - 6 1 8 F W 3 - V L ) ;

40

D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S C R A S Q D I S N H L N W Y Q Q K  
P D G T V K L L I Y Y I S R F H S G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I S N L E  
Q E D I A T Y F C Q Q S K T L P Y T F G Q G T K L E I ( S E Q I D N O . 2 3  
: C A N - 6 1 8 F W 4 - V L ) ;

D I V M T Q T P L S L S V S P G E T A S I S C R A S Q S I S N N L N W F R Q K  
P G Q S P Q R L I Y Y I S R F H S G V P D R F S G S G S G T D F T L R I S R V E  
A D D T G V Y Y C Q Q S H T L P Y T F G A G T K L E I K ( S E Q I D N O . 2  
4 : C A N - L T M 1 0 9 - V L ) ;

D I V M T Q T P L S L S V S P G E T A S I S C R A S Q S I S N N L N W F R Q K  
P G Q S P Q R L I Y Y I S S F H S G V P D R F S G S G S G T D F T L R I S R V E

50

A D D T G V Y Y C Q Q S H T L P Y T F G A G T K L E I K ( S E Q I D N O . 2  
6 : C A N - S S M E 3 M - V L ) ;

D I V M T Q T P L S L S V S P G E P A S I S C R A S Q S I S N N L N W F R Q K  
P D G T V K L L I Y Y I S S F H S G V P S R F S G S G S G T D F T L R I S R V E  
A D D A G V Y Y C Q Q S H T L P Y T F G Q G T K L E I K ( S E Q I D N O . 3  
0 : C A N - S S M Q C 2 3 - V L ) ;

および

1つ以上の保存性アミノ酸置換を有するこれらの変異型  
からなる群より選択される可変軽鎖を備えるイヌ神経成長因子 ( N G F ) に特異的に結合  
する、単離されたイヌ化抗原結合タンパク質。

10

【請求項6】

E V Q L V E S G G D L A R P G G S L K L S C V V S G F S L I G Y D I N W V R Q  
A P G K G L Q W V T M I W G D G T T D Y N S A L K S R F T V S R D N A M N T V Y  
L Q M N S L R V E D T A V Y Y C A R G G Y Y Y G T S Y Y F D Y W G Q G T L V T V  
S S ( S E Q I D N O : 1 7 : C A N - N 2 G 9 - V H ) ;

E V Q L V E S G G D L A R P G G S L K L S C V V S G F S L I G Y D I N W V R Q  
A P G K G L Q W V T M I W G D G T T D Y N S A L K S R F T V S R D N A M N T V Y  
L Q M N S L R V E D T A V Y Y C A R G G Y W Y A T S Y Y F D Y W G Q G T L V T V  
S S ( S E Q I D N O : 2 5 ; C A N - L T M 1 0 9 - V H ) ;

E V Q L V E S G G D L A R P G G S L K L S C V V S G F S L I Q Y D I N W V R Q  
A P G K G L Q W V T M I W G D G T T D Y N S A L K S R F T V S R D N A M N T V Y  
L Q M N S L R V E D T A V Y Y C A R G G Y W Y A T S Y Y F D Y W G Q G T L V T V  
S S ( S E Q I D N O : 2 7 ; C A N - S S M 5 7 - V H ) ;

20

E V Q L V E S G G D L A R P G G S L K L S C V V S G F S L I E Y D I N W V R Q  
A P G K G L Q W V T M I W G D G T T D Y N S A L K S R F T V S R D N A M N T V Y  
L Q M N S L R V E D T A V Y Y C A R G G Y W Y A T S Y Y F D Y W G Q G T L V T V  
S S ( S E Q I D N O : 2 8 ; C A N - S S M 5 8 - V H ) ;

E V Q L V E S G G D L A R P G G S L K L S C V V S G F S L I E Y D I N W V R Q  
A P G K G L Q W V T M I W G T G T T D Y N S A L K S R F T V S R D N A M N T V Y  
L Q M N S L R V E D T A V Y Y C A R G G Y W Y A T S Y Y F D Y W G Q G T L V T V  
S S ( S E Q I D N O : 2 9 ; C A N - S S M 6 6 - V H ) ;

30

および

1つ以上の保存性アミノ酸置換を有するこれらの変異型  
からなる群より選択される少なくとも1つをさらに備える、請求項5に記載の単離された  
抗原結合タンパク質。

【請求項7】

可変軽鎖が配列番号16 ( C A N - E 3 M - V L ) を備え、可変重鎖が配列番号17 ( C A N - N 2 G 9 - V H ) を備える、請求項6に記載の単離された抗原結合タンパク質。

【請求項8】

可変軽鎖が配列番号26 ( C A N - S S M E 3 M - V L ) を備え、可変重鎖が配列番号  
27 ( C A N - S S M 5 7 - V H ) を備える、請求項6に記載の単離された抗原結合タン  
パク質。

40

【請求項9】

可変軽鎖が配列番号30 ( C A N - Q C 2 3 - V L ) を備え、可変重鎖が配列番号27  
( C A N - S S M 5 7 - V H ) を備える、請求項6に記載の単離された抗原結合タンパク  
質。

【請求項10】

請求項1~9のいずれか1項に記載のイヌ化抗原結合タンパク質であって、前記抗原結  
合タンパク質が、モノクローナル抗体；キメラ抗体、単鎖抗体、四量体抗体、四価抗体、  
多特異的抗体、ドメイン特異的抗体、ドメイン欠失抗体、融合タンパク質、S c F c 融合

50

タンパク質、F a bフラグメント、F a b'フラグメント、F ( a b' )<sub>2</sub>フラグメント、F vフラグメント、S c F vフラグメント、F dフラグメント、単ドメイン抗体、d A bフラグメント、小モジュール免疫医薬 ( S M I P )、ナノボディ、およびI g N A R分子からなる群より選択される、イヌ化抗原結合タンパク質。

【請求項 1 1】

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 1 0 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 1 2】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質を産生する宿主細胞。

【請求項 1 3】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の治療有効量のイヌ化抗原結合タンパク質、および薬学的に受容可能なキャリアを備える、獣医学用組成物。

10

【請求項 1 4】

治療有効量の請求項 1 1 に記載の獣医学用組成物を投与する工程を備える、N G F 関連障害についてイヌを治療する方法。

【請求項 1 5】

N G F 関連障害状態が、循環器疾患、アテローム性動脈硬化症、肥満、2 型糖尿病、代謝症候群、痛み、および炎症からなる群より選択される、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

N G F 関連障害状態が痛みである、請求項 1 5 に記載の方法。

20

【請求項 1 7】

請求項 1 6 に記載の方法であって、痛みの型が、慢性の痛み、炎症性の痛み、手術切開後の痛み、神経障害の痛み、骨折の痛み、骨粗しょう症骨折の痛み、ヘルペス後神経痛、癌の痛み、熱傷から生じる痛み、創傷と関連する痛み、外傷と関連する痛み、神経障害の痛み、関節リウマチ、骨関節炎、強直性脊椎炎、血清陰性 ( 非リウマチ ) 関節症、非関節リウマチおよび関節周囲障害などの筋骨格障害と関連する痛み、ならびに末梢神経障害からなる群より選択される、方法。

【請求項 1 8】

痛みが骨関節炎の痛みである、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

配列番号 3 2 ( M U - R N 9 1 1 - V H n t ) ; 配列番号 3 4 ( C A N - N 2 G 9 - V H n t ) ; 配列番号 3 8 ( C A N - L T M 1 0 9 - V H n t ) ; 配列番号 4 0 ( C A N - S S M 5 7 - V H n t ) ; 配列番号 4 1 ( C A N - S S M 5 8 - V H n t ) ; 配列番号 4 2 ( C A N - S S M 6 6 - V H n t ) ; および 1 つ以上の保存性核酸置換を有するこれらの変異型

30

からなる群より選択される少なくとも 1 つの可変重鎖 ( V H ) をコードする核酸配列を備える単離された核酸。

【請求項 2 0】

S E Q I D N O . 3 1 ( M U - R N 9 1 1 - V L n t ) ; S E Q I D N O : 3 3 ( C A N - E 3 M - V L n t ) ; S E Q I D N O : 3 5 ( C A N - 6 1 8 - V L n t ) ; S E Q I D N O : 3 6 ( C A N - Q C 2 3 - V L n t ) ; S E Q I D N O : 3 7 ( C A N - L T M 1 0 9 - V L n t ) ; S E Q I D N O : 3 9 ( C A N - S S M E 3 M - V L n t ) ; S E Q I D N O : 4 3 ( C A N - S S M Q C 2 3 - V L n t ) ;

40

および、 1 つ以上の保存性核酸置換を有するこれらの変異型

からなる群より選択される少なくとも 1 つの可変軽鎖 ( V L ) をコードする核酸配列を備える単離された核酸。

【請求項 2 1】

S E Q I D N O . 3 2 ( M U - R N 9 1 1 - V H n t ) ; S E Q I D N O : 3 4 ( C A N - N 2 G 9 - V H n t ) ; S E Q I D N O : 3 8 ( C A N - L T M 1 0 9

50

- V H n t ) ; S E Q I D N O : 4 0 ( C A N - S S M 5 7 - V H n t ) ; S E Q I D N O : 4 1 ( C A N - S S M 5 8 - V H n t ) ;

または配列番号42 ( C A N - S S M 6 6 - V H n t ) からなる群より選択される可変重鎖 ( V H ) ; および1つ以上の保存性核酸置換を有するこれらの変異型からなる群より選択される少なくとも1つの可変重鎖 ( V H ) をコードする核酸からなる群より選択される少なくとも1つの可変軽鎖 ( V L ) をコードする核酸配列をさらに備える、請求項20に記載の単離された核酸。

【請求項22】

配列番号33 ( C A N - E 3 M - V L n t ) を備えるイヌ化抗 N G F 抗原結合タンパク質の可変軽鎖をコードし、配列番号34 ( C A N - N 2 G 9 - V H n t ) を備える可変重鎖をコードする、請求項21に記載の単離された核酸。

10

【請求項23】

配列番号39 ( C A N - S S M E 3 M - V L n t ) を備えるイヌ化抗 N G F 抗原結合タンパク質 ( b i n d i n g p r o t e i n ) の可変軽鎖をコードし、配列番号40 ( C A N - S S M 5 7 - V H n t ) を備える可変重鎖をコードする、請求項21に記載の単離された核酸。

【請求項24】

配列番号43 ( C A N - S S M Q C 2 3 - V L n t ) を備えるイヌ化抗 N G F 抗原結合タンパク質の可変軽鎖をコードし、配列番号40 ( C A N - S S M 5 7 - V H n t ) を備える可変重鎖をコードする、請求項21に記載の単離された核酸。

20

【請求項25】

請求項19～24のいずれか1項に記載の核酸を備えるベクター。

【請求項26】

請求項25に記載のベクターを備える宿主細胞。

【請求項27】

請求項19～24のいずれか1項に記載の核酸を備える宿主細胞。

【請求項28】

生物学的サンプル中のイヌ N G F レベルを検出または定量する方法であって、  
 ( c ) 請求項1～11のいずれか1項に記載のイヌ化抗原結合タンパク質の存在下でイヌ N G F を含有する臨床的または生物学的サンプルをインキュベートする工程；および  
 ( d ) 前記サンプル中の N G F に結合している抗原結合タンパク質を検出する工程を備える、方法。

30

【請求項29】

請求項1～11のいずれか1項に記載の抗原結合タンパク質を備えるキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

( 関連出願の相互参照 )

本願は、2012年6月6日出願された米国仮出願61/656,056号の優先権を主張し、これはその全体が参照により組み込まれる。

40

【0002】

本発明は免疫学の分野に関連する。より詳細には、本発明は、イヌの中で非免疫原性となるように修飾されている、抗 N G F 抗原結合タンパク質または抗体、特に、イヌ N G F に特異的に結合する、キメラ抗体およびイヌ化抗体に関する。本発明はさらに、イヌにおける N G F 関連障害、特に痛みの治療および/または予防におけるこのような抗原結合タンパク質または抗体の使用に関する。

【背景技術】

【0003】

神経成長因子 ( N G F ) は同定された最初のニューロトロフィンであり、末梢ニューロンと中枢ニューロンの両方の発生および生存におけるその役割は十分に特徴付けされてき

50

た。NGFは、末梢交感神経ニューロンおよび胎児感覚ニューロン、ならびに前脳基底部コリン作用性ニューロンの発生において、決定的に重要な生存および維持の因子であることが示されてきた (Smeyne, et al., Nature 368:246-249 (1994) および Crowley, et al., Cell 76:1001-1011 (1994))。NGFは感覚ニューロン中のニューロペプチドの発現をアップレギュレートし (Lindsay, et al., Nature 337:362-364 (1989))、その活性は、2つの異なる膜結合受容体、TrkAチロシンキナーゼ受容体およびp75共通ニューロトロフィン受容体 (時折、それぞれ、「高親和性」NGF受容体および「低親和性」NGF受容体と呼ばれる) を通して媒介され、これは、腫瘍壊死因子受容体ファミリーの他のメンバーと構造的に関連している (Chao, et al., Science 232:518-521 (1986))。 10

【0004】

神経系におけるその効果に加えて、NGFは、神経系の外部のプロセスに関係していると思われることが増えている。例えば、NGFは、血管透過性を増強すること (Ottén, et al., Eur J Pharmacol. 106:199-201 (1984))、T細胞およびB細胞免疫応答を増強すること (Ottén, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10059-10063 (1989))、リンパ球分化および肥満細胞増殖を誘導すること、ならびに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こと (Matsuda, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6508-6512 (1988); Pearce, et al., J. Physiol. 372:379-393 (1986); Bischoff, et al., Blood 79:2662-2669 (1992); Horigome, et al., J. Bioi. Chem. 268:14881-14887 (1993)) が示されてきた。 20

【0005】

NGFは、肥満細胞 (Leon, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3739-3743 (1994))、Bリンパ球 (Torcia, et al., Cell 85:345-356 (1996))、ケラチノサイト (Di Marco, et al., J. Bioi. Chem. 268:22838-22846) )、平滑筋細胞 (Ueyama, et al., J. Hypertens. 11:1061-1065 (1993))、線維芽細胞 (Lindholm, et al., Eur. J. Neurosci. 2:795-801 (1990))、気管支上皮細胞 (Kassel, et al., Clin. Exp. Allergy 31:1432-40 (2001))、腎メサンギウム細胞 (Steiner, et al., Am. J. Physiol. 261:F792-798 (1991)) および骨格筋筋管 (Schwartz, et al., J. Photochem. Photobiol. B66:195-200 (2002)) を含む多くの細胞型によって産生される。NGF受容体は、神経系の外部の様々な細胞型で見い出されてきた。例えば、TrkAは、ヒト単球、Tリンパ球およびBリンパ球、ならびに肥満細胞で見い出されてきた。 30

【0006】

NGFレベルの増加と様々な炎症状態の間の関連性は、ヒト患者において、ならびにいくつかの動物モデルにおいて観察されてきた。これらには、全身性エリテマトーデス (Bracci-Laudiero, et al., Neuroreport 4:563-565 (1993))、多発性硬化症 (Bracci-Laudiero, et al., Neurosci. Lett. 147:9-12 (1992))、乾癬 (Raychaudhuri, et al., Act Derm. l'energeol. 78:84-86 (1998))、関節炎 (Falcim, et al., Ann. Rheum. Dis. 55:745-748 (1996))、間質性膀胱炎 (Okragly, et al., J. Urology 161:438-441 (1999)) およびぜんそく (Braun, et al., Eur. J. Immunol. 28:3240-3251 (1998)) 40

)が挙げられる。

【0007】

一貫して、末梢組織におけるNGFのレベルの上昇は、痛覚過敏および炎症と関連付けられており、多くの型の関節炎において観察されてきた。関節リウマチに罹患している患者の滑膜は高レベルのNGFを発現しているのに対して、炎症を起こしていない滑膜においては、NGFは検出不能であると報告されている(Aloe, et al., Arch Rheum. 35: 351 - 355 (1992))。同様の結果は、実験的に誘導された関節リウマチのラットにおいて見られた(Aloe, et al., Clin. Exp. Rheumatol. 10: 203 - 204 (1992))。NGFのレベルの上昇は、肥満細胞の数の増加とともに、トランスジェニック関節炎マウスにおいて報告されている(Aloe, et al., Int. J. Tissue Reactions - Exp. Clin. Aspects 15: 139 - 143 (1993))。

10

【0008】

骨関節炎(OA)は、イヌにおける最も一般的な慢性筋骨格疾患の1つであり、1歳齢を超えたイヌ集団の20%が罹患している。OAの発症は、主として、外傷、関節不安定性、および股関節異形成などの疾患に続発する。骨関節炎は全体の関節の疾患状態であり、すべての関節構造の炎症性と編成性の両方の変化が、身体障害、ならびに跛行および痛みの臨床徴候を生じる。痛みは、イヌのOAの最も重要な臨床症状であり、これは、構造的な関節の変化、生化学的および分子的な変化、ならびに末梢および中枢の痛みプロセスメカニズムの間の複雑な相互作用の結果である。このネットワークの中で、炎症性および痛覚過敏性メディエーター(例えば、サイトカイン、プロスタグランジン、およびニューロメディエーター)による末梢侵害受容器の活性化および感作は、関節の痛みの原因である主要な末梢メカニズムの1つである。神経成長因子(NGF)は、炎症性と神経障害性の両方の痛みに関与する鍵となる調節因子として、広範な注目を受けているニューロメディエーターの1つである(Isola et al. Vet Comp Orthop Traumatol 4: 2011 pgs 279 - 284)。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

(発明の要旨)

本発明は、新規なイヌ化抗NGF抗原結合タンパク質(イヌ化抗NGFアンタゴニスト抗体など)、およびそれらをコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明はさらに、NGF関連障害、特に痛みの治療および/または予防における上記抗原結合タンパク質および/またはヌクレオチドの使用を提供する。

30

【課題を解決するための手段】

【0010】

1つの実施形態において、本発明は、イヌNGFに特異的に結合する単離された抗原結合タンパク質または抗体フラグメントを提供する。ある実施形態において、この抗原結合タンパク質は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、四量体抗体、四価抗体、多特異的抗体、ドメイン特異的抗体、ドメイン欠失抗体、融合タンパク質、ScFc融合タンパク質、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、Fvフラグメント、ScFvフラグメント、Fdフラグメント、単一ドメイン抗体、dAbフラグメント、小モジュール免疫医薬(SMIP)ナノボディ、およびIgNAR分子からなる群より選択される。ある実施形態において、上記抗体はモノクローナル抗体である。ある実施形態において、上記抗体はキメラである。1つ以上の実施形態において、本発明の抗原結合タンパク質はイヌ化されている。1つ以上の実施形態において、本発明の抗原結合タンパク質はイヌ抗体である。

40

【0011】

1つ以上の実施形態において、イヌNGFに特異的に結合する抗原結合タンパク質は、イヌNGFがイヌTrkAに結合すること、およびより低い程度でp75に結合すること

50

を妨害し、従って、イヌの T r k A および p 7 5 を通したシグナル伝達を阻害し、このことは、感覚ニューロンを通したシグナル伝達を減少し、従って、痛みのレベルを減少することが示されてきた。1つ以上の実施形態において、本発明の抗原結合タンパク質は、イヌの免疫系に対して顕著な有害効果を有さない。

【 0 0 1 2 】

1つ以上の実施形態において、イヌ N G F に特異的に結合する単離された抗原結合タンパク質は、イヌにおける N G F 関連障害を治療する。ある実施形態において、イヌにおける N G F 関連障害は、循環器疾患、アテローム性動脈硬化症、肥満、糖尿病、代謝症候群、痛み、および炎症からなる群より選択される。ある実施形態において、N G F 関連障害は痛みである。ある実施形態において、痛みの型は、慢性の痛み；炎症性の痛み、手術切開後の痛み、神経障害の痛み、骨折の痛み、骨粗しょう症骨折の痛み、ヘルペス後神経痛、癌の痛み、熱傷から生じる痛み、創傷と関連する痛み、外傷と関連する痛み、神経障害の痛み、関節リウマチ、骨関節炎、強直性脊椎炎、血清陰性（非リウマチ）関節症、非関節リウマチおよび関節周囲障害などの筋骨格障害と関連する痛み、ならびに末梢神経障害なる群より選択される。ある実施形態において、痛みの型は慢性の痛みである。ある実施形態において、痛みの型は骨関節炎の痛みである。

10

【 0 0 1 3 】

1つ以上の実施形態において、本発明は、以下からなる群より選択される少なくとも1つを備える単離された抗原結合タンパク質を提供する：

アミノ酸配列 L I G Y D I N（配列番号（S E C I D N O .）1）；L I Q Y D I N（配列番号7）または L I E Y D I N（配列番号8）を有する相補性決定領域（C D R 1）を備える可変重鎖（V H）；

20

アミノ酸配列 M I W G D G T T D Y N S A L K S（配列番号2）；または M I W G T G T T D Y N S A L K S（アミノ酸配列13）を有する相補性決定領域（C D R 2）を備える可変重鎖（V H）；

アミノ酸配列 G G Y Y Y G T S Y Y F D Y（配列番号3）；または G G Y W Y A T S Y Y F D Y（配列番号9）を有する相補性決定領域（C D R 3）を備える可変重鎖（V H）；および

C D R 1、C D R 2、または C D R 3 の少なくとも1つにおける1つ以上の保存性アミノ酸置換を有するこれらの変異型。

30

【 0 0 1 4 】

1つ以上の実施形態において、本発明は、以下からなる群より選択される少なくとも1つを備える単離された抗原結合タンパク質を提供する：

アミノ酸配列 R A S Q D I S N H L N（配列番号4）；または R A S Q S I S N N L N（配列番号10）を有する相補性決定領域（C D R 1）を備える可変軽鎖（V L）；

アミノ酸配列 Y I S R F H S（配列番号5）または Y I S S F H S（配列番号11）を有する相補性決定領域（C D R 2）を備える可変軽鎖（V L）；

アミノ酸配列 Q Q S K T L P Y T（配列番号6）または Q Q S H T L P Y T（配列番号12）を有する相補性決定領域（C D R 3）を備える可変軽鎖（V L）；および

C D R 1、C D R 2、または C D R 3 の少なくとも1つにおける1つ以上の保存性アミノ酸置換を有するこれらの変異型。ある実施形態において、本発明は、上述の可変軽鎖 C D R の少なくとも1つを備える単離された抗原結合タンパク質を提供し、さらに以下からなる群より選択される下記の可変重鎖 C D R の少なくとも1つを含む。：

40

アミノ酸配列 L I G Y D I N（配列番号1）；L I Q Y D I N（配列番号7）または L I E Y D I N（配列番号8）を有する相補性決定領域（C D R 1）を備える可変重鎖（V H）；

アミノ酸配列 M I W G D G T T D Y N S A L K S（配列番号2）；または M I W G T G T T D Y N S A L K S（配列番号13）を有する相補性決定領域（C D R 2）を備える可変重鎖（V H）；

アミノ酸配列 G G Y Y Y G T S Y Y F D Y（アミノ酸配列3）；または G G Y W Y A T

50

S Y Y F D Y (配列番号 9) を有する相補性決定領域 ( C D R 3 ) を備える可変重鎖 ( V H ) ; および

C D R 1、C D R 2、または C D R 3 の少なくとも 1 つにおける 1 つ以上の保存性アミノ酸置換を有するこれらの変異型。

【 0 0 1 5 】

1 つ以上の実施形態において、本発明の抗原結合タンパク質は下記の少なくとも 1 つを含んでもよい :

以下を備える可変重鎖 :

Q V Q L K E S G P G L V A P S Q S L S I T C T V S G F S L I G Y D I N W V R Q  
P P G K G L E W L G M I W G D G T T D Y N S A L K S R L S I S K D N S K S Q V F  
L K M N S L R T D D T A T Y S C A R G G Y Y Y G T S Y Y F D Y W G Q G T T L T V  
S S A K T T P P S V Y P L A P G S A A Q T N S M V T L G C L V K G Y F P E P V T  
V T W N S G S L S S G V H T F P A V L Q S D L Y T L S S S V T V P S S T W P S E  
T V T C N V A H P A S S T K V D K K I V P R D ( S E Q I D N O . 1 4 ; M U -  
R N 9 1 1 - V H ) ;

10

E V Q L V E S G G D L A R P G G S L K L S C V V S G F S L I G Y D I N W V R Q  
A P G K G L Q W V T M I W G D G T T D Y N S A L K S R F T V S R D N A M N T V Y  
L Q M N S L R V E D T A V Y Y C A R G G Y Y Y G T S Y Y F D Y W G Q G T L V T V  
S S ( S E Q I D N O : 1 7 ; C A N - N 2 G 9 - V H ) ;

20

E V Q L V E S G G D L A R P G G S L K L S C V V S G F S L I G Y D I N W V R Q  
A P G K G L Q W V T M I W G D G T T D Y N S A L K S R F T V S R D N A M N T V Y  
L Q M N S L R V E D T A V Y Y C A R G G Y W Y A T S Y Y F D Y W G Q G T L V T V  
S S ( S E Q I D N O : 2 5 ; C A N - L T M 1 0 9 - V H ) ;

E V Q L V E S G G D L A R P G G S L K L S C V V S G F S L I Q Y D I N W V R Q  
A P G K G L Q W V T M I W G D G T T D Y N S A L K S R F T V S R D N A M N T V Y  
L Q M N S L R V E D T A V Y Y C A R G G Y W Y A T S Y Y F D Y W G Q G T L V T V  
S S ( S E Q I D N O : 2 7 ; C A N - S S M 5 7 - V H ) ;

30

E V Q L V E S G G D L A R P G G S L K L S C V V S G F S L I E Y D I N W V R Q  
A P G K G L Q W V T M I W G D G T T D Y N S A L K S R F T V S R D N A M N T V Y  
L Q M N S L R V E D T A V Y Y C A R G G Y W Y A T S Y Y F D Y W G Q G T L V T V  
S S ( S E Q I D N O : 2 8 ; C A N - S S M 5 8 - V H ) ;

E V Q L V E S G G D L A R P G G S L K L S C V V S G F S L I E Y D I N W V R Q  
A P G K G L Q W V T M I W G T G T T D Y N S A L K S R F T V S R D N A M N T V Y  
L Q M N S L R V E D T A V Y Y C A R G G Y W Y A T S Y Y F D Y W G Q G T L V T V  
S S ( S E Q I D N O : 2 9 ; C A N - S S M 6 6 - V H ) ;

および 1 つ以上の保存性アミノ酸置換を有するこれらの変異型。

【 0 0 1 6 】

1 つ以上の実施形態において、本発明の単離された抗原結合タンパク質は、下記の少なくとも 1 つを含んでもよい :

以下を備える可変軽鎖 :

40

D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S C R A S Q D I S N H L N W Y Q Q K P  
D G T V K L L I Y Y I S R F H S G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I S N L E Q  
E D I A T Y F C Q Q S K T L P Y T F G G G T K L E I K R A ( S E Q I D N O .  
1 5 ; M U - R N 9 1 1 - V L ) ;

D I V M T Q T P L S L S V S P G E T A S I S C R A S Q D I S N H L N W F R Q K  
P G Q S P Q R L I Y Y I S R F H S G V P D R F S G G S G T D F T L R I S R V E A  
D D T G V Y Y C Q Q S K T L P Y T F G A G T K L E I K ( S E Q I D N O . 1 6  
; C A N - E 3 M - V L ) ;

D I V M T Q T P L S L S V S P G E P A S I S C R A S Q D I S N H L N W F R Q K  
P G Q S P Q R L I Y Y I S R F H S G V P S R F S G S G S G T D F T L R I S R V E

50

ADDAGVYYCQQSKTLPYTFGQGGTKLEIK (SEQ ID NO. 18; CAN - 618 - VL) ;

DIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCRASQDISNHLNWFRQK PDGTVKLLIYYISRFHSGVPSRFSGSGSGTDFTLRISRVE ADDAGVYYCQQSKTLPYTFGQGGTKLEIK (SEQ ID NO. 19; CAN - QC23 - VL) ;

DIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCRASQDISNHLNWYQQK PDGTVKLLIYYISRFHSGVPSRFSGSGSGTDFSLTISNLE QEDIATYFCQQSKTLPYTFGGGGTKLEI (SEQ ID NO. 20; CAN - 618FW1 - VL) ;

10

DIQMTQTTSLSASLGDRVTISCRASQDISNHLNWFRQK PGQSPQRLIYYISRFHSGVPSRFSGSGSGTDFSLTISNLE QEDIATYFCQQSKTLPYTFGGGGTKLEI (SEQ ID NO. 21; CAN - 618FW2 - VL) ;

DIQMTQTTSLSASLGDRVTISCRASQDISNHLNWYQQK PDGTVKLLIYYISRFHSGVPSRFSGSGSGTDFTLRISRVE ADDAGVYYCQQSKTLPYTFGGGGTKLEI (SEQ ID NO. 22; CAN - 618FW3 - VL) ;

DIQMTQTTSLSASLGDRVTISCRASQDISNHLNWYQQK PDGTVKLLIYYISRFHSGVPSRFSGSGSGTDFSLTISNLE QEDIATYFCQQSKTLPYTFGQGGTKLEI (SEQ ID NO. 23; CAN - 618FW4 - VL) ;

20

DIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSISNNLNWFRQK PGQSPQRLIYYISRFHSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVE ADDTG VYYCQQSHTLPYTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO. 24; CAN - LTM109 - VL) ;

DIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSISNNLNWFRQK PGQSPQRLIYYISSFHSVGPDRFSGSGSGTDFTLRISRVE ADDTG VYYCQQSHTLPYTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO. 26; CAN - SSME3M - VL) ;

30

DIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCRASQSISNNLNWFRQK PDGTVKLLIYYISSFHSVGPDRFSGSGSGTDFTLRISRVE ADDAGVYYCQQSHTLPYTFGQGGTKLEIK (SEQ ID NO. 30; CAN - SSMQC23 - VL) ;

および

1つ以上の保存性アミノ酸置換を有するこれらの変異型。ある実施形態において、本発明は、上記の可変軽鎖の少なくとも1つを有する単離された抗原結合タンパク質を提供し、そして以下からなる群より選択される単離された抗体またはその抗原結合部分の以下の可変重鎖の少なくとも1つをさらに含むことができる：

QVQLKESGPGGLVAPSQSLSITCTVSGFSLIGYDINWVRQPPGKGLLEWLGMIWGDGTTDYNSALKSRLSISKDNSKSKQVFLKMNSLR TDDTATYSCARGGY YYGTSYYFDYWGQGTTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSA AQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSE TVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRD (SEQ ID NO. 14; MURN911 - VH) ;

40

EVQLVESGGDLARPGGSLKLS CVVSGFSLIGYDINWVRQAPGKGLQWVTMIWGDGTTDYNSALKSRFTVSRDNAMNTVYLQMNSLRVEDTAVYYCARGGY YYGTSYYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 17; CAN - N2G9 - VH) ;

50

EVQLVESGGDLARPGGSLKLSLCVVS GFSLIGYDINWVRQ  
 APGKGLQWVTMIWGDGTTDYNSALKSRFTVSRDNAMNTVY  
 LQMNSLRVEDTAVYYCARGGYWYATSY YFDYWGQGT LVTV  
 SS (SEQ ID NO: 25; CAN - LTM109 - VH);

EVQLVESGGDLARPGGSLKLSLCVVS GFSLIQYDINWVRQ  
 APGKGLQWVTMIWGDGTTDYNSALKSRFTVSRDNAMNTVY  
 LQMNSLRVEDTAVYYCARGGYWYATSY YFDYWGQGT LVTV  
 SS (SEQ ID NO: 27; CAN - SSM57 - VH);

EVQLVESGGDLARPGGSLKLSLCVVS GFSLIEYDINWVRQ  
 APGKGLQWVTMIWGDGTTDYNSALKSRFTVSRDNAMNTVY  
 LQMNSLRVEDTAVYYCARGGYWYATSY YFDYWGQGT LVTV  
 SS (SEQ ID NO: 28; CAN - SSM58 - VH);

EVQLVESGGDLARPGGSLKLSLCVVS GFSLIEYDINWVRQ  
 APGKGLQWVTMIWGTGTTDYNSALKSRFTVSRDNAMNTVY  
 LQMNSLRVEDTAVYYCARGGYWYATSY YFDYWGQGT LVTV  
 SS (SEQ ID NO: 29; CAN - SSM66 - VH);

および、1つ以上の保存性アミノ酸置換を有するこれらの変異型。

【0017】

1つ以上の実施形態において、本発明の単離された抗原結合タンパク質は以下の少なくとも1つを含むことができる：

a) 以下を備える可変軽鎖：

DIQMTQTTSLSASLGDRVTISCRASQDISNHLNWYQQK  
 PDGTVKLLIYYISRFHSGVPSRFSGSGSGT DYSLTISNLE  
 QEDIATYFCQQSKTLPYTFGGGKLEIKRA (SEQ ID NO  
 . 15; MU - RN911 - VL);

DIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQDISNHLNWFRQK  
 PGQSPQRLLIYYISRFHSGVPSRFSGSGSGT DFTLRISRVE  
 ADDTGYYCQQSKTLPYTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO . 1  
 6; CAN - E3M - VL);

DIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCRASQDISNHLNWFRQK  
 PGQSPQRLLIYYISRFHSGVPSRFSGSGSGT DFTLRISRVE  
 ADDAGVYYCQQSKTLPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO .  
 18; CAN - 618 - VL);

DIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCRASQDISNHLNWFRQK  
 PDGTVKLLIYYISRFHSGVPSRFSGSGSGT DFTLRISRVE  
 ADDAGVYYCQQSKTLPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO  
 . 19; CAN - QC23 - VL);

DIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCRASQDISNHLNWYQQK  
 PDGTVKLLIYYISRFHSGVPSRFSGSGSGT DYSLTISNLE  
 QEDIATYFCQQSKTLPYTFGGGKLEI (SEQ ID NO . 20  
 ; CAN - 618FW1 - VL);

DIQMTQTTSLSASLGDRVTISCRASQDISNHLNWFRQK  
 PGQSPQRLLIYYISRFHSGVPSRFSGSGSGT DYSLTISNLE  
 QEDIATYFCQQSKTLPYTFGGGKLEI (SEQ ID NO . 21  
 ; CAN - 618FW2 - VL);

DIQMTQTTSLSASLGDRVTISCRASQDISNHLNWYQQK  
 PDGTVKLLIYYISRFHSGVPSRFSGSGSGT DFTLRISRVE  
 ADDAGVYYCQQSKTLPYTFGGGKLEI (SEQ ID NO . 22  
 ; CAN - 618FW3 - VL);

DIQMTQTTSLSASLGDRVTISCRASQDISNHLNWYQQK

10

20

30

40

50

PDGTVKLLIYYISRFHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLE  
 QEDIATYFCQQSKTLPYTFGQGKLEI (SEQ ID NO. 23  
 ; CAN - 618FW4 - VL) ;

DIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSISNNLNWFRQK  
 PGQSPQRLIYYISRFHSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVE  
 ADDTGYYCQQSHTLPYTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO. 2  
 4 ; CAN - LTM109 - VL) ;

DIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSISNNLNWFRQK  
 PGQSPQRLIYYISSFHSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVE  
 ADDTGYYCQQSHTLPYTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO. 2  
 6 ; CAN - SSME3M - VL) ;

DIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCRASQSISNNLNWFRQK  
 PDGTVKLLIYYISSFHSGVPSRFSGSGSGTDFTLRISRVE  
 ADDAGVYYCQQSHTLPYTFGQGKLEIK (SEQ ID NO. 3  
 0 ; CAN - SSMQC23 - VL) ;

および

1つ以上の保存性アミノ酸置換を有するこれらの変異型 ; ならびに

b) 以下を備える可変重鎖 :

QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLIGYDINWVRQ  
 PPGKGLEWLGMIWGDGTTDYNSALKSRLSISKDNSKSKQVF  
 LKMNSLRDDEATYSCARGGYYYGTSYYFDYWGQGTTLTV  
 SSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVT  
 VTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTSSSVTVPSSTWVSE  
 TVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRD (SEQ ID NO. 14 ; MU -  
 RN911 - VH) ;

EVQLVESGGDLARPGGSLKLSLCVVSGFSLIGYDINWVRQ  
 APGKGLQWVTMIWGDGTTDYNSALKSRFTVSRDNAMNTVY  
 LQMNSLRVEDTAVYYCARGGYYYGTSYYFDYWGQGTTLTV  
 SS (SEQ ID NO : 17 ; CAN - N2G9 - VH) ;

EVQLVESGGDLARPGGSLKLSLCVVSGFSLIGYDINWVRQA  
 PGKGLQWVTMIWGDGTTDYNSALKSRFTVSRDNAMNTVYL  
 QMNSLRVEDTAVYYCARGGYWYATSYFFDYWGQGTTLTVS  
 S (SEQ ID NO : 25 ; CAN - LTM109 - VH) ;

EVQLVESGGDLARPGGSLKLSLCVVSGFSLIQYDINWVRQ  
 APGKGLQWVTMIWGDGTTDYNSALKSRFTVSRDNAMNTVY  
 LQMNSLRVEDTAVYYCARGGYWYATSYFFDYWGQGTTLTV  
 SS (SEQ ID NO : 27 ; CAN - SSM57 - VH) ;

EVQLVESGGDLARPGGSLKLSLCVVSGFSLIEYDINWVRQ  
 APGKGLQWVTMIWGDGTTDYNSALKSRFTVSRDNAMNTVY  
 LQMNSLRVEDTAVYYCARGGYWYATSYFFDYWGQGTTLTV  
 SS (SEQ ID NO : 28 ; CAN - SSM58 - VH) ;

EVQLVESGGDLARPGGSLKLSLCVVSGFSLIEYDINWVRQ  
 APGKGLQWVTMIWGTGTTDYNSALKSRFTVSRDNAMNTVY  
 LQMNSLRVEDTAVYYCARGGYWYATSYFFDYWGQGTTLTV  
 SS (SEQ ID NO : 29 ; CAN - SSM66 - VH) ;

および1つ以上の保存性アミノ酸置換を有するこれらの変異型。

【0018】

1つ以上の実施形態において、本発明は、可変軽鎖が配列番号16 (CAN - E3M - VL) を備え、可変重鎖が配列番号17 (CAN - N2G9 - VH) を備える、単離された抗原結合タンパク質を提供する。

10

20

30

40

50

## 【0019】

1つ以上の実施形態において、本発明は、配列番号26 (CAN - SSME3M - VL) を備える可変軽鎖および配列番号27 (CAN - SSM57 - VH) を備える可変重鎖を備える、単離された抗原結合タンパク質を提供する。

## 【0020】

1つ以上の実施形態において、本発明は、配列番号30 (CAN - SSMQC23 - VL) を備える可変軽鎖および配列番号27 (CAN - SSM57 - VH) を備える可変重鎖を備える、単離された抗原結合タンパク質を提供する。

## 【0021】

1つ以上の実施形態において、本発明は、治療有効量の任意の1種以上の本発明の単離された抗原結合タンパク質を備える獣医学用組成物を提供する。1つ以上の実施形態において、本発明の獣医学用組成物は、イヌの免疫系に対して顕著な有害効果を有さない。

10

## 【0022】

1つ以上の実施形態において、本発明は、任意の1種以上の本発明の抗原結合タンパク質を産生する宿主細胞を提供する。

## 【0023】

1つの実施形態において、本発明は、以下からなる群より選択されるイヌ化抗原結合タンパク質をコードする核酸配列を備える単離された核酸を提供する：

配列番号32 (MU - RN911 - VHnt) ; 配列番号34 (CAN - N2G9 - VHnt) ; 配列番号38 (CAN - LTM109 - VHnt) ; 配列番号40 (CAN - SSM57 - VHnt) ; 配列番号41 (CAN - SSM58 - VHnt) ; 配列番号42 (CAN - SSM66 - VHnt) ; および1つ以上の保存性核酸置換を有するこれらの変異型からなる群より選択される可変重鎖 (VH) をコードする核酸。

20

## 【0024】

1つ以上の実施形態において、本発明は、以下からなる群より選択されるイヌ化抗原結合タンパク質をコードする核酸配列を備える単離された核酸を提供する：

配列番号31 (MU - RN911 - VLnt) ; 配列番号33 (CAN - E3M - VLnt) ; 配列番号35 (CAN - 618 - VLnt) ; 配列番号36 (CAN - QC23 - VLnt) ; 配列番号37 (CAN - LTM109 - VLnt) ; 配列番号39 (CAN - SSME3M - VLnt) ; 配列番号43 (CAN - SSMQC23 - VLnt) ; および1つ以上の保存性核酸置換を有するこれらの変異型からなる群より選択される可変軽鎖 (VL) をコードする核酸。

30

## 【0025】

ある実施形態において、本発明は、配列番号32 (MU - RN911 - VHnt) ; 配列番号34 (CAN - N2G9 - VHnt) ; 配列番号38 (CAN - LTM109 - VHnt) ; 配列番号40 (CAN - SSM57 - VHnt) ; 配列番号41 (CAN - SSM58 - VHnt) ; または配列番号42 (CAN - SSM66 - VHnt) ; および1つ以上の保存性核酸置換を有するこれらの変異型からなる群より選択される可変重鎖 (VH) をコードする核酸をさらに備える。

40

## 【0026】

1つ以上の実施形態において、本発明は、配列番号33 (CAN - E3M - VLnt) を備えるイヌ化抗NGF抗原結合タンパク質の可変軽鎖をコードし、配列番号34 (CAN - N2G9 - VHnt) を備える可変重鎖をコードする、単離された核酸を提供する。

40

## 【0027】

1つ以上の実施形態において、本発明は、配列番号39 (CAN - SSME3M - VLnt) を備える可変軽鎖をコードし、配列番号40 (CAN - SSM57 - VHnt) を備える可変重鎖をコードする、単離された核酸を提供する。

## 【0028】

1つ以上の実施形態において、本発明は、配列番号43 (CAN - SSMQC23 - VLnt) を備える可変軽鎖をコードし、配列番号40 (CAN - SSM57 - VHnt) を備える可変重鎖をコードする、単離された核酸を提供する。

50

を備える可変重鎖をコードする、単離された核酸を提供する。

【0029】

1つ以上の実施形態において、本発明は、本発明の任意の1種以上の核酸を備えるベクターを提供する。

【0030】

1つ以上の実施形態において、本発明は、本発明の任意の1種以上の核酸を備える宿主細胞を提供する。

【0031】

1つ以上の実施形態において、本発明は、本発明の任意の1種以上の核酸を備えるベクターを備える宿主細胞を提供する。

【0032】

1つの実施形態において、本発明は、イヌ化抗原結合タンパク質の産生を生じる条件下で、本明細書に記載されるような本発明の宿主細胞のいずれかを培養する工程、およびこの宿主細胞から、またはこの宿主細胞の培養培地から、イヌ化抗体抗原結合タンパク質を単離する工程を備える、抗原結合タンパク質を産生する方法を提供する。

【0033】

1つの実施形態において、本発明は、治療有効量の本発明の獣医学用組成物を投与する工程を備える、NGF関連障害についてイヌを治療する方法を提供する。ある実施形態において、NGF関連障害は、循環器疾患、アテローム性動脈硬化症、肥満、糖尿病、代謝症候群、痛み、および炎症からなる群より選択される。本発明のある実施形態において、痛みの型は、慢性の痛み、炎症性の痛み、手術切開後の痛み、神経障害の痛み、骨折の痛み、骨粗しょう症骨折の痛み、ヘルペス後神経痛、癌の痛み、熱傷から生じる痛み、創傷と関連する痛み、外傷と関連する痛み、神経障害の痛み、関節リウマチ、骨関節炎、強直性脊椎炎、血清陰性（非リウマチ）関節症、非関節リウマチおよび関節周囲障害などの筋骨格障害と関連する痛み、ならびに末梢神経障害からなる群より選択される。ある実施形態において、痛みの型は骨関節炎の痛みである。

【0034】

1つ以上の実施形態において、本発明は、本発明の獣医学用組成物を投与することによって、イヌにおけるNGF活性を阻害する方法を提供する。

【0035】

1つの実施形態において、本発明は、生物学的サンプル中のNGFレベルを検出または定量する方法を提供し、この方法は以下の工程を備える：

(a) 本発明のイヌ化抗体、抗原結合タンパク質、またはフラグメントのいずれか1つの存在下で、NGFを含有する臨床的サンプルまたは生物学的サンプルをインキュベートする工程；および

(b) 上記サンプル中のNGFに結合している抗原結合タンパク質またはフラグメントを検出する工程。

【0036】

ある実施形態において、抗原結合タンパク質またはフラグメントは、検出可能に標識されている。ある実施形態において、抗原結合タンパク質またはフラグメントは標識されおらず、検出可能に標識されている第2の抗原結合タンパク質またはフラグメントと組み合わせて使用される。1つの実施形態において、本発明は、本発明の抗原結合タンパク質を備えるキットを備える。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】図1は、抗原結合部位を強調表示した、マウス免疫グロブリンG(IgG)分子の一般的構造の略図である。

【図2】図2は、マウス/イヌのキメラIgGの一般的構造の略図である。

【図3】図3は、スペシエーション、すなわちマウスIgGの「イヌ化」を示す図解であり、マウスCDRがイヌのフレームワークに移植されている。

10

20

30

40

50

【図4】図4は、キメラ軽鎖が完全にイヌ化された重鎖と対になっているヘテロキメラモノクローナル抗体の図解である。

【図5】図5は、定常領域へのプライマー、およびマウス可変領域に向けられた縮重プライマーを示す、抗体可変鎖の図解である。

【図6】図6(A)成熟ヒト - NGF上のRN 9 1 1エピトープの分子モデリング。NGFは、典型的には、ホモダイマー化されている。NGFの各モノマーは、薄い灰色と中程度の灰色の記号表示によって区別されており、RN 9 1 1結合に影響を与える同定された残基は黒で示される。様々なマウスmAbの結合に影響を及ぼす各々の可変領域はどのように標識されている。図6(B) - NGF上のRN 9 1 1結合エピトープの種を横切るアミノ酸配列保存性。NGFへのRN 9 1 1結合のために決定的に重要なアミノ酸は灰色で影を付けている。

10

【図7】図7は、ビーグル犬へのIV投与後の血清レベルの遊離のRN 9 1 1のグラフ表示である。

【図8】図8は、ビーグル犬へのIV投与後の血清レベルの「結合NGF」（すなわち、RN 9 1 1に結合したNGF）のグラフ表示である。

【図9】図9は、ビーグル(LPS誘導)滑膜炎痛みモデルにおける跛行に対するRN 9 1 1(3mg/kg、IV)の効果のグラフ表示である。\*P<0.1、PBSビヒクルと比較した場合。

【図10】図10は、発現を回復し、結合を保持するための軽鎖に対して行われたフレームワーク置換の一例の略図である。

20

【図11】図11は、異なるフレームワーク配列を使用するイヌ化誘導体の発現および変異の結果を要約する。

【図12A】図12AおよびBは、イヌ化mAb(左)の親和性データのグラフ表示である。(右)プレインキュベートしたmAb+NGFを用いたtrkA阻害データ。(下)

【図12B】図12AおよびBは、イヌ化mAb(左)の親和性データのグラフ表示である。(右)プレインキュベートしたmAb+NGFを用いたtrkA阻害データ。(下)

【図13】図13は、各mAbのEC50を決定するための、trkA発現細胞システムを使用する細胞ベースのアッセイによって決定されたイヌ化mAbの親和性データのグラフ表示である。

【図14】図14は、イヌ化抗NGF mAb PF 06442590(CANSSM 57-VH/CANSSME3M-VL)の効果のグラフ表示である。

30

【図15】図15は、ルックスルー変異誘発(LTM)および部位飽和変異誘発(SSM)のために使用されるライブラリー設計の図解である。

【図16】図16は、35日間測定した場合の、イヌにおける抗NGFモノクローナル抗体の薬物動態学(PK)研究のグラフ表示である。

【図17】図17は、ラット(MIAラット痛みモデル)におけるOA様病変を再生するために使用されたMIAの関節内注射による炎症誘導の図式記述である。

【図18】図18は、MIAラット痛みモデルにおける痛み治療(モルヒネ、モノクローナル抗体)後の結果のグラフ表示である。

【図19】図19は、MIAラット痛みモデルにおける痛み治療(モルヒネ、モノクローナル抗体)後の結果のグラフ表示である。

40

【0038】

(配列の簡単な説明)

配列番号1は、本明細書中でRN 9 1 1 - VH - CDR 1と呼ばれる可変重鎖CDR 1のアミノ酸配列である。

【0039】

配列番号2は、本明細書中でRN 9 1 1 - VH - CDR 2と呼ばれる可変重鎖CDR 2のアミノ酸配列である。

【0040】

配列番号3は、本明細書中でRN 9 1 1 - VH - CDR 3と呼ばれる可変重鎖CDR 2

50

のアミノ酸配列である。

【0041】

配列番号4は、本明細書中でRN911-VL-CDR1と呼ばれる可変軽鎖CDR1のアミノ酸配列である。

【0042】

配列番号5は、本明細書中でRN911-VL-CDR2と呼ばれる可変軽鎖CDR2のアミノ酸配列である。

【0043】

配列番号6は、本明細書中でRN911-VL-CDR3と呼ばれる可変軽鎖CDR3のアミノ酸配列である。

10

【0044】

配列番号7は、本明細書中でSSM57-VH-CDR1と呼ばれる可変重鎖CDR1のアミノ酸配列である。

【0045】

配列番号8は、本明細書中でSSM58-VH-CDR1と呼ばれる可変重鎖CDR1のアミノ酸配列である。

【0046】

配列番号9は、本明細書中でLTM109-VH-CDR3およびSSM57-VH-CDR3と呼ばれる可変重鎖CDR3のアミノ酸配列である。

【0047】

配列番号10は、本明細書中でLTM109-VL-CDR1と呼ばれる可変軽鎖CDR1のアミノ酸配列である。

20

【0048】

配列番号11は、本明細書中でSSM57-VL-CDR2と呼ばれる可変軽鎖CDR2のアミノ酸配列である。

【0049】

配列番号12は、本明細書中でLTM109-VL-CDR3と呼ばれる可変軽鎖CDR3のアミノ酸配列である。

【0050】

配列番号13は、本明細書中でSSM66-VH-CDR2およびSSM57-VH-CDR2と呼ばれる可変軽鎖CDR2のアミノ酸配列である。

30

【0051】

配列番号14は、本明細書中でMU-RN911-VHと呼ばれる可変重鎖のアミノ酸配列である。

【0052】

配列番号15は、本明細書中でMU-RN911-VLと呼ばれる可変軽鎖のアミノ酸配列である。

【0053】

配列番号16は、本明細書中でCAN-E3M-VLと呼ばれる可変重鎖のアミノ酸配列である。

40

【0054】

配列番号17は、本明細書中でCAN-N2G9-VHと呼ばれる可変重鎖のアミノ酸配列である。

【0055】

配列番号18は、本明細書中でCAN-618-VLと呼ばれる可変軽鎖のアミノ酸配列である。

【0056】

配列番号19は、本明細書中でCAN-QC23-VLと呼ばれる可変軽鎖のアミノ酸配列である。

【0057】

50

配列番号 20 は、本明細書中で C A N - 6 1 8 F W 1 - V L と呼ばれる可変軽鎖のアミノ酸配列である。

【 0 0 5 8 】

配列番号 21 は、本明細書中で C A N - 6 1 8 F W 2 - V L と呼ばれる可変軽鎖のアミノ酸配列である。

【 0 0 5 9 】

配列番号 22 は、本明細書中で C A N - 6 1 8 F W 3 - V L と呼ばれる可変軽鎖のアミノ酸配列である。

【 0 0 6 0 】

配列番号 23 は、本明細書中で C A N - 6 1 8 F W 4 - V L と呼ばれる可変軽鎖のアミノ酸配列である。

【 0 0 6 1 】

配列番号 24 は、本明細書中で C A N - L T M 1 0 9 - V L と呼ばれる可変軽鎖のアミノ酸配列である。

【 0 0 6 2 】

配列番号 25 は、本明細書中で C A N - L T M 1 0 9 - V H と呼ばれる可変重鎖のアミノ酸配列である。

【 0 0 6 3 】

配列番号 26 は、本明細書中で C A N - S S M E 3 M - V L と呼ばれる可変軽鎖のアミノ酸配列である。

【 0 0 6 4 】

配列番号 27 は、本明細書中で C A N - S S M 5 7 - V H と呼ばれる可変重鎖のアミノ酸配列である。

【 0 0 6 5 】

配列番号 28 は、本明細書中で C A N - S S M 5 8 - V H と呼ばれる可変重鎖のアミノ酸配列である。

【 0 0 6 6 】

配列番号 29 は、本明細書中で C A N - S S M 6 6 - V H と呼ばれる可変重鎖のアミノ酸配列である。

【 0 0 6 7 】

配列番号 30 は、本明細書中で C A N - S S M Q C 2 3 - V L と呼ばれる可変重鎖のアミノ酸配列である。

【 0 0 6 8 】

配列番号 31 は、本明細書中で M U - R N 9 1 1 - V L n t と呼ばれる可変軽鎖をコードするヌクレオチド配列である。

【 0 0 6 9 】

配列番号 32 は、本明細書中で M U - R N 9 1 1 - V H n t と呼ばれる可変重鎖をコードするヌクレオチド配列である。

【 0 0 7 0 】

配列番号 33 は、本明細書中で C A N - E 3 M - V L n t と呼ばれる可変軽鎖をコードするヌクレオチド配列である。

【 0 0 7 1 】

配列番号 34 は、本明細書中で C A N - N 2 G 9 - V H n t と呼ばれる可変重鎖をコードするヌクレオチド配列である。

【 0 0 7 2 】

配列番号 35 は、本明細書中で C A N - 6 1 8 - V L n t と呼ばれる可変軽鎖をコードするヌクレオチド配列である。

【 0 0 7 3 】

配列番号 36 は、本明細書中で C A N - Q C 2 3 - V L n t と呼ばれる可変軽鎖をコードするヌクレオチド配列である。

10

20

30

40

50

## 【0074】

配列番号37は、本明細書中でCAN - L T M 1 0 9 - V L n t と呼ばれる可変軽鎖をコードするヌクレオチド配列である。

## 【0075】

配列番号38は、本明細書中でCAN - L T M 1 0 9 - V H n t と呼ばれる可変重鎖をコードするヌクレオチド配列である。

## 【0076】

配列番号39は、本明細書中でCAN - S S M E 3 M - V L n t と呼ばれる可変軽鎖をコードするヌクレオチド配列である。

## 【0077】

配列番号40は、本明細書中でCAN - S S M 5 7 - V H n t と呼ばれる可変重鎖をコードするヌクレオチド配列である。

## 【0078】

配列番号41は、本明細書中でCAN - S S M 5 8 - V H n t と呼ばれる可変重鎖をコードするヌクレオチド配列である。

## 【0079】

配列番号42は、本明細書中でCAN - S S M 6 6 - V H n t と呼ばれる可変重鎖をコードするヌクレオチド配列である。

## 【0080】

配列番号43は、本明細書中でCAN - S S M Q C 2 3 - V L n t と呼ばれる可変軽鎖をコードするヌクレオチド配列である。

## 【0081】

配列番号44は、本明細書中でCAN - 6 5 E - H C と呼ばれるイヌ重鎖定常領域のアミノ酸配列である。

## 【0082】

配列番号45は、本明細書中でCAN - 6 5 E - H C n t と呼ばれるイヌ重鎖定常領域をコードするヌクレオチド配列である。

## 【0083】

配列番号46は、本明細書中でCAN - K A P P A - L C と呼ばれるイヌカップ定常軽鎖領域のアミノ酸配列である。

## 【0084】

配列番号47は、本明細書中でCAN - K A P P A - L C n t と呼ばれるイヌカップ定常軽鎖領域のヌクレオチド配列である。

## 【0085】

配列番号48は、本明細書中でCAN - 6 5 H C n t と呼ばれるイヌ重鎖定常領域のヌクレオチド配列である。

## 【0086】

配列番号49は、本明細書中でCAN - 6 5 H C と呼ばれるイヌ重鎖定常領域のアミノ酸配列である。

## 【0087】

配列番号50は、*Canis lupus familiaris* 神経成長因子 Genbank アクセッション番号 AAY16195 のアミノ酸配列である。

## 【0088】

配列番号51は、*Canis lupus familiaris* 神経成長因子のヌクレオチド配列である。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0089】

(発明の詳細な説明)

本明細書に開示される発明は、高親和性でイヌNGFを結合するイヌ化抗NGF抗原結合タンパク質を提供する。本発明はさらに、上記抗原結合タンパク質の変異型であるイヌ

10

20

30

40

50

NGFにも結合するイヌ化抗原結合タンパク質およびポリペプチド、ならびにこれらの抗原結合タンパク質を作成する方法および使用する方法を提供する。ある実施形態において、本発明は、上記抗原結合タンパク質および/またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた提供する。本明細書に開示される発明は、治療有効量のイヌ化抗NGF抗原結合タンパク質の投与によってイヌの痛みを予防および/または治療するための方法もまた提供する。

【0090】

(一般的技術)

本発明は、本明細書に記載される特定の方法論、プロトコール、および試薬などに限定されず、そのようなものとして、変動してもよいことが理解されるべきである。本明細書において使用される専門用語は、特定の実施形態を説明する目的のためであって、本発明の範囲を限定することは意図されず、本発明は特許請求の範囲によってのみ規定される。

10

【0091】

他に規定されない限り、本明細書に記載される抗体に関連して使用される科学用語および技術用語は、当業者によって共通して理解される意味を有するべきである。さらに、文脈によって他に要求されない限り、単数形用語は複数形を含むべきであり、複数形用語は単数形を含むべきである。一般的に、本明細書に記載される細胞および組織培養、分子生物学、ならびにタンパク質およびオリゴ-またはポリヌクレオチド化学およびハイブリダイゼーションと関連して利用される命名法、および技術は、周知でありかつ当該分野において共通して使用されるものである。

20

【0092】

同定されたすべての特許および他の刊行物は、例えば、本発明に関連して使用されるかもしれないこのような刊行物に記載される方法論を記載および開示する目的のために、明確に参照により組み込まれる。これらの刊行物は、単に、本願の出願日の前のこれらの開示のために提供される。

【0093】

標準的な技術が、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トランスフェクション(例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション)のために使用される。酵素反応および精製技術は、製造者の説明書に従って、または当該分野において共通して達成されるように、または本明細書に記載されるように実施される。一般的に、前述の技術および手順は、当該分野において周知でありかつ記載されるような従来的な方法に従って実施されるが、本明細書の全体にわたって引用および議論される様々な一般的文献およびより特定の文献に限定されない。例えば、Sambrook et al. *Molecular Cloning: Lab. Manual* (3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001) および Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology* (New York: Greene Publishing Association J Wiley Interscience), *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (I. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Imm*

30

40

50

unology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.) ; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987) ; Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., eds., 1987) ; PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994) ; Current Protocols in Immunology (E. Coligan et al., eds., 1991) ; Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999) ; Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997) ; Antibodies (P. Finch, 1997) ; Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988 - 1989) ; Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000) ; Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999) ; The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995) ; および Cancer: Principles and Practice of Oncology (Y. T. DeVita et al., eds., J. B. Lippincott Company, 1993) を参照のこと。

#### 【0094】

操作の例、または他に示される場合以外では、本明細書において使用される成分の量または反応条件を表現するすべての数字は、「約」という用語によりすべての場合において修飾されると理解されるべきである

#### (定義)

本発明を詳細に記載する前に、本発明の文脈において使用されるいくつかの用語が定義される。これらの用語に加えて、他の用語は必要に応じて明細書中の他の箇所で定義される。本明細書中で他に明確に定義されない限り、本明細書中で使用される当該分野の用語は、それらの分野で認識されている意味を有する。

#### 【0095】

本明細書および特許請求の範囲において使用される場合、単数形(「a」、「an」、および「the」)は、文脈が明確に反対を指示していない限り、複数形の言及を含む。例えば、「抗体」という言及は、複数のこのような抗体を含む。

#### 【0096】

本明細書で使用される場合、「備える」という用語は、組成物および方法が、列挙された構成要素を含むが、他の構成要素を除外しないことを意味することが意図される。

#### 【0097】

本明細書で使用される場合、「神経成長因子」および「NGF」という用語は、NGFの生物学的活性の少なくとも一部を保持している神経成長因子およびその変異型をいう。

#### 【0098】

「NGF受容体」とは、NGFによって結合されるかまたは活性化されるポリペプチドをいう。NGF受容体には、イヌのTrkA受容体、およびより低い程度では、p75受容体が含まれる。

#### 【0099】

一般的に、NGFの「生物学的活性」とは、NGF受容体に結合し、および/またはNGF受容体シグナル伝達経路を活性化する能力をいう。限定するわけではないが、生物学的活性には、以下の任意の1つ以上が含まれる: NGF受容体(TrkAおよび/または

p75など)を結合する能力; TrkA受容体のダイマー化および/または自己リン酸化を促進する能力; NGF受容体シグナル伝達経路を活性化する能力; 細胞の分化、増殖、生存、成長、ならびに、(ニューロンの場合においては、末梢ニューロンおよび中枢ニューロンを含む)ニューロンの形態の変化、シナプス形成、シナプス機能、神経伝達物質および/またはニューロペプチド放出、ならびに損傷後の再生を含む、細胞生理学における他の変化を促進する能力; マウスE13.5三叉神経ニューロンの生存を促進する能力; ならびに手術後の痛みを含む、痛みを媒介する能力。

#### 【0100】

本明細書で使用される場合、「抗NGF抗原結合タンパク質」(交換可能に「抗NGF抗体」および「抗NGFアンタゴニスト抗体」と呼ばれる)とは、NGFに結合し、かつNGFシグナル伝達によって媒介されるNGF生物学的活性および/または下流経路を阻害することが可能である、抗原結合タンパク質をいう。抗NGFアンタゴニスト抗体は、NGFシグナル伝達によって媒介される下流経路を含む、NGF生物学的活性を遮断、拮抗、抑制、もしくは減少させる(顕著なものを含む)抗体、ならびに/または受容体結合および/もしくはNGFに対する細胞応答の誘発などの、NGFがその受容体であるtrkAに結合することを阻害する抗体を包含する。本発明の目的のために、「抗NGFアンタゴニスト抗体」という用語が、すべての以前に同定された用語、タイトル、ならびに機能的な状態および特徴を包含し、それによって、NGFそれ自体、NGFの生物学的活性(手術後の痛みの任意の局面を媒介する能力を含むがこれに限定されない)、または生物学的活性の結果が、任意の意味のある程度、実質的に無効にされ、減少され、または中和されることが明確に理解される。ある実施形態において、抗NGFアンタゴニスト抗体はNGFを結合し、そしてNGFダイマー化および/またはNGF受容体(trkAおよび/またはp75など)への結合を妨害する。他の実施形態において、抗NGF抗体は、NGFを結合し、そしてtrkA受容体のダイマー化および/またはtrkAの自己リン酸化を妨害する。抗NGFアンタゴニスト抗体の例は本明細書において提供されている。

#### 【0101】

本明細書で使用される場合、交換可能に使用されてもよい「抗原結合タンパク質」、「抗体」などの用語は、抗原結合部位を備える、ポリペプチドまたはそのフラグメントをいう。本発明の1つの実施形態において、本発明の抗原結合タンパク質は、免疫グロブリン分子の可変領域に位置する少なくとも1つの抗原認識部位を通して、例えば、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチドなどの標的に特異的に結合することが可能であるインタクトな免疫グロブリンをさらに提供する。インタクトな抗体は2つの軽鎖および2つの重鎖を有する。従って、単独の単離されたインタクトな抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、合成抗体、組換え抗体、キメラ抗体、ヘテロキメラ抗体であってもよい。「抗原結合タンパク質」「抗体」という用語は、好ましくは、NGFタンパク質およびそのフラグメントに結合できる、モノクローナル抗体およびそのフラグメント、およびその免疫学的結合等価物をいう。抗体および抗原結合タンパク質という用語は、均一な分子、または複数の異なる分子の実体から作られた、血清製品などのような混合物をいうために使用される。本明細書で使用される場合、この用語は、インタクトなポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を包含するのみならず、そのフラグメントもまた包含する。本発明の目的のために、「抗体」および「抗原結合タンパク質」は、他に言及されない限り、抗体フラグメントもまた含む。例示的な抗体フラグメントには、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv、Fd、dAb、ディアボディ、これらの抗原認識フラグメント、小モジュール免疫医薬(SMIP)ナノボディ、IgNAR分子、および、当業者によって、抗原結合タンパク質または抗体フラグメントであると認識されているすべての同様のもの、および任意の上述のフラグメント、およびそれらの化学的にまたは遺伝子的に操作された対応物、ならびに他の抗体フラグメントおよびその変異体、抗体部分を備える融合タンパク質、および抗原認識部位を備える免疫グロブリン分子の任意の他の修飾された構成が含まれる。抗体および抗原結合タンパク質は、例えば、伝統的なハイブリドーマ技術(Kohler et al., Nature 256: 495-49

10

20

30

40

50

9 ( 1 9 7 5 ) )、組換えDNA法 ( 米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号 )、または抗体ライブラリーを使用するファージディスプレイ技術 ( Clackson et al. , Nature 352 : 624628 ( 1991 ) ; Marks et al. , J. Mol. Biol. 222 : 581597 ( 1991 ) ) を介して作製できる。様々な他の抗体産生技術については、Antibodies : Laboratory Manual , eds. Harlow et al. , Cold Spring Harbor Laboratory , 1988 ならびに当業者に周知である他の技術を参照のこと。

#### 【 0 1 0 2 】

本明細書に定義されるような「モノクローナル抗体」は、単クローンの細胞によって産生される抗体であり ( 具体的には、ハイブリドーマ細胞の単クローン )、それゆえに、単一の純粋な均質な型の抗体である。同じクローンから産生されたすべてのモノクローナル抗体は同一であり、同じ抗原特異性を有する。モノクローナル抗体は、そのモノクローナル抗体が抗原の選択的結合に参与しているアミノ酸 ( 天然に存在するかまたは天然に存在しない ) から構成されている、均質な抗体集団である。モノクローナル抗体の集団は高度に特異的であり、単一の抗原性部位に対して方向付けられている。「モノクローナル抗体」という用語は、インタクトなモノクローナル抗体および全長モノクローナル抗体を包含するのみならず、そのフラグメント ( Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv、Fd、dAb、ディアボディ、これらの抗原認識フラグメント、小モジュール免疫医薬 ( SMIP ) ナノボディ、IgNAR 分子など )、これらの変異体、抗体部分を備える融合タンパク質、ならびに必要とされる特異性および抗原に結合する能力の抗原認識部位を備える免疫グロブリン分子の任意の他の修飾された構成もまた包含する。抗体の供給源またはそれが作られた様式 ( 例えば、ハイブリドーマ、ファージ選択、組換え発現、トランスジェニック動物による、など ) に関しては、限定されることは意図されない。

#### 【 0 1 0 3 】

本発明のモノクローナル抗体は、具体的に、「キメラ」抗体 ( 免疫グロブリン ) を含み、ここでは、重鎖および / または軽鎖の一部が、特定の種から誘導された抗体中の対応する配列と同一であるかまたは相同であるのに対して、残りの鎖は、それらが所望の生物学的活性を示す限り、他の種から誘導された抗体中の対応する配列、ならびにこのような抗体のフラグメントと同一であるかまたは相同である。典型的には、キメラ抗体は、それらの軽鎖および重鎖の遺伝子が、典型的には、遺伝子操作によって、異なる種に属する抗体の可変領域および定常領域の遺伝子から構築された抗体である。例えば、マウスモノクローナル抗体からの遺伝子の可変セグメントが、イヌ定常セグメントに結合されてもよい。図 2 は、マウス : イヌ IgG の 1 つの実施形態の一般的構造の略図である。この実施形態において、抗原結合部位はマウスから誘導されているのに対して、Fc 部分はイヌである。

#### 【 0 1 0 4 】

本明細書で定義されるような「ヘテロキメラ」という用語は、抗体鎖の 1 つ ( 重鎖または軽鎖 ) がイヌ化されており、一方他はキメラである抗体をいう。図 4 は、ヘテロキメラ分子の 1 つの実施形態を描写する。この実施形態において、イヌ化可変重鎖 ( ここでは、すべての CDR がマウスであり、すべての FR がイヌである ) はキメラ可変軽鎖 ( ここでは、すべての CDR がマウスであり、すべての FR がマウスである ) と対になっている。この実施形態において、可変重鎖と可変軽鎖の両方がイヌの定常領域と融合されている。

#### 【 0 1 0 5 】

「イヌ化」型の非イヌ ( 例えば、マウス ) 抗体は、非イヌ免疫グロブリンから誘導された最小配列を含有する、遺伝子操作された抗体である。「イヌ化」は、イヌにおける治療学として有用である治療を生成するために、非イヌ抗原結合情報を、ドナー抗体から、免疫原性がより少ないイヌ抗体アクセプターまで移すための方法として定義される。イヌ化抗体は、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、または所望の特性、特異性、親和性、および収容能力を有する操作された配列などの非イヌ種 ( ドナー

10

20

30

40

50

抗体)からの超可変領域残基によってレシピエントの超可変領域残基が置き換えられている、イヌの免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある例において、イヌの免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非イヌ残基によって置き換えられている。さらに、イヌ化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体において見いだされない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体の性能をさらに洗練させるために行われる。本明細書に記載されるような超可変領域および/またはフレームワーク領域に対する修飾は、当業者に公知である実験に基づき、各々別々に操作され、スペシエーションされた(イヌ化)抗体について決定され、そして上記の実験の前には予測できない。一般的に、イヌ化抗体は、少なくとも1つの実質的にすべて、典型的には2つの可変ドメインを含み、そこでは、すべてまたは実質的にすべての超可変領域が非イヌの免疫グロブリンの超可変領域に対応し、そしてすべてまたは実質的にすべてのFRがイヌの免疫グロブリン配列のものである。イヌ化抗体は、選択的に、完全な、または少なくとも一部の免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的には、イヌの免疫グロブリンのそれを備える。図3は、マウスIgGのスペシエーションまたはイヌ化を示す1つの実施形態の図解である。この実施形態において、マウスCDRはイヌのフレームワークに移植される。ある場合において、超可変領域の外側であるその中のマウスフレームワークまたは残基は維持されている。

10

#### 【0106】

「組換えイヌ抗体」という語句は、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、コンビナトリアルイヌ抗体ライブラリーから単離された抗体、イヌの免疫グロブリン遺伝子につい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., et al. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20: 6287-6295を参照のこと)、またはイヌ免疫グロブリン遺伝子配列を他のDNA配列までスプライシングすることを含んでいる任意の他の手段によって調製、発現、作製、または単離される抗体などの、組換え手段によって調製、発現、作製、または単離されたイヌ抗体を含む。

20

#### 【0107】

「イヌ抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、標的に対して生成され、そして当業者に周知でありかつ本明細書に記載されているハイブリドーマ法によって調製されるイヌ抗体をいう。

30

#### 【0108】

「ネイティブ抗体」および「ネイティブ免疫グロブリン」は、通常、2つの同一の軽(L)鎖および2つの同一の重(H)鎖から構成される約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は1つの共有結合ジスルフィド結合によって重鎖に連結され、一方ジスルフィド結合の数は様々な免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の間で変動する。各重鎖と軽鎖もまた、規則的に間隔の空いた鎖間のジスルフィド架橋を有する。各重鎖は、一方の末端に可変ドメイン(VH)を有し、続いて多数の定常ドメインを有する。各軽鎖は、一方の末端に可変ドメインを有し(VL)、その他方の末端に定常ドメインを有し;軽鎖の定常ドメインは重鎖の第1の定常ドメインと一緒に配列されており、そして軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと一緒に配列されている。特定のアミノ酸残基は、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインの間の界面を形成すると考えられている。図1は、抗原結合部位を強調表示する、ネイティブマウス免疫グロブリン(IgG)の一般的構造の一例である。

40

#### 【0109】

本明細書における「親の」抗体とは、変異型の調製のために使用されるアミノ酸配列によってコードされているものである。好ましくは、親の抗体は、イヌのフレームワーク領域を有し、そして、存在する場合、イヌ抗体定常領域を有する。例えば、親の抗体はイヌ化抗体またはイヌ抗体であり得る。

#### 【0110】

抗体の重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、免疫グロブリンは、様々なクラ

50

スに割り当てることができる。現在では、5つの主要な免疫グロブリンのクラス：I g A、I g D、I g E、I g G、およびI g Mが存在し、そしてこれらのいくつかは、さらにサブクラス（アイソタイプ）、例えば、I g G<sub>1</sub>、I g G<sub>2</sub>、I g G<sub>3</sub>、I g G<sub>4</sub>、I g A<sub>1</sub>、およびI g A<sub>2</sub>に分けられてもよい（マウスおよびヒトの指定によって規定されるように）。免疫グロブリンの様々なクラスに対応する重鎖定常ドメインは、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、およびミューとそれぞれ呼ばれている。様々なクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および三次元配置は、複数の種において周知である。これらの定常ドメインと関連がある個別のアイソタイプおよび機能活性の普及は種特異的であり、実験的に規定されなければならない。

#### 【0111】

任意の脊椎動物種からの抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（K）およびラムダ（ $\lambda$ ）と呼ばれる2つの明確に区別できる型のうちの1つに割り当てることができる。

#### 【0112】

抗体の「可変領域」は、単独かまたは組み合わせたかのいずれかである、抗体軽鎖の可変領域または抗体重鎖の可変領域をいう。重鎖および軽鎖の可変領域は、各々が、超可変領域としてもまた知られる、3つの相補性決定領域（CDR）によって接続された4つのフレームワーク領域（FR）からなる。各鎖の中のCDRは、FRによって密接な近くに一緒に保持されており、そして他の鎖からのCDRとともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。CDRを決定するために少なくとも2つの技術が存在する：（1）近い種の配列変動性に基づくアプローチ（すなわち、Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)）；および（2）抗原-抗体複合体の結晶学的研究に基づくアプローチ（Chothia et al. (1989) *Nature* 342: 877; AI-Iazikani et al. (1997) *J. Molec. Biol.* 273: 927-948）。本明細書で使用される場合、CDRは、いずれかのアプローチによって、または両方のアプローチの組み合わせによって定義されるCDRをいってもよい。

#### 【0113】

「超可変領域」という用語は、本明細書で使用される場合、抗原結合の原因である抗体のアミノ酸残基をいう。超可変領域は、「相補性決定領域」もしくは「CDR」（Kabat, et al. (1991)、上記）からのアミノ酸残基および/または「超可変ループ」からのアミノ酸残基を備える（Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)。「フレームワーク」または「FR」残基は、本明細書に定義されるような超可変領域以外の可変ドメイン残基である。

#### 【0114】

本明細書で使用される場合、「抗原結合領域」という用語は、抗原と相互作用し、かつ抗体に抗原についての抗体の特異性および親和性を付与するアミノ酸残基を含有する抗体分子の一部をいう。抗体結合領域は、抗原-結合残基の適切なコンホメーションを維持するために必要である「フレームワーク」アミノ酸残基を含む。

#### 【0115】

「機能的Fc領域」は、ネイティブ配列Fc領域の少なくとも1つのエフェクター機能を保有する。例示的な「エフェクター機能」には、C1q結合；補体依存性細胞傷害性（CDC）；Fc受容体結合；新生児受容体結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性（ADCC）；食作用；細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体；BCR）のダウンレギュレーション、などが含まれる。このようなエフェクター機能は、一般的には、Fc領域が、結合ドメイン（例えば、抗体可変ドメイン）と組み合わせられることを必要とし、そしてこのような抗体エフェクター機能を評価するために、当該分野で公知である様々なアッセイを使用して評価できる。

10

20

30

40

50

## 【0116】

「ネイティブ配列Fc領域」は、天然に見い出されるFc領域のアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を備える。「変異型Fc領域」または「変異した」または「変異体」Fc領域は、少なくとも1つのアミノ酸修飾によって、ネイティブ配列Fc領域のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を備え、ネイティブ配列Fc領域の少なくとも1つのエフェクター機能を保持してもよいし、保持しなくてもよい。好ましくは、変異型Fc領域は、ネイティブ配列Fc領域または親のポリペプチドのFc領域と比較して少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば、約1個～約10個のアミノ酸置換、および好ましくは、ネイティブ配列Fc領域または親のポリペプチドのFc領域における約1個～約5個のアミノ酸置換を有する。本明細書における変異型Fc領域は、好ましくは、ネイティブ配列Fc領域および/または親のポリペプチドのFc領域と少なくとも約80%の配列同一性を保有し、そして最も好ましくは、それと少なくとも約90%の配列同一性、より好ましくは、それと少なくとも約95%の配列同一性を保有する。変異型または変異したFc領域はまた、抗体のFc領域の機能を本質的に排除してもよい。例えば、Fc領域変異は、抗体のエフェクター機能を排除してもよい。本発明の1つの実施形態において、本発明の抗体は、変異したFc領域を備える。

10

## 【0117】

本明細書で使用される場合、「Fc受容体」および「FcR」とは、抗体のFc領域に結合する受容体を説明する。好ましいFcRはネイティブ配列FcRである。さらに、好ましいFcRは、IgG抗体(ガンマ受容体)を結合するものであり、FcγRI、FcγRII、およびFcγRIIIサブクラスを受容体を含み、これには、これらの受容体の対立遺伝子多型および選択的スプライシング型が含まれる。FcγRII受容体には、FcγRIIA(「活性化受容体」)およびFcγRIIB(「阻害受容体」)が含まれ、これらは、主としてそれらの細胞質ドメインが異なる類似のアミノ酸配列を有する。FcRは、Ravetch and Kinet, 1991, Ann. Rev. Immunol., 9: 457-92; Capel et al., 1994, Immunomet hods, 4: 25-34; および de Haas et al., 1995, J. Lab. Clin. Med., 126: 330-41において概説されている。「FcR」にはまた、母体のIgGの胎児への移動の原因である、新生児受容体、FcRnもまた含まれる(Guyer et al., 1976, J. Immunol., 117: 587; および Kim et al., 1994, J. Immunol., 24: 249)。

20

30

## 【0118】

本明細書で使用される場合、「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性」および「ADCC」とは、Fc受容体(FcR)(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、およびマクロファージ)を発現する非特異的細胞傷害性細胞が、標的細胞上の結合抗体を認識し、続いて、標的細胞の溶解を引き起こす、細胞媒介性反応をいう。目的の分子のADCC活性は、例えば、米国特許第5,500,362号または同第5,821,337号に記載されているようなインビトロADCCアッセイを使用して評価できる。このようなアッセイのための有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(PBMC)およびNK細胞が含まれる。あるいは、または加えて、目的の分子のADCC活性は、インビボで、例えば、Clynes et al., 1998, PNAS(USA), 95: 652-656に開示されるもののような動物モデルにおいて、評価されてもよい。

40

## 【0119】

「補体依存性細胞傷害性」および「CDC」とは、補体の存在下で標的の溶解をいう。補体活性化経路は、同種抗原と複合体化した分子(例えば、抗体)への補体系の第1の成分(C1q)の結合によって開始される。補体活性化を評価するために、例えば、Gaz zano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202: 163(1996)において記載されたようなCDCアッセイが実施されてもよい。

## 【0120】

抗体のパイン消化は、「Fab」フラグメントと呼ばれる2つの同一の抗原結合フラ

50

グメントを産生し、各々が単一の抗原結合部位、および残りの「F c」フラグメントを有し、この名称は容易に結晶化するその能力を反映している。ペプシン処理は、2つの抗原結合部位を有し、なお抗原を架橋することが可能である、F(a b')<sub>2</sub>フラグメントを生み出す。

【0121】

F a bフラグメントはまた、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'フラグメントは、抗体ヒンジ領域からの1つ以上のシステインを含む重鎖C H 1ドメインのカルボキシ末端におけるいくつかの残基の付加によってF a bフラグメントとは異なる。F a b' - S Hは、定常ドメインのシステイン残基が遊離のチオール基を有しているF a b'についての本明細書での命名である。F(a b')<sub>2</sub>抗体フラグメントは、元々は、間にヒンジシステインを有するF a b'フラグメントの対として産生された。抗体フラグメントの他の化学カップリングもまた公知である。

10

【0122】

「F v」は、完全な抗原認識および結合部位を含有する最小抗体フラグメントである。この領域は、緊密な非共有結合的な会合である、1つの重鎖と1つの軽鎖可変ドメインのダイマーからなる。各可変ドメインの3つの超可変領域が、V<sub>H</sub> - V<sub>L</sub>ダイマーの表面上の抗原結合部位を規定するように相互作用するのはこの立体配置の中である。集散的に、6個の超可変領域は、抗原結合の特異性を抗体に付与する。しかし、単一の可変ドメイン(または抗原に特異的な3つのみの超可変領域を備えるF vの半分)でさえもが抗原を認識および結合する能力を有するが、全体の結合部位よりも低い親和性である。

20

【0123】

「抗原」とは、本明細書で使用される場合、本明細書に記載されるような抗原結合タンパク質または抗体のC D Rによって認識される抗原決定基をいう。換言すれば、エピトープとは、抗体によって認識可能であり、そして抗体によって結合可能である任意の分子の一部をいう。他に示されない限り、「エピトープ」という用語は、本明細書で使用される場合、抗N G F抗原結合タンパク質/抗体/因子が結合するN G Fの領域をいう。

【0124】

「抗原結合ドメイン」、「抗体の活性フラグメント」などの用語は、抗原の一部またはすべてに対して特異的に結合するか、または相補的である領域を備える抗体または抗原結合タンパク質の部分の部分をいう。抗原が大きい場合、抗体は抗原の特定の部分にのみ結合してもよい。「エピトープ」、「エピトープの活性フラグメント」、または「抗原決定基」などは、抗体の抗原結合ドメインとの特異的相互作用の原因である抗原分子の一部である。抗原結合ドメインは、1つ以上の抗体可変ドメイン(例えば、V Hドメインからなる、いわゆるF d抗体フラグメント)によって提供されてもよい。抗原結合ドメインは、抗体軽鎖可変ドメイン(V L)および抗体重鎖可変ドメイン(V H)を備えてもよい(米国特許第5,565,332号)。

30

【0125】

抗体の「結合部分」(または「抗体部分」)または抗原結合ポリペプチドなどの用語は、1つ以上の完全なドメイン、例えば、完全なドメインの対、ならびに、抗原、例えば、N G Fに特異的に結合する能力を保持している抗体のフラグメントを含む。抗体の結合機能は全長抗体のフラグメントによって実施できることが示されてきた。結合フラグメントは、組換えD N A技術によって、またはインタクトな免疫グロブリンの酵素的もしくは化学的な切断によって産生される。結合フラグメントには、F a b、F a b'、F(a b')<sub>2</sub>、F a b c、F d、d A b、F v、単鎖、単鎖抗体、例えば、s c F v、および単ドメイン抗体(M u y l d e r m a n s e t a l . , 2 0 0 1 , 2 6 : 2 3 0 - 5)、ならびに単離された相補性決定領域(C D R)が含まれる。F a bフラグメントは、V L、V H、C L、およびC H 1ドメインからなる一価フラグメントである。F(a b')<sub>2</sub>フラグメントは、ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結された2つのF a bフラグメントを備える二価フラグメントである。F dフラグメントはV HドメインおよびC H 1ドメインからなり、そしてF vフラグメントは、抗体の単一アームのV Lドメイ

40

50

ンおよびVHドメインからなる。dAbフラグメントはVHドメインからなる(Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546)。Fvフラグメントの2つのドメイン、VLおよびVHが別々の遺伝子によってコードされる一方、これらは、組換え方法を使用して、VL領域とVH領域が一価分子を形成するために対となる単鎖タンパク質鎖(単鎖Fv(scFv)として知られる)として作製されることを可能にする合成リンカーによって、連結できる(Bird et al., 1988, Science 242: 423-426)。このような単鎖抗体はまた、抗体の「結合部分」という用語の中に包含されることが意図される。ディアボディなどの他の型の単鎖抗体もまた包含される。ディアボディは、二価の、二特異的抗体であり、ここでは、VHドメインおよびVLドメインは、単一のポリペプチド鎖上で発現されるが、同じ鎖上の2つのドメイン間で対を作ること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、別の鎖の相補的ドメインと対を作ることをドメインに強制し、そして、2つの抗原結合部位を作製する(例えば、Holliger, et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448を参照のこと)。抗体またはその結合部分はまた、抗体または抗体部分の、1つ以上の他のタンパク質またはペプチドとの共有結合的または非共有結合的な会合によって形成される、より大きな免疫付着分子の一部であってもよい。このような免疫付着分子の例には、四量体scFv分子を作るためのストレプトアビジンコア領域の使用(Kipriyanov, S.M., et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6: 93-101)、および二価かつビオチン化scFv分子を作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(Kipriyanov, S.M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31: 1047-1058)の使用が含まれる。FabおよびF(ab')<sub>2</sub>フラグメントなどの結合フラグメントは、それぞれ、全体の抗体の、パインまたはペプシン消化などの従来的な技術を使用して、全体の抗体から調製できる。さらに、抗体、抗体部分、および免疫付着分子は、本明細書に記載されているような、および当該分野に公知であるような、標準的な組換えDNA技術を使用して得ることができる。「二特異的」または「二機能的」抗体以外は、抗体は、同一であるその結合部位の各々を有すると理解される。「二特異的」または「二機能的抗体」は、2つの異なる重鎖/軽鎖の対および2つの異なる結合部位を有する人工的なハイブリッド抗体である。二特異的抗体はまた、介在定常領域を伴う2つの抗原結合領域を含むことができる。二特異的抗体は、ハイブリドーマの融合またはFab'フラグメントの連結を含む様々な方法によって産生できる。例えば、Songsivilai et al., Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321, 1990.; Kostelný et al., 1992, J. Immunol. 148, 1547-1553を参照のこと。

#### 【0126】

「復帰突然変異」という用語は、イヌ抗体の体細胞変異したアミノ酸のいくつかまたはすべてが相同生殖系列抗体配列からの対応する生殖系列残基で置き換えられるプロセスをいう。本発明のイヌ抗体の重鎖および軽鎖の配列は、最高の相同性を有する配列を同定するために、生殖系列配列と別々に整列される。本発明のイヌ抗体の差異は、このような異なるアミノ酸をコードする規定されたヌクレオチド位置を変異させることによって、生殖系列配列に戻される。復帰突然変異のための候補としてこのように同定された各アミノ酸の役割は、抗原結合における直接的または間接的な役割について調べられるべきであり、そしてイヌ抗体の任意の望ましい特徴に影響を与えることが変異後に見い出された任意のアミノ酸は、最終的なイヌ抗体の中に含まれるべきではない；一例として、選択的変異誘発アプローチによって同定された、活性を増強させるアミノ酸は、逆変異誘発には供せられない。最も近い生殖系列配列とは異なるが、第2の生殖系列における対応するアミノ酸と同一であることが見い出されたこれらのアミノ酸の位置は、第2の生殖系列配列が本発明のイヌ抗体の配列と同一でありかつ共線的であるならば、逆変異誘発に供せられるアミノ酸の数を最小化するために、そのままの状態であり得る。対応するドナー残基への

10

20

30

40

50

選択された標的フレームワーク残基の復帰突然変異は、親和性を回復し、およびまたは改善するために必要とされるかもしれない。

【0127】

本明細書で使用される場合、抗体の「免疫特異的」結合とは、抗体の抗原結合部位と、その抗体によって認識される特定の抗原の間で起こる抗原特異的な結合相互作用をいう（すなわち、抗体は、ELISAまたは他のイムノアッセイにおいてタンパク質と反応し、そして関連がないタンパク質とは検出可能に反応しない）。抗体またはポリペプチドに「特異的に結合」または「優先的に結合」（本明細書で交換可能に使用される）エピトープは、当該分野において十分に理解されている用語であり、このような特異的または優先的な結合を決定する方法はもまた、当該分野において周知である。分子は、代わりの細胞または物質よりも、より頻度が高く、より迅速に、より長期間、および/またはより高い親和性で特定の細胞または物質と反応または会合するならば、「特異的な結合」または「優先的な結合」を示すといわれる。抗体は、他の物質に結合するよりも、より親和性が高く、より結合力が高く、より容易に、および/またはより長期間結合するならば、標的に「特異的に結合」または「優先的に結合」する。例えば、あるNGFエピトープに特異的にまたは優先的に結合する抗体は、他のNGFエピトープまたは非NGFエピトープに結合するよりも、より親和性が高く、より結合力が高く、より容易に、および/またはより長期間、このNGFエピトープに結合する抗体である。この定義を読むことによって、例えば、第1の標的に特異的にまたは優先的に結合する抗体（または部分またはエピトープ）は、第2の抗体に特異的にまたは優先的に結合してもよいし、結合しなくてもよいこともまた理解される。このようなものとして、「特異的結合」または「優先的結合」は、排他的な結合を必ずしも要求しない（それを含めることはできるが）。一般的に、必ずしも必要ではないが、結合への言及は、優先的結合を意味する。

10

20

【0128】

抗体結合の文脈での「特異的に」という用語は、特異的抗原、すなわち、ポリペプチドまたはエピトープへの抗体の高結合力および/または高親和性結合をいう。抗体特異的にある抗原を結合することは、同じ抗体の他の抗原への結合よりも強力である。あるポリペプチドに特異的に結合する抗体は、弱いが、なお検出可能なレベルで、他のポリペプチドを結合することが可能であり得る（例えば、目的のポリペプチドへの示される結合の10%以下）。このような弱い結合、すなわち、バックグラウンド結合は、例えば、適切な対照の使用によって、対象のポリペプチドへの特異的抗体結合から容易に識別できる。一般的に、特異的抗体は、 $10^{-7}$ M以下、例えば、 $10^{-8}$ M以下、例えば、 $10^{-9}$ M以下、 $10^{-10}$ 以下、 $10^{-11}$ 以下、 $10^{-12}$ 以下、または $10^{-13}$ 以下、などの $K_d$ の結合親和性で抗原に結合する。

30

【0129】

本明細書で使用される場合、「親和性」という用語は、抗原決定基との単一の抗原結合部位の結合の強化をいう。親和性は、抗体または抗原結合タンパク質結合部位と、抗原決定基の間の立体化学的な一致の密接さ、これらの間の接触の領域のサイズ、電荷を有する基と疎水性基の分布などに依存する。抗体の親和性は、平衡分析によって、または表面プラズモン共鳴 - 「SPR」法（例えば、BIACORE（商標））によって測定できる。SPR法は、表面プラズモン共鳴（SPR）の現象に依存しており、これは、表面プラズモン波が金属/液体の界面で励起されるときに起こる。光は、サンプルと接触していない表面の側に方向付けられ、そこから反射し、そしてSPRは、特定の角度と波長の組み合わせで光強度の反射の減少を引き起こす。生体分子結合事象は、表面層における屈折率の変化を引き起こし、これは、SPRシグナルの変化として検出される。

40

【0130】

「 $K_d$ 」という用語は、本明細書で使用される場合、抗体 - 抗原相互作用の解離定数をいうことが意図される。解離定数、 $K_d$ 、および結合定数、 $K_a$ は、親和性の定量的な尺度である。平衡状態においては、遊離の抗原（ $A_g$ ）および遊離の抗体（ $A_b$ ）は、抗原 - 抗体複合体（ $A_g - A_b$ ）と平衡状態にあり、そして速度定数、 $k_a$ および $k_d$ は、個

50

々の反応の速度を定量する。平衡状態においては、 $k_a [A b] [A g] = k_d [A g - A b]$ である。解離定数、 $K_d$ は： $K_d = k_d / k_a = [A g] [A b] / [A g - A b]$ によって与えられる。 $K_d$ は濃度の単位を有し、最も典型的には、M、mM、 $\mu M$ 、nM、pMなどである。 $K_d$ として表現された抗体親和性を比較するとき、NGFについてより高い親和性を有することは、より低い値によって示される。結合定数、 $K_a$ は： $K_a = k_a / k_d = [A g - A b] / [A g] [A b]$ によって与えられる。 $K_a$ は濃度の逆数の単位であり、最も典型的には、 $M^{-1}$ 、 $mM^{-1}$ 、 $\mu M^{-1}$ 、 $nM^{-1}$ 、 $pM^{-1}$ 、などである。本明細書で使用される場合、「結合力」という用語は、可逆的複合体の形成後の抗原-抗体結合の強さをいう。抗NGF抗体は、約(より低い $K_d$ 値)から約(より高い $K_d$ 値)までの範囲の解離定数( $K_d$ )を伴う結合として、NGFタンパク質へのそれらの結合

10

## 【0131】

「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、任意の長さのアミノ酸のポリマーをいうために本明細書で交換可能に使用される。このポリマーは直鎖状であってもよく、分枝鎖であってもよく、これは修飾アミノ酸を備えてもよく、そしてこれは非アミノ酸によって中断されてもよい。この用語はまた、天然にまたは介入によって；例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または標識成分との結合体化などの任意の他の操作もしくは修飾によって修飾されたアミノ酸ポリマーを包含する。この定義の中には、例えば、アミノ酸の1つ以上のアナログ(例えば、非天然アミノ酸を含む)、ならびに当該分野において公知である他の修飾を含有するポリペプチドもまた含まれる。本発明のポリペプチドは抗体に基づいているので、ポリペプチドは単鎖または会合した鎖として存在することができることが理解される。

20

## 【0132】

「保存性アミノ酸置換」という用語は、所定のアミノ酸残基についての任意のアミノ酸置換を示し、ここでは、置換残基は、所定の残基と化学的に類似であるので、ポリペプチド機能(例えば、酵素活性)の実質的な減少は生じない。保存性アミノ酸置換は、当該分野において一般に公知であり、その例は、例えば、米国特許第6,790,639号、同第6,774,107号、同第6,194,167号、または同第5,350,576号に記載されている。好ましい実施形態において、保存性アミノ酸置換は、以下の6つのグループの1つの中に存在するいずれかである：

30

- ・ 1 . 小さな脂肪族、実質的に非極性の残基：Ala、Gly、Pro、Ser、およびThr；
- ・ 2 . 大きな脂肪族、非極性残基：Ile、Leu、およびVal；Met；
- ・ 3 . 極性、負に荷電した残基およびそれらのアミド：AspおよびGlu；
- ・ 4 . 極性、負に荷電した残基のアミド：AsnおよびGln；His；
- ・ 5 . 極性、正に荷電した残基：ArgおよびLys；His；ならびに
- ・ 6 . 大きな芳香族残基：TrpおよびTyr；Phe。

## 【0133】

好ましい実施形態において、保存性アミノ酸置換は、ネイティブ残基(保存性置換)対として列挙されている以下のいずれか1つである：Ala(Ser)；Arg(Lys)；Asn(Gln；His)；Asp(Glu)；Gln(Asn)；Glu(Asp)；Gly(Pro)；His(Asn；Gln)；Ile(Leu；Val)；Leu(Ile；Val)；Lys(Arg；Gln；Glu)；Met(Leu；Ile)；Phe(Met；Leu；Tyr)；Ser(Thr)；Thr(Ser)；Trp(Tyr)；Tyr(Trp；Phe)；およびVal(Ile；Leu)。

40

## 【0134】

「核酸」、「ポリヌクレオチド」、「核酸分子」などの用語は、本明細書では交換可能に使用されてもよく、DNAおよびRNAの中の一連のヌクレオチド塩基(ヌクレオチドとも呼ばれる)をいう。この核酸は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、お

50

よび/またはこれらのアナログを含有してもよい。「核酸」という用語は、例えば、単鎖分子および二本鎖分子を含む。核酸は、例えば、遺伝子または遺伝子フラグメント、エキソン、イントロン、DNA分子(例えば、cDNA)、RNA分子(例えば、mRNA)、組換え核酸、プラスミド、および他のベクター、プライマー、およびプローブであり得る。5'から3'(センス)と3'から5'(アンチセンス)の両方のポリヌクレオチドが含まれる。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドもしくは塩基、および/またはこれらのアナログ、またはDNAもしくはRNAポリメラーゼによってポリマーに取り込むことができる任意の基質であり得る。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびそれらのアナログなどの修飾ヌクレオチドを備えてもよい。存在する場合、ヌクレオチド構造への修飾は、ポリマーのアセンブリーの前後で付与されてもよい。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断されてもよい。ポリヌクレオチドは、標識成分との結合体化などによって、ポリマー化の後でさらに修飾されてもよい。他の型の修飾には、例えば、「キャップ」、1つ以上の天然に存在するヌクレオチドのアナログとの置換、ヌクレオチド間修飾、例えば、荷電していない連結(例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カバメートなど)および荷電した連結(例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど)を伴うもの、ペンダント部分を含有するもの、例えば、タンパク質など(例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど)、インターカレーターを伴うもの(例えば、アクリジン、ソラレンなど)、キレート剤を含有するもの(例えば、金属、放射性金属、ボロン、酸化金属など)、アルキル化剤を含有するもの、修飾リンカーを伴うもの(例えば、アルファアノマー核酸など)、ならびに非修飾型のポリペプチドが含まれる。さらに、糖の中に通常存在する任意のヒドロキシル基は、例えば、ホスホネート基、リン酸基によって置き換えられてもよく、標準的な保護基によって保護されてもよく、または、さらなるヌクレオチドにさらなる連結を準備するために活性化されてもよく、あるいは、固体支持体に結合体化されてもよい。5'および3'末端OHは、リン酸化でき、またはアミンもしくは1個~20個の炭素原子の有機キャッピング基部分で置き換えできる。他のヒドロキシルもまた、標準的な保護基に誘導体化されてもよい。ポリヌクレオチドはまた、当該分野において一般的に公知であるリボースまたはデオキシリボース糖の類似型を含有でき、これには、例えば、2'-O-メチル-、2'-O-アリル、2'-フルオロ-または2'-アジド-リボース、炭素環糖アナログ、アノマー糖、エピマー糖、例えば、アラビノース、キシロース、またはリキソース、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプトロース、非環式アナログ、および脱塩基ヌクレオシドアナログ、例えば、メチルリボシドが含まれる。1つ以上のホスホジエステル結合は、代替の結合基によって置き換えられてもよい。これらの代替の連結基には、リン酸が、P(O)S(「チオエート」)、P(S)S(「ジチオエート」)、(O)NR<sub>2</sub>(「アミデート」)、P(O)R、P(O)OR'、CO、またはCH<sub>2</sub>(「ホルムアセタール」)によって置き換えられており、各RまたはR'は、独立してHまたは置換されたもしくは置換されていない、エーテル(-O-)結合、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、またはアラリジル(aryl)を任意に含有する、アルキル(1-20C)である実施形態が含まれるがこれらに限定されない。ポリヌクレオチド中のすべての結合が同一である必要はない。先の説明は、RNAおよびDNAを含む、本明細書で言及されるすべてのポリヌクレオチドに適用される。

#### 【0135】

本明細書で使用される場合、「ベクター」とは、目的の1つ以上の遺伝子または配列を宿主細胞中に送達し、そして好ましくは発現することが可能な構築物を意味する。ベクターの例には、ウイルスベクター、裸のDNAまたはRNA発現ベクター、プラスミド、コスミドまたはファージベクター、カチオン性縮合剤が付随するDNAまたはRNA発現ベクター、リボソームにカプセル化されたDNAまたはRNA発現ベクター、および特定の真核細胞、例えば、プロデューサー細胞が挙げられるがこれらに限定されない。本明細書に記載されるようなベクターは、核酸の転写を方向付ける核酸配列であることを意味する

10

20

30

40

50

発現制御配列を有する。発現制御配列は、プロモーター、例えば、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターであるか、またはエンハンサーであり得る。発現制御配列は、転写される核酸配列に「作動可能に連結」されている。核酸は、別の核酸配列との機能的関連性に置かれているときに、「作動可能に連結」されている。例えば、プレ配列または分泌リーダーのためのDNAは、ポリペプチドの分泌に關与するプレタンパク質として発現されるならば、ポリペプチドのためのDNAに作動可能に連結されている；プロモーターまたはエンハンサーは、配列の転写に影響を与えるならば、コード配列に作動可能に連結されている；あるいは、リボソーム結合部位は、翻訳を容易にするために配置されるならば、コード配列に作動可能に連結されている。一般的に、「作動可能に連結」とは、連結されているDNA配列が連続的であり、そして分泌リーダーの場合には、連続的でありかつリーディングフェーズの中にあることを意味する。しかし、エンハンサーは、連続的でなければならないわけではない。連結は、便利な制限部位におけるライゲーションによって達成される。このような部位が存在しないならば、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが、従来の実務に従って使用される。

10

20

30

40

50

#### 【0136】

ちょうどポリペプチドが保存性アミノ酸置換を含有するかもしれないのと同様に、それらのポリヌクレオチドは、保存性コドン置換を含有してもよい。コドン置換は、発現したときに、それが上記のように保存性アミノ酸置換を産生するならば、保存性であると見なされる。アミノ酸の置換を生じない縮重コドン置換もまた、本発明に従うポリヌクレオチドにおいて有用である。従って、例えば、本発明の1つの実施形態において有用である選択されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、それを用いて形質転換される発現宿主細胞によって示されるコドン使用頻度に近似するため、または他にその発現を改善するために、縮重コドン置換によって変異されてもよい。

#### 【0137】

「変異型」抗NGF抗体は、本明細書では、親の抗体配列における1つ以上のアミノ酸残基の付加、欠失、および/または置換によって「親の」抗NGF抗体アミノ酸配列とはアミノ酸配列が異なり、ならびに親の抗NGF-抗体の少なくとも1つの所望の活性を保持する分子をいう。変異型抗NGFは、本明細書に記載されるように、抗体の超可変領域において保存性アミノ酸置換を備えてもよい。所望される活性には、特異的に抗原を結合する能力、動物においてNGF活性を減少し、阻害し、または中和する能力を含めることができる。1つの実施形態において、変異型は、親の抗体の1つ以上の超可変領域および/またはフレームワーク領域において1つ以上のアミノ酸置換を備える。例えば、変異型は、親の抗体の1つ以上の超可変領域および/またはフレームワーク領域において、少なくとも1つ、例えば、約1個～約10個、好ましくは、約2個～約5個の置換を備えてもよい。通常、変異型は、親の抗体重鎖または軽鎖可変ドメイン配列と、少なくとも50%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも65%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%。そして最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。この配列に関する同一性または相同性は、必要な場合、最大の配列同一性パーセントを達成するために、配列を整列し、ギャップを導入した後で、親の抗体残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして本明細書で定義される。抗体配列へのN末端、C末端、または内部の伸長、欠失、または挿入はどれも、配列同一性または相同性に影響を与えると解釈されるべきではない。変異型はNGFを結合する能力を保持し、好ましくは、親の抗体と同程度または親より優れた所望の活性を有する。例えば、変異型は、より強力な結合親和性、動物においてNGF活性を減少、阻害、もしくは中和する増強された能力、ならびに/またはNGFがTrk Aおよびp75に結合することを阻害する増強された能力を有してもよい。

#### 【0138】

高親和性NGF受容体と見なされているTrk Aは、神経栄養性チロシンキナーゼ受容体(NTKR)ファミリーのメンバーである。このキナーゼは、ニューロトロフィン結

合の際に、それ自体をリン酸化（自己リン酸化）し、そしてMAPK経路のメンバーをリン酸化する、膜結合型受容体である。このキナーゼの存在は細胞分化に導き、感覚ニューロンサブタイプを特定する際に役割を果たすかもしれない。p75受容体は、低親和性NGF受容体と見なされている。

【0139】

「変異型」核酸とは、本明細書では、「親の」核酸とは配列が異なる分子をいう。ポリヌクレオチド配列の相違は、1つ以上のヌクレオチドの欠失、置換、または付加などの突然変異的な変化から生じるかもしれない。これらの変化の各々は、所定の配列において、単独でまたは組み合わせて、1回以上起こるかもしれない。

【0140】

「単離された」という用語は、物質（例えば、抗体または核酸）が、その天然の環境の成分から分離および/または回収されていることを意味する。その天然の環境の夾雑成分は、その物質についての診断的または治療的使用と干渉する物質であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性の溶質を含むかもしれない。核酸に関しては、単離された核酸は、染色体中で通常付随している5'から3'の配列から分離されているものを含んでもよい。好ましい実施形態において、この物質は、その物質の95重量%より上まで精製され、最も好ましくは、99重量%より上である。単離された物質は、組換え細胞中の物質をインサイチュで含む。なぜなら、その物質の天然の環境の少なくとも1つの成分が存在していないからである。しかし、通常、単離された物質は少なくとも1つの精製工程によって調製される。

【0141】

本明細書で使用される場合、「細胞」、「細胞系統」、および「細胞培養」という用語は、交換可能に使用されてもよい。これらのすべての用語はまた、それらの子孫も含み、これらは、任意のおよびすべての次に続く世代である。意図的な変異または故意でない変異に起因して、すべての子孫は同一でなくてもよいことが理解される。異種核酸配列を発現することの文脈において、「宿主細胞」とは、インビトロで配置されるかまたはインビボで配置されるかに関わらない、原核生物または真核生物（例えば、細菌細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞、および昆虫細胞）をいう。例えば、宿主細胞は、トランスジェニック動物の中に配置されてもよい。宿主細胞は、ベクターのためのレシピエントとして使用でき、そしてベクターを複製し、および/またはベクターによってコードされている異種核酸を発現することが可能である、任意の形質転換可能な生物を含んでもよい。

【0142】

「標識」という言葉は、本明細書で使用されるとき、抗体または核酸に直接的または間接的に結合体化されている、検出可能な化合物または組成物をいう。標識は、それ自体、それ自体によって検出可能であってもよく（例えば、ラジオアイソトープ標識または蛍光標識）、または、酵素標識の場合において、検出可能である基質化合物または組成物の化学的变化を触媒してもよい。

【0143】

「被験体」または「患者」とは、本発明の分子によって影響を受けることができる、治療の必要がある動物をいう。本発明に従って治療できる動物には脊椎動物が含まれ、イヌなどの哺乳動物は特に好ましい例である。

【0144】

「組成物」は、化学的組成物、生物学的組成物、または生物学的治療剤（特に、本明細書に記載されるような抗原結合タンパク質）、および、不活性（例えば、標識）または活性な、例えば、アジュバントであり得る別の化合物または組成物であるか否かに関わらず、活性薬剤の組み合わせを意味することが意図される。

【0145】

本明細書で使用される場合、本発明における使用のために適切な「薬学的に受容可能なキャリア」は、当業者に周知である。このようなキャリアには、非限定的に、水、緩衝液生理食塩水、リン酸緩衝液、アルコール/水溶液、エマルジョンまたは懸濁液が挙げられ

10

20

30

40

50

る。他の従来的に利用される希釈剤、アジュバント、および賦形剤は、従来的な技術に従って加えられてもよい。このようなキャリアには、エタノール、ポリオール、および適切なそれらの混合物、植物油、および注射用有機エステルを含むことができる。緩衝液およびpH調整剤もまた、利用されてもよい。緩衝液には、非限定的に、有機酸または塩基から調製された塩が挙げられる。代表的な緩衝液には、非限定的に、クエン酸の塩などの有機酸塩、例えば、クエン酸塩、アスコルビン酸塩、グルコン酸塩、ヒスチジン - H e l、炭酸塩、酒石酸塩、コハク酸塩、酢酸塩、またはフタル酸塩、T r i s、トリメタミン ( t r i m e t h a m i n e ) 塩酸塩、またはリン酸緩衝液が挙げられる。非経口的キャリアには、塩化ナトリウム溶液、リンガー液デキストロース、デキストロース、トレハロース、スクロース、および塩化ナトリウム、乳酸加リンガー液、または固定油を含めることができる。静脈内キャリアには、体液および栄養補給液、電解質補給液、例えば、リンガー液デキストロースなどに基づくものなどを含めることができる。保存剤、および、例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤 (例えば、E D T A)、不活性ガスなどのような他の添加物もまた、薬学的キャリアの中で提供されてもよい。本発明は、キャリアの選択によって限定されない。適切なpH、等張性、安定性、および他の便利な特徴を有する、上記の成分からのこれらの薬学的に受容可能な組成物の調製は、当業者の範囲内である、例えば、R e m i n g t o n : T h e S c i e n c e a n d P r a c t i c e o f P h a r m a c y , 2 0 t h e d , L i p p i n c o t t W i l l i a m s & W i l k i n s , p u b l . , 2 0 0 0 ; および T h e H a n d b o o k o f P h a r m a c e u t i c a l E x c i p i e n t s , 4 . s u p . t h e d i t . , e d s . R . C . R o w e e t a l , A P h A P u b l i c a t i o n s , 2 0 0 3 などのテキストを参照のこと。

10

20

#### 【0146】

「治療有効量」(または「有効量」とは、被験体または患者に投与したときに、有益または所望の結果をもたらすために十分である、活性成分、例えば、本発明に従う薬剤の量をいう。有効量は、1回以上の投与、適用、または投薬量で投与できる。本発明に従う組成物の治療有効量は、当業者によって容易に決定されてもよい。本発明の文脈において、「治療有効量」は、痛みの感覚の緩和または減少などの臨床結果を含む有益なまたは所望の結果をもたらすために十分である、NGF関連状態に付随する1つ以上のパラメーターの客観的に測定された変化を産生するものである。有効量は、1回以上の投与で投与できる。本発明の目的のために、薬物、化合物、または薬学的組成物の有効量は、手術後の痛み、関節リウマチの痛み、および/または骨関節炎の痛みを含む痛みを治療し、寛解し、その強さを減少し、および/または予防するために十分な量である。ある実施形態において、「有効量」は、休息時の痛み(休息痛)、または機械的に誘導される痛み(動作後の痛みを含む)、または両方を減少させてもよく、これは、痛み刺激の前、その間、またはその後投与されてもよい。臨床文脈において理解されるように、薬物、化合物、または薬学的組成物の有効量は、別の薬物、化合物、または薬学的組成物と組み合わせて達成されてもよいし、されなくてもよい。従って、「有効量」は、1種以上の治療剤を投与することの文脈において考慮されてもよいし、1種以上の他の薬剤と組み合わせて、所望の効果が達成されるかもしれないか、または達成されるならば、単一の薬剤が有効量で与えられることが考慮されてもよい。当然、治療有効量は、治療される特定の被験体および状態、被験体の体重および年齢、状態の重篤度、選択された特定の化合物、後に続く投薬計画、投与のタイミング、投与の様式などに依存して変動し、これらのすべてが、当業者によって容易に決定できる。

30

40

#### 【0147】

本明細書で使用される場合、「治療」という用語は、疾患、状態、または障害のための治療の全体のスペクトルを包含する。本発明の「治療」剤は、リスクがあると同定できる動物を標的とするように設計された手順を取り込むものを含む、予防的もしくは妨害的な様式で(薬理遺伝学);または、天然で寛解的もしくは治癒的である様式で作用してもよく;または、治療される疾患もしくは障害の少なくとも1つの徴候の進行の速度もしくはは

50

程度を遅延させるように作用してもよい。

【0148】

さらなる態様において、本発明は、本発明の抗体が治療的または予防的な使用のために提供される、獣医学的組成物を特徴とする。本発明は、特定の抗原、例えば、疾患または状態と関連するものを有するイヌ被験体を治療するための方法の特徴とする。この方法は、本明細書に記載される組換え抗体を用いて、特定の抗原に特異的な治療有効量の組換え抗体を投与する工程を含む。

【0149】

治療効果を産生するために有用な抗体の量は、当業者に周知である標準的な技術によって決定できる。これらの抗体は、薬学的に受容可能な緩衝液中で、標準的な技術によって一般的に提供され、任意の所望の経路によって投与されてもよい。本発明の抗体または抗原結合部分の投与の経路は、経口、非経口、吸入による、または局所的であってもよい。好ましい実施形態において、投与の経路は非経口である。本明細書で使用されるような非経口という用語には、静脈内、筋肉内、皮下、直腸、腔、または腹腔内の投与が含まれる。

10

【0150】

本明細書で使用される「痛み」とは、急性および慢性の痛み、ならびに炎症性要素を伴う任意の痛みを含む、任意の病因の痛みをいう。痛みの例には、炎症性の痛み、手術切開後の痛み、神経障害の痛み、骨折の痛み、骨粗しょう症骨折の痛み、ヘルペス後神経痛、癌の痛み、熱傷（burn）から生じる痛み、熱傷または創傷と関連する痛み、外傷と関連する痛み（外傷性頭部損傷を含む）、神経障害の痛み、関節リウマチ、骨関節炎、強直性脊椎炎、血清陰性（非リウマチ）関節症、非関節リウマチおよび関節周囲障害などの筋骨格障害と関連する痛み、ならびに癌と関連する痛み（「突出痛」および末期癌と関連する痛みを含む）、末梢神経障害、ならびにヘルペス後神経痛が挙げられる。

20

【0151】

本明細書で使用される場合、「治療」とは、有益なまたは所望の臨床結果を得るためのアプローチである。本発明の目的のための有益なまたは所望の臨床結果には、以下の1つ以上が挙げられるがこれらに限定されない：急性、慢性、炎症性、神経障害性、手術後の痛み、関節リウマチの痛み、または骨関節炎の痛みが挙げられる、痛みの任意の態様の改善または緩和。本発明の目的のために、有益なまたは所望の臨床結果には、以下の1つ以上が挙げられるがこれらに限定されない：重篤度を軽減すること、任意の痛みの態様を含む痛みと関連する1つ以上の徴候の緩和（痛みの期間の短縮、痛みの感度または感覚の減少など）。

30

【0152】

NGF関連障害とは、本明細書に記載される場合、循環器疾患、アテローム性動脈硬化症、肥満、2型糖尿病、代謝症候群、痛み、および炎症を含む障害をいう。本発明のある実施形態において、NGF関連障害とは、痛み、特に、慢性の痛み、炎症性の痛み、手術切開後の痛み、神経障害の痛み、骨折の痛み、骨粗しょう症骨折の痛み、ヘルペス後神経痛、癌の痛み、熱傷（burn）から生じる痛み、熱傷または創傷と関連する痛み、外傷と関連する痛み（外傷性頭部損傷を含む）、神経障害の痛み、関節リウマチ、骨関節炎、強直性脊椎炎、血清陰性（非リウマチ）関節症、非関節リウマチおよび関節周囲障害などの筋骨格障害と関連する痛み、ならびに癌と関連する痛み（「突出痛」および末期癌と関連する痛みを含む）、末梢神経障害、ならびにヘルペス後神経痛をいう。

40

【0153】

痛みの「発生の減少」とは、重篤度の減少（この状態のために必要なものの減少、および/または、例えば、鎮静剤を含む、この状態のために一般的に使用される他の薬物および/または治療の量（例えば、曝露の量）の減少）、期間の減少、および/または頻度の減少（例えば、個体における手術後の痛みまでの時間を遅延または増加させることを含む）のいずれかを意味する。当業者によって理解されているように、個体は、治療に対するそれらの応答によって変動する可能性があり、このようなものとして、例えば、「個体に

50

おける関節リウマチの痛みまたは骨関節炎の痛みの発生を減少させる方法」は、このような投与は特定の個体におけるこのような発生の減少を引き起こす可能性が高いという合理的な予想に基づいて、抗NGFアンタゴニスト抗体を投与することを反映している。

【0154】

痛みまたは痛みの1つ以上の徴候（関節リウマチの痛みまたは骨関節炎の痛みなど）を「寛解する」とは、抗NGFアンタゴニスト抗体を投与しないことと比較した場合の、痛みの1つ以上の徴候の軽減または改善を意味する。「寛解」は、徴候の期間の短縮または減少もまた含む。

【0155】

痛みまたは痛みの1つ以上の徴候（関節リウマチの痛みまたは骨関節炎の痛みなど）を「緩和する」とは、本発明に従って抗NGFアンタゴニスト抗体で治療された個体または個体の集団における手術後の痛みの1つ以上の望ましくない臨床徴候の程度の軽減を意味する。

10

【0156】

本明細書で使用される場合、痛みの発症を「遅延する」とは、手術後の痛み、関節リウマチの痛み、または骨関節炎の痛みなどの痛みの進行を引き延ばし、邪魔し、遅くし、遅れさせ、安定させ、および/または延期させることを意味する。この遅延は、疾患および/または治療される個体の履歴に依存して、時間の長さを変化させることであり得る。当業者に明白であるように、十分なまたは意味のある遅延は、事実上、個体が痛みを発症しないという点で予防を包含する。徴候の発症を「遅延する」方法は、この方法を使用しないことと比較して、所定の時間フレームの中で徴候を発症する可能性を減少し、および/または所定の時間フレームの中で症候の程度を減少する方法である。このような比較は、典型的には、被験体の統計学的に有意な数を使用する、臨床研究に基づく。

20

【0157】

「手術後の痛み」（交換可能に、「切開後」または「外傷後の痛み」と称する）とは、個体の組織への切断、穿刺、切開、裂傷、または創傷などの外部的な外傷（侵襲性か非侵襲性かに関わらず、すべての外科的手順から生じるものを含む）から生じるかまたは起こる痛みをいう。本明細書で使用される場合、手術後の痛みは、外部の身体的な外傷を伴わずに起こる（生じるまたは始まる）痛みを含まない。ある実施形態において、手術後の痛みは、内部または外部（末梢を含む）の痛みであり、創傷、切断、外傷、裂傷、または切開は、偶然に（外傷性創傷のように）または意図的に（外科切開のように）起こるかもしれない。本明細書で使用される場合、「痛み」には、痛覚および痛みの感覚が含まれ、痛みは、痛みスコアおよび当業者に周知である他の方法を使用して、客観的および主観的に評価できる。手術後の痛みには、本明細書で使用される場合、異痛（すなわち、非侵害刺激に対する応答の増加）および痛覚過敏（すなわち、通常侵害性または不快な刺激に対する応答の増加）が含まれ、これらは、次には、天然では、熱的または機械的（触覚的）であり得る。ある実施形態において、手術後の痛みは、熱感受性、機械的感受性、および/または休息痛によって特徴付けられる。ある実施形態において、手術後の痛みは機械的に誘導される痛み、または休息痛を備える。他の実施形態において、手術後の痛みは休息痛を備える。痛みは、当該分野において周知であるように、一次的な痛みまたは二次的な痛みであり得る。

30

40

【0158】

本発明の方法が記載される前に、本発明は、特定の方法、および実験条件に限定されないことが理解される。このような方法および条件は変動してもよいからである。本明細書で使用される専門用語は、特定の実施形態を説明するのみのためであり、限定することは意図されないこともまた理解される。なぜなら、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲のみによって限定されるからである。

【0159】

他に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する当該分野の当業者によって共通して理解されるものと同じ意味を有する。本

50

明細書に記載されるものと同様のまたは等価な任意の方法および物質が本明細書の実施または試験において使用できるが、好ましい方法または物質がここで説明される。本明細書で言及されるすべての刊行物はそれらの全体が参照により組み込まれる。

【0160】

本明細書に記載される本発明は、本明細書に記載されるように「抗原結合タンパク質」という用語と交換可能に使用され、神経成長因子（NGF）に特異的に結合する抗体に関係し、そして、特に、それがハイブリドーマもしくはファージディスプレイ技術によって産生されたイヌ抗体であるか、または完全な「イヌ化」モノクローナル抗体であるかに関わらず、イヌNGFに特異的に結合し、従って、イヌNGFがイヌTrkAに、そしてより低い程度ではイヌp75受容体に結合することを妨害し、従って、シグナル伝達経路がNGFによって活性化されることから妨害されるという点で、アンタゴニストとして働く抗体に関係する。

10

【0161】

NGFは最初に同定されたニューロトロフィンであり、末梢ニューロンと中枢ニューロンの両方の発生および生存におけるその役割は十分に特徴付けされてきた。NGFは、末梢交感神経ニューロンおよび胎児感覚ニューロン、ならびに前脳基底コリン作用性ニューロンの発生において、決定的な生存および維持の因子であることが示されてきた（Smeeyne, et al., Nature 368: 246 - 249 (1994) および Crowley, et al., Cell 76: 1001 - 1011 (1994)）。NGFは感覚ニューロン中のニューロペプチドの発現をアップレギュレートし（Lindsay, et al., Nature 337: 362 - 364 (1989)）、その活性は、2つの異なる膜結合受容体、TrkA受容体および低親和性p75共通ニューロトロフィン受容体と見なされているものを通して媒介される。

20

【0162】

NGFは、損傷または疾患を有する組織中に上昇した量のNGFが存在する、NGF関連障害において上昇していることが示されてきた。NGF関連障害は、障害があるか、疾患があるか、または損傷がある組織中でのNGFの上昇に起因する痛みの増加として定義できる。痛みは、本明細書で使用される場合、本明細書に記載されるように定義され、慢性の痛み、炎症性の痛み、手術切開後の痛み、神経障害の痛み、骨折の痛み、骨粗しょう症骨折の痛み、ヘルペス後神経痛、癌の痛み、熱傷から生じる痛み、熱傷または創傷と関連する痛み、外傷と関連する痛み（外傷性頭部損傷を含む）、神経障害の痛み、慢性の痛み、関節リウマチ、骨関節炎、強直性脊椎炎、血清陰性（非リウマチ）関節症、非関節リウマチおよび関節周囲障害などの筋骨格障害と関連する痛み、および癌と関連する痛み（「突出痛」および末期癌と関連する痛みを含む）、末梢神経障害、およびヘルペス後神経痛を含む障害をいう。

30

【0163】

本発明の1つの実施形態において、NGF障害は、イヌにおける骨関節炎として定義される。骨関節炎（OA）は、イヌにおける関節軟骨の喪失および引き続く軟骨下骨の露出によって特徴付けられるゆっくりと進行する変性性関節疾患である。これは、最終的には、関節痛によって特徴付けられる自己永続的な潜行性障害を生じる。慢性炎症、および動作と痛みの両方を制限する試みの中での局所的組織損傷に応答して、新たな骨形成が起こる。肉眼的には、関節軟骨の喪失、関節腔の狭小化、軟骨下骨の硬化、および関節骨棘の産生が存在する（Veterinary Focus: Vol 17 No 3; 2007）。

40

【0164】

イヌにおいては、原発性OAの発症は品種に依存する。発症の平均年齢は、Rotweilerで3.5年、プードルで9.5年であり、例えば、他の品種または混合品種については広範な範囲の発症を伴う。発生整形外科的疾患および付随する骨関節炎は、イヌにおいて最も一般的な関節疾患であり、これらは、付随肢骨格の中に関節疾患および関連する問題について、医療訪問のおよそ70%を計上する。症例の22%が1年以下、年齢を

50

とっていた。OAの発生は、外傷、ならびに、肥満、加齢、および遺伝子異常によって増加された。特に、年齢はOA発生の1つの因子であり得、ここで、>50%の関節炎の症例が8~13歳の年齢のイヌにおいて観察されている。筋骨格系疾患は高齢患者において非常に一般的であり、ほぼ20%の高齢イヌが整形外科的障害を示す。>8歳年齢のLabrador Retrieverにおいて、いくつかの関節(肘、肩、腰、膝)におけるOAが典型的である。さらに、イヌのサイズがOAの発症において同様に役割を果たす。関節炎を有するイヌの45%が大きな品種のイヌである。これらの間で、>50%が巨大な品種のイヌであるのに対して、28%のみが中くらいの品種のイヌであり、27%が小さな品種のイヌである。イヌにおけるOAの痛みのための薬学的介入の必要性は非常に高い。

10

#### 【0165】

本明細書で言及されるように、NGFのレベルの上昇は、NGF関連障害、特に、OAを示す。NGFのレベルの上昇は、肥満細胞の数の増加とともに、トランスジェニック関節炎マウスにおいて報告されてきた(Aloe, et al., Int. J. Tissue Reactions - Exp. Clin. Aspects 15:139-143 (1993))。PCT公開番号WO 02/096458は、炎症状態(例えば、関節リウマチ)などの様々なNGF関連障害を治療する際の特定の特性の抗NGF抗体の使用を開示している。ヒト腫瘍壊死因子遺伝子を有する関節炎トランスジェニックマウスに注射した精製された抗NGF抗体は、肥満細胞の数の減少、ならびに関節炎マウスの滑膜中のヒスタミンおよびサブスタンスPのレベルの減少を引き起こすことが報告されてきた(Aloe et al., Rheumatol. Int. 14:249-252 (1995))。NGF抗体の外因性投与は、関節炎マウスに存在するTNFのレベルの増強を減少することが示されてきた(Marmi et al., Rheumatol. Int. 18:97-102 (1998))。齧歯類抗NGFアンタゴニスト抗体が報告されてきた。例えば、Hongo et al., ハイブリドーマ(2000)19(3):215-227; Ruberti et al. (1993) Cell. Molec. Neurobiol. 13(5):559-568を参照のこと。しかし、齧歯類抗体が非マウス哺乳動物において治療的に使用されるとき、有意な数の治療された個体において、抗マウス抗体応答が発生する。従って、イヌ使用のための、特に、OAを治療する際の使用のための、本発明の抗NGFアンタゴニスト抗体を含む、抗NGFアンタゴニスト抗原結合タンパク質についての重大な必要性が存在する。

20

30

#### 【0166】

抗体の特性はそれらを非常に魅力的な治療剤にする一方、多くの制限が存在する。圧倒的多数のモノクローナル抗体(mAbs)は、以前に記した通り、齧歯類起源である。このような抗体が異なる種において投与されるとき、患者は、このような異種抗体に対するそれら自体の応答を開始し得る。このような応答は、抗体の最終的な中和および除去を生じるかもしれない。上記に記載されたように、マウスはモノクローナル抗体の産生において広範に使用されている。特定の種、一般的には、最初にマウスで産生される抗体を使用することの使用の1つの問題点は、上記抗体で治療される非マウス被験体が、あたかも外来物質であるかのようにマウス抗体と反応し、従って、マウス抗体に対する抗体の新たなセットを作製することである。マウス抗体は、非マウス、例えば、イヌの免疫系によって外来性で見られ、次いで、被験体は、その分子に対する免疫応答を開始する。この分野の当業者は、抗原特異的抗体を用いて被験体を治療するが、しかし、その抗体を種特異的にすることが可能である必要性を認識している。異種間抗体投与、例えば、イヌに投与されるマウスモノクローナル抗体から生成する反応の一部は、発疹のような軽度型から、より極度の腎不全などの生命に関わる応答までの範囲であり得る。この免疫応答はまた、被験体がマウス抗体を含有する引き続く治療を与えられるならば、治療の有効性を減少し、または将来の反応を生み出すことがあり得る。従って、本発明者らは、抗体の「イヌ化」によってこの不利益を克服することを説明する。特に、このプロセスは、免疫グロブリン可変ドメインのフレームワーク領域に焦点を当てているが、可変ドメインの相補性決定(c

40

50

ompliment determinant)領域(CDR)もまた含むことができる。実現する工程およびこのプロセスについて実施するための単純化は本開示の中で説明される。

#### 【0167】

種への治療的投与のために、動物からのモノクローナル抗体を修飾して、免疫原性を少なくするプロセスは、積極的に追求されており、多くの刊行物の中に記載されてきた(例えば、Antibody Engineering: A practical Guide. Carl A. K. Borrebaeck ed. W. H. Freeman and Company, 1992)。しかし、このプロセスは、最近まで、非ヒト、特に、イヌのための治療薬または診断薬の開発のために適用されてはいなかった。実際、イヌ可変ドメインに関しては非常にわずかしか公開されていない。Wasserman and Capra, Biochem. 6, 3160 (1977)は、イヌのIgMとイヌのIg重鎖の間の可変領域のアミノ酸配列を決定した。Wasserman and Capra, Immunochem. 15, 303 (1978)は、イヌのIgAからのK軽鎖のアミノ酸配列を決定した。McCumber and Capra, Mol. Immunol. 16, 565 (1979)は、イヌのミュー鎖の完全アミノ酸配列を開示する。Tang et al., Vet. Immunology Immunopathology 80, 259 (2001)は、単一のイヌIgG-Ay鎖のcDNAおよび4つのイヌIgG-Ay鎖のタンパク質配列を開示している。これは、ヒト、マウス、ブタ、およびウシのIgGの保存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増幅を記載している。イヌの抗体上で利用できる情報の不足は、イヌの疾患の治療のための治療薬としてのそれらの開発を妨害してきた。

10

20

#### 【0168】

これらの顕著な制限は、「スペシエーション」として知られる操作技術の開発を促進してきており、治療抗体の「ヒト化」によって当業者に周知である。ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンから誘導された最小配列を含有するキメラ抗体またはそのフラグメントとして生成できる。大部分については、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域(CDR)からの残基が、特異性、親和性、および効力などの所望の特性を有する、マウスなどの非ヒト種(すなわち、「ドナー抗体」または「元々の種の抗体」)のCDRからの残基によって置き換えられているヒト抗体(すなわち、「レシピエント抗体」または「標的種抗体」)である。ある例において、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられている。このヒト化戦略は、ヒト化抗体の作製のために報告されたように、「CDR移植」と呼ばれる(Winter、米国特許第5,225,539号)。選択された標的フレームワーク残基の対応するドナー残基への復帰突然変異は、親和性を回復およびまたは改善するために必要とされるかもしれない。構造に基づく方法はまた、例えば、米国特許出願シリアル番号10/153,159および関連する出願においてヒト化について記載されているように、ヒト化および親和性成熟のために利用されてもよい。いくつかの抗体のヒト化において要求される必須のフレームワーク残基、ならびに抗体結晶構造に基づくコンピュータモデリングの比較は、「ベルニエ領域残基」と呼ばれるフレームワーク残基のセットを明らかにした(Fote, J. Mol. Biol. 224:487-499 (1992))。加えて、VH-VL界面におけるいくつかの残基は、抗原についての親和性を維持する際に重要であることが示唆されてきた(Santos, Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 60:169-94 (1998); Kettleborough, et al., Protein Engin., 4:773-783 (1991))。イヌにおける使用のための抗体の「ヒト化」のための同様の戦略は、米国特許第7,261,890号に記載されている。

30

40

#### 【0169】

あるいは、ヒト化抗体は、個別のヒトフレームワーク領域のプール(例えば、ライブラリー)に移植された非ヒト配列からのCDRを含有してもよい。この新たに操作された抗

50

体は、元々の抗体と同じ抗原に結合することが可能である。この抗体定常領域はヒト抗体から誘導されている。この態様を実施するための方法論は、一般的には、フレームワークシフトとして記載されている(Dall'Acqua, Methods, 36:43-60(2005))。さらに、ヒト化抗体は、ドナー種に対して高い相同性を有する少なくとも2つのヒト抗体生殖系列配列から誘導された2つ以上のフレームワーク領域からの配列を含有してもよい。この方法を使用して設計された抗体は、ハイブリッド抗体として記載されており(Rother et al., 米国特許第7,393,648号)、そして、ヒト化の外側のスペシエーション、例えば、イヌ化のために適用可能であり得る。

#### 【0170】

上記に記載されるアプローチは、ドナー種からCDRを受け取るように操作されている標的種の1つ以上の可変重鎖または可変軽鎖からの本質的に完全なフレームワーク領域を利用する。ある場合において、可変領域中の選択された残基の復帰突然変異は、CDRの提示を増強するために使用される。有効性を十分に維持するために抗体の抗原結合領域を保存するのと同様の間に、抗体中の非ネイティブ配列に対して被験体中の免疫原性反応を最小化する抗体を設計することは、困難であることが判明してきた。

10

#### 【0171】

治療用抗体標的化タンパク質を開発するための別の挑戦は、異なる種の中の相同タンパク質上のエピトープが頻繁に異なっており、他のタンパク質との交差反応性についての潜在能力もまた異なることである。結果として、抗体は、治療される特定の種における特定の標的のために、作製、試験、および開発されなければならない。

20

#### 【0172】

抗体は、抗体分子の可変領域との相互作用によって、抗原上の特異的エピトープのその結合を通して、抗原を標的とする。さらに、抗体は、様々な生物学的活性を媒介し、阻害し(本発明のアンタゴニスト抗NGF抗原結合タンパク質の場合と同様に)、および/または開始する能力を有する。治療抗体の広範な機能が存在し、例えば、抗体は、アゴニストまたはアンタゴニストとしての受容体-リガンド相互作用を調節できる。抗体結合は、細胞増殖、サイトカイン産生、またはアポトーシスを刺激するための細胞内シグナル伝達を開始できる。抗体は、Fc領域に結合した薬剤を特定の部位まで送達することができる。抗体はまた、抗体媒介細胞傷害性(ADCC)、補体媒介細胞傷害性(CDC)、および食作用を誘発する。変化され、ADCC、CDC、C1q結合、および食作用が排除されている抗体もまた存在する。本発明の1つの実施形態において、本発明の抗体は、上記抗体のエフェクター機能を変化させる抗体のFc領域に変化を備える。

30

#### 【0173】

(イヌ化)

本明細書で使用される場合、「イヌ化抗体」とは、イヌによって産生された抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有し、および/または、当該分野において公知であり、もしくは本明細書に開示される技術のいずれかを使用して作製された抗体を意味する。このイヌ化抗体の定義には、少なくとも1つのイヌ重鎖ポリペプチドまたは少なくとも1つのイヌ軽鎖ポリペプチドを備える抗体が含まれる。抗体の、および特に抗体のヒト化の「スペシエーション」は、それ自体、当業者に周知の研究の分野である。ヒト化を超えた抗体のスペシエーションが、任意の他の種において有効であり得る治療抗体を生み出すか否かは最近まで不明であった。本発明は、イヌにおける治療的使用のための抗NGF抗体のイヌ化を実証する。

40

#### 【0174】

キメラ抗体は、少なくとも2つの種からの配列を備える。1つの例として、組換えクローニング技術が、可変領域を含むために使用されてもよく、これは、非イヌ抗体からの抗原結合部位(すなわち、抗原で免役された非イヌ種の中で調製された抗体)およびイヌ免疫グロブリンから誘導された定常領域を含有する。

#### 【0175】

イヌ化抗体はキメラ抗体の1つの型であり、ここでは、抗原結合の原因である可変領域

50

残基（すなわち、相補性決定領域の残基、短縮相補性決定領域、または抗原結合に参加する任意の他の残基）が非イヌ種から誘導されており、一方、残りの可変領域残基（すなわち、フレームワーク領域の残基）および定常領域は、少なくとも部分的に、イヌ抗体配列から誘導されている。イヌ化抗体のフレームワーク領域残基および定常領域残基のサブセットは、非イヌ供給源から誘導されてもよい。イヌ化抗体の可変領域もまた、イヌ化されたとして記載されている（すなわち、イヌ化された軽鎖または重鎖可変領域）。非イヌ種は、典型的には、マウス、ラット、非ヒト霊長類、または他の非イヌ哺乳動物種などの、抗原を用いる免疫のために使用されるものである。

**【0176】**

相補性決定領域（CDR）は、抗原結合に参加する抗体可変領域の残基である。CDRを同定するためのいくつかの番号付けシステムが普通に使われている。Kabatの定義は配列変動性に基づいており、Clothiaの定義は構造的ループ領域の位置に基づいている。AbMの定義は、KabatのアプローチとClothiaのアプローチの間の妥協である。本発明のイヌ化抗体は、1つ以上のCDRを備えるように構築されてもよい。なおさらに、CDRは、別々に、またはSMIPなどの合成分子および小さな抗体模倣物と組み合わせて使用されてもよい。

10

**【0177】**

フレームワーク残基は、超可変残基またはCDR残基以外の抗体可変領域の残基である。フレームワーク残基は、本発明の抗体のフレームワーク領域と実質的に同様であるイヌのフレームワークなどの天然に存在するイヌの抗体から誘導されてもよい。個々の配列間でコンセンサスを表す人工のフレームワーク配列もまた使用されてもよい。イヌ化のためにフレームワーク領域を選択するとき、イヌにおいて広範に表される配列は、数が多い配列よりも好ましいかもしれない。イヌのフレームワークアクセプター配列のさらなる変異は、抗原の接触に関連すると考えられているマウス残基、および/もしくは抗原結合部位の構造的完全性に関連する残基を回復させるために、または抗体発現を改善するために作製されてもよい。

20

**【0178】**

CDRの移植は、アクセプター抗体（例えば、イヌ化抗体または所望のフレームワーク残基を備える他の抗体）の1つ以上のCDRを、ドナー抗体（例えば、非イヌ抗体）のCDRで置き換えることによって実施される。アクセプター抗体は、候補アクセプター抗体とドナー抗体の間のフレームワーク残基の類似性に基づいて選択されてもよい。例えば、イヌのフレームワーク領域は、関連の非イヌ抗体の各フレームワーク領域に対して実質的な配列相同性を有するとして同定され、非イヌ抗体のCDRは、様々なイヌのフレームワーク領域の複合物に移植される。

30

**【0179】**

利用可能なアミノ酸配列データの分析と組み合わせた、抗体-抗原複合体の三次元構造の分析は、CDRの中の各位置に存在するアミノ酸の構造的相違に基づいて、配列変動性をモデリングするために使用されてもよい。本発明のCDRはまた、2つのCDR領域および1つのフレームワーク領域を備える小さな抗体模倣物中でも利用できる（*Quietal Nature Biotechnology Vol 25; 921-929; August 2007*）。

40

**【0180】**

CDRまたは短縮CDRの移植のためのアクセプターフレームワークは、所望の残基を導入するためにさらに修飾されてもよい。例えば、アクセプターフレームワークは、1つ以上の位置における非イヌドナー残基を任意に有する、イヌコンセンサス配列の重鎖可変領域を備えてもよい。移植後、抗体結合および機能性を最適化するために、ドナー配列および/またはアクセプター配列において、さらなる変化が作製されてもよい。例えば、国際公開WO 91/09967を参照のこと。

**【0181】**

本発明は、本発明の抗体を発現する細胞および細胞系統をさらに提供する。代表的な宿

50

主細胞には、細菌、酵母、哺乳動物およびヒト細胞、例えば、CHO細胞、HEK-293細胞、HeLa細胞、CV-1細胞、およびCOS細胞が挙げられる。宿主細胞への異種構築物の形質転換後の安定な細胞系統を生成するための方法は、当該分野において公知である。代表的な非哺乳動物宿主細胞には、昆虫細胞(Potter et al. (1993) Int. Rev. Immunol. 10(2-3): 103-112)が挙げられる。抗体はまた、トランスジェニック動物(Houdebine (2002) Curr. Opin. Biotechnol. 13(6): 625-629)およびトランスジェニック植物(Schillberg et al. (2003) Cell Mol. Life Sci. 60(3): 433-45)において産生されてもよい。

#### 【0182】

上記に議論されたように、例えば、抗体の他の部分、例えば、定常領域を欠失、付加、または置換することによって修飾されたモノクローナル抗体、キメラ抗体、およびイヌ化抗体もまた、本発明の範囲内にある。例えば、抗体は、以下のようにして修飾できる：(i) 定常領域を欠失させることによる；(ii) 定常領域を、別の定常領域、例えば、抗体の半減期、安定性、もしくは親和性を増大させることを意味する定常領域、または別の種もしくは抗体のクラスからの定常領域で置き換えることによる；あるいは(iii) 例えば、とりわけ、グリコシル化部位の数、エフェクター細胞の機能、Fc受容体(FcR)結合、補体結合を変化させるために定常領域中の1つ以上のアミノ酸を修飾することによる。本発明の1つの実施形態において、本発明の抗体は、抗体のエフェクター機能を変化させる、変化させたFc領域を備える。

#### 【0183】

抗体定常領域を変化させるための方法は、当該分野において公知である。変化させた機能を有する抗体、例えば、細胞上のFcRまたは補体のC1成分は、抗体の定常部分における少なくとも1つのアミノ酸残基を異なる残基で置き換えることによって産生できる(例えば、EP 388,151 A1、米国特許第5,624,821号および同第5,648,260号を参照のこと、これらのすべての内容は参照により組み込まれる)。

#### 【0184】

例えば、特定の残基を、側鎖に適切な官能基を有する残基で置き換えることによって、あるいは、グルタミン酸もしくはアスパラギン酸などの電荷を有する官能基、または、ことによると、フェニルアラニン、チロシン、もしくはアラニンなどの芳香族性非極性残基を導入することによって、FcR(例えば、FcR1)またはC1q結合が、抗体のFc領域の親和性を変化させることが可能である(例えば、米国特許第5,624,821号を参照のこと)。抗体またはその結合フラグメントは、細胞毒素、治療剤、または放射性金属イオンと結合体化されてもよい。1つの実施形態において、結合体化されるタンパク質は抗体またはそのフラグメントである。細胞毒素または細胞傷害性因子には、細胞に対して有害である任意の薬剤が挙げられる。非限定的な例には、カリケアマイシン、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(tenoposide)、ピンクリスチン、ピンプラスチン、コルヒチン(colchicin)、ドキシソルピシン、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-ジヒドロテストステロン、糖質コルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、およびこれらのアナログまたはホモログが挙げられる。治療剤には、代謝拮抗物質(例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラピン、および5-フルオロウラシル、ダカルバジン(decarbazine)、アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、チオエパ(thioepa)、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)、およびロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド(cyclophosphamide)、プスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびシス-ジクロロジアミン白金(II)(DDP)、シスプラチン)、アントラサイクリン(例えば、ダウノルピシンおよびドキシソルピシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン、ブレオマイ

10

20

30

40

50

シン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン)、および有糸分裂阻害剤(例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン)が挙げられるがこれらに限定されない。このような部分をタンパク質に結合体化するための技術は当該分野において周知である。

【0185】

(組成物、誘導された組成物、およびこれらの組成物を作製する方法)

本発明は、本発明の抗体またはポリペプチドをコードする配列を備える抗体、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドを包含する薬学的組成物を含む組成物を包含する。

【0186】

本明細書で使用される場合、組成物は、イヌNGFに結合する1種以上の抗体、抗原結合タンパク質もしくはポリペプチド(これは抗体であってもよいし、抗体でなくでもよい)、および/またはNGFに結合する1種以上の抗体もしくはポリペプチドをコードする配列を備える1種以上のポリヌクレオチドを備える。これらの組成物は、緩衝液を含む薬学的に受容可能な賦形剤などの適切な賦形剤をさらに備えてもよく、これらは当該分野において周知である。本発明はまた、単離された抗体、ポリペプチド、およびポリヌクレオチドの実施形態もまた包含する。本発明はまた、実質的に純粋な抗体、ポリペプチド、およびポリヌクレオチドの実施形態もまた包含する。

10

【0187】

ある実施形態において、本発明は、イヌNGFに特異的に結合する新規なイヌ化モノクローナル抗体を提供する。1つの実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、NGFに結合し、その受容体TrkA、およびより低い程度ではp75へのその結合、およびその活性化を妨害し、従って、本明細書に記載されるようなシグナル伝達カスケードを妨害する。本発明のモノクローナル抗体は、「SM57」、「SM58」、「SM66」、「CanE3M65-12」、および「CANS57-VH/SM57-VH」(「SSMQC23HCLC」)として本明細書で同定される。

20

【0188】

1つ以上の実施形態において、本発明は、可変軽鎖が配列番号16(CAN-E3M-VL)を備え、可変重鎖が配列番号17(CAN-N2G9-VH)を備える、単離されたイヌ化抗原結合タンパク質を提供する。

【0189】

1つ以上の実施形態において、本発明は、可変軽鎖が配列番号26(CAN-SSME3M-VL)を備え、可変重鎖が配列番号27(CAN-SSM57-VH)を備える、単離されたイヌ化抗原結合タンパク質を提供する。

30

【0190】

1つ以上の実施形態において、本発明は、可変軽鎖が配列番号30(CAN-QC23-VL)を備え、可変重鎖が配列番号27(CAN-SSM57-VH)を備える、単離されたイヌ化抗原結合タンパク質を提供する。

【0191】

本発明のさらなる実施形態は、以前に記載されたような様々な抗原結合タンパク質をコードする核酸を提供する。

【0192】

本発明は、組換えモノクローナル抗体およびペプチド、ならびに、臨床的投与、および診断手順を含む科学的手順におけるこれらの使用を提供する。分子生物学および組換え技術の方法の出現により、組換え手段により抗体および抗体様分子を産生し、それによって、抗体のポリペプチド構造において見いだされる特定のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列を生成することが可能である。このような抗体は、上記の抗体のポリペプチド鎖をコードする遺伝子配列をクローニングすること、または上記ポリペプチド鎖の直接合成のいずれかによって、特定のエピトープおよび抗原決定基についての親和性を有する活性四量体(H2L2)構造を形成するための合成した鎖のアセンブリーを用いて、産生することができる。このことは、異なる種および供給源からの中和抗体の配列特性を有する抗体の即時産生を可能にする。

40

50

## 【0193】

抗体の供給源、またはどのようにして抗体が組換え的に構築されたか、または抗体がどのようにして合成されたか、インビトロかインビボか、トランスジェニック動物の使用、研究用または商業用のサイズの大きな細胞培養、トランスジェニック植物の使用、またはプロセスの任意の段階で生きている生物を利用しない直接化学合成によるかに関わらず、すべての抗体は類似の全体的な三次元構造を有する。この構造は、しばしば、H2L2として与えられ、抗体が共通して2つの軽(L)鎖アミノ酸鎖および2つの重(H)鎖アミノ酸鎖を備えるという事実をいう。両方の鎖は、構造的に相補的な抗原性標的を相互作用することが可能である領域を有する。標的と相互作用する領域は「可変」または「V」領域といい、様々な抗原特異性の抗体からのアミノ酸配列の違いによって特徴付けられる。H鎖またはL鎖の可変領域は、抗原性標的に特異的に結合することが可能であるアミノ酸配列を含有する。

10

## 【0194】

本明細書で使用される場合、「抗原結合領域」とは、抗原と相互作用し、抗体に、抗原についてのその特異性および親和性を付与するアミノ酸残基を含有する、抗体分子の部分を用いる。抗体結合領域は、抗原結合残基の適切なコンホメーションを維持するために必要な「フレームワーク」アミノ酸残基を含む。抗原結合領域を提供するH鎖とL鎖の可変領域の中に、異なる特異性の抗体間でのその配列の極度の変動性のために「超可変」との異名のある小さな配列がある。このような超可変領域はまた、「相補性決定領域」または「CDR」領域ともいわれる。これらのCDR領域は、特定の抗原決定基構造についての抗体の基本的特異性を説明する。

20

## 【0195】

CDRは、可変領域の中のアミノ酸の非連続的なストレッチを表すが、しかし、種に関わらず、可変重鎖と可変軽鎖領域の中の決定的に重要なアミノ酸配列の位置的な配置は、可変鎖のアミノ酸配列の中の同様の位置を有することが見い出されている。すべての抗体の可変重鎖および可変軽鎖は、各々が、3つのCDR領域を有し、各々が他とは非連続的である。すべての哺乳動物種において、抗体ペプチドは、定常(高度に保存性)領域および可変領域を含有し、そして、後者の中には、CDR、および、重鎖または軽鎖の可変領域の中であるが、CDRの外側であるアミノ酸配列から作られる、いわゆる「フレームワーク領域」が存在する。

30

## 【0196】

本発明は、上記の核酸の少なくとも1種を含むベクターをさらに提供する。遺伝コードが縮重しているため、1種より多くのコドンが使用されて、特定のアミノ酸をコードすることができる。遺伝コードを使用すると、1つ以上の異なるヌクレオチド配列が同定でき、これらの各々は、アミノ酸をコードすることが可能である。特定のオリゴヌクレオチドが実際に実際のコード配列を構成する可能性は、異常な塩基の対合の関連性および特定のコドンが(特定のアミノ酸をコードするために)、抗NGF抗体または一部を発現する真核生物細胞または原核生物細胞において実際に使用される頻度を考慮することによって見積もることができる。このような「コドン使用頻度の規則」は、L a t h e , e t a l . , 1 8 3 J . M o l e c . B i o l . 1 - 1 2 ( 1 9 8 5 ) によって開示されている。L a t h e の「コドン使用頻度の規則」を使用して、抗NGF配列をコードすることが可能である理論的に「最もありそうな」ヌクレオチド配列を含有する単一のヌクレオチド配列、または一連のヌクレオチド配列が同定できる。本発明における使用のための抗体コード領域はまた、本明細書に記載される抗体およびペプチドの変異型(アゴニスト)を生じる、標準的な分子生物学的技術を使用して、既存の抗体遺伝子を変化させることによってもまた提供できることもまた意図される。このような変異型には、抗NGF抗体またはペプチドのアミノ酸配列の欠失、付加、および置換が挙げられるがこれらに限定されない。

40

## 【0197】

例えば、置換の1つのクラスは、保存性アミノ酸置換である。このような置換は、同様

50

の特徴の別のアミノ酸によって、抗NGF抗体ペプチド中の所定のアミノ酸を置換するものである。典型的には、脂肪族アミノ酸Ala、Val、Leu、およびIleの間での1つのものを別のものへの置き換え；ヒドロキシル残基SerおよびThrの交換、酸性残基AspおよびGluの交換、アミド残基AsnとGlnの間の置換、塩基性残基LysおよびArgの交換、芳香族残基Phe、Tyrの間の置き換えなどが、保存性置換として見られる。アミノ酸交換が表現型的にサイレントであるようであることに関するガイドダンスは、Bowie et al., 247 Science 1306-10 (1990)において見いだされる。

#### 【0198】

変異型またはアゴニスト抗NGF抗体またはペプチドは、完全に機能的であってもよく、1つ以上の活性を欠いていてもよい。完全に機能的な変異型は、典型的には、保存性のバリエーションまたは決定的でない残基もしくは決定的でない領域のバリエーションのみを含有する。機能的な変異型はまた、機能の変化を生じないか、または機能の重要でない変化を生じる類似のアミノ酸の置換を含有できる。あるいは、このような置換は、ある程度まで、機能にポジティブまたはネガティブな影響を与えてもよい。非機能的な変異型は、典型的には、1つ以上の非保存性アミノ酸の置換、欠失、挿入、反転、または欠失または切断、あるいは、決定的な残基または決定的な領域における置換、挿入、反転または欠失を含有する。

#### 【0199】

機能のために必須であるアミノ酸は、部位特異的変異誘発またはアラニンスキニング変異誘発などの当該分野において公知の方法によって同定できる。Cunningham et al., 244 Science 1081-85 (1989)。後者の手順は、分子のあらゆる残基において、単一のアラニン変異を導入する。次いで、得られた変異体分子は、エピトープ結合またはインビトロADCC活性などの生物学的活性について試験される。リガンド-受容体結合のために決定的な部位もまた、結晶学、核磁気共鳴、または光親和性標識などの構造分析によって決定できる。Smith et al., 224 J. Mol. Biol. 899-904 (1992); de Vos et al., 255 Science 306-12 (1992)。

#### 【0200】

さらに、ポリペプチドは、しばしば、20種の「天然に存在する」アミノ酸以外のアミノ酸を含有する。さらに、末端のアミノ酸を含む多くのアミノ酸は、プロセッシングおよび他の翻訳後修飾などの天然のプロセス、または当業者で公知の化学的修飾によって修飾されてもよい。公知の修飾には、アセチル化、アシル化、ADPリボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトール (phosphatidylinositol)、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、ガンマカルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、水酸化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解的プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などのトランスファーRNAが媒介するタンパク質へのアミノ酸の付加、およびユビキチン化が挙げられるがこれらに限定されない。このような修飾は当業者には周知であり、科学文献において非常に詳細に記載されてきた。いくつかの特に一般的な修飾、グリコシル化、脂質結合、硫酸化、グルタミン残基のガンマカルボキシル化、水酸化、およびADPリボシル化は、例えば、Proteins - Structure and Molecular Properties (2nd ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman & Co., NY, 1993)などの最も基本的なテキストに記載されている。この主題に対して多くの詳細な概説が、例えば、World, Posttranslational Covalent Modification of proteins, 1-12 (Johnson, ed., Academic Press, NY, 1983); Seiffter et al. 182 Meth.

10

20

30

40

50

Enzymol. 626-46 (1990); および Rattan et al. 663 Ann. NY Acad. Sci. 48-62 (1992) などによって利用可能である。

#### 【0201】

従って、本発明の抗体およびペプチドは、置換されたアミノ酸残基が遺伝コードによってコードされるものではない、誘導体またはアナログもまた包含する。同様に、アミノ酸配列における付加および置換、ならびにバリエーション、およびちょうど記載された修飾は、NGF抗原および/またはそのエピトープまたはペプチドのアミノ酸配列に対して等しく適用可能であるかもしれない、従って、本発明によって包含される。上記に言及されたように、本発明に従うモノクローナル抗体をコードする遺伝子は、NGFの認識において特に有効である。

10

#### 【0202】

##### (抗体誘導体)

抗体誘導体は本発明の範囲に含まれる。抗体の「誘導体」は、通常はタンパク質の一部ではないさらなる化学部分を含有する。タンパク質の共有結合的修飾は、本発明の範囲に含まれる。このような修飾は、抗体の標的化されたアミノ酸残基を、選択された側鎖または末端残基と反応することが可能である有機誘導体化剤と反応させることによって、分子に導入されてもよい。例えば、当該分野において周知である二官能性剤を用いる誘導体化が、抗体またはフラグメントを、水不溶性支持体マトリックスまたは他の高分子キャリアに架橋するために有用である。

20

#### 【0203】

誘導体はまた、標識されている放射能標識されたモノクローナル抗体も含む。例えば、放射性ヨウ素(251, 131I)、炭素(4C)、硫黄(35S)、インジウム、トリチウム(H<sup>3</sup>)などを用いて; ビオチンまたはアビジンとのモノクローナル抗体の結合体、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、カルボン酸アンヒドラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、リゾチーム、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、またはグルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼなどの酵素を用いて; およびまた、生物発光剤(ルシフェラーゼなど)、化学発光剤(アクリジンエステルなど)または蛍光剤(フィコビリタンパク質など)とモノクローナル抗体の結合体である。

30

#### 【0204】

本発明の別の誘導体二機能抗体は、2つの異なる抗原性基を認識する2つの別々の抗体の部分の合わせることによって生成された二特異的抗体である。これは、架橋技術または組換え技術によって達成されてもよい。加えて、(例えば、血流からのクリアランスまでの時間を長くすることによって)インピボでの半減期を増加させるための部分が抗体またはその一部に加えられてもよい。このような技術には、例えば、PEG部分を加えること(ペグ化とも呼ばれる)が挙げられ、これらは当業者に周知である。米国特許出願公開第20030031671号を参照のこと。

##### (抗体の組換え発現)

ある実施形態において、対象のモノクローナル抗体をコードする核酸は宿主細胞に直接導入され、その細胞はコードされた抗体の発現を誘導するために十分な条件下でインキュベートされる。対象の核酸が細胞に導入された後で、細胞は、典型的には、抗体の発現を可能にするために、通常、37°Cで、時折、選択下で、約1~24時間の間、インキュベートされる。1つの実施形態において、抗体は、細胞が増殖している培地の上清に分泌される。伝統的に、モノクローナル抗体は、マウスハイブリドーマ系統中でネイティブ分子として産生されてきた。この技術に加えて、本発明は、モノクローナル抗体の組換えDNA発現を提供する。これは、選択した宿主種における、イヌ化抗体、ならびに一定のスペクトルの抗体誘導体および融合タンパク質の産生を可能にする。

40

#### 【0205】

少なくとも1種の本発明の抗NGF抗体、部分、またはポリペプチドをコードする核酸

50

配列は、ライゲーションのためのプラントエンドまたはスタガードエンド末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、適切に付着末端のフィルイン、望ましくない結合を回避するためのアルカリホスファターゼ処理、および適切なりガーゼを用いるライゲーションを含む、従来の技術に従ってベクターDNAを用いて組換えられてもよい。このような操作のための技術は、例えば、Maniatis et al., MOLECULAR CLONING, LAB. MANUAL, (Cold Spring Harbor Lab. Press, NY, 1982 and 1989), and Ausubel et al. 1993 前出によって開示されており、モノクローナル抗体分子またはその抗原結合領域をコードする核酸配列を構築するために使用されてもよい。

【0206】

DNAなどの核酸分子は、それが転写および翻訳の調節情報を含んでいるヌクレオチド配列を含有し、そのような配列が、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に「作動可能に連結」されているならば、ポリペプチドを「発現することが可能」であるといわれる。作動可能な連結は、調節DNA配列および発現されることが求められているDNAが、抗NGFペプチドまたは抗体部分としての遺伝子発現を回収可能な量で可能にするようなやり方でつながれている連結である。遺伝子発現のために必要とされる調節領域の正確な性質は、類似の分野において周知であるように、生物から生物で異なるかもしれない。例えば、Sambrook et al., 2001 前出; Ausubel et al., 1993 前出を参照のこと。

【0207】

従って、本発明は、原核生物または真核生物のいずれかにおいて、抗NGF抗体またはペプチドの発現を包含する。適切な宿主には、インビボもしくはインサイチュでの細菌、酵母、昆虫、真菌、鳥類、および哺乳動物の細胞、または哺乳動物、昆虫、鳥類、もしくは酵母起源の宿主細胞を含む、細菌宿主または真核生物宿主が挙げられる。哺乳動物の細胞または組織は、ヒト、霊長類、ハムスター、齧歯類、ウシ、ヒツジ、ウマ、ヤギ、イヌ、またはネコ起源であってもよいが、任意の他の哺乳動物細胞が使用されてもよい。

【0208】

1つの実施形態において、本発明のヌクレオチド配列は、レシピエント宿主における自律複製が可能であるプラスミドまたはウイルスベクターに導入される。広範な種々のベクターのいずれかがこの目的のために利用されてもよい。例えば、Ausubel et al., 1993、前出を参照のこと。特定のプラスミドまたはウイルスベクターを選択する際の重要性についての因子には、ベクターを含有するレシピエント細胞が、ベクターを含有しないレシピエント細胞から認識および選択され得る容易さ; 特定の宿主において所望されているベクターのコピーの数; および様々な種の宿主細胞間でベクターを「シャトル」できることが所望されているか否か、が挙げられる。

【0209】

当該分野において公知である原核生物ベクターの例には、E. coliにおいて複製が可能であるものなどのプラスミド(例えば、pBR322、ColE1、pSC101、pACYC 184、vXなど)が挙げられる。このようなプラスミドは、例えば、Maniatis et al., 1989 前出; Ausubel et al., 1993 前出によって開示されている。バシラスプラスミドには、pC194、pC221、pT127などが挙げられる。このようなプラスミドは、Gryczan, in THE MOLEC. BIO. OF THE BACILLI 307-329 (Academic Press, NY, 1982)によって開示されている。適切なストレプトミセスプラスミドには、p1J101 (Kendall et al., 169 J. Bacteriol. 4177-83 (1987))が挙げられ、そしてストレプトミセスバクテリオファージは、pHLC31 (Chater et al., in SIXTH INT'L SYMPOSIUM ON ACTINOMYCETALES BIO. 45-54 (Akademiai Kiado, Budapest, Hungary 1986))などである。シュードモナスプラスミドは、John et al., 8 Rev. In

10

20

30

40

50

fect. Dis. 693 - 704 (1986); Iizaki, 33 Jpn. J. Bacteriol. 729 - 42 (1978); および Ausubel et al., 1993 前出において概説されている。

#### 【0210】

あるいは、抗NGF抗体またはペプチドをコードするcDNAの発現のために有用な遺伝子発現エレメントには、(a)SV40初期プロモーター(Okayama et al., 3 Mol. Cell. Biol. 280 (1983), ラウス肉腫ウイルスLTR(Gorman et al., 79 Proc. Natl. Acad. Sci., US 6777 (1982)、およびモロニーマウス白血病ウイルスLTR(Grosschedl et al., 41 Cell 885 (1985)などのウイルス転写プロモーターおよびそれらのエンハンサーエレメント; (b)SV40後期領域から誘導されたもの(Okayama et al., 1983)などのスプライシング領域およびポリアデニル化部位、ならびに(c)SV40におけるもの(Okayama et al., 1983)などのポリアデニル化部位が挙げられるがこれらに限定されない。

10

#### 【0211】

免疫グロブリンcDNA遺伝子は、Weidle et al., 51 Gene 21 (1987)によって記載されているように、発現エレメントとして、SV40初期プロモーターおよびそのエンハンサー、マウス免疫グロブリンH鎖プロモーターエンハンサー、SV40後期領域 mRNAスプライシング、ウサギS-グロビン介在配列、免疫グロブリンおよびウサギS-グロビンポリアデニル化部位、ならびにSV40ポリアデニル化エレメントを使用して、発現できる。一部cDNA、一部ゲノムDNAから構成される免疫グロブリン遺伝子(Whittle et al., 1 Protein Engin. 499 (1987)については、転写プロモーターはヒトサイトメガロウイルスであり得、プロモーターエンハンサーは、サイトメガロウイルスおよびマウス/ヒト免疫グロブリンであり得、そしてmRNAスプライシングおよびポリアデニル化領域はネイティブ染色体免疫グロブリン配列であり得る。

20

#### 【0212】

1つの実施形態において、齧歯類細胞におけるcDNA遺伝子の発現のために、転写プロモーターはウイルスLTR配列であり、転写プロモーターエンハンサーは、マウス免疫グロブリン重鎖エンハンサーとウイルスLTRエンハンサーのいずれかまたは両方であり、スプライシング領域は31bpよりも大きなイントロンを含有し、そしてポリアデニル化領域および転写終結領域は、合成される免疫グロブリン鎖に対応するネイティブな染色体配列から誘導される。他の実施形態において、他のタンパク質をコードするcDNA配列は、哺乳動物細胞中のタンパク質の発現を達成するための上記に列挙された発現エレメントと組み合わせられる。

30

#### 【0213】

各々の融合された遺伝子は、発現ベクターの中にアセンブルでき、またはそこに挿入できる。次いで、キメラ免疫グロブリン鎖遺伝子産物を発現することが可能なレシピエント細胞は、抗NGFペプチドまたはキメラH鎖もしくはキメラL鎖をコードする遺伝子を用いて単独でトランスフェクトされるか、あるいはキメラH鎖およびキメラL鎖の遺伝子とともに同時トランスフェクトされる。トランスフェクトされたレシピエント細胞は、組み込まれた遺伝子の発現を可能にする条件下で培養され、発現された免疫グロブリン鎖またはインタクトな抗体もしくはフラグメントが培養から回収される。

40

#### 【0214】

1つの実施形態において、抗NGFペプチドまたはキメラH鎖およびL鎖、またはこれらの部分をコードする融合した遺伝子は、別々の発現ベクターにアセンブルされ、次いで、これらはレシピエント細胞を同時トランスフェクトするために使用される。あるいは、キメラH鎖およびL鎖をコードする融合した遺伝子は同じベクター上でアセンブルできる。発現ベクターのトランスフェクションおよびキメラ抗体の産生のために、レシピエント細胞系統はミエローマ細胞であってもよい。ミエローマ細胞は、トランスフェクトされた

50

免疫グロブリン遺伝子によってコードされる免疫グロブリンを合成、アSEMBル、および分泌でき、免疫グロブリンのグリコシル化のためのメカニズムを保有する。ミエローマ細胞は、培養中またはマウスの腹腔中で増殖でき、このマウスの腹腔では、分泌された免疫グロブリンは腹水から入手できる。他の適切なレシピエント細胞には、ヒトまたは非ヒト起源のBリンパ球などのリンパ細胞、ヒトまたは非ヒト起源のハイブリドーマ細胞、または種間ヘテロハイブリドーマ細胞が挙げられる。

【0215】

本発明のキメラ、イヌ化抗体構築物、または抗NGFポリペプチドを持っている発現ベクターは、形質転換、トランスフェクション、結合体化、プロトプラスト融合、リン酸カルシウム沈殿、およびジエチルアミノエチル(DEAE)デキストランなどのポリカチオンを用いる適用などの生化学的手段、ならびにエレクトロポレーション、直接マイクロインジェクション、および微粒子銃などの機械的手段を含む種々の適切な手段のいずれかによって適切な宿主細胞に導入できる。Johnston et al., 240 Science 1538 (1988)。

10

【0216】

酵母は、免疫グロブリンH鎖およびL鎖の産生のために、細菌を超えた実質的な利益を提供できる。酵母は、グリコシル化を含む翻訳後修飾を実行する。多数の組換えDNAストラテジーが現在存在しており、これは、酵母における所望のタンパク質の産生のために使用できる、強力なプロモーター配列および高コピー数プラスミドを利用する。酵母は、クローニングされた哺乳動物遺伝産物のリーダー配列を認識し、リーダー配列を持つペプチド(すなわち、プレペプチド)を分泌する。Hitzman et al., 11th Int'l Conference on Yeast, Genetics & Molec. Biol. (Montpellier, France, 1982)。

20

【0217】

酵母遺伝子発現系は、抗NGFペプチド、抗体、およびアSEMBルされたマウスおよびキメラ、ヘテロキメラ、イヌ化、抗体、そのフラグメント、およびその領域の産生、分泌、および安定性のレベルについて日常的に評価された。酵母がグルコースが豊富である培地中で増殖されるときに、大量に産生される糖分解酵素をコードする活発に発現される遺伝子からのプロモーターおよび終結エレメントを組み込む一連の酵母遺伝子発現系のいずれかが利用できる。公知の糖分解遺伝子もまた、非常に効率的な転写制御シグナルを提供することができる。例えば、ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)遺伝子のプロモーターシグナルおよびターミネーターシグナルが利用できる。多数のアプローチが、酵母におけるクローニングされた免疫グロブリンcDNAの発現のための最適な発現プラスミドを評価するために取られることができる。Vol. II DNA Cloning, 45-66, (Glover, ed.,) IRL Press, Oxford, UK 1985)を参照のこと。

30

【0218】

細菌株もまた、本発明によって記載される抗体分子またはペプチドの産生のための宿主として利用できる。宿主細胞と適合可能である種から誘導される、レプリコンおよび制御配列を含有するプラスミドベクターは、これらの細菌種と関連して使用される。ベクターは、複製部位、ならびに、形質転換された細胞において表現型選択を提供することが可能である特定の遺伝子を持っている。多数のアプローチが、細菌におけるクローニングされた免疫グロブリンcDNAによってコードされる、マウス、キメラ、ヘテロキメラ、イヌ化抗体、フラグメント、領域、または抗体鎖の産生のための発現プラスミドを評価するために取られることができる(Glover, 1985 前出; Ausubel, 1993 前出; Sambrook, 2001 前出; Colligan et al., eds. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, NY, NY (1994-2001); Colligan et al., eds. Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY (1997-2001)を参

40

50

照のこと)。

【0219】

宿主哺乳動物細胞は、インビトロまたはインビボで増殖されてもよい。哺乳動物細胞は、リーダーペプチドの除去、H鎖およびL鎖の折りたたみおよびアセンブリー、抗体分子のグリコシル化、および機能的抗体タンパク質の分泌を含む、免疫グロブリンタンパク質分子に対する翻訳後修飾を提供する。上記のリンパ起源の細胞に加えて、抗体タンパク質の産生のための宿主として有用であり得る哺乳動物細胞には、Ver o (ATCC CRL 81)細胞またはCHO-K1(ATCC CRL 61)細胞などの線維芽細胞起源の細胞が挙げられる。多くのベクター系は、哺乳動物細胞中でクローニングされた抗NGFペプチドH鎖およびL鎖遺伝子の発現のために利用可能である(Glover, 1985前出を参照のこと)。完全なH2L2抗体を得るために、異なるアプローチに従うことができる。完全な四量体H2L2抗体および/または抗NGFペプチドへのH鎖およびL鎖の細胞内会合および連結を達成するために、同じ細胞の中でH鎖とL鎖を同時発現させることが可能である。この同時発現は、同じ宿主において、同じプラスミドまたは異なるプラスミドのいずれかを使用することによって行うことができる。H鎖およびL鎖、および/または抗NGFペプチドの両方についての遺伝子が同じプラスミドに配置でき、次いで、これは細胞にトランスフェクトされ、それによって、両方の鎖を発現する細胞について直接選択される。あるいは、細胞は、1つの鎖、例えば、L鎖をコードするプラスミドで最初にトランスフェクトでき、続いて、第2の選択マーカーを含有するH鎖プラスミドを用いて、得られる細胞系統のトランスフェクションを行うことができる。いずれかの経路を介して抗NGFペプチドおよび/またはH2L2分子を産生する細胞系統は、さらなる選択マーカーとともに、ペプチド、H鎖、L鎖、またはH鎖プラスL鎖のさらなるコピーをコードするプラスミドを用いてトランスフェクトし、アSEMBLされたH2L2抗体分子のより高い産生、またはトランスフェクトされた細胞系統の安定性の増強などの、増強された特性を有する細胞系統を生成することができる。

10

20

30

40

50

【0220】

長期的な、高収率の組換え抗体の産生のために、安定な発現が使用されてもよい。例えば、抗体分子を安定に発現する細胞系統が操作されてもよい。複製のウイルス起点を含有する発現ベクターを使用するよりも、宿主細胞は、免疫グロブリン発現カセットおよび選択マーカーを用いて形質転換できる。外来DNAの導入後、操作された細胞は、富化培地中で1~2日間の間増殖され、次いで、選択培地に切りかえられる。組換えプラスミド中の選択マーカーは選択に対する抵抗を付与し、染色体にプラスミドを安定して組み込むこと、および増殖して増殖巣を形成することを可能にし、これは、次には、クローニングされて細胞系統に拡大できる。このような操作された細胞系統は、抗体分子と間接的または直接的に相互作用する化合物/成分のスクリーニングおよび評価において特に有用であるかもしれない。

【0221】

一旦、本発明の抗体が産生されると、これは、免疫グロブリン分子の精製のために当該分野において公知である任意の方法、例えば、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換、アフィニティー、特に、プロテインAの後の特異的抗原についてのアフィニティー、およびサイズ排除クロマトグラフィー)、遠心分離、溶解度の違い、またはタンパク質の精製のための任意の他の標準的な技術によって精製されてもよい。多くの実施形態において、抗体は、細胞から培養培地に分泌され、培養培地から収集される。

【0222】

(薬学および獣医学的適用)

本発明の抗NGF抗体またはペプチドは、例えば、イヌにおけるNGF関連障害の治療において使用できる。より具体的には、本発明は、薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤、および、活性成分として、本発明に従う抗体またはペプチドを備える薬学的組成物をさらに提供する。この抗体は、本発明に従う、キメラ、ヘテロキメラ、イヌ化、または抗体であり得る。インタクトな免疫グロブリン、またはそれらの結合フラグメント、例え

ば、F a bもまた想定される。本発明の抗体またはその薬学的組成物は、非経口的投与、例えば、皮下、筋肉内、または静脈内の投与のために有用である。

【0223】

本発明の抗NGF抗体および/またはペプチドは、個別の治療剤として、または他の治療剤と組み合わせてのいずれかで投与できる。これらは単独で投与できるが、しかし、一般的には、選択された投与の経路および標準の薬学的実務に基づいて、選択された薬学的キャリアと一緒に投与される。本明細書に開示される抗体の投与は、非経口注射（腹腔内、皮下、または筋肉内の注射）、経口、または気道表面への抗体の局所投与（薬学的製剤中で局所的に運ばれる）を含む、任意の適切な手段によって実行されてもよい。気道表面への局所投与は、鼻内投与によって実行できる（例えば、ドロッパー、スワブ、または吸入器の使用によって）。気道表面への抗体の局所投与はまた、エアロゾル懸濁液としての抗体を含有する薬学的製剤（固体粒子と液体粒子の両方を含む）の呼吸用粒子を作製すること、次いで、被験体に呼吸用粒子を吸入させることによるなどの、吸入投与によっても実行できる。薬学的製剤の呼吸用粒子の投与のための方法および装置は周知であり、任意の従来的な技術が利用できる。

10

【0224】

ある所望の実施形態において、抗体は非経口注射によって投与される。非経口投与のために、抗NGF抗体またはペプチドが、薬学的に受容可能な非経口ビヒクルと共同して、溶液、懸濁液、エマルジョン、または凍結乾燥粉末として製剤化できる。例えば、ビヒクルは、水性キャリアなどの受容可能なキャリア中に溶解された、抗体の溶液またはそのカクテルであってもよく、このようなビヒクルは、水、生理食塩水、リンガー液、デキストロース溶液、トレハロースまたはスクロース溶液、または5%血清アルブミン、0.4%生理食塩水、0.3%グリシンなどであり得る。リポソームおよび固定油などの非水性ビヒクルもまた使用できる。これらの溶液は滅菌性であり、一般的には、粒子状物質を含まない。これらの組成物は、従来的な、周知の滅菌技術によって滅菌されてもよい。これらの組成物は、pH調整剤および緩衝剤、毒性調整剤などの適切な生理学的条件に対して要求されるような薬学的に受容可能な補助物質、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどを含有してもよい。これらの製剤中の抗体の濃度は、幅広く変動でき、例えば、約0.5重量%未満、通常、約1重量%または少なくとも約1重量%から、15重量%または20重量%程度の濃度まで変動でき、そして選択された投与の特定の様式に従って、主として液体の体積、粘度などに基づいて選択される。ビヒクルまたは凍結乾燥粉末は、等張性を維持する添加剤（例えば、塩化ナトリウム、マンニトール）および化学的安定性を維持する添加剤（例えば、緩衝剤および保存剤）を含有できる。製剤は、一般的に使用される技術によって滅菌される。非経口投与可能な組成物を調製するための実際の方法は当業者に公知であるかまたは明白であり、例えば、REMI NGTON'S PHARMA. SCI. (15th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa., 1980)においてより詳細に記載されている。

20

30

【0225】

本発明の抗体は、保存のために凍結乾燥でき、使用前に適切なキャリア中で再構築できる。この技術は、従来的な免疫グロブリンとともに有効であることが示されてきた。任意の適切な凍結乾燥技術および再構築技術が利用できる。凍結乾燥および再構築は、抗体活性の喪失の程度の変化をもたらすことができ、補償するために使用レベルが調整されてもよいことが当業者によって評価される。本発明の抗体またはそのカクテルを含有する組成物は、再発の予防および/または既存の疾患のための治療的処置のために投与できる。適切な薬学的キャリアは、この技術分野における標準的な参考テキストであるREMI NGTON'S PHARMA CEUTICAL SCIENCESの最も最近の版に記載されている。治療的適用において、組成物は、すでに疾患に罹患している被験体に、疾患またはその合併症を治癒するため、または少なくとも部分的に阻止もしくは軽減するための量で投与される。これを達成するために適正な量は、「治療有効用量」または「治療有効

40

50

量」として定義される。この使用のための有効量は、疾患の重篤度および被験体自体の免疫系の一般的状態に依存するが、しかし、一般的には、kg体重あたり約0.1mgからkg体重あたり約10mgまで、好ましくは、体重のkgあたり約0.3mgから体重のkgあたり約5mgまでの範囲である。本発明のイヌ様抗体によって達成される、余分な物質の最小化および「外来物質」拒絶の低い可能性の観点において、これらの抗体の実質的な過剰量を投与することが可能であるかもしれない。

【0226】

投与される投薬量は、特定の薬剤の薬力学的特性などの公知の因子、およびその投与の様式および経路；レシピエントの年齢、健康、および体重；徴候の性質および程度、併用治療の種類、治療の頻度、および所望される効果に依存して変動する。

10

【0227】

非限定的な例として、イヌにおけるNGF関連病理の治療は、上記の投薬量範囲である本発明の抗NGF抗体の2週間に1回、または1ヶ月に1回の投薬量として提供できる。イヌの治療使用のための例示的な抗体は、本発明に従う、高親和性（これらはまた、高い結合力であってもよい）抗体、ならびに、強力なインビボ抗NGF活性を有する抗体のフラグメント、領域、および誘導体である。組成物の単回または複数回投与は、治療する獣医によって選択される用量レベルおよびパターンに伴って実行できる。いずれにしても、薬学的製剤は、被験体を効果的に治療するために十分である本発明の抗体の量を提供すべきである。

【0228】

20

（診断的適用）

本発明はまた、NGF関連障害を有することが知られているか、またはそのことが疑われているイヌにおけるNGFを検出するための診断方法における使用のための上記の抗NGF抗体およびペプチドを提供する。本発明の1つの実施形態において、NGF関連障害は痛みである。別の実施形態において、NGF関連障害は骨関節炎である。本発明の抗NGF抗体および/またはペプチドは、サンプル中のNGFまたは抗NGF抗体を検出または定量するイムノアッセイのために有用である。NGFのイムノアッセイは、典型的には、NGFに選択的に結合することが可能である、検出可能に標識された高親和性（または高結合力）の本発明の抗NGF抗体またはポリペプチドの存在下で、臨床または生物学的サンプルをインキュベートすること、および、サンプル中で結合している標識ペプチドまたは抗体を検出することを備える。様々な臨床アッセイ手順が当該分野において周知である。例えば、IMMUNOASSAYS FOR THE 80'S (Voller et al., eds., Univ. Park, 1981)を参照のこと。このようなサンプルには、動物被験体から収集され、かつ以下に記載されるようなELISA分析に供される、組織生検、血液、血清、および糞便のサンプルが挙げられる。従って、抗NGF抗体またはポリペプチドは、細胞、細胞粒子、または可溶性タンパク質を固定化可能である、ニトロセルロースまたは別の固体支持体に固定できる。次いで、この支持体は、適切な緩衝液で洗浄され、続いて、検出可能に標識されたNGF特異的ペプチド、抗体、または抗原結合タンパク質を用いる処理を行う。次いで、この固相支持体は、結合していないペプチドまたは抗体を除去するために、緩衝液を用いて2回目の洗浄をされる。次いで、この固相支持体上に結合した標識の量は、公知の方法の工程によって検出できる。

30

40

【0229】

「固相支持体」または「キャリア」とは、ペプチド、抗原、または抗体を結合可能な任意の支持体をいう。周知の支持体またはキャリアには、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリビニリデンフルオリド(PVDF)、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、およびマグネタイトが挙げられる。キャリアの性質は、本発明の目的のために、ある程度まで可溶性であるか、または不溶性であるかのいずれかであり得る。支持体の材料は、結合される分子がNGFまたは抗NGF抗体に結合可能である限り、実質的に任意の可能な構造的構成を有することができる。従って、支持体の構成は、球状であり得、同様に、ビーズ状

50

、または円筒状、同様に、試験管の内部表面中、またはロッドの外部表面であり得る。あるいは、この表面は、シート、培養ディッシュ、試験ストリップなどのように平らであり得る。例えば、支持体はポリスチレンビーズを含んでもよい。当業者は、抗体、ペプチド、または抗原を結合するための多くの他の適切なキャリアを知っており、または日常の実験によってそのことを確認できる。周知の方法の工程は、所定のロットの抗NGFペプチドおよび/または抗体もしくは抗原結合タンパク質の結合活性を決定できる。当業者は、操作的なおよび最適なアッセイ条件を日常の実験によって決定できる。

#### 【0230】

NGF特異的ペプチドおよび/または抗体の検出可能な標識化は、酵素免疫測定(EIA)、または酵素結合免疫吸着測定(ELISA)における使用のために、酵素に結合することによって達成できる。結合された酵素は、露出された基質と反応し、例えば、分光光度法的に、蛍光分析的に、または視覚的手段によって検出できる化学部分を生成する。本発明のNGF特異的抗体を検出可能に標識するために使用できる酵素には、リンゴ酸脱水素酵素、スタフィロコッカスヌクレアーゼ、デルタ5ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、アルファ-グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼが挙げられるがこれらに限定されない。NGF特異的抗体を放射性標識することにより、ラジオイムノアッセイ(RIA)の使用を通して、NGFを検出することが可能である。Work et al., LAB. TECHNIQUES & BIOCHEM. IN MOLEC. BIO (No. Holland Pub. Co., NY, 1978)を参照のこと。放射性同位元素は、ガンマカウンターまたはシンチレーションカウンターまたはオートラジオグラフィーの使用のような手段によって検出できる。本発明の目的のために特に有用な同位元素には、 $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^3\text{S}$ 、および $^{14}\text{C}$ が挙げられる。

10

20

#### 【0231】

NGF特異的抗体を蛍光化合物で標識することもまた可能である。蛍光標識された抗体が適切な波長の光に曝露されたとき、その存在は、次に、蛍光によって検出できる。最も共通して使用されている蛍光標識化合物には、フルオレセインイソシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒド、およびフルオレスカミンがある。NGF特異的抗体または抗原結合タンパク質はまた、 $^{125}\text{Eu}$ などの蛍光放射金属またはランタニド系列の他の金属を使用して検出可能に標識できる。これらの金属は、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)またはエチレンジアミン四酢酸(EDTA)のような金属キレート剤を使用して、NGF特異的抗体に結合される。

30

#### 【0232】

NGF特異的抗体はまた、化学発光化合物にカップリングすることによって、検出可能に標識できる。次いで、化学発光標識された抗体の存在は、化学反応の過程の間に生じる発光の存在を検出することによって決定される。有用な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、セロマチックアクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびシュウ酸エステルである。

40

#### 【0233】

同様に、生物発光化合物は、本発明のNGF特異的抗体、一部、フラグメント、ポリペプチド、または誘導体を標識するために使用できる。生物発光は、触媒タンパク質が化学発光反応の有効性を増加させる生物学的系において見い出される化学発光の1つの型である。生物発光タンパク質の存在は、発光の存在を検出することによって決定される。標識の目的のための重要な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、およびエクオリンである。

#### 【0234】

50

NGF特異的抗体、一部、フラグメント、ポリペプチド、または誘導体の検出は、例えば、検出可能な標識が放射能ガンマカウンターである場合には、シンチレーションカウンターによって、または、例えば、標識が蛍光物質である場合には、フルオロメーターによって達成できる。酵素標識の場合には、検出は、酵素の基質を利用する比色分析(colorometric)方法によって達成できる。検出はまた、同様の準備された標準と比較において、基質の酵素反応の程度の視覚的比較によって達成できる。

#### 【0235】

本発明の目的のために、上記のアッセイによって検出されるNGFは、生物学的サンプル中に存在し得る。NGFを含有する任意のサンプルが使用されてもよい。例えば、サンプルは、例えば、血液、血清、リンパ、尿、糞便、炎症性滲出液、脳脊髄液、羊水、組織抽出液、ホモジネートなどの体液である。本発明は、これらのサンプルのみを使用することに限定されないが、しかし、当業者は、本明細書に照らして、他のサンプルの使用を可能にする適切な条件を決定することが可能である。

10

#### 【0236】

インサイチュ検出は、動物被験体から組織学的試料を取り出すことによって達成でき、このような試料への本発明の標識された抗体の組み合わせを提供する。抗体(またはその一部)は、生物学的サンプルに、標識された抗体(またはその一部)を適用することによって、または標識された抗体(またはその一部)重ね合わせることによって提供されてもよい。このような手順の使用を通して、調べられた組織中のNGFの存在のみならず、NGFの分布もまた決定することが可能である。本発明を使用して、当業者は、広範な種々の組織学的方法のいずれか(染色手順など)が、このようなインサイチュ検出を達成するために修飾できることを容易に認知する。

20

#### 【0237】

本発明の抗体、フラグメント、または誘導体は、「二部位」または「サンドイッチ」アッセイとしてもまた知られる免疫測定アッセイにおける利用のために適合できる。典型的な免疫測定アッセイにおいて、未標識抗体(または抗体のフラグメント)の量は、試験される液体中に不溶性である固体支持体に結合され、一定量の検出可能に標識された可溶性抗体が、固相抗体、抗原、および標識抗体の間で形成された三成分複合体の検出および/または定量を可能にする。

#### 【0238】

抗体は、サンプル中のNGFを定量的もしくは定性的に検出するために、またはNGFを発現する細胞の存在を検出するために使用されてもよい。これは、蛍光顕微鏡法、フローサイトメトリー、または蛍光測定検出と結びつけられた、蛍光標識された抗体(以下を参照のこと)を利用する免疫蛍光技術によって達成できる。診断目的のために、抗体は、標識されるか、または標識されないかのいずれであってもよい。未標識抗体は、イヌ免疫グロブリン定常領域に特異的な抗体などの抗体と反応性である、他の標識された抗体(二次抗体)と組み合わせて使用できる。あるいは、抗体は、直接標識できる。放射性核種、蛍光、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤、リガンド(特に、ハプテン)などのような広範な種々の標識が利用されてもよい。以前に議論された多くの型のイムノアッセイが利用可能であり、当業者に周知である。重要なことに、本発明の抗体は、イヌにおけるNGF関連障害を診断する際に役に立つかもしれない。より具体的には、本発明の抗体は、コンパニオンアニマルにおけるNGFの過剰発現を同定してもよい。従って、本発明の抗体は、重要な免疫組織化学ツールを提供してもよい。本発明の抗体は、遺伝子発現プロフィールを測定するために高度に適切である、抗体アレイ上で使用されてもよい。

30

40

#### 【0239】

(キット)

対象の方法を実施するためのキットもまた、本発明の範囲に含まれる。これらのキットは、1種以上の本発明の抗体、これをコードする核酸、またはこれを含有する細胞を少なくとも含む。本発明の抗体は、通常は、凍結乾燥型で、容器中に提供されてもよい。標識もしくは毒素に結合体化されてもよいが、または結合体化されなくてもよい抗体は、典型

50

的には、T r i s、リン酸、炭酸などの緩衝液、安定剤、殺生物剤、不活性タンパク質、タンパク質、例えば血清アルブミンなどを伴うキットの中に含まれる。一般的には、これらの材料は、活性抗体の量に基づいて、5重量%未満、通常、抗体濃度に再度基づいて、少なくとも約0.001重量%の総量で存在する。頻繁には、活性成分を希釈するために不活性増量剤または賦形剤を含めることが所望され、ここでは、賦形剤は、総組成物の約1重量%～99重量%で存在してもよい。一次抗体に結合可能である二次抗体がアッセイで利用されるとき、これは、通常、別々のバイアル中に存在する。二次抗体は、典型的には、標識と結合体化され、上記の抗体製剤と類似の様式で製剤化される。キットは、一般的には、使用のための一連の説明書もまた含む。

【0240】

本発明は、ここで、以下の非限定的な実施例によってさらに説明される。

【0241】

(実施例)

本発明は、下記の実施例によってさらに例証および支持される。しかし、これらの実施例は、いかなる場合であっても、本発明の範囲をさらに限定するとは見なされるべきではない。それとは反対に、当業者は、本発明の技術思想、および/または添付の特許請求の範囲の範囲から逸脱することなく、本発明の他の実施形態、改変、および等価物が存在することを容易に理解する。

【0242】

(実施例1)

(イヌの神経成長因子(NGF)を認識するマウスモノクローナル抗体の同定)

一連のマウスmAbは成熟ヒト - NGFに対して産生された(米国特許第7,727,527号)。一旦これらのmAbが生成されると、これらは、エピトープマッピング、ならびに1)NGFへの結合、および2)NGFのその受容体TrkAおよびより低い程度でのp75への結合を遮断する能力、および3)NGF遮断(TrkA自己リン酸化の遮断、ニューロンのNGF依存的生存の遮断)と関連する機能的拮抗作用の評価についてのインビトロ試験を含む様々な分析に供せられた。これらの結果に基づいて、可変領域1(-ヘアピンターンA'-A")、4(-鎖CおよびD)およびカルボキシ末端に結合するmAbは、TrkAおよびp75結合を遮断することが可能であることが見い出された。これらのマウスmAbの1つ、RN911のNGF上の結合エピトープの分子モデリングは図6Aに示されている。RN911は、関節炎、癌、手術切開、ならびに神経障害の痛み、および内臓の痛みと関連する痛みの前臨床齧歯類モデルにおいて有効であることが示された。

【0243】

(イヌにおける関節の痛みのための抗NGF治療)

イヌ、マウス、およびヒトにわたって、 - NGF上のRN911の結合エピトープの中でアミノ酸配列同一性は100%保存されている(図6B、上)。RN911の組換えイヌNGFへの高親和性結合( $K_D = 755 \text{ pM}$ )は実験的に確認され、そして痛みモデルを評価する際に当業者によって日常的に使用され、以下に記載されるイヌの滑膜炎痛みモデルにおける抗NGFmAbの有効性が、RN911を使用して評価された。RN911は、専用に繁殖されたビーグルにおける薬物動態学/耐性と有効性の両方の研究のために、当業者の技術を使用して、十分な量で産生された。RN911のIV注射の3日後および7日後の滑膜炎の誘導、ならびに滑膜炎誘導後の複数の時点での跛行/痛みの評価を含んだ有効性研究が設計された。次のセクションにおいて説明される薬物動態学/耐性研究は、ビーグルにおけるRN911の安全性の信頼を得るために、および有効性研究のための用量選択の指導を補助するデータを収集するために、有効性研究に先立って実施された。

【0244】

(DMPK)

(代謝および体内動態)

すべてのタンパク質と同様に、RN911はアミノ酸および他の内因性成分に異化されることが推測できる。変化していないRN911が排出されることはなさそうである。

【0245】

(薬物動態学)

イヌにおけるマウス抗NGF mAb RN911の薬物動態学(PK)は、単回IV投与後に研究された。3匹のイヌはプラセボ、4匹のイヌは1.2 mg/kg、4匹のイヌは3.5 mg/kg、そして1匹のイヌは9.8 mg/kgを投薬された。1匹のイヌのみが最高用量で利用された。薬物動態学データは低い変動性を示し、そしてすべての用量における「遊離の」RN911のプロフィールの類似の形状は、標的媒介性体内動態がPKの要因ではないことを示唆した。データは優秀な用量比例を示した。T<sub>1/2</sub>はすべての用量で同様であり、平均では102 ± 27時間であった(n = 9)。クリアランスは0.00051 ± 0.00005 L/h/kgであり、非常に遅かった。分配量は0.072 ± 0.021 L/kgであり、イヌの血液量に制約されるタンパク質について予測される量に近かった。図7は、以下に記載される滑膜炎有効性研究から分析されたマーカーの血清分析からのデータを示す。有効性研究における3 mg/kgでの血清濃度および薬物動態学は、PK研究における3.5 mg/kgでの値とほぼ同一であったことは明白である。

10

【0246】

「結合型」RN911は、ELISA法を使用して両方の研究でアッセイされた(図8)。濃度はNGF等価物として報告されている。少なくとも1週間の間、ほぼピークレベルのままであった典型的なRN911-NGF濃度は、NGF等価物中でおおよそ0.5 ng/mLであった。これは、イヌ血清中の内因性NGF濃度(~40 - 60 pg/mL)よりも大体10倍高い。

20

【0247】

典型的なRN911-NGF血清濃度は、RN911等価物に転換されたときに、おおよそ5 ng/mL(0.5 ng/mL \* 分子量比率、150,000 / 13,425)であった。これは、最初の図において示された測定された遊離のRN911濃度よりもはるかに下であり、mAbが、3 mg/kgの用量での数週間の間、過度のままである(NGF濃度と比較した場合に)かもしれないことを示唆している。

【0248】

(免疫原性)

抗薬物抗体(ADA)力価は、投薬前および研究の最後に決定された。表1に示されるように、少なくとも2匹のビーグルにおいて、ADA力価の上昇の証拠が存在した(イヌ8および12を参照のこと)。もしもこれがマウスmAbであるならば、RN911がビーグルにおいて免疫応答を生成することは驚くべきことではない;このmAbを用いて反復投薬研究を実施する試みは行われなかった。

30

【0249】

【表 1】

イヌ	用量 (mg/k g)	ADA力価 (倍数希釈)	
		0日目	28日目
対照サンプル	---	400	800
1	0	100	<50
2	0	50	50
3	0	<50	<50
5	1.2	50	200
6	1.2	50	50
7	1.2	<50	50
8	1.2	50	≥1600
9	3.5	<50	50
10	3.5	<50	200
11	3.5	<50	100
12	3.5	50	800
13	9.8	<50	<50

表1. RN911のIV注射後の抗薬物抗体(ADA)力価

## 【0250】

(生物分析アッセイの方法)

遊離のRN911 ELISAは、捕捉因子としての組換えイヌNGFおよび検出抗体としてのペルオキシダーゼ結合体化ロバ抗マウスIgGの使用に基づいた。QCならびに標準がアッセイランに含められた。

## 【0251】

結合型RN911-NGF ELISAは、ストレプトアビジンプレートに吸着させたビオチン化ウサギ抗ヒトNGFの使用に基づいた。NGF-RN911と遊離のNGFの両方を捕捉したが、NGF-RN911を捕捉しなかったこの抗体は、ペルオキシダーゼ結合体化ロバ抗マウスIgGを使用して選択的に検出された。標準は、既知の濃度のイヌNGFを、わずかにモル過剰のRN911とともに、インキュベーションすることによって調製された。

## 【0252】

抗薬物抗体ELISAは、捕捉因子としてRN911を利用した。イヌ血清サンプル中のADAはプレート上で捕捉され、4種すべてのイヌIgGサブクラスを検出可能であったペルオキシダーゼ結合体化ヤギ抗イヌ抗体の混合物を使用して検出された。

## 【0253】

(薬物動態学/薬力学(PK/PD))

PK/PDデータは、滑膜炎有効性研究において標的種の中でRN911を用いて生成された。滑膜炎痛みモデルにおいて、単一の膝関節の滑膜の一過性炎症が、細菌リポポリサッカリド(LPS)の関節内注射を介して誘導される。定量可能な跛行は滑膜炎誘導の2時間以内に起こり、3~4時間のピークは6時間までに徐々に弱くなり、24時間後には完全に消散した。IACUCの見込みから、最初の滑膜炎誘導と関連する跛行が完全に消散したならば、2つの別々の場合に対して(すなわち、各々の膝関節において)滑膜炎を誘導することは受容可能である。それゆえに、本発明者らは、滑膜炎が、同じピーグル

10

20

30

40

50

において、IV処理（RN911またはPBSビヒクル）の3日後および7日後に誘導される研究を設計した。各々の滑膜炎誘導後、跛行は、視覚的アナログスケール（VAS）を使用して定量された。

#### 【0254】

本研究の結果は、RN911（3mg/kg、IV）が、投薬3日後において、滑膜炎関連跛行の統計学的に有意な減少を引き起こしたことを示す（図4）。この時点で、遊離のRN911血清濃度は、平均で $24400 \pm 3900$  ng/mLであった（ $170 \pm 27$  nM；図2）。RN911は、7日目においてさらにより有効であり（図9）、このとき、遊離のRN911血清濃度が平均で $13200 \pm 3500$  ng/mLであった（ $91 \pm 24$  nM；図7）。

10

#### 【0255】

（実施例2）

（イヌ化ストラテジー）

抗薬物抗体（ADA）の生成は、モノクローナル抗体を含む任意の生物治療タンパク質の効力の損失と関連付けることができる。文献の包括的な評価は、免疫原性完全ヒトmAbおよび非免疫原性キメラmAbの例を見い出すことができるが、モノクローナル抗体のスペシエーションが、mAbが免疫原性である傾向を減少できることを示した。本明細書に提供されるマウス抗NGF、RN911、モノクローナル抗体についてのADA製剤に付随するリスクを和らげることを補助するために、イヌ化ストラテジーが利用された。このイヌ化ストラテジーは、CDR移植のために最も適切なイヌの生殖系列抗体配列を同定することに基いている（図3）。重鎖と軽鎖の両方についてのすべての利用可能なイヌ生殖系列配列の広範な分析後、生殖系列候補は、RN911に対するそれらの相同性に対して選択され、RN911からのCDRが、ネイティブイヌCDRを置き換えるために使用された。目的は、インビボでの免疫原性の潜在能力を最小化するために、完全なイヌフレームワークを使用して、高い親和性および細胞ベースの活性を保持することであった。イヌ化mAbは、哺乳動物発現のために最適化され、発現され、そしてSPRを介してNGFを結合するそれらの能力について特徴付けられた。これらの結果は、実施例3において以下に説明される。イヌ化後の信頼できる発現レベルとNGFを結合する能力の両方を保持したmAbのみがさらなる特徴付けに進められた。一過性に発現されず、またはNGFを結合する能力を失ったmAbは体系的に精査され、1）機能の喪失または発現の欠如の原因である鎖、2）発現または機能の喪失の原因であるフレームワーク、および3）発現または機能の喪失の原因であるアミノ酸を同定した。

20

30

#### 【0256】

（実施例3）

（RN911抗体のイヌ化）

mAb RN911のイヌ化可変重鎖および軽鎖を表す合成構築物が作られた。それぞれのイヌ化重鎖またはカップ構築物領域を含有するプラスミドへの各々の可変鎖のサブクローニング後に、プラスミドは、HEK293細胞の中での抗体発現のために同時トランスフェクトされた。本発明のイヌ重鎖定常領域は任意の特定のサブタイプに限定されないが、しかし、ある実施形態において、イヌ重鎖は配列番号45または配列番号48に記載されている。イヌカップ軽鎖定常領域は任意の特定の配列に限定されないが、しかし、本発明のある実施形態において、イヌカップ軽鎖定常領域は配列番号47に記載されている。mAb「canE3M65」のために使用されるフレームワークはHEK293一過性発現系において発現され、イヌ化に際してNGF結合を保持した（アミノ酸配列33「CAN-E3M-VL」、配列番号34「CAN-N2G9-VH」）。

40

#### 【0257】

対照的に、can618（CAN-618-VL；CAN-N2G9-VH）イヌ化の試みのために使用された生殖系列配列は、特定の非発現mAbを生じた。キメラ、ヘテロキメラ、およびイヌ化バージョンのmAb RN911が発現され、SPRを介してイヌNGFを結合するそれらの能力について特徴付けされた。これらの結果は、イヌ化抗体が

50

発現しなかったことを実証した。また、ヘテロキメラに関しては、イヌ化軽鎖と対合したキメラ重鎖が発現を失ったのに対して、キメラ軽鎖と対合したイヌ化重鎖は、HEK293細胞における発現を保持した。ヘテロキメラから得られた結果に基づいて、イヌ化軽鎖が発現の喪失の原因であることが推定された。発現が失われたRN911のイヌ化バージョンの発現を回復させるための試みにおいて、イヌ化軽鎖は、フレームワーク配列を交換することによって修飾された。図10は、can911軽鎖フレームワーク置換作業の概観を提供する。この作業は、イヌのフレームワークII(FWII)の中の残基を、マウスのフレームワークII配列で置き換え、HEK293細胞における発現を回復した抗体(配列番号35「CAN-618-VL」、配列番号36「CAN-QC23-VL」、および可変重鎖配列番号34「CAN-N2G9-VH」)を同定した。

10

## 【0258】

図11は、発現とそれぞれの変異の両方の結果を要約する。これらのデータは、フレームワーク3および4を使用するイヌ化誘導体が、両方とも、それらの前駆体分子と比較可能なHEK発現レベルを保持し、イヌNGFへの結合を示すことを実証する。フレームワーク1は、より低い程度まで発現を保持したが、これもまたイヌNGFへの結合を維持した。

## 【0259】

(実施例4)

(イヌ化抗NGFmAbへのイヌNGF結合の特徴付け)

各イヌ化抗NGF抗体のイヌNGFへの親和性は、SPR(表面プラズモン共鳴)を使用して測定された。加えて、機能的インビトロアッセイが、NGFのTrkAへの結合を阻害するmAbの能力についての阻害定数を測定するために開発された。can6512(CAN-N2G9-VH、CAN-E3M-VL、CAN-65E-HC、CAN-KAPPA-LC)およびRN911について図12および13に示されたデータは、mAbのNGFへの高い親和性結合、およびNGFの受容体trkAへの結合のmAbによる強力な阻害を例証する。しかし、ある程度の親和性は、mAb CAN-N2G9-VH、CAN-E3Mへのイヌ化の際に失われた。この親和性の喪失に起因して、イヌ化mAbは、効力を取り戻すために、親和性成熟化されている(詳細については実施例5を参照のこと)。各SPRアッセイ上での親和性成熟化された、SSM57(配列番号27「CAN-SSM57-VH」、配列番号26「CAN-SSME3M-VL」)、SSM58(配列番号28「CAN-SSM58-VH」、配列番号26「CAN-SSME3M-VL」)、およびSSM66(アミノ酸配列29「CAN-SSM66」、配列番号26「CAN-SSME3M-VL」)の結果が図12および13に含まれた。

20

30

## 【0260】

(実施例5)

(イヌ化抗NGFmAbの親和性成熟)

canE3M65(配列番号16「CAN-E3M-VL」、配列番号17「CAN-N2G9-VH」)の親和性成熟は、イヌ化mAbの親和性を先祖のマウス抗体に戻すために必要である。CDR領域のみにおける抗体配列中の個々の点変異を含有するための、2つの抗体ライブラリーが設計された。図15は、各Fabライブラリーの設計ストラテジーを概観する。ここでは、ルックスルー変異誘発(LTM)ライブラリーは、代表的な9個の保存性アミノ酸残基のうち1個に限定された個別の変異誘発を備えるのに対して、部位特異的変異誘発(SSM)ライブラリーは、任意の天然のアミノ酸(CysおよびMetはここでは除外されている)をサンプリングできる。このLTMライブラリーは、CDRH3、CDRH1、およびCDRL3における有益な変異を同定するために構築された。あるいは、SSMライブラリーが、CDRH1、CDRH2、およびCDRL2に配置され、本発明者らが各ライブラリーからの有益な変異を組み合わせることを可能にする。

40

## 【0261】

LTMライブラリーは、当業者によって共通して使用されるオリゴヌクレオチド設計プ

50

プログラムを使用して設計された一連のプライマーから構築された。PCR産物は、3つの特定のCDRの各々上での単一の変異、ならびにCDRH3、CDRL1、および/またはCDRL3上のパリエーションを含む組み合わせから構成されるFabライブラリーを達成するために組み合わせられた。93%ライゲーション効率が、 $\sim 10^4$ のライブラリーサイズを用いて達成された。減少量のビオチン化IgGを用いる4ラウンドのパニングが実行され、拡張オフレートが、延長された一晚の洗浄工程によって選択された。1ng/ $\mu$ Lビーズから10pg/ $\mu$ Lビーズまでの量の範囲で使用されたNGF抗原は、過剰の非ビオチン化IgGを使用して溶出された。4回目のパニングのラウンド後、アウトプットはTOPOベクターにクローニングされ、配列決定された。富化された変異は表2に示される。

10

【0262】

【表2】

変異の頻度；

HC CDR3	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
E3	G	G	Y	W	Y	A	T	S	Y	Y	F	D	Y
911	G	G	Y	Y	Y	G	T	S	Y	Y	F	D	Y
		A (1)	K (4)	D (5)	S (4)	W (3)	S (3)	W (2)				A (1)	
			S (3)	K (3)	D (2)	S (2)	D (2)	H (2)				V (1)	
			W (2)	S (2)	K (2)	Y (2)	Q (1)	A (2)					
			P (2)	Q (2)	W (1)	L (2)	H (1)	P (1)					
			D (2)	W (1)	Q (1)	Q (1)	A (1)	D (1)					
			L (1)	P (1)	P (1)	P (1)		Q (1)					
			H (1)	L (1)	H (1)	A (1)							
			H (1)										

LC CDR1	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
E3	R	A	S	Q	S	I	S	N	N	L	N
911	R	A	S	Q	D	I	S	N	H	L	N
	P (1)	G (2)	N (1)	P (2)	S (2)	H (1)	P (3)	H (3)	K (2)	Q (2)	A (2)
			Q (1)	A (1)	G (1)	Y (1)	Y (1)	D (3)	Y (1)	D (1)	S (1)
			R (1)		N (1)	S (1)	T (1)	S (2)	S (1)	H (1)	
			W (1)		A (1)		Q (1)	P (2)	P (1)	Y (1)	
			P (1)					K (2)	N (1)	P (1)	
			D (1)					Q (1)		N (1)	
								L (1)		K (1)	
								A (1)			

LC CDR3	89	90	91	92	93	94	95	96	97
E3	Q	Q	E	H	T	L	P	Y	T
911	Q	Q	S	K	T	L	P	Y	T
			K (2)	D (3)	P (2)	K (1)	S (1)		A (1)
			Y (2)	Q (1)	K (1)	E (1)	K (1)		
			D (1)	H (1)	A (1)	Y (1)	A (1)		
			I (1)	Y (1)	L (1)	W (1)	Y (1)		
			P (1)	P (1)	H (1)	Q (1)			
				L (1)	Y (1)	H (1)			
				E (1)	W (1)				

20

30

【0263】

示された構築物は、全長IgGに転換され、HEK293細胞において一過性に発現された。個々のおよび組み合わせた変異についての発現の結果は、表3および4において以下に示される。

40

【0264】

【表 3 - 1】

#	HC	LC	発現	#	HC	LC	発現	#	HC	LC	発現
1	N2G9_651 2	E3M	8.15	31	N2G9_651 2	E3M	13.1	61	N2G9_65 12	E3M	15.8
2	N2G9_651 2	S91Y	6.04	32	Y100W	D28S	7.35	62	Y102W	D28S	9.39
3	N2G9_651 2	D28S	6.18	33	Y100W	D28S,NH31H N (1)	6.37	63	Y102W	D28S,NH 31HN (1)	4.8
4	N2G9_651 2	D28S, NH31 HN (1)	4.75	34	Y100W	D28S, H32N	5.88	64	Y102W	D28S, H32N	低すぎる
5	N2G9_651 2	D28S, H32N	5.42	35	Y100W	D28S, H32N, K92H	6.66	65	Y102W	D28S, H32N, K92H	8.74
6	N2G9_651 2	D28S, H32N, K92H	8.79	36	Y100W	K92D	13.5	66	Y102W	K92D	11.5
7	N2G9_651 2	K92D	6.64	37	Y100W	D28S, NH31HN, S91Y (2)	7.45	67	Y102W	D28S, NH31HN, S91Y (2)	5.12
8	N2G9_651 2	D28S, NH31 HN, S91Y (2)	4.7	38	Y100W	D28S, NH31HN, K92D	11.7	68	Y102W	D28S, NH31HN, K92D	15.4
9	N2G9_651 2	D28S, NH31 HN, K92D	8.95	39	Y100W	D28S, S91Y	6.57	69	Y102W	D28S, S91Y	6.19
10	N2G9_651 2	D28S, S91Y	低すぎる	40	Y100W	D28, K92D	10.1	70	Y102W	D28, K92D	13.8
11	N2G9_651 2	D28, K92D	8.91	41	Y100W	D28S, H32N, SK91EH	5.91	71	Y102W	D28S, H32N, SK91EH	4.89
12	N2G9_651 2	D28S, H32N, SK91E H	4.41	42	Y100W	SK91EH	低すぎる	72	Y102W	SK91EH	7.37
13	N2G9_651 2	SK91E H	4.2	43	Y100W	K92H	10.6	73	Y102W	K92H	10.3
14	N2G9_651 2	K92H	11.7	44	Y100W	S91E	3.03	74	Y102W	S91E	低すぎる
15	N2G9_651 2	S91E	4.56	45	Y100W	H32N	11.2	75	Y102W	H32N	12.7
16	N2G9_651 2	H32N	8.23	46	Y101W	D28S	6.76	76	Y101D	D28S	12.6
17	Y100W	E3M	10.7	47	Y101W	D28S,NH31H N (1)	5.04	77	Y101D	D28S,NH 31HN (1)	低すぎる
18	Y101W	E3M	11.8	48	Y101W	D28S, H32N	5.5	78	Y101D	D28S, H32N	8.55
19	Y102W	E3M	9.81	49	Y101W	D28S, H32N, K92H	9.21	79	Y101D	D28S, H32N, K92H	9.95
20	Y101D	E3M	4.92	50	Y101W	K92D	12.3	80	Y101D	K92D	13.4
21	YY100WD	E3M	12.1	51	Y101W	D28S, NH31HN, S91Y (2)	5.38	81	Y101D	D28S, NH31HN, S91Y (2)	5.55
22	Y101W, G103A	E3M	7.14	52	Y101W	D28S, NH31HN, K92D	5.43	82	Y101D	D28S, NH31HN, K92D	17.4
23	G103A	E3M	低すぎる	53	Y101W	D28S, S91Y	5.85	83	Y101D	D28S,	6.02

10

20

30

【 0 2 6 5 】

【表 3 - 2】

24	Y100W	S91Y	4.7	54	Y101W	D28, K92D	8.41	84	Y101D	D28, K92D	14.5
25	Y101W	S91Y	4.11	55	Y101W	D28S, H32N, SK91EH	5.4	85	Y101D	D28S, H32N, SK91EH	4.65
26	Y102W	S91Y	4.78	56	Y101W	SK91EH	低すぎる	86	Y101D	SK91EH	8.18
27	Y101D	S91Y	低すぎる	57	Y101W	K92H	12	87	Y101D	K92H	11.1
28	YY100WD	S91Y	5.58	58	Y101W	S91E	低すぎる	88	Y101D	S91E	低すぎる
29	Y101W, G103A	S91Y	4.4	59	Y101W	H32N	11.2	89	Y101D	H32N	13.9
30	G103A	S91Y	4.62	60	ネガティ ブ対照； DNAなし		低すぎる	90	ネガティ ブ対照； DNAなし		低すぎる

40

【 0 2 6 6 】

【表 4】

#	HC	LC	発現		#	HC	LC	発現
91	N2G9_6512	E3M	12.9		121	N2G9_6512	E3M	10.2
92	YY100WD	D28S	7.2		122	G103A	D28S	低すぎる
93	YY100WD	D28S,NH31HN (1)	低すぎる		123	G103A	D28S,NH31HN (1)	低すぎる
94	YY100WD	D28S, H32N	低すぎる		124	G103A	D28S, H32N	3.6
95	YY100WD	D28S, H32N, K92H	6.01		125	G103A	D28S, H32N, K92H	12.2
96	YY100WD	K92D	11.6		126	G103A	K92D	15.9
97	YY100WD	D28S, NH31HN, S91Y (2)	6.53		127	G103A	D28S, NH31HN, S91Y (2)	6.36
98	YY100WD	D28S, NH31HN, K92D	15.3		128	G103A	D28S, NH31HN, K92D	13.9
99	YY100WD	D28S, S91Y	4.22		129	G103A	D28S, S91Y	6.32
100	YY100WD	D28, K92D	11.3		130	G103A	D28, K92D	13.5
101	YY100WD	D28S, H32N, SK91EH	低すぎる		131	G103A	D28S, H32N, SK91EH	低すぎる
102	YY100WD	SK91EH	低すぎる		132	G103A	SK91EH	9.04
103	YY100WD	K92H	16.5		133	G103A	K92H	4.88
104	YY100WD	S91E	低すぎる		134	G103A	S91E	低すぎる
105	YY100WD	H32N	5.31		135	G103A	H32N	4.01
106	Y101W, G103A	D28S	4.57		136	反復 58		低すぎる
107	Y101W, G103A	D28S,NH31HN (1)	低すぎる		137	反復 59		13.3
108	Y101W, G103A	D28S, H32N	低すぎる		138	反復 115		低すぎる
109	Y101W, G103A	D28S, H32N, K92H	5.62					
110	Y101W, G103A	K92D	13.2					
111	Y101W, G103A	D28S, NH31HN, S91Y (2)	4.48					
112	Y101W, G103A	D28S, NH31HN, K92D	6.88					
113	Y101W, G103A	D28S, S91Y	5.26					
114	Y101W, G103A	D28, K92D	5.89					
115	Y101W, G103A	D28S, H32N, SK91EH	低すぎる					
116	Y101W, G103A	SK91EH	低すぎる					
117	Y101W, G103A	K92H	低すぎる					
118	Y101W, G103A	S91E	低すぎる					
119	Y101W, G103A	H32N	低すぎる					
120	Y101W, G103A	D28S, H32N, SK91EH	低すぎる					

10

20

30

## 【 0 2 6 7 】

上清に対する S P R は、初期のスクリーニングとして実施され、良好な結合物が精製され、純粋な m A b が再度 S P R を介して実施され、イヌ N G F への結合を測定した (表 5)。構築物 L T M 1 0 9 および L T M 1 3 5 は、結合親和性に基づいて進行するよう選択された。

## 【 0 2 6 8 】

【表 5 - 1】

B i a c o r e T 1 0 0 : イヌ N G F と A b の 結 合 速 度 論 の 要 約

名称	HC	LC	11/8	11/22	11/24	11/29	コメント
			$K_D$ (M)	$K_D$ (M)	$K_D$ (M)	$K_D$ (M)	
hE3	Y101W,G103A	D28S,H32N, SR91EH	1.29E-12	1.12E-12	3.37E-12	1.49E-12	
CanE3M 65112			3.35E-09	1.46E-09	2.35E-09	3.51E-09	
32	Y100W	D28S		2.25E-09			
33	Y100W	*D28S,NH31HN		結合なし	結合なし		
34	Y100W	D28S, H32N		6.39E-10		8.85E-10	√?
35	Y100W	D28S, H32N, K92H		2.37E-10		8.10E-10	√
36	Y100W	K92D		5.50E-09			
37	Y100W	*D28S,NH31HN, S91Y		1.91E-09			
38	Y100W	D28S,NH31HN, K92D		2.15E-09			
39	Y100W	D28S, S91Y		結合なし	結合なし		
40	Y100W	D28S, K92D		弱い結合	弱い結合		
41	Y100W	D28S, H32N, SR91EH		弱い結合	弱い結合		
43	Y100W	K92H			5.67E-09		
44	Y100W	S91E			結合なし		
45	Y100W	H32N			2.10E-09	4.35E-09	
109	Y101W, G103A	D28S, H32N, K92H			5.15E-10	7.48E-10	√
110	Y101W, G103A	K92D			3.26E-12	9.42E-10	Agg?
111	Y101W, G103A	*D28S, NH31HN, S91Y			1.46E-10	2.88E-11	Agg?
112	Y101W, G103A	D28S, NH31HN, K92D			1.65E-12	1.52E-11	Agg?
133	G103A	K92H			1.33E-12	1.10E-11	Agg?
135	G103A	H32N			1.38E-10	6.10E-12	Agg?

10

20

## 【 0 2 6 9 】

様々な  $K_D$  は異なるセンサーに対応しており、表面密度はわずかに変動する。Agg は、抗体凝集の徴候を示す結合曲線が少なくとも 1 回の実行で見られたことを示す。

## 【 0 2 7 0 】

SSMライブラリーを使用するファージディスプレイの 4 回のラウンドは、LTMのために使用される同じ野生型配列上での単一の部位変異を使用して実施された。ライブラリーは、ビオチン化または遊離のイヌNGFに対してパンされ、各ラウンド後に、高親和性および遅いオフレートについて選択された。選択は以下に示されるように実行され、ラウンド 4 のアウトプットがTOPOKローニングされ、配列決定された。

30

## 【 0 2 7 1 】

【表 5 - 2】

NGF親和性成熟のための部位特異的変異誘発—選択ストラテジー—

使用されるサンプル:

- (1) 抗原なしのストレプトアビジンビーズを使用するネガティブ対照
- (2) ストレプトアビジンビーズ上のbioNGF抗原
- (3) チューブ上に固定化されたdNGFを伴うイムノチューブ
- (4) bioNGFを伴うストレプトアビジンビーズ上のE33ポジティブ対照
- (5) イムノチューブ/dNGF抗原を伴うE33ポジティブ対照

\*注記 ポジティブ対照は適切なストリンジエンシーで検証する

注記：本発明者らは最も強固な結合物をスクリーニングして除いていないことを保証するために、化学溶出（100mM TEA）のみを使用する。イムノチューブについてのネガティブ選択＝固定化されたdNGFを伴わないチューブ。ストレプトビーズについてのネガティブ選択＝固定化されたbioNGFを伴わないビーズ。

洗浄の延長は非常に遅いオフレートについて選択する；ストリンジエンシーはラウンドとともに増加した。

【 0 2 7 2 】

10

20

30

【表 5 - 3】

サンプル (1), (2), (3)  
50µg/mL dNGF

ブロック	2時間
ネガティブ選択	1時間
結合	1時間
洗浄	10x PBST 洗浄4回
	10x PBS 洗浄17回
溶出	2時間
	30分間

100 nM bioNGF (ネガティブ対照= PBSのみ)

ブロック/ファージ	1時間
ブロック/ビーズ	2時間
ネガティブ選択	1時間
結合 抗原/ファージ	1時間
結合 複合体/ビーズ	15分間
洗浄	6x MPBST 洗浄4回
	6x MPBST 洗浄11回
	2x PBS

\*各行は新しいチューブへの移動を表す

溶出 5分間

10

20

30

ラウンド上:  
イムノチューブ:

【 0 2 7 3 】

【表 5 - 4】

サンプル (1), (2), (3), (4), (5) 20µg/mL dNGF			
ブロック			2時間
ネガティブ選択			1時間
結合			1時間
洗浄	15x PBST	洗浄 4回	2時間
	15x PBS	洗浄25回	2.5時間
溶出			30分間
50 nM bioNGF (ネガティブ選択= PBSのみ)			
ブロック/ファージ			1時間
ブロック/ビーズ			2時間
ネガティブ選択			1時間
結合 抗原/ファージ			1時間
結合 複合体/ビーズ			15分間
洗浄	10x MPBST	洗浄 4回	2時間
	10x MPBST	洗浄 18回	2時間
	4x PBS	PBS 洗浄2回	30分間
	*各行は新しいチューブへの移動を表す		
溶出			5分間

ラウンド2:  
イムノチューブ:

【 0 2 7 4 】

ストレプビーズ:

10

20

30

## 【表 5 - 5】

ラウンド3: サンプル (1), (2), (3), (4), (5)

イムノチューブ: 20ug/mL dNGF

ブロック			2時間
ネガティブ選択			1時間
結合			一晚
洗浄	15x PBST	洗浄4回	2時間
	15x PBS	洗浄 25回	6時間
溶出			30分間

10

ストレプビーズ: 30 nM bioNGF (ネガティブ選択= PBSのみ)

ブロックファージ			1時間
ブロックビーズ			2時間
ネガティブ選択			1時間
結合 抗原/ファージ			1時間
結合 複合体/ビーズ			一晚
洗浄	10x MPBST	洗浄4回	2時間
	10x MPBST	洗浄18回	30分間
	4x PBS	PBS 洗浄 2回	6時間
	*各行は新しいチューブへの移動を表す		
溶出			5分間

20

## 【 0 2 7 5 】

## 【表 5 - 6】

ラウンド 4: サンプル (1), (2), (3), (4), (5)

イムノチューブ: 10ug/mL dNGF

ブロック			2時間
ネガティブ選択			1時間
結合			1時間
洗浄	20x PBST	洗浄4回	3時間
	20x PBS	洗浄 32回	13時間
溶出			30分間

10

ストレプビーズ: 15 nM bioNGF (ネガティブ選択= PBSのみ)

ブロック フェージ			1時間
ブロック ビーズ			2時間
ネガティブ選択			1時間
結合 抗原/フェージ			1時間
結合 複合体/ビーズ			15分間
洗浄	15x MPBST	洗浄4回	3時間
	15x MPBST		
	5x PBS	PBS 洗浄 2回	13時間
	*各行は新しいチューブへの移動を表す		
溶出			5分間

20

## 【 0 2 7 6 】

【表 6】

サンプル	位置																													
	50	51	52	53	54	55	56	29	30	31	32	33	34	35	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
RN911	Y	I	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S
E3	Y	T	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	L	N	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	V	K	S	
A01	Y	I	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	K	N	S	A	L	K	S
B01	Y	I	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	N	L	K	S
B06	Y	I	S	R	F	H	S																							S
F03	Y	I	S	R	H	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S
F06	Y	I	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	P	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S
D10	Y	V	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	H	S
E07	Y	I	S	R	V	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	K	A	L	K	S
C07	Y	I	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S
C09	Y	I	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S
A02	Y	I	R	R	F	H	S	L	I	G	X	D	I	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	K	N	S	A	L	K	S
D08	Y	I	S	Q	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	D	I	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S
D09	Y	I	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S
A11	Y	I	S	R	F	H	S																							
C12	Y	N	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S
H11	Y	I	S	R	F	H	S																							
F11	Y	I	R	R	F	H	S																							
A08	Y	I	R	R	F	H	S																							
C06	Y	I	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S

見かけのプリセ  
ット プリアファ  
レンス

K

10

Y

20

R

30

40

【0277】

上記の表6は、SSMライブラリーディスプレイならびに初期の多様性から配列決定されたアウトプットを示す。富化された部位は、単一部位変異と複数部位変異（富化部位の組み合わせ）と、引き続きI g G転換の両方について選択された。重鎖と軽鎖の両方のSSM変異は、3つの鋳型：（1）野生型mAb、（2）LTM109（3）LTM135に対して生成された。

【0278】

変異した抗体はHEK293細胞中で発現され、イヌNGFに対する結合親和性につい

50

て評価された（以下の結果；表7～9における発現の結果）。抗体SSM57（配列番号27「CAN-SSM57-VL」、配列番号26「CAN-SSM-E3M-VL」）、SSM58（配列番号28「CAN-SSM58-VH」、配列番号26「CAN-SSM-E3M-VL」）、およびSSM66（配列番号29「CAN-SSM66-VH」、配列番号26「CAN-SSM-E3M-VL」）が最高の親和性を示した。

【0279】

【表7】

（表7-フアーージディスプレイアウトプット）

位置

サンプル

	50	51	52	53	54	55	56	29	30	31	32	33	34	35	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
RN911	Y	I	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	D	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S
E3	Y	T	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	L	N	I	W	G	D	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	V	K	S	
Imm2_E06	Y	I	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	T	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S	
Imm2_C08	Y	I	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	D	I	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S	
Imm2_H06	Y	I	S	R	F	H	S	L	I	E	Y	D	I	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S	
Imm1_G12	Y	I	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	Q	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S	
Imm1_B02	Y	I	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	T	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S	
Imm1_G12	Y	I	S	S	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S	
Imm2_G02	Y	I	S	S	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S	
ImmRB11	Y	I	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	T	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S	
ImmRD07	Y	I	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	H	I	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S	
ImmRC08	Y	I	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S	
ImmRE08	Y	I	S	R	F	H	S	L	I	E	Y	D	I	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S	
ImmRA06	Y	I	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	D	I	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S	
ImmRA10	Y	I	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	S	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S	
ImmRH02	Y	I	S	K	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S	
ImmRG09	Y	I	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S	
ImmRD12	Y	I	S	S	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S	
ImmRE04	Y	I	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	Q	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S	
ImmRC06	Y	I	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	T	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S	
ImmRG02	Y	I	R	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S	
ImmRA11	Y	I	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	T	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S	
ImmRC02								L	I	G	Y	D	I	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S	
ImmRG03	Y	I	S	R	F	H	S	L	I	G	Y	D	Q	N	M	I	W	G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	L	K	S	

10

20

30

40

【0280】

【表 8 - 1】

#	軽鎖	重鎖	発現
1'	E3M	N2G96512	低すぎる
2'	<i>E3M</i>	<i>SSMwtHCG31Q</i>	8.02
3'	<i>E3M</i>	<i>SSMwtHCG31E</i>	25
4'	E3M	SSMwtHCD33H	低すぎる
5'	E3M	SSMwtHCI34Q	低すぎる
6'	E3M	SSMwtHCD54T	低すぎる
7'	E3M	SSMwtHCDG54TI	低すぎる
8'	<i>E3M</i>	<i>SSMwtHCD54T,L63I</i>	4.94
9'	E3M	SSMwtHCD54T,D33H	低すぎる
10'	E3M	SSMwtHCD54T,I34Q	低すぎる
11'	<i>E3M</i>	<i>SSMwtHCD54T,G31E</i>	5.75

10

#	軽鎖	重鎖	発現
1b'	E3M	N2G96512	11.5
12'	<i>SSMwtLCR53S</i>	<i>N2G96512</i>	17.3
13'	<i>SSMwtLCR53S</i>	<i>SSMwtHCG31Q</i>	23.5
14'	<i>SSMwtLCR53S</i>	<i>SSMwtHCG31E</i>	27.3
15'	SSMwtLCR53S	SSMwtHCD33H	低すぎる
16'	SSMwtLCR53S	SSMwtHCI34Q	低すぎる
17'	<i>SSMwtLCR53S</i>	<i>SSMwtHCD54T</i>	11.9
18'	SSMwtLCR53S	SSMwtHCDG54TI	低すぎる
19'	<i>SSMwtLCR53S</i>	<i>SSMwtHCD54T,L63I</i>	14.5
20'	<i>SSMwtLCR53S</i>	<i>SSMwtHCD54T,D33H</i>	4.15
21'	SSMwtLCR53S	SSMwtHCD54T,I34Q	低すぎる
22'	<i>SSMwtLCR53S</i>	<i>SSMwtHCD54T,G31E</i>	15.5

20

30

#	軽鎖	重鎖	発現	2回目の試み
				発現
1c'	E3M	N2G96512	5.35	16
23'	E3M H32N	HC135 (G103A)	低すぎる	11.4

【 0 2 8 1 】

40

【表 8 - 2】

24'	E3M H32N	SSM135HCG31Q	低すぎる	3.7
25'	<i>E3M H32N</i>	<i>SSM135HCG31E</i>	3	3.8
26'	E3M H32N	SSM135HCD33H	低すぎる	低すぎる
27'	E3M H32N	SSM135HCI34Q	低すぎる	低すぎる
28'	E3M H32N	SSM135HCD54T	低すぎる	低すぎる
29'	E3M H32N	SSM135HCDG54TI	低すぎる	低すぎる
30'	E3M H32N	SSM135HCD54T,L63I	低すぎる	低すぎる
31'	E3M H32N	SSM135HCD54T,D33H	低すぎる	低すぎる
32'	E3M H32N	SSM135HCD54T,I34Q	低すぎる	低すぎる
33'	E3M H32N	SSM135HCD54T,G31E	低すぎる	低すぎる
34'	<i>SSM135LCR53S</i>	<i>HC135 (G103A)</i>	5.55	12.4
35'	<i>SSM135LCR53S</i>	<i>SSM135HCG31Q</i>	3	16.5
36'	<i>SSM135LCR53S</i>	<i>SSM135HCG31E</i>	6.06	11.7
37'	<i>SSM135LCR53S</i>	<i>SSM135HCD33H</i>	低すぎる	12.3
38'	SSM135LCR53S	SSM135HCI34Q	低すぎる	低すぎる
39'	SSM135LCR53S	SSM135HCD54T	低すぎる	7.36
40'	SSM135LCR53S	SSM135HCDG54TI	低すぎる	低すぎる
41'	SSM135LCR53S	SSM135HCD54T,L63I	低すぎる	8.14
42'	SSM135LCR53S	SSM135HCD54T,D33H	低すぎる	低すぎる
43'	SSM135LCR53S	SSM135HCD54T,I34Q	低すぎる	低すぎる
44'	<i>SSM135LCR53S</i>	<i>SSM135HCD54T,G31E</i>	3.17	13.6

10

20

#	軽鎖	重鎖	発現	2回目の試み
				発現
1d'	E3M	N2G96512	低すぎる	
45'	E3M D28S,H32N,K92H	HC109 (Y101W,G103A)	低すぎる	4.12
46'	E3M D28S,H32N,K92H	SSM109HCG31Q	低すぎる	5.27
47'	E3M D28S,H32N,K92H	SSM109HCG31E	低すぎる	6.67
48'	E3M D28S,H32N,K92H	SSM109HCD33H	低すぎる	低すぎる
49'	E3M D28S,H32N,K92H	SSM109HCI34Q	低すぎる	低すぎる
50'	E3M D28S,H32N,K92H	SSM109HCD54T	低すぎる	低すぎる
51'	E3M D28S,H32N,K92H	SSM109HCDG54TI	低すぎる	低すぎる

30

40

【 0 2 8 2 】

【表 8 - 3】

52'	E3M D28S,H32N,K92H	SSM109HCD54T,L63I	低すぎる	低すぎる
53'	E3M D28S,H32N,K92H	SSM109HCD54T,D33H	低すぎる	低すぎる
54'	E3M D28S,H32N,K92H	SSM109HCD54T,I34Q	低すぎる	低すぎる
55'	E3M D28S,H32N,K92H	SSM109HCD54T,G31E	低すぎる	5.97
56'	SSM109LCR53S	HC109 (Y101W,G103A)	低すぎる	14.5
57'	SSM109LCR53S	SSM109HCG31Q	低すぎる	12.1
58'	SSM109LCR53S	SSM109HCG31E	低すぎる	15.3
59'	SSM109LCR53S	SSM109HCD33H	低すぎる	11.7
60'	SSM109LCR53S	SSM109HCI34Q	低すぎる	低すぎる
61'	SSM109LCR53S	SSM109HCD54T	低すぎる	低すぎる
62'	SSM109LCR53S	SSM109HCDG54TI	低すぎる	低すぎる
63'	SSM109LCR53S	SSM109HCD54T,L63I	低すぎる	3.11
64'	SSM109LCR53S	SSM109HCD54T,D33H	低すぎる	低すぎる
65'	SSM109LCR53S	SSM109HCD54T,I34Q	低すぎる	低すぎる
66'	SSM109LCR53S	SSM109HCD54T,G31E	低すぎる	11.6

10

20

【 0 2 8 3 】

【表 9】

リガンド	サンプル	フィット	ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	kd (s <sup>-1</sup> )	KD (M)
A1	HBS-EP	1:1 結合	1.39E+07	6.61E-08	結合なし
A2	CanE3M 65112	1:1 結合	1.72E+04	8.11E-05	4.70E-09
A3	hE3	1:1 結合	8.75E+04	1.67E-07	1.91E-12
A4	LTM135	1:1 結合	2.51E+04	4.23E-05	1.69E-09
A5	SSM-2	1:1 結合	8.08E+03	1.14E-04	1.42E-08
A6	SSM-3	1:1 結合	4.04E+03	1.67E-04	4.14E-08
A7	SSM-8	1:1 結合	4.13E+03	1.73E-04	4.18E-08
A8	SSM-12	1:1 結合	9.57E+02	4.13E-03	4.32E-06
A9	SSM-13	1:1 結合	7.75E+03	2.41E-03	3.11E-07
A10	SSM-14	1:1 結合	3.44E+05	8.12E-03	2.36E-08
A11	SSM-17	1:1 結合	2.03E+04	1.40E-03	6.91E-08
A12	SSM-19	1:1 結合	4.38E+04	1.64E-03	3.74E-08
A13	SSM-22	1:1 結合	1.19E+03	2.96E-04	2.49E-07
A14	SSM-34	1:1 結合	6.24E+04	1.92E-04	3.08E-09
A15	SSM-36	1:1 結合	8.20E+03	3.30E-04	4.02E-08

30

40

【 0 2 8 4 】

( 実施例 6 )

50

(イヌ化抗体型グルタミンシンテターゼ (GS) プラスミドの産生)

イヌ化RN911 mAbをコードする遺伝子は、GSプラスミドpEE6.4およびpEE12.4にそれぞれクローニングされた(Lonza, Basel, Switzerland)。得られたプラスミドは、製造業者のプロトコールに従って消化され、一緒にライゲーションされて、単一の哺乳動物発現プラスミドを形成した。各プラスミドは、HEK293細胞をトランスフェクトするために使用され、発現は20Lの培養培地中で実行された。タンパク質は、馴化HEK培地からプロテインAアフィニティークロマトグラフィーを使用して、標準的なタンパク質精製方法に従って単離された。培地はクロマトグラフィー樹脂上にロードされ、pHシフトによって溶出された。溶出されたタンパク質はpH調整され、透析され、そして使用前に滅菌ろ過された。得られた抗体は、分析用サイズ排除クロマトグラフィーによって99パーセントより上のモノマーであり、高分子量凝集物は観察されなかった。抗体は、インビボ有効性を評価するために、イヌ滑膜炎モデルにおける評価のために引き続き使用された。

10

【0285】

(実施例7)

(イヌ滑膜炎モデルにおけるイヌ化抗体の評価)

イヌ化mAb(CAN-SSME3M-VL、CAN-SSM57-HC)は、5mg/kg IVおよび5mg/kg SCで、イヌ滑膜炎モデルにおいて試験された。研究の結果は図14に示され、投薬の7日後および28日後に滑膜炎を誘導した。イヌ化mAbは、投薬の7日後と28日後の両方で、SCとIVの投薬計画について有効性を示した。

20

(実施例8)

(イヌ化抗体の薬物動態学)

イヌ化SSM57 mAb(PF-06442591)の薬物動態学(PK)が、6匹のイヌにおいて、5mg/kgで、皮下(SC)投与を使用して研究された。イヌは、合計3回の注射について、5mg/kg SCのmAbを用いて、14日ごとに1回投薬され(0日目、14日目、28日目)、完全安全評価のために35日目に安楽死させられた(以下の安全情報を参照のこと)。各イヌからの血清サンプルは各投薬の前、および35日にわたって定期的に収集された。抗体濃度は、ELISAベース形式で測定され、ここでは、イヌNGFは、血清からmAbを捕捉するために使用された。次いで、抗体は、抗体サブクラスのFc部分を認識する標識された抗イヌ抗体を使用して検出された。結果は図16に示される。

30

【0286】

(実施例9)

(ラットMIAモデルにおけるイヌ化抗体の評価)

骨関節炎(OA)は、関節痛および関節軟骨の進行性の喪失によって特徴付けられる変性関節疾患である。MIAの関節内注射は、OAの病変に類似する軟骨下骨病変の進行を伴う関節軟骨の喪失を誘導する。このモデルは、齧歯動物種におけるOA様病変を再生するための迅速かつ最小限に侵襲性的な方法を提供する。

40

【0287】

骨関節炎のラットMIAモデルにおける1用量のMIAにおけるイヌ化抗NGF抗体の鎮痛効果は、研究の間に2回、研究7日目と研究14日目にイヌ化SSM57 mAb(PF-06442591)を投薬することによって実証された。痛みは、持続性の痛みのために重量負荷試験を、機械的痛覚過敏のために関節圧迫(Randall Selltó)試験を使用して評価された。ラットMIA手順の図解については、図17を参照のこと。

【0288】

(試験群の構成と用量レベル)

この表は研究において比較される実験群とそれぞれの用量レベルを列挙する。

【0289】

50

【表 10 - 1】

(試験群の構成と用量レベル)

この表は研究において比較される実験群とそれぞれの用量レベルを列挙する。

群番号	群サイズ	処理	量	用量 (mg/kg)	経路	投薬計画	試験計画
1	n=10	ビヒクル	1.6 ml/kg	0	SC	研究7日目と14日目に1回	研究-1日目、9日目、16日目、21日目、および28日目の重量負荷試験 研究-1日目、20日目、および28日目のRandall-Selitto試験
2	N=10	ポジティブ対照 (モルヒネ)	5 ml/kg	10	SC	研究9日目と16日目に1回1時間のプレ重傷負荷試験	
3	N=10	mAb1	1.6 ml/kg	8	SC	研究7日目と14日目に1回	
4	N=10	mAb2	1.6 ml/kg	8	SC		

10

## 【0290】

(感作物質の調製)

60 mg / ml の濃度の M I A 溶液が生理食塩水中で調製された。各ラットは調製された溶液の 50  $\mu$  l、すなわち、3 mg の M I A を投薬された。

## 【0291】

20

(ビヒクル調製(群1))

ビヒクル対照は生理食塩水であった。

(10 mg / kg の用量でのモルヒネ調製(群2))

1. 13.5 ml 生理食塩水を 1.5 ml モルヒネに加える

2. ラット体重 200 g あたり 1 ml の溶液を受容するように注射する

(試験項目の準備(群3~4))

抗体は 5 mg / ml であった。化合物は 2 ~ 8 で保存され、使用前に光から遮断された。激しい振盪はしない。化合物は投薬前 1 時間の間、室温まであたためられた。

## 【0292】

(処理)

30

ビヒクル(群1)および試験項目 m A b (群3および4)は試験日7日目と14日目に S C を経路して1回投与された。本研究におけるポジティブ対照であるモルヒネ(群2)は試験日7日目と14日目に S C を経路して1回投与された。

## 【0293】

(投与の経路)

i . ビヒクル対照 S C

i i , ポジティブ対照(モルヒネ) 10 mg / kg の用量 S C

i i i . 試験項目 m A b S C

(統計学/評価)

すべてのデータは平均  $\pm$  S E M として提示される。各処理群は、一元 A N O V A 分析、続いてテューキー検定を使用して(Prism V 4.0、GraphPad Software)、ビヒクル群と比較された。モデルを評価するための、ビヒクル群とモルヒネ群の間、およびのビヒクル群の中での比較は、T - 検定を使用して実施された。p 値 < 0.05 が有意差を表しているものとして考慮された。

40

## 【0294】

(動物の世話と使用)

## 【0295】

## 【表 10 - 2】

種／系統:	Rat Ola Wistar.	
性別:	雄性.	
齢／体重:	若年成体；研究開始時 (130-180 g).	
動物の健康:	本研究に使用された動物の健康状態はそれらの到着時に調べられた。良好な健康状態にある動物のみが実験室条件に順応され、研究に使用された。	10
順応:	少なくとも5日間.	
収容:	順応の間、および全体の研究期間を通して、動物はアクセスが限られた齧歯類施設の中に収容され、ポリプロピレンケージあたり最大3匹の群の中で維持された。ケージには固い底がはめ込まれ、ベッド材料としての滅菌経木で満たされた。	
食物および水:	動物は、市販の滅菌齧歯類のえさを自由に提供され、少量ずつ飲むためのステンレス鋼製チューブを備えたプロピレンボトルを介して各ケージに供給される飲用水に自由にアクセスした。	20
環境:	自動制御された環境条件は、研究室の中で、30-70%の相対湿度 (RH) で 17-23℃、12:12時間明：暗サイクル、および15-30換気／時間を維持するように設定された。温度およびRHは毎日モニターされた。	
ランダム化:	順応期間の間、動物はランダムに実験群に割り当てられた。各投薬群は、糞便の消費を通して起こり得る相互汚染を回避するために、別々のケージに維持された。	
終了:	研究の終わりに、生存している動物は、ペントバルビタールナトリウムによって安楽死させられた。	30

## 【0296】

研究は、実験動物の世話および使用における倫理的行為のための委員会 (the Committee for Ethical Conduct in the Care and Use of Laboratory Animals) に提出された、示される規則および規定に準拠していると述べている申し込み書式の認可後に実施された。

## 【0297】

(重量負荷試験)

ラットトレーニング - 試験環境への習慣付け

実験中での変動性のレベルが比較的高いことが予期されたので、このトレーニング計画が必要とされた。従って、このプロトコルの使用は、変動性を減少させる手助けとなり、首尾よい研究の可能性を増加させる。各ラットは1分間取り扱われ、試験装置 (インキャパシタンスメーター) の中に5分間配置された (試験装置への馴化)。この手順は研究 - 2日目に実施された。

40

## 【0298】

(重量負荷評価の詳細)

重量負荷の欠乏は、研究 - 1日目にすべてのラットにおいて測定され、この測定はベースラインとして役立った。次いで、重量負荷は、研究9日目、16日目、21日目、および28日目に記録された。インキャパシタンスメーターは、5秒間の時間にわたる3回の

50

測定を記録し、次いで、これらを平均して1つの値を得る。

【0299】

(機械的痛覚過敏 (Randall Selitto 試験))

痛覚計 (Ugo Basile) を使用する Randall - Selitto 試験を用いて、グラムで表現される、ラットにおける機械的閾値が測定された。この試験は、後足に対して有害な圧力を適用することによって実施された。モーターを作動させるペダルを押すことによって、線形スケール上で一定の速度で力が増加した。動物が、足の引っ込みまたは発声により痛みを示したとき、ペダルはすぐに解放され、侵害性の閾値がスケール上で読み取られた。400gのカットオフが使用されて、潜在的な組織損傷を回避した。Randall Selitto 試験は、研究 - 1日目 (ベースライン) と28日目に実施された。

10

【0300】

(臨床徴候)

30日間の研究の全体を通して、注意深い臨床試験が少なくとも1日1回実施された。何らかの異常が観察された場合、これらは記録された。観察には、皮膚、毛皮、眼、粘膜の変化、分泌物および排泄物 (例えば、下痢) の発生、自律神経活性化 (例えば、流涙、流涎、立毛、瞳孔の大きさ、異常な呼吸パターン)、歩行、姿勢、および取り扱いに対する反応、ならびに異常な行動、ふるえ、けいれん、眠り、および昏睡の存在が含まれた。

【0301】

(結果)

すべての群についての平均群体重 (g)。

20

【0302】

【表11】

	処理	ベースライン		7日目		14日目		21日目		27日目	
		平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
1	ビヒクル	178.9	3.04	258.5	4.43	295.3	5.92	318.2	7.21	341.4	7.57
2	モルヒネ 10 mg/kg	178.5	2.97	256.2	6.12	285.1	7.45	300.6	9.04	316	9.87
5	mAb1	176.8	4.57	258.7	5.98	296.4	7.01	319.2	7.8	342.9	7.66
6	mAb2	178	4.35	253.4	5.8	290.7	6.66	311.6	7.07	332.6	7.71

30

【0303】

(重量負荷試験に対する応答 (足の間の違い) (g))

\* ビヒクルに対して  $p < 0.05$  一方向 ANOVA、続いてテューキー検定を使用

各足の重量負荷試験は、重量負荷装置 (IITC, Series 8, Model 600 (登録商標)) によって別々に測定された。この試験は、2つの別々のセンサー上で、動物が各後足に適用する重量を独立して測定することによって、自発性の痛みを反映する自発性の姿勢の変化を定量する。

40

【0304】

結果が計算され、2つの後足にかかるもたれた重さの総量からの、動物が、損傷した右足またはインタクトな左足にもたれた重量のパーセンテージとして表された。次いで、インタクトな左足の値 - 損傷した右足の値の2つの値の間の差が計算される。

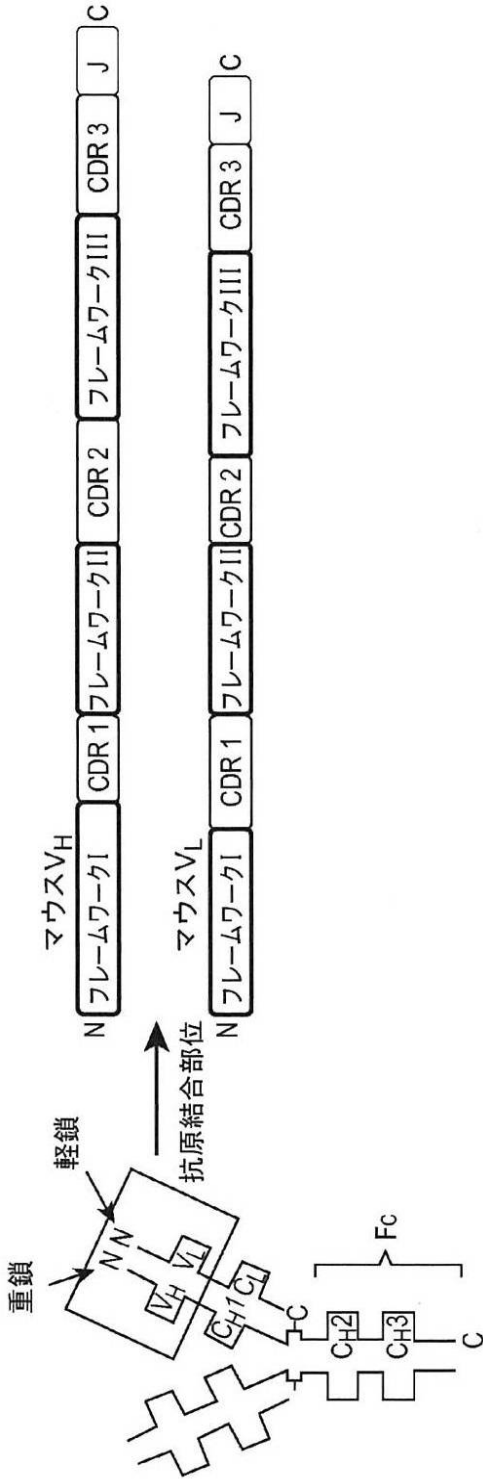
【0305】

重量負荷試験は、動物の重量を後足上にかけるその動物の能力を測定する。通常の場合では、動物は、その重量を両方の後足に均等にかける (左足に50%および右足に50%)。従って、各足にかかる重量のパーセンテージの間の違いは0%に近い。動物が痛みを経験するとき、この状況は変化する。動物は、痛みのない足により多くの重量をかけ、痛

50

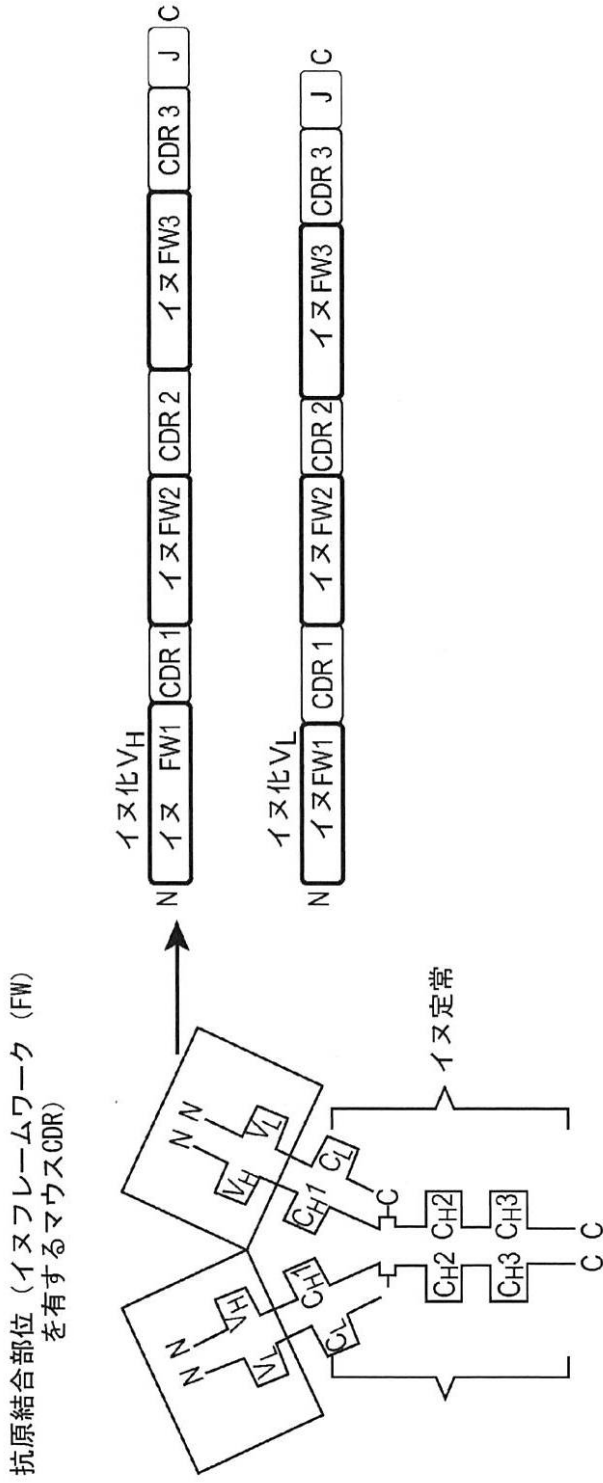
みのある足により少ない重量をかける傾向がある。結果として、両方の足にかかる重量のパーセンテージの違いは増大する。

【図 1】

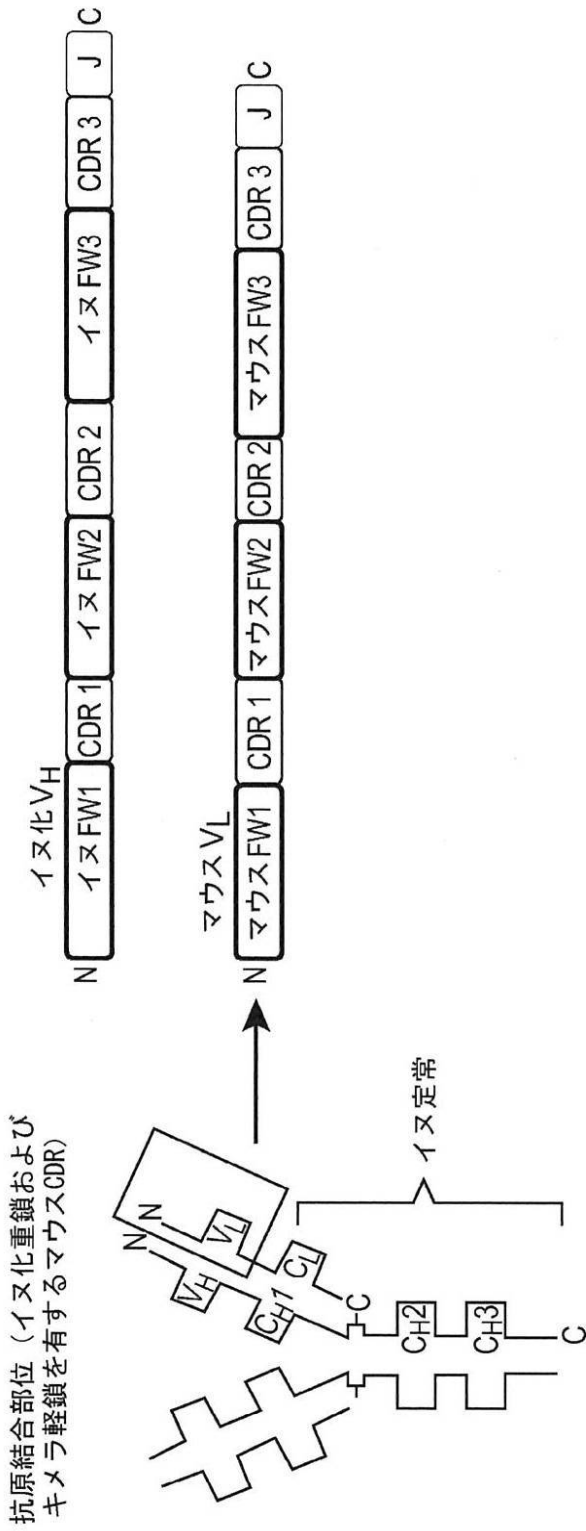




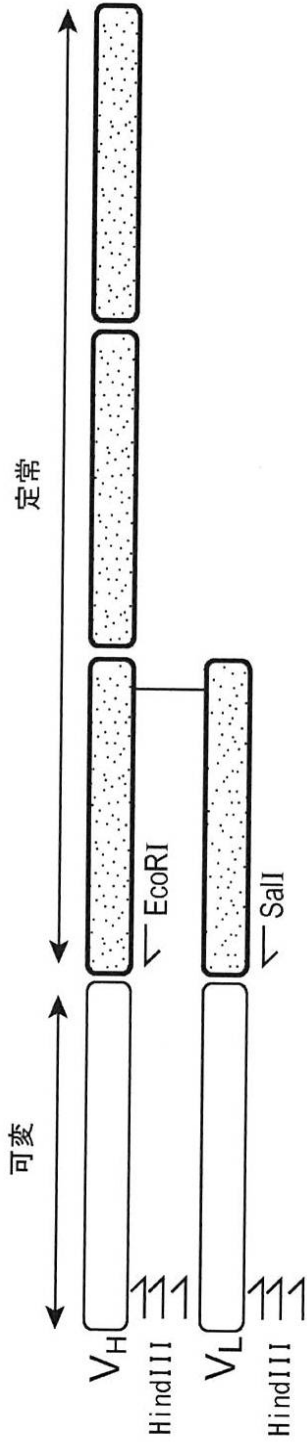
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】

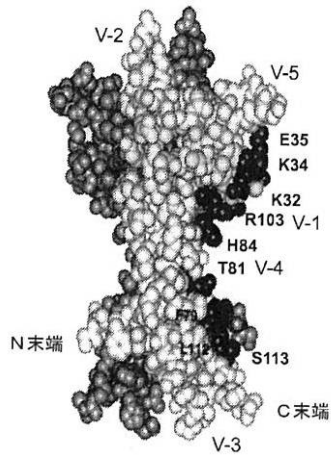


図 6 A

```

1                               30
イヌ (1) SSSHPVPHRGEFSVCDSSVSVWVGDKTTATD
ネコ (1) SSSHPVPHRGEFSVCDSSVSVWVGDKTTATD
ヒト (1) SSSHPVPHRGEFSVCDSSVSVWVGDKTTATD
マウス (1) SSTHPVPHMGEFSVCDSSVSVWVGDKTTATD
ラット (1) SSTHPVPHMGEFSVCDSSVSVWVGDKTTATD

31                               60
イヌ (31) IKGKEVMVLGEVNIINNSVFKQYFFETKCRD
ネコ (31) IKGKEVMVLGEVNIINNSVFKQYFFETKCRD
ヒト (31) IKGKEVMVLGEVNIINNSVFKQYFFETKCRD
マウス (31) IKGKEVTVLAEVNIINNSVFRQYFFETKCRA
ラット (31) IKGKEVTVLGEVNIINNSVFKQYFFETKCRA

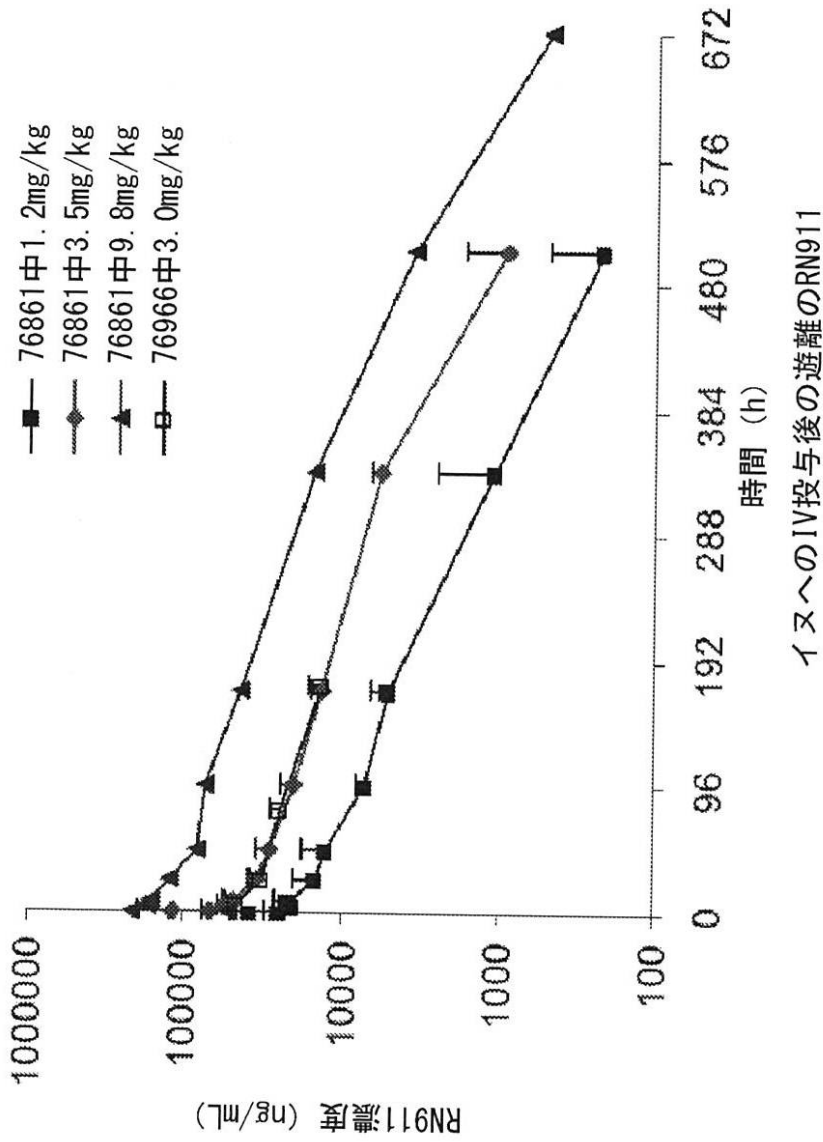
61                               90
イヌ (61) PTPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKAL
ネコ (61) PTPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKAL
ヒト (61) PNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKAL
マウス (61) SNPVESGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKAL
ラット (61) PNPVESGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKAL

91                               120
イヌ (91) TMDGQAARWFIRIDTACVCVLSRKAGRRA
ネコ (91) TMDGQAARWFIRIDTACVCVLSRKAGRRA
ヒト (91) TMDGQAARWFIRIDTACVCVLSRKAVRRA
マウス (91) TTDEKQAARWFIRIDTACVCVLSRKATRREG
ラット (91) TTDDKQAARWFIRIDTACVCVLSRKAARRG

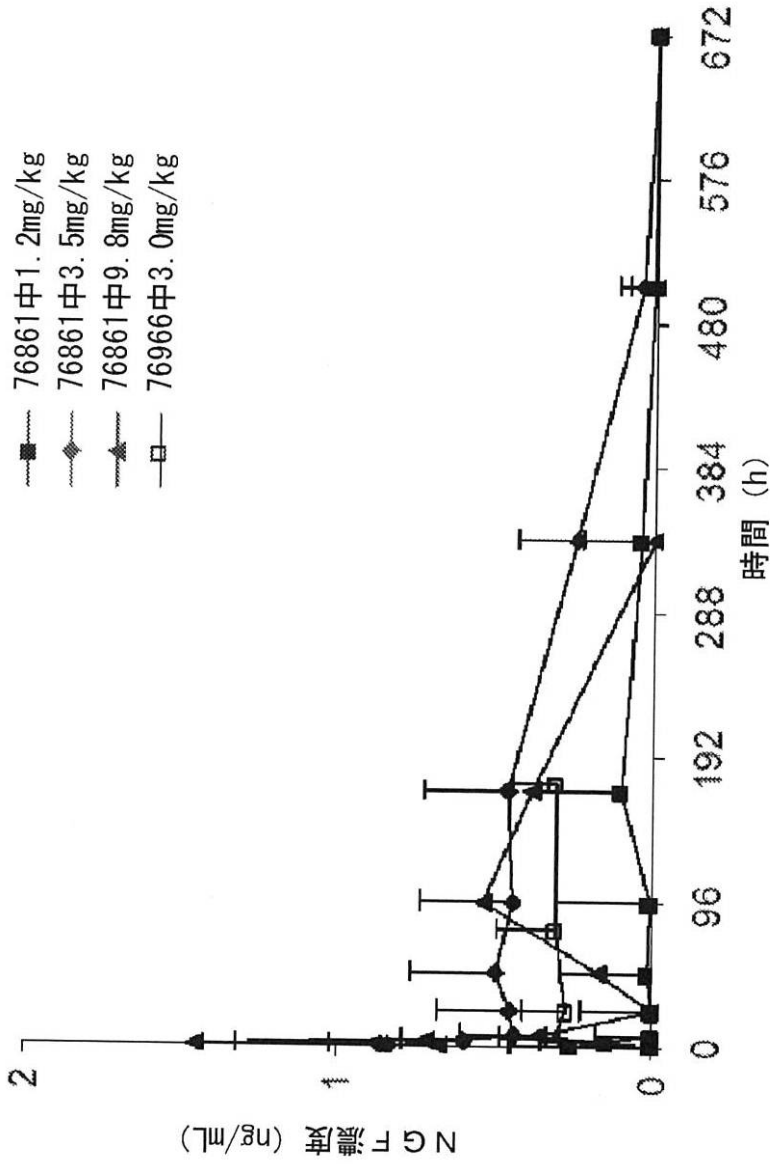
```

図 6 B

【 図 7 】



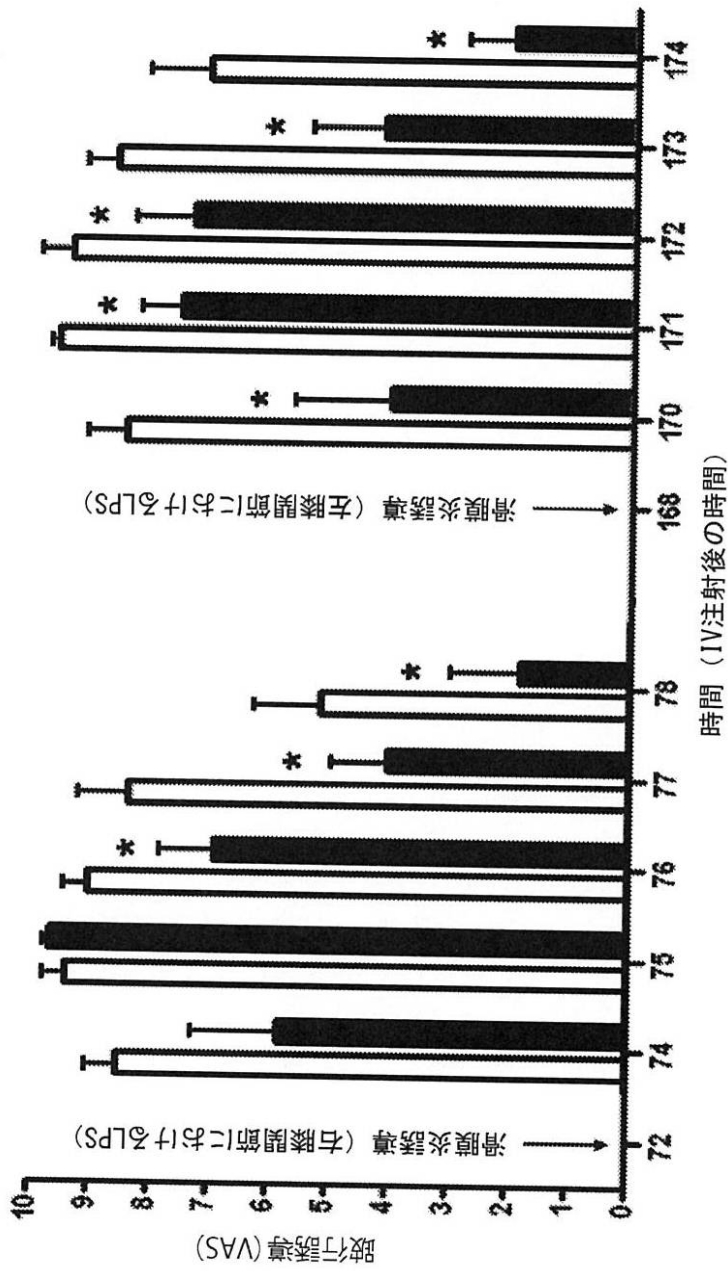
【 図 8 】



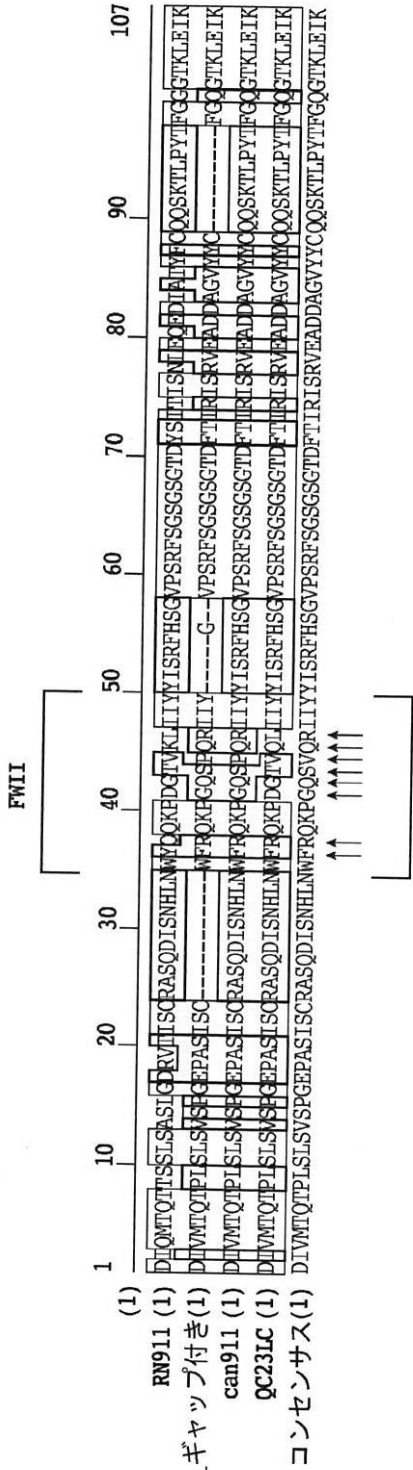
イヌへのIV投与後の結合型RN911

【 図 9 】

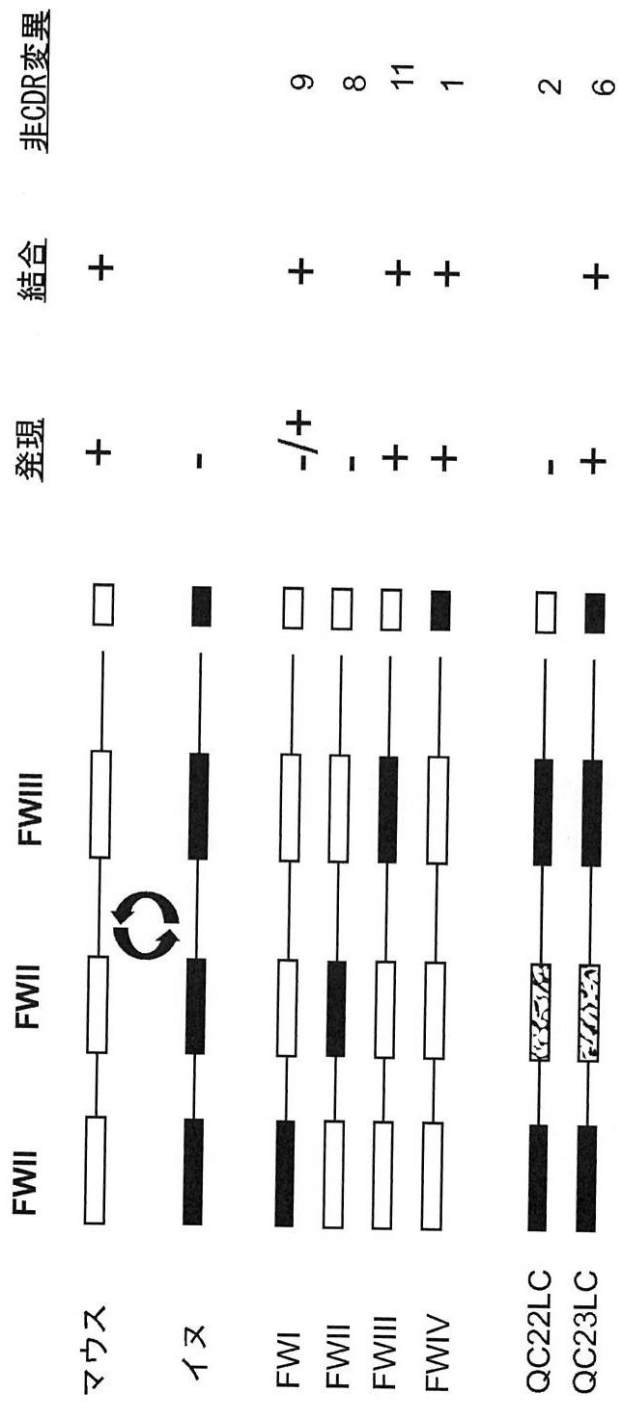
□ PBS (IV), N = 8  
■ RN 911 (3 mg/kg, IV), N = 8



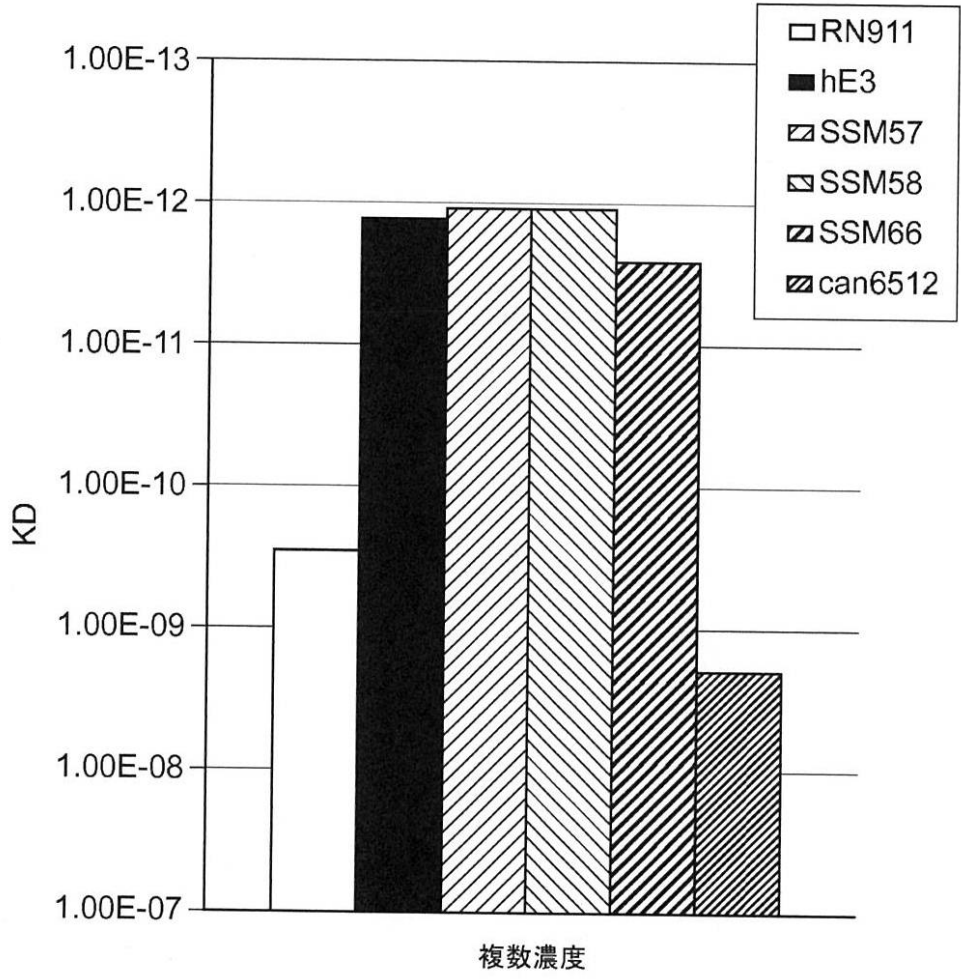
【 図 1 0 】



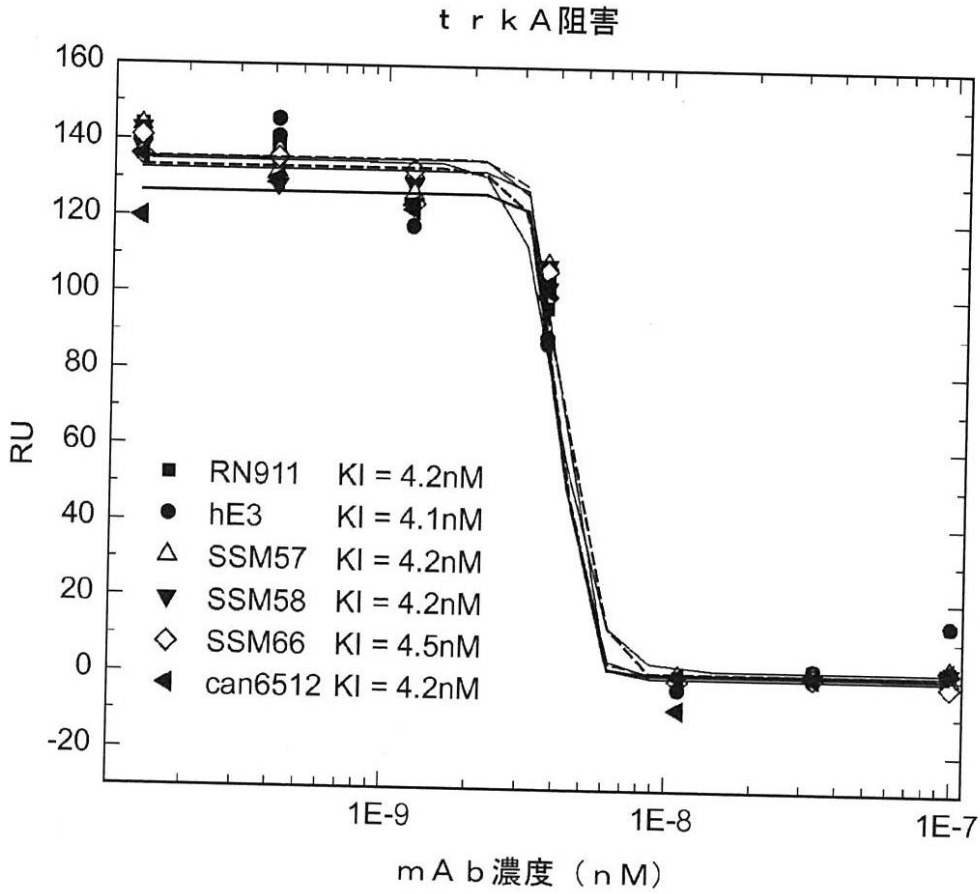
【 図 1 1 】



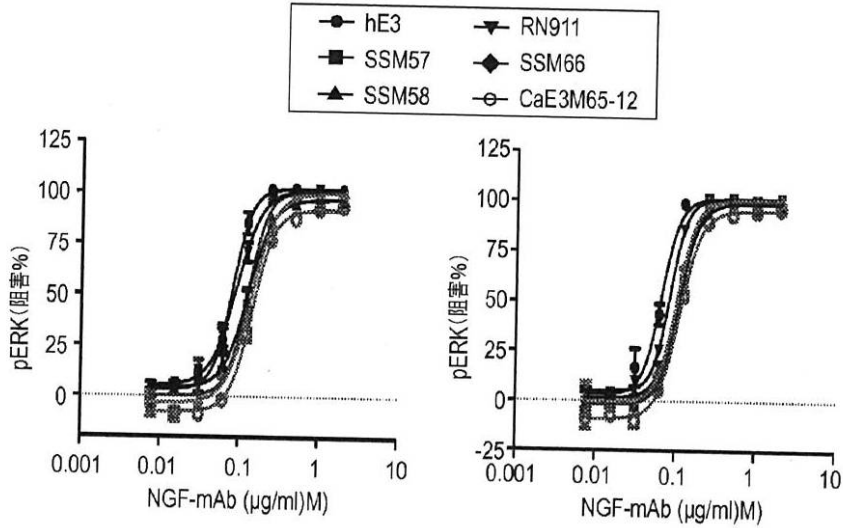
【 図 1 2 A 】



【 図 1 2 B 】



【 図 1 3 】



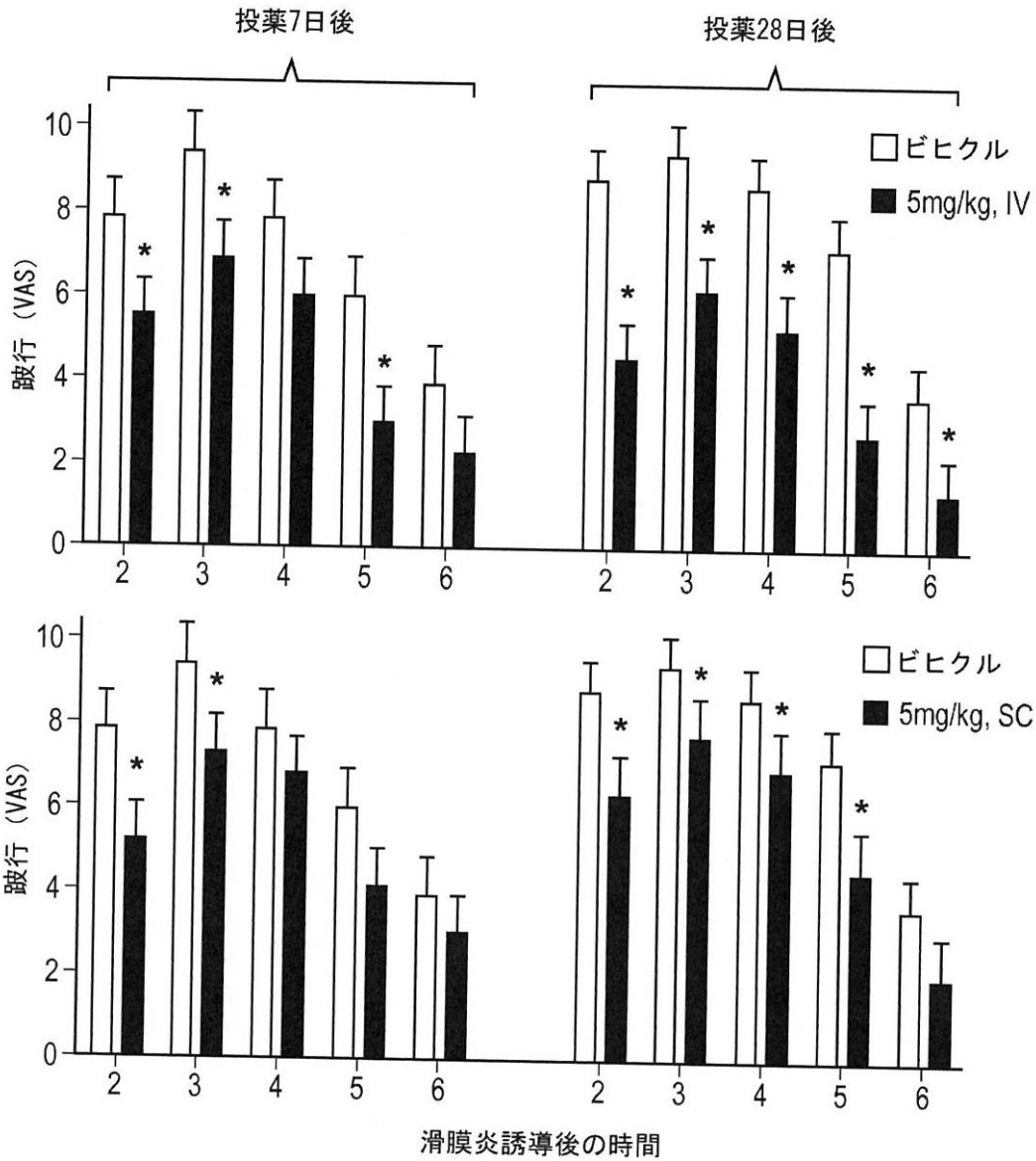
		EC50 (nM)						
細胞型	ブレインキュベーション時間	hE3	SSM57	SSM58	RN911	SSM66	CaE3M65-12	日付
huTrkA (CHO)	1時間	0.55	0.86	0.86	0.62	0.94	0.97	3/31/11
huTrkA (CHO)	6時間	0.44	0.73	0.72	0.57	0.69	0.76	3/31/11

		RN911に対する倍数効力の違い				
細胞型	ブレインキュベーション時間	SSM57	SSM58	SSM66	CaE3M65-12	日付
huTrkA (CHO)	1時間	1.4	1.4	1.5	1.6	3/31/11
huTrkA (CHO)	6時間	1.3	1.3	1.2	1.3	3/31/11

		EC50 (nM)						
細胞型	ブレインキュベーション時間	hE3	SSM57	SSM58	RN911	SSM66	CaE3M65-12	日付
huTrkA (CHO)	1時間	0.49	0.85	0.79	0.47	0.76	0.99	3/26/11
PC-12 (ラットニューロン)	1時間	0.36	0.65	0.65	0.46	0.71	0.81	3/26/11
PC-12 (ラットニューロン)	1時間	0.54	1.08	1.05	0.67	1.45	1.10	2/23/11

		RN911に対する倍数効力の違い				
細胞型	ブレインキュベーション時間	SSM57	SSM58	SSM66	CaE3M65-12	日付
huTrkA (CHO)	1時間	1.8	1.7	1.6	2.1	3/26/11
PC-12 (ラットニューロン)	1時間	1.4	1.4	1.5	1.8	3/26/11
PC-12 (ラットニューロン)	1時間	1.6	1.6	2.2	1.6	2/23/11

【図 1 4】



3つの処理群が比較された：

1. SCで投薬されたビヒクル；
2. 5mg/kg, IVで投薬されたPF-06442590；
3. 5mg/kg, SCで投薬されたPF-06442590 処理群あたりN=8ビーグル

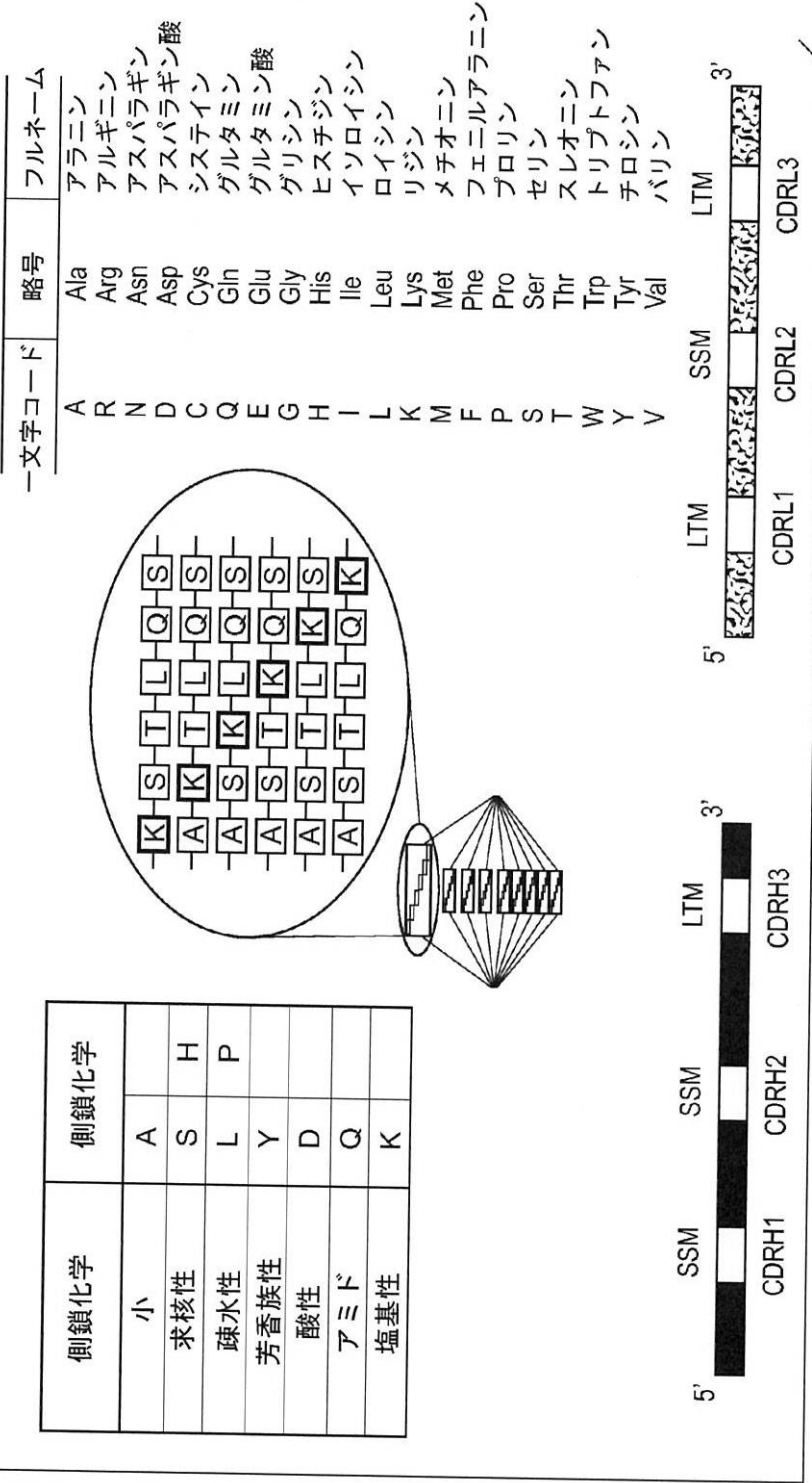
ビーグル滑膜炎痛みモデルにおける跛行に対する  
イヌ化抗NGF mAb PF-06442590の効果

【 図 1 5 】

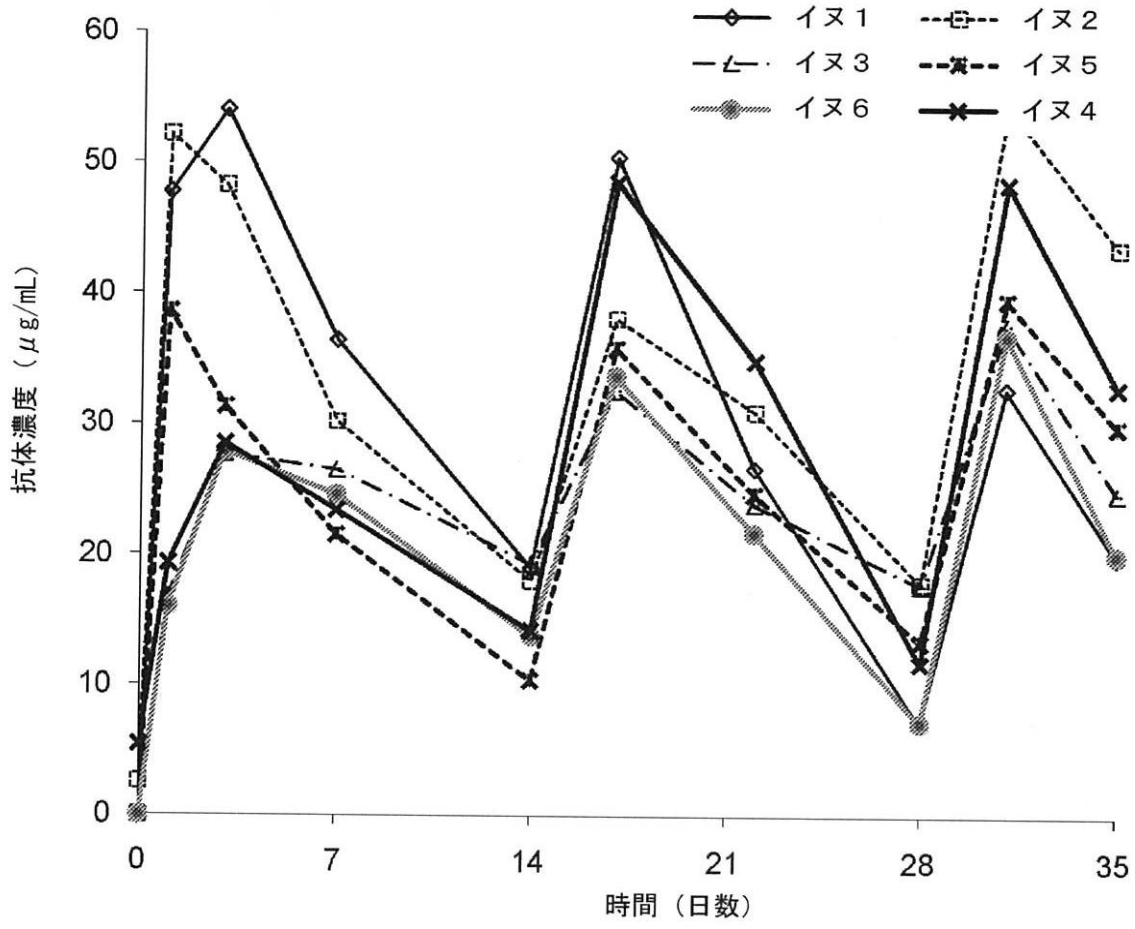
I. ルックスルー変異誘発 (LTM)  
(~10<sup>4</sup>ライブラリーサイズ)

側鎖化学	側鎖化学
小	A
求核性	S H
疎水性	L P
芳香族性	Y
酸性	D
アミド	Q
塩基性	K

I I. 部位飽和変異誘発 (SSM)  
(~10<sup>6</sup>ライブラリーサイズ)

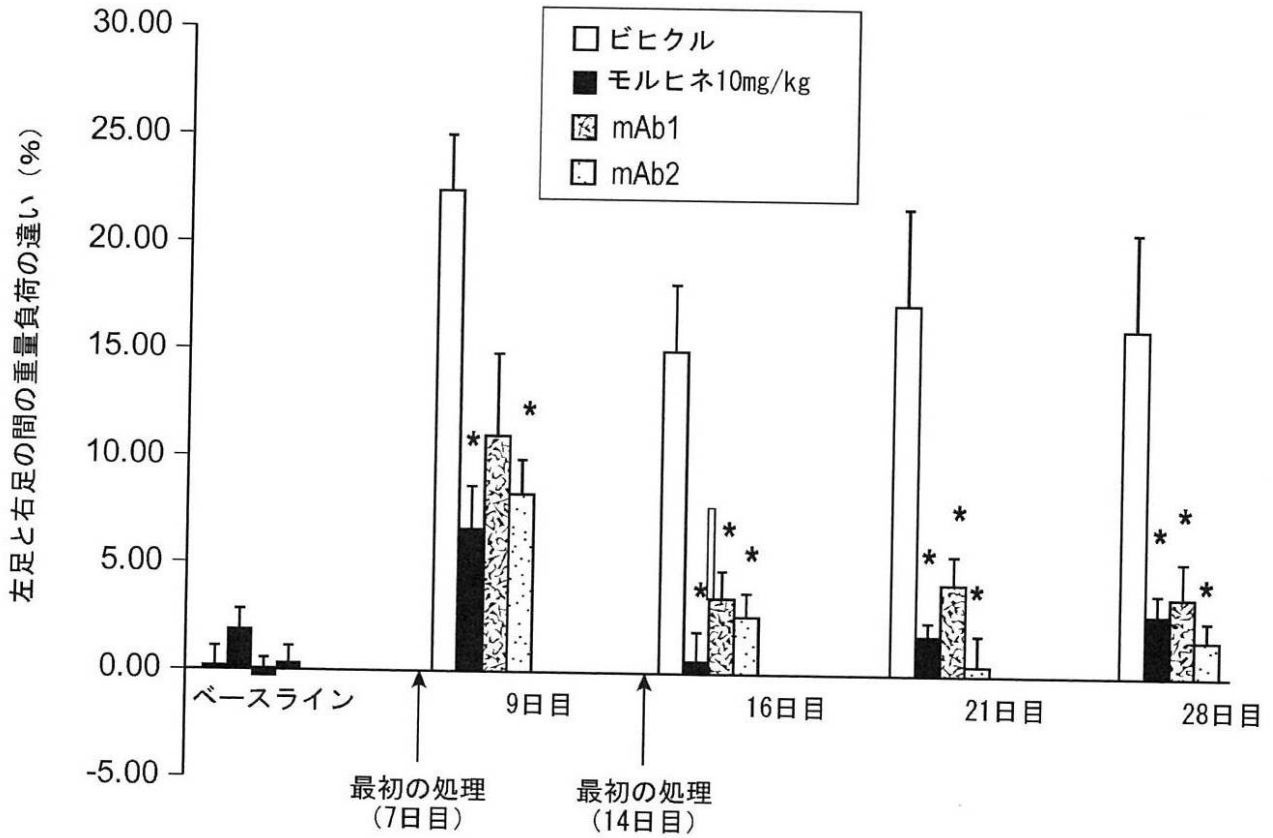


【 図 1 6 】

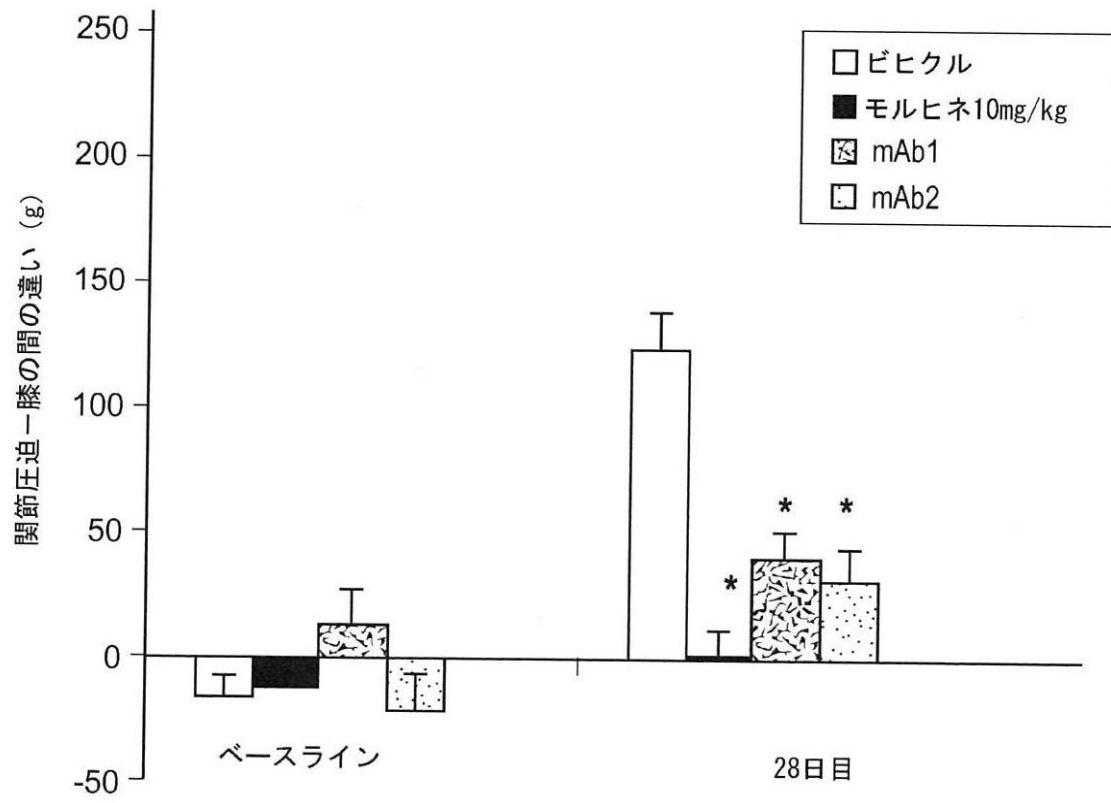




【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



【 配 列 表 】

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/044430
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K16/22 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 02/096458 A1 (GENENTECH INC [US]; SHELTON DAVID L [US]) 5 December 2002 (2002-12-05) figures 6,7; examples 2, 4, 5 -----	1-29
Y	HONGO J-A S ET AL: "ANTIBODY BINDING REGIONS ON HUMAN NERVE GROWTH FACTOR IDENTIFIED BY HOMOLOG- AND ALANINE-SCANNING MUTAGENESIS", HYBRIDOMA, LIEBERT, NEW YORK, NY, US, vol. 19, no. 3, 1 January 2000 (2000-01-01), pages 215-227, XP002951932, ISSN: 0272-457X, DOI: 10.1089/02724570050109611 page 223; figures 5,6 ----- -/--	1-29
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
18 July 2013		31/07/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Domingues, Helena

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/044430

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>HALVORSON K G ET AL: "A blocking antibody to nerve growth factor attenuates skeletal pain induced by prostate tumor cells growing in bone",            CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US,            vol. 65, no. 20,            1 October 2005 (2005-10-01), pages            9426-9435, XP002365572,            ISSN: 0008-5472, DOI:            10.1158/0008-5472.CAN-05-0826            the whole document</p> <p>-----</p>	1-29
Y	<p>WO 2012/024650 A2 (ABBOTT LAB [US]; LACEY SUSAN E [US]; BARBON JEFFREY A [US]; CHHAYA MEH) 23 February 2012 (2012-02-23)            page 63            examples 1,7,12,13,16, 18 and 19; tables            17A,17B, 19,21</p> <p>-----</p>	1-29
Y	<p>WO 2006/110883 A2 (RINAL NEUROSCIENCE CORP [US]; ROSENTHAL ARNON [US]; SHELTON DAVID L [U] 19 October 2006 (2006-10-19)            examples 1,6,7,9</p> <p>-----</p>	1-29
Y	<p>MOKHTARANI ET AL: "A50 RN624 (ANTI-NERVE GROWTH FACTOR ANTIBODY) EFFECTIVELY REDUCES PAIN AND IMPROVES FUNCTION IN SUBJECTSWITH KNEE OSTEOARTHRITIS",            OSTEOARTHRITIS AND CARTILAGE, BAILLIERE TINDALL, LONDON, GB,            vol. 14, 1 January 2006 (2006-01-01),            pages S41-S42, XP005831584,            ISSN: 1063-4584, DOI:            10.1016/S1063-4584(07)60503-2            the whole document</p> <p>-----</p>	1-29

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/044430

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date			
WO 02096458	A1	05-12-2002	AT 522229 T 15-09-2011			
			AU 2007207881 A1 06-09-2007			
			AU 2010200170 A1 04-02-2010			
			BR 0210231 A 14-09-2004			
			CA 2448956 A1 05-12-2002			
			CN 1684708 A 19-10-2005			
			CN 101653604 A 24-02-2010			
			DK 1401498 T3 21-11-2011			
			EP 1401498 A1 31-03-2004			
			EP 2340849 A1 06-07-2011			
			ES 2371748 T3 09-01-2012			
			HK 1063427 A1 06-07-2012			
			IL 158921 A 29-12-2008			
			JP 4567944 B2 27-10-2010			
			JP 2004536072 A 02-12-2004			
			JP 2010043089 A 25-02-2010			
			KR 20080103610 A 27-11-2008			
			KR 20100132559 A 17-12-2010			
			MX PA03010911 A 17-02-2004			
			NZ 529612 A 31-03-2006			
			NZ 544410 A 30-04-2008			
			PT 1401498 E 24-11-2011			
			US 2004219144 A1 04-11-2004			
			US 2010254990 A1 07-10-2010			
			US 2011268725 A1 03-11-2011			
			US 2013004495 A1 03-01-2013			
			WO 02096458 A1 05-12-2002			
			ZA 200308999 A 19-11-2004			
			-----	-----	-----	-----
			WO 2012024650	A2	23-02-2012	AU 2011291462 A1 14-03-2013
						CA 2808577 A1 23-02-2012
						EP 2606067 A2 26-06-2013
WO 2012024650 A2 23-02-2012						
-----	-----	-----	-----			
WO 2006110883	A2	19-10-2006	AR 055323 A1 15-08-2007			
			AU 2006235559 A1 19-10-2006			
			BR PI0610463 A2 22-06-2010			
			CA 2604443 A1 19-10-2006			
			CN 101217978 A 09-07-2008			
			CN 103143016 A 12-06-2013			
			DK 1871416 T3 06-08-2012			
			EP 1871416 A2 02-01-2008			
			EP 2305711 A2 06-04-2011			
			ES 2389960 T3 05-11-2012			
			HK 1121038 A1 28-12-2012			
			JP 2008535929 A 04-09-2008			
			JP 2013100335 A 23-05-2013			
			KR 20070119748 A 20-12-2007			
			KR 20100135336 A 24-12-2010			
			NZ 562229 A 30-04-2010			
			NZ 583780 A 22-12-2011			
			PL 1871416 T3 30-11-2012			
			PT 1871416 E 25-09-2012			
			SI 1871416 T1 28-09-2012			
			TW 201242979 A 01-11-2012			
			US 2008182978 A1 31-07-2008			
			US 2011033447 A1 10-02-2011			
			WO 2006110883 A2 19-10-2006			

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/044430

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		ZA 200708362 A	30-12-2009

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395		N
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00		
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10		
A 6 1 P	3/04	(2006.01)	A 6 1 P	3/04		
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10		
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/00		
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00		
A 6 1 P	25/04	(2006.01)	A 6 1 P	25/04		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 7 1	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53		D
G 0 1 N	33/577	(2006.01)	G 0 1 N	33/577		B

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

(72)発明者 バージェロン, リサ・マリー  
アメリカ合衆国ミシガン州4 9 5 0 6, イースト・グランド・ラピッズ, ウェルシー・ストリート  
・サウスイースト 1 6 0 8

(72)発明者 ベインブリッジ, グレーム  
アメリカ合衆国ミシガン州4 9 0 0 9, カラマズー, シェファーズ・グレン・ロード 7 6 3 0

(72)発明者 ダナム, スティーブン・エイ  
アメリカ合衆国ミシガン州4 9 0 0 8, カラマズー, オールド・コロニー・ロード 3 9 3 9

(72)発明者 ダイ, ミンファ  
アメリカ合衆国ミネソタ州5 5 4 4 6, プリマス, メリマック・レーン・ノース 5 1 1 8

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA43 CA01 CA11 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04

HA15

4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AB01 BA02 CA44 CA46

4C085 AA14 AA16 BB41 BB43 BB44 BB50 DD62 EE01 GG02 GG04

4H045 AA11 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	犬抗NGF抗体和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015521461A</a>	公开(公告)日	2015-07-30
申请号	JP2015516189	申请日	2013-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	硕腾服务有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	Zoetisu LLC		
[标]发明人	バージェロンリサマリー ベインブリッジグレース ダナムスティーブンエイ ダイミンフア		
发明人	バージェロン,リサマリー ベインブリッジ,グレース ダナム,スティーブン・エイ ダイ,ミンフア		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/22 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61P9/00 A61P9/10 A61P3/04 A61P3/10 A61P3/00 A61P29/00 A61P25/04 A61P43/00 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P3/00 A61P3/04 A61P25/04 A61P29/00 C07K16/22 C07K2317/24 C07K2317/565 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2317/94 A61K39/3955 C07K2317/31 C07K2317/35 C07K2317/54 C07K2317/55 C07K2317/56 C07K2317/569 C07K2317/622		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/22 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61K39/395. N A61P9/00 A61P9/10 A61P3/04 A61P3/10 A61P3/00 A61P29/00 A61P25/04 A61P43/00.171 G01N33 /53.D G01N33/577.B		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024 /DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/HA15 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065 /AA87X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB44 4C085/BB50 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG04 4H045 /AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 泰 竹内茂雄 山本修		
优先权	61/656056 2012-06-06 US		
其他公开文献	JP6629069B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了新的犬抗NGF抗体（例如犬抗NGF拮抗剂抗体和抗原结合蛋白），以及编码它们的多核苷酸。本发明进一步提供了该抗体或抗原结合蛋白和/或核苷酸在治疗和/或预防NGF相关病症，特别是疼痛中的用途。【选择图】无

(21) 出願番号	特願2015-516189 (P2015-516189)	(71) 出願人	512261355
(86) (22) 出願日	平成25年6月6日 (2013.6.6)		ゾエティス・エルエルシー
(85) 翻訳文提出日	平成27年2月4日 (2015.2.4)		アメリカ合衆国ニュージャージー州079
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/044430		32, フローラム・パーク, キャンパス・
(87) 国際公開番号	W02013/184871		ドライブ 100
(87) 国際公開日	平成25年12月12日 (2013.12.12)	(74) 代理人	100140109
(31) 優先権主張番号	61/656,056		弁理士 小野 新次郎
(32) 優先日	平成24年6月6日 (2012.6.6)	(74) 代理人	100075270
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100101373
			弁理士 竹内 茂雄
		(74) 代理人	100118902
			弁理士 山本 修
		(74) 代理人	100107386
			弁理士 泉谷 玲子

最終頁に続く