

(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2014-522236

(P2014-522236A)

(43) 公表日 平成26年9月4日(2014.9.4)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-509817 (P2014-509817)
 (86) (22) 出願日 平成24年5月8日 (2012.5.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年12月26日 (2013.12.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2012/051002
 (87) 国際公開番号 W02012/153121
 (87) 国際公開日 平成24年11月15日 (2012.11.15)
 (31) 優先権主張番号 61/483, 481
 (32) 優先日 平成23年5月6日 (2011.5.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 1114858.2
 (32) 優先日 平成23年8月29日 (2011.8.29)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 61/531, 439
 (32) 優先日 平成23年9月6日 (2011.9.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513279423
 エヌヴィーアイピー プロプライエタリー
 リミテッド
 オーストラリア 3000 ヴィクトリア
 メルボルン クイーン ストリート 3
 1 レヴェル 8
 (74) 代理人 100092093
 弁理士 辻居 幸一
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100084663
 弁理士 箱田 篤
 (74) 代理人 100093300
 弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗神経成長因子抗体並びに前記抗体の製造及び使用方法

(57) 【要約】

イヌでの使用に適切な抗体の調製方法が提供される。イヌニューロン成長因子 (NGF) と特異的に結合し、さらにp75又はTrkAイヌNGFレセプターと結合するイヌNGFの能力を中和するイヌ化抗体もまた提供される。本発明は、前記をコードする核酸、及び前記抗体及び/又は核酸を用いてイヌで痛み及び関節炎を治療する方法に及ぶ。

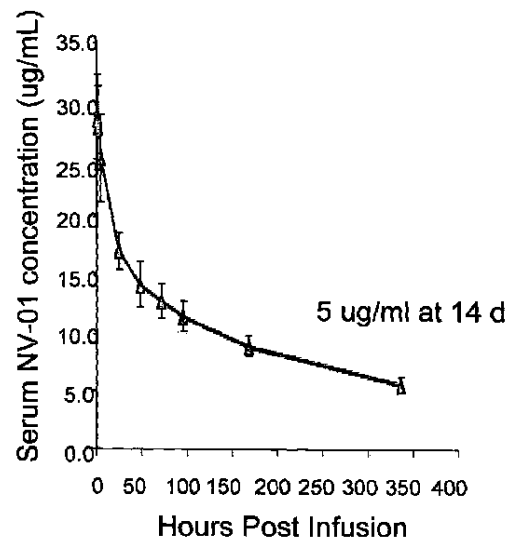


Figure 18

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下の工程を含む、イヌでの使用に適切な抗体を調製する方法：

- イヌ以外の種に由来するドナー抗体を提供する工程であって、ここで前記ドナー抗体がイヌに存在するある標的抗原に対して結合特異性を有する、前記工程；
- 前記ドナー抗体のフレームワーク領域のアミノ酸配列の各アミノ酸残基を、1つ以上のイヌ抗体のフレームワーク領域のアミノ酸配列の対応する位置に存在する各アミノ酸残基と比較して、前記1つ以上のイヌ抗体のフレームワーク領域のアミノ酸配列内の前記対応する位置の1つ以上のアミノ酸残基と異なる、前記ドナー抗体のフレームワーク領域のアミノ酸配列内の1つ以上のアミノ酸残基を同定する工程；及び
- 前記ドナー抗体で同定された前記1つ以上のアミノ酸残基を、前記1つ以上のイヌ抗体の前記対応する位置に存在する1つ以上のアミノ酸残基で置換する工程。

10

【請求項 2】

1つ以上の同定アミノ酸残基の置換工程が、置換される1つ以上のアミノ酸残基に対し最高の相同性を有する、対応する位置に存在する1つ以上のアミノ酸残基で前記1つ以上の同定アミノ酸残基を置換する工程を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ドナー抗体の重鎖及び/又は軽鎖の定常ドメインを、イヌ抗体に由来する重鎖及び/又は軽鎖の定常ドメインで置換する工程を含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

重鎖の定常ドメインがHCA又はHCD型イヌ定常ドメインで置換される、請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

標的抗原が神経成長因子 (NGF) である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

イヌ神経成長因子 (NGF) と特異的に結合することができる中和抗体又はその抗原結合フラグメントであって、配列番号：1若しくは配列番号：3のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び/又は配列番号：2若しくは配列番号：4のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、前記中和抗体又はその抗原結合フラグメント。

30

【請求項 7】

抗体がキメラ抗体又はイヌ化抗体である、請求項 6 に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 8】

抗体の重鎖定常ドメインが下流のエフェクター機能を媒介しないように、前記定常ドメインがアミノ酸置換又は欠失の方法によって選別又は改変される、請求項 6 又は請求項 7 に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 9】

軽鎖が、配列番号：5若しくは配列番号：10のアミノ酸配列、又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 6 から 8 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

40

【請求項 10】

重鎖が、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13及び配列番号：14から成る群から選択されるアミノ酸配列、又は前記配列と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 6 から 9 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 11】

重鎖が、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21及び配列番号：22から成る群から選択されるアミノ酸配列、又は前記配列と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 6 から 9

50

のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項12】

重鎖が、配列番号：6、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：18、配列番号：19及び配列番号：22から成る群から選択されるアミノ酸配列、又は前記配列と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項6から9のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項13】

抗イヌNGF抗体又はそのイヌNGF結合フラグメントであって、
軽鎖可変領域が、

配列番号：23又は配列番号：24のアミノ酸配列から成るか又は前記を含むFR1フレームワーク領域、

配列番号：25のアミノ酸配列から成るか又は前記を含むFR2フレームワーク領域、

配列番号：26又は配列番号：27のアミノ酸配列から成るか又は前記を含むFR3フレームワーク領域、

配列番号：28のアミノ酸配列から成るか又は前記を含むFR4フレームワーク領域、
の少なくとも1つを含み、

及び/又は重鎖可変領域が、

配列番号：29のアミノ酸配列から成るか又は前記を含むFR1フレームワーク領域、

配列番号：30のアミノ酸配列から成るか又は前記を含むFR2フレームワーク領域、

配列番号：31又は配列番号：32のアミノ酸配列から成るか又は前記を含むFR3フレームワーク領域、

配列番号：33のアミノ酸配列から成るか又は前記を含むFR4フレームワーク領域、
の少なくとも1つを含む、

前記抗イヌNGF抗体又はそのイヌNGF結合フラグメント。

【請求項14】

以下から成る群から選択されるアミノ酸置換の1つ以上によって改変されている配列番号：23のFR1領域を有する軽鎖可変ドメインを含む、請求項13に記載の抗イヌNGF抗体又はイヌNGF結合フラグメント：アミノ酸残基Q3はV、T5はM、S7はT、A9はL、L13はV、Q15はP又はR、E16はG、K18はT又はP、V19はA、T20はS、T22はS、T5はI、A9はP、S12はA、S14はR又はT、E16はD、E17はD、K18はA、E又はL、T22はY、および、C23はYによる置換。

【請求項15】

以下から成る群から選択されるアミノ酸置換の1つ以上によって改変されている配列番号：24のFR1領域を有する軽鎖可変ドメインを含む、請求項13に記載の抗イヌNGF抗体又はイヌNGF結合フラグメント：残基V3はQ、T5はM、S7はT、A9はL、L13はV、Q15はP又はR、E16はG、K18はT又はP、V19はA、T20はS、T22はS、T5はI、A9はP、S12はA、S14はR又はT、E16はD、E17はD、K18はA、E又はL、T22はY、さらにC23はYによる置換。

【請求項16】

以下から成る群から選択されるアミノ酸置換の1つ以上によって改変されている配列番号：25のFR2領域を有する軽鎖可変ドメインを含む、請求項13から15のいずれか1項に記載の抗イヌNGF抗体又はイヌNGF結合フラグメント：Y2はF、Q3はR、A9はS、K11はQ、L12はR、Y2はI又はL、Q3はI又はL、Q4はH、K5はR、P6はA又はS、G7はD、A9はP又はT、K11はE又はR、L12はA、G、P又はS、I14はL、さらにY15はE、F、N、S又はVによる置換。

【請求項17】

以下から成る群から選択されるアミノ酸置換の1つ以上によって改変されている配列番号：26のFR3領域を有する軽鎖可変ドメインを含む、請求項13から16のいずれか1項に記載の抗イヌNGF抗体又はイヌNGF結合フラグメント：S4はD、E14はD、Y15はF、S16はT、L17はF、T18はK、N20はS、L22はV、S24はP、V27はA、F31はY、G1はA、V2はA、P3はS、F6はL又はV、S7はI、G8はA、T13はA、S16はR、T18はR、S24はA、E25はD、G、I又はN、V27はG、S又はT、A28はG、さらにV29はI又はLによる置換。

【請求項18】

10

20

30

40

50

以下から成る群から選択されるアミノ酸置換の1つ以上によって改変されている配列番号：27のFR3領域を有する軽鎖可変ドメインを含む、請求項13から16のいずれか1項に記載の抗イヌNGF抗体又はイヌNGF結合フラグメント：S4はD、E14はD、F15はY、S16はT、L17はF、T18はK、S20はN、L22はV、P24はS、V27はA、Y31はF、G1はA、V2はA、P3はS、F6はL又はV、S7はI、G8はA、T13はA、S16はR、T18はR、S24はA、E25はD、G、I又はN、V27はG、S又はT、A28はG、さらにV29はI又はLによる置換。

【請求項19】

以下から成る群から選択されるアミノ酸置換の1つ以上によって改変されている配列番号：28のFR4領域を有する軽鎖可変ドメインを含む、請求項13から18のいずれか1項に記載の抗イヌNGF抗体又はイヌNGF結合フラグメント：E8はD、G2はS、A3はP、Q、又はT、G4はE、T5はP、K6はQ又はS、V7はL又はW、E8はR、又L9はIによる置換。

10

【請求項20】

以下から成る群から選択されるアミノ酸置換の1つ以上によって改変されている配列番号：29のFR1領域を有する重鎖可変ドメインを含む、請求項13から19のいずれか1項に記載の抗イヌNGF抗体又はイヌNGF結合フラグメント：D10はG、N13はQ、G15はT、G16はE、T17はS、T19はR、V24はA、S28はT、L29はF、T30はS、E1はD又はG、V2はE、G、I、L、又はM、Q3はA、E、H、K、L、P、R、S又はV、L4はP又はV、V5はA、E、L又はM、E6はA又はQ、S7はF、L又はT、G9はE、D10はA、E、N又はT、L11はQ、R、V又はW、V12はA、I又はM、N13はK又はR、P14はF又はT、G15はA又はE、G16はA、T17はP、L18はR、T19はG、K又はV、L20はI又はV、S21はY、V23はA、E、I又はL、V24はG、I、S又はT、S25はG、P又はT、G26はD、R又はT、F27はD、I、L、S、T又はV、S28はA、D、I、L、M、N、P又はR、L29はI、M又はV、T30はD、G、H、I、K、N、R、Vによる置換。

20

【請求項21】

以下から成る群から選択されるアミノ酸置換の1つ以上によって改変されている配列番号：30のFR2領域を有する重鎖可変ドメインを含む、請求項13から20のいずれか1項に記載の抗イヌNGF抗体又はイヌNGF結合フラグメント：L6はP、R8はK、E11はQ、G14はA、W1はC、V2はA、F、I又はL、Q4はH又はL、A5はD、G、P、S、T又はV、G7はE、L又はR、R8はA、E、G、M又はQ、G9はD、E、R、T又はV、L10はF、M又はP、E11はD、H、L、P又はR、W12はC、F、L、M、S又はY、V13はF、I又はL、G14はL、S又はTによる置換。

【請求項22】

以下から成る群から選択されるアミノ酸置換の1つ以上によって改変されている配列番号：31のFR3領域を有する重鎖可変ドメインを含む、請求項13から21のいずれか1項に記載の抗イヌNGF抗体又はイヌNGF結合フラグメント：L2はF、T5はS、T8はN、S9はA、S11はN、V13はL、F14はY、K16はQ、H18はN、Q21はR、S22はA、T27はV、R32はK、R1はQ、L2はV、T3はA、I又はS、I4はL、M、T又はV、T5はA又はF、R6はK、D7はE又はN、T8はD、G、I又はS、S9はD、G、P、T又はV、K10はE、G、M、N、Q又はR、S11はD、H、K又はR、T12はA、I、M又はS、V13はA、I又はM、F14はH、S又はT、L15はI、K16はA、D、E、H又はR、M17はL、H18はD、K、P、R、S又はT、S19はD、G、N、R又はT、L20はV、Q21はG、I、K、S又はT、S22はD、G、P、T又はV、E23はA、D又はV、T25はA、M又はS、A26はG又はV、T27はF、I、K、L、M又はQ、Y28はH、Y29はF又はH、A31はC、G、L、M、R、S、T又はV、R32はA、D、E、G、I、L、M、N、P、Q、S、T又はVによる置換。

30

40

【請求項23】

以下から成る群から選択されるアミノ酸置換の1つ以上によって改変されている配列番号：32のFR3領域を有する重鎖可変ドメインを含む、請求項13から21のいずれか1項に記載の抗イヌNGF抗体又はイヌNGF結合フラグメント：L2はF、T5はS、T8はN、S9はA、S11はN、V13はL、F14はY、Q16はK、H18はN、R21はQ、S22はA、T27はV、R32はK、R1はQ、L2はV、T3はA、I又はS、I4はL、M、T又はV、T5はA又はF、R6はK、D7はE又はN、T8はD、G、I又はS、S9はD、G、P、T又はV、K10はE、G、M、N、Q又はR、S11はD、H、K又はR、T12はA、I、M又はS、V13はA、I又はM、F14はH、S又はT、L15はI、K16はA、D、E、H又はR、M17はL、H18はD、K、P、R、S又はT、S19はD、G、N、R又はT、L20はV、Q21はG、I、K、S又はT、S22はD、

50

G、P、T又はV、E23はA、D又はV、T25はA、M又はS、A26はG又はV、T27はF、I、K、L、M又はQ、Y28はH、Y29はF又はH、A31はC、G、L、M、R、S、T又はV、R32はA、D、E、G、I、L、M、N、P、Q、S、T又はVによる置換。

【請求項 2 4】

以下から成る群から選択されるアミノ酸置換の1つ以上によって改変されている配列番号：33のFR4領域を有する重鎖可変ドメインを含む、請求項13から23のいずれか1項に記載の抗イヌNGF抗体又はイヌNGF結合フラグメント：W1はL、G2はA又はS、Q3はD、H、P又はR、T5はA、I、N又はS、L6はP、Q又はR、V7はI、L又はP、T8はA、F、I、L、P、S又はY、V9はA、S10はA、C、P又はT、S11はA、L又はPによる置換。

【請求項 2 5】

HCA又はHCD型イヌ定常ドメインを有する、請求項13から24のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項 2 6】

請求項1から5のいずれか1項に記載の方法にしたがって調製された抗体、又はその結合フラグメント。

【請求項 2 7】

前記抗体又はその抗原結合フラグメントとイヌNGFとの結合が、p75又はTrkAイヌNGFレセプターと結合するイヌNGFの能力を阻害する、請求項6から26のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 2 8】

1×10^{-8} 以下の平衡解離定数 (K_D) の結合親和性でイヌNGFと特異的に結合する、請求項6から27のいずれか1項に記載の抗体又は結合フラグメント。

【請求項 2 9】

抗原結合フラグメントが、単鎖Fv (scFv) 抗体フラグメント、Fab抗体フラグメント、Fab'抗体フラグメント、及びF(ab')₂抗体フラグメントから成る群から選択される、請求項6から28のいずれか1項に記載の抗体又は結合フラグメント。

【請求項 3 0】

抗体が多重特異的又は多価抗体である、請求項6から29のいずれか1項に記載の抗体又は結合フラグメント。

【請求項 3 1】

抗体又は結合フラグメントがイヌで少なくとも1週間の血清寿命を有する、請求項6から30のいずれか1項に記載の抗体又は結合フラグメント。

【請求項 3 2】

抗体又は結合フラグメントがイヌで免疫原性でない、請求項6から31のいずれか1項に記載の抗体又は結合フラグメント。

【請求項 3 3】

抗体が、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー及びサイズ排除クロマトグラフィーの工程を含む方法によって精製できる、請求項6から32のいずれか1項に記載の抗体又は結合フラグメント。

【請求項 3 4】

抗体がカプトアドヘアアフィニティクロマトグラフィー及び陰イオン交換クロマトグラフィーの工程を含む方法によって精製できる、請求項6から33のいずれか1項に記載の抗体又は結合フラグメント。

【請求項 3 5】

以下の工程を含む、イヌで痛みを治療、阻害又は緩和する方法：
 - 治療的に有効な量の抗イヌNGF抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する工程、及び
 - 前記抗体又はその抗原結合フラグメントをその必要があるイヌに投与する工程。

【請求項 3 6】

抗イヌNGF抗体が、請求項6から34のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合フラグ

10

20

30

40

50

メントである、請求項35に記載の方法。

【請求項 37】

抗イヌNGF抗体が、配列番号：1若しくは配列番号：3のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有する配列を含む軽鎖可変ドメイン、及び/又は配列番号：2若しくは配列番号：4のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、請求項35に記載の方法。

【請求項 38】

抗イヌNGF抗体が、配列番号：5若しくは配列番号：10のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の配列同一性を有する配列を有する軽鎖、及び/又は配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13及び配列番号：14から成る群から選択されるアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、前記配列から成るか、又は本質的に前記配列から成る重鎖を含む、請求項35に記載の方法。

10

【請求項 39】

痛みが、神経障害痛、炎症痛、そう痒痛、術時、術後及び外科手術後の痛みから成る群から選択される、請求項35から38のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 40】

術後痛がイヌの整形外科手術、軟組織外科手術、卵巣子宮摘出術、去勢術から成る群から選択される、請求項39に記載の方法。

【請求項 41】

以下の工程を含む、イヌ対象動物で関節炎又は関節炎症状を治療する方法：

- イヌ化抗体である抗イヌNGF抗体又はその抗原結合フラグメントの治療的に有効な量を提供する工程、及び
- 前記抗体又はその抗原結合フラグメントをその必要があるイヌに投与する工程。

20

【請求項 42】

抗イヌNGF抗体が、請求項6から34のいずれか1項に記載の抗体である、請求項41に記載の方法。

【請求項 43】

抗イヌNGF抗体が、配列番号：1若しくは配列番号：3のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有する配列を含む軽鎖可変ドメイン、及び/又は配列番号：2若しくは配列番号：4のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、請求項41に記載の方法。

30

【請求項 44】

抗イヌNGF抗体が、配列番号：5若しくは配列番号：10のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の配列同一性を有する配列を有する軽鎖、及び/又は配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13及び配列番号：14から成る群から選択されるアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%同一性の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、前記配列から成るか、又は本質的に前記配列から成る重鎖を含む、請求項41に記載の方法。

【請求項 45】

関節炎又は関節炎症状が、免疫媒介多発性関節炎、慢性関節リウマチ及び変形性関節症から成る群から選択される症状を含む、請求項41から44のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項 46】

関節炎又は関節炎症状の治療が、前記関節炎症状に付随するか又は前記に起因する痛みの緩和、阻害、軽減、抑制又はその開始の遅延を含む、請求項41から45のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 47】

以下の工程を含む、イヌNGFの発現の増加又はイヌ対象動物におけるNGF感受性の増加によって引き起こされるか、前記発現の増加若しくは前記感受性の増加に付随するか、又は前記発現の増加若しくは前記感受性の増加を生じる症状を治療する方法：

50

- イヌ化抗体である抗イヌNGF抗体又はその抗原結合フラグメントの治療的に有効な量を
提供する工程、及び

- 前記をその必要があるイヌに投与する工程。

【請求項 4 8】

抗イヌNGF抗体が、請求項6から34のいずれか1項に記載の抗体である、請求項47に記載
の方法。

【請求項 4 9】

抗イヌNGF抗体が、配列番号：1若しくは配列番号：3のアミノ酸配列又は前記配列と少
なくとも85%の同一性を有する配列を含む軽鎖可変ドメイン、及び/又は配列番号：2若
しくは配列番号：4のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の配列同一性を有する
アミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、請求項47に記載の方法。

10

【請求項 5 0】

抗イヌNGF抗体が、配列番号：5若しくは配列番号：10のアミノ酸配列又は前記配列と少
なくとも85%の配列同一性を有する配列を有する軽鎖、及び/又は配列番号：6、配列番
号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13及び配
列番号：14から成る群から選択されるアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%同一
性の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、前記配列から成るか、又は本質的に前記配
列から成る重鎖を含む、請求項47に記載の方法。

【請求項 5 1】

以下の工程を含む、NGFによって増殖が誘発された腫瘍及び前記に付随する症状をイヌ
で治療する方法：

20

- イヌ化抗体である抗イヌNGF抗体又はその抗原結合フラグメントの治療的に有効な量を
提供する工程、及び

- 前記抗体又はその抗原結合フラグメントをその必要があるイヌに投与する工程。

【請求項 5 2】

抗イヌNGF抗体が、請求項6から34のいずれか1項に記載の抗体である、請求項51に記載
の方法。

【請求項 5 3】

抗イヌNGF抗体が、配列番号：1若しくは配列番号：3のアミノ酸配列又は前記配列と少
なくとも85%の同一性を有する配列を含む軽鎖可変ドメイン、及び/又は配列番号：2若
しくは配列番号：4のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の配列同一性を有する
アミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、請求項51に記載の方法。

30

【請求項 5 4】

抗イヌNGF抗体が、配列番号：5若しくは配列番号：10のアミノ酸配列又は前記配列と少
なくとも85%の配列同一性を有する配列を有する軽鎖、及び/又は配列番号：6、配列番
号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13及び配
列番号：14から成る群から選択されるアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%同一
性の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、前記配列から成るか、又は本質的に前記配
列から成る重鎖を含む、請求項51に記載の方法。

【請求項 5 5】

腫瘍の増殖がオートクライン又はパラクラインNGFによって誘発される、請求項51から5
4のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項 5 6】

腫瘍が骨肉腫である、請求項55に記載の方法。

【請求項 5 7】

少なくとも1つのさらに別の治療薬剤を同時投与する工程をさらに含む、請求項35から5
6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5 8】

少なくとも1つの治療薬剤が、鎮痛剤、NSAID、オピオイド、コルチコステロイド又はス
テロイドから成る群から選択される、請求項57に記載の方法。

50

【請求項59】

少なくとも1つの治療薬剤が、抗生物質、抗真菌性治療薬、抗原生動物治療薬及び抗ウイルス治療薬から成る群から選択される、請求項57に記載の方法。

【請求項60】

少なくとも1つの治療薬剤が、炎症媒介物質阻害剤、PGE-レセプターアンタゴニスト、免疫抑制剤、シクロスポリン、抗炎症性グルココルチコイド、認知機能不全若しくは認識障害の治療に使用される薬剤、抗高血圧薬、心臓系機能不全の治療に使用される、利尿剤、血管拡張剤、ベータ-アドレナリン作動性レセプターアンタゴニスト、アンジオテンシン-II変換酵素阻害剤、カルシウムチャネルブロッカー及びHMG-CoAレダクターゼ阻害剤から成る群から選択される、請求項57に記載の方法。

10

【請求項61】

抗体又は抗原結合フラグメントが、約0.01mg/kg体重から約10mg/kg体重の用量範囲でイヌに投与される、請求項35から60のいずれか1項に記載の方法。

【請求項62】

抗体又は抗原結合フラグメントが、約0.03mg/kg体重から約3mg/kg体重の用量範囲でイヌに投与される、請求項35から60のいずれか1項に記載の方法。

【請求項63】

イヌにおける痛み又は痛みを生じるか若しくは痛みによって引き起こされる症状又はNGFによって増殖が誘発される腫瘍を治療する医薬組成物であって、前記組成物が、請求項6から34のいずれか1項に記載の抗イヌNGFイヌ化抗体又はその結合フラグメントの治療的に有効な量を、少なくとも1つの医薬的に許容できる担体、賦形剤又は希釈剤とともに含む、前記医薬組成物。

20

【請求項64】

さらに少なくとも1つの鎮痛剤、NSAID、オピオイド、コルチコステロイド又はステロイドを含む、請求項63に記載の医薬組成物。

【請求項65】

痛みを生じる症状が、慢性関節リウマチ、変性関節症、そう痒、炎症、免疫媒介多発性関節炎、急性痛、慢性痛、外科手術痛及び外科手術後痛から成る群から選択されるか、又はNGFによって増殖が誘発される腫瘍が骨肉腫である、請求項63又は64に記載の医薬組成物。

30

【請求項66】

請求項6から34のいずれか1項に記載の抗体又は抗原結合フラグメントをコードする単離された核酸。

【請求項67】

配列番号：1又は配列番号：3のアミノ酸配列を有する抗イヌNGFイヌ化抗体又は抗体フラグメントの軽鎖可変ドメイン、又は配列番号：5又は10のアミノ酸配列を有する軽鎖をコードする単離された核酸。

【請求項68】

配列番号：2又は配列番号：4のアミノ酸配列を有する抗イヌNGFイヌ化抗体又は抗体フラグメントの重鎖可変ドメイン、又は配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、又は配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21及び配列番号：22から成る群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖をコードする単離された核酸。

40

【請求項69】

1つ以上の調節配列と作動できるように連結された、請求項66から68のいずれか1項に記載の単離された核酸。

【請求項70】

請求項66から69のいずれか1項に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項71】

50

さらに1つ以上の調節配列を含む、請求項70に記載の発現ベクター。

【請求項72】

ベクターがプラスミド又はレトロウイルスベクターである、請求項70又は71に記載の発現ベクター。

【請求項73】

請求項70から72のいずれか1項に記載の発現ベクターを取り込んでいる宿主細胞。

【請求項74】

イヌ化抗イヌNGF中和抗体を生成する方法であって、請求項73に記載の宿主細胞を培養して前記細胞にイヌ化抗イヌNGF中和抗体を発現させる工程を含む、前記方法。

【請求項75】

イヌで痛み又はNGFによって増殖が誘発される腫瘍を治療、緩和若しくは阻害する方法であって、請求項66から69のいずれか1項に記載の核酸の治療的に有効な量をイヌに投与する工程を含む、前記方法。

【請求項76】

イヌで痛みの治療又は予防に使用される、請求項6から34のいずれか1項に記載の抗体又は抗体の結合フラグメント、請求項63から65のいずれか1項に記載の医薬組成物、請求項66から69のいずれか1項に記載の核酸、又は請求項70から72に記載の発現ベクター。

【請求項77】

痛みが、急性痛、慢性痛、術時痛、術後痛、整形外科手術で生じる痛み、軟組織外科手術に付随する痛み、卵巣子宮摘出術から生じる痛み、去勢術から生じる痛み、炎症痛、癌又は癌性症状に付随する慢性痛、及び慢性関節リウマチ又は変形性関節症に付随するか又は前記から生じる痛みから成る群から選択される、請求項76に記載の抗体又は抗体の結合フラグメント。

【請求項78】

関節炎の治療又は予防に使用される、請求項6から34のいずれか1項に記載の抗体又は抗体の結合フラグメント、請求項63から65のいずれか1項に記載の医薬組成物、請求項66から69のいずれか1項に記載の核酸、又は請求項70から72に記載の発現ベクター。

【請求項79】

関節炎が、変形性関節症、免疫媒介多発性関節炎又は慢性関節リウマチである、請求項78に記載の抗体又は抗体の結合フラグメント。

【請求項80】

イヌでNGFによって増殖が誘発される腫瘍及び前記に付随する症状の治療又は予防で使用される、請求項6から34のいずれか1項に記載の抗体又は抗体の結合フラグメント、請求項63から65のいずれか1項に記載の医薬組成物、請求項66から69のいずれか1項に記載の核酸、又は請求項70から72に記載の発現ベクター。

【請求項81】

腫瘍が骨肉腫である、請求項80に記載の抗体又は抗体の結合フラグメント。

【請求項82】

イヌで痛みを治療又は予防する医薬の調製における、請求項6から34のいずれか1項に記載の抗体又は抗体の結合フラグメント、請求項63から65のいずれか1項に記載の医薬組成物、請求項66から69のいずれか1項に記載の核酸、又は請求項70から72に記載の発現ベクターの使用。

【請求項83】

痛みが、急性痛、慢性痛、術時痛、術後痛、整形外科手術で生じる痛み、軟組織外科手術に付随する痛み、卵巣子宮摘出術から生じる痛み、去勢術から生じる痛み、癌又は癌性症状に付随する慢性痛、及び慢性関節リウマチに付随するか又は前記から生じる痛み、炎症痛、そう痒痛、免疫媒介性多発性関節炎又は変形性関節症から成る群から選択される、請求項82に記載の使用。

【請求項84】

イヌで関節炎を治療、阻害、緩和又は予防する医薬の調製における、請求項6から34の

10

20

30

40

50

いずれか1項に記載の抗体又は抗体の結合フラグメント、請求項63から65のいずれか1項に記載の医薬組成物、請求項66から69のいずれか1項に記載の核酸、又は請求項70から72に記載の発現ベクターの使用。

【請求項85】

関節炎が、変形性関節症、免疫媒介多発性関節炎又は慢性関節リウマチである、請求項84に記載の使用。

【請求項86】

イヌでNGFによって増殖が誘発される腫瘍及び前記に付随する症状を治療する医薬の調製における、請求項6から34のいずれか1項に記載の抗体又は抗体の結合フラグメント、請求項63から65のいずれか1項に記載の医薬組成物、請求項66から69のいずれか1項に記載の核酸、又は請求項70から72に記載の発現ベクターの使用。

10

【請求項87】

腫瘍が骨肉腫である、請求項86に記載の使用。

【請求項88】

請求項6から34のいずれか1項に記載の抗イヌNGF中和モノクローナル抗体又はそのフラグメントを産生する細胞株又はその誘導若しくは子孫細胞。

【請求項89】

イヌの痛みの治療のため、又は痛みに付随する症状の治療のため、又は免疫媒介多発性関節炎、変形性関節症若しくは慢性関節リウマチに付随する痛みの治療、緩和若しくは阻害のため、又はイヌでNGFによって増殖が誘発される腫瘍及び前記に付随する症状の治療のためのキットであって、前記キットが、請求項6から34のいずれか1項に記載の抗イヌNGF抗体又は結合フラグメント及び前記の使用のための指示を含む、前記キット。

20

【請求項90】

抗イヌNGFモノクローナル抗体又は結合フラグメントの検出に使用される、請求項6から34のいずれか1項に記載の抗イヌNGF抗体又は結合フラグメントを含む診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、イヌ神経成長因子のアンタゴニストとして作用する抗体及びそのフラグメントに関する。本発明は、前記抗体及びそのフラグメントを調製する方法並びにこれらの抗体及びフラグメントの神経成長因子関連症状（例えば痛み、痛み関連疾患及びイヌで慢性痛の出現をもたらす症状）を処置する治療的使用に及ぶ。

30

【背景技術】

【0002】

神経成長因子（NGF）は天然に存在する分泌タンパク質であり、アルファ、ベータ及びガンマポリペプチド鎖から成る。NGFはニューロトロフィンファミリーのメンバーであり、多数の異なる役割に関係する。NGFは、感覚神経及び交感神経ニューロンの生存及び分化、並びに2つの膜結合レセプター-p75（低親和性NGFレセプター）及びTrkA（トランスメンブレンチロシンキナーゼ及び高親和性NGFレセプター）を介するシグナルを増進させる。NGFとTrkA又はp75との結合は感覚神経ニューロンでニューロペプチドのアップレギュレーションをもたらす。

40

ヒトの痛み及び痛み感受性の治療でNGFアンタゴニストの使用が報告されている（Cattaneo A., Curr. Op. Mol. Ther. 2010 12(1):94-106）。例えば、国際特許出願WO 2006/13 1951は、ラットアルファD11（D11、aD11）モノクローナル抗体のヒト化型を記載している。D11抗体はマウスNGFに対して結合特異性を有するが、NGFのヒト及びラット型と結合することもまた知られている。D11ラット由来モノクローナル抗体のヒト化は、げっ歯類由来抗体に対して上昇するヒト抗マウス抗体（HAMA）応答から生じる中和抗体の産生を最小限にするために、ヒトに投与する前に要求される。さらにまた、マウス定常ドメインのヒト定常ドメインによる入れ替えは下流のエフェクター機能の選択を可能にする。

イヌにおける痛みの管理は、現在のところいくつかのクラスの鎮痛薬（局所麻酔及び全

50

身麻酔剤、オピオイド鎮痛薬、 α 2アゴニスト、非ステロイド系抗炎症剤（NSAID）及びステロイドを含む）の投与により提供されている。これらの各々は頻繁な投与を必要とし、さらに有効性及び安全性に限界がある。したがって、慢性痛（例えば癌性痛又は関節炎に関する痛み）を有するイヌの痛みを緩和する、投与頻度が低く、長時間持続性で有効な形態が希求される。

【0003】

NGFはイヌの組織で発現され、イヌNGF分子の性状が調べられたが（Eisele I, Wood IS, German AJ, Hunter L, Trayhurn P. "Adipokine gene expression in dog adipose tissues and dog white adipocytes differentiated in primary culture" *Hormone & Metabolic Research*. 37(8):474-81, 2005 Genbank XP_540250）、イヌNGFに対するアンタゴニストが記載されたことはなく、痛みを予防又は緩和するためにイヌでのNGF媒介シグナリング遮断の使用が記載されたこともない。他の種で抗NGFアンタゴニストとして作用される公知の抗体をイヌで使用することは、中和抗体の生成のために実現可能ではない。さらにまた、イヌ由来定常ドメイン及び公知のNGF抗体（例えばアルファD11）由来可変ドメインを含むキメラ抗体の作製はイヌNGFとの結合を保証できなかった。さらにまた、そのような抗体は、前記抗体が最初に得られた種には存在しないがイヌに存在する可能性がある他の標的エピトープと交差反応性を示すかもしれない。さらにまた、中和抗体の生成は長期の治療的投与を制限するであろう（慢性痛関連症状又は癌性症状を治療するときに特に重要な要件である）。同様に、CDR移植又は関連技術を用いる抗NGF抗体のイヌ化型の作製もまた中和抗体生成をもたらす、さらに抗原結合親和性及びアビジチーの更なる低下を示す可能性がある。したがって、高レベルの結合親和性及びアビジチーを保持するが中和抗体の生成は回避する、イヌの痛みの管理で使用される、イヌNGFのアンタゴニストとして作用する結合メンバーが強く希求される。

【発明の概要】

【0004】

懸命な奮闘の結果、本発明者らは、驚くべきことにイヌNGFと特異的に結合しさらにイヌNGFの生物学的活性を中和する非免疫原性抗体及び結合フラグメントを生じる抗体を調製する方法を決定した。特に、全く予期せぬことながら、本発明の抗体及び結合フラグメントとイヌNGFとの結合は、イヌNGFと高親和性TrkAレセプター又はp75レセプターとの結合を阻害することによってイヌNGFの生物学的活性を封鎖することが本明細書で示される。このことは、結果として感覚神経ニューロンでのニューロペプチドのアップレギュレーションを防ぎ、痛覚が軽減又は除去されるという効果をもたらす。この抗体は組換えDNAの方法を用いて生成され、予想に反して非免疫原性である（すなわち、イヌ対象動物への投与後にこの抗体に対する中和抗体が生じない）。抗体が標準的な方法論（例えばCDR移植など）を用いて作製されたのではないので、前記のような発見は全く驚くべきことであり予想に反する。

【0005】

本発明の第一の特徴にしたがえば、イヌでの使用に適切な抗体を調製する方法が提供され、前記方法は以下の工程を含むか又は本質的に以下の工程から成る：

- イヌ以外の種に由来するドナー抗体を提供する工程であって、前記ドナー抗体はイヌに存在するある標的抗原に対して結合特異性を有する、前記工程；
- 前記ドナー抗体のフレームワーク領域のアミノ酸配列の各アミノ酸残基を、1つ以上のイヌ抗体のフレームワーク領域のアミノ酸配列で対応する位置に存在する各アミノ酸残基と比較して、前記1つ以上のイヌ抗体のフレームワーク領域のアミノ酸配列内の前記対応する位置の1つ以上のアミノ酸残基と異なる、前記ドナー抗体のフレームワーク領域のアミノ酸配列内の1つ以上のアミノ酸残基を同定する工程；及び
- 前記ドナー抗体で同定された前記1つ以上のアミノ酸残基を、前記1つ以上のイヌ抗体で前記対応する位置に存在する1つ以上のアミノ酸残基と置換する工程。

本発明の方法はイヌで使用するためにドナー抗体を改変し、前記改変抗体が、そのフレームワーク領域内のいずれの位置においても、イヌでは前記位置で外来性であるようなア

ミノ酸を全く含まない態様で改変する。前記改変抗体は、前記標的抗原に対して特異性及び親和性を保持するが、重要なこととして、潜在的に外来性のエピトープが生成されないように改変される。前記改変抗体はしたがって外来性とみなされず、（特に長期投与に続いて）抗体の効能の中和を生じ得る免疫応答をイヌで誘発しない。

【0006】

ある種の実施態様では、1つ以上の同定アミノ酸残基の置換工程は、前記置換される1つ以上のアミノ酸残基と最高の相同性を有する対応する位置に存在する1つ以上のアミノ酸残基で前記1つ以上の同定アミノ酸残基を置換する工程を含む。

ある種の実施態様では、本方法はさらに、ドナー抗体の重鎖及び/又は軽鎖の定常ドメインを、イヌ抗体由来の重鎖及び/又は軽鎖の定常ドメインで置換する工程を含む。典型的には、重鎖の定常ドメインはHCA又はHCD型イヌ定常ドメインで置換される。

ある種の実施態様では、標的抗原は神経成長因子（NGF）である。

本発明の第一の特徴の方法はCDR移植を含まない。本発明の第一の特徴の方法にしたがって調製される抗体は、ドナー抗体のCDR、本発明の第一の特徴の方法にしたがって調製されたイヌ化フレームワーク領域及びイヌの定常ドメインを含む。

本発明は、本発明の第一の特徴の方法にしたがって調製された抗体（例えば以下に記載される抗体）に及ぶ。

【0007】

したがって、本発明の第一の特徴の方法にしたがえば、イヌのニューロン成長因子（NGF）と特異的に結合するイヌ化抗体又はその結合フラグメントが提供される。典型的には、イヌ化抗体又はその結合フラグメントは、NGFと結合するときNGFの生物学的機能を中和する。すなわち、イヌ化抗体又は結合フラグメントとNGFとの結合は、TrkAレセプター又はp75レセプターと結合するNGFの能力を封鎖する。ある種の実施態様では、イヌ化抗体又はその結合フラグメントは 1×10^{-8} 以下の K_D の結合親和性でNGFと結合する。

本発明のさらに別の又は関連する特徴では、イヌ神経成長因子（NGF）と特異的に結合することができる中和抗体又はその抗原結合フラグメントが提供される。前記抗体又は抗体の結合フラグメントは、配列番号：1若しくは配列番号：3のアミノ酸配列、又は前記配列と少なくとも85、90、95又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むか、前記から成るか、又は本質的に前記から成る。ある種の実施態様では、前記同一性は、少なくとも約15アミノ酸、好ましくは約20アミノ酸、より好ましくは約25アミノ酸の長さになる。

【0008】

いくつかの実施態様では、中和抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの実施態様では、抗体はキメラ抗体である。いくつかの実施態様では、抗体はイヌ化抗体である。すなわちイヌ対象動物に投与されたとき、当該イヌ化抗体に対して中和抗体が産生されないように脱免疫化されてあるアミノ酸配列を有する抗体である。ある種の実施態様では、イヌ化抗体は、本発明の第一の特徴の抗体を調製する方法にしたがって調製される。典型的には、当該抗体の重鎖定常ドメインは、定常ドメインが下流のエフェクター機能を媒介しないように、アミノ酸置換又は欠失の方法によって選別又は改変される。

いくつかの実施態様では、抗体又は抗体の結合フラグメントは、配列番号：5若しくは配列番号：10のアミノ酸配列、又は前記配列と少なくとも85、90、95又は99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖を含むか、前記から成るか、又は本質的に前記から成る。ある種の実施態様では、前記同一性は、少なくとも約15アミノ酸、好ましくは約20アミノ酸、より好ましくは約25アミノ酸の長さになる。

さらに別の又は関連する特徴では、イヌ神経成長因子（NGF）と特異的に結合することができる中和抗体又はその抗原結合フラグメントが提供される。前記抗体又は抗体の結合フラグメントは、配列番号：2若しくは配列番号：4のアミノ酸配列、又は前記配列と少なくとも85、90、95又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むか、前記から成るか、又は本質的に前記から成る。ある種の実施態様では、前記同一性は、少なくとも約15アミノ酸、好ましくは約20アミノ酸、より好ましくは約25アミノ酸の長さになる。

わたる。

【0009】

典型的には、前記重鎖（VH）可変領域は、少なくとも1つの免疫グロブリン定常ドメインを含むさらに別のアミノ酸配列と接続される。ある種の実施態様では、前記免疫グロブリン定常ドメインは、サブクラスIgG（免疫グロブリンG）の抗体に由来し、本発明のイヌ化抗体の完全な重鎖を形成する。異なる4つのイヌ定常ドメインが知られている。典型的には、前記定常ドメインはCH1、CH2及びCH3を含み、CH1及びCH2ドメインの間に位置する適切なリンカー（又は“ヒンジ”）を伴う。典型的には、本発明の抗イヌNGF抗体は、定常ドメインに接続された重鎖可変ドメインを含み、ここで前記定常ドメインは、下流のエフェクター機能（例えば補体の固定、ADCC、Fcレセプター結合など）を媒介しない。典型的には、前記重鎖はイヌ重鎖アイソタイプA又はDである。

10

ある種の実施態様では、前記抗体又は抗体の結合フラグメントは、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13及び配列番号：14から成る群から選択されるアミノ酸配列、又は前記配列と少なくとも85、90、95又は99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖を含むか、前記から成るか、又は本質的に前記から成る。ある種の実施態様では、前記同一性は、少なくとも約15アミノ酸、好ましくは約20アミノ酸、より好ましくは約25アミノ酸の長さにとわたる。

【0010】

ある種のさらに別の実施態様では、抗体又は結合フラグメントは、その定常ドメインの少なくとも1つのアミノ酸残基が置換又は欠失されてあって当該アミノ酸残基のグリコシル化を妨げる重鎖を含むことができる。したがって、ある種のさらに別の実施態様では、抗体又は抗体の結合フラグメントは、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21及び配列番号：22から成る群から選択されるアミノ酸配列、又は前記配列と少なくとも85、90、95又は99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖を含むか、前記から成るか、又は本質的に前記から成る。ある種の実施態様では、前記同一性は、少なくとも約15アミノ酸、好ましくは約20アミノ酸、より好ましくは約25アミノ酸の長さにとわたる。

20

いくつかの実施態様では、下流のエフェクター機能（例えば補体の固定、ADCC、Fcレセプター結合など）を媒介しない重鎖定常ドメインを有する抗体又はフラグメントが好ましい。そのような重鎖は、イヌ由来サブタイプIgG-Aの重鎖を含むことができ、配列番号：6、11、15又は19のアミノ酸配列を有し得る。さらにまた、そのような重鎖は、イヌ由来サブタイプIgG-Dの重鎖を含むことができ、配列番号：9、14、18及び22のアミノ酸配列を有し得る。

30

【0011】

さらに別の又は関連する特徴では、本発明は、イヌ神経成長因子（NGF）と特異的に結合することができる中和抗体又はその抗原結合フラグメントに及ぶ。前記抗体又は抗体の結合フラグメントは、その軽鎖可変領域（VL）が配列番号：1若しくは配列番号：3のアミノ酸配列、又は前記配列と少なくとも85、90、95又は99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、さらにその重鎖可変領域（VH）が、配列番号：2又は配列番号：4のアミノ酸配列と同一若しくは実質的に相同なアミノ酸配列、又は前記配列と少なくとも85、90、95又は99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、前記から成るか、又は本質的に前記から成る軽鎖及び重鎖を含むか、前記から成るか、又は本質的に前記から成る。ある種の実施態様では、前記同一性は、少なくとも約15アミノ酸、好ましくは約20アミノ酸、より好ましくは約25アミノ酸の長さにとわたる。

40

ある種の実施態様では、前記抗体又は結合メンバーは、配列番号：5若しくは配列番号：10のアミノ酸配列、又は前記配列と少なくとも85%のアミノ酸同一性、より好ましくは95%及びもっとも好ましくは少なくとも98%の同一性を有する配列を含むか、前記から成るか、又は本質的に前記から成る軽鎖を含む。ある種の実施態様では、前記同一性は、少なくとも約15アミノ酸、好ましくは約20アミノ酸、より好ましくは約25アミノ酸の長さにとわたる。

50

【0012】

ある種の実施態様では、前記抗体又は結合メンバーは、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13及び配列番号：14から成る群から選択されるアミノ酸配列、又は前記配列と少なくとも85%、より好ましくは95%及びもっとも好ましくは少なくとも98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、前記から成るか、又は本質的に前記から成る重鎖を含む。ある種の実施態様では、前記同一性は、少なくとも約15アミノ酸、好ましくは約20アミノ酸、より好ましくは約25アミノ酸の長さにとわたる。

ある種の実施態様では、前記抗体は少なくとも1つのレポーター分子と結合され得る。

ある種のさらに別の実施態様では、定常ドメインの少なくとも1つの残基は置換又は欠失され、当該残基のグリコシル化を妨げることができる。したがって、ある種のさらに別の実施態様では、抗体又は抗体の結合フラグメントは、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21及び配列番号：22から成る群から選択されるアミノ酸配列、又は前記配列と少なくとも85%、より好ましくは95%及びもっとも好ましくは少なくとも98%のアミノ酸同一性を有する配列を含む重鎖を含むか、前記から成るか、又は本質的に前記から成る。ある種の実施態様では、前記同一性は、少なくとも約15アミノ酸、好ましくは約20アミノ酸、より好ましくは約25アミノ酸の長さにとわたる。

10

【0013】

本発明者らはさらに、相補性決定領域（CDR）と合体させてイヌ化重鎖及び軽鎖可変ドメインを形成できる一連のフレームワーク領域（FR）を規定した。重鎖及び軽鎖ドメインの各々は、4つのフレームワーク領域（FR1、FR2、FR3及びFR4と称される）を有する。

20

抗体分子はCDR1、CDR2及びCDR3領域並びに関連する介在フレームワーク領域を含む重鎖可変ドメインを含むことができる。重鎖可変ドメイン（VH）のCDRはHCDRとして知られ、これらのCDRはKabatの番号付与系にしたがえば以下の位置で見出される：VHCDR1：Kabat残基31 - 35、VHCDR2：Kabat残基50 - 65、VHCDR3：Kabat残基95 - 102（Kabat EA et al. (1991) Sequences of proteins of immunological interest, 5th edition. Bethesda: US Department of Health and Human Services）。

さらにまた、抗体はさらにCDR1、CDR2及びCDR3領域並びに関連する介在フレームワーク領域を含む軽鎖可変ドメインを含む。軽鎖可変ドメイン（VL）のCDRはVLCDRとして知られ、これらのCDRはKabatの番号付与系にしたがえば以下のアミノ酸残基位置で見出される：VLCDR1：Kabat残基24 - 34、VLCDR2：Kabat残基50 - 56、VLCDR3：Kabat残基89 - 97。

30

軽鎖又は重鎖可変ドメインは4つのフレームワーク領域（FR1、FR2、FR3及びFR4）を含み、前記には以下の配置でCDRが介在する：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

【0014】

さらにまた別の特徴では、本発明は抗NGF抗体又はそのNGF結合フラグメントに及ぶ。前記抗体又は抗体の結合フラグメントは、

- 配列番号：23又は配列番号：24のアミノ酸配列から成るか又は前記配列を含むFR1フレームワーク領域、

40

- 配列番号：25のアミノ酸配列から成るか又は前記を含むFR2フレームワーク領域、

- 配列番号：26又は配列番号：27のアミノ酸配列から成るか又は前記配列を含むFR3フレームワーク領域、

- 配列番号：28のアミノ酸配列から成るか又は前記配列を含むFR4フレームワーク領域の少なくとも1つを含む軽鎖可変領域、及び/又は

- 配列番号：29のアミノ酸配列から成るか又は前記配列を含むFR1フレームワーク領域、

- 配列番号：30のアミノ酸配列から成るか又は前記配列を含むFR2フレームワーク領域、

- 配列番号：31又は配列番号：32のアミノ酸配列から成るか又は前記配列を含むFR3フレームワーク領域、

50

- 配列番号：33のアミノ酸配列から成るか又は前記配列を含むFR4フレームワーク領域、
の少なくとも1つを含む重鎖可変領域を含む。

典型的には、軽鎖及び重鎖CDRは、イヌNGFに対し結合特異性を有する抗体に由来する。

典型的には、本発明のイヌ化抗イヌNGF抗体の作製は、軽鎖又は重鎖可変ドメインのフレームワーク領域への復帰変異の導入を必要としない。

【0015】

ある種の実施態様では、上記記載の前記少なくとも1つのフレームワーク領域を含む軽鎖可変ドメインは、イヌ由来軽鎖定常ドメイン（典型的には軽鎖カップ定常ドメインであるが場合によってラムダ軽鎖）と接続される。ある種の実施態様では、前記軽鎖は、配列番号：23又は配列番号：24のアミノ酸配列を有するFR1領域、配列番号：25のアミノ酸配列を有するFR2領域、配列番号：26又は配列番号：27のアミノ酸配列を有するFR3領域、及び配列番号：28のアミノ酸配列を有するFR4領域、又は前述のものと少なくとも85、90、95又は98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するフレームワーク領域を含む。ある種の実施態様では、前記同一性は少なくとも約5アミノ酸、好ましくは約10アミノ酸の長さ

10

にわたる。ある種のさらに別の実施態様では、上記記載のフレームワーク領域の少なくとも1つを含む重鎖可変領域は、イヌ由来重鎖定常ドメインと接続される。ある種の実施態様では、前記定常ドメインのアミノ酸配列は一切の翻訳後修飾を欠くか、又は定常ドメインがグリコシル化されないように、N-結合若しくはO-結合グリコシレーションに付され得るいずれかの又は全ての残基を除去するために改変できる。ある種の実施態様では、重鎖は、配列番号：29のアミノ酸配列を有するFR1領域、配列番号：30のアミノ酸配列を有するFR2領域、配列番号：31又は配列番号：32のアミノ酸配列を有するFR3領域、及び配列番号：33のアミノ酸配列を有するFR4領域、又は前述のものと少なくとも85、90、95又は98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するフレームワーク領域を含む。ある種の実施態様では、前記同一性は少なくとも約5アミノ酸、好ましくは約10アミノ酸の長さ

20

【0016】

ある種のさらに別の実施態様では、改変は本明細書に記載のフレームワーク領域に対して実施できる。すなわち、本発明者らは、各フレームワーク領域のいくつかの残基について、与えられた位置に存在し得るアミノ酸残基には選択に幅があることを確認した。重要なこととして、これらフレームワーク領域の改変は、相補性決定領域に立体構造の変化をもたらさない。なぜならば立体構造の変化は、得られた抗体の結合特異性及び/又は親和性を変更する可能性があるからである。ある種の実施態様では、本発明は、軽鎖可変領域及び/又は重鎖可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸残基への2つ以上の置換の導入に及ぶ。したがって、ある種のさらに別の実施態様では、本発明は、ポリペプチド、例えば抗体又はその抗原結合フラグメントに及び、前記は、以下のアミノ酸置換の1つ以上によって改変されてある配列番号：23のアミノ酸配列を含むFR1領域を有する軽鎖可変ドメインを含む（ここでアミノ酸は一文字コードによって示される）：3位のアミノ酸残基Q（Q3）はアミノ酸残基Vに置換され、T5はMで、S7はTで、A9はLで、L13はVで、Q15はP又はRで、E16はGで、K18はT又はPで、V19はAで、T20はSで、さらにT22はSで置換される。さらにまた、以下の置換の1つ以上がさらに提供され得る：T5はIで、A9はPで、S12はAで、S14はR又はTで、E16はDで、E17はDで、K18はA、E又はLで、T22はYで、さらにC23はYである。

30

40

【0017】

ある種のさらに別の実施態様では（軽鎖可変領域が配列番号：24のアミノ酸配列を含むFR1領域を有する態様では）、前記は以下のアミノ酸置換の1つ以上によって改変され得る：3位のアミノ酸残基V（V3）はアミノ酸残基Qによって置換され、T5はMで、S7はTで、A9はLで、L13はVで、Q15はP又はRで、E16はGで、K18はT又はPで、V19はAで、T20はSで、さらにT22はSで置換される。さらにまた、以下の置換の1つ以上がさらに提供され得る：T5はIで、A9はPで、S12はAで、S14はR又はTで、E16はDで、E17はDで、K18はA、E又はLで、T22はYで、さらにC23はYで置換される。

50

ある種のさらに別の実施態様では、配列番号：25のアミノ酸配列を有する軽鎖FR2領域は以下のアミノ酸置換の1つ以上によって改変され得る：Y2はFで、Q3はRで、A9はSで、K11はQで、さらにL12はRで置換される。さらにまた、Y2はI又はLであり得、Q3はI又はLであり得、Q4はHであり得、K5はRであり得、P6はA又はSであり得、G7はDであり得、A9はP又はTであり得、K11はE又はRであり得、L12はA、G、P又はSであり得、I14はLであり得、さらにY15はE、F、N、S又はVであり得る。

ある種のさらに別の実施態様では、配列番号：26のアミノ酸配列を有する軽鎖FR3領域は以下のアミノ酸置換の1つ以上によって改変され得る：S4はDで、E14はDで、Y15はFで、S16はTで、L17はFで、T18はKで、N20はSで、L22はVで、S24はPで、V27はAで、F31はYで置換される。さらにまた、G1はAであり得、V2はAであり得、P3はSであり得、F6はL又はVであり得、S7はIであり得、G8はAであり得、T13はAであり得、S16はRであり得、T18はRであり得、S24はAであり得、E25はD、G、I又はNであり得、V27はG、S又はTであり得、A28はGであり得、さらにV29はI又はLであり得る。

10

【0018】

ある種のさらに別の実施態様では（軽鎖可変ドメインが配列番号：27のアミノ酸配列を含む軽鎖FR3領域を有する実施態様では）、前記は以下のアミノ酸置換の1つ以上によって改変され得る：S4はDで、E14はDで、F15はYで、S16はTで、L17はFで、T18はKで、S20はNで、L22はVで、P24はSで、V27はAで、Y31はFで置換される。さらにまた、G1はAであり得、V2はAであり得、P3はSであり得、F6はL又はVであり得、S7はIであり得、G8はAであり得、T13はAであり得、S16はRであり得、T18はRであり得、S24はAであり得、E25はD、G、I又はNであり得、V27はG、S又はTであり得、A28はGであり得、さらにV29はI又はLであり得る。

20

ある種のさらに別の実施態様では、配列番号：28のアミノ酸配列を有する軽鎖FR4領域は以下のアミノ酸置換の1つ以上によって改変され得る：E8はDで置換される。さらにまた、G2はSであり得、A3はP、Q、又はTであり得、G4はEであり得、T5はPであり得、K6はQ又はSであり得、V7はL又はWであり得、E8はRであり得、又L9はIであり得る。

【0019】

ある種のさらに別の実施態様では、配列番号：29のアミノ酸配列を有する重鎖FR1領域は以下のアミノ酸置換の1つ以上によって改変され得る：D10はGで、N13はQで、G15はTで、G16はEで、T17はSで、T19はRで、V24はAで、S28はTで、L29はFで、T30はSで置換される。さらにまた、E1はD又はGであり得、V2はE、G、I、L、又はMであり得、Q3はA、E、H、K、L、P、R、S又はVであり得、L4はP又はVであり得、V5はA、E、L又はMであり得、E6はA又はQであり得、S7はF、L又はTであり得、G9はEであり得、D10はA、E、N又はTであり得、L11はQ、R、V又はWであり得、V12はA、I又はMであり得、N13はK又はRであり得、P14はF又はTであり得、G15はA又はEであり得、G16はAであり得、T17はPであり得、L18はRであり得、T19はG、K又はVであり得、L20はI又はVであり得、S21はYであり得、V23はA、E、I又はLであり得、V24はG、I、S又はTであり得、S25はG、P又はTであり得、G26はD、R又はTであり得、F27はD、I、L、S、T又はVであり得、S28はA、D、I、L、M、N、P又はRであり得、L29はI、M又はVであり得、T30はD、G、H、I、K、N、R、Vであり得る。

30

ある種のさらに別の実施態様では、配列番号：30のアミノ酸配列を有する重鎖FR2領域は以下のアミノ酸置換の1つ以上によって改変され得る：L6はPで、R8はKで、E11はQで、G14はAで置換される。さらにまた、W1はCであり得、V2はA、F、I又はLであり得、Q4はH又はLであり得、A5はD、G、P、S、T又はVであり得、G7はE、L又はRであり得、R8はA、E、G、M又はQであり得、G9はD、E、R、T又はVであり得、L10はF、M又はPであり得、E11はD、H、L、P又はRであり得、W12はC、F、L、M、S又はYであり得、V13はF、I又はLであり得、G14はL、S又はTであり得る。

40

【0020】

ある種のさらに別の実施態様では、配列番号：31のアミノ酸配列を有する重鎖FR3領域は以下のアミノ酸置換の1つ以上によって改変され得る：L2はFで、T5はSで、T8はNで、S9はAで、S11はNで、V13はLで、F14はYで、K16はQで、H18はNで、Q21はRで、S22はAで、T27

50

はVで、R32はKで置換される。さらにまた、R1はQであり得、L2はVであり得、T3はA、I又はSであり得、I4はL、M、T又はVであり得、T5はA又はFであり得、R6はKであり得、D7はE又はNであり得、T8はD、G、I又はSであり得、S9はD、G、P、T又はVであり得、K10はE、G、M、N、Q又はRであり得、S11はD、H、K又はRであり得、T12はA、I、M又はSであり得、V13はA、I又はMであり得、F14はH、S又はTであり得、L15はIであり得、K16はA、D、E、H又はRであり得、M17はLであり得、H18はD、K、P、R、S又はTであり得、S19はD、G、N、R又はTであり得、L20はVであり得、Q21はG、I、K、S又はTであり得、S22はD、G、P、T又はVであり得、E23はA、D又はVであり得、T25はA、M又はSであり得、A26はG又はVであり得、T27はF、I、K、L、M又はQであり得、Y28はHであり得、Y29はF又はHであり得、A31はC、G、L、M、R、S、T又はVであり得、R32はA、D、E、G、I、L、M、N、P、Q、S、T又はVであり得る。

10

【0021】

ある種のさらに別の実施態様では（重鎖可変ドメインが配列番号：32のアミノ酸配列を含むFR3領域を有する態様では）、前記は以下のアミノ酸置換の1つ以上によって改変され得る：L2はFで、T5はSで、T8はNで、S9はAで、S11はNで、V13はLで、F14はYで、Q16はKで、H18はNで、R21はQで、S22はAで、T27はVで、R32はKで置換される。さらにまた、R1はQであり得、L2はVであり得、T3はA、I又はSであり得、I4はL、M、T又はVであり得、T5はA又はFであり得、R6はKであり得、D7はE又はNであり得、T8はD、G、I又はSであり得、S9はD、G、P、T又はVであり得、K10はE、G、M、N、Q又はRであり得、S11はD、H、K又はRであり得、T12はA、I、M又はSであり得、V13はA、I又はMであり得、F14はH、S又はTであり得、L15はIであり得、K16はA、D、E、H又はRであり得、M17はLであり得、H18はD、K、P、R、S又はTであり得、S19はD、G、N、R又はTであり得、L20はVであり得、Q21はG、I、K、S又はTであり得、S22はD、G、P、T又はVであり得、E23はA、D又はVであり得、T25はA、M又はSであり得、A26はG又はVであり得、T27はF、I、K、L、M又はQであり得、Y28はHであり得、Y29はF又はHであり得、A31はC、G、L、M、R、S、T又はVであり得、R32はA、D、E、G、I、L、M、N、P、Q、S、T又はVであり得る。

20

ある種のさらに別の実施態様では、配列番号：33のアミノ酸配列を有する重鎖FR4領域は、以下のアミノ酸置換の1つ以上によって改変される：L6はSで置換される。さらにまた、W1はLであり得、G2はA又はSであり得、Q3はD、H、P又はRであり得、T5はA、I、N又はSであり得、L6はP、Q又はRであり得、V7はI、L又はPであり得、T8はA、F、I、L、P、S又はYであり得、V9はAであり得、S10はA、C、P又はTであり得、S11はA、L又はPであり得る。

30

【0022】

本発明の上記特徴のある種の実施態様では、抗体はモノクローナル抗体である。典型的には、抗体はイヌ化抗体である。

本発明の上記特徴のある種の実施態様では、本発明のイヌ化NGF中和抗体又は前記由来の結合フラグメントは、 1×10^{-8} 以下の平衡解離定数 (K_D) を有する結合親和性でイヌNGF（神経成長因子）と特異的に結合する。さらにまた、好ましくは、前記イヌ化抗体はイヌに存在する他のいずれのエピトープとも交差反応せず、さらにそれらをイヌに投与したとき本発明の抗体に対して中和抗体は生成されない。さらにまた、好ましくは、前記抗体の定常ドメインは、いずれの下流のエフェクター機能（補体の固定及び活性化、ADCC並びにFcレセプター結合及び活性化を含むが、ただしこれらに限定されない）も媒介しない。

40

本発明の上記特徴のある種の実施態様では、前記抗体又はその抗原結合フラグメントはイヌで少なくとも1週間の血清半減期を有する。典型的には、血清半減期は少なくとも8日間である。典型的には、前記抗体はイヌで免疫原性ではない。

本発明の上記特徴のある種の実施態様では、前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー及びサイズ排除クロマトグラフィーを含む方法によって精製可能であるか又は精製される。また別の実施態様では、前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、カプトアドヘアアフィニティークロマトグラフィーとその後の陰イオン交換クロマトグラフィーを含む方法によって精製可能であるか又は精製される。

50

【0023】

ある種の実施態様では、前記抗体又はその抗原結合フラグメントは下流のエフェクター機能を媒介しない。典型的には、前記抗体又は結合フラグメントは、イヌ重鎖アイソタイプA又はDを有する。

ある種の実施態様では、イヌ化抗体は、本発明の第一の特徴の抗体を調製する方法にしたがって調製される。ある種のさらに別の実施態様では、重鎖定常領域のアミノ酸配列に対する改変は本発明の抗体に対して実施できる。前記改変は、1つ以上のアミノ酸残基の付加、置換又は欠失を含むことができる。前記アミノ酸の変更は、典型的には抗体の機能的特徴を改変するために実施される。例えば、アミノ酸の改変は、例えばFcレセプターと結合し、補体を活性化し又はADCCを誘発する抗体の能力を妨げることによって、抗体の定常ドメインによって媒介される下流のエフェクター機能を妨げるために実施できる。さらにまた、改変は重鎖定常ドメインのヒンジ領域のアミノ酸残基に対して実施して、抗体をイヌに投与したとき当該抗体の循環半減期を改変することができる。

10

【0024】

本発明は、イヌNGFと結合し、p75又はTrkAレセプターと結合するNGFの能力を封鎖する抗体フラグメントに及ぶ。

ある種の実施態様では、抗体の結合フラグメントは、可撓性リンカーによって連結された本発明の重鎖及び軽鎖配列を含み、単鎖抗体を形成することができる。

単鎖Fv (scFv) はVH及びVLドメインを含む。VH及びVLドメインは共同して標的結合部位を形成する。これら2つのドメインはペプチドリンカーによって共有結合により連結される。scFv分子は、軽鎖可変ドメインがN-末端に要求される事例ではVL-リンカー-VHの形態を有し、VHドメインがN-末端に要求される事例ではVH-リンカー-VLとしての形態有することができる。したがって、ある種のさらに別の実施態様では、抗原結合フラグメントは単鎖Fv (scFv) 抗体フラグメントである。ある種のさらに別の実施態様では、抗体の結合フラグメントは、Fab抗体フラグメント、Fab'抗体フラグメント、F(ab')₂抗体フラグメント、Fv抗体フラグメント、scFv抗体フラグメントなど(ただしこれらに限定されない)から成る群から選択される。

20

【0025】

いくつかの実施態様では、本発明は多重特異的抗体又は多価抗体を提供し、前記抗体は、併用療法で使用される、種々の結合特異性を有する他の抗体と連結又は接続された本発明の抗NGF抗体又は結合フラグメントを含む。多重特異的抗体は、第一のNGFエピトープに特異的な少なくとも1つの抗体又は結合フラグメント、及びNGFに存在する別のエピトープ、又は異なる抗原に特異的な少なくとも1つの結合部位を含む。多価抗体は、同じNGFエピトープに対して結合特異性を有する複数の抗体又は抗体の結合フラグメントを含む。したがってある種の実施態様では、本発明は、本発明のイヌ化抗体の4つ以上のFv領域又はFab領域を含む抗体融合タンパク質に及ぶ。さらにまた別の実施態様は、本明細書に記載の抗体に由来する1つ以上のFab領域を、NGFに特異的な抗体に由来する1つ以上のFab又はFv領域とともに含む抗体融合タンパク質に及ぶ。ある種のさらに別の実施態様では、本発明は二重特異性抗体に及び、前記では、本発明の抗体又はその結合フラグメントは、第二の標的(前記標的はNGFではない)に結合特異性を有する第二の抗体又はその結合フラグメントと結合される。好ましくは、前記第二の標的は、p75又はTrkAレセプターを介するNGF媒介シグナリングの防止を補助する。そのような多価、二重特異性又は多重特異性抗体は、当業者に周知の多様な組換え方法によって作製することができる。

30

40

【0026】

本発明のさらにまた別の特徴は抗ニューロトロフィン中和抗体を提供し、前記抗体は、配列番号:1又は配列番号:3のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメイン、及び/又は配列番号:2又は4のアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメインを含む。ある種の実施態様では、前記ニューロトロフィンはイヌの神経成長因子(NGF)である。

本発明のさらにまた別の特徴は、以下の工程を含む、イヌで痛みを治療、阻害又は緩和する方法を提供する:

50

- 治療的に有効な量の抗イヌNGF抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する工程、及び

- 前記をその必要があるイヌに投与する工程。

ある種の実施態様では、抗体はイヌ化抗体である。

ある種の実施態様では、前記抗体は、配列番号：1若しくは配列番号：3のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有する配列を含む軽鎖可変ドメイン、及び/又は配列番号：2若しくは配列番号：4のアミノ酸配列又は前記と少なくとも85%の配列相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

ある種の実施態様では、前記抗体は、配列番号：5若しくは配列番号：10のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有する配列を有する軽鎖、及び/又は配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13及び配列番号：14から成る群から選択されるアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%及びより好ましくは少なくとも98%の同一性を有する配列を含むか、前記配列から成るか、又は本質的に前記から成る重鎖を含む。

ある種の実施態様では、抗イヌNGF抗体又はその抗原結合フラグメントは、本発明の前記の特徴によって提供されるもののいずれかである。

【0027】

ある種の実施態様では、痛みは神経障害痛である。特に、痛みは術時、術後又は外科手術後痛であり得る。術後痛は、イヌにおける整形外科手術、軟組織外科手術、卵巣子宮摘出術、去勢術など(ただし前記に限定されない)を含むことができる任意の術技の後で生じ得る。ある種のさらに別の実施態様では、痛みは癌又は癌性症状(腫瘍学的痛み)に付随する慢性痛である。ある種のさらに別の実施態様では、痛みは、慢性関節リウマチ又は変形性関節症に付随するか又は前記から生じる。ある種の実施態様では、痛みは炎症痛又はそう痒痛である。

本発明のさらにまた別の特徴にしたがえば、イヌ対象動物における関節炎又は関節炎症状の治療方法が提供され、前記方法は以下の工程を含む：

- 本発明の抗イヌNGF抗体又はその抗原結合フラグメントの治療的に有効な量を提供する工程、及び

- 前記をその必要があるイヌに投与する工程。

【0028】

ある種の実施態様では、前記抗体はイヌ化抗体である。ある種の実施態様では、前記抗体は、配列番号：1若しくは配列番号：3のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有する配列を含む軽鎖可変ドメイン、及び/又は配列番号：2若しくは配列番号：4のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の配列相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

ある種の実施態様では、関節炎又は関節炎症状には、免疫媒介多発性関節炎、慢性関節リウマチ、変形性関節症及び関連症状から成る群から選択される症状が含まれる。

典型的には、関節炎又は関節炎症状の治療は、当該関節炎症状に付随するか又は前記に起因する痛みの緩和、障害、軽減、抑制又はその開始の遅延を含む。

本発明のさらに別の特徴は、イヌNGFの発現の増加又はイヌ対象動物におけるNGF感受性の増加によって引き起こされるか、前記発現の増加若しくは感受性の増加に付随するか、又は前記発現の増加若しくは感受性の増加を生じる症状の治療方法を提供し、前記方法は以下の工程を含む：

- 本発明のイヌ化抗イヌNGF抗体又はその抗原結合フラグメントの治療的に有効な量を提供する工程、及び

- 前記をその必要があるイヌに投与する工程。

本発明のさらにまた別の特徴にしたがえば、NGFによってイヌで増殖が誘発される腫瘍及び前記に付随する症状の治療方法が提供され、前記方法は以下の工程を含む：

- 本発明の抗イヌNGF抗体又はその抗原結合フラグメントの治療的に有効な量を提供する工程、及び

10

20

30

40

50

- 前記をその必要があるイヌに投与する工程。

ある種の実施態様では、腫瘍は骨肉腫である。ある種の実施態様では、腫瘍はオートクライン又はパラクラインNGFによって増殖が誘発される。

【0029】

ある種の実施態様では、本発明の前述の方法はさらに、本発明の抗NGF抗体の有効性を強化及び/又は補完することができる少なくとも1つのさらに別の薬剤を同時投与する工程を含む。例えば、前記の抗体又は抗原結合フラグメントは、少なくとも1つの鎮痛剤、NSAID、オピオイド、コルチコステロイド又はステロイドと一緒に同時投与できる。

適切な鎮痛剤の例には、ブトルファノール、ブプレノルフィン、フェンタニル、フルニキシム、メグルミン、メルピジン、モルヒネ、ナルブフィン及びその誘導体が含まれるが、ただしこれらに限定されない。適切なNSAIDには、アセトアミノフェン、アセチルサリチル酸、カルプロフェン、エトドラク、ケトプロフェン、メロキシカン、フィロコキシブ、ロベナコキシブ、デラコキシブなどが含まれるが、ただしこれらに限定されない。

ある種のさらに別の実施態様では、少なくとも1つのさらに別の薬剤は、抗生物質、抗真菌性治療薬、抗原生動物治療薬から選択される群の1つ以上であり得る治療的に活性な薬剤であり得る。さらにまた、前記少なくとも1つのさらに別の薬剤は、炎症媒介物質の阻害剤（例えばPGE-レセプターアンタゴニスト）、免疫抑制剤（例えばシクロスポリン）、又は抗炎症性グルココルチコイドであり得る。ある種のさらに別の実施態様では、前記少なくとも1つのさらに別の薬剤は、認知機能不全又は障害（老犬で大いに増加し得る、例えば記憶低下又は関連症状）の治療に用いられる薬剤であり得る。さらにまた、前記少なくとも1つのさらに別の薬剤は、心臓系機能不全の治療（例えば高血圧、心筋虚血、うっ血性心不全などの治療）に用いられる抗高血圧薬又は他の化合物であり得る。さらにまた、前記少なくとも1つのさらに別の薬剤は、利尿剤、血管拡張剤、ベータ-アドレナリン作動性レセプターアンタゴニスト、アンジオテンシン-II変換酵素阻害剤、カルシウムチャンネルブロッカー又はHMG-CoAレダクターゼ阻害剤であり得る。

【0030】

ある種の実施態様では、前記抗体又は抗原結合フラグメントは、前述の方法の部分として、約0.01mg/kg体重から約10mg/kg体重、特に0.03mg/kg体重から約3mg/kg体重の用量範囲でイヌに投与される。

多様なさらに別の特徴では、本発明は、本発明の前述の特徴のいずれかに示す抗体又はその結合フラグメントを含む組成物に及ぶ。ある種の実施態様では、前記組成物はさらに少なくとも1つの医薬的に許容できる担体を含む。

本発明のさらにまた別の特徴は、イヌにおける慢性痛又はNGFによって増殖が誘発される腫瘍をもたらすか、又は前記を引き起こす痛み又は症状を治療する医薬組成物を提供する。前記組成物は、医薬的に有効な量の本発明の抗体を少なくとも1つの医薬的に許容できる担体、賦形剤又は希釈剤とともに含む。

ある種の実施態様では、前記組成物はさらに少なくとも1つの鎮痛剤、NSAID、オピオイド、コルチコステロイド又はステロイドを含むことができる。

多様なさらに別の特徴では、本発明は、本発明の抗体又は抗体の結合フラグメントをコードする単離された核酸に及ぶ。

したがって、本発明のさらにまた別の特徴は、本発明の前述の特徴のいずれかに示す抗体又は抗原結合フラグメントをコードする単離された核酸を提供する。

ある種の実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、配列番号：1又は配列番号：3のアミノ酸配列を有する抗イヌNGF抗体又は抗体フラグメントの軽鎖可変ドメイン、又は配列番号：5又は10のアミノ酸配列を有する軽鎖をコードする。

【0031】

ある種のさらに別の実施態様では、前記ポリヌクレオチドは、配列番号：2又は配列番号：4のアミノ酸配列を有する抗イヌNGF抗体又は抗体フラグメントの重鎖可変ドメイン、又は配列番号：6 - 配列番号：9、配列番号：11 - 配列番号：14、配列番号：15 - 配列番号：18及び配列番号：19 - 配列番号：22から成る群から選択されるアミノ酸配列を有する重

鎖をコードする。

ある種の実施態様では、前記単離された核酸はさらに、前記単離された核酸に作動できるように連結された1つ以上の調節配列を含む。

さらに別の特徴では、本発明の重鎖及び/又は軽鎖可変ドメイン又は重鎖及び/又は軽鎖定常ドメインをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが提供される。ある種の実施態様では、前記発現ベクターはさらに1つ以上の調節配列を含む。ある種の実施態様では、前記ベクターはプラスミド又はレトロウイルスベクターである。

さらにまた別の特徴は、本発明の前述の特徴の発現ベクターを取り込んでいる宿主細胞を提供する。本発明のさらに別の特徴は、本発明の前述の特徴の抗体のいずれかを生成する宿主細胞を提供する。

本発明のさらにまた別の特徴は抗イヌNGF中和抗体を生成する方法を提供し、前記方法は、本発明の前述の特徴の宿主細胞を培養して前記細胞に抗イヌNGF中和抗体を発現させる工程を含む。

【0032】

本発明のさらに別の特徴は、以下の工程を含む本発明の抗イヌNGF抗体を精製する方法を提供する：

- (i) 陰イオン交換クロマトグラフィー；
- (ii) 疎水性相互作用クロマトグラフィー；及び
- (iii) サイズ排除クロマトグラフィー。

本発明のさらに別の特徴は、以下の工程を含む本発明の抗イヌNGF抗体を精製する方法を提供する：

- (i) カプトアドヘアアフィニティークロマトグラフィー；及び
- (ii) 陰イオン交換クロマトグラフィー。

本発明のさらにまた別の特徴は、本発明の抗イヌNGFイヌ化抗体を生成する方法を提供する。前記方法は、本発明の抗体の軽鎖及び/又は重鎖を発現する本発明の前述の特徴のポリヌクレオチド/核酸又はベクターの1つ以上を発現する工程、前記発現ポリペプチドを回収する工程（前記ポリペプチドは1つの宿主細胞と一緒に発現されるか、又は異なる細胞で別々に発現され得る）、及び抗体を単離する工程を含む。

【0033】

本発明のさらにまた別の特徴は、イヌで痛みを治療、緩和若しくは阻害するか、又はNGFによって増殖が誘発される腫瘍を治療する方法を提供し、前記方法は、本発明の前述の特徴のいずれかに示すポリヌクレオチドの有効量をイヌに投与する工程を含む。

本発明のさらにまた別の特徴は、本発明の前述の特徴のいずれかに示す抗体若しくは抗体の結合フラグメント、又は本発明の前述の特徴のいずれかに示す医薬組成物、又は本発明の前述の特徴のいずれかに示すものを含む核酸若しくはベクターの、イヌにおける痛みの治療又は予防における使用を提供する。

ある種の実施態様では、痛みは急性痛である。ある種のさらに別の実施態様では、前記痛みは慢性痛である。さらにまた、痛みは術後痛、又は任意の術技から生じる痛みであり得る。前記術技にはイヌの整形外科手術、軟組織外科手術、卵巣子宮摘出術、去勢術などが含まれ得る（ただし前記に限定されない）。ある種のさらに別の実施態様では、痛みは癌又は癌性症状に付随する慢性痛である。ある種のさらに別の実施態様では、痛みは、慢性関節リウマチ又は変形性関節症に付随するか又は前記から生じる。ある種の実施態様では、痛みは炎症痛又はそう痒痛である。

本発明のさらにまた別の特徴は、本発明の前述の特徴のいずれかに示す抗体若しくは抗体の結合フラグメント、又は本発明の前述の特徴に示す医薬組成物、又は本発明の前述の特徴のいずれかに示すものを含む核酸若しくはベクターの、関節炎（特に変形性関節症及び/又は慢性関節リウマチ）の治療における使用を提供する。

【0034】

本発明のさらにまた別の特徴は、本発明の前述の特徴のいずれかに示す抗体若しくは抗体の結合フラグメント、又は本発明の前述の特徴に示す医薬組成物、又は本発明の前述の

10

20

30

40

50

特徴のいずれかに示すものを含む核酸若しくはベクターの、NGF誘発増殖腫瘍（特に骨肉腫）及び前記に付随する症状のイヌ対象動物における使用を提供する。ある種の実施態様では、腫瘍はオートクライン又はパラクラインNGFによって増殖が誘発される。

本発明のさらにまた別の特徴は、本発明の前述の特徴のいずれかに示す抗体若しくは抗体の結合フラグメント、又は本発明の前述の特徴に示す医薬組成物、又は本発明の前述の特徴のいずれかに示すものを含む核酸若しくはベクターの、イヌにおける痛みの治療又は予防のための医薬の調製における使用を提供する。

典型的には前記痛みは慢性痛である。さらにまた、痛みは術後痛、又は任意の術技から生じる痛みであり得る。前記術技には、イヌの整形外科手術、軟組織外科手術、卵巣子宮摘出術、去勢術などが含まれ得る（ただし前記に限定されない）。ある種のさらに別の実施態様では、痛みは癌又は癌性症状に付随する慢性痛である。ある種のさらに別の実施態様では、痛みは、慢性関節リウマチ又は変形性関節症に付随するか又は前記から生じる。ある種の実施態様では、痛みは炎症痛又はそう痒痛である。

本発明のさらにまた別の特徴は、本発明の前述の特徴のいずれかに示す抗体若しくは抗体の結合フラグメント、又は本発明の前述の特徴に示す医薬組成物、又は本発明の前述の特徴のいずれかに示すものを含む核酸若しくはベクターの、慢性関節リウマチ又は変形性関節症のイヌにおける治療、阻害、緩和又は予防のための医薬の調製における使用を提供する。

【0035】

本発明のさらにまた別の特徴は、本発明の前述の特徴のいずれかに示す抗体若しくは抗体の結合フラグメント、又は本発明の前述の特徴に示す医薬組成物、又は本発明の前述の特徴のいずれかに示すものを含む核酸若しくはベクターの、イヌにおけるNGF誘発増殖腫瘍（特に骨肉腫）及び前記に付随する症状の治療用医薬の調製における使用を提供する。ある種の実施態様では、腫瘍はオートクライン又はパラクラインNGFによって増殖が誘発される。

さらにまた別の特徴では、本発明の抗イヌNGF中和モノクローナル抗体又はそのフラグメントを生成する細胞株又はその誘導若しくは子孫細胞が提供される。

本発明のさらにまた別の特徴は、イヌにおける痛みの治療のため、又は痛みに付随する症状の治療のため、又は変形性関節症若しくは慢性関節リウマチに付随する痛みの治療、緩和若しくは阻害のためのキットを提供し、前記キットは、本発明の前述の特徴のいずれかに示す抗イヌNGF抗体またはその結合フラグメント及び前記の使用のための指示を含む。

本発明のさらにまた別の特徴は、液体中の抗イヌNGFモノクローナル抗体のin vitro、ex vivo及びin vivo検出のための、前記抗体の濃度測定における使用のための診断キットを提供する。前記キットは、本発明の任意の抗体又は前記の結合フラグメントを含むことができる。前記キットは前記を使用するための指示を含むことができる。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】本発明にしたがって作製したイヌ化抗体とネズミNGF及びイヌNGFとの結合を示すグラフである。

【図2 A - D】本発明のイヌ化抗体のプロテインA精製を示す一連のゲルを示す。

【図3】SDS-PAGEを用いたイヌ化抗体の精製の結果を示すゲルを示す。

【図4】NGF誘発TF-1増殖のイヌ化抗体による阻害を示すグラフを示す。

【図5】抗原捕捉イヌ化抗体によって誘発される補体沈着を示すグラフを示す。

【図6】イヌ化抗NGFの軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す（配列番号：1）。3つのCDR領域（Kabatの番号付与にしたがって同定）には下線が付されている。特定残基の上部の星印は、イヌ化配列とラットアルファD11抗ネズミNGFモノクローナル抗体のアミノ酸配列との間の配列の相違を示す。

【図7】イヌ化抗NGFの重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す（配列番号：2）。3つのCDR領域（Kabatの番号付与にしたがって同定）には下線が付されている。特定残基の上部

10

20

30

40

50

の星印は、イヌ化配列とラットaD11抗ネズミNGFモノクローナル抗体との間の配列の相違を示す。

【図8】イヌ化抗NGF軽鎖可変ドメインイヌカッパ軽鎖 (caN-kLC) 抗体のアミノ酸配列を示す (配列番号: 5)。可変ドメイン残基は太字で示されている。

【図9】イヌ化抗NGF重鎖可変ドメインイヌIgG-A重鎖 (caN-HCA) のアミノ酸配列を示す (配列番号: 6)。可変ドメイン残基は太字で示されている。

【図10】イヌ化抗NGF重鎖可変ドメインイヌIgG-B重鎖 (caN-HCB) のアミノ酸配列を示す (配列番号: 7)。可変ドメイン残基は太字で示されている。

【図11】イヌ化抗NGF重鎖可変ドメインイヌIgG-C重鎖 (caN-HCC) のアミノ酸配列を示す (配列番号: 8)。可変ドメイン残基は太字で示されている。

【図12】イヌ化抗NGF重鎖可変ドメインイヌIgG-D重鎖 (caN-HCD) のアミノ酸配列を示す (配列番号: 9)。可変ドメイン残基は太字で示されている。

【図13A】配列番号: 5及び7並びに配列番号: 10及び11の多様な希釈を用いた抗イヌNGFモノクローナル抗体のNGF結合の比較を示すグラフを示す。

【図13B】図13Aの上清の補体沈着を示すグラフを示す。

【図14A】HCB及びHCC重鎖アイソタイプを有する抗イヌNGFモノクローナル抗体のN-グリコシル化及び非グリコシル化変種のNGF結合の比較を示すグラフを示す。

【図14B】図14Aの上清の補体沈着を示すグラフを示す。

【図15A】(1)陰イオン交換クロマトグラフィー、(2)疎水性相互作用クロマトグラフィー及び(3)サイズ排除クロマトグラフィーを含む三工程方法 (方法I) を用いた、本発明の抗イヌNGF抗体の定量的精製を示す。図15Aは、サイズ排除HPLCによる分画化の結果を示す。

【図15B】(1)陰イオン交換クロマトグラフィー、(2)疎水性相互作用クロマトグラフィー及び(3)サイズ排除クロマトグラフィーを含む三工程方法 (方法I) を用いた、本発明の抗イヌNGF抗体の定量的精製を示す。図15Bは、各工程後の分画の還元SDS-PAGEゲルを示す。

【図15C】カプトアドヘアクロマトグラフィー及び陰イオン交換クロマトグラフィーを含む二工程方法 (方法II) を用いた、本発明の抗イヌNGF抗体の定量的精製を示す。図15C: 非還元及び還元条件下でのSDS-PAGE分析。レーン1はMWS、レーン2は3450サンプル2 µg/mL及び還元剤0 µL、レーン3は3450サンプル4 µg/mL及び還元剤0 µL、レーン4は3450サンプル6 µg/mL及び還元剤0 µL、レーン5はMWS、レーン6は3450サンプル2 µg/mL及び還元剤3 µL、レーン7は3450サンプル4 µg/mL及び還元剤3 µL、レーン8は3450サンプル6 µg/mL及び還元剤3 µL及びレーン9はMWSである。

【図15D】カプトアドヘアクロマトグラフィー及び陰イオン交換クロマトグラフィーを含む二工程方法 (方法II) を用いた、本発明の抗イヌNGF抗体の定量的精製を示す。図15D: サイズ排除クロマトグラフィー。

【図16A】方法I及びIIによって精製された抗NGFモノクローナル抗体の比較を示す。図16A: 非還元及び還元SDS-PAGEによる比較。

【図16B】方法I及びIIによって精製された抗NGFモノクローナル抗体の比較を示す。図16B: 抗NGF ELISAによる比較。

【図17】抗イヌNGF抗体のイヌへの静脈内投与後に体重 (上段パネル) 及び体温 (下段パネル) が安定であることを示す。

【図18】イヌに静脈内注射した後の抗NGFモノクローナル抗体の血中濃度における動的变化の分析を示す。ビーグル犬の静脈内に抗NGF抗体 (2mg/kg) を注射し、血漿サンプルを表示の時間で採取し、NGF-ELISAによって抗NGFモノクローナル抗体を検出した。抗イヌNGFモノクローナル抗体は、約9日という極めて長時間の排除 (ベータ) 相半減期を有した。

【図19】抗NGFモノクローナル抗体はイヌの炎症痛を軽減することを示す。ビーグル犬のフットパッドにカオリンを-1日目に、抗体又はピヒクルコントロールを0日目に注射し、跛行を目視採点基準によって測定した。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0037】

徹底的な実験の後に、本発明者らは、ラット抗マウスNGFモノクローナル抗体(MAb) D11のアミノ酸配列を得て、驚くべきことにこの配列を用いて非免疫原性抗イヌNGF抗体を作製した。得られた非免疫原性抗体(標準的なCDR移植技術では生成されない)は、イヌNGFに対して高親和性結合を有することが示された。この抗体はイヌNGFの生物学的機能を中和する(もっとも具体的にはNGFと細胞上のレセプターTrkA及びp75との結合の阻害によって示される)。さらにまた予想に反して、イヌに投与したとき当該抗体に対して中和抗体が産生されないこともまた見出された。したがって、本発明のイヌ化抗体はイヌにおける長期間の慢性痛除去に適切である。

10

【0038】

本発明者らが用いた、本発明の抗体のための重鎖及び軽鎖可変ドメインを作製するプロセスによって、ラット(ドナー)の軽鎖及び重鎖可変ドメインのフレームワーク領域内に存在する特定のアミノ酸残基の置換が生じる。前記置換に用いられる残基は、本発明者らの分析にしたがえば、当該CDR領域の立体構造を維持(したがって結合特異性及びアビジチーを維持)するが、もし未改変の形態で抗体がイヌに投与されたならば当該抗体に対する中和抗体の生成をもたらす可能性がある免疫原性エピトープの存在を減少させる残基である。具体的には、本発明の抗体を調製する方法(ペチセーション(PETisation)として知られている)は、ドナー(例えばラット)抗体のフレームワーク領域の配列をイヌ由来の1つの抗体又はプール抗体の配列と比較することによって、イヌへの投与の適切性についてドナー抗体のフレームワーク領域の配列を評価する工程を含む。比較はドナー配列とただ1つの標的配列メンバーとの間で実施されるが、標的配列プールとの比較が好ましいことは明白であろう。なぜならば、標的配列プールとの比較は、標的種の各Kabatの位置で無理のない(naturai)選択肢の数を広げることとなるからである。前記は、ドナーと標的との間の“マッチ”のチャンスを増加させるだけでなく、マッチが存在しない置換の選択肢もまた増加させるであろう。結果として、ドナーに可能な限り近い特性による置換を選択することができる。ドナー配列とイヌ配列が任意のKabat番号又は対応する位置で異なる場合、ドナー配列は、問題のアミノ酸残基をイヌの当該位置で無理がないことが知られているアミノ酸残基で置換することによって改変される。

20

【0039】

ドナーの免疫グロブリンフレームワーク領域に存在するアミノ酸残基の置換が必要な場合、典型的には、置換は保存的置換の原則を用いて実施される(保存的置換では、アミノ酸残基は、イヌの当該Kabatの位置で無理がなく、さらにドナー配列の置換されるアミノ酸とサイズ、荷電及び疎水性が可能な限り密接な関係を有するアミノ酸残基で置換される)。その意図は、ドナー抗体の三次元構造に混乱又は破壊を引き起こさないか又は前記を最小にする置換を選択することである。ある種の状況では、明瞭な選択肢が存在せず、各選択肢が利益及び不利益を有するであろう。最終的な決定には三次元モデリング又は多様な選択配列の発現さえ要求され得る。しかしながら、一般的には明瞭な優先性が利用可能であろう。この方法の結果として、ドナー配列の変更は、当該残基が標的内で外来性であるときにのみ実施され、入れ代わったアミノ酸は、前記が置換したアミノ酸と可能な限り密接な関係を有する。したがって、外来性のエピトープの発生は回避されるが、全体的な三次元構造は保存され、結果として親和性及び特異性もまた保存される。

30

40

当該軽鎖及び重鎖定常領域は、典型的にはイヌ(標的)由来抗体から誘導される。前記重鎖定常ドメインは、それらが下流のエフェクター機能を媒介しないように選択又は改変される。極めて驚くべきことには、本発明にしたがって生成された抗体に対して中和抗体は生成されないか又は最小限しか生成されないことが見出されたので、本発明の抗体は驚くべくことに、長期の循環半減期及び反復投与の選択肢という密接に関係する利益を有することが判明した。さらにまた、フレームワーク残基の置換が、CDR領域の三次元構造に影響しないような態様で実施されるので、所望の標的に対する結合特性に多様性は存在しないであろう。

50

【0040】

ヒト及びマウスには4つの主要なIgGアイソタイプが存在し、呼称は類似するが、それらは、作用態様及び機能（細菌生成物、例えばプロテインA及びプロテインGに対する親和性を含む）、補体依存細胞溶解（CDC）活性化能力、並びに抗体依存細胞性細胞傷害（ADCC）による標的細胞の殺滅誘発能力に違いを有する。CDC及びADCC活性を有する（又は“武装”）定常ドメインをもつIgGアイソタイプを選択することは、標的細胞の同族抗原を有する標的細胞を排除するように設計するときには（例えば腫瘍学において又は感染制御時に）臨床的に有利であると考えられる（例えば人間の医療における使用ではIgG1アイソタイプが上記の目的のために好ましい）。対照的に、免疫系の活性化は、他の設定では（例えば炎症、痛み又は自己免疫の除去では）望ましくないと考えられ、したがって最小限のCDC及びADCC活性をもつヒトIgGアイソタイプが好ましい（そのような人間の医療における使用ではIgG4アイソタイプがしばしば好ましい）。イヌ免疫系で（米国特許5,852,183号；Tang L. et al. 2001. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 80, 259-270）、4つの別個の免疫グロブリンガンマ（IgG）重鎖定常ドメインアイソタイプが、1カップ及びラムダ定常ドメイン配列と一緒に記載されている。前記4つのイヌ重鎖定常ドメインA、B、C及びDは、それらによって媒介される機能的活性に関しては性状が調べられていない。IgGファミリーに対する全体的な相同性にもかかわらず、イヌIgGをコードするタンパク質は、他の種由来のファミリーメンバーよりも互いにより密接な関係を有し、したがって何らかの機能が4つのイヌアイソタイプの各々に帰せられるとしても、相同性のみによって上記機能のどれかを規定することは可能ではない。CDC及びADCC活性を有する定常ドメインを含むIgGアイソタイプを選択することは、同族抗原を有する標的細胞を排除するように抗体を設計するときには（例えば腫瘍学において又は感染制御時には）有利であると考えられる。例えば人間の医療における使用では、IgG1アイソタイプが好ましい。対照的に、免疫系の活性化は、他の設定では（例えば炎症、痛み又は自己免疫の除去では）望ましくないと考えられ、したがって最小限の（又は“非武装”）CDC及びADCC活性をもつヒトIgGアイソタイプが好ましい（例えば人間の医療における使用では、IgG4アイソタイプが選択されるであろう）。

10

20

【0041】

本発明の抗体はイヌ由来重鎖及び軽鎖定常ドメインを含む。さらにまた、相補性決定領域はラットアルファD11抗マウスNGF抗体に由来する。前記D11抗体は最初Cattaneoらが記載した（Cattaneo A, Rapposelli B, Calissano P. (1988) “Three distinct types of monoclonal antibodies after long-term immunization of rats with mouse nerve growth factor” *J Neurochem* 50(4):1003-1010）。アルファD11抗体は、続いてRubertiらによってクローニングされた（Ruberti, F. et al. (1993) “Cloning and Expression of an Anti-Nerve Growth Factor (NGF) Antibody for Studies Using the Neuroantibody Approach” *Cellular and Molecular Neurobiology*. 13(5):559-568）。

30

D11抗体に由来するCDR領域を、本発明者らがCDRの三次元構造を保存すると決定したフレーム領域配列と結合させる。前記フレームワーク領域はしたがって結合特異性を保存するが、一方、当該抗体をイヌに投与したとき、それらに対する中和抗体を生じない。

【0042】

軽鎖及び重鎖可変領域の各々は4つのフレームワーク領域（FR1 - FR4と称される）を含む。これらのフレームワーク領域の各々について、本発明者らは、特定の位置毎に好ましい残基（いわゆる優先残基）、及びさらに別の代替アミノ酸残基（前記もまた当該位置に提供し得る）を同定した。下記の表1から8は重鎖及び軽鎖の各々の4つのフレームワーク領域を示す。これらの表は、当該個別のフレームワーク領域に対応するアミノ酸の位置とともに、さらに完全な重鎖又は軽鎖可変ドメインの全長に沿って固有の残基の位置を見分けるために用いられるKabat番号付与システムにしたがうアミノ酸の位置を提供する。グループ1の残基として示される1つの残基又は複数の残基は優先残基であり、一方、グループ2の残基は代替残基である。しかしながら後者は一般的に、当該個別の位置に関してグループ1に示す残基よりも優先性は低いであろう。アミノ酸残基は一文字システムを用い

40

50

て識別される。

【 0 0 4 3 】

表1：軽鎖可変ドメインFR1の残基

軽鎖FR1 における位置	軽鎖のKabat番号付 与による位置	グループ1の アミノ酸残基	グループ2の アミノ酸残基
1	1	D	
2	2	I	
3	3	QV	
4	4	M	
5	5	TM	I
6	6	Q	
7	7	ST	
8	8	P	
9	9	AL	P
10	10	S	
11	11	L	
12	12	S	A
13	13	LV	
14	14	S	RT
15	15	QPR	
16	16	GE	D
17	17	E	D
18	18	TKP	AEL
19	19	VA	
20	20	TS	
21	21	I	
22	22	ST	Y
23	23	C	Y

10

20

30

表2：軽鎖可変ドメインFR2残基

軽鎖FR2 における位置	軽鎖のKabat番号付 与による位置	グループ1の アミノ酸残基	グループ2の アミノ酸残基
1	35	W	
2	36	YF	IL
3	37	QR	IL
4	38	Q	H
5	39	K	R
6	40	P	AS
7	41	G	D
8	42	Q	
9	43	SA	PT
10	44	P	
11	45	KQ	ER
12	46	LR	AGPS
13	47	L	
14	48	I	L
15	49	Y	EFNSV

10

20

表3：軽鎖可変ドメインFR3残基

軽鎖FR3 における位置	軽鎖のKabat番号付 与による位置	グループ1の アミノ酸残基	グループ2の アミノ酸残基
1	57	G	A
2	58	V	A
3	59	P	S
4	60	SD	
5	61	R	
6	62	F	LV
7	63	S	I
8	64	G	A
9	65	S	
10	66	G	
11	67	S	
12	68	G	
13	69	T	A
14	70	DE	
15	71	FY	
16	72	ST	R
17	73	FL	
18	74	KT	R
19	75	I	
20	76	SN	
21	77	S	
22	78	LV	
23	79	E	
24	80	PS	A
25	81	E	DGIN
26	82	D	
27	82A	VA	GST
28	82B	A	G
29	82C	V	IL
30	83	Y	
31	84	YF	
32	85	C	

10

20

30

表4：軽鎖可変ドメインFR4残基

40

軽鎖FR4 における位置	軽鎖のKabat番号付 与による位置	グループ1の アミノ酸残基	グループ2の アミノ酸残基
1	95	F	
2	96	G	S
3	97	A	PQT
4	98	G	E
5	99	T	P
6	100	K	QS
7	101	V	LW
8	102	ED	R
9	103	L	I
10	104	K	

表5：重鎖可変ドメインFR1残基

重鎖FR1 における位置	重鎖のKabat番号付 与による位置	グループ1の アミノ酸残基	グループ2の アミノ酸残基
1	1	E	DG
2	2	V	EGILM
3	3	Q	AEHKLPRSV
4	4	L	PV
5	5	V	AELM
6	6	E	AQ
7	7	S	FLT
8	8	G	
9	9	G	E
10	10	GD	AENT
11	11	L	QRVW
12	12	V	AIM
13	13	QN	KR
14	14	P	FT
15	15	GT	AE
16	16	GE	A
17	17	ST	P
18	18	L	R
19	19	RT	GKV
20	20	L	IV
21	21	S	Y
22	22	C	
23	23	V	AEIL
24	24	AIV	GST
25	25	S	GPT
26	26	G	DRT
27	27	F	DILSTV
28	28	ST	ADILMNPR
29	29	LF	IMV
30	30	ST	DGHIKNRV

10

20

30

表6：重鎖可変ドメインFR2残基

重鎖FR2 における位置	重鎖のKabat番号付 与による位置	グループ1の アミノ酸残基	グループ2の アミノ酸残基
1	36	W	C
2	37	V	AFIL
3	38	R	
4	39	Q	HL
5	40	A	DGPSTV
6	41	LP	
7	42	G	ELR
8	43	RK	AEGMQ
9	44	G	DERTV
10	45	L	FMP
11	46	EQ	DHLPR
12	47	W	CFLMSY
13	48	V	FIL
14	49	GA	LST

10

表7：重鎖可変ドメインFR3残基

20

重鎖FR3 における位置	重鎖のKabat番号付 与による位置	グループ1の アミノ酸残基	グループ2の アミノ酸残基
1	66	R	Q
2	67	LF	V
3	68	T	AIS
4	69	I	LMTV
5	70	ST	AF
6	71	R	K
7	72	D	EN
8	73	TN	DGIS
9	74	AS	DGPTV
10	75	K	EGMNQR
11	76	SN	DHKR
12	77	T	AIMS
13	78	VL	AIM
14	79	FY	HST
15	80	L	I
16	81	KQ	ADEHR
17	82	M	L
18	82A	HN	DKPRST
19	82B	S	DGNRT
20	82C	L	V
21	83	QR	GIKST
22	84	SA	DGPTV
23	85	E	ADV
24	86	D	
25	87	T	AMS
26	88	A	GV
27	89	TV	FIKLMQ
28	90	Y	H
29	91	Y	FH
30	92	C	
31	93	A	CGLMRSTV
32	94	RK	ADEGILMNPQS TV

10

20

30

表8：重鎖可変ドメインFR4残基

40

重鎖FR4 における位置	重鎖のKabat番号付 与による位置	グループ1の アミノ酸残基	グループ2の アミノ酸残基
1	103	W	L
2	104	G	AS
3	105	Q	DHPR
4	106	G	
5	107	T	AINS
6	108	SL	PQR
7	109	V	ILP
8	110	T	AFILPSY
9	111	V	A
10	112	S	ACPT
11	113	S	ALP

10

【0044】

したがって、本発明のイヌ化抗体は、例えばキメラモノクローナル抗体（第一の種に由来する完全な可変領域及び第二の種に由来する定常ドメインから成る）、又はCDR移植イヌ化抗体（重鎖及び軽鎖可変領域の相補性決定領域（CDR）は、ドナー抗体に由来しフレームワーク領域（FR）に導入されたアミノ酸残基並びに標的の抗体又はイヌ生殖細胞系列の配列に由来する定常領域（CR）を含む）とは異なる。

20

好ましくは、イヌ化抗体は、そのCDRが由来した親（ドナー）抗体の結合特性を実質的に保持する。このことは、イヌ化抗体が、そのCDRが由来したドナー抗体と同じ又は実質的におなじ結合親和性を示すことを意味する。理想的には、イヌ化抗体の親和性は、標的のエピトープに対するドナー抗体の親和性の10%より低くはなく、より好ましくは約30%より低くはなく、もっとも好ましくは親（ドナー）抗体の50%より低くはないであろう。抗原結合親和性をアッセイする方法は当業界で周知であり、1/2最大結合アッセイ、競合アッセイ及びスキャチャード分析が含まれる。

【0045】

上記で規定したように、本発明は、本発明のイヌ化抗体に由来する結合メンバー又は抗原結合フラグメントに拡張される。そのような抗原結合フラグメントは、イヌNGFと特異的に結合する能力を保持する、抗体の1つ以上のフラグメントを指す。抗体の抗原結合機能は完全長抗体のフラグメントによって達成され得る。ある種の実施態様では、前記結合メンバー又は抗原結合フラグメントは単離された結合メンバーであり得る。本発明の結合メンバー又は抗原結合フラグメントは、本発明の抗体のフラグメント、例えば完全にイヌ化された抗体分子のフラグメント、例えば重鎖若しくは軽鎖のみ、又は例えば重鎖及び/又は軽鎖の可変ドメインを含むことができる。ある種の実施態様では、結合メンバーは、典型的には抗体のVH及び/又はVLドメインを含むか、前記から成るか又は本質的に前記から成る。結合メンバーのVHドメインはまた本発明の部分として提供される。VH及びVLドメインの各々には3つの相補性決定領域（“CDR”）が4つの付随フレームワーク領域（“FR”）と一緒に存在する。VHドメインは典型的には3つのHCDR（重鎖相補性決定領域）を含み、VLドメインは3つのLCDR（軽鎖相補性決定領域）を含む。したがって、結合メンバーは、一連のVHCDR1（又はHCDR1）、CDR2（HCDR2）及びCDR3（HCDR3）領域を複数の付随するフレームワーク領域とともに含むVHドメインを含むことができる。結合メンバーは、前記に加えて或いはまた別に、VLCDR1、CDR2及びCDR3ドメインを付随するフレームワーク領域とともに含むVLドメインを含む。VH又はVLドメインは、典型的には4つのフレームワーク領域（FR1、FR2、FR3及びFR4）を含む。本明細書で用いられるように、“フレームワーク領域”又は“フレームワーク配列”という用語は、CDRを失った可変領域の残りの配列を指す。CDR配列の厳密な規定は種々のシステム（Kabat, Chothiaなど）によって決定され得るので、フレームワーク配列の意味は対応する種々の解釈にしたがう。6つのCDR（軽

30

40

50

鎖のVL-CDR1、CDR2及びCDR3、並びに重鎖のVH-CDR1、CDR2及びCDR3)は、軽鎖及び重鎖のフレームワーク配列を、各鎖でFR1、FR2、FR3及びFR4として4つの部分領域に分割する。

【0046】

図6は、本発明の抗NGF抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。CDR1、CDR2及びCDR3領域には下線が付されている。したがって図6に示されるように、VL-CDR1はFR1及びFR2フレームワーク領域の間に位置し、VL-CDR2はFR2及びFR3フレームワーク領域の間に位置し、さらにVL-CDR3はFR3及びFR4フレームワーク領域の間に位置する。図7は、本発明の抗NGF抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。CDR1、CDR2及びCDR3領域には下線が付されている。図6に示す軽鎖可変領域に関するように、VH-CDR1はFR1及びFR2フレームワーク領域の間に位置し、VH-CDR2はFR2及びFR3フレームワーク領域の間に位置し、さら

10

にVH-CDR3はFR3及びFR4フレームワーク領域の間に位置する。

図6及び7では、軽鎖可変ドメイン(図6)及び重鎖可変ドメイン(図7)の残基は、便宜的にKabatらによって考案された番号付与システムにしたがって番号が付けられている(Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H., Gottesman, K. and Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242; Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391)。Kabat番号付与システムとは、抗体又はその抗原結合部分の重鎖及び軽鎖可変領域で他のアミノ酸残基より可変性が強い(すなわち超可変性)アミノ酸残基の番号付与システムを指す。したがって、Kabat番号付与システムは一般的に、可変ドメインの残基(軽鎖の約1-104残基及び重鎖の1-113残基)を指すときに用いられる。この番号付与システムは特段の場合には本明細書で用いることができる。Kabatの残基指定は、本明細書に列挙した関連配列で提供する本発明の重鎖及び軽鎖可変領域のアミノ酸残基の直線的番号付与と常に直接的に一致するとは限らない。特に実際の直線的アミノ酸配列は、重鎖又は軽鎖の基本的可変ドメインのフレームワーク領域であれ又は相補性決定領域(CDR)であれ構造成分の短縮又は構造成分への挿入に対応して、厳格なKabat番号付与の場合よりも減少又は増加したアミノ酸を含むことができる。任意のある抗体の残基に対する正確なKabatの番号付与は、Kabatの番号付与が適用されている標準配列に対して当該抗体の配列アラインメントを実施することによって決定できる。

20

【0047】

さらにまた、図7は重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示している。前記配列はまた配列番号:2で示されている。しかしながら、図7では、番号付与はアミノ酸残基80、80A、80B、及び80Cを示すが、配列番号:2では番号付与は連続的に続く(すなわち80、81、82、及び83)。同じことが図7のKabat残基100、100A、100B、100C、100D及び100Eにも当てはまる。

30

これまでに記載したように、抗体の結合フラグメントは、Fabフラグメント、Fab'フラグメント及びscFv(単鎖可変フラグメント)(ただしこれらに限定されない)を含む群、又はペプチド模倣体、ジアポディ若しくは関連する多価誘導体から選択できる。

ある種の実施態様では、抗体の結合フラグメントは、Fab又はF(ab')₂フラグメント(抗体のVL、VH、CL及びCH1ドメインから成る)である。ある種の実施態様では、VLドメインは配列番号:1又は配列番号:3のアミノ酸配列を有し、VHドメインは配列番号:2又は配列番号:4のアミノ酸配列を有する。ある種の実施態様では、CL及びCH1ドメインは、イヌ免疫グロブリンのCL及びCH1ドメインのアミノ酸配列を土台にする。

40

【0048】

Fab、Fab'又はF(ab')₂フラグメントの組換え体作製に用いられる技術は当業者に周知であり、PCT特許公開公報WO 92/22324及びSawaiらの論文(Sawai et al., "Direct Production of the Fab Fragment Derived From the Sperm Immobilizing Antibody Using Polymerase Chain Reaction and cDNA Expression Vectors", 1995, AJRI 34:26-34)に開示された技術が含まれる。scFv(単鎖Fvフラグメント)の作製に用いることができる技術の例は以下に開示されている:Huston et al., "Protein Engineering of Single-Chain Fv Analogs and Fusion Proteins", Methods in Enzymology, vol. 203:46-88, 1991(

50

前記文献の内容は参照により本明細書に含まれる)。

ある種の実施態様では、抗体フラグメントは、モリモトの方法にしたがってタンパク質分解消化により完全長抗体から誘導することができる (Morimoto et al., "Single-step purification of F(ab')₂ fragments of mouse monoclonal antibodies (immunoglobulin s G1) by hydrophobic interaction high performance liquid chromatography using TS Kgel Phenyl-5PW" Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117, 1992)。抗体フラグメントはまた、宿主細胞によって直接作製することができる (Carter et al., "High level Escherichia coli expression and production of a bivalent humanized antibody fragment" Bio/Technology 10:163-167, 1992)。

【0049】

イヌ化モノクローナル (イヌNGFと結合特異性を有し、イヌNGF機能と拮抗する) の提供に加えて、本発明はさらに抗体以外の結合メンバーに及ぶ。前記は、配列番号:1又は配列番号:3に規定するVL (軽鎖可変) 領域のアミノ酸配列及び配列番号:2又は配列番号:4に規定するVH (重鎖可変) 領域のアミノ酸配列を土台とする一対の結合ドメインを含む。特に本発明は一結合ドメインに及び、前記は本発明のイヌ化抗体のVL又はVH領域を土台にする。

したがって、本発明のある種のさらに別の実施態様では、本発明のヒト化抗体から誘導された一結合ドメインを含むか、前記から成るか、又は本質的に前記から成る結合メンバーが提供される。ある種の実施態様では、前記一結合ドメインは、配列番号:2又は配列番号:4に規定するVH (重鎖可変ドメイン) のアミノ酸配列から誘導される。そのような結合ドメインはイヌNGFへの標的化薬剤として用いることができる。

【0050】

ある種の実施態様では、さらに別の操作技術を用いて本発明の抗体を改変することができる (例えば以下の改変を含む:Fc領域 (血清半減期を改変できる)、補体の固定、Fcレセプター結合及び/又は抗原依存細胞性細胞傷害の改変)。さらにまた、ある種の実施態様では、グリコシル化パターンを変化させた抗体又は抗体フラグメントを作製できる。ある種の実施態様では、本発明の抗体は、抗体のグリコシル化の程度を増加又は低下させるために改変される。ポリペプチドのグリコシル化は典型的にはN-結合又はO-結合である。N-結合は、アスパラギン残基の側鎖と炭水化物部分との結合を指す。トリペプチド配列、アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニン (Xはプロリンを除く任意のアミノ酸) は、炭水化物部分とアスパラギン側鎖との酵素結合の認識配列である。したがって、ポリペプチド中のこれらトリペプチド配列のどちらかの存在は潜在的グリコシル化部位を作出する。O-結合グリコシル化は、糖類、N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース又はキシロースの1つとヒドロキシアミノ酸 (もっとも一般的にはセリン又はスレオニンであるが5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンもまた用いることができる) との結合を指す。本発明者らはグリコシル化されていないイヌ定常ドメインを提供し、それらは配列番号:15、16、17、18、19、20、21及び22として本明細書で規定される。

ある種のさらに別の実施態様では、本発明の抗イヌNGF抗体は、当該抗体をポリエチレングリコール (PEG) 誘導體と反応させることによってPEG化することができる。ある種の実施態様では、前記抗体は脱フコシル化され、したがってフコース残基を欠く。

【0051】

ある種の実施態様では、抗体の生物学的特性の改変は、(a)置換領域のポリペプチド骨格の構造 (例えばシート又はヘリックスの立体構造としての構造)、(b)標的部位における当該分子の荷電又は疎水性、又は(c)側鎖の高、に影響を与える置換を選択することによって達成できる。アミノ酸は、それらの側鎖の特性の類似性にしたがって以下のように分類できる (A. L. Lehninger, in Biochemistry, 2nd Ed., 73-75, Worth Publishers, New York, 1975): (1)非極性:Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Pro (P)、Phe (F)、Trp (W)、Met (M); (2)非荷電極性:Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C)、Tyr (Y)、Asn (N)、Gln (Q); (3)酸性:Asp (D)、Glu (E); (4)塩基性:Lys (K)、Arg (R)、His (H)。或いはまた、天然に存在する残基は、以下のよ

10

20

30

40

50

うに共通の側鎖の特性を基準にして分類できる：(1)疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；(2)中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；(3)酸性：Asp、Glu；(4)塩基性：His、Lys、Arg；(5)鎖の方向性に影響する残基：Gly、Pro；(6)芳香族：Trp、Tyr、Phe。非保存的置換では、これらのクラスの1つのメンバーを別のクラスに交換することが要求されるであろう。そのような置換残基はまた保存的置換部位に、又はそのままの(例えば非保存的)部位に導入することができる。

【0052】

多様なさらに別の特徴では、本発明は、パートナー分子と連結された本発明の抗イヌNGF抗体又はその抗原結合部分を含むイムノコンジュゲートに及ぶ。ある種の実施態様では、そのような抗体-パートナー分子のコンジュゲートは、化学的リンカー(例えばペプチジルリンカー、ヒドラジンリンカー又はジスルフィドリンカー)の手段によって結合される。ある種の実施態様では、前記カップリングパートナーはエフェクター分子、標識、薬剤、又は担体分子である。本発明の抗体をペプチジル及び非ペプチジルカップリングパートナーのどちらともカップリングさせる適切な技術は当業者には周知であろう。適切な標識の例には、検出可能な標識(例えば放射能標識)又は酵素標識(例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼ)又は化学的成分(例えばビオチン)が含まれる。或いはまた、標識は、機能性標識(例えばリシン)又はプロドラッグ(前記はプロドラッグを抗体の結合部位で活性薬剤に変換することができる)であり得る。

多様なさらに別の特徴では、本発明は、本発明のイヌ化抗体、抗体フラグメント及び結合メンバーをコードするポリヌクレオチド、及び特に単離ポリヌクレオチドに及ぶ。本明細書に規定するように、“ポリヌクレオチド”は、任意のポリリボヌクレオチド又はポリデオキシリボヌクレオチドを含み、前記は、未改変RNA若しくはDNAでも又は改変RNA若しくはDNAでもよく、一本鎖及び二本鎖RNA並びに一本鎖及び二本鎖領域の混合物であるRNAを含む(ただし前記に限定されない)。本発明のポリヌクレオチド(例えば本発明の1つのポリペプチド又は複数のポリペプチドをコードする)には、その対立遺伝子変種及び/又はそれらの相補物(そのようなヌクレオチド配列と中等度の又は高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む)が含まれる。

【0053】

本発明はさらに、抗体模倣物、例えば本発明のイヌNGF抗体を土台にするドメイン抗体、ナノボディ、ユニボディ、パーサボディ及びデュオカリンに及ぶ。極めて多様な抗体模倣技術が当業者には公知である。例えば、いわゆるドメイン抗体(Domantis, UK)は、ヒト抗体の軽鎖又は重鎖の可変領域に対応する抗体の小さな機能性結合ユニットである。そのようなドメイン抗体作製の指示は、米国特許6,291,158号、米国特許6,582,915号及び米国特許6,593,081号で見出すことができる。ナノボディは抗体誘導治療タンパク質であり、ラクダ科動物で見出される天然に存在する重鎖抗体の固有の構造的及び機能的特性を含む。ユニボディはさらに別の抗体フラグメント技術であり、IgG4抗体のヒンジ領域の除去を基準にする。ヒンジ領域の欠失は、伝統的なIgG4抗体のほぼ半分のサイズである、一価の結合領域を有する分子を生じる。ユニボディは不活性で、したがって免疫応答を誘発しないIgG4抗体の特性を保存する。

さらに別の結合分子には、アフィボディ分子(米国特許5,831,012号)、DARPin(設計されたアンキリンリピートタンパク質)(PCT国際特許出願公開公報WO 02/20565)及びアンチカリン(米国特許7,250,297号及びWO 99/16873)が含まれる。パーサボディ(Amunix、米国特許出願公開公報2007/0191272)は、マイクロプロテインと称される、15%を超えるシステイン残基を有する3-5kDaの小タンパク質であり、典型的にタンパク質が提示する疎水性コアと入れ替わった高密度ジスルフィド結合の足場を形成する。

【0054】

アビマーは抗体模倣物のもう1つのタイプである。アビマーはヒト血清蛋白質ファミリーの組換えに由来する。前記は、モジュール式結合ドメインで構成される1本のタンパク質鎖であり、当該ドメインの各々は特定の標的部位と結合するように設計される。アビマーは、1つのタンパク質標的上の複数の部位及び/又は複数のタンパク質標的上の複数の

部位と同時に結合することができる。マルチポイント結合又はアビジチーとして知られているように、この結合メカニズムは、複数の細胞と複数の分子が体内で相互作用する態様を模倣し、アンタゴニスト及びアゴニストの作出を支援し、複数の機能及び強力な活性を有する薬剤をもたらす。アビマーライブラリーは、WO 2004/044011（前記文献は参照により本明細書に含まれる）及び例えばUS 2005/0053973にしたがって作製することができる。アビマーライブラリーはまた市場（Avidia Inc, Mountain View, California, USA）で入手できる。

【0055】

抗体製造

本発明の抗体及び結合メンバーは化学的合成によって全体として又は部分として生成できる。例えば、本発明の抗体及び結合メンバーは、当業者に周知の技術（例えば標準的な液体ペプチド合成又は固相ペプチド合成の方法）によって調製できる。或いはまた、本抗体及び結合メンバーは、液相ペプチド合成技術を用いて、又はさらに固相、液相及び溶液化学の組合せによって調製できる。

本発明はさらに、本発明の抗体を含む少なくとも1つのアミノ酸をコードする核酸を、所望のペプチド又はポリペプチドがコードされ得る適切な発現系で発現させることによって本発明の抗体又は結合メンバーを生成することに及ぶ。例えば、軽鎖アミノ酸をコードする核酸及び重鎖アミノ酸をコードする第二の核酸を発現させ、本発明の抗体を提供することができる。

したがって、本発明のある種のさらに別の特徴では、本発明の抗体又は結合メンバーを形成するアミノ酸配列をコードする核酸が提供される。

典型的には、本発明の抗体又は結合メンバーを形成するアミノ酸配列をコードする核酸は、単離形若しくは精製形で提供されるか、又は天然では当該核酸に付随し得る物質を実質的に含まない（ただし例外として1つ以上の調節配列を有する）形態で提供され得る。本発明の抗体又は結合メンバーを発現する核酸は全体として又は部分として合成でき、前記にはDNA、cDNA及びRNAが含まれ得るが、ただしこれらに限定されない。

【0056】

本発明の抗体又は結合メンバーをコードする核酸は、当業者に周知の技術を用いて当業者は容易に調製することができる。前記は、例えば以下に記載されている技術である： Sambrook et al. "Molecular Cloning", A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Volumes 1-3, 2001 (ISBN-0879695773) 及び Ausubel et al. Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, 4th Edition, 1999 (ISBN-0471250929)。前記技術には (i) 核酸サンプルの増幅にポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を使用、(ii) 化学合成、又は (iii) cDNA配列の調製が含まれる。本発明の抗体又は結合メンバーをコードするDNAは当業者に公知の任意の適切な方法で生成及び使用され得る。前記方法は、コードDNAを採取し、発現されるべき部分のどちらかの側の適切な制限酵素認識部位を同定し、さらに当該部分をDNAから切り出す工程を含む。続いて、前記切り出した部分を適切なプロモーターに作動できるように連結し、さらに適切な発現系（例えば市場で入手できる発現系）で発現させることができる。或いはまた、DNAの関連する部分を適切なPCRプライマーを用いることによって増幅させることができる。DNA配列の改変は位置指定変異導入を用いて実施できる。

【0057】

本発明の抗体又は結合メンバーをコードする核酸配列は、上記に記載の少なくとも1つの核酸を含むプラスミド、ベクター、転写又は発現カセットの形態の構築物として提供することができる。前記構築物は、組換え宿主細胞（上記に記載の1つ以上の構築物を含む）内に含まれ得る。発現は、便利には適切な条件下で、適切な核酸配列を含む組換え宿主細胞を培養することによって達成できる。発現に続いて、適切な技術を用いて抗体又は抗体フラグメントを単離及び/又は精製し、続いて適切に使用することができる。

多様な種々の宿主細胞でのポリペプチドのクローニング及び発現系は周知である。適切な宿主細胞には、細菌、哺乳動物細胞、酵母、昆虫及びバキュロウイルス系が含まれる。

異種ポリペプチドの発現に当業界で利用可能な哺乳動物細胞株には、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎細胞及びNSOマウスミエローマ細胞が含まれる。一般的で好ましい細菌宿主は大腸菌（*E. coli*）である。抗体及び抗体フラグメントの原核細胞（例えば*E. coli*）での発現は当業界では良く確立されている。

培養真核細胞での発現もまた、結合メンバーの生成のための選択肢として当業者には利用可能である。

抗体を生成する一般的な技術は当分野の業者には周知であり、そのような方法は、例えば以下で考察されている：Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495-497；米国特許4,376,110号；Harlow and Lane, *Antibodies: a Laboratory Manual*, (1988) Cold Spring Harbor. 組換え抗体分子の調製技術は、上記の参考文献に及び例えば欧州特許0,368,684号にも記載されている。

10

【0058】

本発明のある種の実施態様では、抗体又は結合メンバーの重鎖可変ドメイン及び/又は軽鎖可変ドメインをコードする挿入物を含む組換え核酸が利用される。規定すれば、そのような核酸は、前記コード核酸又はその相補性核酸から成る一本鎖、二本鎖核酸、又はこれら相補性（一本鎖）核酸そのものをコードする。

さらにまた、抗体の重鎖可変ドメイン及び/又は軽鎖可変ドメインをコードする核酸は、天然に存在する重鎖可変ドメイン及び/又は軽鎖可変ドメイン又はその変異体をコードする真性の配列を有する、酵素的に又は化学的に合成された核酸であり得る。

本発明の抗体は、組換え手段によって、直接的にだけでなく異種ポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても生成することができる（前記異種ポリペプチドは、好ましくはシグナル配列又は成熟タンパク質又はポリペプチドのN-末端に特異的な切断部位を有する他のポリペプチドである）。優先的に選択される異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識されプロセッシングされる（すなわちシグナルペプチダーゼによって切断される）ものである。本来の抗体のシグナル配列を認識及びプロセッシングしない原核宿主細胞については、シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ipp又は熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核細胞シグナル配列によって置換される。

20

【0059】

“単離された”という用語は、本発明のイヌ化抗体、又は前記に由来する結合メンバー、又は前記をコードするポリペプチドに対応して用いられるとき、前記抗体、結合メンバー又は核酸（ポリヌクレオチド）が単離及び/又は精製された形態で提供されている状態（すなわちそれらはそれらの天然の環境から分離されているか、単離されているか、又は精製されている）であるか、さらに実質的に純粋若しくは均質な形態で提供される状態又は核酸の場合には要求される機能を有するポリペプチドをコードする配列以外の起源を有する核酸又は遺伝子を含まないか又は実質的に含まない状態を指す。したがって、そのような単離抗体、結合メンバー及び単離された核酸は、それらに天然の状態が付随する物質（例えばそれらがその天然の環境で、又はそのような調製が組換えDNA技術によって*in vitro*又は*in vivo*で実施されるときそれらが調製される環境（例えば細胞培養）で一緒に見出されるポリペプチド又は核酸）を含まないか又は実質的に含まないであろう。

30

40

抗体、結合メンバー及び核酸は希釈剤又はアジュバントとともに処方することができ、さらに実用的な目的のために単離された形態で提供されると考えられる。例えば、抗体及び結合メンバーは、マイクロアッセイで使用されるマイクロタイタープレートの被覆に用いられる場合にはゼラチン又は他の担体と混合できる。また前記は、診断又は治療で用いられるときには医薬的に許容できる担体又は希釈剤と混合されるであろう。抗体又は結合メンバーは、自然の状態で又は異種真核細胞（例えばCHO又はNSO細胞）系によってグリコシル化されていてもよく、またそれらは（例えば原核細胞での発現によって生成される場合には）グリコシル化されてなくてもよい。

抗イヌNGFイヌ化抗体分子を含む不均質調製物もまた本発明の部分を形成する。例えば、そのような調製物は、完全長の重鎖及びC-末端リジンを欠く重鎖を有する抗体、種々の

50

程度のグリコシル化を示す抗体、及びノ又は誘導アミノ酸（例えばピログルタミン酸残基の形成のために環化されたN-末端グルタミン酸）を有する抗体の混合物であり得る。

【0060】

抗体の精製

イヌ抗NGF MAbアイソタイプA、B、C及びDは等しい能力を有する。イヌIgGアイソタイプA及びDが、このアイソタイプは所望される補体結合欠如を示すので本発明の使用で好ましい。しかしながら、これらのアイソタイプはスタフィロコッカスプロテインA又はストレプトコッカスプロテインGと結合しないので、したがってこれらの通常のツールを用いて精製できない。本発明者らは、アイソタイプA及びノ又はDの精製に用いることができる2つの代替方法を同定した。第一の方法は、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー及びサイズ排除クロマトグラフィーの組合せを含む。第二の方法はカプトアドヘアアフィニティクロマトグラフィー及び陰イオン交換クロマトグラフィーの組合せを含む。

10

【0061】

医薬組成物

典型的には、本発明の医薬組成物は、液体処方物、凍結乾燥処方物、液体として再構成される凍結乾燥処方物、又はエアロゾル処方物として処方される。ある種の実施態様では、処方物中の抗体は、約5mg/mLから約250mg/mL、約0.5mg/mLから約45mg/mL、約0.5mg/mLから約100mg/mL、約100mg/mLから約200mg/mL、又は約50mg/mLから約250mg/mLの濃度で存在する。

20

ある種の実施態様では、処方物はさらに緩衝剤を含む。典型的には、処方物のpHは約pH 5.5から約pH6.5である。ある種の実施態様では、緩衝剤は約4mMから約60mMのヒスチジン緩衝液、約5mMから約25mMのコハク酸緩衝液、又は約5mMから25mMの酢酸緩衝液を含むことができる。ある種の実施態様では、緩衝液は、約10mMから300mMの濃度、典型的には125mM周辺の濃度の塩化ナトリウム、及び約5mMから50mM、典型的には25mMの濃度のクエン酸ナトリウムを含む。ある種の実施態様では、処方物はさらに0%ちょうどから0.2%の濃度の界面活性剤を含むことができる。ある種の実施態様では、界面活性剤は、ポリソルベート-20、ポリソルベート-40、ポリソルベート-60、ポリソルベート-65、ポリソルベート-80、ポリソルベート-85（ただしこれらに限定されない）及び前記の組合せから成る群から選択される。好ましい実施態様では、界面活性剤はポリソルベート-20であり、さらに約125mMの濃度の塩化ナトリウム及び約25mMの濃度のクエン酸ナトリウムを含むことができる。

30

【0062】

投与

本発明の抗体又は結合メンバーは単独投与できるが、好ましくは医薬組成物として投与されるであろう。前記医薬組成物は、一般的には意図する投与経路にしたがって選択される医薬的に許容できる適切な賦形剤、希釈剤又は担体を含むであろう。適切な医薬的担体の例には、水、グリセロール、エタノールなどが含まれる。

本発明のモノクローナル抗体又は結合メンバーは、任意の適切な経路により治療の必要があるイヌ患者に投与できる。典型的には、組成物は注射又は輸液により非経口的に投与できる。非経口的投与の好ましい経路の例には以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：静脈内、心臓内、動脈内、腹腔内、筋肉内、腔内、皮下、経粘膜、吸入又は経皮投与。投与経路はさらに、局所及び経腸、例えば経粘膜（肺を含む）、口、鼻、直腸を含むことができる。

40

組成物が、注射用組成物として（例えば静脈内、皮内又は皮下適用で）デリバリーされる実施態様では、活性成分は非経口的に許容できる水溶液（発熱因子を含まず適切なpH、張度及び安定性を有する）の形態として存在し得る。当業者は、例えば等張なビヒクル（例えば塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液又は乳酸リンゲル注射液）を用いて適切な溶液を容易に調製できる。保存料、安定化剤、緩衝剤、抗酸化剤及びノ又は他の添加物も必要に応じて含むことができる。

50

組成物はまた微小球、リポソーム、他の微粒子デリバリー系、又は血液を含むある種の組織に配置される持続放出処方物により投与され得る。

【0063】

上記に記載の技術及びプロトコル並びに本発明で用いることができる他の技術及びプロトコルの例は以下で見出すことができる：Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, Gennaro, A.R., Lippincott Williams & Wilkins; 20th edition ISBN 0-912734-04-3及びPharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems; Ansel, H.C. et al. 7th Edition ISBN 0-683305-72-7 (前記文献の全内容は参照により本明細書に含まれる)。

本発明の抗体及び組成物は、典型的には“治療的に有効な量”で対象動物に投与される(この量は当該組成物が投与される対象動物に利益を示すために十分な量である)。投与される実際の用量並びに投与の頻度及びタイムコースは、治療される症状の性質及び重篤性とともに、治療される対象動物の年齢、性別及び体重の他に投与経路に左右され、当然それらを参考にして決定できる。さらにまた当然の斟酌が、組成物の特性、例えばその結合活性及びin vivo血中寿命、処方物中の抗体又は結合メンバーの濃度とともにデリバリーの経路、部位及び頻度に対して払われるべきである。

【0064】

投薬レジメンには、本発明の抗体又は組成物の1回投与、又は抗体若しくは組成物の複数回投与が含まれる。抗体又は抗体含有組成物はさらに、連続して又は別々に他の治療薬及び医薬とともに投与され得る。前記他の治療薬及び医薬は、本発明の抗体又は結合メンバーが治療のために投与される症状の治療に用いられるものである。

対象動物に実施できる投薬レジメンの例は以下を含む群から選択できる(ただしこれらに限定されない)：1µg/kg/日から20mg/kg/日、1µg/kg/日から10mg/kg/日、10µg/kg/日から1mg/kg/日。ある種の実施態様では、投薬は、1µg/kgから100µg/kgの抗体血中濃度が得られるものであろう。しかしながら実際の組成物の投与用量並びに投与の頻度及びタイムコースは、治療される症状の性質及び重篤性に左右されるであろう。治療の処方(例えば投薬量の決定など)は、最終的には獣医学技術者及び他の獣医師の対応能力の範囲内及び自由裁量にあり、治療される疾患、個々の患者の状態、デリバリー部位、投与方法、及び技術者に公知の他の要因が考慮されるであろう。

【0065】

定義

特段に規定されなければ、本明細書で用いられる全ての技術用語及び学術用語は、本発明の分野の業者が一般的に理解する意味と同じ意味を有する。前記用語の意味及び範囲は明確であるべきであるが、何らかの曖昧さを有する事象では、本明細書で提供する定義がいずれの辞書又は付帯的定義にも優先する。

本明細書を通して、文脈が特段に要求しないかぎり、“含む”若しくは“含有する”又は変型、例えば“含み”若しくは“含有し”は、記述された整数又は整数群を含むが、任意の他の整数又は整数群も排除しないことを暗示する。

本明細書で用いられるように、例えば“a”、“an”及び“the”という語は、文脈が特段の要求を明瞭に示さないかぎり単数及び複数の該当語を含む。したがって、例えば、“活性物質”又は“薬理的に活性な物質”と言え、ただ1つの活性薬剤だけでなく2つ以上の組み合わせられた異なる活性物質を含み、一方、“担体”と言え、2つ以上の担体の混合物だけでなくただ1つの担体なども含まれる。さらにまた、文脈が特段に要求しないかぎり、単数用語は複数を含み、さらに複数用語は単数を含むであろう。

【0066】

本明細書で規定するように、“痛み”という用語は、実際の又は潜在的な組織損傷に付随する、又はそのような損傷に関連して記載される不快な感覚的及び情緒的体験を意味する。

手術痛又は術後痛に関して、米国動物福祉法(Animal Welfare Act 2002, AWA regulations, CFR, Title 9 (Animals and Animal Products), Chapter 1 (Animal and Plant He

10

20

30

40

50

alth Inspection Service, Department of Agriculture). Subchapter A (Animal Welfare), Parts 1-4) は、痛みを伴う処置とは、当該処置を適用される人間の軽度の又は瞬間的な痛み又は苦痛(すなわち、注射又はそれより軽度の他の処置によって引き起こされる痛みよりも強い痛み)を超えるものを引き起こすことが合理的に予想される任意の処置であると規定する。したがって、イヌが痛みを伴う外科手術を受ける場合、当該動物は術後鎮痛剤を投与されるべきである。

さらに別の例では、イヌは、付随する症状(例えば慢性関節リウマチ、変形性関節症、炎症又は癌性若しくは悪性症状)の結果として強い又は慢性の痛みを体験し続ける可能性がある。

【0067】

“侵害受容”という用語は有害刺激の認知を指す。本明細書で規定するように、“神経障害痛”(“神経痛”としても知られている)は、神経発のシグナルに関する問題から生じる痛みである。前記は、体性感覚系に影響を及ぼす病巣又は疾患の結果として生じ得る。神経障害痛の原因が存在し、知覚不全(偶発的に生じる)と称される異常感覚に付随し得る。或いはまた、前記は異痛症に付随することがある(異痛症は、通常は痛みを引き起こさない接触又は刺激で痛みが発生又は悪化するときに生じる)。例えば、三叉神経痛を有する場合には、顔面のかすかな接触が痛みの引き金となり得る。又は糖尿病性神経障害の場合には、寝具の圧迫が痛みの引き金となり得る。神経障害痛はまた、通常は痛みを引き起こさない接触又は刺激で痛みが発生又は悪化する場合に異痛症から生じることがある。例えば、対象動物が三叉神経痛を有する場合には、顔面のかすかな接触が痛みの引き金となり得る。痛覚過敏が関連する神経障害痛は、通常はかすかな不快感を引き起こすだけの刺激又は接触から重篤な痛みが生じることを意味し、一方、感覚異常は、痛みが生じている領域に何も(例えばピン及び針が)接触していないときでも不快な又は痛みを伴う感覚が発生することを意味する。神経障害痛の他の形態はそう痒症又はかゆみ症を含み、前記は、皮膚のアレルギー又は炎症応答に付随し、炎症痛が組織の傷害及び修復プロセスから生じ得る。

【0068】

本明細書に規定されるように、“NGF中和抗体”という用語又は類似の用語は、NGFの生物学的活性化及びシグナリングを中和することができる抗体を示す。中和抗体(アンタゴニスト抗体又は遮断抗体とも称され得る)は、特異的に及び好ましくは選択的にNGFと結合し、NGFの1つ以上の生物学的活性を阻害する。例えば、中和抗体はNGFとその標的リガンド(例えば細胞膜結合TrkA又はp75レセプター)との結合を阻害することができる。

本明細書で用いられるように、“生物学的活性”という用語は、ある分子の任意の1つ以上の固有の生物学的特性を指す(前記分子がin vivoで見出されるように天然に存在するか、又は組換え手段によって提供又は可能となるかに関係はない)。生物学的特性にはレセプター結合及び/又は活性化、細胞シグナリング又は細胞増殖の誘発、細胞増殖の阻害、サイトカイン産生の誘発、アポトーシスの誘発、及び酵素活性が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

本明細書で用いられる“相補性決定領域(CDR)”という用語は、本来の免疫グロブリン結合部位の天然のFv領域の結合親和性及び特異性を一緒に規定するアミノ酸配列を指し、前記はKabatら(Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H., Gottesman, K. and Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242)によって正確に示された。本明細書で用いられる“フレームワーク領域(FR)”という用語は、CDRの間に介在するアミノ酸配列を指す。抗体のこれらの部分は、CDRを適切な向きで保持するために機能する(CDRが抗原と結合することを可能にする)。

【0069】

本明細書で用いられる“定常領域(CR)”という用語は、エフェクター機能を付与する抗体分子の部分の部分を指す。本発明では、定常領域は典型的にはイヌ定常領域を意味する。すなわち、対象のイヌ化抗体の定常領域はイヌ免疫グロブリンに由来する。重鎖定常領域は

10

20

30

40

50

4つのアイソタイプA、B、C又はDのいずれかから選択できる。

本明細書で用いられる“キメラ抗体”という用語は、2つの異なる抗体（典型的には異なる種に由来する）に由来する配列を含む抗体を指す。もっとも典型的には、キメラ抗体は、ドナー種に由来する可変ドメイン（標的エピトープに特異的に結合する）及び当該抗体が投与される標的種から得られる抗体に由来する定常ドメインを含む。

本明細書で用いられる“免疫原性”という用語は、受容動物に投与されたときに、標的タンパク質又は治療的部分の免疫応答（液性又は細胞性）を誘引する能力の強さを指す。本発明は対象のイヌ化抗体の免疫原性に関する。好ましくは、本発明の抗体は免疫原性をもたず（すなわち、イヌに投与されたときそれらに対して中和抗体は生じないであろう）、さらに前記抗体のFc領域によってエフェクター機能は媒介されない。

本明細書で用いられる“同一性”又は“配列同一性”という用語は、アラインメントを実施した配列の個々の任意のアミノ酸残基位置で、アミノ酸残基が当該アラインメント実施配列間で同一であることを意味する。本明細書で用いられる“類似性”又は“配列類似性”という用語は、アラインメントを実施した配列の個々の任意の位置で、アミノ酸残基が当該配列間で類似のタイプであることを示す。例えば、イソロイシン又はバリンはロイシンに置換され得る。前記は保存的置換と称することができる。好ましくは、本発明のアミノ酸配列を当該配列に含まれるアミノ酸残基のいずれかの保存的置換によって改変するとき、これらの改変は、生じた抗体の結合特異性又は機能的活性に対して未改変抗体と比較して全く影響を及ぼさない。

【0070】

本発明の（本来の）ポリペプチド及びその機能的誘導体に対する配列同一性は、配列アラインメントを実施し、配列同一性の部分として保存的置換を全く考慮することなく、最大相同性パーセンテージを達成するために必要な場合にはギャップを導入した後の、当該対応する本来のポリペプチドの残基と同一である当該候補配列のアミノ酸残基のパーセンテージを示す。N-末端若しくはC-末端伸長も挿入も、配列同一性又は類似性の低下とは解されないであろう。2つ以上のアミノ酸配列のアラインメントを実施し、それらの配列同一性又は相同性を決定する方法及びコンピュータープログラムは当業者には周知である。例えば、2つのアミノ酸配列の同一性又は類似性のパーセンテージは、アルゴリズム、例えばBLAST (Altschul et al. 1990)、FASTA (Pearson & Lipman 1988)、又はSmith-Watermanアルゴリズム (Smith & Waterman 1981) を用いて容易に計算できる。

本明細書で用いられるように、第二のアミノ酸残基に対して“最高の相同性”を有するアミノ酸残基と言えば、当該第二のアミノ酸残基と共通であるもっとも多くの特徴又は特性を有するアミノ酸残基を指す。あるアミノ酸残基が第二のアミノ酸残基と最高の相同性を有するか否かを決定するとき、典型的には、例えば電荷、極性、疎水性、サイドアームの質量及びサイドアームの大きさの評価を実施することができる。

第一の配列の具体的なアミノ酸残基と一致する位置で第二の配列に存在するアミノ酸残基を指すために本明細書で用いられる“対応する位置”という用語は、2つの配列間で最大の配列同一性が可能となるように2つの配列でアラインメントを実施したとき、第一の配列の位置と同じ位置である第二の配列の位置を指すことが意図される。対応する位置のアミノ酸残基は同じKabat番号付与を有する。

【0071】

本明細書で用いられる“本質的に～から成る”又は“本質的に～から成って”という用語は、ポリペプチドが記載されたものの他に追加される特色又は成分を有することができることを意味するが、ただしそのような追加の特色又は成分が、当該抗体又は抗体フラグメントのイヌNGFに対する結合特異性を有する能力に実質的に影響を及ぼさないことを条件とする。すなわち、当該ポリペプチドを含む抗体又は抗体フラグメントは、イヌNGFと結合し、さらにイヌNGFの機能的活性と拮抗する当該抗体又は抗体フラグメントの能力を妨げない追加の特色又は成分を有することができる。そのような改変は、当該抗体の免疫原性を低下させるためにアミノ酸配列に導入することができる。例えば、本質的に規定の配列から成るポリペプチドは、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つ以上の追加のアミノ酸、

欠失アミノ酸又は置換アミノ酸を当該配列のどちらかの末端又は両端に含むことができるが、ただしこれらのアミノ酸が、イヌNGFとの結合及びその生物学的機能の封鎖における当該抗体又はフラグメントの役割に干渉、阻害、遮断又は妨害しないことを条件とする。同様に、イヌNGFアンタゴニスト抗体となり得るポリペプチドは1つ以上の官能基を用いて化学的に改変できるが、ただしそのような官能基が、イヌNGFと結合しその機能と拮抗する当該抗体又は抗体フラグメントの能力を妨げないことを条件とする。

【0072】

本明細書で用いられるように、“有効な量”又は“治療的に有効な量”という用語は、イヌNGFとp75及び/又はTrkAレセプターとの結合の抑制に必要な、本発明の物質、結合化合物、小分子、融合タンパク質又はペプチド模倣体の量を意味する。

“ポリペプチド”、“ペプチド”又は“タンパク質”という用語は、本明細書では互換的に用いられ、隣接残基のアルファ-アミノ基とカルボキシ基との間のペプチド結合によって互いに連結された線状の一連のアミノ酸残基を指す。アミノ酸残基は通常は天然の“L”異性体型である。しかしながら、当該ポリペプチドが所望の機能的特性を維持するがぎり、“D”異性体型の残基で任意のL-アミノ酸残基を置換することができる。

本明細書で規定されるように、“抗体”は、問題の標的抗原（この場合はイヌ神経成長因子）と特異的に結合する抗原結合タンパク質を包含し、前記タンパク質は、組換えにより調製されるか、又は免疫グロブリン遺伝子又は免疫グロブリン遺伝子のフラグメントによって遺伝的にコードされる1つ以上のポリペプチドを有する。“抗体”という用語は、モノクローナル抗体及びキメラ抗体、特にイヌ化抗体を包含し、さらにまたポリクローナル抗体又は任意のクラス又はサブタイプの抗体を包含する。“抗体”はさらにハイブリッド抗体、二重特異性抗体、ヘテロ抗体、及び抗原結合を維持する前記の機能的フラグメントに及ぶ。

【0073】

“特異的に結合する”という語句は、タンパク質の不均質集団中の特異的なタンパク質又は標的と抗体の結合を指す。したがって、特異的な免疫アッセイ条件で存在するときは、抗体は特定のタンパク質（この場合にはイヌNGF）と結合し、サンプル中に存在する他のタンパク質と有意な量では結合しない。

本明細書で規定されるように、“canine（イヌ科の動物）”はまた“dog（イヌ）”を指すことができる。Canineは三名法のカニス・ルプス・ファミリアリス（*Canis lupus familiaris*）（カニス・ファミリアリス・ドメスチクス（*Canis familiaris domesticus*））又はカニス・ルプス・ディンゴ（*Canis lupus dingo*）の亜種に属するものに分類することができる。イヌ科の動物にはイヌの任意の種が含まれ、野生変種及び愛玩変種の両方が含まれ、後者はまたコンパニオンアニマルとも称される。

本発明を以下の実施例を参照しながらこれから説明するであろう。これらの実施例は例証のために提供され、本発明の限定と解されることを意図しない。本発明の方法及び技術は、概ね当業界で周知の通常的な方法にしたがって実施され、特段の指示がなければ、本明細書中で引用及び考察されている多様な一般的及び具体的参考文献に記載されている。

【実施例1】

【0074】

抗体の作製

イヌ化可変ドメイン配列をC-末端のイヌ定常重鎖配列又は定常軽鎖配列と結合させることによって全抗体配列を作製した。4つの別個の免疫グロブリンガンマ（IgG）重鎖定常ドメインアイソタイプがイヌ免疫系で単一の kappa 及びラムダ定常ドメイン配列と一緒に記載されている（Tang L. et al. 2001. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 80 . 259-270）。

イヌ化 D11 VHドメインを、4つのIgG重鎖アイソタイプA、B、C及びDの各々並びにイヌ kappa 軽鎖定常ドメインを有するイヌ化 D11 VLドメインと結合させた。完全長の成熟抗体鎖（caN）の配列は、配列番号：5（VL1及びイヌ kappa 定常ドメイン）、6（VH1及び重鎖アイソタイプA）、7（VH1及び重鎖アイソタイプB）、8（VH1及び重鎖アイソタイプC）

10

20

30

40

50

及び9 (VH1及び重鎖アイソタイプD) に示される。変種抗体 (caN2) の軽鎖の配列は配列番号: 10 (軽鎖変種 (VL2) 及びイヌカッパ定常ドメイン) に示される。変種抗体 (caN2) の重鎖のアミノ酸配列は、配列番号: 11 (HCA変種 - VH2及び重鎖アイソタイプA)、配列番号: 12 (HCB変種 - VH2及び重鎖アイソタイプB)、配列番号: 13 (HCC変種 - VH2及び重鎖アイソタイプC) 及び配列番号: 14 (HCD変種 - VH2及び重鎖アイソタイプD) で提供される。

前記結合させたアミノ酸配列を、コドンの最適選別及び完全な化学的遺伝子合成並びに哺乳動物細胞発現ベクター-pcDNA3.1+へのクローニングによって哺乳動物細胞で発現可能な形態に変換した。

得られたcDNAをCHO細胞にトランスフェクトし、配列番号: 6 - 9の配列を有する重鎖の上清を実施例2で分析した。配列番号: 10の軽鎖配列及び配列番号: 11の重鎖配列を有する抗体を実施例11で精製した。

【実施例 2】

【0075】

抗体とネズミNGF及びイヌNGFとの結合の決定

イヌ化重鎖及び軽鎖cDNAの結合物をCHO細胞にトランスフェクトし、上清を採集しイヌ又はネズミNGFを用いてELISAフォーマットで反応させた。インキュベーション及び洗浄工程の後で、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合ヤギ抗イヌIgG特異的ポリクローナル抗体との反応によって結合イヌ抗体を検知し、TMBを用いて現像した。生じた生成物の光学密度を450nmで測定し、偽似空ベクターをトランスフェクトした細胞上清 (図1で “Mock” と表示) の光学密度と比較した。

結果は図1のグラフに示される。マウスNGFとの結合は4つのイヌ化抗体について示されている。これらの抗体の各々は、同じ軽鎖 (caN-kLC-1) (すなわちイヌカッパ定常ドメインを含む軽鎖) を有する。各抗体は異なる重鎖定常ドメインを有する。したがって、特異的な重鎖可変ドメインが異なる4つの定常ドメインの1つと結合される (caN-HCA、caN-HCB、caN-HCC又はcaN-HCD)。当該グラフの第二の部分では、caN-kLC-1軽鎖及びcaN-HCB定常鎖を含むただ1つの抗体とイヌNGFとの結合が示される。

【実施例 3】

【0076】

イヌ化抗体の精製

プロテインAカラムを用いて実施例2から得た上清を精製し、SDS-PAGEによって分離し、抗イヌIgGポリクローナル抗体HRPとの反応性について試験した。このポリクローナル抗体は優先的に当該重鎖を認識する。

結果は図2A - Dに示される。記号の説明: A-HCAはcaN-HCA重鎖及びcaN-kLC軽鎖を含むイヌ化抗体であり、B-HCBはcaN-HCB重鎖及びcaN-kLC軽鎖を含むイヌ化抗体であり、C-HCCはcaN-HCC重鎖及びcaN-kLC軽鎖を含むイヌ化抗体であり、D-HCDはcaN-HCA重鎖及びcaN-kLC軽鎖を含むイヌ化抗体である。図2A - Dの各々に関して、Lはローディングを意味し、Wは洗浄を意味し、Pはピーク分画を意味し、Fはフロースルーを意味する。

プロテインAは優先的にHCBアイソタイプ (すなわちcaN-HCB重鎖を含むイヌ化抗体) と結合するが、HCA、HCC及びHCDアイソタイプでは有意な量は保持されず容易に洗い流されることが観察できる。

【実施例 4】

【0077】

精製イヌ化抗体のSDS-PAGEによる分析

実施例2 (図2A - D) に示したゲル由来の代表的ピーク分画をSDS-PAGEで分離し、クマシールブルーで染色した。

結果は図3のゲルに示される。このゲルは、重鎖及び軽鎖がはっきりと見えることを示している。レーンは左から順に、レーン1 - サイズ標準物、レーン2 - HCA caN-HCA+caN-kLC1、レーン3 - HCB caN-HCB+caN-kLC1、レーン4 - HCC caN-HCC+caN-kLC1、レーン5 - HCD caN-HCA+caN-kLC。

10

20

30

40

50

【実施例 5】

【0078】

TF-1細胞NGF誘発増殖のイヌ化抗体による阻害

実施例2から得たCHO細胞トランスフェクタントの上清の連続希釈（“アンタゴニスト”）を、0.3ng/mLのNGFの存在下でTF-1細胞とともにインキュベートした。生じた増殖をチミジンの取り込みによって測定した。

結果は図4に示される。50%阻害は、0.75 - 1.5ng/mLと算出されたモノクローナル抗体（Mab）で観察された。

【実施例 6】

【0079】

抗原捕捉イヌ化抗体によって誘発される補体沈着

実施例2から得たCHO細胞トランスフェクタントの上清を0.1ng/mLのNGFで被覆した抗体捕捉プレートを用いてインキュベートした。このプレートを洗浄し、続いてヒト血清とともにインキュベートし、結合した補体C1qを抗ヒトC1qポリクローナル抗体HRPの結合および上記のように現像して測定した。

補体結合方法：

プレートを5 μ g/mLのマウスNGFを用い100 μ L/ウェルで被覆し、さらに5%のBSA/PBSで封鎖した。被覆ウェルをPBS/1%BSAで希釈した組換えイヌ化抗NGF IgGを含む細胞培養上清とともに、1時間室温でインキュベートした（100 μ L/ウェル）。このプレートを洗浄し、さらにヒト血清（100 μ L/ウェル）とともに1時間室温でインキュベートした。前記ヒト血清は、ペロナル緩衝食塩水（0.5mM MgCl₂、2mM CaCl₂、0.05% Tween-20、0.1%ゼラチン及び0.5% BSAを含む）で1/100に希釈された。洗浄後、プレートを100 μ Lのヒツジ抗C1q-HRP（Serotec）（PBS/1%BSAで1/800に希釈）とともにインキュベートした。洗浄後、100 μ LのTMB基質（Thermo Scientific）を添加してプレートを現像した。現像反応を100 μ LのH₂SO₄（2N）の添加によって停止させ、吸収を450nmで測定した。

結果は図5のグラフに示される。これらの結果は、C1qと固定イヌ化HCB及びHCC型抗体が結合すること、C1qとイヌ化HCA及びHCD型抗体は結合しないことを示している。したがって、これらの結果は、驚くべきことに、異なるイヌ科動物に由来する重鎖は異なる補体結合及び活性化の特徴を示すこと、及びHCA及びHCD型重鎖をもつイヌ化抗体は予想に反してイヌNGF拮抗反応での使用に好ましいことを示している。補体の固定を媒介しないイヌ動物由来重鎖の同定は、NGFが可溶性媒介物質であるので特に有益な発見である。

【実施例 7】

【0080】

抗イヌNGFモノクローナル抗体とNGFとの結合の比較

フレームワークVL1及びVH1（配列番号：1及び2）に対して代替フレームワークVL2及びVH2（配列番号：3及び4）を用いて、抗イヌNGFモノクローナル抗体とNGFとの結合を比較した。配列番号：10及び配列番号：11に示す軽鎖及び重鎖をコードするDNAを合成し、pcDNA 3.1+を用い分泌シグナル配列ペプチドの下流でクローニングした。このDNAをCHO細胞にコトランスフェクトし、その上清を配列番号：5プラス配列番号：7の同時発現から得たCHO上清とマウスNGF結合ELISAによって比較した。

結果は図13Aに示される。レーンA - Dは、配列番号：5及び7の上清（それぞれ未希釈、1/10、1/100、1/1000）を示す。レーンE - Hは、配列番号：10及び11の上清（それぞれ未希釈、1/10、1/100、1/1000）を示す。レーンIは未希釈の陰性コントロール上清を示す。

【実施例 8】

【0081】

NGF-捕捉イヌ化抗体によって誘発される補体沈着

実施例7から得たCHO細胞トランスフェクタントの上清をそれらの補体動員能力についてC1q ELISAアッセイを用いて試験した（図5に記載の方法を用いる）。

結果は図13Bに示される。VL2（配列番号：10）及びVH2フレームワークプラスHCA型定常ドメイン（配列番号：11）の組合せは、パネルAで認められるMabのHCB型重鎖（配列番号

10

20

30

40

50

: 5 + 7) と等価のNGF結合にもかかわらず補体補充では不活性であった。前記MAbは4、2及び1 μ g/mLの一連の希釈で試験した。Cは陰性コントロールであった。

【実施例 9】

【0082】

HCB及びHCC重鎖アイソタイプを有する抗イヌNGFモノクローナル抗体のN-グリコシル化及び非グリコシル化変種のNGF結合の比較

HCB及びHCC重鎖アイソタイプを有する抗イヌNGFモノクローナル抗体のN-グリコシル化及び非グリコシル化変種のNGF結合の比較を実施した。配列番号：5及び配列番号：7 (HCB)、配列番号：5及び配列番号：16 (HCB^{*})、配列番号：5及び配列番号：8 (HCC) 又は配列番号：5及び配列番号：17 (HCC^{*}) によって示される軽鎖及び重鎖対をコードする発現ベクターをCHO細胞にコトランスフェクトし、上清をマウスNGFとの結合ELISAによって比較した。

10

結果は図14Aに示される。白棒は未希釈上清を示し、影付き棒は1/100希釈を示し、Cは未希釈陰性コントロール上清を示す。NGFとの等価の結合が認められた。

【実施例 10】

【0083】

NGF捕捉イヌ化抗体によって誘発される補体沈着

実施例9から得たCHO細胞トランスフェクタントの上清をそれらの補体動員能力についてC1q ELISAアッセイを用いて試験した (図5に記載の方法を用いる)。

結果は図14Bに示される。補体C1q動員能力は、B型重鎖のN-結合グリコシル化部位の除去 (HCB^{*}) によって失われ、C型重鎖の同様な変異 (HCC^{*}) によって低下した。

20

したがって、極めて驚くべきことに、本発明の抗体がHCA又はHCDサブタイプのイヌ科動物由来重鎖を有する場合には、当該抗体とイヌNGFとの結合は補体活性化又は他の下流のエフェクター機能 (例えばADCC) をもたらさないことが本明細書で提示される。したがって、前記抗体は、イヌNGFと膜結合TrkA又はp75レセプターとの結合を妨害することによってイヌNGFの生物学的機能の活性と拮抗して、関連する下流の細胞内シグナリングカスケードを阻害する。さらにまた、NGF発現はしばしば神経などの基部で生じるので、本発明のNGF拮抗又は中和抗体 (HCA又はHCDサブタイプのイヌ科動物由来重鎖を有する) は、より広範囲の免疫応答を補充することなくNGFの生物学的活性を封鎖することができる。そのような機能的特性は予想されず、しかも極めて望ましいものである。

30

【実施例 11】

【0084】

CHO細胞での発現に続く抗NGFモノクローナル抗体の精製

HCA及びHCDアイソタイプのイヌ抗NGFモノクローナル抗体は望ましい補体結合欠如を示すがスタフィロコッカスプロテインAとの結合は弱いので (図2)、代替の精製方法が開発された。配列番号：10 (軽鎖変種 (VL2) 及びイヌカッパ定常ドメイン) 及び配列番号：11 (HCA変種 - VH2及び重鎖アイソタイプA) を発現する発現ベクターに由来する抗イヌNGFモノクローナル抗体をCHO細胞で発現させ、徹底的な実験の後で、イヌ抗NGF抗体は2つの代替精製方法によって高純度で分画できることが見出された。

第一の方法では、抗イヌNGFモノクローナル抗体は、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー及びサイズ排除クロマトグラフィー (方法I - 15A及びB) によって精製された。第二の方法では、抗NGF抗体は、カプトアドヘアアフィニティクロマトグラフィーとその後の陰イオン交換クロマトグラフィー (方法II - 図15C及びD) によって精製できた。

40

どちらの方法で精製した抗NGFモノクローナル抗体の主ピークも約150kDaの分子量に一致した。SDS-PAGE及びELISAによる比較 (図16) は、方法I及びIIは同様な純度及び生物活性をもつ抗体調製物を生じることを示している。これらの方法によって生成された精製抗NGFモノクローナル抗体をTF-1 NGF中和アッセイ (図4で説明) で試験し、高い性能を有することが示された (IC₅₀ 13pMの抗NGFは37pMのNGFを中和した (データは示されていない))。

50

【実施例 1 2】

【0085】

抗イヌNGFモノクローナル抗体はイヌ静脈内に安全に投与でき、発熱を引き起こさない
 配列番号：10及び配列番号：11（イヌHCA型重鎖）を発現する発現ベクター由来の抗イヌNGFモノクローナル抗体をCHO細胞で発現させ、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー及びサイズ排除クロマトグラフィー（方法I、図15A及びB）の組合せによって精製し、リン酸緩衝食塩水に緩衝液交換を実施した。前記抗体をビーグル犬の静脈内に2mg/kg体重で注射し、獣医師による目視精査、体重変化、体温及び血液生化学によって毒性徴候を評価した。図17は体重及び体温測定を示す。前記又は測定したいずれの血液生化学の分析物（ナトリウム、カリウム、クロリド、カルシウム、ホスフェート、尿素、クレアチニン、グルコース、コレステロール、ビリルビン、アラニントランスアミナーゼ、アルカリホスファターゼ、アミラーゼ、リパーゼ、総タンパク質又はアルブミン）にも変化（前記は示されていない）は観察されなかった。

10

【実施例 1 3】

【0086】

抗イヌNGFモノクローナル抗体のin vivo血中薬理学動態は長時間の血清半減期及び免疫原性の欠如を提示する

配列番号：10及び配列番号：11（イヌHCA型重鎖）を発現する発現ベクター由来の抗イヌNGFモノクローナル抗体をCHO細胞で発現させ、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー及びサイズ排除クロマトグラフィーの組合せによって精製し、リン酸緩衝食塩水に緩衝液交換を実施した（方法I、図15A及びB）。前記抗体をビーグル犬の静脈内に2mg/kg体重で注射し、その後の2週間にわたって血漿サンプルを種々の時間に採取した。標的としてNGF及び抗イヌポリクローナル抗体-セイヨウワサビペルオキシダーゼ二次試薬を用い、ELISAによって希釈血漿サンプルを抗イヌNGF抗体濃度について評価し、さらに図1のようにデベロップさせた。結果は図18に示される。測定された血中濃度は二相型動態と一致し、約33時間の組織分布（アルファ）相半減期を有し、驚くべきことに約9日間の長時間排除（ベータ）相を示した。

20

100から300時間の間では血中濃度における抗イヌNGF抗体濃度の急激な低下がないことは、組換え抗NGFモノクローナル抗体に対するイヌの既存の中和抗体も、輸液後に生成されるそのような中和抗体も一切存在しないことを示している。比較によれば、組換えヒト免疫グロブリン系タンパク質は、イヌ血液中で抗体によって輸液後約200時間で中和される（Richter et al, Drug Metabolism and Disposition 27: 21, 1998）。したがって、これらの結果は、本発明の抗イヌNGFは静脈内輸液後in vivoで長時間の血清半減期（9日間）を有すること、及び既存の抗体もさらに時間の経過にしたがって抗NGF抗体を中和する新規に生成される抗体も存在しないことを示している。

30

【実施例 1 4】

【0087】

in vivoで炎症痛を軽減する抗イヌNGFモノクローナル抗体の効果

抗体療法：

配列番号：10及び配列番号：11（イヌHCA型重鎖）を発現する発現ベクター由来の抗イヌNGFモノクローナル抗体をCHO細胞で発現させ、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー及びサイズ排除クロマトグラフィー（方法I、図15A及びB）の組合せによって精製し、リン酸緩衝食塩水に緩衝液交換を実施した。

40

炎症のイヌモデル：

全ての実験は院内倫理委員会（CRL, Ireland）の事前の承認の下に実施された。ビーグル犬の一方の後肢のフットパッドにカオリンを注射し（=-1日目）、約24時間後に開始し当該イヌを一次的に跛行に至らしめる自家消散炎症を発生させた。このモデルではいったんカオリンに対する初期炎症応答が低下すると、約1-2週間にわたって着実にイヌの跛行が緩和されていき、続いて完全に回復する。

3匹のイヌのグループに抗イヌNGFモノクローナル抗体（200 µg/kg体重）又はピヒクル

50

コントロールとしてリン酸緩衝食塩水を静脈内注射した (=1日目)。前記のイヌを以下の目視採点方法によって7日間跛行について評価した：スコア0、跛行無し（完全な体重保持）；スコア1、わずかな跛行（完全な体重保持ではないが良好に歩行する）；スコア2、軽度の跛行（弱い体重保持で歩行は良好ではない）、スコア3、重篤な跛行（体重を保持できない）。観察者はどのイヌがどの注射を受けているか知らされてなかった。

結果は図19に示される。跛行スコアは、ビヒクルコントロールと比較して、注射後3日目に抗NGFモノクローナル抗体を投与されたイヌで軽減され、抗NGFモノクローナル抗体が、ビヒクル単独で観察される効果よりもイヌの痛みを軽減する効果を有することを示している。この長期に及ぶ活性は、抗イヌNGFモノクローナル抗体の血中薬理学動態（約30時間のゆっくりとした組織分布（アルファ）相及び相対的に貧弱なフットパッド領域の血管形成を示した）と一致する。図19に提供された結果は、本発明の抗イヌNGF抗体はイヌで炎症痛を軽減し、結果として跛行を緩和することを示している。

【0088】

本明細書に引用した全ての文書類は参照により本明細書に含まれる。本発明の記載の実施態様の多様な改変及び変型が、本発明の範囲を逸脱することなく当業者には明白であろう。本発明を特定の好ましい実施態様との関連でこれまで説明してきたが、特許請求の範囲に記載した本発明はそのような個々の実施態様に限定されるべきではないことは理解されよう。実際のところ、本発明の実施に関して記載した態様の当業者に明白な多様な改変が本発明に包含される。

【図1】

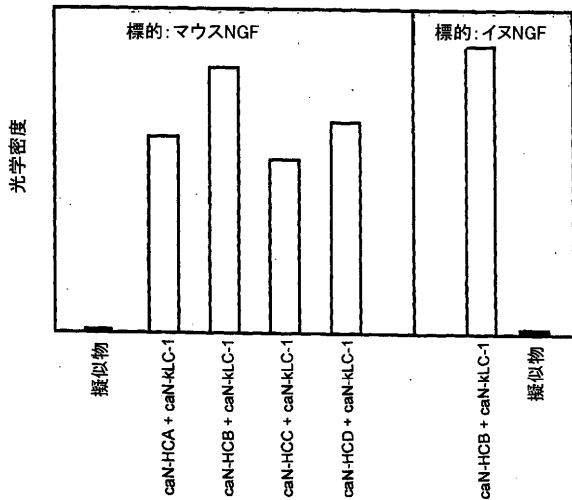


Figure 1

【図2】

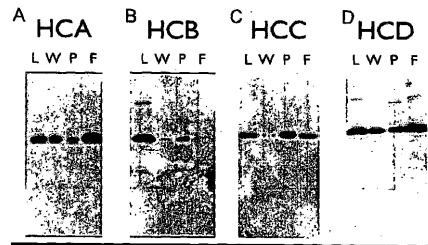


Figure 2

【図3】

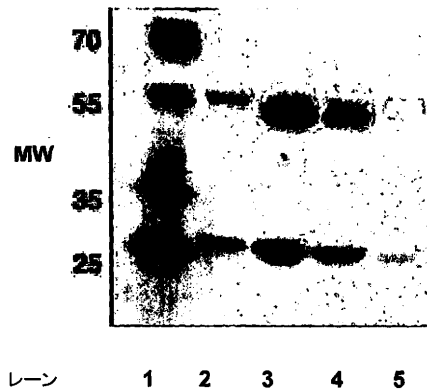


Figure 3

【 図 4 】

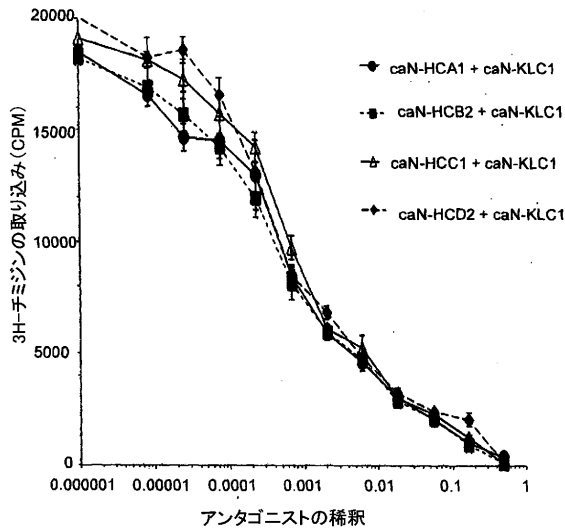


Figure 4

【 図 5 】

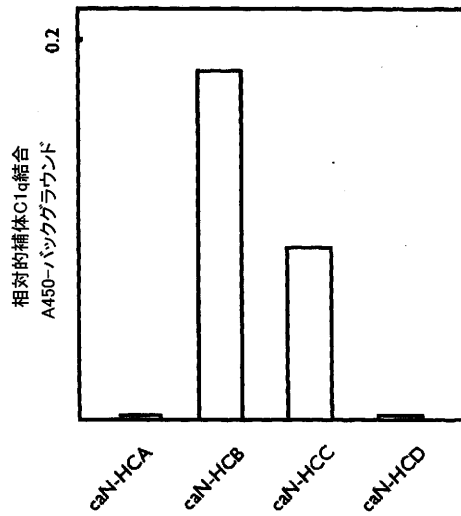


Figure 5

【 図 6 】

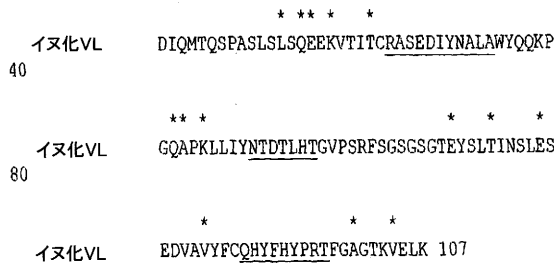


Figure 6 - 軽鎖可変ドメイン

【 図 8 】



Figure 8 - イヌ化抗NGF VLイヌカッパ軽鎖 (caN-LKC)

【 図 7 】

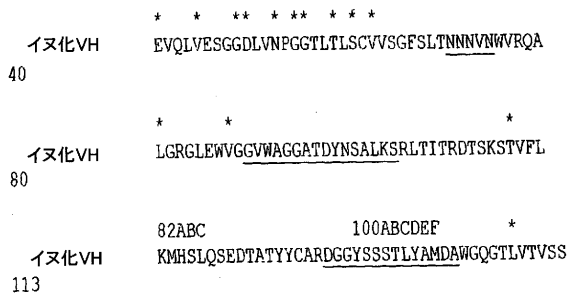


Figure 7 - 重鎖可変ドメイン

【 図 9 】

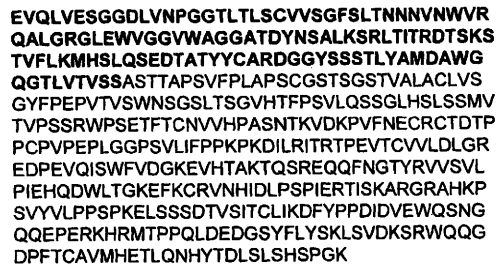


Figure 9 - イヌ化抗NGF VHイヌIgG-A重鎖 (caN-HCA)

【 図 1 0 】

EVQLVESGGDLVNPGGTLTLCVVSFGFSLTNNNNWVR
 QALGRGLEWVGGVWAGGATDYNALKSRLTITRDTSKS
 TVFLKMHSLSQSEDTATYYCARDGGYSSSTLYAMDAWG
 QGTLVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVS
 GYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMV
 TVPSSRWPSETFTCNVAHPASKTKVDKVPVKRENGRVP
 RPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDILLIARTPEVTC
 VVDLDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFNGT
 YRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKA
 RGQAHQPSVYVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFYPPDIDV
 EWQSNQEQEPESKYRTTPQLDEDGYSFLYSKLSVDKS
 RWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLSHSPGK

Figure 10 - イヌ化抗NGF VHイヌIgG-B重鎖 (caN-HCB)

【 図 1 2 】

EVQLVESGGDLVNPGGTLTLCVVSFGFSLTNNNNWVR
 QALGRGLEWVGGVWAGGATDYNALKSRLTITRDTSKS
 TVFLKMHSLSQSEDTATYYCARDGGYSSSTLYAMDAWG
 QGTLVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVS
 GYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMV
 TVPSSRWPSETFTCNVHPASNTKVDKVPVKESTCKCIS
 PCVPPELGGPSVFIFPPKPKDILRITRTEITCVLDLGRE
 DPEVQISWFVDGKEVHTAKTQPREQQFNSTYRVVSVLPI
 EQDQWLTGKEFKCRVNHIGLPSPIERTISKARGQAHQPS
 VYVLPSPKELSSSDTVTLTCLIKDFYPPPEIDVEWQSNQ
 PEPESKYHTTAPQLDEDGYSFLYSKLSVDKSRWQQGDT
 FTCAVMHEALQNHHTDLSLSHSPGK

Figure 12 - イヌ化抗NGF VHイヌIgG-D重鎖 (caN-HCD)

【 図 1 1 】

EVQLVESGGDLVNPGGTLTLCVVSFGFSLTNNNNWVR
 QALGRGLEWVGGVWAGGATDYNALKSRLTITRDTSKS
 TVFLKMHSLSQSEDTATYYCARDGGYSSSTLYAMDAWG
 QGTLVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSGSTVALACLVS
 GYIPEPVTVSWNSVSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMV
 TVPSSRWPSETFTCNVAHPATNTKVDKPVAKECECKCN
 CNNCPCPGCGLLGGPSVFIFPPKPKDILVTARTPTVTCVV
 VDLDPENPEVQISWFVDSKQVQTANTQPREEQSNGTYR
 VVSVLPIGHQDWLSGKQFKCKVNNKALPSPIEIIISKTPG
 QAHQPNVYVLPSPRDEMSKNTVTLTCLVKDFPPEIDVE
 WQSNQEQEPESKYRMTTPQLDEDGYSFLYSKLSVDKSR
 WQRGDTFICAVMHEALHNHYTQISLSHSPGK

Figure 11 - イヌ化抗NGF VHイヌIgG-C重鎖 (caN-HCC)

【 図 1 3 A 】

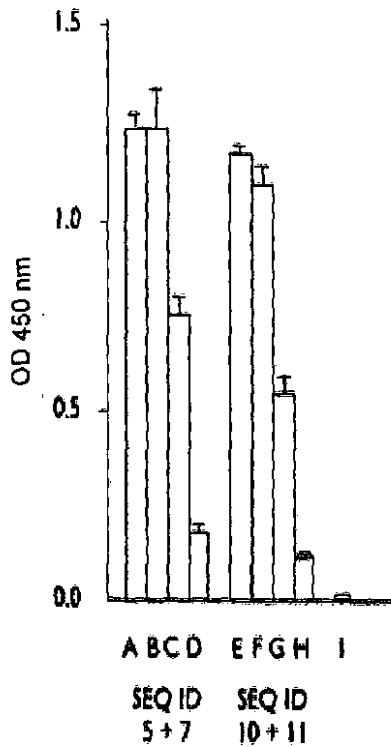


Figure 13A

【 図 1 3 B 】

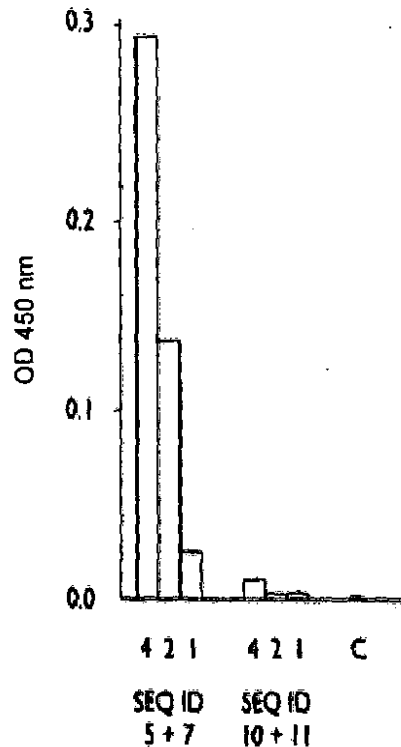


Figure 13B

【 図 1 4 A 】

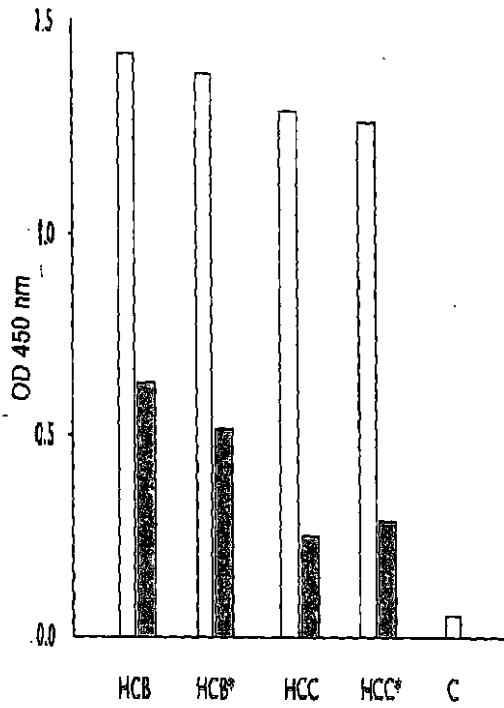


Figure 14A

【 図 1 4 B 】

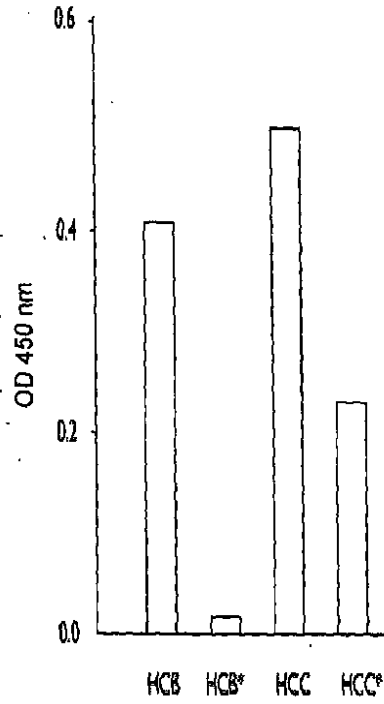


Figure 14B

【 図 1 5 A 】

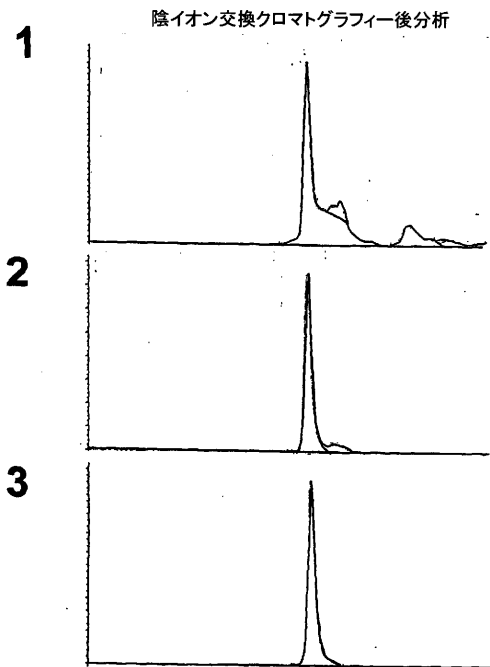


Figure 15A

【 図 1 5 B 】

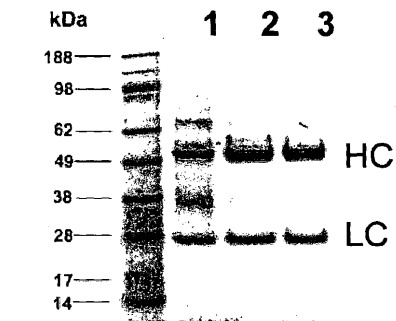


Figure 15B

【 図 1 5 C 】

SDS-PAGE

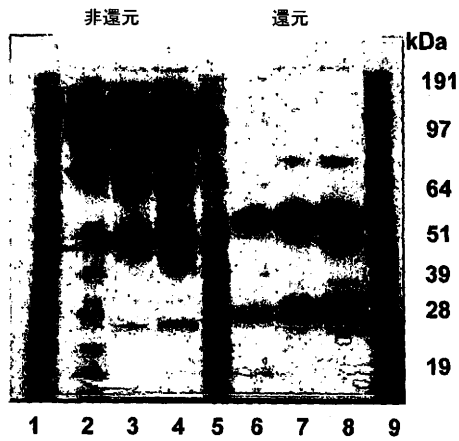
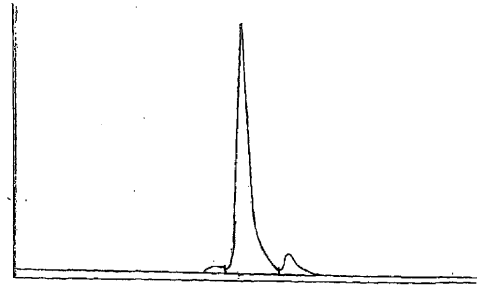


Figure 15C

【 図 1 5 D 】



ピーク保持時間 (分)	およその MW (kDa)	総ピーク面積に対する%
8.05	353	2.6
9.17	156	89.7
11.18	36	7.7

Figure 15D

【 図 1 6 B 】

NGF ELISA

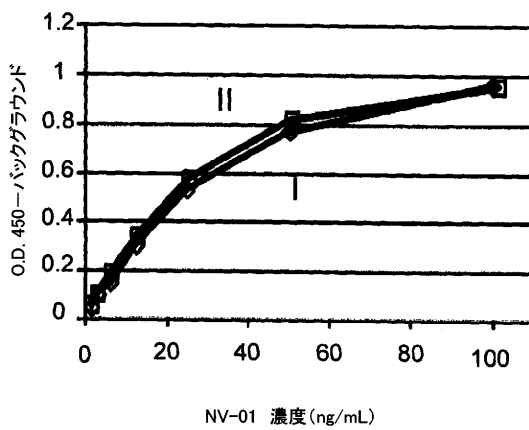


Figure 16B

【 図 1 7 】

動物の識別	実験日														
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
68305	38.6	38.6	38.6	38.5	38.4	38.5	38.4	38.3	38.7	38.2	38.3	38.9	38.4	38.6	38.5
26886	38.2	38.0	38.0	38.2	38.4	37.7	38.1	38.2	38.4	38.2	38.4	38.5	38.6	38.4	38.6
32886	38.7	38.9	38.9	38.8	38.7	38.8	38.7	38.5	38.8	38.7	38.2	39.2	38.7	38.7	38.8

【 図 1 8 】

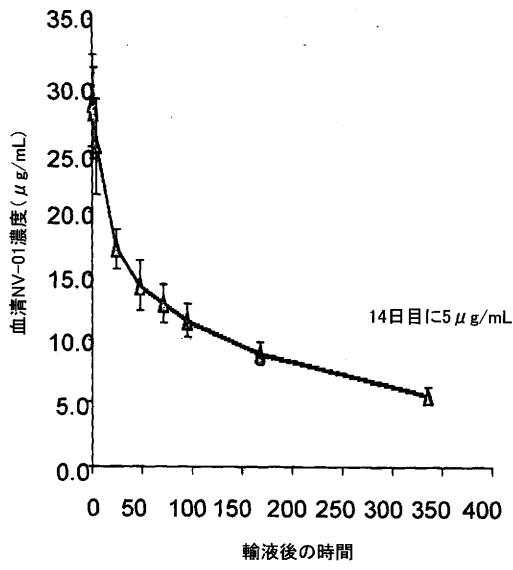


Figure 18

【 図 1 9 】

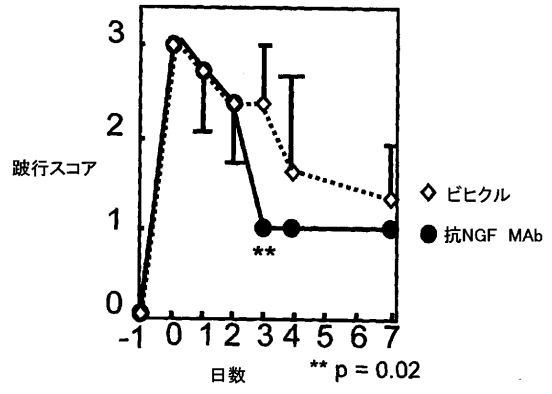


Figure 19

【図16A】

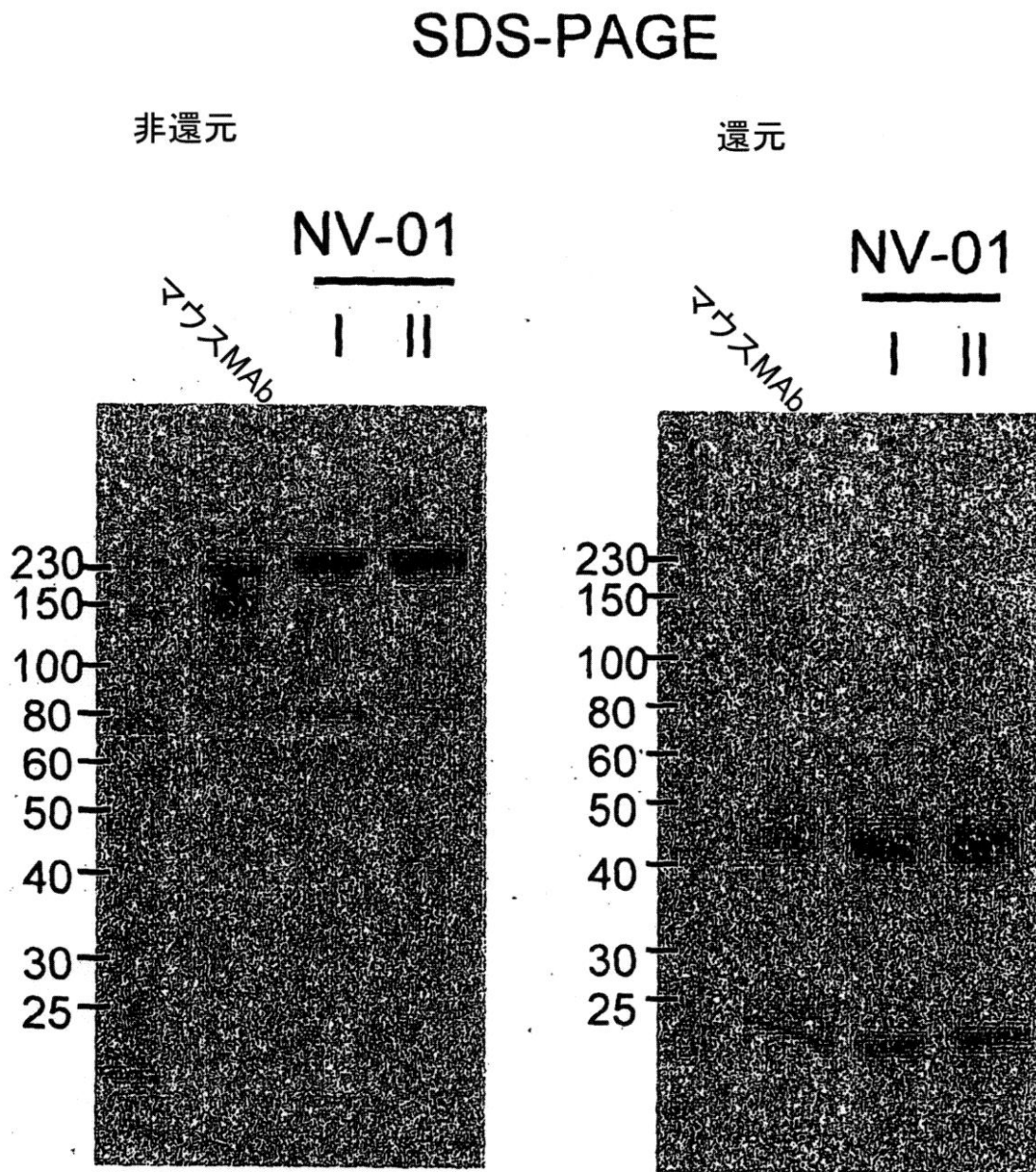


Figure 16A

【配列表】

[2014522236000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2012/051002

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/22 C07K16/46 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/060080 A2 (IDEXX LAB INC [US]; KRAH EUGENE REGIS III [US]; GUO HONGLIANG [US]; AI) 24 July 2003 (2003-07-24) example 5 -----	1-5,8, 26-65, 75-89
Y	PELAT THIBAUT ET AL: "Non-human primate immune libraries combined with germline humanization: an (almost) new, and powerful approach for the isolation of therapeutic antibodies", MABS,, vol. 1, no. 4, 1 July 2009 (2009-07-01), pages 377-381, XP009135983, paragraph [0006] -----	1-5, 9-25, 66-74,90
X	WO 2005/061540 A2 (LAY LINE GENOMICS S P A [IT]; SCUOLA INTERNAZ SUPERIORE DI S [IT]; CAT) 7 July 2005 (2005-07-07) sequence 17 -----	6,7,13
Y	----- -/--	8-90
<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
20 August 2012		04/09/2012
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 Wagner, René

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2012/051002

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& DATABASE Geneseq [Online] 8 September 2005 (2005-09-08), "Humanized alpha D11 antibody heavy chain variable region SEQ ID NO 17.", XP002679816, retrieved from EBI accession no. GSP:AEB12537 Database accession no. AEB12537 sequence -----	
Y	COVACEUSZACH S ET AL: "Dissecting NGF Interactions with TrkA and p75 Receptors by Structural and Functional Studies of an Anti-NGF Neutralizing Antibody", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 381, no. 4, 12 September 2008 (2008-09-12), pages 881-896, XP023611489, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2008.06.008 [retrieved on 2008-06-10] page 890 - left-hand column -----	8-12, 14-34
A	ABE T ET AL: "Protective role of nerve growth factor against postischemic dysfunction of sympathetic coronary innervation.", CIRCULATION 7 JAN 1997 LNKD- PUBMED:8994439, vol. 95, no. 1, 7 January 1997 (1997-01-07), pages 213-220, XP002679817, ISSN: 0009-7322 the whole document -----	1-90
A, P	WO 2012/024650 A2 (ABBOTT LAB [US]; LACEY SUSAN E [US]; BARBON JEFFREY A [US]; CHHAYA MEH) 23 February 2012 (2012-02-23) the whole document -----	1-90

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2012/051002

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 03060080	A2	24-07-2003	AU 2002359851 A1	30-07-2003
			CA 2469833 A1	24-07-2003
			EP 1485126 A2	15-12-2004
			JP 2005514063 A	19-05-2005
			US 2004181039 A1	16-09-2004
			WO 03060080 A2	24-07-2003
			-----	-----
WO 2005061540	A2	07-07-2005	AT 534665 T	15-12-2011
			AU 2004303633 A1	07-07-2005
			AU 2009245889 A1	07-01-2010
			BR P10418202 A	17-04-2007
			CA 2551796 A1	07-07-2005
			CA 2688944 A1	07-07-2005
			CN 1906212 A	31-01-2007
			CN 101724070 A	09-06-2010
			DK 2138512 T3	27-02-2012
			EP 1709076 A2	11-10-2006
			EP 2138512 A1	30-12-2009
			EP 2218737 A2	18-08-2010
			EP 2308894 A2	13-04-2011
			ES 2377535 T3	28-03-2012
			JP 4652341 B2	16-03-2011
			JP 2008500274 A	10-01-2008
			JP 2009291211 A	17-12-2009
			PT 2138512 E	05-03-2012
			SI 2138512 T1	30-04-2012
			US 2009300780 A1	03-12-2009
			US 2011104164 A1	05-05-2011
			US 2011105727 A1	05-05-2011
			US 2011105728 A1	05-05-2011
			US 2011191872 A1	04-08-2011
			WO 2005061540 A2	07-07-2005
			ZA 200605200 A	26-08-2009
			-----	-----
WO 2012024650	A2	23-02-2012	NONE	
-----	-----	-----	-----	

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 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	4 C 0 8 6
C 0 7 K	16/22 (2006.01)	C 0 7 K	16/22	4 C 0 8 7
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 P	25/04 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/04	
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 K	31/573 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 K	31/56 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	31/573	
A 6 1 K	35/76 (2006.01)	A 6 1 K	31/56	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
G 0 1 N	33/577 (2006.01)	A 6 1 K	35/76	
		G 0 1 N	33/53	D
		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, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO , NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111501
弁理士 滝澤 敏雄

(72)発明者 ゲアリング ディヴィッド
オーストラリア 3 0 0 6 ヴィクトリア サウスバンク ミードン ストリート 9

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA43 BA53 CA02 CA07 DA02 EA04
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA91X AA91Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46
4C084 AA13 AA19 NA14 ZA081 ZA082 ZA961 ZA962 ZB111 ZB112 ZB151
ZB152 ZC611 ZC612
4C085 AA13 AA14 DD62 DD63 EE01 GG01
4C086 AA01 AA02 DA08 DA10 MA01 MA02 MA04 NA14 ZA08 ZA96
ZB11 ZB15 ZC61
4C087 AA01 AA02 BC83 NA14 ZA08 ZA96 ZB11 ZB15 ZC61
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA76 EA21 EA22 FA74 GA22 GA23
GA25 GA26

专利名称(译)	抗神经生长因子抗体和产生和使用所述抗体的方法		
公开(公告)号	JP2014522236A	公开(公告)日	2014-09-04
申请号	JP2014509817	申请日	2012-05-08
[标]申请(专利权)人(译)	NVIP		
申请(专利权)人(译)	NTT V型IPD的专有限公司		
[标]发明人	ゲアリングディヴィッド		
发明人	ゲアリング ディヴィッド		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C07K16/22 A61K39/395 A61P25/04 A61P29/00 A61P19/02 A61K45/00 A61K31/573 A61K31/56 A61K48/00 A61K35/76 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	A61K2039/505 C07K16/08 C07K16/22 C07K16/24 C07K16/28 C07K2317/24 C07K2317/41 C07K2317/51 C07K2317/52 C07K2317/70 C07K2317/71 C07K2317/72 C07K2317/732 C07K2317/734 A61P17/04 A61P19/02 A61P25/04 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 C07K16/467 A61K38/17 A61K38/18 A61K38/19 A61K39/395 A61K47/42 A61K48/00 A61K49/16 C07K14/435 C07K14/475 C07K16/18 C07K16/30 C07K19/00 C07K2319/30 A61K39/3955 A61K45/06		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/08 C07K16/22 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P25/04 A61P29/00 A61P19/02 A61P29/00.101 A61K45/00 A61K31/573 A61K31/56 A61K48/00 A61K35/76 G01N33/53.D G01N33/577.B		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/BA53 4B024/CA02 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/EA04 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/AA19 4C084/NA14 4C084/ZA081 4C084/ZA082 4C084/ZA961 4C084/ZA962 4C084/ZB111 4C084/ZB112 4C084/ZB151 4C084/ZB152 4C084/ZC611 4C084/ZC612 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/DA08 4C086/DA10 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA08 4C086/ZA96 4C086/ZB11 4C086/ZB15 4C086/ZC61 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/NA14 4C087/ZA08 4C087/ZA96 4C087/ZB11 4C087/ZB15 4C087/ZC61 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA21 4H045/EA22 4H045/FA74 4H045/GA22 4H045/GA23 4H045/GA25 4H045/GA26		
代理人(译)	山崎 一夫		
优先权	61/483481 2011-05-06 US 2011014858 2011-08-29 GB 61/531439 2011-09-06 US		
其他公开文献	JP2014522236A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了一种制备适用于犬的抗体的方法。还提供了犬化抗体，其特异性结合犬神经生长因子 (NGF) 并中和犬NGF结合p75或TrkA犬NGF受体的能力。本发明涉及编码该核酸的核酸，以及涉及使用所述抗体和/或核酸治疗犬中疼痛和关节炎的方法。

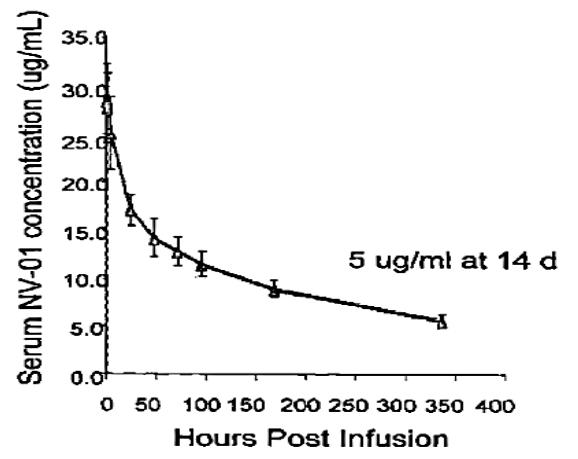


Figure 1B