

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6533512号
(P6533512)

(45) 発行日 令和1年6月19日(2019.6.19)

(24) 登録日 令和1年5月31日(2019.5.31)

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	C 1 2 N	15/13	Z N A
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K	16/18	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
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 2 1

請求項の数 13 (全 73 頁)

(21) 出願番号	特願2016-501499 (P2016-501499)	(73) 特許権者	597160510
(86) (22) 出願日	平成26年3月12日 (2014.3.12)		リジェネロン・ファーマシューティカルズ
(65) 公表番号	特表2016-512430 (P2016-512430A)		・インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成28年4月28日 (2016.4.28)		REGENERON PHARMACEU
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/024336		TICALS, INC.
(87) 国際公開番号	W02014/159595		アメリカ合衆国10591-6707ニュ
(87) 国際公開日	平成26年10月2日 (2014.10.2)		ーヨーク州タリータウン、オールド・ソー
審査請求日	平成29年2月27日 (2017.2.27)		・ミル・リバー・ロード777番
(31) 優先権主張番号	61/783,094	(74) 代理人	100127926
(32) 優先日	平成25年3月14日 (2013.3.14)		弁理士 結田 純次
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100140132
			弁理士 竹林 則幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Nav1.7に対するヒト抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトNav_v1.7のドメイン1の細胞外(EC3)ループ(EC3-1)と特異的に結合し、配列番号70のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(HCVR)の相補性決定領域(HCDR1-HCDR2-HCDR3)および配列番号72のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(LCVR)の相補性決定領域(LCDR1-LCDR2-LCDR3)を含む、単離ヒト抗体又はヒト抗体の抗原結合断片。

【請求項2】

配列番号70のアミノ酸配列を含むHCVRおよび配列番号72のアミノ酸配列を含むLCVRを含む、請求項1記載のヒト抗体又はその抗原結合断片。

【請求項3】

IgG4抗体である、請求項2記載のヒト抗体。

【請求項4】

IgG1抗体である、請求項2記載のヒト抗体。

【請求項5】

請求項1～4のいずれか1項記載の抗体又はその抗原結合断片をコードする、単離核酸分子。

【請求項6】

請求項5記載の核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項7】

10

20

疼痛の治療法において使用するための、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 8】

前記疼痛が、急性疼痛、慢性疼痛、神経因性疼痛、炎症性疼痛、関節炎、骨関節炎、偏頭痛、群発頭痛症候群、三叉神経痛、疱疹性神経痛、全身性神経痛、神経変性疾患、運動障害、神経内分泌障害、失調症、内臓痛、急性痛風、ヘルペス後神経痛、糖尿病性神経障害、座骨神経痛、背痛、頭部若しくは頸部の疼痛、激痛若しくは難治性疼痛、突発痛、手術後の痛み、遺伝性紅痛症、歯痛、鼻炎、がん疼痛、又は膀胱障害からなる群から選択される病状又は疾患に関連するものである、請求項 7 記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 9】

前記がん疼痛が、前立腺がん、乳がん、及び子宮頸がんからなる群から選択されるがんと関連する、請求項 8 記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 10】

前記抗体若しくはその抗原結合断片が、第 2 の治療薬と組み合わせて患者に投与され、任意で、該第 2 の治療薬が、オピオイド、COX-2 阻害剤、局所麻酔剤、NMDA モジュレータ、カンナビノイド受容体アゴニスト、P2X ファミリーモジュレータ、VR1 アンタゴニスト、サブスタンス P アンタゴニスト、第 2 の $Na_v1.7$ アンタゴニスト、サイトカイン若しくはサイトカイン受容体アンタゴニスト、抗てんかん薬、神経成長因子 (NGF) 阻害剤、低用量コルヒチン、アスピリン、NSAID、ステロイド、低用量サイクロスポリン A、腫瘍壊死因子 (TNF) 若しくは TNF 受容体阻害剤、尿酸合成阻害剤、尿酸排泄促進剤、カスパーゼ - 1、p38、IKK1/2、CTLA-4 Ig 及び副腎皮質ステロイドの阻害剤等の他の炎症阻害剤からなる群から選択され、任意で、該第 2 の $Na_v1.7$ アンタゴニストが、低分子量有機分子、 $Na_v1.7$ に特異的な第 2 抗体、ポリペプチドアンタゴニスト、siRNA、又は $Na_v1.7$ に特異的なアンチセンス分子であり、又は該サイトカイン若しくはサイトカイン受容体アンタゴニストが、インターロイキン - 1 (IL-1) アンタゴニスト、IL-6 アンタゴニスト若しくは IL-18 アンタゴニストである、請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の単離抗体又はその抗原結合断片と、薬学的に許容し得る担体とを含む医薬組成物。

【請求項 12】

$Na_v1.7$ - 関連病状若しくは疾患、又は $Na_v1.7$ - 関連病状若しくは疾患と関連する疼痛を治療するための第 2 の薬剤を更に含み、任意で、該第 2 の薬剤が、オピオイド、COX-2 阻害剤、局所麻酔剤、NMDA モジュレータ、カンナビノイド受容体アゴニスト、P2X ファミリーモジュレータ、VR1 アンタゴニスト、サブスタンス P アンタゴニスト、第 2 の $Na_v1.7$ アンタゴニスト、サイトカイン若しくはサイトカイン受容体アンタゴニスト、抗てんかん薬、神経成長因子 (NGF) 阻害剤、低用量コルヒチン、アスピリン、NSAID、ステロイド、低用量サイクロスポリン A、腫瘍壊死因子 (TNF) 若しくは TNF 受容体阻害剤、尿酸合成阻害剤、尿酸排泄促進剤、カスパーゼ - 1、p38、IKK1/2、CTLA-4 Ig 及び副腎皮質ステロイドの阻害剤等の他の炎症阻害剤からなる群から選択され、任意で、該第 2 の $Na_v1.7$ アンタゴニストが、低分子量有機分子、 $Na_v1.7$ に特異的な第 2 抗体、ポリペプチドアンタゴニスト、siRNA、又は $Na_v1.7$ に特異的なアンチセンス分子である、請求項 11 記載の医薬組成物。

【請求項 13】

疼痛の治療法において使用するための、請求項 11 又は 12 記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトナトリウムチャネル $Na_v1.7$ と特異的に結合するヒト抗体及びヒト

10

20

30

40

50

抗体の抗原結合断片、並びに上記抗体を使用する治療方法に関する。

【背景技術】

【0002】

$Na_v1.7$ は、種々の興奮細胞における電気発生及び神経インパルス誘導にとって重要な電位開口型ナトリウムチャネル ($VGS Cs$ 又は Na_v) のファミリーのメンバーである。 $VGS C$ は、大きい中心孔形成 - サブユニットと2個の小さい補助 - サブユニットからなるヘテロ二量体複合体である。孔形成 - サブユニットは機能発現には十分であるが、チャネル開閉の動態及び電圧依存性は - サブユニットにより修飾されている。

- サブユニットは、I ~ IV (A、B、C及びD、又は1、2、3及び4とも呼ばれる) の4個の繰り返しドメインを有しており、それぞれは、S1 ~ S2と標識される6個の膜貫通領域を含んでいる。10種のクローニングされた - サブユニットと4種の - サブユニットがある。これらの異なるナトリウムチャネルは、類似の構造的及び機能的特性を有しているが、それらは異なる細胞型において活動電位を惹起し、異なる制御特性及び薬理学的特性を有している。10種の異なる遺伝子は、ナトリウムチャネルタンパク質の10種のイソ型をコードし、それは全て共通の構造を有するが、異なるアミノ酸配列を有している。

10

【0003】

SCN9Aによりコードされる $Na_v1.7$ は、主に痛覚器官脊髄後根神経節ニューロン及び交感神経節ニューロンにおける電気信号に重要である。 $Na_v1.7$ は、インパルスが惹起される部位の近くの痛覚器官の末端で発現する(非特許文献1)。

20

【0004】

疼痛における $Na_v1.7$ の役割は、 $Na_v1.7$ を欠失するように遺伝子操作がなされたマウスにおいて決定された。より具体的には、痛覚器官の $Na_v1.7$ を欠失するノックアウトマウスが、炎症性疼痛を小さくすることが示された(非特許文献2)。更に、患者が軽度の温かさに対して激しい灼熱痛を感じる遺伝性ニューロパシーである肢端紅痛症は、過度のチャネル活性を起こす $Na_v1.7$ の変異の結果であると思われる(非特許文献3; 非特許文献4)。 $Na_v1.7$ の機能の欠失をもたらす、痛みの喪失をももたらすSCN9A変異は、パキスタンの3つの家系で同定された。観察された全ての変異は、SCN9A遺伝子におけるホモ接合変異を有する影響を受けたほとんどの患者でナンセンス変異であった。この観察は、痛みを経験できないことで、 $Na_v1.7$ 機能の欠失と関連している(非特許文献5)。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】 Toledo - Aralら(1997), PNAS 94: 1527 - 1532

【非特許文献2】 Nassarら(2004), PNAS 101: 12706 - 12711

【非特許文献3】 Drenthら(2001), Am. J. Hum. Genet. 68: 1277 - 1282

40

【非特許文献4】 Cumminsら, (2004), J. Neurosci 24: 8232 - 8236

【非特許文献5】 Coxら, (2006), Nature 444: 894 - 898

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

ナトリウムイオンの細胞外孔形成領域と結合し、または機能性カリウム、ナトリウムまたはカルシウムチャネルのイオン輸送を阻害する抗体は、米国特許出願公開第2005/0271656号、米国特許出願公開第2011/0135662号、米国特許出願公開第2012/0259096、欧州特許出願公開第2493926A1号、WO2007

50

／ 0 2 3 2 9 8 及び WO 2 0 1 1 / 0 5 1 3 5 0 に開示されている。ナトリウムチャンネル遮断薬を投与することにより局所麻酔を行う方法は、例えば、米国特許第 6 4 0 7 0 8 8 号、米国特許第 6 5 9 9 9 0 6 及び米国特許第 6 5 4 8 5 0 7 号に開示されている。Na_v1.7 イオンチャンネルの活性を修飾する薬剤の同定法は WO 2 0 0 7 / 1 0 9 3 2 4 に開示されている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

第1の態様においては、本発明は、ヒト Na_v1.7 と特異的に結合し、その活性を阻害又は遮断する、完全なヒトモノクローナル抗体 (mAbs) 及びその抗原結合断片を提供する。抗体又はその抗原結合断片は、細胞内での Na_v1.7 の存在と関連する疼痛を改善するのに有用である。

10

【0008】

本発明の抗体は完全長であってもよく (例えば、IgG1 又は IgG4) であってもよく、又は抗原結合部位 (Fab、F(ab')₂ 又は scFv 断片) のみを含んでいてもよく、機能性に影響を及ぼすように、例えば残りのエフェクター機能を除去するように (Reddy ら, 2000, J. Immunol. 164: 1925-1933) 修飾されていてもよい。

【0009】

一実施態様においては、ヒト Na_v1.7 と特異的に結合する、単離ヒト抗体又はヒト抗体の抗原結合断片は、ヒト Na_v1.7 の少なくとも1つの細胞外 (EC) ループ若しくはその断片、又はパドル領域若しくはその断片と結合する。

20

【0010】

一実施態様においては、抗体が結合する EC ループは、ドメイン1、2、3 又は4のいずれかにおける EC1、EC2 及び EC3 から選択することができる。

【0011】

他の実施態様においては、抗体が結合する EC ループは、そのドメインが配列番号: 670 のおおよそ 269 番目の残基から 338 番目のアミノ酸残基を含むドメイン1の細胞外ループ3 (EC3) であってもよい。

【0012】

他の実施態様においては、抗体が結合する EC ループは、そのドメインが配列番号: 670 のおおよそ 1333 番目の残基からおおよそ 1382 番目の残基のアミノ酸残基を含むドメイン3内の細胞外ループ3 (EC3) であってもよい。

30

【0013】

他の実施態様においては、抗体は、そのパドル領域が、配列番号: 670 のおおよそ 202 番目の残基からおおよそ 232 番目の残基のアミノ酸残基を含む、Na_v1.7 のパドル領域と結合する場合がある。

【0014】

特定の実施態様においては、抗体は、配列番号 838 ~ 852 の1以上と結合しない。

【0015】

一実施態様においては、本発明は、表1に示す重鎖可変 (V_H) アミノ酸配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列、又は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する、それらと実質的に同様の配列を有する重鎖可変領域 (HCVR) を含む、抗体又はその抗原結合断片を含む。一実施態様においては、本発明は、配列番号: 2、6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、50、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90、94、98、102、106、110、681、685、689、693、697、701、705、709、722、727、743、759、791、807、823、860、864、868 及び 872 からなる群から選択されるアミノ酸配列、又は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する、それらと実質的に同様の配列を有する HCVR を含む、抗体若しくはは

40

50

抗体の抗原結合断片を含む。一実施態様においては、抗体又は抗体の抗原結合断片は、18、22、46、50、66、70、82、86、90、94、102、689、693、705及び709からなる群から選択されるアミノ酸配列、又は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する、それらと実質的に同様の配列を有するHCVRを含む。一実施態様においては、抗体又は抗体の抗原結合断片は、配列番号：14、22、30、98、701、722、727、759、860、864、868及び872からなる群から選択されるアミノ酸配列、又は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する、それらと実質的に同様の配列を有するHCVRを含む。一実施態様においては、H4H439Pとして設計された抗体のVH鎖のアミノ酸配列（配列番号：70）の位置番号7は、セリン（S）、又はトリプトファン（W）である。一実施態様においては、ヒトNa_v1.7と結合するヒト抗体の抗体又は抗原結合断片は、配列番号：4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、84、88、92、96、100、104、108、112、683、687、691、695、699、703、707、711、724、735、751、767、799、815、831、862、866、870及び874からなる群から選択されるアミノ酸配列、又は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する、それらと実質的に同様の配列を有するLDVRを含む。一実施態様においては、抗体又は抗原結合断片は、配列番号：16、24、32、100、703、724、735、767、862、866、870及び874からなる群から選択されるアミノ酸配列、又は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する、それらと実質的に同様の配列を有するLDVRを含む。一実施態様においては、本発明は、表1に示す軽鎖可変領域（VL）のいずれかから選択されるアミノ酸配列、又は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する、それらと実質的に同様の配列を有するLCVRを含む抗体又は抗体の抗原結合断片を含む。

【0016】

一実施態様においては、本発明は、配列番号：4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、84、88、92、96、100、104、108、112、683、687、691、695、699、703、707、711、724、735、751、767、799、815、831、862、866、870及び874からなる群から選択されるアミノ酸配列、又は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する、それらと実質的に同様の配列を有するLCVRを含む抗体又は抗体の抗原結合断片を含む。

【0017】

一実施態様においては、抗体又は抗体の抗原結合断片は、20、24、48、52、68、72、84、88、92、96、104、691、695及び707からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するLCVRを含む。一実施態様においては、抗体又は抗体の抗原結合断片は、配列番号：16、24、32、100、703、724、735、767、862、866、870及び874からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するLCVRを含む。

【0018】

特定の実施態様においては、抗体又は抗体の抗原結合断片は、配列番号：2/4、6/8、10/12、14/16、18/20、22/24、26/28、30/32、34/36、38/40、42/44、46/48、50/52、54/56、58/60、62/64、66/68、70/72、74/76、78/80、82/84、86/88、90/92、94/96、98/100、102/104、106/108、110/112、681/683、685/687、689/691、693/695、697

10

20

30

40

50

/ 699、701 / 703、705 / 707、709 / 711、722 / 724、727 / 735、743 / 751、759 / 767、791 / 799、807 / 815、823 / 831、860 / 862、864 / 866、868 / 870及び872 / 874からなる群から選択されるHCVR / LCVRアミノ酸配列対を含む。

【0019】

一実施態様においては、HCVR / LCVRアミノ酸配列対は、配列番号：18 / 20、22 / 24、46 / 48、50 / 52、66 / 68、70 / 72、82 / 84、86 / 88、90 / 92、94 / 96、102 / 104、689 / 691、693 / 695及び705 / 707からなる群から選択される。

【0020】

一実施態様においては、HCVR / LCVRアミノ酸配列対は、配列番号：14 / 16、22 / 24、30 / 32、98 / 100、701 / 703、722 / 724、727 / 735、759 / 767、860 / 862、864 / 866、868 / 870及び872 / 874からなる群から選択される。

【0021】

第2の態様においては、本発明は、配列番号：2、6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、50、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90、94、98、102、106、110、681、685、689、693、697、701、705、709、722、727、743、759、791、807、823、860、864、868及び872からなる群から選択されるHCVR内に含まれる3つの重鎖CDR (HCDR1、HCDR2及びHCDR3)を含むHCVRと、配列番号：4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、84、88、92、96、100、104、108、112、683、687、691、695、699、703、707、711、724、735、751、767、799、815、831、862、866、870及び874からなる群から選択されるLCVR配列内に含まれる3つの軽鎖CDR (LCDR1、LCDR2及びLCDR3)を含むLCVRとを含む、ヒトNa_v1.7と特異的に結合する単離ヒト抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0022】

第3の態様においては、本発明は、表2に示すもののいずれかから選択されるアミノ酸配列、又は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する、それらと実質的に同様の配列を有するHCDR3ドメインと；表2に示すもののいずれかから選択されるアミノ酸配列、又は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する、それらと実質的に同様の配列を有するLCDR3ドメインとを含む、抗体又は抗体の抗原結合断片をも提供する。

【0023】

本発明の第4の態様は、表2に示すもののいずれかのアミノ酸配列、又は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する、それらと実質的に同様の配列を有するHCDR1ドメインと、表2に示すもののいずれかのアミノ酸配列、又は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する、それらと実質的に同様の配列を有するHCDR2ドメインと、表2に示すもののいずれかのアミノ酸配列、又は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する、それらと実質的に同様の配列を有するLCDR1ドメインと、表2に示すもののいずれかのアミノ酸配列、又は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する、それらと実質的に同様の配列を有するLCDR2ドメインとを更に含む、抗体又はその断片を提供する。

【0024】

一実施態様においては、抗体又は抗体の抗原結合部分は、(a)配列番号：18の残基

10

20

30

40

50

97～112；配列番号：14、22、727、又は759の残基97～107；配列番号：46又は50の残基97～108；配列番号：66、70、701又は864の残基96～110；配列番号82又は86の残基97～117；配列番号90又は94の残基97～116；配列番号102又は705の残基98～110；配列番号：689又は693の残基97～111；配列番号：30、722、868又は872の残基97～106；配列番号：98又は860の残基96～108からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するHCDR3ドメインと、

(b) 配列番号：20、68、72、84、88、92、96、104、703、707、724、866又は874の残基89～97；配列番号：32、48、52、691、695又は870の残基95～103；及び配列番号：16、24、735又は767の残基94～102からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するLCDR3ドメインとを含む。

10

【0025】

一実施態様においては、抗体又は抗体の抗原結合部分は、(c) 配列番号：14、18、22、30、46、50、66、70、82、86、90、94、98、689、693、701、722、727、759、860、864、868又は872の残基26～33；及び配列番号：102又は705の残基26～35からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するHCDR1ドメインと；

(d) 配列番号：14、18、22、30、46、50、82、86、90、94、689、693、722、727、759、868又は872の残基51～58 配列番号：66、70、98、701、860又は864の残基51～57；及び配列番号：102又は705の残基53～59からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するHCDR2ドメインと；

20

(e) 配列番号：20、68、72、84、88、92、96、104、703、707、724、866又は874の残基27～32；配列番号：16、24、735、又は767の残基27～37；及び配列番号：32、48、52、100、691、695、862又は870の残基27～38からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するLCDR1ドメインと；と

(f) 配列番号：20、68、72、84、88、92、96、104、703、707、724、866又は874の残基50～52；配列番号：16、24、735又は767の残基55～57；及び配列番号：32、48、52、100、691、695、862又は870の残基56～58からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するLCDR2とを更に含む。

30

【0026】

特定の実施態様においては、ヒトNa_v1.7と特異的に結合する抗体又は抗体の抗原結合部分は、表2に示すHCDR3/LCDR3アミノ酸配列から選択されるHCDR3/LCDR3アミノ酸配列対を含む。特定の実施態様によれば、抗体又は抗体の抗原結合部分は、配列番号：18の残基97～112/配列番号：20の残基89～97；配列番号：22の残基97～107/配列番号：24の残基94～102；配列番号：46又は50の残基97～108/48又は52の残基95～103；配列番号：66又は70の残基96～110/配列番号：68又は72の残基89～97；配列番号：82又は86の残基97～117/配列番号：84又は88の残基89～97；配列番号：90又は94の残基97～116/配列番号：92又は96の残基89～97；配列番号：102又は705の残基98～110/配列番号：104又は707の残基89～97；配列番号：689又は693の残基97～111/配列番号：691又は695の残基95～103，配列番号：14の残基97～107/配列番号：16の残基94～102；配列番号：22の残基97～107/配列番号：24の残基94～102；配列番号：727の残基97～107/配列番号：735の残基94～102；配列番号：759の残基97～107/配列番号：767の残基94～102；配列番号：30の残基97～106/配列番号：32の残基95～103；配列番号：868の残基97～106/配列番号：8

40

50

70の残基95～103；配列番号：701の残基96～110／配列番号：703の残基89～97；配列番号：864の残基96～110／配列番号：866の残基89～97；配列番号：98の残基96～108／配列番号：100の残基95～99；配列番号：860の残基96～108／配列番号：862の残基95～99；配列番号：722の残基97～106／配列番号：724の残基89～97；配列番号：872の残基97～106／配列番号：874の残基89～97からなる群から選択されるHCDR3/LCDR3アミノ酸配列対を含む。

【0027】

一実施態様においては、抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ、配列番号：18の残基26～33、51～58及び97～112のHCDR1、HCDR2及びHCDR3配列と、それぞれ、配列番号：20の残基27～32、50～52及び89～97のLCDR1、LCDR2及びLCDR3配列とを含む。

10

【0028】

一実施態様においては、抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ、配列番号：22の残基26～33、51～58及び97～107のHCDR1、HCDR2及びHCDR3配列と、それぞれ、配列番号：24の残基27～37、55～57及び94～102のLCDR1、LCDR2及びLCDR3配列とを含む。

【0029】

一実施態様においては、抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ、配列番号：46の残基26～33、51～58及び97～108のHCDR1、HCDR2及びHCDR3配列と、それぞれ、配列番号：48の残基27～38、56～58及び95～103のLCDR1、LCDR2及びLCDR3配列とを含む。

20

【0030】

一実施態様においては、抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ、配列番号：66の残基26～33、51～57及び96～110のHCDR1、HCDR2及びHCDR3配列と、それぞれ、配列番号：68の残基27～32、50～52及び89～97のLCDR1、LCDR2及びLCDR3配列とを含む。

【0031】

一実施態様においては、抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ、配列番号：82の残基26～33、51～58及び97～117のHCDR1、HCDR2及びHCDR3配列と、それぞれ、配列番号：84の残基27～32、50～52及び89～97のLCDR1、LCDR2及びLCDR3配列とを含む。

30

【0032】

一実施態様においては、抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ、配列番号：90の残基26～33、51～58及び97～116のHCDR1、HCDR2及びHCDR3配列と、それぞれ、配列番号：92の残基27～32、50～52及び89～97のLCDR1、LCDR2及びLCDR3配列とを含む。

【0033】

一実施態様においては、抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ、配列番号：102の残基26～35、53～59及び98～110のHCDR1、HCDR2及びHCDR3配列と、それぞれ、配列番号：104の残基27～32、50～52及び89～97のLCDR1、LCDR2及びLCDR3配列とを含む。

40

【0034】

一実施態様においては、抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ、配列番号：689の残基26～33、51～58及び97～111のHCDR1、HCDR2及びHCDR3配列と、それぞれ、配列番号：691の残基27～38、56～58及び95～103のLCDR1、LCDR2及びLCDR3配列とを含む。

【0035】

一実施態様においては、抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ、配列番号：14の残基26～33、51～58及び97～107のHCDR1、HCDR2及びHCDR3配

50

列と、それぞれ、配列番号：16の残基27～37、55～57及び94～102のLCDR1、LCDR2及びLCDR3配列とを含む。

【0036】

一実施態様においては、抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ、配列番号：22の残基26～33、51～58及び97～107のHCDR1、HCDR2及びHCDR3配列と、それぞれ、配列番号：24の残基27～37、55～57及び94～102のLCDR1、LCDR2及びLCDR3配列とを含む。

【0037】

一実施態様においては、抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ、配列番号：727の残基26～33、51～58及び97～107のHCDR1、HCDR2及びHCDR3配列と、それぞれ、配列番号：735の残基27～37、55～57及び94～102のLCDR1、LCDR2及びLCDR3配列とを含む。

10

【0038】

一実施態様においては、抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ、配列番号：759の残基26～33、51～58及び97～107のHCDR1、HCDR2及びHCDR3配列と、それぞれ、配列番号：767の残基27～37、55～57及び94～102のLCDR1、LCDR2及びLCDR3配列とを含む。

【0039】

一実施態様においては、抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ、配列番号：30又は868の残基26～33、51～58及び97～106のHCDR1、HCDR2及びHCDR3配列と、それぞれ、配列番号：32又は870の残基27～38、56～58及び95～103のLCDR1、LCDR2及びLCDR3とを含む。

20

【0040】

一実施態様においては、抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ、配列番号：701又は864の残基26～33、51～57及び96～110のHCDR1、HCDR2及びHCDR3配列と、それぞれ、配列番号：703又は866の残基27～32、50～52及び89～97のLCDR1、LCDR2及びLCDR3とを含む。

【0041】

一実施態様においては、抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ、配列番号：98又は860の残基26～33、51～57及び96～108のHCDR1、HCDR2及びHCDR3配列と、それぞれ、配列番号：100又は862の残基27～38、56～58及び95～99のLCDR1、LCDR2及びLCDR3とを含む。

30

【0042】

一実施態様においては、抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ、配列番号：722又は872の残基26～33、51～58及び97～106のHCDR1、HCDR2及びHCDR3配列と、それぞれ、配列番号：724又は874の残基27～32、50～52及び89～97のLCDR1、LCDR2及びLCDR3とを含む。

【0043】

本発明の特定の非限定的な典型的な抗体及び抗原結合断片は、それぞれ表1又は2に示すアミノ酸配列のいずれかから選択される、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及びLCDR3ドメインを含む。

40

【0044】

一実施態様においては、抗体又は抗原結合断片は、ヒト、サル、マウス及びラットのNa_v1.7と結合する。

【0045】

一実施態様においては、抗体又は抗原結合断片は、ヒト、サル及びマウスのNa_v1.7と結合するが、ラットのNa_v1.7とは結合しない。

【0046】

一実施態様においては、抗体又は抗原結合断片は、ヒト、サル及びラットのNa_v1.7と結合するが、マウスのNa_v1.7とは結合しない。

50

【 0 0 4 7 】

一実施態様においては、抗体又は抗原結合断片は、ヒト及びサル $N a_v 1 . 7$ と結合するが、ラット又はマウスの $N a_v 1 . 7$ とは結合しない。

【 0 0 4 8 】

一実施態様においては、抗体又は抗原結合断片はヒトの $N a_v 1 . 7$ と結合するが、サル、マウス又はラットの $N a_v 1 . 7$ とは結合しない。

【 0 0 4 9 】

一実施態様においては、本発明は、ヒト $N a_v 1 . 7$ ($h N a_v 1 . 7$)と特異的に結合し、 $h N a_v 1 . 7$ 活性を中和する完全なモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を提供する。抗体又はその断片が、以下の特徴の1以上を示す。(i)配列番号：14、18、22、30、46、50、66、70、82、86、90、94、98、102、689、693、701、705、722、727、759、860、864、868及び872からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するHCVRを含み；(ii)配列番号：16、20、24、32、48、52、68、72、84、88、92、96、100、104、691、695、703、707、724、735、767、862、866、870及び874からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するLCVRを含み；(iii)表2に示す、重鎖又は軽鎖CDR1、CDR2、及びCDR3配列及びそれらの組み合わせのいずれか1以上を含み；(iv)他のナトリウムチャネル活性、例えば $N a_v 1 . 5$ に影響を及ぼさずに $N a_v 1 . 7$ 活性の阻害に特異的であり；(v) $h N a_v 1 . 7$ の以下の領域、すなわち配列番号：670のおよそ269～338番目の残基のアミノ酸残基を含む、ドメイン1の細胞外ループ3 (EC3-1と命名)若しくはその断片；配列番号：670のおよそ1333～1382番目の残基のアミノ酸残基を含む、ドメイン3の細胞外ループ3 (EC3-3と命名)若しくはその断片；又は配列番号；670のおよそ202～232番目の残基のアミノ酸残基を含む、 $N a_v 1 . 7$ のパドル領域若しくはその断片のいずれかの1以上に対し特異的結合を示し；(iv)ヒト、サル、マウス又はラットの $N a_v 1 . 7$ のいずれか1種以上と結合し、又は(vii)当業者に公知の任意の標準法、例えば、パッチクランプ法により示されるように、 $N a_v 1 . 7$ 含有細胞においてイオン束を阻害し、それにより膜貫通型脱分極を阻害する。

【 0 0 5 0 】

一実施態様においては、本発明は、以下の特徴の1以上を示す、ヒト $N a_v 1 . 7$ ($h N a_v 1 . 7$)と特異的に結合し、 $h N a_v 1 . 7$ 活性を中和する完全なモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を提供する：(i)抗体又はその断片が、以下の特徴の1以上を示す。(i)配列番号：14、18、22、30、46、50、66、70、82、86、90、94、98、102、689、693、701、705、722、727、759、860、864、868からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するHCVRを含み；(ii)配列番号：16、20、24、32、48、52、68、72、84、88、92、96、100、104、691、695、703、707、724、735、767、862、866、870及び874からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するLCVRを含み；(iii)表2に示す、重鎖又は軽鎖CDR1、CDR2、及びCDR3配列及びそれらの組み合わせのいずれか1以上を含み；(iv)他の特定のナトリウムチャネル活性、例えば1.8及び/又は $N a_v 1 . 9$ に加え、 $N a_v 1 . 7$ 活性を阻害し得；(v) $h N a_v 1 . 7$ の以下の領域、すなわち配列番号：670のおよそ269～338番目の残基のアミノ酸残基を含む、ドメイン1の細胞外ループ3 (EC3-1と命名)若しくはその断片；配列番号：670のおよそ1333～1382番目の残基のアミノ酸残基を含む、ドメイン3の細胞外ループ3 (EC3-3と命名)若しくはその断片；又は配列番号；670のおよそ202～232番目の残基のアミノ酸残基を含む、 $N a_v 1 . 7$ のパドル領域若しくはその断片のいずれかの1以上に対し特異的結合を示し；(iv)ヒト、サル、マウス又はラットの $N a_v 1 . 7$ のいずれか1種以上と結合し、又は(vii)当業者に公知の任意の標準法、例えば、パッチクランプ法により示されるように、 $N a_v 1 . 7$ 含有細胞においてイオン束を阻害し、それにより膜貫通型脱分極を阻害

10

20

30

40

50

する。

【0051】

一実施態様においては、本発明は、配列番号：2 / 4、6 / 8、10 / 12、14 / 16、18 / 20、22 / 24、26 / 28、30 / 32、34 / 36、38 / 40、42 / 44、46 / 48、50 / 52、54 / 56、58 / 60、62 / 64、66 / 68、70 / 72、74 / 76、78 / 80、82 / 84、86 / 88、90 / 92、94 / 96、98 / 100、102 / 104、106 / 108、110 / 112、681 / 683、685 / 687、689 / 691、693 / 695、697 / 699、701 / 703、705 / 707、709 / 711、722 / 724、727 / 735、743 / 751、759 / 767、791 / 799、807 / 815、823 / 831、860 / 862、864 / 866、868 / 870及び872 / 874からなる群から選択される重鎖及び軽鎖配列対内に含まれる重鎖及び軽鎖CDRドメインを含む、抗体又は抗原結合断片とのhNa_v1.7の特異的結合と競合する単離抗体又はその抗原結合断片を提供する。

10

【0052】

一実施態様においては、本発明は、配列番号：2 / 4、6 / 8、10 / 12、14 / 16、18 / 20、22 / 24、26 / 28、30 / 32、34 / 36、38 / 40、42 / 44、46 / 48、50 / 52、54 / 56、58 / 60、62 / 64、66 / 68、70 / 72、74 / 76、78 / 80、82 / 84、86 / 88、90 / 92、94 / 96、98 / 100、102 / 104、106 / 108、110 / 112、681 / 683、685 / 687、689 / 691、693 / 695、697 / 699、701 / 703、705 / 707、709 / 711、722 / 724、727 / 735、743 / 751、759 / 767、791 / 799、807 / 815、823 / 831、860 / 862、864 / 866、868 / 870及び872 / 874からなる群から選択される重鎖及び軽鎖配列対を含む抗体により認識されるhNa_v1.7上の同一エピトープと結合する、単離抗体又はその抗原結合断片を提供する。

20

【0053】

第5の態様においては、本発明は、抗-Na_v1.7抗体又はその断片をコードする核酸を提供する。本発明の核酸を保有する組換え発現ベクター、及びそのようなベクターを導入した宿主細胞、また、抗体の産生及び産生された抗体を回収することを可能にする条件下に宿主細胞を培養することにより、抗体を産生する方法も本発明に包含される。

30

【0054】

一実施態様においては、本発明は、配列番号：1、5、9、13、17、21、25、29、33、37、41、45、49、53、57、61、65、69、73、77、81、85、89、93、97、101、105、109、680、684、688、692、696、700、704、708、721、726、742、758、790、806、822、859、863、867及び871からなる群から選択される核酸配列、又は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の相同性を有するそれらと実質的に同様の配列によりコードされるHCVRを含む、抗体又はその断片を提供する。一実施態様においては、HCVRは、配列番号：13、17、21、29、45、49、65、69、81、85、89、93、97、101、688、692、700、704、721、726、758、859、863、867及び871からなる群から選択される核酸配列によってコードされる。

40

【0055】

一実施態様においては、抗体又はその断片は、配列番号：3、7、11、15、19、23、27、31、35、39、43、47、51、55、59、63、67、71、75、79、83、87、91、95、99、103、107、111、682、686、690、694、698、702、706、710、723、734、750、766、782、798、814、830、861、865、869及び873からなる群から選択される核酸配列、又はこれらと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の相同性を有する実質的に同一の配列によりコードされる

50

LCVRを更に含む。一実施態様においては、LCVRは、配列番号：15、19、23、31、47、51、67、71、83、87、91、95、99、103、690、694、702、706、723、734、766、861、865、869及び873からなる群から選択される核酸によってコードされる。

【0056】

一実施態様においては、本発明は、表1に示すいずれかの抗体由来の可変領域内に位置する核酸配列、又はそれらと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する実質的に同一の配列によりコードされるHCDR3ドメインと；表1に示すいずれかの配列、又はそれらと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する実質的に同一の配列によりコードされるLCDR3ドメインとを含む抗体又は抗体の抗原結合断片をも提供する。

10

【0057】

一実施態様においては、本発明は、表1に示すものの核酸配列、又はそれらと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する実質的に同一の配列によりコードされるHCDR1ドメイン；表1に示すものの核酸配列、又はそれらと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する実質的に同一の配列によりコードされるHCDR2ドメイン；表1に示すものの核酸配列、又はそれらと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する実質的に同一の配列によりコードされるLCDR1ドメイン；並びに表1に示すものの核酸配列、又はそれらと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有する実質的に同一の配列によりコードされるLCDR2ドメイン；を更に含む抗体又はその断片を提供する。

20

【0058】

第6の態様においては、本発明は、 V_H 、 D_H 及び J_H 生殖系配列に由来する核酸配列断片によりコードされるLCVRと、 V_K 及び J_K 生殖系配列に由来する核酸配列断片によりコードされるLCVRとを、表3に示すように組み合わせる含む、ヒト抗-hNa_v1.7抗体又は抗体の抗原結合断片を特徴とする。

【0059】

本発明は、修飾されたグリコシル化パターンを有する抗-hNa_v1.7抗体を包含する。ある応用においては、所望でないグリコシル化部位を除去するための修飾、例えば、抗体依存性細胞障害(ADCC)機能を増強するためのフコース部分の除去が有用である場合がある(Shieldら(2002) JBC 277:26733を参照のこと)。他の応用においては、補体依存性細胞障害(CDC)を修飾するために、ガラクトシル化の修飾を実施することができる。

30

【0060】

第7の態様においては、本発明は、hNa_v1.7と特異的に結合する組換え型ヒト抗体又はその断片と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を特徴とする。一実施態様においては、本発明は、本発明の抗体又は抗体の抗原結合断片と、第2の治療薬との組み合わせである組成物を特徴とする。第2の治療薬は、本発明の抗体又はその断片と遊離に併用される任意の薬剤、例えば、疼痛を減少し得る薬剤、例えば、限定されないが、オピオイド、COX-2阻害剤、局所麻酔剤、NMDAモジュレータ、カンナビノイド受容体アゴニスト、P2Xファミリーモジュレータ、VR1アンタゴニスト、及びサブスタンスPアンタゴニストであってもよい。第2の治療薬は、インターロイキン(IL-1)阻害剤、例えば、融合タンパク質(米国特許第6,927,044号)；ガバペンチン、プレガバリン、トピラマート等の抗てんかん薬；アミトリプチリン等の三環系抗うつ薬；セレコキシブ；IL-6、IL-6R、IL-18又はIL-18Rに対するアンタゴニスト等のサイトカイン阻害剤又はアンタゴニスト、Na_v1.8阻害剤、Na_v1.9阻害剤、又はNGF阻害剤、又はNa_v1.7に対する第2の阻害剤若しくはアンタゴニストで

40

50

あってもよい。第2の治療薬は、 $Na_v1.7$ に特異的な第2の抗体、 $Na_v1.7$ に対するポリペプチド性アンタゴニスト、*siRNA*、若しくはアンチセンス分子であってもよい。第2の治療薬は、低分子量薬剤、又はタンパク質/ポリペプチド性阻害剤であってもよい。第2の治療薬は、合成又は天然由来であってもよい。本発明の抗体及び薬学的に許容される組成物は、併用療法において使用することができ、すなわち、抗体及び薬学的に許容される組成物は、1種以上の他の所望の治療薬若しくは内科的治療と同時に、前に、若しくは後に投与することができる。併用療法において使用される治療法（治療又は手術）の特定の組み合わせは、所望の治療及び/又は手術の適合性、達成すべき所望の治療効果を考慮する。また、用いる治療は、同じ障害（例えば、抗体を、同じ障害を治療するために使用される他の薬剤と同時に投与することができる）に対して所望の効果を達成することができ、またはそれらが異なる効果（例えば、任意の副作用の制御）を達成し得ることが理解されるであろう。本明細書で用いられる場合、特定の疾患又は病状を治療又は予防するために通常に投与される追加の治療薬は、治療される疾患又は病状に適したものである。

10

【0061】

第8の態様においては、本発明は、本発明の抗- $hNa_v1.7$ 抗体又は抗体の抗原結合部分を使用する、 $hNa_v1.7$ 活性の阻害法を特徴とし、この治療法は、治療的有効量の抗体又はその抗原結合断片を投与することを含む。

【0062】

一実施態様においては、本発明は、 $Na_v1.7$ 関連病状若しくは疾患、又は $Na_v1.7$ 関連病状若しくは疾患と関連する疼痛を治療するための治療法を提供する。該方法は、 $Na_v1.7$ 関連病状又は疾患が解消し、前記病状又は疾患に関連する疼痛が軽減又は減少するように、本明細書に記載された $Na_v1.7$ 抗体又は抗原結合断片を、治療を必要とする患者に投与することを含む。

20

【0063】

関連実施態様においては、本発明は、治療を必要とする患者において、 $Na_v1.7$ 関連病状若しくは疾患、又は $Na_v1.7$ 関連病状若しくは疾患に関連する疼痛、又は $Na_v1.7$ 関連病状若しくは疾患と関連する少なくとも1種の症状若しくは合併症が、重傷度及び/又は期間において予防、改善又は抑制される、 $Na_v1.7$ 関連病状若しくは疾患、又は $Na_v1.7$ 関連病状若しくは疾患に関連する疼痛、又は $Na_v1.7$ 関連病状若しくは疾患と関連する少なくとも1種の症状若しくは合併症の治療に使用するための、本発明の1種以上の任意の抗- $Na_v1.7$ 抗体又はその抗原結合断片を含む医薬組成物を提供する。

30

【0064】

一実施多様においては、本発明は、治療を必要とする患者における、 $Na_v1.7$ 関連病状若しくは疾患、又は $Na_v1.7$ 関連病状若しくは疾患に関連する疼痛、又は $Na_v1.7$ 関連病状若しくは疾患と関連する少なくとも1種の症状若しくは合併症の治療用医薬の製造における、本発明の1種以上の任意の抗- $Na_v1.7$ 抗体又はその抗原結合断片を含む医薬組成物の使用であって、 $Na_v1.7$ -関連病状若しくは疾患、又は $Na_v1.7$ -関連病状若しくは疾患と関連する疼痛、又は $Na_v1.7$ -関連病状若しくは疾患と関連する少なくとも1種の症状又は合併症が、重症度及び/又は期間において予防、改善又は抑制される、医薬組成物の使用を提供する。

40

【0065】

治療される障害は、 $hNa_v1.7$ 活性を、排除、阻害又は減少することによって、改善、軽減、阻害又は予防されるあらゆる障害又は病状である。本発明の治療法によって治療可能な具体的な集団としては、急性、慢性、神経障害性、若しくは炎症性疼痛、関節炎、偏頭痛、群発性頭痛、三叉神経痛、疱疹性神経痛、全身性神経痛、てんかん若しくはてんかん様症状、筋緊張症、不整脈、運動障害、神経内分泌障害、失調症、過敏性大腸症候群、炎症性腸疾患、糞便切迫感、失禁、直腸過敏症、内臓痛、骨関節痛、ヘルペス後神経痛、糖尿病性神経障害、神経根痛、座骨痛、背痛、頭部又は頸部の疼痛、激痛、手術後疼

50

痛、又はがん疼痛が挙げられる。本発明の治療法により治療可能な他の病状としては、遺伝性紅痛症、鼻炎、前立腺がん、乳がん、子宮頸がん又は膀胱障害が挙げられる。本発明の抗体又はその抗原結合断片は、以下の病状：非悪性の急性、慢性、若しくは骨折による骨痛；リウマチ性関節炎、脊椎管狭窄症、神経障害性腰痛；筋膜性疼痛症候群；繊維筋痛症；側頭骨顎関節痛；脾臓；慢性頭痛；群発性頭痛等の緊張型頭痛；糖尿病性神経障害；HIV-関連ニューロパシー；シャルコー・マリー・トゥースニューロパシー；遺伝性感覚性ニューロパシー；末梢神経損傷；有痛性神経腫；異所性近位及び遠位排泄；神経根症；化学療法誘発性神経因性痛；放射線療法誘発性神経因性痛；乳房切除後の痛み；中枢性疼痛；脊髄損傷疼痛；脳卒中後疼痛；視床痛；複合性局所疼痛症候群；幻肢痛；難治性疼痛；急性筋骨格痛；関節痛；急性痛風による痛み；機械的な腰痛；頸部痛；腱炎；負傷/運動痛；腹痛；腎盂腎炎；盲腸炎；胆嚢炎；腸閉塞；ヘルニア等；心臓痛を含む胸部痛；骨盤痛、腎臓疝痛、陣痛を含む出産時の痛み；帝王切開の痛み；火傷及び外傷痛；子宮内膜症；帯状疱疹痛；鎌状赤血球貧血；急性脾炎；激痛；副鼻腔炎痛、歯痛を含む口腔顔面痛；多発性硬化症痛；ハンセン病痛；ベーチェット病痛；有痛脂肪症；静脈炎痛；ギランバレー症候群痛；痛む脚と動く足趾症候群；Haglund症候群；ファブリー病痛；膀胱及び泌尿生殖器疾患；活発性膀胱；有痛性膀胱症候群；間質性膀胱炎；又は前立腺炎を治療するために使用することもできる。本発明の抗体又はその抗原結合断片は、前立腺癌、乳癌及び頸部癌等の腫瘍細胞の腫瘍細胞増殖又は転移を阻害するためにも使用することができる。

10

【0066】

20

他の実施態様は、以下の詳細な説明の検討から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0067】

【図1】図1は、Navチャンネルの図を示す。

【図2】図2は、対照の抗体REGN646、REGN1063(H4H439P)、又はREGN1064(H4H468P)で処理した前後の機械的刺激に対する足圧しきい値(プールされた左及び右の後ろ足の値)を示す。

【図3】図3は、REGN646(対照)、REGN1063(H4H439P)、又はREGN1064(H4H468P)で処理下前後の有害な熱刺激に対する足撤退の潜伏時間(プールされた左及び右の後ろ足の値)を示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0068】

本発明の方法記載に入る前に、本発明は、記載される特定の方法及び実験条件に限定されるものではなく、かかる方法及び条件も異なる場合があることは理解されるべきである。また、本明細書で使用する用語は、あくまでも個々の実施形態を説明するためのであり、限定を意図したものではなく、その理由は、本発明の範囲は添付のクレームによるのみ限定されるからである。

【0069】

特に定義しない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、一般的に、本発明が属する技術分野の当業者によって理解されるのと同じ意味を有する。任意の方法および本明細書に記載のものと類似または同等の材料が本発明の実施または試験において使用され得るが、好ましい方法および材料は以下に記載されている。本明細書で言及される全ての刊行物は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0070】

定義

本明細書で用いられる場合、「Nav1.7」又は「Nav1.7」は、ETHA、FEB3B、NE-NA、hNE-Na、Nav1.7、PN1、NaS、ナトリウムチャンネルタンパク質9型サブユニットアルファ、ナトリウムチャンネルIX型サブユニットアルファ、及び電位開口型ナトリウムチャンネルサブユニットアルファNav1.7等の名称により当該技術分野で公知の電位開口型ナトリウムチャンネル(VGSC)のイソ型を意

50

味する。Na_v1.7 ナトリウムチャネルをコードする遺伝子は、SCN9A と命名されている。本明細書で用いられる場合、「Na_v1.7」、「Nav1.7」、「hNav1.7」、又は「hNav1.7」又はその断片という表現は、例えば、ヒト以外の種由来のもの、例えば、「マウスNav1.7」、「ラットNav1.7」、又は「サルNav1.7」であると特に指定しない限り、ヒトNav1.7 タンパク質又はその断片を意味する。更に、本明細書で用いられる場合、「Na_v1.7」又は「Nav1.7」は、配列番号：669 (Genbank 受託番号 DQ857292; NM_002977.3; X82835) で示される核酸配列、及び配列番号：670 (Genbank 受託番号 ABI51981; NP_002968; CAA58042) のアミノ酸配列、又はそれらの生物学的活性断片を有するヒトNa_v1.7 を意味する。Na_v1.7 の - サブユニットは、I ~ IV (A、B、C 及び D、又は 1、2、3 及び 4 と呼ばれる) の 4 個の繰り返しドメインを有しており、それぞれは、S1 ~ S2 と標識される 6 個の膜貫通領域を含んでいる。ドメイン I は配列番号：670 の残基 1 ~ 728 にわたり、ドメイン II は配列番号：670 の残基 729 ~ 1176 にわたり、ドメイン III は配列番号：670 の残基 1177 ~ 1494 にわたり、ドメイン IV は配列番号：670 の残基 1495 ~ 1977 にわたる。本明細書で用いられる場合、Na_v1.7 と結合し、その機能を阻害する Na_v1.7 特異的抗体を調製するのに有用である Na_v1.7 の細胞外領域は、「細胞外 (EC) ループ 3 - 1」(ループ 3、ドメイン 1、「EC3 - 1」と命名された。配列番号：670 の残基番号 269 ~ 338); 「EC ループ番号 3 - 2」(ループ 3、ドメイン 2、「EC3 - 2」と命名された。配列番号：670 の残基番号 874 ~ 932); 「EC ループ 3 - 3」(ループ 3、ドメイン 3、「EC3 - 3」と命名された、配列番号：670 の残基番号 1333 ~ 1382); 又は「EC ループ番号 3 - 4」(ループ 3、ドメイン 4、「EC3 - 4」と命名された。配列番号：670 の残基番号 1659 ~ 1723) を意味する。本明細書で用いられる場合、「パドル領域 2 - 1」は、配列番号：670 の残基番号 202 ~ 232 に延び、本発明において、Na_v1.7 の機能を阻害するのに有用な抗体の調製にも使用することができる。以下の Genbank 受託番号：NM_002977 (ヒト)、U35238 (ウサギ)、X82835 (ヒト)、U79568 (ラット) 及び AF000368 (ラット) を有する Na_v1.7 遺伝子に関連する他の種々の配列がある。更に、各細胞外領域及び / 又はドメインについての正確なアミノ酸配列は、使用されるデータベースエントリーによって変化する場合があり、例えば、UniProtKB/Swiss-Prot は、本明細書に開示される配列と非常にわずかに異なる Na_v1.7 の情報を提供する。これらの核酸配列、それによってコードされるポリペプチド、並びに他の核酸及びポリペプチド配列は、本明細書に含まれる個々の配列と同様、全体として参照により本明細書に組み入れられる。

【0071】

本明細書で用いられる場合「抗体」という用語は、2つの重 (H) 鎖及び2つの軽 (L) 鎖がジスルフィド結合により相互接続した4つのポリペプチド鎖、並びにそれらの多量体 (例えば、IgM) 又はその抗原結合断片を意味することが意図される。各重鎖は、重鎖可変領域 (「HCVR」又は「V_H」) と重鎖定常領域 (ドメイン C_H1、C_H2 及び C_H3 からなる) とから構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域 (「LCVR」又は「V_L」) と軽鎖定常領域 (C_L) とから構成される。V_H 及び V_L 領域は、フレームワーク (FR) 領域と命名された、更に保存された領域が分散している相補性決定領域 (CDR) と命名された超可変領域に更に分けることができる。各 V_H 及び V_L は、アミノ末端からカルボキシ末端に以下の順番：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 に配列した、3つの CDR 及び4つの FR から構成される。本発明の特定の実施態様においては、抗 - Na_v1.7 抗体 (又はその抗原結合断片) の FR は、ヒトの生殖系列配列と同一であってもよく、又は天然のものであり、又は人工的に修飾されていてもよい。アミノ酸コンセンサス配列は、2種以上の CDR の比較分析に基づいて定義することができる。

【0072】

1以上のCDR残基の置換、又は1以上のCDRの脱落の可能である。結合するために1以上のCDRを省略することができる抗体は科学文献に開示されている。Padlanら(1995 FASEB J. 9: 133-139)は、公開された結晶構造に基づき、抗体とその抗原との接触領域を分析し、CDR残基の約1/5~1/3のみが実際に抗原と接触していると結論づけた。また、Padlanは、1つ又は2つのCDRが抗原と接触するアミノ酸を有していない多くの抗体を発見した(Vajdosら、2002 J Mol Biol 320: 415-428も参照のこと)。

【0073】

分子モデリング及び/又は経験により、ChothiaのCDRの外側にあるKabata CDRの領域から、抗原と接触していないCDR残基は、以前の研究に基づいて同定することはできない(例えば、残基CDRH2のH60~H65が必要でない場合がある)。CDR又は残基が省略されている場合は、通常、他のヒト抗体配列の対応する位置又はそのような配列のコンセンサスを占めるアミノ酸配列のコンセンサスを占めるアミン残で置換されている。置換するCDR及びアミノ酸も経験的に選択することができる。経験的置換は、保存的又は非保存的置換であってもよい。

【0074】

本明細書に開示された完全なヒト抗-hNav_{1.7}抗体は、対応する生殖系列配列と比較し、フレームワーク及び/又は重鎖及び軽鎖可変ドメインのCDR領域内に、1以上のアミノ酸置換、挿入及び/又は欠失を含んでもよい。このような変異は、例えば、本明細書に開示されたアミノ酸配列を公共の抗体配列データベースからの生殖系列配列と比較することにより確認することができる。本発明は、1以上のフレームワーク及び/又はCDR領域内の1以上のアミノ酸が対応する生殖系列残基又は生殖系列残基の保存アミノ酸置換(天然又は非天然)に復帰突然変異した(このような配列の変化を、本明細書において「生殖細胞系復帰突然変異」と呼ぶ)、本明細書に開示されたアミノ酸配列のいずれかに由来する抗体及びその抗原結合断片を包含する。当業者は、本明細書に開示された重鎖及び軽鎖可変領域から開始し、1以上の個々の生殖細胞系復帰突然変異又はそれらの組み合わせを含む、多数の抗体及び抗原結合断片を容易に製造することができる。特定の実施態様においては、VH及び/又はVLドメイン内のフレームワーク及び/又はCDR残基の全ては、生殖細胞系列配列に復帰突然変異される。他の実施態様においては、ある種の残基のみ、例えば、FR1の最初の8つのアミノ酸内若しくはFR4の最後の8つのアミノ酸内に見出される突然変異残基のみが、生殖細胞系列配列に復帰突然変異され、又は、CDR1、CDR2若しくはCDR3内に見出される突然変異残基のみがFR1、FR2、FR3、FR4の全てのフレームワーク内の生殖系復帰突然片に突然変異される。更に、本発明の抗体は、フレームワーク及び/又はCDR領域内に2つ以上の生殖細胞系復帰突然変異の任意の組み合わせを含んでもよく、すなわち、その際、ある種の個々の残基は、生殖細胞系列配列に復帰突然変異されるが、生殖細胞系列配列と異なるある種の他の残基は維持される。いったん入手したら、1以上の生殖細胞系復帰突然変異を含む抗体及び抗原結合断片は、1以上の所望の性質、例えば改善された結合特異性、増強された結合親和性、改善された又は強化されたアンタゴニスト又はアゴニストの生物学的性質(場合による)、低下された免疫原性等について容易に試験することができる。この一般的な方法で入手した抗体及び抗原結合断片は、本発明内に包含される。

【0075】

本明細書で用いられる場合、「ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖細胞系列に由来する可変領域及び定常領域を有する抗体を含むことを意図する。本発明のヒトmAbは、例えばCDR中、特にCDR3中にヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基(例えば、インビトロでランダムな若しくは部位特異的な突然変異誘発によって又は生体内で体細胞突然変異によって導入された突然変異)を含んでもよい。しかし、本明細書に用いられる「ヒト抗体」という用語は、別の哺乳動物種(例えば、マウス)の生殖細胞系列から誘導されたCDR配列がヒトFR配列に融合されたmAbを含まないものとする。本発明の抗-hNav_{1.7}抗体は、「抗-hNav_{1.7}」又は「抗

10

20

30

40

50

- h N a_v 1 . 7」と命名される。

【 0 0 7 6 】

「特異的に結合する」又は同様の用語は、抗体又はその抗原結合性断片が生理学的状態条件下で比較的安定である、抗原との複合体を形成することを意味する。特異的結合は、少なくとも約 1×10^{-6} M 又はそれ未満の平衡解離定数（例えば、 K_D が小さいほど、より緊密な結合を表す）を特徴とすることができる。2つの分子が特異的に結合するかどうかを測定する方法は、当該技術分野で周知であり、例えば、平衡透折、表面プラズモン共鳴及び同様のものが挙げられる。しかし、N a_v 1 . 7 を特異的に結合する単離抗体は、他の種由来の N a_v 1 . 7 分子のような他の抗原に対する交差反応性を示すことがある。それにもかかわらず、更に、h N a_v 1 . 7 及び1以上の更なる抗原と結合する多重特異的抗体、又はh N a_v 1 . 7 の2種の異なる領域（例えば、E C ループ 3 - 1 及び E C ループ 3 - 3）と結合する二重特異的抗体は、h N a_v 1 . 7 と「特異的に結合する」抗体とみなされる。

10

【 0 0 7 7 】

本明細書で用いられる場合、特定の標的分子（例えば、特定の N a_v 1 . 7 ペプチド）に「結合しない」という用語は、プラズモン共鳴アッセイにおいて25 で標的分子に対する結合について試験をした場合に、抗体が500 nM を超える K_D を示し、又は酵素結合免疫吸着測定法（E L I S A）において25 で標的分子に対する結合について試験をした場合に50 nM を超える E C₅₀ を示し、又はいずれかのタイプのアッセイ又はその同等のアッセイにおいて結合を示さないことを意味する。

20

【 0 0 7 8 】

「高親和性」抗体という用語は、表面プラズモン共鳴、例えば、B I A C O R E T M 又は溶液親和性 E L I S A で測定して h N a_v 1 . 7 に対し、少なくとも 10^{-9} M、好ましくは 10^{-10} M、更に好ましくは 10^{-11} M、より好ましくは 10^{-12} M の結合親和性を有する m A b s を意味する。

【 0 0 7 9 】

「スローオフレート（s l o w o f f r a t e）」、「K o f f」又は「k d」という用語は、表面プラズモン共鳴、例えば、B I A C O R E で測定して、 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以下、好ましくは $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ 以下の速度定数で h N a_v 1 . 7 から解離する抗体を意味する。

30

【 0 0 8 0 】

本明細書で用いられる場合、抗体の「抗原結合部分」、抗体の「抗原結合断片」のような用語は、抗原と特異的に結合して複合体を形成する、天然の、酵素的に得られた、合成、若しくは遺伝子操作されたポリペプチド糖タンパク質を含む。本明細書で用いられる場合、抗体の「抗原結合部分」又は「抗体断片」という用語は、h N a_v 1 . 7 と特異的に結合する能力を保持する1以上の抗体の断片を意味する。

【 0 0 8 1 】

本発明の特定の実施態様の抗体又は抗体断片は、オピオイド、C O X - 2 阻害剤、局所麻酔剤、I L - 1 又は I L - 6 阻害剤等のサイトカインアンタゴニスト、第2の N a_v 1 . 7 阻害剤、N M D A モジュレータ、カンナビノイド受容体アゴニスト、P 2 X ファミリーモジュレータ、V R 1 アンタゴニスト、サブスタンス P アンタゴニスト、化学療法剤、又は放射性同位体のような治療部分と結合させてもよい（免疫複合体）。

40

【 0 0 8 2 】

本明細書で用いられる場合、「単離抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体（A b s）を実質的に含んでいない（例えば、h N a_v 1 . 7 と特異的に結合する単離抗体は、h N a_v 1 . 7 以外の抗原と特異的に結合する A b s を実質的に含んでいない）ことを意味することを意図する。

【 0 0 8 3 】

本明細書で用いられる場合、「中和抗体」（又は「N a_v 1 . 7 活性を中和する抗体）は、h N a_v 1 . 7 に対するその結合が N a_v 1 . 7 の少なくとも1つの生物活性の阻害を

50

もたらず抗体を意味することを意図する。Na_v1.7の生物活性のこの阻害は、当該技術分野で公知の幾つかの1以上の標準的インビトロ又はインビボ分析で、Na_v1.7生物活性の1以上の指標を測定するにより評価することができる(下記実施例を参照)。

【0084】

本明細書で用いられる場合、「表面プラズモン共鳴」という用語は、例えばBIACOREシステム(Pharmacia Biosensor AB、Uppsala、Sweden and Piscataway、NJ)を用いて、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度変化の検出により、リアルタイム生体特異的相互作用の解析を可能にする光学現象を意味する。

【0085】

本明細書で用いられる場合、「K_D」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の平衡解離定数を意味することを意図する。

【0086】

「エピトープ」という用語は、パラトープとして知られる抗体分子の可変領域内の抗原結合部位と相互作用する抗原決定基を意味する。単一の抗原は1以上のエピトープを有している。したがって、異なる抗体は、抗原の異なる領域と結合し、異なる生物学的効果を有している可能性がある。また、「エピトープ」という用語は、B及び/又はT細胞が応答する抗原上の部位を意味する。また、抗体によって結合する抗原の領域を意味する。エピトープは構造又は機能として定義される。機能エピトープは、一般的に構造エピトープのサブセットであり、相互作用の親和性に直接寄与するそれらの残基を有する。エピトープは、立体配座性でもあり、すなわち非線形アミノ酸から構成されてもよい。特定の実施態様においては、エピトープは、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル基、又はスルホニル基などの分子の化学的活性表面グルーピングである決定因子を含んでもよく、そして特定の実施態様では、特異的3次元構造特性、及び/又は特異的電荷特性を有してもよい。

【0087】

核酸又はその断片に言及する場合の、「実質的同一性」又は「実質的に同一の」という用語は、他の核酸(又はその相補鎖)と適切なヌクレオチド挿入又は欠失を有して最適に整列した場合に、下記で検討するFASTA、BLAST又はGAPなど配列同一性のいずれか周知のアルゴリズムによって測定して、少なくとも約90%、より好ましくは少なくとも約95%、96%、97%、98%又は99%のヌクレオチド塩基においてヌクレオチド配列同一性があることを意味する。特定の例においては、基準核酸分子と実質的に同一性を有する核酸分子は、基準核酸分子によりコードされるのと同様又は実質的に類似のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする。

【0088】

ポリペプチドに適用した場合に、「実質的類似性」又は「実質的に類似の」という用語は、デフォルトギャップ重量を用いてGAP又はBESTFITプログラム等により最適に整列した場合に、2つのペプチド配列が、少なくとも90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも95%、98%又は99%の配列同一性を共有することを意味する。好ましくは、同一ではない残基位置は保存アミノ酸置換によって異なる。「保存アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の化学特性(例えば、電荷又は疎水性)を有する側鎖(R基)を有する他のアミノ酸残基によって置換されたものである。一般に、保存アミノ酸置換は、タンパク質の機能特性を実質的に変えない。2つ以上のアミノ酸配列が保存的置換により互いに異なるという場合に、類似性の割合及び程度は、置換の保存的性質を修正するために上方へ調整してもよい。この調整を行なう手段は当業者に周知である。例えば、本明細書に参照として組み入れられるPearson(1994)Methods Mol. Biol. 24:307-331を参照のこと。類似の化学特性を有する側鎖を有するアミノ酸群の例としては、1)脂肪族側鎖:グリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン; 2)脂肪族ヒドロキシル側鎖:セリン及びスレオニン; 3)アミド含有側鎖:アスパラギン及びグルタミン; 4)芳香族側鎖:フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファン; 5)塩基性側鎖:リジン、アルギニン、及びヒスチジン; 6)酸性側鎖; ア

10

20

30

40

50

スパラギン酸及びグルタミン酸、並びに7)含硫黄側鎖：システイン及びメチオニンが挙げられる。好ましい保存アミノ酸置換群は：バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リジン - アルギニン、アラニン - バリン、グルタミン酸 - アスパラギン酸、及びアスパラギン - グルタミンである。また、保存的置換は、G o n n e t r a (1 9 9 2) S c i e n c e 2 5 6 : 1 4 4 3 4 5 に開示されているP A M 2 5 0 対数尤度マトリックスにおいて、正の値を有するあらゆる変化である。「緩やかな保存」置換は、P A M 2 5 0 対数尤度マトリックスにおいて負ではない値を有するあらゆる変化である。

【0089】

ポリペプチドの配列類似性は、一般に配列解析ソフトウェアを使用して測定する。タンパク質分析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含め、種々の置換、欠失及び他の変化に割り当てられている類似性測定値を使用して類似配列を照合する。例えば、G C G ソフトウェアには、G A P 及びB E S T F I T などのプログラムが含有されており、これらをデフォルトのパラメータで使用して、異なる生物種からの相同ポリペプチドなど密接に関連するポリペプチド間で、又は野生型タンパク質とその変異タンパク質との間で、配列相同性又は配列同一性を決定することができる。例えば、G C G バージョン6.1を参照のこと。ポリペプチド配列は、G C G バージョン6.1 付属プログラムであるF A S T A を使用してデフォルト又は推奨パラメータを用いて比較することもできる。F A S T A (例えば、F A S T A 2 及びF A S T A 3) により、クエリー及び検索配列間で最良重複領域のアラインメント及び配列同一性のパーセントが得られる(P e a r s o n (2 0 0 0) 、前出)。本発明の配列を異なる生物の多数の配列を含むデータベースと比較する場合に好ましい別のアルゴリズムは、デフォルトのパラメータを用いる、コンピュータプログラムB L A S T、特にB L A S T P 又はT B L A S T N である。例えば、それぞれ、参照として本明細書に組み入れられるA l t s c h u l e t a l . (1 9 9 0) J . M o l . B i o l . 2 1 5 : 4 0 3 4 1 0 及び(1 9 9 7) N u c l e i c A c i d s R e s . 2 5 : 3 3 8 9 4 0 2 を参照のこと。

【0090】

特定の実施態様においては、本発明の方法に使用するための抗体又は抗体断片は、単一特異性、二重特異性、又は多重特異性であってもよい。多重特異性抗体は1つの標的ポリペプチドの異なるエピトープに対して特異的であってもよく、又は1つの標的ポリペプチドより大きいエピトープに特異的な抗原結合ドメインを含んでいてもよい。本発明との関連で使用することができる典型的な二重特異体は、第1の免疫グロブリン(I g) C_H3 ドメイン及び第2のI g C_H3 ドメインの使用であって、第1及び第2のI g C_H3 ドメインが少なくとも1つのアミノ酸で互いに異なり、少なくとも1つのアミノ酸の差異が、アミノ酸の差異を欠いている二重特異体と比べて、プロテインA に対する二重特性抗体の結合を減少させる、第1の免疫グロブリン(I g) C_H3 ドメイン及び第2のI g C_H3 ドメインの使用を包含する。一実施態様においては、第1のI g C_H3 ドメインはプロテインA を結合し、第2のI g C_H3 ドメインはH 9 5 R 修飾(I M G T エキソナンバリングによる；E U ナンバリングによるH 4 3 5 R) 糖のプロテインA 結合を減少又は停止させる突然変異を含む。第2のC_H3 はY 9 6 F 修飾(I M G T による；E U によるY 4 3 6 F) を更に含む。第2のC_H3 内に認められる可能性のある更なる修飾としては：I g G 1 m A b s の場合におけるD 1 6 E、L 1 8 M、N 4 4 S、K 5 2 N、V 5 7 M、及びV 8 2 I (I M G T による；E U によるD 3 5 6 E、L 3 5 8 M、N 3 8 4 S、K 3 9 2 N、V 3 9 7 M、及びV 4 2 2 I)；I g G 2 m A b s の場合におけるN 4 4 S、K 5 2 N、及びV 8 2 I (I M G T；E U によるN 3 8 4 S、K 3 9 2 N、及びV 4 2 2 I)；及びI g G 4 m A b s の場合におけるQ 1 5 R、N 4 4 S、K 5 2 N、V 5 7 M、R 6 9 K、E 7 9 Q、及びV 8 2 I (I M G T による；E U によるQ 3 5 5 R、N 3 8 4 S、K 3 9 2 N、V 3 9 7 M、R 4 0 9 K、E 4 1 9 Q、及びV 4 2 2 I) が挙げられる。上記の二重特異体の変異は、本発明の範囲内であると考えられる。

【0091】

「治療的有効量」という語句は、それが投与されて所望の効果をもたらす量を意味する。正確な量は治療の目的に依存し、公知技術（例えば、Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* を参照）を用いて当業者により確認することが可能である。

【0092】

一般的記載

電位開口型ナトリウムチャンネル (VGSC) は、典型的には、種々のサブユニットの複合体であり、原則として1つは孔形成サブユニットであるアルファ - サブユニットである。アルファ - サブユニットのみで全ての既知のナトリウムチャンネル機能に十分である。しかし、特定のナトリウムチャンネルにおいては、大きいアルファ - サブユニットと結合していることが知られており、アルファサブユニットの機能のいくつかを修飾すると考えられているベータ - サブユニットと呼ばれる小さい、補助的なサブユニットがある (Kranerら (1985) *J Biol Chem* 260: 6341 - 6347; Tanakaraら (1983) *J Biol Chem* 258: 7519 - 7526; Hartshorneら (1984) *J Biol Chem* 259: 1667 - 1675; Catterall (1992) *Physiol Rev* 72: S14 - S48; Andersonら (1992) *Physiol Rev* 72: S89 - S158 を参照のこと)。ナトリウムチャンネルの総説は、Catterall, (1995) *Ann Rev Biochem* 64: 493 - 531) に示されている。

【0093】

ナトリウムチャンネルのアルファ - サブユニットは、細胞内ループによって連結した4個の相対的繰り返しドメイン (I ~ IV と命名) を含む、大きな糖タンパク質であり (Albertsら編、" *Molecular Biology of the Cell* " 534 - 535, Garland Pub., New York, N.Y. (1994))、各ドメインは6個の膜貫通領域を含んでいる (S1 ~ S6 と命名)。セグメント5 (S5) 及びセグメント6 (S6) の間に細孔ループがある。セグメント4 (S4) は、電圧「センサー」/リガンド結合ドメインである。「パドル領域」は、セグメント S3b と S4 との間にある。細胞外ループは、セグメント1 (S1) をセグメント2 (S2) に、セグメント3 (S3) をセグメント4 (S4) に、S5 を S6 に連結している。細胞内ループは、S2 を S3 に、S4 を S5 (S5) に連結している (Agnewら (1978) *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 2606 - 2610; Agnewら (1980) *Biochem Biophys Res Comm* 92: 860 - 866; Catterall, (1986) *Ann Rev Biochem* 55: 953 - 985; Catterall, (1992) *Physiol Rev* 72: S14 - S48 を参照のこと)。

【0094】

$Na_v1.7$ VGSC は、テトロドトキシン (TTX) による遮断に感受性があり、好ましくは末梢交感神経及び感覚ニューロンに発現している。 $Na_v1.7$ をコードする SCN9A 遺伝子は、ヒト、ラット及びウサギを含む多くの種からクローニングされ、ヒト及びラットの遺伝子間で90%アミノ酸同一性を示す (Toledo-Aralら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(4): 1527 - 1532 (1997))。h $Na_v1.7$ の構造及び機能発現は、Klugbauerら (Klugbauer, N.ら (1995) *The EMBO Journal* 14 (6): 1084 - 1090) に開示されている。

【0095】

本発明の特定の実施態様においては、 $Na_v1.7$ の1以上の任意のドメイン (I、II、III又はIV、ドメイン1、2、3及び4とも呼ばれる)、又は $Na_v1.7$ のドメインのいずれかの1以上の任意の細胞外ループ (又はその断片) は、 $Na_v1.7$ と結合し、その機能を阻害する抗体を調製するために使用することができる。ヒト $Na_v1.7$ の

7の完全長アミノ酸配列を配列番号：670に示す。ドメインIは配列番号：670の残基1～728にわたり、ドメインIIは配列番号：670の残基729～1176にわたり、ドメインIIIは配列番号：670の残基1177～1494にわたり、ドメインIVは配列番号：670の残基1495～1977にわたる。一実施態様においては、 $\text{Na}_v1.7$ と結合し、その機能を阻害する $\text{Na}_v1.7$ 特異的抗体を調製するのに有用である $\text{Na}_v1.7$ の細胞外領域は、「細胞外(EC)ループ3-1」(ループ3、ドメイン1、「EC3-1」と命名された。配列番号：670の残基番号269～338);又は「ECループ3-3」(ループ3、ドメイン3、「EC3-3」と命名された、配列番号：670の残基番号1333～1382);又は「パドル領域2-1」(配列番号：670の残基番号202～232)に言及される領域が含まれる。特定の実施態様においては、 $\text{Na}_v1.7$ に対する阻害抗体を調製するのに使用される興味のある領域は、「ECループ番号3-2」(ループ3、ドメイン2、「EC3-2」と命名された。配列番号：670の残基番号874～932)及び「ECループ番号3-4」(ループ3、ドメイン4、「EC3-4」と命名された。配列番号：670の残基番号1659～1723)から選択することができる。特定の実施態様においては、 $\text{Na}_v1.7$ と特異的に結合する抗体は、上記ループ又はパドル領域の断片、又は本明細書に開示された領域のN若しくはC末端のいずれか若しくは両方から約10～約50個のアミノ酸残基により指定された領域を超えて延びるペプチド、例えば、配列番号：670内に含まれるパドル領域の約202～215の残基番号;配列番号：670内に含まれるパドル領域のおよそ206～211の残基番号;配列番号：670内に含まれるECループ3-1のおよそ269～310の残基番号;配列番号：670内に含まれるECループ3-1のおよそ269～326の残基番号;配列番号：670内に含まれるECループ3-1のおよそ272～310の残基番号;配列番号：670内に含まれるECループ3-1のおよそ272～378の残基番号;配列番号：670内に含まれるECループ3-3のおよそ1333～1375の残基番号;配列番号：670内に含まれるECループ3-3のおよそ1341～1419の残基番号を使用して製造することができる。特定の実施態様においては、上記領域又はその断片が、 $\text{Na}_v1.7$ 特異的抗体を調製するために使用される。上述したように、 $\text{Na}_v1.7$ のECループ又はパドル領域を含むアミノ酸残基の長さ又は数は、抗-h $\text{Na}_v1.7$ 特異的抗体を調製するための完全長ECループ若しくはパドル領域、又はその断片のN末端若しくはC末端のいずれか若しくは両方から延びる約10～50個のアミノ酸残基で変化し得る。例えば、パドル領域2-1を含むアミノ酸残基の数は、配列番号：670等で本明細書に開示された領域のN若しくはC末端のいずれか若しくは両方から約20アミノ酸残基に及び得る。更に、ECループ3-1を含むアミノ酸残基の数は、配列番号：679等で本明細書に開示された領域のN若しくはC末端のいずれか若しくは両方から約40アミノ酸残基の範囲となり得る。更に、ECループ3-3を含むアミノ酸残基の数は、配列番号：725等で本明細書に開示された領域のN若しくはC末端のいずれか若しくは両方から約50アミノ酸残基の範囲となり得る。特定の実施態様においては、 $\text{Na}_v1.7$ のいずれか1以上の上記領域又はその断片は、単一特異的、二重特異的、又は多重特異的抗体を調製するのに使用することができる。

【0096】

抗体の抗原結合断片

本明細書で用いられる場合特に指摘しない限り、「抗体」という用語は、2本の免疫グロブリン重鎖及び2本の免疫グロブリン軽鎖(すなわち、完全な抗体分子)、及びその抗原結合断片を包含すると理解される。本明細書で用いられる場合、抗体の「抗原結合部分」、抗体の抗原結合断片」という用語には、天然の、抗原と特異的に結合して複合体を形成する、酵素的に得られた、合成、又は遺伝子操作されたポリペプチド又は糖タンパク質が含まれる。本明細書で用いられる場合、抗体の「抗原結合部分」又は「抗体断片」という用語は、h $\text{Na}_v1.7$ と特異的に結合する能力を維持する抗体の1以上の断片を意味する。抗体断片としては、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、dAb断片、CDRを含む断片、又は単離CDRが挙げられる。抗体の抗原結合断片は、例えば、適切な

標準的技術、例えば、タンパク質分解、又は抗体の可変及び（任意に）定常ドメインをコードするDNAの操作及び発現を含む組換え遺伝子操作技術を使用し、完全抗体分子から得ることができる。このようなDNAは公知であり、例えば、商業的供給源、DNAライブラリー（例えば、ファージ-抗体ライブラリー）から容易に得ることができ、又は合成することができる。DNAは、1以上の可変及び/又は定常ドメインを適切な立体配置に配置するために、又はコドンを導入し、システイン残基を作成し、アミノ酸などを修飾し、加え又は削除するために、配列決定されそして化学的に又は分子生物学技術を用いることによって操作され得る。

【0097】

抗原結合断片の非限定的例としては：(i) Fab断片；(ii) F(ab')₂断片；(iii) Fd断片；(iv) Fv断片；(v) 単鎖Fv(scFv)分子；(vi) dAb断片；及び(vii) 抗体の超可変領域（例えば、単離相補性決定領域(CDR)）が挙げられる。本明細書で用いられる場合、二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体及びミニボディ等の他の遺伝子操作された分子も、「抗原結合断片」という表現に包含される。

10

【0098】

抗体の抗原結合断片は、通常、少なくとも1つの可変ドメインを含む。可変ドメインはいずれのサイズ及びアミノ酸組成物であってもよく、一般的に、1以上のフレームワーク配列を備えたフレームに隣接して又はその中にある少なくとも1つのCDRを含む。V_Lドメインと関連するV_Hドメインを有する抗原結合断片において、V_H及びV_Lドメインは、互いに対していずれの適切な配列にも位置し得る。例えば、可変領域は二量体であり、V_H-V_H、V_H-V_L又はV_L-V_L二量体を含有し得る。または、抗体の抗原結合断片は、単量体のV_H及びV_Lドメインを含有し得る。

20

【0099】

ある実施態様においては、抗体の抗原結合断片は、少なくとも1つの定常ドメインに共有結合した少なくとも1つの可変ドメインを含有し得る。本発明の抗体の抗原結合断片内に見出され得る、可変及び定常ドメインの限定されない、例示的立体配置としては：(i) V_H-C_H1；(ii) V_H-C_H2；(iii) V_H-C_H3；(iv) V_H-C_H1-C_H2；(v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3；(vi) V_H-C_H2-C_H3；(vii) V_H-C_L；(viii) V_L-C_H1；(ix) V_L-C_H2；(x) V_L-C_H3；(xi) V_L-C_H1-C_H2；(xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3；(xiii) V_L-C_H2-C_H3；及び(xiv) V_L-C_L；が挙げられる。上記に記載した例示的立体配置のいずれをも含む、可変及び定常ドメインのいずれの立体配置においても、可変及び定常ドメインは、互いに直接連結され得るか又は完全若しくは部分ヒンジ若しくはリンカー領域によって連結され得る。ヒンジ領域は、単一ポリペプチド分子中の隣接可変及び/又は定常ドメイン間の可撓性又は半可撓性連結をもたらす、少なくとも2つの（例えば、5、10、15、20、40、60又はそれ以上）アミノ酸から成り得る。更に、本発明の抗体の抗原結合断片は、お互いと及び/又は1以上の単量体V_H又はV_Lドメインと非共有結合に関係して（例えば、1つ又は複数のジスルフィド結合）、上記に掲載された可変及び定常ドメイン立体配置のいずれかのホモ二量体又はヘテロ二量体（又は他の多量体）を含んでいてもよい。

30

40

【0100】

完全抗体分子と同様に、抗原結合断片は、単一特異性又は多重特異性（例えば、二重特異性）であってもよい。抗体の多重特異性抗原結合断片は通常、少なくとも2つの異なる可変ドメインを含んでいてもよく、メインは別々の抗原に又は同じ抗原上の異なるエピトープに特異的に結合することができる。本明細書に開示の例示的な二重特異性抗体フォーマットを含む、いずれの多重特異性抗体フォーマットも、当技術分野で利用できるルーチン技術を用いて本発明の抗体の抗原結合断片との関連で用いるのに適合し得る。

【0101】

ヒト抗体の調製

50

形質転換マウス中でヒト抗体を生成する方法は当該技術分野において公知である。本発明の文脈では、任意のこのような知られている方法を用いて、ヒト $N a_{\nu} 1 . 7$ に特異的に結合するヒト抗体を作製することができる。

【 0 1 0 2 】

VELOCIMMUNE (商標) 技術又はモノクローナル抗体を生成するための他のなんらかの知られている方法を用いて、ヒト可変領域およびマウス定常領域を有する、 $N a_{\nu} 1 . 7$ に対する高親和性キメラ抗体を最初に単離する。以下の実験の項におけるように、親和性、選択性、エピトープ等を含む望ましい特徴について抗体を特徴づけし、選択する。マウス定常領域を所望のヒト定常領域と置換して本発明の完全ヒト抗体、例えば、野生型又は修飾された $I g G 1$ 又は $I g G 4$ を生成する。選択する定常領域は特定の使用に 10 応じて変化してもよいが、高親和性の抗原結合性及びターゲット特異性の特徴は可変領域に存在する。

【 0 1 0 3 】

一般に、本発明の抗体は、極めて高い親和性を保有し、典型的に、固相上に固定化されているかまたは溶液相中にある抗原に対する結合によって測定した場合に約 $1 0^{-12}$ ~ 約 $1 0^{-9}$ M の K_D を有する。マウス定常領域を、所望のヒト定常領域で置換して、本発明の完全ヒト抗体を作製する。選択した定常領域は特定の使用に応じて変化し得るが、高親和性抗原結合特性および標的特異性は可変領域内に残る。

【 0 1 0 4 】

生物学的同等性

本発明の抗 - $N a_{\nu} 1 . 7$ 抗体及び抗体断片は、記載される抗体のアミノ酸配列とは異なるが、 $N a_{\nu} 1 . 7$ に結合する能力を保持するアミノ酸配列を有するタンパク質を包含する。このような変異体の抗体および抗体断片は、親配列と比較して1つ以上のアミノ酸の付加、欠失、または置換を含むが、記載される抗体と本質的に同等な生物学的活性を示す。同様に、本発明の抗体をコードするDNA配列も、開示された配列と比較した場合、1つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、または置換を含むが、本発明の抗 - $N a_{\nu} 1 . 7$ 抗体又は抗体断片と生物学的に本質的に同等な抗 - $N a_{\nu} 1 . 7$ 抗体又は抗体断片をコードする配列を包含する。

【 0 1 0 5 】

2つの抗原結合タンパク質又は抗体は、例えば、単回投与であれ、複数回投与であれ、類似の実験条件下において同じモル用量で投与した場合、それらの吸収速度及び吸収度が有意差を示さない薬学的同等物または薬学的代替物であれば、生物学的に同等であると 30 考えられる。一部の抗体は、それらの吸収度は同等であるが、それらの吸収速度が同等でなくとも、このような吸収速度の差異が意図的なものであり、表示において反映され、例えば、長期使用における有効な体内薬物濃度の達成には本質的でなく、特定の被験薬生成物にとって医学的に重要ではないと考えられるために生物学的に同等であると考えられれば、同等物又は薬学的代替物と考えられる。

【 0 1 0 6 】

一実施態様においては、2つの抗原結合タンパク質は、それらの安全性、純度、及び効力において臨床的に有意な差異が認められなければ生物学的に同等である。 40

【 0 1 0 7 】

一実施態様においては、2つの抗原結合タンパク質は、患者を、基準生成物と生物学的生成物との間で1回以上にわたり切り換え、このような切換えを伴わない連続療法と比較して臨床的に重要な免疫原性の変化又は有効性の減殺を含む、有害作用の危険性の予測される増大を伴わずにおくことが可能であれば、生物学的に同等である。

【 0 1 0 8 】

一実施形態では、2つの抗原結合タンパク質は、それらの両方が、1以上の使用条件に対して、1以上の共通の作用機構を介して作用するなら、このような機構が知られている限りにおいて、生物学的に同等である。

【 0 1 0 9 】

10

20

30

40

50

生物学的同等性は、インビボ及び/又はインビトロの方法によって実証することができる。生物学的同等性の測定には、例えば、(a)抗体又はその代謝物の濃度を、血液、血漿、血清、又は他の体液において時間の関数として測定する、ヒト又は他の哺乳動物におけるインビボ試験；(b)インビボにおけるヒトのバイオアベイラビリティデータと相関し、これを妥当な程度で予測するインビトロ試験；(c)抗体の適切な急性の薬理学的効果(又はその標的)を時間の関数として測定する、ヒト又は他の哺乳動物におけるインビボ試験；及び(d)抗体の安全性、有効性、又はバイオアベイラビリティ若しくは生物学的同等性を確立する、十分に制御された臨床試験が含まれる。

【0110】

本発明の抗-Na_v1.7抗体の生物学的に同等な変異体は、例えば、残基又は配列の様々な置換を施すことによって構築することもでき、生物学的活性に必要なでない末端又は内部の残基又は配列を欠失させることによって構築することもできる。例えば、生物学的活性に本質的でないシステイン残基を欠失させるか、又は他のアミノ酸で置換して、還元した際の、不必要であるか又はは不適正な分子内ジスルフィド架橋の形成を防止することができる。他の文脈では、生物学的に同等な抗体は、この抗体のグリコシル化特性を修飾するアミノ酸変化、例えば、グリコシル化を消失させるかまたは除去する突然変異を含む抗-Na_v1.7抗体の変異体を包含し得る。

【0111】

抗体の生物学的特徴

一般に、本発明の抗体は、Na_v1.7のドメイン(I、II、III、IV)の任意の1以上に結合することによって機能し得る。特定の実施態様においては、本発明の抗体は、hNa_v1.7のいずれかのドメイン内に見いだされる細胞外(EC)ループの少なくとも1つに位置するエピトープに結合し得る。特定の実施態様においては、本発明の抗体は、ドメインI、及び/又はドメインIIIのいずれか若しくは両方のECループ3に結合することにより、Na_v1.7の活性を遮断若しくは阻害することによって機能し得る。また、あるいは更に、本発明の抗体は、配列番号670のおよそ202~232の残基間に位置するNa_v1.7のパドル領域に結合し得る。特定の実施態様においては、本発明の抗体は二重特異性抗体であってもよい。本発明の二重特異性抗体は、ECループ3-1内の1つのエピトープと結合することができ、またECループ3-1以外のhNa_v1.7の領域内の1つのエピトープとも結合することができる。特定の実施態様においては、本発明の二重特異性抗体は、ECループ3-1の内側の1つのエピトープと結合することができ、ECループ3-3内の1つのエピトープ、又はhNa_v1.7のドメインI、II、III又はIV内のパドル領域若しくは他の任意のドメインと結合することができる。特定の実施態様においては、本発明の二重特異性抗体は、同じECループ内の2種の領域と結合し得る。

【0112】

具体的には、本発明の抗-Na_v1.7抗体は、以下の特徴の1以上を示す：(1)ヒトNa_v1.7又はその断片と、非ヒト(例えば、マウス、サル、ラット、ウサギ、イヌ、ブタ等)のNa_v1.7又はその断片との結合能力；(2)ヒトNa_v1.7又はその断片と結合するが、非ヒト(例えば、マウス、サル、ラット、ウサギ、イヌ、ブタ等)のNa_v1.7又はその断片とは結合しない能力；(3)ヒトNa_v1.7又はその断片と、非ヒト霊長類(例えば、サル)のNa_v1.7又はNa_v1.7断片と結合するが、マウス、ラット、ウサギ、イヌ又はブタのNa_v1.7又はNa_v1.7断片とは結合しない能力；(4)ヒトNa_v1.7又はその断片、非ヒト霊長類(例えば、サル)のNa_v1.7又はその断片、及びマウスのNa_v1.7又はその断片と結合するが、ラットのNa_v1.7とは結合しない能力；(5)ヒトNa_v1.7又はその断片、非ヒト霊長類(例えば、サル)のNa_v1.7又はその断片、及びラットのNa_v1.7又はその断片と結合するが、マウスのNa_v1.7とは結合しない能力；(6)他の電位開口型ナトリウムチャネル、又はナトリウムチャネルの他の任意のイソ型(例えば、Na_v1.1、Na_v1.2、Na_v1.3、Na_v1.4、Na_v1.5、Na_v1.6、Na_v1.8又はNa_v1.9)と結

10

20

30

40

50

合するか若しくはしないか、又は、交差反応性を有するか若しくは有しない；又は（7）例えば、パッチクランプ法を使用する、当業者に公知の任意の標準的技術により示されるような、 $Na_v1.7$ を含む細胞内のイオン束を阻害し、それによって膜貫通形脱分極を阻害する能力。

【0113】

本発明の特定の抗- $Na_v1.7$ 抗体は、インピトロアッセイにおいて、 $Na_v1.7$ の活性を阻害又は減弱させることができる。ナトリウムチャネル活性と結合し、阻害するという本発明の抗体の能力は、電気生理的方法（例えば、パッチクランプアッセイ）、結合アッセイ、放射性フラックスアッセイ、膜電位感受性蛍光色素、及び蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）に基づく電圧検出端子を含む、当業者に公知の任意の標準的方法を用いて測定することができる。 $Na_v1.7$ 活性を測定するための非限定的な励磁機インピトロアッセイを、本明細書の実施例6及び7に示す。この実施例においては、 $hNa_v1.7$ を発現する細胞を、Ion Work Quattroアッセイのようなアッセイを使用するイオンフラックスを阻害する $Na_v1.7$ 抗体の能力を評価するために使用し、又は $hNa_v1.7$ が安定に形質転換された細胞内の $Na_v1.7$ チャネルからのイオンフラックスを阻害する抗- $Na_v1.7$ 抗体の能力を検出するためのポート-パッチシステムを使用し、イオンフラックスを阻害する $Na_v1.7$ 抗体の能力を評価する。

【0114】

本発明は、以下のペプチド又はその断片の1以上と結合する、抗- $Na_v1.7$ 抗体及びその抗原結合断片を含む：配列番号：670の残基番号1~728（ $Na_v1.7$ アルファサブユニットのドメインI）；配列番号：670の残基729~1176（ $Na_v1.7$ アルファサブユニットのドメインII）；配列番号：670の残基1177~1494（ $Na_v1.7$ アルファサブユニットのドメイン3）；配列番号：670の残基1495~1977（ $Na_v1.7$ アルファサブユニットのドメインIV）；配列番号：677又は725（ $hNa_v1.7$, EC3-3）；配列番号：676又は678（ $hNa_v1.7$, EC3-1）；配列番号：675又は679（ $hNa_v1.7$ パドル領域2-1）。本明細書に開示されるあらゆる $Na_v1.7$ ペプチド又はその断片は、抗- $Na_v1.7$ 抗体を生成するために使用することができる。更に、抗体の調製を考慮するための多のミノ酸配列としては、抗体を生成するためにヒトFcと結合した、全てが、 $hNa_v1.7$ のECループ又はパドル領域と結合したRor1シグナル配列（配列番号：671、672、673及び674の最初の29個のアミノ酸）を含む、配列番号：671、672、673及び/又は674が挙げられる。ペプチドは、タグ付けのための特定の残基、又はKLH等の担体分子へのコンジュゲーションを目的とする特定の残基の付加又は置換を包含するように修飾することができる。例えば、ペプチドのN末端又はC末端にシステインを付加することもでき、リンカー配列を付加して、例えば、免疫感作のためにKLHへとコンジュゲートされるペプチドを調製することもできる。

【0115】

$Na_v1.7$ に対して特異的な抗体は、さらなる標識又は部分を含有しない場合もあり、N末端又はC末端の標識または部分を含有する場合もある。一実施態様においては、標識又は部分はビオチンである。結合アッセイでは、標識（存在する場合）の配置によって、ペプチドが結合する表面に対するペプチドの方向が決定され得る。例えば、表面をアビジンでコーティングする場合は、N末端にビオチンを含有するペプチドを、ペプチドのC末端部分が表面に対して遠位となるように方向付ける。

【0116】

一実施態様においては、本発明は、 $hNa_v1.7$ と特異的に結合し、 $hNa_v1.7$ を中和する完全ヒトモノクローナル抗体又はその抗原結合断片であって、以下の特徴の1以上を示す完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を提供する：(i) 配列番号：18、22、46、50、66、70、82、86、90、94、102、689、693及び705からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するHCVRを含み；(ii) 配列番号：20、24、48、52、68、72、84、88、92、96、104

10

20

30

40

50

、691、695及び707からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するLCVRを含み；(iii)表2に示す、任意の1以上の重鎖又は軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3、及びそれらの組み合わせを含み；(iv)他のナトリウムチャンネルに影響を及ぼさずに、Na_v1.7の活性を特異的に遮断し；(v)例えば、配列番号：670のおよそ269～338の残基、又は、配列番号：670の残基1333～1382のアミノ酸残基を含む、EC3-1又はEC3-3を含む、Na_v1.7の1以上の任意の細胞外ループに特異的な結合を示し；(vi)配列番号：670のおよそ202～232の残基のアミノ酸残基を含む、Na_v1.7のパドル領域に対して特異的な結合を示し；(vii)ヒト、サル、マウス又はラットのNa_v1.7の任意の1以上と結合し、当業者に公知の任意の標準法、例えば、パッチクランプ法により示されるように、Na_v1.7含有細胞においてイオン束を阻害し、それにより膜貫通型脱分極を阻害する。

10

【0117】

Fc改変体を含む抗-Na_v1.7抗体

本発明のある実施形態によれば、FcRn受容体への抗体の結合性を、例えば、中性pHに比して酸性pHで高める又は減退させる、1つ以上の変異を含むFcドメインを含む、抗Na_v1.7抗体を提供する。例えば、本発明は、FcドメインのC_H2又はC_H3領域における変異を含む抗Na_v1.7抗体を含み、これにおいて、変異(複数可)により酸性環境(例えば、pH範囲約5.5～約6.0のエンドソーム)におけるFcドメインのFcRnに対する親和性が高まる。こうした変異により、動物に投与した場合、抗体の血清中半減期が長くなり得る。このようなFc改変の非限定的な実施例には、例えば、250位(例えば、E又はQ)；250及び428位(例えば、L又はF)；252位(例えば、L/Y/F/W又はT)；254位(例えば、S又はT)；並びに256位(例えば、S/R/Q/E/D又はT)での改変；又は428位及び/又は433位(例えば、H/L/R/S/P/Q又はK)及び/又は434位(例えば、A、W、H、F又はY[N434A、N434W、N434H、N434F又はN434Y])での改変；又は250及び/又は428位での改変；又は307もしくは308位(例えば、308F、V308F)、及び434位での改変が含まれる。ある実施形態では、改変には、428L(例えば、M428L)及び434S(例えば、N434S)の改変；428L、259I(例えば、V259I)、及び308F(例えば、V308F)の改変；433K(例えば、H433K)及び434(例えば、434Y)の改変；252、254、及び256(例えば、252Y、254T、及び256E)の改変；250Q及び428Lの改変(例えば、T250Q及びM428L)；並びに307及び/又は308の改変(例えば、308F又は308P)が含まれる。さらに別の実施形態では、改変には、265A(例えば、D265A)及び/又は297A(例えば、N297A)の改変が含まれる。

20

30

【0118】

例えば、本発明は、250Q及び248L(例えば、T250Q及びM248L)；252Y、254T及び256E(例えば、M252Y、S254T及びT256E)；428L及び434S(例えば、M428L及びN434S)；257I及び311I(例えば、P257I及びQ311I)；257I及び434H(例えば、P257I及びN434H)；376V及び434H(例えば、D376V及びN434H)；307A、380A及び434A(例えば、T307A、E380A及びN434A)；並びに433K及び434F(例えば、H433K及びN434F)からなる群から選択される1つ以上の変異対又は変異群を含む抗Na_v1.7抗体Fcドメインを含む。上述のFcドメイン変異、及び本明細書に開示する抗体の可変ドメイン内の他の変異について可能な全組み合わせは、本発明の範囲内であることが意図される。

40

【0119】

本発明はまた、キメラ重鎖定常(C_H)領域を含む抗Na_v1.7抗体を含み、これにおいて、かかるキメラC_H領域は1つ以上のイムノグロブリン・アイソタイプのC_H領域に由来するセグメントを含む。例えば、本発明の抗体は、ヒトIgG1、ヒトIgG2又はヒトIgG4分子に由来するC_H2ドメインの一部又はすべてを含むキメラC_H領域を、ヒト

50

IgG1、ヒトIgG2又はヒトIgG4分子に由来するC_H3ドメインの一部又はすべてと組み合わせて含んでよい。ある実施形態によれば、本発明の抗体は、キメラのヒンジ領域を有するキメラC_H領域を含む。例えば、キメラのヒンジ領域は、ヒトIgG1、ヒトIgG2又はヒトIgG4のヒンジ領域領域に由来する「アッパーヒンジ (upper hinge)」のアミノ酸配列 (EUナンバリングの216~227位のアミノ酸残基) を、ヒトIgG1、ヒトIgG2又はヒトIgG4のヒンジ領域領域に由来する「ローワーヒンジ (lower hinge)」配列 (EUナンバリングの228~236位のアミノ酸残基) と組み合わせて含んでよい。ある実施形態によれば、キメラのヒンジ領域は、ヒトIgG1又はヒトIgG4のアッパーヒンジ (upper hinge) に由来するアミノ酸残基、及びヒトIgG2ローワーヒンジ (lower hinge) に由来するアミノ酸残基を含む。ある実施形態では、本明細書に記載するキメラC_H領域を含む抗体は、抗体の治療的又は薬物動態的性質に悪影響を与えることなく改変されたFcエフェクター機能を示す。(例えば、その全体が本明細書に参照として組み入れられる、2013年2月1日提出の米国仮出願第61/759,578号を参照のこと)。

10

【0120】

エピトープマッピング及び関連技術

特定のエピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、Antibodies, Harlow及びLane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY) に記載されているようなルーチンの交叉ブロッキングアッセイを使用することができる。他の方法としては、アラニンスキャン変異解析、ペプチドプロット解析 (Reineke (2004) Methods Mol Biol 248: 443-63) (その全体が参照として本明細書に組み入れられる) 又はペプチド開裂解析が挙げられる。更に、抗原のエピトープ切り出し (epitope excision)、エピトープ抽出及び化学的な修飾等の方法を使用することができる (Tomer, 2000, Protein Science 9: 487-496) (その全体が参照として本明細書に組み入れられる)。

20

【0121】

「エピトープ」という用語は、B細胞及び/又はT細胞がそれに対して応答する、抗原における部位を意味する。B細胞エピトープは、隣接アミノ酸から形成される場合もあり、タンパク質の三次フォールディングによって並置される非隣接アミノ酸から形成される場合もある。隣接アミノ酸から形成されるエピトープは、典型的に、変性溶媒へと曝露しても保持されるが、三次フォールディングによって形成されるエピトープは、典型的に、変性溶媒で処理すると失われる。エピトープは、典型的に、固有の空間配座にある少なくとも3つのアミノ酸、より通常には少なくとも5または8~10アミノ酸を包含する。

30

【0122】

特定の実施態様においては、抗-Na_v1.7抗体又は抗体の抗原結合断片は、Na_v1.7ドメインI、II、III若しくはIV、又はその断片の少なくとも1つの中のエピトープと結合し、ここで、ドメインIは、配列番号: 670のおよそ1~およそ728番の残基であり; ドメインIIは、配列番号: 670のおよそ729~およそ1176番の残基であり; ドメインIIIは、配列番号: 670のおよそ1177~およそ1494番の残基であり; ドメインIVは、配列番号: 670のおよそ1495~およそ1977番の残基である。

40

【0123】

特定の実施態様においては、抗-Na_v1.7抗体又は抗体の抗原結合断片は、Na_v1.7のドメインI、II、III若しくはIVのいずれかの細胞外ループ若しくはその断片、又はNa_v1.7のパドル領域又はその断片のいずれか1の中のエピトープと結合する。

【0124】

一実施態様においては、抗体は、Na_v1.7のドメインIのECループ3又はその断片内のエピトープと結合する。一実施態様においては、抗体は、配列番号: 670のおよ

50

そ269～およそ338の残基番号のNa_v1.7のドメインIのECループ3内のエピトープと結合する。一実施態様においては、抗体は、配列番号：670のおよそ272～およそ326の残基番号のNa_v1.7のドメインIのECループ3内のエピトープと結合する。一実施態様においては、抗体は、配列番号：670のおよそ272～およそ310の残基番号のNa_v1.7のドメインIのECループ3内のエピトープと結合する。

【0125】

特定の実施態様においては、抗-Na_v1.7抗体又は抗体の抗原結合断片は、Na_v1.7のドメインIIIの細胞外(EC)ループ3又はその断片内のエピトープと結合する。一実施態様においては、抗体は、配列番号：670のおよそ1333～およそ1382番の残基のNa_v1.7のドメインIIIのECループ3内のエピトープと結合する。一実施態様においては、抗体は、配列番号：670のおよそ1333～およそ1375番の残基のNa_v1.7のドメインIIIのECループ3内のエピトープと結合する。

10

【0126】

特定の実施態様においては、抗-Na_v1.7抗体又は抗体の抗原結合断片は、Na_v1.7のパドル領域(配列番号：670の残基番号202～232)内のエピトープと結合する。

【0127】

特定の実施態様においては、抗-Na_v1.7抗体又は抗体の抗原結合断片は、ECループ3-2(配列番号：670のおよそ874～およそ932の残基番号)内のエピトープと結合する。

20

【0128】

特定の実施態様においては、抗-Na_v1.7抗体又は抗体の抗原結合断片は、ECループ番号3-4(配列番号：670のおよそ1659～およそ1723の残基番号)内のエピトープと結合する。

【0129】

特定の実施態様においては、本発明の抗-Na_v1.7抗体は、上記ループ又はパドル領域の断片内のエピトープ、例えば、配列番号：670のパドル領域の残基番号202～215；配列番号：670のループ3-1の残基269～310；配列番号：670のループ3-1の残基番号269～326；配列番号：670のループ3-1の残基272～310；配列番号：670のループ3-3の残基1333～1375と結合し得る。

30

【0130】

特定の実施態様においては、抗体又は抗体断片は、ドメインI、II、III又はIV内、及び/又は2若しくは3種のドメイン内(例えば、ドメインI、II及びIII内、ドメインII、III及びIV内、ドメインI、III及びIV内、又はドメインI、II及びIV内)のNa_v1.7の列挙される1以上のエピトープを含むエピトープと結合する。

【0131】

特定の実施態様においては、抗体は、Na_v1.7の1つのドメイン内のエピトープと、Na_v1.7の異なるドメイン内の他のエピトープと結合する二重特異性抗体である。一実施態様においては、抗体は、Na_v1.7の1つのドメインのECループ3内の1つのエピトープと、Na_v1.7の異なるドメインのECループ3内の他のエピトープと結合する二重特異性抗体である。一実施態様においては、抗体は、Na_v1.7のドメインIのECループ3内の1つのエピトープ(1つのエピトープは配列番号：670のおよそ269～およそ338番目の残基の範囲である)と、Na_v1.7のドメインIIIのECループ3内の第2のエピトープ(第2のエピトープは配列番号：670のおよそ1333～およそ1382番目の残基の範囲である)と結合する二重抗体である。一実施態様においては、抗体は、ドメインI(配列番号：670のおよそ269～およそ338番目の残基)及びドメインIII(配列番号：670のおよそ1333

40

50

～およそ1382番目の残基)のいずれかのECループ3内の1つのエピトープと、N_av_v1.7のパドル領域(配列番号:670のおよそ202～およそ232番目の残基)内の第2のエピトープと結合する二重特異性抗体である。

【0132】

本発明は、本明細書に記載する具体的に例示される抗体(例えば、HIM852N、H1M875N、H4H391B、H4H391P、H4H434B、H4H434P、H4H439B、H4H439P、H4H468B、H4H468P、H4H471B、H4H471P、H1H1006B、H1H1006P)のいずれかと同一のエピトープに結合する抗N_av_v1.7抗体を含む。同様に、本発明はまた、N_av_v1.7又はN_av_v1.7断片への結合について、本明細書に記載する具体的に例示される抗体のいずれかと競合する抗N_av_v1.7抗体を含む。

10

【0133】

ある抗体が、基準となる抗N_av_v1.7抗体について、それと同一のエピトープに結合、又はそれとの結合について競合するかどうかは、当該技術分野で既知であるルーチンの方法により容易に測定できる。例えば、被験抗体が、基準となる本発明の抗N_av_v1.7抗体と同一のエピトープに結合するかどうかを測定する場合は、飽和状態で基準抗体をN_av_v1.7タンパク質又はペプチドと結合させる。次いで、M_av_v1/7分子への被験抗体の結合能力を評価する。被験抗体が、基準抗N_av_v1.7抗体との飽和結合に続いてN_av_v1.7に結合することができれば、被験抗体は基準抗N_av_v1.7抗体とは異なるエピトープに結合するという結論を出すことができる。一方、被験抗体が、基準抗N_av_v1.7抗体との飽和結合に続いてN_av_v1.7に結合することができなければ、被験抗体は、基準となる本発明の抗N_av_v1.7抗体が結合したエピトープと同一のエピトープに結合し得るということである。

20

【0134】

抗体が基準抗N_av_v1.7抗体と結合について競合することを検討するため、上記の結合方法を2つの方向から実施する。第1の方向は、基準抗体を飽和条件下でN_av_v1.7分子に結合させた後、被験抗体のN_av_v1.7分子への結合を評価する。第2の方向では、被験抗体を飽和条件下でN_av_v1.7分子に結合させた後、基準抗体のN_av_v1.7分子への結合を評価する。この2つの方向において、第1の(飽和)抗体のみがN_av_v1.7分子に結合することができれば、被験抗体と基準抗体はN_av_v1.7への結合について競合するという結論が導き出される。当該技術分野の当業者には認識されるように、結合について基準抗体と競合する抗体は、必ずしも基準抗体と同一のエピトープに結合するわけではないが、重複する又は隣接するエピトープに結合することにより基準抗体の結合を立体的に遮断し得る。

30

【0135】

それぞれが、抗原に対する他のものの結合を阻害(遮断)するなら、2つの抗体は、同じかまたは重複するエピトープに結合している。すなわち、1倍、5倍、10倍、20倍または100倍過剰の1つの抗体は競合的結合アッセイで測定すると、他の結合を少なくとも50%、しかし、好ましくは75%、90%又は更に99%阻害する(例えば、Jung *et al.*, *Cancer Res.* 1990;50:1495-1502を参照のこと)。また、あるいは、1つの抗体の結合を低減または排除する抗原中の本質的にすべてのアミノ酸変異が他の結合を低減または排除する場合、2つの抗体は同じエピトープに結合すると考えられる。1つの抗体の結合を低減または排除する一部のアミノ酸変異が他の結合を低減または排除する場合、2つの抗体は重複している。

40

【0136】

さらなる常用実験(例えば、ペプチド変異及び結合分析)を実施して、試験抗体の結合が観察されなかったのが実際に参照抗体と同じエピトープに結合したことによるものかどうか、または立体障害(または、別の現象)が、結合が観察されなかった原因であるかどうかを確認することができる。この種の実験は、ELISA、RIA、表面プラズモン共鳴、フローサイトメトリー、又は当分野で利用可能な他のなんらかの定量的若しくは定性

50

的抗体結合アッセイを用いて実施することができる。

【0137】

種選択性および種交差反応性

本発明の特定の実施態様によれば、抗-Na_v1.7抗体はヒトNa_v1.7に結合するが、他の種からのNa_v1.7には結合しない。また、特定の実施態様においては、本発明の抗-Na_v1.7抗体はヒトNa_v1.7に結合し、かつ1以上の非ヒト種からのNa_v1.7に結合する。例えば、本発明の抗-Na_v1.7抗体は、ヒトNa_v1.7に結合してもよく、かつ、場合によっては、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、スナネズミ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ラクダ、カニクイザル、マーモセット、アカゲザル又はチンパンジーのNa_v1.7の1種以上に結合してもよく、結合しなくてもよい。

10

【0138】

免疫複合体

本発明は、痛み及び/又は炎症、化学療法剤又は放射性同位体を軽減し得る薬剤のような、治療部分と結合した、ヒト抗-Na_v1.7モノクローナル抗体を包含する。抗-Na_v1.7抗体と結合し得る治療部分の種類は、治療すべき状態及び達成すべき所望の治療効果を考慮する。例えば、急性又は慢性疼痛の治療のために、NSAID等の薬剤、オピオイド、又はCox-2阻害剤、局所麻酔剤、又は第2のNa_v1.7阻害剤を、Na_v1.7抗体と結合することができる。また、所望の治療効果が、痛みを伴う病状に関連する炎症を治療することである場合には、これらに限定されないが、セレコキシブ、IL-1又はIL-6阻害剤のようなサイトカインアンタゴニスト等の抗-炎症剤を抗-Na_v1.7抗体に結合させることが有利である。治療すべき病状が癌性状態である場合には、化学療法剤、又は放射性同位体をNa_v1.7抗体に結合することが有益である。免疫複合体を精製するのに適切な薬剤の例は当該技術分野において公知であり、例えば、WO 05/103081を参照のこと。

20

【0139】

多重特異性抗体

本発明の抗体は、単一特異性、二重特異的、又は多重特異性であってよい。多重特異性抗体は、1つの標的ポリペプチドの異なるエピトープに特異的であってよく、又は、1つ以上の標的ポリペプチドに特異的な抗原結合ドメインを含有してよい。例えば、Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244を参照のこと。本発明の抗Na_v1.7抗体を、別の機能性分子、例えば、別のペプチド又はタンパク質と結合又は共発現させてよい。例えば、抗体又はその断片を、別の抗体又は抗体断片など1つ以上の他の分子種(molecular entities)に機能的に結合させ(例えば、化学的共役、遺伝子融合、非共有性会合又はその他により)、第2の結合特異性を有する二重特異性又は多重特異性抗体を作製することができる。例えば、本発明は、免疫グロブリンの1本の腕はヒトNa_v1.7又はその断片に対して特異的であり、免疫グロブリンのもう一方の腕は第2の治療標的に対して特異的である又は治療的部分に抱合される、二重特異性抗体を含む。本発明の特定の実施態様においては、免疫グロブリンの一方の腕が、hNa_v1.7の一方のECループ又はその断片に対して得意手できであり、免疫グロブリンの他方の腕が、hNa_v1.7の第2のECループ又はhNa_v1.7のパドル領域に対して特異的である。特定の実施態様においては、免疫グロブリンの一方の腕がhNa_v1.7の一方のECループの1つのエピトープに対して特異的であり、他の腕がhNa_v1.7の同じECループの第2のエピトープに対して特異的である。

30

40

【0140】

本発明の文脈において使用可能な例示的な二重特異性抗体フォーマットでは、第1の免疫グロブリン(Ig)のC_H3ドメイン及び第2のIgのC_H3ドメインを使用し、これにおいて、第1及び第2のIgのC_H3ドメインは少なくとも1個のアミノ酸が互いに異なり、かつ、少なくとも1個のアミノ酸の違いにより、アミノ酸の違いがない二重特異性抗体に比してタンパク質への二重特異性抗体の結合を減少させる。ある実施形態では、第1のIgのC_H3ドメインはタンパク質Aに結合し、第2のIgのC_H3ドメインには、H9

50

5 R 改変 (I M G T エキソンナンバリングによる ; E U ナンバリングによる H 4 3 5 R) などのタンパク質 A 結合を減少又は消失させる変異が含まれている。第 2 の C_H3 は、Y 9 6 F 改変 (I M G T による ; E U による Y 4 3 6 F) をさらに含んでよい。第 2 の C_H3 内に見ることができるさらなる改変には、I g G 1 抗体の場合は D 1 6 E、L 1 8 M、N 4 4 S、K 5 2 N、V 5 7 M、及び V 8 2 I (I M G T による ; E U による D 3 5 6 E、L 3 5 8 M、N 3 8 4 S、K 3 9 2 N、V 3 9 7 M、及び V 4 2 2 I) ; I g G 2 抗体の場合は N 4 4 S、K 5 2 N、及び V 8 2 I (I M G T による ; E U による N 3 8 4 S、K 3 9 2 N、及び V 4 2 2 I) ; 並びに I g G 4 抗体の場合は Q 1 5 R、N 4 4 S、K 5 2 N、V 5 7 M、R 6 9 K、E 7 9 Q、及び V 8 2 I (I M G T による ; E U による Q 3 5 5 R、N 3 8 4 S、K 3 9 2 N、V 3 9 7 M、R 4 0 9 K、E 4 1 9 Q、及び V 4 2 2 I) が含まれる。上記の二重特異性抗体フォーマットに対する変形は本発明の範囲内であることを意図するものである。

【 0 1 4 1 】

治療的投与及び製剤

本発明は、本発明の抗 - N a_v1.7 抗体又はそれらの抗原結合断片を含む治療用組成物を提供する。本発明に従う治療用組成物の投与は、導入、送達、忍容性などの改善をもたらすために製剤に組み込まれる、適切な担体、賦形剤、および他の薬剤と共に施される。適切な製剤の大半は、全ての製薬化学者に公知の処方集である、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA において見出すことができる。これらの製剤としては、例えば、粉末、ペースト、軟膏、ゼリー、蠟、油、脂質、脂質 (カチオン性脂質またはアニオン性脂質) を含有する小胞 (LIPOFECTIN (商標) など)、DNA コンジュゲート、無水吸収ペースト、水中油エマルジョン及び油中水エマルジョン、カーボワックスエマルジョン (様々な分子量のポリエチレングリコール)、半固体ゲル、及びカーボワックスを含有する半固体混合物が含まれる。Powellら、"Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311 も参照のこと。

【 0 1 4 2 】

本発明の抗体の用量は、投与される対象の年齢及び大きさ、標的疾患、病状、投与経路等に応じて変化させることができる。成人患者において、病状又は疾患が、急性又は慢性疼痛、炎症性疼痛、神経因性疼痛等をもたらす種々の病状及び疾患において、N a_v1.7 と関連する痛みを治療するために本発明の抗体を使用する場合、本発明の抗体を、通常は約 0.01 ~ 約 20 mg / kg 体重、更に好ましくは約 0.02 ~ 約 7、約 0.03 ~ 約 5、又は約 0.05 ~ 約 3 mg / kg 体重の単回投与で静脈内投与することが有利である。病状の重症度に依存し、治療の頻度及び期間を調整することができる。

【 0 1 4 3 】

種々の送達システムが公知であり、本発明の医薬組成物の投与に使用できる。例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセル、変異ウイルスを発現することができる組換え細胞、受容体介在性エンドサイトーシスへの封入がある (例えば、Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 を参照のこと)。導入方法には、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、経鼻、硬膜外、及び経口経路が含まれるが、これらに限定されない。組成物を、任意の好都合な経路、例えば注入又はボーラス注射で、上皮又は粘膜皮膚内 (例えば、口腔粘膜、直腸粘膜及び腸管粘膜など) を介した吸収により投与してよく、また、他の生物学的に活性な薬剤とともに投与してよい。投与は、全身又は局所で行うことができる。

【 0 1 4 4 】

医薬組成物はまた、小胞、特に、リポソームによって送達することもできる (例えば、Langer (1990) Science 249:1527-1533 を参照のこと)。

【 0 1 4 5 】

10

20

30

40

50

特定の状況下では、医薬組成物を、制御放出系によって送達することができる。一実施態様においては、ポンプを使用することができる。他の実施態様においては、ポリマー材料を使用することができる。さらに別の実施形態では、制御放出系を組成物の標的に近接して設置するため、全身投与用量の一部しか必要としない。

【0146】

注射用調製物は、静脈内注射用、皮下注射用、皮内注射用、及び筋肉内注射用、滴下注入用などの剤形を包含し得る。これらの注射用調製物は、公知の方法を介して調製することができる。例えば、注射用調製物は、例えば、上記で記載した抗体又はその塩を、注射に通常使用される滅菌の水性媒体若しくは油性媒体中に溶解、懸濁、又は乳化させることによって調製することができる。注射用の水性媒体としては、例えば、アルコール（例えば、エタノール）、多価アルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤〔例えば、ポリソルベート80、HCO-50（水素化したヒマシ油のポリオキシエチレン（50モル）付加物）〕のような適切な可溶化剤と組み合わせ使用し得る、生理食塩液、グルコース及び他の補助剤などを含有する等張性溶液が存在する。油性媒体としては、例えば、安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等の可溶化剤と組み合わせ使用し得るゴマ油、ダイズ油などが用いられる。こうして調製された注射液は、好ましくは適切なアンプル内に充填する。

【0147】

本発明の医薬組成物は、標準的な針及び注射器を用いて皮下又は静脈内に送達可能である。さらに、皮下送達に関しては、ペン送達デバイスには、本発明の医薬組成物の送達適用が用意されている。かかるペン送達デバイスは、再使用可能又は使い捨てであってよい。再使用可能ペン送達デバイスは、一般に、医薬組成物を含有する交換式カートリッジを使用する。一旦カートリッジ内の医薬組成物をすべて投与し、カートリッジが空になると、その空のカートリッジを廃棄し医薬組成物が含有されている新しいカートリッジと交換することができる。その後、そのペン送達デバイスは再度使用することができる。使い捨てペン送達デバイスでは交換式カートリッジはない。むしろ、使い捨てペン送達デバイスはデバイス内のレザバーに医薬組成物が予め充填されて提供される。一旦レザバーの医薬組成物がなくなると、デバイスは丸ごと廃棄される。

【0148】

多数の再使用可能ペン及び自動注入送達デバイスが、本発明の医薬組成物の皮下送達で適用される。ほんの数例として、AUTOPEN（商標）（Owen Mumford, Inc、イギリス、ウッドストック）、DISETRONIC（商標）ペン（Disetronic Medical Systems、スイス、ブルグドルフ）、HUMALOG MIX75/25（商標）ペン、HUMALOG（商標）ペン、HUMALIN70/30（商標）ペン（Eli Lilly and Co.、インディアナ州インディアナポリス）、NOVOPEN（商標）I、II及びIII（Novo Nordisk、デンマーク、コペンハーゲン）、NOVOPEN JUNIOR（商標）（Novo Nordisk、デンマーク、コペンハーゲン）、BD（商標）ペン（Becton Dickinson、ニュージャージー州フランクリン・レイクス）、OPTIPEN（商標）、OPTIPEN PRO（商標）、OPTIPEN STARLET（商標）、及びOPTICLIK（商標）（Sanofi-Aventis、ドイツ、フランクフルト）が含まれるが、これらに限定されない。本発明の医薬組成物の皮下送達に適用される使い捨てペン送達デバイスには、ほんの数例として、SOLOSTAR（商標）ペン（Sanofi-Aventis）、FLEXPEN（商標）（Novo Nordisk）、及びKWIKPEN（商標）（Eli Lilly）、SURECLICK（商標）自動注入器（Amgen、カリフォルニア州サウザンズオークス）、PENLET（商標）（Haseleimer、ドイツ、シュツットガルト）、EPIPEN（Dey、L.P.）、及びHUMIRA（商標）ペン（Abbott Labs、イリノイ州アボットパーク）が含まれるが、これらに限定されない。

【0149】

有利には、上記の経口又は非経口用の医薬組成物を、活性成分の用量にふさわしい適切な単位用量の剤形に調製する。単位用量のかかる剤形には、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが含まれる。前述の抗体含有量は、一般に、単位用量の剤形あたり約5～約500mgであり、特に注射形態では、前述の抗体を約5～約100mgで含有し、また他の剤形では約10～約250mgで含有することが好ましい。

【0150】

投与レジメン

本発明のある実施形態によれば、hNa_v1.7に対する抗体の複数用量をある一定期間被験者に投与してよい。本発明のこの態様による方法は、複数用量のNa_v1.7に対する抗体を被験者に順次投与することを含む。本明細書中で使用する場合、「順次投与する」とは、Na_v1.7に対する抗体の各用量を被験者に異なる時間ポイントで、例えば、予め設定された間隔（例えば、時間、日、週又は月）で区切った異なる日に投与することを意味する。本発明は、患者に単一の初回用量でNa_v1.7に対する抗体投与後、1つ以上の第2用量でNa_v1.7に対する抗体を投与し、必要に応じ、さらに1つ以上の第3用量でNa_v1.7に対する抗体を順次投与することを含む方法を含む。

10

【0151】

「初回用量」、「第2用量」、及び「第3用量」という用語は、本発明のhNa_v1.7に対する抗体を時間的順序で投与することをいう。したがって、「初回用量」とは、治療レジメン開始時に投与する用量であり（「ベースライン用量」とも言う）、「第2用量」は、初回用量後に投与する用量、並びに「第3用量」は、第2用量後に投与する用量である。初回、第2、及び第3用量はすべて同量のhNa_v1.7に対する抗体を含有してよいが、一般に投与頻度の点で互いに異なる場合がある。しかしながら、ある実施形態では、初回、第2及び/又は第3用量におけるhNa_v1.7に対する抗体含有量は、治療期間中、互いに異なる（例えば、適宜、増減を調整）。ある実施形態では、2以上の（例えば、2、3、4、又は5）用量を治療レジメン開始時に「負荷投与」として投与した後、以降の用量を低頻度で（例えば、「維持量」）投与する。

20

【0152】

本発明のある例示的な実施形態では、各第2及び/又は第3用量を直近の先行投与から1～26（例えば、1、1_{1/2}、2、2_{1/2}、3、3_{1/2}、4、4_{1/2}、5、5_{1/2}、6、6_{1/2}、7、7_{1/2}、8、8_{1/2}、9、9_{1/2}、10、10_{1/2}、11、11_{1/2}、12、12_{1/2}、13、13_{1/2}、14、14_{1/2}、15、15_{1/2}、16、16_{1/2}、17、17_{1/2}、18、18_{1/2}、19、19_{1/2}、20、20_{1/2}、21、21_{1/2}、22、22_{1/2}、23、23_{1/2}、24、24_{1/2}、25、25_{1/2}、26、26_{1/2}、又はそれ以上）週間後に投与する。「直近の先行投与」という語句は、本明細書中で使用する場合、一連の複数投与において、他の用量が介入しない順序で、直後の用量に先立ち患者に投与するhNa_v1.7に対する抗体の用量を意味する。

30

【0153】

本発明のこの態様による方法は、任意の数の第2及び/又は第3用量のhNa_v1.7に対する抗体を患者に投与することを含んでよい。例えば、ある実施形態では、第2用量を1回のみ患者に投与する。他の実施形態では、2以上の（例えば、2、3、4、5、6、7、8、又はそれ以上）の第2用量を患者に投与する。同様に、ある実施形態では、第3用量を1回のみ患者に投与する。他の実施形態では、2以上の（例えば、2、3、4、5、6、7、8、又はそれ以上）の第3用量を患者に投与する。

40

【0154】

複数の第2用量を使用する実施形態では、各第2用量を、他の第2用量と同一頻度で投与してよい。例えば、各第2用量を、直近の先行投与から1～2週間後に患者に投与してよい。同様に、複数の第3用量を使用する実施形態では、各第3用量を、他の第3用量と同一頻度で投与してよい。例えば、各第3用量を直近の先行投与から2～4週間後に患者に投与してよい。また、第2及び/又は第3用量を患者に投与する頻度は治療レジメン期間中を通して異なり得る。投与頻度は、臨床検査後の個々の患者の必要性に応じ、治療期

50

間中に医師が調整してもよい。

【0155】

抗体の治療的使用

本発明の抗体は、 $Na_v1.7$ と関連する疾患、障害又は病状の治療、予防及び/又は改善、該疾患、障害又は病状と関連する少なくとも1種の症状の改善、このような疾患、障害又は病状と関連する疼痛の改善に有用である。本発明の抗- $Na_v1.7$ 抗体により治療することのできる、このような病状、疾患又は障害の例としては、急性、慢性、神経障害性、若しくは炎症性疼痛、関節炎、偏頭痛、群発性頭痛、三叉神経痛、疱疹性神経痛、全身性神経痛、てんかん若しくはてんかん様症状、筋緊張症、不整脈、運動障害、神経内分泌障害、失調症、過敏性大腸症候群、炎症性腸疾患、糞便切迫感、失禁、直腸過敏症、内臓痛、骨関節痛、痛風、ヘルペス後神経痛、糖尿病性神経障害、神経根痛、座骨痛、背痛、頭部又は頸部の疼痛、激痛、手術後疼痛、又はがん疼痛が挙げられる。本発明の治療法により治療可能な他の病状としては、遺伝性紅痛症、鼻炎、前立腺がん、乳がん、子宮頸がん又は膀胱障害が挙げられる。本発明の抗体又はその抗原結合断片は、以下の病状：非悪性の急性、慢性、若しくは骨折による骨痛；リウマチ性関節炎、脊椎管狭窄症、神経障害性腰痛；筋膜炎疼痛症候群；繊維筋痛症；側頭骨顎関節痛；腹腔、脾臓を含む内臓痛；慢性頭痛；群発性頭痛等の緊張型頭痛；糖尿病性神経障害；HIV-関連ニューロパシー；シャルコー・マリー・トゥースニューロパシー；遺伝性感覚性ニューロパシー；末梢神経損傷；有痛性神経腫；異所性近位及び遠位排泄；神経根症；化学療法誘発性神経因性痛；放射線療法誘発性神経因性痛；乳房切除後の痛み；中枢性疼痛；脊髄損傷疼痛；脳卒中後疼痛；視床痛；複合性局所疼痛症候群；幻肢痛；難治性疼痛；急性筋骨格痛；関節痛；急性痛風による痛み；機械的な腰痛；頸部痛；腱炎；負傷/運動痛；腹痛；腎盂腎炎；盲腸炎；胆嚢炎；腸閉塞；ヘルニア等；心臓痛を含む胸部痛；骨盤痛、腎臓疝痛、陣痛を含む出産時の痛み；帝王切開の痛み；火傷及び外傷痛；子宮内膜症；带状疱疹痛；鎌状赤血球貧血；急性脾炎；激痛；副鼻腔炎痛、歯痛を含む口腔顔面痛；多発性硬化症痛；ハンセン病痛；ベーチェット病痛；有痛脂肪症；静脈炎痛；ギランバレー症候群痛；痛む脚と動く足趾症候群；Haglund症候群；ファブリー病痛；膀胱及び泌尿生殖器疾患；活発性膀胱；有痛性膀胱症候群；間質性膀胱炎；又は前立腺炎を治療するために使用することもできる。本発明の抗体又はその抗原断片は、前立腺癌、乳癌及び頸部癌等の腫瘍細胞の腫瘍細胞増殖又は転移を阻害するためにも使用することができる。

10

20

30

【0156】

併用療法

併用療法としては、他の $Na_v1.7$ アンタゴニスト（例えば、抗- $Na_v1.7$ 抗体、又は $Na_v1.7$ の抗体若しくは低分子量阻害剤）、 $Na_v1.8$ アンタゴニスト（例えば、抗- $Na_v1.8$ 抗体、又は $Na_v1.8$ の抗体若しくは低分子量阻害剤）、 $Na_v1.9$ アンタゴニスト（例えば、抗- $Na_v1.9$ 抗体、又は $Na_v1.9$ の抗体若しくは低分子量阻害剤）、サイトカイン阻害剤（例えば、インターロイキン-1（IL-1）阻害剤（例えば、リロナセプト（「IL-1トラップ」、Regeneron）又はアナキンラ（KINERET（登録商標）、Amgen）、低分子量IL-1アンタゴニスト、又は抗-IL-1抗体）；IL-18阻害剤（例えば、低分子量IL-18アンタゴニスト、又は抗-IL-18抗体）；IL-6又はIL-6R阻害剤（例えば、低分子量IL-6アンタゴニスト、抗-IL-6抗体、又は抗-IL-6受容体抗体）；抗てんかん薬（例えば、ガバペンチン、プレガバリン）；神経成長因子（NGF）阻害剤（例えば、低分子量NGFアンタゴニスト、又は抗-NGF抗体）；低用量コルヒチン；アスピリン；NSAID；ステロイド（例えば、プレドニゾン、メトトレキサート等）；低用量シクロスポリンA；腫瘍壊死因子（TNF）又はTNF受容体阻害剤（例えば、低分子量TNF若しくはTNFRアンタゴニスト、又は抗-TNF若しくはTNFR抗体）；尿酸合成阻害剤（例えば、アロプリノール）；尿酸排泄促進剤（例えば、プロベネシド、スルフィンピラゾン、ベンズプロマロン等）；他の炎症阻害剤（例えば、カスパーゼ-1の阻害剤、p38、IKK1/2、CTLA-4 Ig等）；及び/又は副腎皮質ステロイドと本発明の

40

50

抗 - h N a_v 1 . 7 抗体とが挙げられる。

【 0 1 5 7 】

抗体の診断用使用

本発明の抗 N a_v 1 . 7 抗体を、N a_v 1 . 7、又は試料中の N a_v 1 . 7 を検出及び / 又は測定するため、例えば、診断するために使用することもできる。例えば、抗 N a_v 1 . 7 抗体、又はその断片を、N a_v 1 . 7 の異常発現を特徴とする病態又は疾患を診断するため（例えば、過剰発現、低発現、発現の欠如など）に使用してよい。N a_v 1 . 7 の例示的な診断アッセイは、例えば、患者から得た試料を本発明の抗 N a_v 1 . 7 抗体と接触させることを含んでよく、ここでは、抗 N a_v 1 . 7 抗体を検出可能標識又はレポーター分子で標識する。別の方法では、未標識抗 N a_v 1 . 7 抗体を、それ自体が検出可能に標識された第 2 抗体と組み合わせて診断用途に使用できる。検出可能標識又はレポーター分子は、³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、又は¹²⁵I などの放射性同位元素；フルオレセインイソチオシアネート、又はローダミンなどの蛍光又は化学発光部分；又はアルカリホスファターゼ、アルカリフォスファターゼ、ガラクトシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、又はルシフェラーゼなどの酵素であり得る。試料中の N a_v 1 . 7 を検出又は測定するために使用可能な具体的試験法の例には、酵素結合免疫吸着法（E L I S A）、ラジオイムノアッセイ（R I A）、及び蛍光活性化細胞分類（F A C S）を含む。

10

【 0 1 5 8 】

本発明の N a_v 1 . 7 診断アッセイに使用可能な試料には、検出可能量の N a_v 1 . 7 タンパク質、又はその断片を正常又は病理学的状態で含有する、患者から得ることが可能な任意の組織又は流体の試料が含まれる。一般に、健全な患者（例えば、N a_v 1 . 7 の異常なレベル又は活性に関連する疾患又は病態に罹患していない患者）から得た特定試料中における N a_v 1 . 7 レベルを測定し、最初に N a_v 1 . 7 のベースライン、すなわち標準のレベルを設定する。次いで、この N a_v 1 . 7 のベースライン値を、N a_v 1 . 7 関連の疾患若しくは病態、又はこのような疾患若しくは病態と関連する疼痛を有することが疑われる各患者から得た試料で測定された N a_v 1 . 7 レベルと比較する。

20

【実施例】

【 0 1 5 9 】

以下の実施例は、本発明の方法及び組成物をいかに使用し作製するかについての開示及び説明を完全に当業者に提供するために提案するものであり、本発明者らが該発明者らの発明であるとみなす範囲を限定することは意図していない。使用する数字に関し、正確さを保証するべく試みがなされた（例えば、量、温度など）が、一部の実験上の誤差及び偏差は考慮されるべきである。特に指定しない限り、部は重量部、分子量は平均分子量、温度はセ氏、及び圧力は大気圧又はその近傍圧である。

30

【実施例 1】

【 0 1 6 0 】

ヒト N a_v 1 . 7 に対するヒト抗体の作製

ヒト N a_v 1 . 7 のパドル領域（ループ 2 - 1）由来の細胞外ループ 3 - 1 又は 3 - 3 からのアミノ酸配列を有する N a_v 1 . 7 ペプチドのいずれか 1 つを含む免疫源を、ヒト N a_v 1 . 7 に対する抗体を生成するために使用した。これらのペプチドを、キャリアー、例えば K L H とコンジュゲートした後、免疫応答を刺激するためにアジュバントとともに、ヒト免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖可変領域をコードする D N A を含む、V E L O C I M M U N E（登録商標）マウスに直接投与した。抗体免疫応答を N a_v 1 . 7 特異的イムノアッセイにより監視した。所望の免疫応答が達成されたら、脾細胞を回収してマウス骨髄腫細胞と融合させ、細胞の活動性を保存するとともにハイブリドーマ細胞株を形成した。N a_v 1 . 7 特異性抗体を産生する細胞株を同定するために、ハイブリドーマ細胞株をスクリーニングし選択した。この手法を使用し、抗 N a_v 1 . 7 ラ抗体（すなわち、ヒト可変ドメイン及びマウスの定常ドメインを有する抗体）を幾つか得た。この方法で作製した 2 つの例示的抗体を、H 1 M 8 5 2 N 及び H 1 M 8 7 5 N と命名した。この方法を使用して生成した、他の抗 - N a_v 1 . 7 抗体を表 1 に示し、H 1 M 6 8 3 N、H 1 M 7

40

50

97N、H1M834N、H1M839N、H1M799N、H1M839N、H1M875N、H1M801N及びH1M836Nと命名した。

【0161】

また、抗N_av1.7抗体を、その全体が参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第2007/0280945A号に記載のように、骨髄腫細胞とは融合させずに、抗原陽性B細胞から直接単離した。この方法を使用して、完全ヒト抗-N_av1.7抗体（すなわち、ヒト可変ドメイン及びヒト定常ドメイン）を幾つか得た；この方法で作製した例示的抗体を、H4H391B、H4H391P、H4H439B、H4H439P、H4H468B、H4H468P、H4H471B、H4H471P、H1H1006B、H1H1006P、H4H434B、H4H434P、H4H362B、H4H362P、H4H441B、H4H441P、H1H1003B、H4H1003P、H1H1025B及びH1H1025Pと命名した。この方法を使用して生成した、他の抗-N_av1.7抗体を表1に示す。表2は、例示的な抗N_av1.7抗体についての重鎖及び軽鎖の相補性決定領域（CDR）のアミノ酸残基の位置を要約する。

10

【0162】

本実施例の方法に従って作製した例示的抗N_av1.7抗体の生物学的性質を、下記実施例に詳述する。

【0163】

【表 1】

表 1

抗体 ID	ループ 特異性	V _H		V _L	
		DNA 配列番号	タンパク質 配列番号	DNA 配列番号	タンパク質 配列番号
H1M683N	2-1	1	2	3	4
H1M797N	3-1	5	6	7	8
H1M834N	3-1	9	10	11	12
H1M839N	3-1	13	14	15	16
H1M852N	3-3	17	18	19	20
H1M875N	3-1	21	22	23	24
H1M799N	3-1	25	26	27	28
H4H362B	3-1	29	30	31	32
H4H367B	3-1	33	34	35	36
H4H368B	3-1	37	38	39	40
H4H382B	3-1	41	42	43	44
H4H391B	3-1	45	46	47	48
H4H391P	3-1	49	50	51	52
H4H397B	3-1	53	54	55	56
H4H408B	3-1	57	58	59	60
H4H426B	3-1	61	62	63	64
H4H439B	3-1	65	66	67	68
H4H439P	3-1	69	70	71	72
H4H443B	3-1	73	74	75	76
H4H448B	3-1	77	78	79	80
H4H468B	3-3	81	82	83	84
H4H468P	3-3	85	86	87	88
H4H471B	3-3	89	90	91	92
H4H471P	3-3	93	94	95	96
H1H1003B	3-1	97	98	99	100
H1H1006B	3-1	101	102	103	104
H1H1008B	3-1	105	106	107	108
H1H1019B	3-1	109	110	111	112
H1H1010B	3-1	113	114	115	116
H1H1011B	3-1	117	118	119	120
H1H1013B	3-1	121	122	123	124
H1H1015B	3-1	125	126	127	128
H1H1022B	3-1	129	130	131	132
H1H1023B	3-1	133	134	135	136
H1H1026B	3-1	137	138	139	140
H1H1030B	3-1	141	142	143	144
H1H1032B	3-1	145	146	147	148
H1H1038B	3-1	149	150	151	152
H1H1041B	3-1	153	154	155	156
H1H1044B	3-1	157	158	159	160
H1H1045B	3-1	161	162	163	164
H1H1050B	3-1	165	166	167	168

【 0 1 6 4 】

【表 2】

H1H1055B	3-1	169	170	171	172
H1H1056B	3-1	173	174	175	176
H1H1059B	3-1	177	178	179	180
H1H1060B	3-1	181	182	183	184
H1H1069B	3-1	185	186	187	188
H1H1082B	3-1	189	190	191	192
H1H1098B	3-1	193	194	195	196
H1H1105B	3-1	197	198	199	200
H1H1123B	3-1	201	202	203	204
H1H1138B	3-1	205	206	207	208
H1H1144B	3-1	209	210	211	212
H1H1147B	3-1	213	214	215	216
H1H1155B	3-1	217	218	219	220
H1H1164B	3-1	221	222	223	224
H1H1166B	3-1	225	226	227	228
H1H1169B	3-1	229	230	231	232
H4H361B	3-1	233	234	235	236
H4H365B	3-1	237	238	239	240
H4H371B	3-1	241	242	243	244
H4H372B	3-1	245	246	247	248
H4H373B	3-1	249	250	251	252
H4H379B	3-1	253	254	255	256
H4H381B	3-1	257	258	259	260
H4H385B	3-1	261	262	263	264
H4H388B	3-1	265	266	267	268
H4H396B	3-1	269	270	271	272
H4H398B	3-1	273	274	275	276
H4H399B	3-1	277	278	279	280
H4H400B	3-1	281	282	283	284
H4H402B	3-1	285	286	287	288
H4H409B	3-1	289	290	291	292
H4H415B	3-1	293	294	295	296
H4H416B	3-1	297	298	299	300
H4H419B	3-1	301	302	303	304
H4H422B	3-1	305	306	307	308
H4H434B	3-1	309	310	311	312
H4H438B	3-1	313	314	315	316
H4H442B	3-1	317	318	319	320
H4H444B	3-1	321	322	323	324
H4H446B	3-1	325	326	327	328
H4H456B	3-3	329	330	331	332
H4H457B	3-3	333	334	335	336
H4H458B	3-3	337	338	339	340
H4H460B	3-3	341	342	343	344
H4H461B	3-3	345	346	347	348
H4H462B	3-3	349	350	351	352
H4H463B	3-3	353	354	355	356
H4H464B	3-3	357	358	359	360
H4H465B	3-3	361	362	363	364
H4H466B	3-3	365	366	367	368

10

20

30

40

【表 3】

H4H467B	3-3	369	370	371	372
H4H472B	3-3	373	374	375	376
H4H473B	3-3	377	378	379	380
H4H475B	3-3	381	382	383	384
H4H477B	3-3	385	386	387	388
H4H480B	3-3	389	390	391	392
H4H481B	3-3	393	394	395	396
H4H482B	3-3	397	398	399	400
H4H483B	3-3	401	402	403	404
H4H484B	3-3	405	406	407	408
H4H486B	3-3	409	410	411	412
H4H488B	3-3	413	414	415	416
H4H489B	3-3	417	418	419	420
H4H491B	3-3	421	422	423	424
H1H1114B	3-1	425	426	-	-
H1H1021B	3-1	427	428	-	-
H1H1028B	3-1	429	430	-	-
H1H1029B	3-1	431	432	-	-
H1H1036B	3-1	433	434	-	-
H1H1039B	3-1	435	436	-	-
H1H1040B	3-1	437	438	-	-
H1H1042B	3-1	439	440	-	-
H1H1052B	3-1	441	442	-	-
H1H1058B	3-1	443	444	-	-
H1H1061B	3-1	445	446	-	-
H1H1065B	3-1	447	448	-	-
H1H1066B	3-1	449	450	-	-
H1H1067B	3-1	451	452	-	-
H1H1068B	3-1	453	454	-	-
H1H1076B	3-1	455	456	-	-
H1H1089B	3-1	457	458	-	-
H1H1090B	3-1	459	460	-	-
H1H1097B	3-1	461	462	-	-
H1H1100B	3-1	463	464	-	-
H1H1102B	3-1	465	466	-	-
H1H1106B	3-1	467	468	-	-
H1H1107B	3-1	469	470	-	-
H1H1108B	3-1	471	472	-	-
H1H1109B	3-1	473	474	-	-
H1H1111B	3-1	475	476	-	-
H1H1117B	3-1	477	478	-	-
H1H1118B	3-1	479	480	-	-
H1H1119B	3-1	481	482	-	-
H1H1121B	3-1	483	484	-	-
H1H1126B	3-1	485	486	-	-
H1H1130B	3-1	487	488	-	-
H1H1131B	3-1	489	490	-	-
H1H1133B	3-1	491	492	-	-
H1H1134B	3-1	493	494	-	-
H1H1135B	3-1	495	496	-	-

10

20

30

40

【表 4】

H1H1137B	3-1	497	498	-	-
H1H1139B	3-1	499	500	-	-
H1H1141B	3-1	501	502	-	-
H1H1149B	3-1	503	504	-	-
H1H1153B	3-1	505	506	-	-
H1H1156B	3-1	507	508	-	-
H1H1157B	3-1	509	510	-	-
H1H1158B	3-1	511	512	-	-
H1H1162B	3-1	513	514	-	-
H1H1172B	3-1	515	516	-	-
H4H370B	3-1	517	518	-	-
H4H378B	3-1	519	520	-	-
H4H383B	3-1	521	522	-	-
H4H389B	3-1	523	524	-	-
H4H405B	3-1	525	526	-	-
H4H407B	3-1	527	528	-	-
H4H413B	3-1	529	530	-	-
H4H427B	3-1	531	532	-	-
H4H432B	3-1	533	534	-	-
H4H436B	3-1	535	536	-	-
H4H437B	3-1	537	538	-	-
H4H445B	3-1	539	540	-	-
H4H453B	3-1	541	542	-	-
H4H478B	3-3	543	544	-	-
H4H490B	3-3	545	546	-	-
H1H1002B	3-1	-	-	547	548
H1H1005B	3-1	-	-	549	550
H1H1009B	3-1	-	-	551	552
H1H1016B	3-1	-	-	553	554
H1H1020B	3-1	-	-	555	556
H1H1024B	3-1	-	-	557	558
H1H1025B	3-1	-	-	559	560
H1H1034B	3-1	-	-	561	562
H1H1035B	3-1	-	-	563	564
H1H1048B	3-1	-	-	565	566
H1H1049B	3-1	-	-	567	568
H1H1051B	3-1	-	-	569	570
H1H1064B	3-1	-	-	571	572
H1H1071B	3-1	-	-	573	574
H1H1072B	3-1	-	-	575	576
H1H1077B	3-1	-	-	577	578
H1H1086B	3-1	-	-	579	580
H1H1096B	3-1	-	-	581	582
H1H1120B	3-1	-	-	583	584
H1H1128B	3-1	-	-	585	586
H1H1132B	3-1	-	-	587	588
H1H1142B	3-1	-	-	589	590
H1H1171B	3-1	-	-	591	592
H4H363B	3-1	-	-	593	594
H4H364B	3-1	-	-	595	596

10

20

30

40

【表 5】

H4H366B	3-1	-	-	597	598
H4H369B	3-1	-	-	599	600
H4H374B	3-1	-	-	601	602
H4H375B	3-1	-	-	603	604
H4H376B	3-1	-	-	605	606
H4H377B	3-1	-	-	607	608
H4H380B	3-1	-	-	609	610
H4H384B	3-1	-	-	611	612
H4H387B	3-1	-	-	613	614
H4H392B	3-1	-	-	615	616
H4H394B	3-1	-	-	617	618
H4H395B	3-1	-	-	619	620
H4H404B	3-1	-	-	621	622
H4H410B	3-1	-	-	623	624
H4H411B	3-1	-	-	625	626
H4H412B	3-1	-	-	627	628
H4H414B	3-1	-	-	629	630
H4H421B	3-1	-	-	631	632
H4H428B	3-1	-	-	633	634
H4H430B	3-1	-	-	635	636
H4H431B	3-1	-	-	637	638
H4H433B	3-1	-	-	639	640
H4H435B	3-1	-	-	641	642
H4H440B	3-1	-	-	643	644
H4H441B	3-1	-	-	645	646
H4H450B	3-1	-	-	647	648
H4H451B	3-1	-	-	649	650
H4H452B	3-1	-	-	651	652
H4H455B	3-1	-	-	653	654
H4H459B	3-3	-	-	655	656
H4H469B	3-3	-	-	657	658
H4H470B	3-3	-	-	659	660
H4H474B	3-3	-	-	661	662
H4H476B	3-3	-	-	663	664
H4H479B	3-3	-	-	665	666
H4H487B	3-3	-	-	667	668
H4H385B	3-1	680	681	682	683
H4H395B	3-1	684	685	686	687
H4H434B	3-1	688	689	690	691
H4H434P	3-1	692	693	694	695
H4H438B	3-1	696	697	698	699
H4H441B	3-1	700	701	702	703
H1H1006P	3-1	704	705	706	707
H1H1068B	3-1	708	709	710	711
H1H1025B	3-1	721	722	723	724
H1M801N	3-1	726	727	734	735
H1M826N	3-1	742	743	750	751
H1M836N	3-1	758	759	766	767
H1M879N	3-1	790	791	798	799
H1M994N	3-1	806	807	814	815

【表 6】

H2M799N	3-1	822	823	830	831
H4H1003P	3-1	859	860	861	862
H4H441P	3-1	863	864	865	866
H4H362P	3-1	867	868	869	870
H4H1025P	3-1	871	872	873	874

【 0 1 6 9 】

【表7】

表2

抗体	配列 番号 V _H	残基番号			配列 番号 V _L	残基番号		
		HCDR1	HCDR2	HCDR3		LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1M683N	2	26-33	51-58	97-110	4	27-33	50-52	89-97
H1M797N	6	97-107	26-33	97-107	8	27-37	55-57	94-102
H1M834N	10	26-33	51-58	97-107	12	27-37	55-57	94-102
H1M839N	14	26-33	51-58	97-107	16	27-37	55-57	94-102
H1M852N	18	26-33	51-58	97-112	20	27-32	50-52	89-97
H1M875N	22	26-33	51-58	97-107	24	27-37	55-57	94-102
H1M799N	26	26-33	51-58	97-113	28	27-37	55-57	94-103
H4H362B	30	26-33	51-58	97-106	32	27-38	56-58	95-103
H4H367B	34	26-33	51-58	97-108	36	27-32	50-52	89-97
H4H368B	38	26-33	51-58	97-108	40	27-38	56-58	95-103
H4H382B	42	26-33	51-58	97-108	44	27-38	56-58	95-103
H4H385B	681	26-33	51-58	97-108	683	27-38	56-58	95-103
H4H391B	46	26-33	51-58	97-108	48	27-38	56-58	95-103
H4H391P	50	26-33	51-58	97-108	52	27-38	56-58	95-103
H4H395N	685	26-33	51-58	97-115	687	27-38	56-58	95-103
H4H397B	54	26-33	51-58	97-108	56	26-33	51-58	97-108
H4H408B	58	26-33	51-58	97-108	60	27-32	50-52	89-97
H4H426B	62	26-33	51-58	97-117	64	27-32	50-52	89-97
H4H434B	689	26-33	51-58	97-111	691	27-38	56-58	95-103
H4H434P	693	26-33	51-58	97-111	695	27-38	56-58	95-103
H4H438B	697	26-33	51-57	96-110	699	27-32	50-52	89-97
H4H439B	66	26-33	51-57	96-110	68	27-32	50-52	89-97
H4H439P	70	26-33	51-57	96-110	72	27-32	50-52	89-97
H4H441B	701	26-33	51-57	96-110	703	27-32	50-52	89-97
H4H443B	74	26-33	51-58	97-117	76	27-32	50-52	89-97
H4H448B	78	26-33	51-58	97-113	80	27-32	50-52	89-97
H4H468B	82	26-33	51-58	97-117	84	27-32	50-52	89-97
H4H468P	86	26-33	51-58	97-117	88	27-32	50-52	89-97
H4H471B	90	26-33	51-58	97-116	92	27-32	50-52	89-97
H4H471P	94	26-33	51-58	97-116	96	27-32	50-52	89-97
H1H1003B	98	26-33	51-57	96-108	100	27-38	56-58	95-99
H1H1006B	102	26-35	53-59	98-110	104	27-32	50-52	89-97
H1H1006P	705	26-35	53-59	98-110	707	27-32	50-52	89-97
H1H1008B	106	26-35	53-59	98-110	108	27-32	50-52	89-97
H1H1019B	110	26-35	53-59	98-110	112	27-32	50-52	89-97
H1H1068B	709	26-33	51-58	97-103	711	27-38	56-58	95-103
H1H1025B	722	26-33	51-58	97-106	724	27-32	50-52	89-97
H1M801N	727	26-33	51-58	97-107	735	27-37	55-57	94-102
H1M826N	743	26-33	51-58	97-107	751	27-37	55-57	94-102
H1M836N	759	26-33	51-58	97-107	767	27-37	55-57	94-102
H1M879N	791	26-33	51-58	97-109	799	27-32	50-52	89-97
H1M994N	807	26-33	51-58	97-107	815	27-37	55-57	94-102

【0170】

【表 8】

H2M799N	823	26-33	51-58	97-113	831	27-37	55-57	94-103
H4H1003P	860	26-33	51-57	96-108	862	27-38	56-58	95-99
H4H441P	864	26-33	51-57	96-110	866	27-32	50-52	89-97
H4H362P	868	26-33	51-58	97-106	870	27-38	56-58	95-103
H4H1025P	872	26-33	51-58	97-106	874	27-32	50-52	89-97

【実施例 2】

【0171】

可変遺伝子の利用分析

生産した抗体の構造を分析するために、抗体の可変領域をコードする核酸をクローニングし、配列決定した。抗体の核酸配列および抗体の予測アミノ酸配列から、各重鎖可変領域（HCVR）および軽鎖可変領域（LCVR）について、遺伝子使用を同定した。表 3 は、本発明による選択抗体の遺伝子使用を示す。NA：利用不可能

【0172】

【表 9】

表 3

PID	ループ	V _H	D	JH	VK	JK
H1M683N	2-1	V3-30	D6-6	J6	V1-9	J2
H4H362B	3-1	V1-18	D1-7	J4	V4-1	J1
H4H367B	3-1	V3-30	D5-5	J4	V1-16	J4
H4H368B	3-1	V3-30	D5-5	J4	V4-1	J2
H4H382B	3-1	V3-30	D5-5	J4	V4-1	J2
H4H385B	3-1	V3-30	D5-5	J4	V4-1	J2
H4H391B	3-1	V3-30	D5-5	J4	V4-1	J2
H4H395B	3-1	V3-23	D2-2	J3	V4-1	J2
H4H397B	3-1	V3-30	D5-5	J4	V4-1	J2
H4H408B	3-1	V3-30	D5-5	J4	V1-17	J4
H4H426B	3-1	V3-9	D3-9	J6	V1-9	J1
H4H434B	3-1	V3-23	D6-13	J2	V4-1	J2
H4H438B	3-1	V4-34	D1-26	J2	V1-39	J2
H4H439B	3-1	V4-34	D6-6	J2	V1-39	J2
H4H441B	3-1	V4-34	D6-6	J2	V1-39	J2
H4H443B	3-1	V3-9	D3-9	J6	V1-9	J1
H4H448B	3-1	V3-9	D3-9	J6	V1-39	J2
H1M797N	3-1	V3-30	D6-19	J3	V2-24	J3
H2M799N	3-1	V3-7	D3-16	J6	V2-28	J3
H1M834N	3-1	V3-30	D5-12	J4	V2-24	J3
H1M839N	3-1	V3-30	D5-12	J4	V2-24	J3
H1M875N	3-1	V3-30	D5-12	J4	V2-24	J3
H1H1003B	3-1	V3-23	D6-13	J4	V4-1	J3
H1H1006B	3-1	V4-39	D1-1	J6	V1-12	J4
H1H1008B	3-1	V4-39	D1-1	J6	V1-12	J4
H1H1019B	3-1	V4-39	D4-4	J6	V1-12	J4
H1H1025B	3-1	NA	NA	NA	V1-17	J1
H1H1068B	3-1	V1-18	D7-27	J5	V4-1	J1
H4H468B	3-3	V3-33	D6-6	J6	V1-6	J4
H4H471B	3-3	V3-11	D4-17	J6	V1-16	J4
H1M852N	3-3	V3-33	D3-22	J4	V1-6	J4
H1M801N	3-1	V3-30	D6-19	J3	V2-24	J3
H1M826N	3-1	V3-30	D5-12	J4	V2-24	J3
H1M836N	3-1	V3-30	D5-12	J4	V2-24	J3
H1M879N	3-1	V3-21	D6-6	J4	V3-11	J1
H1M994N	3-1	V3-30	D6-19	J3	V2-24	J3
H2M799N	3-1	V3-7	D3-16	J6	V2-28	J3

【実施例 3】

【0173】

Na_v1.7 抗体の結合アフィニティー

Na_v1.7 ループペプチドに対する抗 - Na_v1.7 抗体の結合アフィニティーを Biacore により測定した。一価の動力学的試験のために、抗体を、ヤギ抗 - Fc - 結合バイオセンサー表面を介して Fc 領域を介して捕捉し、ペプチド（分析物としての）を、捕捉した抗体表面上に注入した。二価（結合力駆動型）の動力学的試験のために、Na_v1.7 3-1、3-3 又はパドルループ配列に対応するピオチニル化ペプチドを NeutrAvidin センサー面に捕捉し、抗 - Na_v1.7 抗体（分析物としての）をこの表面に捕捉した。捕捉工程の後、各分析物を、それぞれの撮像面上に、いくつかの濃度で

10

20

30

40

50

個々に注入し、結合表面単位 (RU) をモニターした。解離速度は、実験に使用する分析物の濃度とは無関係であり、解離速度定数 (K_d) は、経時的な抗体に結合した分析物 RU の変化から求めた。二重参照手順 (referencing procedure) を用いて、Biacore 動態データを得た。二重参照は、参照表面上の分析物のあらゆる相互作用を減算することにより実施し (すなわち、抗-Fc 結合表面単独又は NeutrAvidin 表面単独)、それによって、捕捉表面に対する非特異的結合及び屈折率を補正した。抗体 - 又はペプチド - 捕捉表面上の対照の緩衝液の注入 (分析物なし) も実施し、センサー表面からの捕捉パートナーの自然の解離から得られる結果として得られる RU シグナル変化の減算を可能にした。動的パラメータは、Biacore T100 評価ソフトウェアバージョン 2.0.2 を使用し、全ての試験を行った所定のペプチド又は抗体を 1:1 結合モデルにデータを包括的に適合させることにより得た。KD は、会合速度定数で割った解離速度定数として算出した ($K_D = k_d / k_a$)。解離半減期 ($t_{1/2}$) は、解離速度定数から計算した ($t_{1/2} = \ln 2 / k_d$)。

【0174】

ヒト、サル、ラット及びマウスの 3-1、3-3 ループ及び 2-1 (パドル領域) 配列を含む、種々の種由来の $Na_v 1.7$ の細胞外ループを表わす合成ペプチド (Celtek Bioscience, LLC, 1515 Elm Hill Pike, Suite 104, Nashville, TN 37210, USA) を生成し、ペプチドに対する $Na_v 1.7$ の結合プロフィールを特徴づけた。種々のペプチドのピオチニル化形状及び非ピオチニル化形状の両者を、以下に示す Biacore 結合実験のために作製した。ピオチニル化形状については、G4S リンカーを開始、C-末端又は N-末端のいずれかで、ペプチドにピオチン部分を共有的に結合させた。表 4 は、Biacore 結合実験に使用する、これらのペプチド - 配列及び起源を示す。

【0175】

【表 10】

表 4

ペプチド	種	配列識別子
野生型 $Na_v 1.7$ (3-1)	ヒト	配列番号: 854
C-末端ピオチン $Na_v 1.7$ (3-1)	ヒト	配列番号: 853
N-末端ピオチン $Na_v 1.7$ (3-1)	アカゲザル	配列番号: 718
N-末端ピオチン $Na_v 1.7$ (3-1)	マウス	配列番号: 719
野生型 $Na_v 1.7$ (3-1)	ラット	配列番号: 715
野生型 $Na_v 1.7$ (3-3)	ヒト	配列番号: 677
C-末端ピオチン $Na_v 1.7$ (3-3)	ヒト	配列番号: 855
C-末端ピオチン $Na_v 1.7$ (3-3)	マウス	配列番号: 857
C-末端ピオチン $Na_v 1.7$ (3-3)	ラット	配列番号: 858
野生型 $Na_v 1.7$ (パドル)	ヒト	配列番号: 856

10

20

30

40

50

【0176】

一価の結合形式（捕捉した抗体センサー表面上に注入された一価のペプチド）を使用することにより、表5に示すように、試験を行った30種の抗-Na_v1.7抗体のうち27種が、ヒトNa_v1.7の3-1ループペプチドと、0.46 nM ~ 332 nMの範囲のK_Dで結合した。2種の抗体、H4H408B及びH1H1025Bは、この形式を用いて、測定可能な結合を示さなかった（表中、「NB」）。1種の抗体、H1H1003Bは、標準適合モデルに適合し得る結合データを生成しなかった（表中、「IC」）。H4H426B、H4H443B及びH4H448Bが、この形式で測定した時にヒトのペプチドに結合したにもかかわらず、サル（アカゲザル）のNa_v1.7の3-1ペプチドに対し、ヒトのペ

10 プチドに対するのと類似の結合挙動を示した（表5）。抗体、H1M797N、H1M834N、H1M839N、H1M875N、H1H1003B、H1H1006B、H4H1008B、H1H1019B、H4H367B、H4H368B、H4H397B、H4H434B、H4H443B、及びH1M801Nは、この結合形式で、3.5 nM ~ 2,000 nMの範囲のK_DでマウスのNa_v1.7の3-1ペプチドと結合する（表5）。

20 抗体、H4H439P、H1M797N、H1M834N、H1M839N、H1M875N、H1H1006B、H4H1008B、H1H1019B、H4H367B、H4H368B、H4H397B、H4H434B、H4H438B、H4H441B、H4H443B、H1M801N、及びH1M836Nは、この結合形式で、2.6 nM ~ 750 nMの範囲のK_Dで、ラットのNa_v1.7の3-1ペプチドと結合する（表5）。

表6に示すように、捕捉抗体としてのH4H468P及びH4H471Pは、一価のヒトのNa_v1.3の3-3ループペプチドと結合するが、この条件下で、マウス又はラットのペプチドとは結合しない（H4H471Pは、1:1モデルに適合することのできない、マウスペプチドに対する結合反応を示した。表中、「IC」）。表7に示すように、捕捉抗体H1M683Nは、9.4 nMのK_Dで、ヒトのNa_v1.7のパドルペプチドと結合する。

【0177】

二価（結合力駆動型）形式を使用することにより、表8に示すように、試験を行った32種の抗体のうち28種が、C-末端ビオチンを介してNeutrAvidinセンサー表面で捕捉された。ヒトNa_v1.7の3-1ループペプチド上に注入した時に、25 p

30 M ~ 1340 nMの範囲のK_Dで測定可能な結合を示した。表9に示すように、抗体H4H468P、H4H471P及びH1M852Nは、NeutrAvidinセンサー表面に固定したビオチニル化ヒトNa_v1.7の3-3ループペプチドと、138 pM ~ 117 nMの範囲のK_Dで結合した。

【0178】

表形式データの要約：

【表 1 1】

表 5 : 固定化抗体と結合したNa_v1.7の3-1ペプチドに対する結合定数及び解離半減期

mAb	ヒトNa _v 1.7 3-1 野生型		アカゲザル Na _v 1.7 3-1 N-末端 ビオチン		マウスNa _v 1.7 3-1 N-末端ビオチン		ラットNa _v 1.7 3-1 野生型	
	K _D (M)	t _{1/2} (分)	K _D (M)	t _{1/2} (分)	K _D (M)	t _{1/2} (分)	K _D (M)	t _{1/2} (分)
H4H362B	6.12E-10	8.6	2.57E-10	36.1	NB	NB	NB	NB
H4H391P	1.36E-08	8.1	2.18E-09	36.1	NB	NB	NB	NB
H4H439P	1.53E-08	7.7	1.39E-09	46.8	NB	NB	7.50E-07	0.083
H1M797N	4.62E-10	16.0	4.35E-10	43.7	7.4E-09	4.6	2.57E-09	5.8
H2M799N	9.93E-09	17.5	4.14E-09	27.4	NB	NB	NB	NB
H1M834N	5.53E-09	12.0	2.39E-09	20.3	1.92E-08	2.8	1.02E-08	2.3
H1M839N	3.32E-09	18.2	1.47E-09	28.7	1.51E-08	3.1	7.11E-09	3.2
H1M875N	5.85E-09	12.5	1.89E-09	26.5	1.20E-08	3.2	6.7E-09	3.0
H1H1003B	IC	IC	IC	IC	1.95E-06	0.46	IC	IC
H1H1006B	1.64E-08	3.3	6.1E-09	7.5	1.03E-07	0.62	3.39E-08	0.74
H4H1008B	4.31E-09	4.0	1.11E-09	17.5	1.48E-08	1.3	4.67E-09	3.1
H1H1019B	1.13E-07	0.44	1.26E-08	2.8	3.51E-07	0.083	1.01E-07	0.11
H4H367B	4.67E-09	10.5	6.3E-10	23.7	1.07E-07	0.59	8.80E-08	0.42
H4H368B	6.10E-08	3.6	1.00E-08	10.9	1.20E-08	964.1	1.27E-07	0.32
H4H382B	3.89E-08	3.3	1.31E-08	6.0	NB	NB	NB	NB
H4H385B	1.88E-07	0.80	2.93E-08	3.1	NB	NB	NB	NB
H4H395B	1.32E-08	20.7	2.5E-09	34.0	IC	IC	NB	NB
H4H397B	2.37E-09	34.0	9.7E-11	288.8	4.35E-08	3.92	1.42E-08	3.3
H4H408B	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
H4H426B	6.01E-09	6.3	NB	NB	NB	NB	NB	NB
H4H434B	2.14E-08	2.5	3.68E-09	4.7	8.98E-09	3.4	1.07E-07	0.17
H4H438B	2.73E-09	30.2	5.4E-10	110.6	NB	NB	7.70E-08	0.56
H4H441B	6.58E-09	12.5	4.39E-10	128.3	NB	NB	1.78E-07	0.39
H4H443B	2.11E-08	2.5	NB	NB	4.10E-07	0.39	1.76E-07	0.48
H4H448B	2.19E-08	1.8	NB	NB	IC	IC	IC	IC
H1H1025B	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
H1H1068B	2.36E-07	0.16	4.26E-08	0.34	IC	IC	IC	IC
H1M801N	3.73E-09	4.3	8.89E-10	16.8	3.53E-09	4.2	4.16E-09	3.6
H1M836N	3.32E-07	0.30	1.81E-08	1.7	NB	NB	2.98E-07	0.10
H1M879N	4.43E-09	3.0	1.05E-09	11.7	NB	NB	NB	NB

【 0 1 7 9 】

【表 1 2】

表 6 : 固定化抗体と結合したNa_v1.7の3-3ペプチドに対する結合定数及び解離半減期

mAb	ヒト Na _v 1.7 3-3 野生型		マウスNa _v 1.7 3-3 C-末端ビオチン		ラットNa _v 1.7 3-3 C-末端ビオチン	
	K _D (M)	t _{1/2} (分)	K _D (M)	t _{1/2} (分)	K _D (M)	t _{1/2} (分)
H4H468P	6.30E-07	0.31	NB	NB	NB	NB
H4H471P	1.60E-08	16.99	IC	IC	NB	NB
H1M852N	NB	NB	NB	NB	NB	NB

【 0 1 8 0 】

【表 1 3】

表 7 : 固定化抗体と結合したNa_v1.7のパドルペプチドに対する結合定数及び解離半減期

mAb	ヒト Na _v 1.7 パドル野生型	
	K _D (M)	t _{1/2} (分)
H1M683N	9.40E-09	18

【 0 1 8 1】

10

【表 1 4】

表 8 : NeutrAvidin表面に捕捉した、ビオチン化ヒトNa_v1.7 3-1ペプチドに対する、結合定数及び解離半減期

mAb	ヒト Na _v 1.7 3-1 C-末端ビオチン	
	K _D (M)	t _{1/2} (分)
H4H362B	2.18E-10	100.7
H4H391P	8.02E-10	64.6
H4H439P	1.40E-09	62.0
H4H468P	NB	NB
H4H471P	NB	NB
H1M683N	NB	NB
H1M797N	3.59E-10	99.1
H2M799N	8.15E-10	106.1
H1M834N	7.51E-10	82.5
H1M839N	6.92E-10	137.4
H1M852N	NB	NB
H1M875N	7.80E-10	87.2
H1H1003B	2.64E-09	27.8
H1H1006B	2.39E-10	81.7
H4H1008B	1.23E-10	84.2
H1H1019B	2.31E-10	29.8
H4H367B	3.41E-10	94.0
H4H382B	1.04E-09	92.9
H4H385B	4.43E-10	73.2
H4H395B	2.52E-11	108.1
H4H397B	2.99E-10	206.5
H4H408B	1.31E-08	29.4
H4H426B	3.80E-10	114.9
H4H434B	3.34E-10	113.9
H4H438B	6.14E-10	117.7
H4H441B	7.03E-10	86.9
H4H443B	6.12E-10	76.5
H1H1025B	1.34E-06	1.0
H1H1068B	2.00E-07	0.3
H1M801N	5.11E-10	71.0
H1M836N	1.92E-08	3.8
H1M879N	2.70E-10	87.0

20

30

40

50

【0182】

【表15】

表9: NeutrAvidin表面に捕捉した、ビオチン化
ヒトNa_v1.7 3-3ペプチドに対する、結合定数
及び解離半減期

mAb	ヒトNa _v 1.7 3-3 C-末端ビオチン	
	K _D (M)	t _{1/2} (分)
H4H468P	4.72E-08	1.3
H4H471P	1.38E-10	743.2
H1M852N	1.17E-07	1.3

10

【実施例4】

【0183】

Na_v1.7ペプチドに対する抗体結合/種特異性

ヒト、サル、ラット及びマウスの3-1、3-3ループ及び2-1(パドル領域)配列を含む、様々な種由来の細胞外ループを表わす合成ペプチド(Celtek Bioscience, LLC, 1515 Elm Hill Pike, Suite 104, Nashville, TN 37210, USA)を生成し、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)により抗-Na_v1.7抗体の結合プロファイルを特徴づけた。種々のペプチドのビオチン化形状及び非ビオチン化形状の両者を、以下に示す実験のために作製した。ビオチン化形状については、G4Sリンカーを介しC-末端又はN-末端のいずれかで、ペプチドにビオチン部分を共有的に結合させた。表10は、これらのペプチド-配列及び起源を示す。

20

【0184】

【表 16】

表10

ペプチド	種	配列識別子
野生型 Na _v 1.7 (3-3)	ヒト	配列番号: 677
N-末端ビオチン- Na _v 1.7 (3-1)	ヒト	配列番号: 712
N-末端ビオチン- Na _v 1.7 (3-3)	ヒト(アカゲザルに ついての EC3-3 と同一配列)	配列番号 NO: 713
N-末端ビオチン Na _v 1.7 (パドル)	ヒト	配列番号: 714
野生型 Na _v 1.7 (3-1)	ラット	配列番号: 715
野生型 Na _v 1.7 (3-3)	ラット	配列番号: 716
N-末端ビオチン Na _v 1.7 (パドル)	アカゲザル	配列番号: 717
N-末端ビオチン Na _v 1.7 (3-1)	アカゲザル	配列番号: 718
N-末端ビオチン Na _v 1.7 (3-1)	マウス	配列番号: 719
N-末端ビオチン Na _v 1.7 (3-3)	マウス	配列番号: 720

【0185】

抗 - Na_v1.7 抗体を、Na_v1.7 ペプチドに対する結合能力について試験した。種々のペプチドを PBS 中、4 μg/mL 濃度で 96 ウェルの Nunc Immunosorb プレートに一晩コーティングした後、適切なブロッキング剤中で 1 時間ブロッキングした。ビオチン化ペプチドについて、最初に、アビジンを、PBS 中、2 μg/mL で Nunc Immunosorb に一晩コーティングした後、上述のようにブロッキングし、次いで、ビオチン化ペプチドを、0.4 μg/mL でコーティングし、室温で 1 時間インキュベートした。精製した抗 - Na_v1.7 抗体を最終濃度 0.1 μg/mL 及び 1.0 μg/mL に希釈し、コーティングしたマイクロタイタープレートのウェルに加え、室温で 1 時間インキュベートした。抗体種に依存し、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合抗 - マウス又は抗 - ヒト IgG (Jackson Immuno Research Lab, West Grove, PA) を用いて結合抗体を検出し、テトラメチルベンジジン (TMB) 基質 (BD Biosciences) を用い、比色反応により発色させた。吸光度は、プレートリーダーにより、OD₄₅₀ で 0.1 秒間読み取った。

【0186】

表 11 中の値は、以下のように、1 μg/mL で加えた抗体についてのペプチドをコーティングしたプレートに対する絶対結合範囲 (OD₄₅₀ における) を示す: OD₄₅₀ < 0.2 : - ; 0.2 < OD₄₅₀ < 1 : + ; 1 < OD₄₅₀ < 2 : ++ ; 2 < OD₄₅₀ < 4 : +++ ; NT : 試験を行っていない。

【0187】

表 11 に示すように、抗 - Na_v1.7 抗体は、ELISA) により測定すると、異なる異種間特異性を示した。

【0188】

【表 17】

表 1 1

mAb ID	ループ	ヒト	サル	マウス	ラット
H1M683N	2-1	++	+	NT	NT
H4H362B	3-1	+++	+++	-	+++
H4H367B	3-1	+++	+++	+++	+++
H4H368B	3-1	+++	-	+/-	+++
H4H382B	3-1	+++	+++	+	+++
H4H391B	3-1	+++	+++	+/-	+
H4H397B	3-1	+++	+++	+++	+++
H4H408B	3-1	+++	+++	-	+
H4H426B	3-1	+++	++	+	++
H4H439B	3-1	+++	+++	+/-	++
H4H443B	3-1	+++	+	+	++
H4H448B	3-1	+++	-	-	-
H1M797N	3-1	+++	+++	+++	+++
H2M799N	3-1	+++	+++	-	-
H1M834N	3-1	+++	+++	++	+++
H1M839N	3-1	+++	+++	+++	+++
H1M875N	3-1	+++	+++	+++	+++
H1H1003B	3-1	+++	+++	+	+++
H1H1006B	3-1	+++	+++	+++	+++
H1H1008B	3-1	+++	+++	+++	+++
H1H1019B	3-1	+++	+++	+++	+++
H1M801N	3-1	++	+++	++	++
H1M836N	3-1	+++	+++	++	++
H1M879N	3-1	+++	+++	-	-
H4H468B	3-3	++	++	-	+++
H4H471B	3-3	+++	+++	-	-
H1M852N	3-3	++	++	NT	+++

10

20

30

【実施例 5】

【0189】

Na_v1.7 を発現するように遺伝子操作された細胞に対する抗体結合

抗 - Na_v1.7 を更に特徴づけるため、ヒト胎児腎臓 293 株化細胞 (HEK 293) の細胞を遺伝子操作し、全長ヒト (配列番号: 670) Na_v1.7 を過剰発現させた。

【0190】

HEK 293 細胞中で発現した全長 Na_v1.7 に対する抗 - Na_v1.7 ヒト抗体の結合は、フローサイトメトリー (FACS) で測定した。HEK 293 細胞を、緑色蛍光タンパク質 (GFP) にその N 末端で融合した全長ヒト Na_v1.7 を安定的にトランスフェクトし、株化細胞 hNa_v1.7 - GFP - HEK 293 を作製した。Na_v1.7 を過剰発現するトランスフェクトした細胞に対する抗体の結合を、親の HEK 293 細胞に対する結合と比較した。結合実験を実施するため、1 mM EDTA の PBS 溶液を使用して付着細胞を集め、5% PBS を含む冷 PBS に再懸濁した。各懸濁実験について、抗 - Na_v1.7 抗体 (1 nM ~ 13 nM の範囲の濃度) を、5% FBS を含む 500 μL の PBS 中の 250,000 個の細胞に加えた。氷上で 20 分間インキュベートした後、ヒト - Fc 及びシアニン 5 (Cy5) に結合したものの、又はマウス - Fc 及びアロフィコシアニン (APC) に結合したもののいずれかを認識する二次抗体を、二次抗体の濃度が 1.7 nM となるように細胞混合物に加えた。氷上で 20 分間インキュベートした後、

40

50

PBS + 5% FBS に細胞を再懸濁し、その後、貯蔵し、フローサイトメトリーで分析し、候補抗体による相対的結合を測定した。FACS 分析のため、抗体結合実験において、健康な生細胞のみを調べるため、ゲート開閉 (gating) を適用し、染色した割合を記録した。Na_v1.7-GFP-HEK293 に対する二次抗体のみの染色により、低いバックグラウンドシグナルが得られた (1~2%)。Na_v1.7-GFP-HEK293 に対する結合割合から親の HEK293 細胞に対する結合の割合を引くことにより、特異的結合を測定した。

【0191】

表12に示すように、抗-Na_v1.7抗体は、親細胞と比較し、Na_v1.7を過剰発現する HEK293 細胞に対し特異的な結合を示した。

【0192】

【表18】

表12

	Na _v 1.7に対する結合%
H4H362B	3.7
H4H391P	14.3
H4H468P	71.8
H1M797N	14.4
H2M799N	5.7
H1M834N	4.8
H1M839N	5.1
H1M852N	68.6
H1M875N	5.9
H1H1003B	1.3
H1H1006B	8.6
H1H1008B	12.5
H1H1019B	28.1
H4H367B	15.8
H4H368B	17.4
H4H443B	10.1
H4H448B	9.2
H4H426B	19.8
H4H382B	13
H1M801N	49.5
H1M836N	68.9
H1M879N	63
H1M994N	36
H1M826N	61

【0193】

同様の実験において、遺伝子操作を行った全長ヒト (配列番号: 670) Na_v1.7 を過剰発現させたヒト胎児腎臓293株化細胞 (HEK293) に対する結合について抗-Na_v1.8の試験を、免疫染色法を用いて行った。上述したように、HEK293細胞を、緑色蛍光タンパク質 (GFP) にそのN末端で融合した全長ヒトNa_v1.7を安定的にトランスフェクトし、株化細胞 hNa_v1.7-GFP-HEK293 を作製した。Na_v1.7を過剰発現するトランスフェクトした細胞に対する抗体の結合を、親の HEK293 細胞に対する結合と比較した。1 μg/mL のドキシサイクリンで一晩誘導した後、全長ヒトNa_v1.5を発現する HEK293 細胞を用いて、抗-Na_v1.7抗体

の交差反応性を試験した。Na_v1.5を過剰発現するトランスフェクトした細胞に対する抗体の結合を、誘導を行っていない同じHEK293細胞の結合と比較した。手短に言えば、細胞を、PDLをコーティングした8チャンバーの培養スライドグラスに、150,000細胞/ウェルの密度で、37℃で一晩置いた。次の日、培地を取り除き、細胞をPBSで3回洗浄した。細胞を4% PFAを用い、室温で20分間固定した後、0.05% Triton X-100を用い、室温で5分間透過処理した。スーパーブロックを用いて、細胞を室温で1時間ブロックした後、1μgの抗Na_v1.7抗体を用いて4℃で一晩インキュベートした。次いで、抗-ヒトAlexa Fluor (登録商標) 594 (Invitrogen)を結合した二次抗体の1:1400倍希釈液中で、室温で1時間、細胞をインキュベートした後、グリーンフィルターを使用し、蛍光顕微鏡下、撮像した。

10

【0194】

以下の表13に示すように、ほとんどの抗-Na_v1.7抗体が、全長ヒトNa_v1.7を発現するHEK293細胞に対する結合陽性を示したが、ドキシサイクリンで誘導した後は、全長ヒトNa_v1.7を発現するHEK293細胞に対する結合を示さなかった。上記のFACS結合試験により観察された結果と比較し、免疫染色法により観察された結果の間の相違は、使用した試薬、例えば、界面活性剤、緩衝液等の違いによって説明することが可能である。

【0195】

【表 19】

表 13

PID	ループ特異性	免疫染色	
		Na _v 1.7	Na _v 1.5
H1M683N	2-1	-	ND
H4H362B	3-1	+	高 bg
H4H367B	3-1	+	bg
H4H368B	3-1	+	bg
H4H382B	3-1	-	-
H4H385B	3-1	+	-
H4H391B	3-1	+	-
H4H395B	3-1	+	-
H4H397B	3-1	+	ND
H4H434B	3-1	+/-	-
H4H408B	3-1	+	bg
H4H426B	3-1	-	-
H4H438B	3-1	+	bg
H4H439B	3-1	+	-
H4H441B	3-1	-	ND
H4H448B	3-1	-	-
H1M797N	3-1	+	-
H4H443B	3-1	-	-
H2M799N	3-1	+	-
H1M834N	3-1	+	-
H1M839N	3-1	+	-
H1M875N	3-1	+	-
H1H1003B	3-1	+	-
H1H1006B	3-1	+	高 bg
H1H1008B	3-1	+/-	bg
H1H1019B	3-1	+	bg
H1H1025B	3-1	+	bg
H1H1068B	3-1	+/-	bg
H4H468B	3-3	-	-
H4H471B	3-3	+/-	-
H4H852N	3-3	+/-	-
H1M801	3-1	+	-
H1M836	3-1	-	-
H1M879	3-1	-	-

10

20

30

40

【0196】

他の実験においては、遺伝子操作を行った全長ヒト（配列番号：670）Na_v1.7を過剰発現させたヒト胎児腎臓293株化細胞（HEK293）（上述した通り）内で発現する全長hNa_v1.7に対する結合について、ウェスタンブロット法を用いて、抗-Na_v1.7抗体の試験を行った。

【0197】

プロテアーゼ阻害剤を補充したRIPA緩衝液を用いて細胞を収集した。15μLの細胞溶解物を、マイクロチューブ中、15μLのSDS試料緩衝液と混合し、100℃で5分間加熱した。試料をSDS-PAGEにより単離し、PVDF膜に移動させた。膜を、5%（w/v）脱脂粉乳を用い、室温で1時間ブロッキングした後、抗-Na_v1.7抗

50

体と、4 で一晩インキュベートした。膜を、TBS-Tを用いて5分間、3回洗浄した後、二次抗体(1:10,000希釈)と室温で1時間インキュベートした。二次抗体は、試験を行った抗-Na_v1.7抗体のFc断片に応じて、HRP-結合抗-ヒトIgG又は抗-マウスIgGであった。膜を15分間、3回洗浄した後、Thermo Scientific ECL溶液を用いて発色させ、感光性フィルムにさらした。

【0198】

以下の表14に示すように、以下の抗-Na_v1.7抗体は、H1M797N、H2M799N、H1M834N及びH1M839N細胞由来のPVDFプロットした全長Na_v1.7との結合を示した。

【0199】

【表20】

10

表14

PID	ループ特異性	WB
H1M683N	2-1	なし
H1M797N	3-1	あり
H2M799N	3-1	あり
H1M834N	3-1	あり
H1M839N	3-1	あり
H1M852N	3-3	なし
H1M875N	3-1	なし
H4H362B	3-1	なし
H4H391B	3-1	なし
H4H439B	3-1	なし
H4H468B	3-3	なし
H4H471B	3-3	なし
H1H1003B	3-1	なし
H1H1006B	3-1	なし
H1H1008B	3-1	なし
H1H1019B	3-1	なし
H1M801N	3-1	なし
H1M836N	3-1	なし
H1M879N	3-1	なし

20

30

【実施例6】

【0200】

ペプチド結合競合によって評価した、細胞表面hNa_v1.7に対する抗-Na_v1.7抗体結合の特異性

HEK293細胞内で発現する全長Na_v1.7に対する抗-Na_v1.7ヒト抗体の結合特異性を、フローサイトメトリーを用いたペプチド競合実験により測定した。

40

【0201】

GFPにそのN末端で融合した全長Na_v1.7を安定的にトランスフェクトされたHEK293細胞(Na_v1.7-GFP-HEK293)を、本試験に使用した。Na_v1.7を過剰発現する、トランスフェクトされた細胞に対する抗体の結合を、過剰のペプチド-存在下における結合、及び親HEK293株化細胞に対する結合と比較した。結合実験を実施するため、1mMEDTAのPBS溶液を用いて付着細胞を収集し、洗浄し、5%FBSを含む冷PBSに再懸濁した。各結合実験について、最終濃度が3.3nM(PBS/5%FBS中)で抗-Na_v1.7抗体を、直接、又は抗体のループ特異性に対応する配列を有する、1000倍モル過剰(PBS/5%FBS中、最終濃度3.3μM)の合成ペプチドとともに氷上で10分間インキュベートした後のいずれかに細胞

50

に加えた。PBS溶液を用いて付着細胞を収集し、洗浄し、5% FBSを含む冷PBSに再懸濁した。各結合実験について、最終濃度が3.3 nM (PBS/5% FBS中)で抗-Na_v1.7抗体を直接、又は抗体のループ特異性に対応する配列を有する、100倍モル過剰 (PBS/5% FBS中、最終濃度3.3 μM)の合成ペプチドとともに氷上で10分間インキュベートした後のいずれかに細胞に加えた。H4H391P、H4H443B、H4H448B、及びH1M797Nと命名した抗体を、上述したように、ECループ3-1に対応する合成ペプチド (配列番号: 670のアミノ酸残基269~338)とプレインキュベートしたが、H4H468P及びH1M852Nと命名した抗体は、ECループ3-3 (配列番号: 670のアミノ酸残基1333~1382)に対応する合成ペプチドとプレインキュベートした。次いで、抗体又は抗体-ペプチド混合物を、氷上で細胞とともに20分間インキュベートし、その後、500 μLの冷PBS/5% FBSを加えた。遠心単離により細胞を集め、500 μLの冷PBS/5% FBSに再懸濁した後、抗体イソ型に適合する二次抗体 (シアニンと結合した抗-ヒト-Fc、又はアロフィコシアニンと結合した抗-マウス-Fc)を加えた。結合はフローサイトメトリー装置で検出し、装置のソフトウェアを用い、結合の割合として分析した。FACS分析については、健康な生細胞のみを数えるため、適切なゲーティングを適用した。Na_v1.7-GFP-HEK293細胞に対する二次抗体単独でのバックグラウンド染色について試験を行い、全ての試料について記録し、結果は1~2%結合の範囲であった。

10

【0202】

ペプチド競合について試験を行った6種の抗-Na_v1.7は、各抗体-特異的ペプチドとプレインキュベートした時に結合の減少を示した (表15)が、無関係なペプチドとインキュベートした時には同様の減少を示さなかった。

20

【0203】

【表21】

表15

抗体の命名	ループ 特異性	結合% HEK293 (親株)	結合% Na _v 1.7 (安定株)	結合% Na _v 1.7 +1000x ペプチド (競合結合)
H4H391P	EC 3-1	3.1	7.8	2.6
H4H443B	EC 3-1	3.0	10.1	5.1
H4H448B	EC 3-1	4.9	9.2	5.8
H1M797N	EC 3-1	20.2	45.4	10.8
H4H468P	EC 3-3	12.5	89.5	6.1
H1M852N	EC 3-3	14.1	64.1	9.7
H1M801N	EC 3-1	15.3	49.5	1.9
H1M836N	EC 3-1	14.9	68.9	2.2
H1M879N	EC 3-1	14.4	63	1.3
H1M994N	EC 3-1	79	93	33.4
H1M826N	EC 3-1	73.6	95.6	17.7

30

【実施例7】

【0204】

IonWorks (Quattro (IWQ) Patch Clamp Device)により測定した膜貫通脱分極における抗-Na_v1.7抗体の影響

1810と命名されたNa_v1.7安定株化細胞 (Millipore)、又は全長Na_v1.7受容体及びN-末端にGFPタグを発現する、安定にトランスフェクトされたHEK293細胞を、IonWorks (Quattro (IWQ), Molecular Devices)パッチクランプアッセイ装置を用いた、膜貫通電流フラックスにおけるNa_v1.7抗体の影響について試験を行うために使用した。貯蔵溶液からの、Na_v1.7に対するヒト抗体を、100 (g/mLシステム緩衝液 (10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 10 mM グルコース,

40

50

1 mM MgCl₂ (pH = 7.3) 中の濃度で使用した。マウスの定常領域を有するコントロール抗体は、陰性コントロールとして含まれていた。コントロール抗体及び 1 nM が、TTX を要するコントロールとして含まれていた。対照抗体及び 100 nM の TTX は、陽性コントロールとして含まれていた。

【0205】

抗-Na_v1.7 抗体を、最終濃度 223 nM に 3 倍希釈し（一部が細胞懸濁液、一部がシステム緩衝液、一部が抗体溶液）、反復脈動により、細胞を最大 30 分インキュベートした。全ての抗体は、別々の 3 日間に三重に試験を行った。アッセイは、80 mV の保持電位で実施し、同様に、不活性化状態と閉鎖状態とで分割されたチャネルを有する抗体を提供するように設計された。膜貫通電流の阻害は、最初のパルスの後、又は -80 mV での保持電位から 10 番目のパルス後に算出した。

10

【0206】

表 16 に示すように、複数の試験抗体は、複数の実験において、膜貫通脱分極を阻害することを示した。

【0207】

【表 22】

表 16

PID	電流ブロッキング (Average % inhibition)
H4H362B	25.5
H4H367B	-35
H4H368B	-16
H4H382B	-6
H4H385B	31
H4H391B	48
H4H395B	57
H4H397B	-50
H4H434B	17.5
H4H438B	43.5
H4H439B	33.6
H4H441B	81
H1M797N	-31
H2M799N	6
H1M834N	-14
H1M839N	13
H1M875N	25
H1H1003B	32.5
H1H1006B	64
H1H1008B	38
H1H1019B	24
H1H1025B	49
H1H1048B	31
H1H1068B	34
H4H468B	45
H4H471B	57
H4H852N	7

20

30

40

【実施例 8】

【0208】

50

Port-a-Patch (登録商標) パッチクランプ装置により測定した抗- $\text{Na}_v1.7$ 抗体による $\text{hNa}_v1.7$ チャネル脱分極の機能的障害

マイクロチップをベースとするパッチクランプシステム (Port-a-Patch (登録商標)、Nanon Technologies、Munich、Germany) を使用して、抗- $\text{Na}_v1.7$ ヒト抗体の $\text{Na}_v1.7$ イオンチャネルを介した電位開口型イオン束を障害する能力を測定した。これらの実験のために、GFPにその末端で融合したヒトHEK293株化細胞を安定的にトランスフェクトしたHEK293株化細胞を使用した。記録の日に、トリプシン (0.025%) で処理することにより細胞を収集し、遠心単離し、500 μL の細胞外緩衝液溶液 (140 mM NaCl、4 mM KCl、1 mM MgCl_2 、2 mM CaCl_2 、5 mM グルコース、及びグルコース及び10 mM HEPES、NaOHによりpH 7.3に調整) に再懸濁した。その後、5 μL の細胞懸濁液を記録チップ上に載せた。まず、パッチを安定化するため、0.1% (w/v) のウシ血清アルブミンを含む細胞外緩衝液で約5分間細胞を灌流した。 $\text{Na}_v1.7$ 電流は、10秒毎に、-100 mVの保持電位から0 mVへの20 msの反復脱分極工程を誘発した。1 nAよりも大きいナトリウム内向き電流を示す細胞を、300、50又は30 nMの最終濃度で試験又は対照抗体溶液を加えることにより、イオンチャネル障害について試験した。細胞内記録溶液の組成は、CsOHでpH 7.3に調整した、140 mM CsF、10 mM NaCl、1 mM EGTA及び10 mM HEPESであった。十分に確認された電位開口型ナトリウムチャネル遮断薬を、陽性コントロールとして実験の最後に適用した。

【0209】

チャネルブロッキングは、複数の遮断実験にわたり平均され、抗体の非存在下、電流束に対する抗体の存在において観察された電流の障害の割合として測定した。

【0210】

表17に示すように、抗- $\text{Na}_v1.7$ 抗体は、非障害電流レベルと比較し、最大で70%の電圧依存脱分極を障害することが示された。

【0211】

【表23】

表17

抗体	試験を行った細胞の数	抗体の濃度	電流障害の割合 (平均 \pm SEM)
H4H439B	10	300 nM	54 \pm 10
	6	50 nM	69 \pm 12
	2	30 nM	55 \pm 25
H4H391B	5	300 nM	42 \pm 12
H4H468B	3	300 nM	37 \pm 8
	5	50 nM	50 \pm 3
H4H471B	6	300 nM	60 \pm 10
	4	50 nM	55 \pm 5
	1	30 nM	50
H1M852N	13	50 nM	40 \pm 8
H4H1006B-1	4	300 nM	33 \pm 3
	1	50 nM	20
H4H496B	12	300 nM	19 \pm 6
	1	50 nM	0

【実施例 9】

【0212】

Q - パッチクランプ装置により測定した、抗 - $Na_v1.7$ 抗体による $hNa_v1.7$ チャネルの機能的阻害

1810と命名された $Na_v1.7$ 安定株化細胞 (Millipore)、又は全長 $Na_v1.7$ 受容体及び N - 末端に GFP タグを発現する、安定にトランスフェクトされた HEK293 細胞を、Q - パッチ (Sophion Biosciences) 自動化パッチクランププラットフォームを使用し、ヒト $Na_v1.7$ 電流における $Na_v1.7$ 抗体の効果の試験を行うために使用した。記録の日に、アクターゼ細胞単離溶液 (Millipore, カタログ番号 SRC005) により細胞を収集し、1 mL の血清を含まない溶液 [CHO - SFM - II 培地 (Invitrogen, カタログ番号 31033), HEPES 25 mM 及びペニシリン/ストレプトマイシン 100 単位/mL] に再懸濁した。細胞懸濁液を振盪機上に室温で 30 分間置いた後、細胞を Q - パッチに載せた。 $Na_v1.7$ 電流は、30 秒毎に、-100 mV の保持電流から -30 mV への 20 ms の 1 回の脱分極パルス、その後の 0 mV への 20 ms (5 秒離して) への脱分極パルスを誘発した。ヒト抗 - $Na_v1.7$ 抗体を、0.2% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む細胞外緩衝液 (137 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM グルコース、10 mM HEPES, pH = 7.3) で最終濃度 100 nM に希釈した。TTX (100 nM) を、陽性コントロールとして実験の最後に含有させた。

10

20

【0213】

まず、電流を安定化させるために繰り返しパルス処理をしながら、細胞を 0.2% BSA で 16 分間インキュベートし、0.2% BSA の存在下、繰り返しパルス処理をしながら抗 - $Na_v1.7$ 抗体と更に 16 分間インキュベートした。電流の電圧依存を、0.2% BSA によるインキュベーションの最後と抗体とのインキュベーションの最後に記録し、電流は、-100 mV の保持電流から、5 mM の増加で -85 mV ~ +30 mV の工程の脱分極で誘発された。全ての抗体は、3 日以上離れた日に、二重に試験を行った。チャンネルブロッキングは、複数の遮断実験にわたり平均され、抗体の非存在下、電流束に対する抗体及び 0.2% BSA の存在下に観察された電流束の阻害割合として測定した。

30

【0214】

表 18 に示すように、複数の実験において、ほとんどの抗体はヒト $Na_v1.7$ の機能的阻害を示した。

【0215】

【表 2 4】

表 1 8

抗体	試験を行った細胞の数	抗体濃度 (nM)	電流阻害
H4H362B	13	100	++
H4H367B	9	100	+
H4H368B	12	100	+
H4H382B	9	100	+
H4H385B	10	100	-
H4H391B	6	100	-
H4H395B	13	100	+
H4H397B	14	100	-
H4H434B	8	100	-
H4H438B	12	100	+
H4H439B	5	100	+
H4H441B	17	100	++
H1M797N	11	100	+
H2M799N	13	100	-
H1M834N	7	100	-
H1M839N	7	100	++
H1M875N	12	100	++
H1H1003B	9	100	++
H1H1006B	7	100	+
H1H1008B	7	100	-
H1H1019B	4	100	+
H1H1025B	14	100	++
H1H1068B	11	100	+
H4H468B	13	100	+
H4H471B	15	100	+
H4H852N	4	100	+
H1M801	15	100	++
H1M836	9	100	++
H1M879	18	100	+
-	遮断なし		
+	遮断<15%		
++	試験を行った 40%以上の細胞で、遮断>15%		

【 0 2 1 6 】

ほとんどの抗体はある程度の阻害を示しているので、どの抗体を更に試験するかについて決定するための一定の基準を設定した。試験を行った 40%の 15%以上のヒト Na_v1.7 電流を阻害する Na_v1.7 抗体を、4 点用量応答アッセイにおいて更に試験を行うために選択した。まず、電流を安定化させるために繰り返しパルス処理しながら、細胞を、0.2% BSA で 16 分間インキュベートし、0.2% BSA の存在下、各濃度

10

20

30

40

50

で抗 - $\text{Na}_v 1.7$ 抗体とインキュベートした。4種の濃度を、同じウェルで連続的に（パルス処理をしながら）試験を行った。 $\text{Na}_v 1.7$ 抗体の単一用量試験と同様、ヒト $\text{Na}_v 1.7$ 電流の電圧依存性を、BSAとのインキュベーションの最後、抗体の各濃度でのインキュベーションの最後に記録した。TTX（100 nM）を、陽性コントロールとして記録の最後に含有させた。全ての抗体は、3日以上離して二重で試験を行った。チャンネルブロッキングは、複数の遮断実験にわたり平均され、抗体の非存在下、電流束に対する抗体及び0.2% BSAの存在において観察された電流の阻害の割合として測定した。

【0217】

12種の抗体の試験を行い、そのうちの8種が、用量依存的な、ヒト $\text{Na}_v 1.7$ 電流の阻害を示した。陰性コントロールの抗体（REGN1002）も含まれていた。結果を表19に要約する。

10

【0218】

【表 25】

表19

抗体	遮断を示した試験の数/ 試験の数	遮断を示した試験の数	抗体濃度(nM)	電流阻害の割合 (平均±SEM)
H4H362B	4/6	4	1	6±4
			10	24±8
			100	53±6
			300	65±6
H4H441B	9/11	9	1	6±3
			10	18±6
			100	32±7
			300	41±6
H1M839N	4/5	4	1	3±3
			10	8±4
			100	13±6
			300	20±7
H1H1003B	9/10	9	1	8±3
			10	20±6
			100	37±8
			300	53±8
H4H1025P	14/27	14	1	11±5
			10	22±5
			100	40±5
			300	54±4
H1M875N	5/6	5	1	5±2
			10	18±6
			100	27±12
			300	38±10
H1M801N	7/7	7	1	4±3
			10	17±8
			50	26±10
			100	44±10
H1M836N	9/10	9	1	9±4
			10	29±3
			50	39±6
			100	52±7
REGN1002	4/24	4	1	0
			10	3±3
			100	9±6
			300	28±9

【0219】

8種の抗体について、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ のドキシサイクリンを用いて一晩誘導した後、全長ヒト $\text{Na}_v1.5$ を発現するHEK293細胞を用い、交差反応性について、更に試験を行った。 $\text{Na}_v1.5$ 電流は、5秒毎に、 -100mV の保持電流から 0mV への 20ms の1回の脱分極パルスに誘発された。まず、電流を安定化させるために繰り返しパルス処理しながら、細胞を、 0.2% BSAで16分間インキュベートし、 0.2% BSAの存在下、繰り返しパルス処理をしながら抗- $\text{Na}_v1.7$ 抗体と更に16分間インキュベートした。TTX ($2\mu\text{M}$)を、陽性コントロールとして記録の最後に含有させた。ヒト $\text{Na}_v1.7$ 抗体を、 0.2% BSAを含む細胞外記録溶液 (137mM NaCl , 4mM KCl , 1.8mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 , 10mM グルコース、 10mM HEPES , $\text{pH}=7.3$)で最終濃度 100nM 又は 300nM に希釈し

た。全ての抗体は、3日以上離れた日に、二重に試験を行った。チャンネルブロッキングは、複数の遮断実験にわたり平均され、抗体の非存在下、電流束に対する抗体及び0.2% BSAの存在下に観察された電流束の阻害割合として測定した。表20に示すように、抗体は、ヒトNa_v1.5電流の顕著な阻害を示さなかった。

【0220】

【表26】

表20

Ab PID	試験数	抗体濃度 (nM)	hNa _v 1.5電流の遮断割合 (平均 ± SEM)
H4H362B	5	300	6 ± 4
H1H801N	8	300	4 ± 2
H1H875N	10	300	4 ± 2
H1H1003B	7	300	5 ± 3
H4H1025P	4	300	0 ± 0
H4H441B	10	300	10 ± 4
	8	100	4 ± 2
H1M836N	15	300	10 ± 3
	12	100	6 ± 3
H1M839N	9	300	7 ± 3
	13	100	6 ± 2

【実施例10】

【0221】

後根神経節(DRG)侵害受容ニューロンにと結合する抗体

Na_v1.7は、後根神経節(DRG)侵害受容ニューロンで優先的に発現する。選択したヒト抗-Na_v1.7抗体を、ヒトNa_v1.7を発現するように遺伝子操作されたマウス(Scn9a^{hu/+})、ヒト細胞外孔ループを含むキメラNa_v1.7を発現するように遺伝子操作されたマウス(Scn9a^{hu3-1/hu3-1})及び野生型マウス(Scn9a^{+/+})から収集したDRGニューロンに対する結合について評価した。

【0222】

手短に言うと、腰部DRGを、Scn9a^{hu/+}、Scn9a^{hu3-1/hu3-1}、及びScn9a^{+/+}マウスから収集した。単離後、細胞を、ポリ-DL-オルニチン(0.1mg/mL)及びラミン(5µg/mL)で処理した96ウェルプレートに、5.5 × 10⁴細胞/ウェルの密度で入れ、96.5%空気及び3.5% CO₂で37°Cでインキュベートした。50ng/mLの神経成長因子、100U/mLのペニシリン/ストレプトマイシン、MEMビタミン類、及び10%の加熱不活性ウシ胎児血清を補充したDMEMの培地中に維持した。

【0223】

培地中で3~8日後、ニューロンを、PBS中、4% PFA及び4%ショ糖内に30分間固定し、10% NGS及び0.1% Triton X-100内で透過処理した。次いで、ニューロンを、66nM(1µg)の抗-Na_v1.7抗体と4°Cで一晩インキュベートした。次の日、ニューロンを、1:400に希釈した、抗-ヒトAlexa Fluor(登録商標)594(Invitrogen)結合二次抗体中、室温で1時間

インキュベートした。蛍光顕微鏡を用いて撮像した。

【0224】

DRGに対する抗- $\text{Na}_v1.7$ ヒト抗体の結合特異性を、免疫細胞化学を用いたペプチド競合実験により測定した。ヒトの配列由来の $\text{Na}_v1.7$ 又は $\text{Na}_v1.5$ のドメイン1の細胞外ループ3 (EC3-1) 及びドメイン3の細胞外ループ3 (EC3-3) を表わす合成ペプチド (Celtek Bioscience, LLC, 1515 Elm Hill Pike, Suite 104, Nashville, TN 37210, USA) を合成し、抗- $\text{Na}_v1.7$ 抗体の結合プロファイルの特徴付けを行った。DRGに対する抗体結合を、過剰のペプチドの存在下における結合と比較した。DRGニューロンに対する $\text{Na}_v1.7$ 抗体の結合は、Elisa及びBiacoreにより測定したペプチドに対する異種間結合と一致していた (表21A及び21B)。

10

【0225】

【表 27】

表 21A

Ab PID	免疫源	Immuno Scn9a hu/+ マウス	Immuno Scn9a hu3-1/hu3-1 マウス	Immuno Scn9a +/- マウス	Nav1.7 3-1 野生型 ペプチド	Nav1.7 3-3 野生型 ペプチド	Nav1.5 3-1 野生型 ペプチド	Nav1.5 3-3 野生型 ペプチド
H4H391B	3-1	+	+	-	+	-	-	-
H4H439B	3-1	-	-	-	-	-	-	-
H1M875N	3-1	-	-	+	-	-	-	-
H4H468B	3-3	+	-	-	-	+	-	-
H1H1006B	3-1	+	+	+	+	-	-	-
H4H852N	3-3	+/-	-	-	-	-	-	-

表 21B

Ab PID	免疫源	ELISA/Biacore ペプチドに対する結合			
		ヒト	アカガザル	ラット	マウス
H4H391B	3-1	+/+	+/+	弱/-	弱/-
H4H439B	3-1	+/+	+/+	+/+	-/-
H1M875N	3-1	+/+	+/+	+/+	+/+
H4H468B	3-3	+/+	+/+	+/>200nM	-/-
H1H1006B	3-1	+/+	+/+	+/+	+/+
H4H852N	3-3	+/>200nM	+/+	+/-	-/-

【実施例 11】

【0226】

カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) 放出アッセイ

神経ペプチド、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は、刺激に反応して、ペプチド性 A (及び C 線維侵害受容ニューロンの末梢及び脊髄の末端から放出される。神経ペプチドの放出は、痛覚をもたらす神経性炎症、肥満細胞の脱顆粒、及び他の炎症性反応

10

20

30

40

50

を開始する。プロスタグランジンE₂、ブラジキニン、セロトニン、ヒスタミン及びカプサイシン等の炎症性メディエータは、インビトロ及びインビボで侵害受容DRGを直接感作及び刺激する。DRGの感作及び活動電位の発火は、CGRPを放出し、それによってDRG侵害受容機能を測定するための手段として機能する、異なる炎症性メディエータによりインビトロで達成され得る。

【0227】

インビトロにおけるDRGのCGRPの炎症性上清誘発性放出においてNa_v1.7がどのように役割を果たしているかを決定するためにコントロールとして、2種の公知のナトリウム電位開口型チャネル阻害剤(テトロドトキシン(TTX)及びリドカイン)を試験した。

10

【0228】

手短に言うと、培養4~8日のDRGをアッセイ緩衝液で1度洗浄し、37℃に維持した。炎上性上清をアッセイ緩衝液(例えば、10µMプロスタグランジン、10µMブラジキニン、及び1µMカプサイシン)中に調製した。ニューロンを、10nM TTX又は5mMリドカインのいずれかと20分間インキュベートし、次いで、炎症性上清又は10nM TTX及び炎症性上清、又は5mMリドカイン及び炎症性上清を用いて20分間刺激した。炎症性上清で刺激する前に、ニューロンを阻害剤と20分間プレインキュベートすると、CGRPの炎症性上清誘導性放出が顕著に増大することが示された。しかし、ニューロンを阻害剤及び炎症性上清と20分間同時インキュベートすると、阻害剤は、CGRPの炎症性上清誘導性放出に影響しない。

20

【0229】

他の毒素、ProTx-IIを用いて同様の実験を実施した。20nMで、ProTx-IIはNa_v1.7をほとんど阻害する。この結果は、ProTx-IIとの20分間のプレインキュベーションがCGRPの放出を顕著に増大するが、ProTx-IIを炎症性上清に添加しても、炎症性上清が誘導するCGRP放出に影響しないことを示している。

【0230】

炎症性上清誘導性のCGRP放出におけるNa_v1.7阻害剤の影響は、以下に示すように、Scn9a^{+/+}、Scn9a^{hu3-1/hu3-1}、及びScn9a^{hu/+}マウスから単離したDRGにおいても示された。

30

【0231】

他の実験においては、Scn9a^{+/+}から単離したDRGにおけるインビトロでのCGRP放出についてのそれらの影響について、300nM濃度で、選択された抗-Na_v1.7ヒト抗体の試験を行った。結果は、炎症性上清による刺激前に、抗-Na_v1.7で20分間プレインキュベートすると、CGRPの放出が顕著に増大することを示した。

【0232】

同様の実験において、Scn9a^{+/+}、Scn9a^{hu3-1/hu3-1}、及びScn9a^{hu/+}マウスから単離したDRGにおけるインビトロでのCGRP放出についてのそれらの影響について、選択された抗-Na_v1.7ヒト抗体-試験を行った。H4H852N及びH4H439Bのようなマウスと交差しないヒトNa_v1.7抗体、H4H439B及びH1H1006Bのようなドメイン1の細胞外ループ3(EC3-1)と結合する抗体、ドメイン3の細胞外ループ3(EC3-3)と結合する抗体の試験により、DRGニューロンにおけるNa_v1.7チャネルとの特異的結合が示された。表22に示すように、インビトロでのCGRP放出アッセイにおけるNa_v1.7抗体の影響は、ELISA及びBiacoreにより測定されたペプチドに対する異種間結合と相関している。これらのデータは、生成されたNa_v1.7抗体が、DRGニューロン中でヒトNa_v1.7チャネルと特異的に結合し機能的であることを示唆している。

40

【0233】

【表 2 8】

表 2 2

Ab PID	ループ 特異性	CGRP Scn9a Hu/+ DRG	CGRP Scn9a Hu3-1/ Hu3-1 DRG	CGRP Scn9a +/- DRG	ELISA/Biacore ペプチドに対する結合		
					ヒト	ラット	マウス
H4H439B	3-1	+	+	-	+/+	+/+	-/-
H1M875N	3-1	ND	ND	+	+/+	+/+	+/+
H1H1006B	3-1	+	+	+	+/+	+/+	+/+
H4H852N	3-3	+	-	-	+>200nM	+/-	-/-

10

【実施例 1 2】

【0 2 3 4】

急性侵害受容のラットモデルにおける、インビボでの抗 - $Na_v 1.7$ 抗体の効果

ラットにおける、侵害受容性疼痛の効果を判定するため、特定の抗 - $Na_v 1.7$ 抗体の効果を評価するために試験を実施した。REGN1063 (H4H439P) 及び REGN1064 (H4H468P) と命名された抗 - $Na_v 1.7$ 抗体、並びに対照のイソ型適合抗体 REGN646 を、50 mg / kg の用量で腹腔内注射を介して投与した。機

20

【0 2 3 5】

動物

オスのスプラーグドローラット (Hsd : Sprague - Dawley (登録商標) SD (登録商標) TM, Harlan, Indianapolis, Indiana, U.S.A.) を、ケージあたり 3 匹収容し、試験開始前に施設の環境に順応させ、摂食状態で投与した。全ての試験は、盲検法で行った。

【0 2 3 6】

治療前のベースライン評価後、動物を、処置群の平均値がほぼ等しくなるように、足の圧力の終点のベースライン応答しきい値に基づいて処置群に割り当てた。手短に言うと、上記基準を満たした全ての動物は、最低から最高まで応答しきい値によってランク付けされ、以下のように治療が割り当てられた (例えば、A、B、C、D、E、B、C、D、E、A、C、D、E、A、B、D、E、A、B、C 等)。その後、一連の所定の動物全体の治療の分布が予測可能ではなかったように、動物は、その後、治療時間に基づいて順々に投与された。

30

【0 2 3 7】

抗 - $Na_v 1.7$ 候補抗体

本試験において、抗体はリン酸緩衝食塩水 (Sigma Phosphate Buffered Saline 10x Concentrate) を食塩水 0.9% (Phoenix Pharmaceuticals, Inc.) で 1 : 9 vol : vol で希釈することにより個々に調製した。手短に言うと、凍結保存した抗体を室温に戻した後、あらかじめ標識してある濃度から 50 mg / d mL の濃度に調整した。全ての抗体は、個々の動物の体重を基準に、1 mL / kg の用量容積で腹腔注入により投与した。

40

【0 2 3 8】

機械的しきい値試験

機械的刺激に対するベースライン及び治療後足逃避 (paw withdrawal) しきい値を、Randall - Selitto 足圧力装置 (Ugo Basile Analgesymeter, model # 7200) を用いて測定した。この装置は、直線的に増加する機械的な力を発生する。3 番目及び 4 番目の中足間に配置されたドーム状

50

のプラスチックチップにより後ろ足の足底表面に刺激が適用される。組織の損傷を避けるため、カットオフ圧を250gで設定した。機械的しきい値は、足逃避、奮闘、及び/又は発生を含む、第1の疼痛行動のグラムで表す力として定義された。平均値及び平均値の標準誤差(SEM)は、各処置群について負傷した足について決定した。

【0239】

熱しきい値テスト

有害な刺激に対するベースライン及び治療後の足逃避潜伏時間は、足底試験装置(IITC, Woodland Hills, CA, モデル番号390)を使用した、放射熱試験(Hargreaves, K.ら, 1988, Pain, Vol. 32(1): 77-88)を用いて測定した。刺激強度は、最大出力を30%に設定し、カットオフ時間は45秒に設定した。ラットを 28 ± 2 に加温したガラス台に置き、各試験セッションの前に、最低15分間、試験室に馴化させた。熱刺激は、足の足底表面に適用し、足あたり、ラット毎に3つの読み取り値を、各試験セッションにおいて取得した。熱しきい値は、刺激された足の侵害防御足逃避、足を引っ込めること、足を咬むこと、及び/又は足をなめることを含む、最初の疼痛行動を秒で表した潜伏時間と定義されている。動物あたりの各足の読み取りを、それぞれ個々の時点で平均し、平均及び平均の標準誤差(SEM)は、各処置群について、左右の足(プールされた値)について決定した。

【0240】

データ分析

試験品が足逃避しきい値又は熱侵害受容応答を大幅に変化させるかどうかを判断するために、対照の抗体(REGN646)を、所定の候補抗体、REGN1063(H4H439P)及びREGN1064(H4H468P)と比較し、各時点(治療後1、2、及び4時間)での対応のないt-検定を実施した。統計分析は、Prism™ 5.01(GraphPad, San Diego, CA, USA)を使用して実施した。

【0241】

結果

図2に示すように、候補抗体REGN1063(H4H439P)及びREGN1064(H4H468P)の50mg/kgでの腹腔内注射によって、対照抗体(REGN646)で処置した動物と比較し、注射後24又は48時間の機械的刺激に対する足逃避しきい値の大幅な変化はなかった(有意性を $p = 0.05$ に設定、対応のないt-検定)。示したものは、特定時点における、REGN646、REGN1063及びREGN1064で処置した動物についての足逃避しきい値の平均 \pm SEM($n = 8$)である。

【0242】

図3及び下記表23に示すように、候補抗体REGN1063(H4H439P)の50mg/kgの腹腔内注射によって、REGN646と比較し、注射後48時間での熱侵害受容しきい値の大幅な上昇が示された(+ : $p = 0.05$ 、対応のないt-検定)。REGN1064(H4H468P)は50mg/kgにおいて、投与後いかなる時点でも熱侵害受容しきい値を大幅に変化させなかった。示したものは、特定時点における、REGN646、REGN1063及びREGN1064で処置した動物についての逃避しきい値に対する潜伏時間の平均 \pm SEM($n = 8$)である。

【0243】

結論

候補の抗-Na_v1.7抗体、REGN1063及びREGN1064の投与により(50mg/kg, i.p.)、対照抗体、REGN646と比較し、試験を行った以下の用量でいかなる時点においても、機械的刺激しきい値に影響を及ぼさないことが示された。しかし、REGN1063の投与(50mg/kg, 腹腔内投与)は、投与48時間後の時点で、対照のREGN646と比較し、熱侵害受容しきい値が顕著に上昇していた。対照抗体と比較した、熱侵害受容しきい値におけるREGN1063及びREGN1064の効果を示すデータを下記表23(* $p = 0.05$)及び図3に示す。

【0244】

【表 2 9】

表 2 3

	ベースライン		24 時間		48 時間	
	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM
NEG CTRL	17.1	1.5	15.9	0.87	14.2	0.70
REGN1063 (H4H439P)	16.5	1.5	17.6	1.2	17.7*	1.5
REGN1064 (H4H468P)	17	1.4	19	2.1	15.7	1.2

10

【実施例 1 3】

【0 2 4 5】

カラギーナン疼痛モデルにおけるインビボでの疼痛の減少に対する抗 - $Na_v 1.7$ 抗体の効果

海藻抽出物から得られた多糖類、 α -カラギーナンは、注射 3 ~ 5 時間に、ピーク効果を伴う強固な炎症及び侵害受容過敏症をもたらす。選択した抗 - $hNa_v 1.7$ 抗体を、 α -カラギーナン誘発性熱侵害受容過敏症を減少させる能力について試験を行う。

【0 2 4 6】

C57BL/6 を、試験を行う抗体毎、8 匹のマウスの群に分ける。全てのマウスに、約 50 mg/kg の抗体を皮下注射により投与する。C57BL/6 マウスの対照群には、試験抗体として、同じイソ型の無関係の抗体を投与する。1% ~ 2% の α -カラギーナン溶液（生理食塩水に溶解）25 μ L を、左の後ろ足の足底側に皮下（s.c.）注射により、マウスに、末梢性炎症を起こす。 α -カラギーナン注射の前、1 及び 3 時間後のマウスの後ろ足熱感受性は、有害な熱刺激から後ろ足を逃避する動物の潜伏時間を測定する、ハーグリーブス装置（IITC Life Science, Inc.）を使用して測定する。各マウスについて、3 回の測定を別々に行い、各群の平均の熱侵害受容を計算する（平均 \pm SEM）。一元配置分散分析（ANOVA）を使用し、各群の平均値を、対照群と比較して統計的に比較する。浮腫の存在量も、 α -カラギーナン注射の前及び 3 時間後に、ノギスにより後ろ足の厚さを測定することによって測定する。実験の最後に血液を集め、循環する抗 - $hNa_v 1.7$ 抗体の濃度（血清 Ab）を、標準的な ELISA アッセイを使用して測定する。手短かに言えば、プレートを、ヤギ抗 - ヒト Fc 抗体（Sigma - Aldrich）でコーティングし、血清 Ab を捕獲する。次いで、プレートに血清を加え、捕獲した抗 - $hNa_v 1.7$ 抗体を、セイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）が結合したヤギ抗 - ヒト IgG 抗体（Sigma - Aldrich）を使用し、比色基質により測定する。

20

30

【0 2 4 7】

$Na_v 1.7$ 活性を遮断又は中和するのに十分に効果的な量の抗 - $Na_v 1.7$ 抗体を受け入れた動物は、同じイソ型の無関係の抗体を受け入れた動物と比較して、熱感受性が大幅に減少することを示すであろう。

40

【実施例 1 4】

【0 2 4 8】

二重特異性抗 - $Na_v 1.7$ 抗体の生成

$Na_v 1.7$ 特異的チャネル遮断薬は、ループ特異的可溶性領域が、単一の結合分子内で二重ループの特異性を付与するために一緒に連結された、二重特異性の形式（二重特異性）で生成される。適切に設計された二重特異性は、 $Na_v 1.7$ のチャネル特異性及び結合親和性の両方を向上させることにより、全体的なチャネル遮断効果を増強するはずである。個々のループ（例えば、EC3-1、EC-3-3、又はパドル領域 2-1 $Na_v 1.7$ ループ特異的バインダー）についての特異性を有する可変領域又は 1 つのループ内

50

で異なる領域と結合し得る可変領域は、各可変領域が個々のループ又は1つのループ内の異なる領域に同時に結合できる、構造的な骨格で対になっている。二重特異性について一例においては、1つのループ特異性を有するバインダー由来の重鎖可変領域 (V_H) は、 V_H の元の特異性を破壊することなく、元の V_H と対を形成することのできる、非類似の V_L パートナーを同定するための第2のループ特異性を有する一連のバインダー由来の軽鎖可変領域 (V_L) と再結合している。このように、単一の V_L 断片 (例えば、 V_L1) は、2つの異なる V_H ドメイン (V_H1 及び V_H2) と結合し、2つの結合「アーム」 ($V_H1 - V_L1$ 及び $V_H2 - V_L1$) からなる二重特異性を生成することができる。単一の V_L 断片を使用すると、システムの複雑さが低減し、それによって、簡略化され、クローニング、発現及び二重特異性を生成するために使用される使用プロセスの効率が增大する。

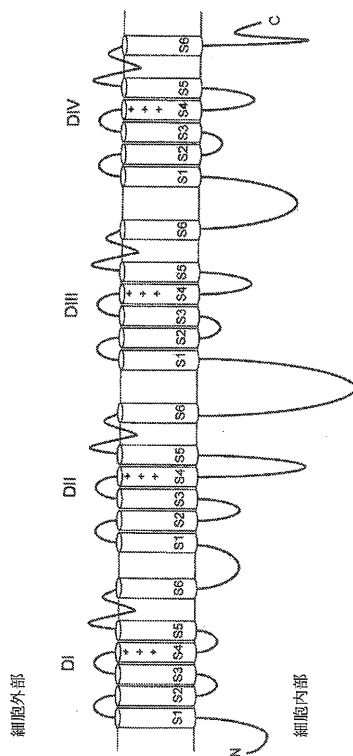
10

【0249】

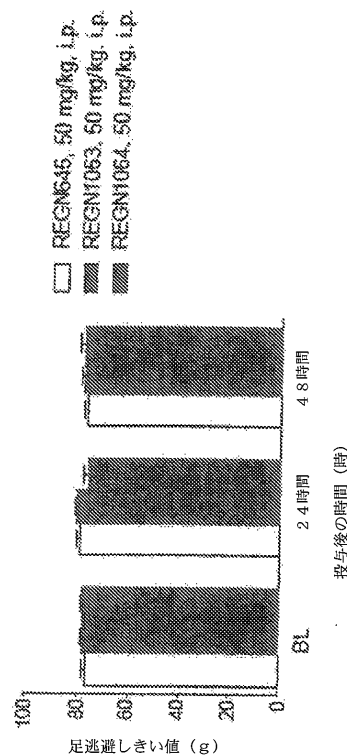
二重特異性バインダーは、上記抗体のアッセイのいずれかにおける、 $Na_v1.7$ の結合及び機能的遮断について試験を行う。例えば、 $Na_v1.7$ 発現細胞に対する二重特異性抗体の結合は、細胞に結合した抗- $Na_v1.7$ 二重特異性抗体を認識する、蛍光標識した二次抗体を使用してフローサイトメトリーにより測定する。異なる種変異体内、又は異なる種変異体間の種々の $Na_v1.7$ ループの交差反応性を、異なるループを表わす合成ペプチドがマイクロタイタープレートのウェルにコーティングされているELISA結合アッセイを用いて評価し、二重特異性の結合は、二次検出抗体を使用することにより測定する。また、二重特異性抗体またはペプチドのそれぞれが捕捉されるセンサー表面にわたりペプチドまたは二重特異性抗体を流すことにより、リアルタイムのペプチドの抗体に対する結合相互作用を測定する表面プラズモン共鳴実験を用いてループペプチドによる結合実験も実施することができる。二重特異性による $Na_v1.7$ チャネルの機能的遮断は、二重特異性が、 $Na_v1.7$ 発現細胞の電圧刺激脱分極を阻害するパッチクランプアッセイを用いて測定される。上述の急性侵害受容及びカラギーナンモデルを含むインビボモデルは、インビボでの効果を評価するために使用されるであろう。

20

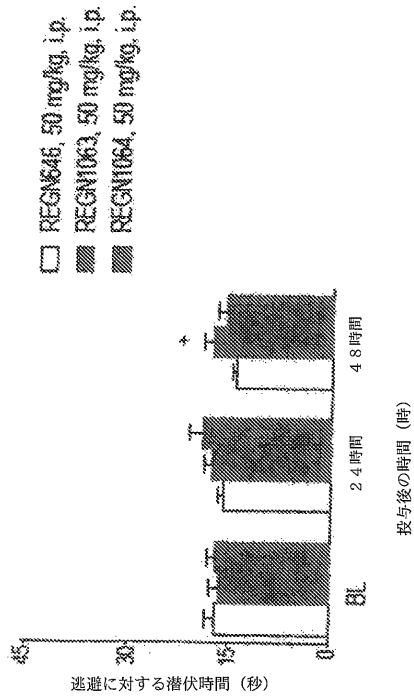
【図1】



【図2】



【 図 3 】



【 配列表 】

0006533512000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 リン・マクドナルド
アメリカ合衆国ニューヨーク州10605・ホワイトプレーンズ・ゲッドニーウェイ16
- (72)発明者 アンドリュー・ジェイ・マーフィー
アメリカ合衆国ニューヨーク州10520・クロトン・オン・ハドソン・ニュートンコート10
- (72)発明者 ニコラス・ジェイ・パパドポロス
アメリカ合衆国ニューヨーク州12540・ラグレンジビル・ヘリテイジレーン59
- (72)発明者 ニール・スタール
アメリカ合衆国ニューヨーク州10512・カーメル・ケントショアドライブ48
- (72)発明者 ニコール・アレッサンドリ・ヘイパー
アメリカ合衆国ニューヨーク州10573・ライブルック・ボンウィットロード15

審査官 齊藤 貴子

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2011/0307966(US, A1)
特表2013-507980(JP, A)
特表2013-508443(JP, A)
Alessandri-Haber, N. et al., Genetically engineered mice expressing human Nav1.7 (SCN9a) sodium channels; a critical tool for the validation of antibodies specific to human Nav1.7 channels, Society for Neuroscience Abstract Viewer and Itinerary Planner, 2011年, Vol. 41, program No. 275.26/LL22, [retrieved on 12/22/2017], URL, <http://www.abstractsonline.com/Plan/ViewAbstract.aspx?sKey=ad34eaf8-76fd-4966-9706-b70a6f9f25c6&cKey=0212387d-34ee-46f6-832a-5337124762cd&mKey=8334be29-8911-4991-8c31-32b32dd5e6c8>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00 - 19/00
UniProt/GeneSeq
BIOSIS/CAPLUS/MEDLINE/EMBASE
/WPIDS(STN)
PubMed
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)