

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-531902

(P2012-531902A)

(43) 公表日 平成24年12月13日(2012.12.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/40 (2006.01)	C 0 7 K 16/40 Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 56 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-517907 (P2012-517907)	(71) 出願人	397009934
(86) (22) 出願日	平成22年7月1日 (2010.7.1)		グラクソ グループ リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成24年2月27日 (2012.2.27)		GLAXO GROUP LIMITED
(86) 国際出願番号	PCT/US2010/040724		イギリス ミドルセックス ユービー6
(87) 国際公開番号	W02011/002968		OEヌエヌ グリーンフォード パークレ
(87) 国際公開日	平成23年1月6日 (2011.1.6)		ー アベニュー グラクソ ウェルカム
(31) 優先権主張番号	61/249, 757		ハウス (番地なし)
(32) 優先日	平成21年10月8日 (2009.10.8)		Glaxo Wellcome Hous
(33) 優先権主張国	米国 (US)		e, Berkeley Avenue G
(31) 優先権主張番号	61/222, 521		reenford, Middlesex
(32) 優先日	平成21年7月2日 (2009.7.2)		UB6 ONN, Great Brita
(33) 優先権主張国	米国 (US)		in
		(74) 代理人	100117787
			弁理士 勝沼 宏仁
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリペプチドおよび治療の方法

(57) 【要約】

ヒトADAMTS 5に結合することができる少なくとも1つの第1の免疫グロブリン可変ドメインを含んでなる単離した抗原結合タンパク質を本明細書に提供する。モノクローナル抗体である本発明の抗原結合タンパク質、前記抗原結合タンパク質を含んでなる医薬組成物および治療法も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト A D A M T S 5 に結合することができる少なくとも 1 つの第 1 の免疫グロブリン可変ドメインを含んでなる、単離された抗原結合タンパク質。

【請求項 2】

前記抗原結合タンパク質が、抗体またはその断片である、請求項 1 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 3】

前記抗体が、モノクローナル抗体またはその断片である、請求項 1 または 2 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 4】

前記モノクローナル抗体またはその断片が、マウス、キメラ、ヒト化、または完全ヒトである、請求項 3 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 5】

前記抗原結合タンパク質が、少なくとも 1 つの相補性決定領域を含んでなる、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 6】

前記抗原結合タンパク質が、C D R H 1、C D R H 2、および C D R H 3 を含んでなる重鎖と、C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3 を含んでなる軽鎖とを含んでなるモノクローナル抗体であって、

前記重鎖の相補性決定領域 (C D R) が、

a) アミノ酸配列 D A W M D と少なくとも約 80 % の配列同一性を有する C D R H 1 ;

b) アミノ酸配列 E I R H K A N D H A I F Y X E S V K G と少なくとも約 70 % の配列同一性を有する C D R H 2 ; および

c) アミノ酸配列 T Y Y Y G S S Y G Y C D V または P F A Y と少なくとも約 70 % の配列同一性を有する C D R H 3 ;

の群から選択され、かつ

前記軽鎖の相補性決定領域が、

d) アミノ酸配列 K A S Q S V G T T I V または R T S E N I Y S Y L A と少なくとも約 70 % の配列同一性を有する C D R L 1 ;

e) アミノ酸配列 N A K T L A E または S A S N R X T と少なくとも約 70 % の配列同一性を有する C D R L 2 ; および

f) アミノ酸配列 Q Q Y S S Y P F T または Q H H Y G T P W T と少なくとも約 70 % の配列同一性を有する C D R L 3 ;

の群から選択される、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 7】

前記ポリペプチドが、C D R H 1、C D R H 2、および C D R H 3 を含んでなる重鎖と、C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3 を含んでなる軽鎖とを含んでなるモノクローナル抗体であって、

前記重鎖の相補性決定領域 (C D R) が、

(a) C D R H 1 が、アミノ酸配列 D A W M D である ;

(b) C D R H 2 が、アミノ酸配列 E I R H K A N D H A I F Y A E S V K G、E I R N K A N N H A R H Y A E S V K G、E I R H K A N D Y A I F Y D E S V K G、E I R H K A N D H A I F Y D E S V K G、D I R N T A N N H A T F Y A E S V K G、または E I R H K A N D H A I F Y D E S V K G から選択される ; および

(c) C D R H 3 が、T Y Y Y G S S Y G Y C D V または P F A Y である ; から選択され、かつ

前記軽鎖の相補性決定領域が、

(d) C D R L 1 が、アミノ酸配列 K A S Q S V G T T I V、R T S E N I Y S Y L A、または K A S Q N V G T A V V から選択される ;

10

20

30

40

50

(e) C D R L 2 が、アミノ酸配列 N A K T L A E、S A S N R H T、S A S T R Y T、または S A S N R Y T から選択される；および

(f) C D R L 3 が、アミノ酸配列 Q Q Y S S Y P F T、Q H H Y G T P W T、Q Q Y V N Y P F T、または Q Q Y T S Y P F T から選択される；
から選択される、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 8】

C D R H 3 が、アミノ酸配列 P F A Y を含んでなる、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 9】

前記ポリペプチドが、F a b または F (a b)₂ 断片である、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

10

【請求項 10】

前記第 1 の免疫グロブリン可変ドメインが、一本鎖可変ドメインである、請求項 1 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 11】

前記抗原結合タンパク質が、第 2 の抗原に結合することができる第 2 の免疫グロブリン可変ドメインをさらに含んでなる、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 12】

前記第 2 の免疫グロブリン可変ドメインが、ヒト血清アルブミン、A D A M T S 4、N G F、O S M、T N F - α、I L - 6、V I P、T R P V 1、T R P V 4、A D A M T S 1、アグリカン、コラーゲン I I、R A N K L、シンデカン 4、ヘッジホッグ、および／または I L - 1 の群から選択される少なくとも 1 つの抗原に結合する、請求項 11 に記載の抗原結合タンパク質。

20

【請求項 13】

ヒト A D A M T S 5 に対して約 2.5×10^{-10} M 以下の解離定数 K D (o f f) によって特徴づけられる、請求項 1 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 14】

前記抗原結合タンパク質が、A D A M T S 5 の少なくとも 1 つの活性を阻止する、かつ／または減少させる、請求項 1 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

30

【請求項 15】

前記抗原結合タンパク質が、G l u³⁷³ - A l a³⁷⁴ 切断部位における A D A M T S 5 によるアグリカンの切断を阻止する、かつ／または減少させる、請求項 1 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 16】

前記抗原結合タンパク質が、動物に投与される時、軟骨を透過することができる、請求項 1 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 17】

請求項 1 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

40

【請求項 18】

請求項 17 に記載のポリヌクレオチドを含んでなる、宿主細胞。

【請求項 19】

請求項 1 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の抗原結合タンパク質の少なくとも 1 つを含んでなる、医薬組成物。

【請求項 20】

請求項 1 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の第 1 の抗原結合タンパク質と、第 2 のモノクローナル抗体とを含んでなる、医薬組成物。

【請求項 21】

前記第 2 のモノクローナル抗体が、A D A M T S 4、A D A M T S 5、N G F、O S M

50

、TNF- α 、IL-6、VIP、TRPV1、TRPV4、ADAMTS1、アグリカン、コラーゲンII、RANKL、および／またはIL-1の群から選択される抗原に結合する、請求項20に記載の医薬組成物。

【請求項22】

治療を必要としている患者の治療方法であって、請求項19～21のいずれか1項に記載の医薬組成物の少なくとも一回用量を前記患者に投与することを含んでなる、方法。

【請求項23】

前記患者が軟骨の疾患を患っている、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記患者が、癌、疼痛、慢性疼痛、神経因性疼痛、術後の疼痛、変形性関節症、スポーツ外傷、びらん性関節炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、ライム関節炎、若年性関節炎、強直性脊椎症、神経痛、神経障害、痛覚、神経損傷、虚血、神経変性、炎症性疾患、軟骨変性、咽頭、気管、耳管、椎間板、靱帯、腱、関節包、または骨の発達に影響を与える疾患、椎間板変性、骨減少症、または歯周病、急性関節損傷、および／または関節破壊に関連する疾患の群から選択される少なくとも1つの疾患を患っている、請求項23に記載の方法。

10

【請求項25】

前記患者が、変形性関節症を患っている、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記医薬組成物の少なくとも一回用量の投与が、前記患者における軟骨分解を減少させる、請求項22～25のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項27】

前記医薬組成物の少なくとも一回用量の投与が、前記患者におけるアグリカン切断を阻害する、かつ／または減少させる、請求項22～26のいずれか1項に記載の方法。

【請求項28】

前記医薬組成物が、静脈内投与、筋肉内投与、関節内投与、皮下投与、経口投与、鼻腔内投与、および／または呼吸吸入器により投与される、請求項22～27のいずれか1項に記載の方法。

【請求項29】

CDRH1がDAWMD（配列番号2）であり、CDRH2がEIRNKANNHARHYAESVKG（配列番号13）であり、CDRH3がTYYYGSSYGYCDV（配列番号18）であり、CDRL1がRTSENIYSYLA（配列番号20）であり、CDRL2がNAKTLE（配列番号22）であり、CDRL3がQHGYGTPWT（配列番号27）である、6つのCDRを含んでなる、単離されたモノクローナル抗体。

30

【請求項30】

CDRH1がDAWMD（配列番号2）であり、CDRH2がEIRHKANDHAIFYDES VKG（配列番号15）であり、CDRH3がPFAY（配列番号5）であり、CDRL1がKASQSVGTTIV（配列番号19）であり、CDRL2がSASN RHT（配列番号23）であり、CDRL3がQQYTSYPFT（配列番号29）である、6つのCDRを含んでなる、単離されたモノクローナル抗体。

40

【請求項31】

請求項29または請求項30に記載の抗体と競合的にヒトADAMTS5と結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項32】

結合定数（Ka）を測定すると、少なくとも約 5×10^4 L／モルの親和性でヒトADAMTS5の中和エピトープに結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項33】

前記抗体が、ヒト定常領域を含んでなる、請求項29～31のいずれか1項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

50

【請求項 34】

免疫グロブリンクラスが I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、または I g Mである、請求項 1 に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 35】

前記断片が、F a b、F a b'、F (a b')₂、および F v からなる群から選択される、請求項 29～34 のいずれか 1 項に記載の抗原結合断片。

【請求項 36】

配列番号 76、80、116、118、120、122、124、126、128、136、138、140、142、および 144 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体 V_H ドメインを含んでなる、抗原結合タンパク質またはその断片。

10

【請求項 37】

配列番号 78、82、130、132、134、および 146 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体 V_L ドメインを含んでなる、抗原結合タンパク質またはその断片。

【請求項 38】

請求項 36 に記載の抗体 V_H ドメインおよび請求項 37 に記載の V_L ドメインを含んでなる、抗原結合タンパク質またはその断片。

【請求項 39】

配列番号 76 を含んでなる抗体 V_H ドメインおよび配列番号 78 を含んでなる V_L ドメインを含んでなる、請求項 38 に記載の抗原結合タンパク質またはその断片。

20

【請求項 40】

配列番号 80 を含んでなる抗体 V_H ドメインおよび配列番号 82 を含んでなる V_L ドメインを含んでなる、請求項 38 に記載の抗原結合タンパク質またはその断片。

【請求項 41】

配列番号 116、118、120、122、124、126、および 128 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体 V_H ドメイン、ならびに配列番号 130、132、および 134 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる V_L ドメインを含んでなる、請求項 38 に記載の抗原結合タンパク質またはその断片。

【請求項 42】

配列番号 136、138、140、142、および 144 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体 V_H ドメイン、ならびに配列番号 146 を含んでなる V_L ドメインを含んでなる、請求項 38 に記載の抗原結合タンパク質またはその断片。

30

【請求項 43】

配列番号 68、72、84、86、88、90、92、94、96、104、106、108、110、112、および 158 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体重鎖を含んでなる、抗原結合タンパク質またはその断片。

【請求項 44】

配列番号 70、74、98、100、102、および 114 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体軽鎖を含んでなる、抗原結合タンパク質またはその断片。

【請求項 45】

配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 43 に記載の抗体重鎖、および請求項 44 に記載の抗体軽鎖を含んでなる、抗原結合タンパク質またはその断片。

40

【請求項 46】

配列番号 68 を含んでなる抗体重鎖および配列番号 70 を含んでなる抗体軽鎖を含んでなる、請求項 45 に記載の抗原結合タンパク質またはその断片。

【請求項 47】

配列番号 72 を含んでなる抗体重鎖および配列番号 74 を含んでなる抗体軽鎖を含んでなる、請求項 45 に記載の抗原結合タンパク質またはその断片。

【請求項 48】

50

配列番号 84、86、88、90、92、94、および 96 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体重鎖、ならびに配列番号 98、100、および 102 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体軽鎖を含んでなる、請求項 45 に記載の抗原結合タンパク質またはその断片。

【請求項 49】

配列番号 104、106、108、110、112、および 158 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体重鎖、ならびに配列番号 114 を含んでなる抗体軽鎖を含んでなる、請求項 45 に記載の抗原結合タンパク質またはその断片。

【請求項 50】

配列番号 76、80、116、118、120、122、124、126、128、136、138、140、142、および 144 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体 V_H ドメインをコードする、単離されたポリヌクレオチド。

10

【請求項 51】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 75、79、115、117、119、121、123、125、127、135、137、139、141、143、および 159 からなる群から選択される、請求項 50 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 52】

配列番号 78、82、130、132、134、および 146 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体 V_L ドメインをコードする、単離されたポリヌクレオチド。

20

【請求項 53】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 77、81、129、131、133、および 145 からなる群から選択される、請求項 52 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 54】

配列番号 68、72、84、86、88、90、92、94、96、104、106、108、110、112、および 158 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体重鎖をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 55】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 67、71、83、85、87、89、91、93、95、103、105、107、109、111、および 159 からなる群から選択される、請求項 54 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

30

【請求項 56】

配列番号 70、74、98、100、102、および 114 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体軽鎖をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 57】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 69、73、97、99、101、および 115 からなる群から選択される、請求項 56 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 58】

治療を必要としている患者の治療方法であって、請求項 1～16 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つの抗原結合タンパク質を前記患者に投与することを含んでなる、方法。

40

【請求項 59】

約 5×10^{-4} L/秒未満の解離定数 (K_d) でヒト ADAMTS5 の中和エピトープに結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アグリカナーゼ、特に、ADAMTS5 を阻害することによって、軟骨におけるアグリカンの分解を減少させる方法に関する。

【背景技術】

【0002】

50

軟骨は、様々な機械的および生化学的刺激に反応する軟骨細胞と呼ばれる特殊な細胞が集合した無血管組織である。軟骨は、関節の内張り、間質結合組織、および基底膜に存在し、I型コラーゲン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、およびラミニンを含んでなるいくつかの基質成分を含んでなる細胞外基質を含んでなる。

【0003】

正常な軟骨において、細胞外基質の合成は細胞外基質の分解によって相殺され、正常な基質の代謝回転をもたらす。受信信号（複数可）に応じて、次の反応は、（基質の産生および／もしくは修復を引き起こす）同化作用または（基質の分解、細胞のアポトーシス、機能喪失、および疼痛を引き起こす）異化作用のいずれかであり得る。

【0004】

圧迫障害および／または炎症性メディエーター（例えば、炎症性サイトカイン）への曝露に応答して、軟骨細胞は基質産生を減少させ、複数の基質分解酵素の産生を増加させる。基質分解酵素の例として、アグリカナーゼ（ADAMTS）と基質メタロプロテイナーゼ（MMP）が挙げられる。これらの酵素の活性が軟骨基質の分解をもたらす。アグリカナーゼ（ADAMTS）は、MMPと共に、関節軟骨に存在するアグリカン、すなわちプロテオグリカン集合体を分解する。変形性関節症（OA）の関節軟骨において、プロテオグリカン染色の喪失が、初期のOAの表面ゾーンおよび中等度から重度のOAにおける軟骨侵食の隣接領域に観察される。

【0005】

アグリカナーゼによって媒介されるアグリカンの異化は、アグリカンの中の特定の保存された部位で生じる。（配列番号44として図5に示す）ヒトADAMTS4および（配列番号43として図4に示す）ADAMTS5は、ネオエピトープARGSVIL（配列番号1）を産生するアミノ酸E373とA374の間でアグリカンを切断することが示されている。

【0006】

細胞外基質の過剰分解が、疼痛、慢性疼痛、神経因性疼痛、術後の疼痛、関節リウマチ、変形性関節症、スポーツ外傷、びらん性関節炎、強直性脊椎症、神経痛、神経障害、痛覚、神経損傷、虚血、神経変性、軟骨変性、脳卒中、失禁、炎症性疾患、過敏性腸症候群、歯周病、異常な血管新生、腫瘍の浸潤、および転移、角膜潰瘍、糖尿病の合併症を含んでなる多くの疾患および病状の発病に関与している。

【0007】

従って、アグリカナーゼ活性および軟骨分解を阻害することができる化合物に対するニーズがある。

【発明の概要】

【0008】

本発明は、ヒトADAMTS5に結合することができ、かつ／またはヒトADAMTS5を中和することができると少なくとも1つの可変ドメインを含んでなる単離したポリペプチドを提供する。

【0009】

本発明のポリペプチドをコードする単離したポリヌクレオチドも提供する。

【0010】

本発明の少なくとも1つのポリペプチドを含んでなる医薬組成物も提供する。

【0011】

本発明の医薬組成物を用いて、軟骨の疾患を患っている患者を治療する方法を本明細書に提供する。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】ADAMTS5mAbによる、ARGSVIL（配列番号1）ネオエピトープ生成のインビトロ阻害を示すグラフである。

【図2】7B4．1E11マウスmAbによる、ARGSVIL（配列番号1）ネオエピ

10

20

30

40

50

トープ生成の濃度依存的なインビトロ阻害を示すグラフである。

【図 3】選択した A D A M T S 5 抗体で治療したマウス対インビボ対照のマウスの全関節スコアの平均を示すグラフおよび関節の写真である。

【図 4】ヒト A D A M T S 5（配列番号 4 3）のアミノ酸配列である。

【図 5】ヒト A D A M T S 4（配列番号 4 4）のアミノ酸配列である。

【図 6】ヒト化抗 A D A M T S 5 抗体の組換え抗原への結合を示すグラフである。

【図 7】ヒト化抗 A D A M T S 5 抗体の組換え抗原への結合を示すグラフである。

【図 8】ヒト化抗 A D A M T S 5 抗体の組換え抗原への結合を示すグラフである。

【図 9】ヒト化抗 A D A M T S 5 抗体の組換え抗原への結合を示すグラフである。

【図 10】A D A M T S 5 活性の阻害率（％）を示すグラフである。

10

【図 11】A D A M T S 5 活性の阻害率（％）を示すグラフである。

【図 12】精製した抗 A D A M T S 5 抗体の組換え抗原への結合を示すグラフである。

【図 13】構造モデルが予測する A g / A b 相互作用部位を示す表およびモデル図である。

。

【発明の具体的説明】

【0013】

「ポリヌクレオチド」は、一般的に、修飾されていない R N A もしくは D N A、または修飾された R N A もしくは D N A であり得る任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを表す。「ポリヌクレオチド」には、1 本鎖および 2 本鎖の D N A、1 本鎖および 2 本鎖の領域の混合物である D N A、1 本鎖および 2 本鎖の R N A、ならびに 1 本鎖および 2 本鎖の領域の混合物である R N A、1 本鎖、より典型的には、2 本鎖であり得るか、または 1 本鎖および 2 本鎖の領域の混合物であり得る D N A および R N A を含んでなるハイブリッド分子が含まれるが、これらに限定されない。さらに、「ポリヌクレオチド」は、R N A もしくは D N A または R N A および D N A の両方を含んでなる 3 本鎖領域を表す。ポリヌクレオチドという用語には、1 個以上の修飾塩基を含んでなる D N A または R N A、安定性のために、もしくは他の理由のために修飾された骨格を有する D N A または R N A も含まれる。「修飾」塩基には、例えば、トリチル化塩基およびイノシンなどの独特の塩基が含まれる。様々な修飾が D N A および R N A に行われるので、「ポリヌクレオチド」は、通常、自然界に見られるポリヌクレオチドの化学的、酵素的または代謝的な修飾形態、ならびにウイルスおよび細胞に典型的な D N A および R N A の化学形態を包含する。「ポリヌクレオチド」は、オリゴヌクレオチドと称されることが多い比較的短いポリヌクレオチドも包含する。

20

30

【0014】

「ポリペプチド」は、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合、すなわち、ペプチドアイソスターにより互いに結合している 2 個以上のアミノ酸を含んでなる任意のペプチドまたはタンパク質を表す。「ポリペプチド」は、一般に、ペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと称される短鎖、および一般にタンパク質と称される長鎖の両方を表す。ポリペプチドは、遺伝子によりコードされた 20 種のアミノ酸以外のアミノ酸を含んでもよい。「ポリペプチド」は、翻訳後プロセッシングなどの天然のプロセス、または当該技術分野で公知の化学修飾法のいずれかにより修飾されたアミノ酸配列を含んでなる。このような修飾は、基本的なテキスト、より詳細な研究書、および多数の研究文献に詳しく記載されている。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖、およびアミノ末端またはカルボキシル末端を含んでなるポリペプチドのどこにでも生じ得る。同じ種類の修飾が、所定のポリペプチドのいくつかの部位で、同じ程度または異なる程度で存在し得ることは理解されよう。所定のポリペプチドは多くの種類の修飾も含み得る。ポリペプチドはユビキチン化の結果として分枝状であってもよく、分岐の有無にかかわらず、環状であってもよい。環状、分枝状、および分枝環状のポリペプチドは、翻訳後の天然プロセスから生じるか、または合成法によって作製され得る。修飾には、アセチル化、アシル化、A D P-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの

40

50

共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、 γ -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などのトランスファーRNAによるタンパク質へのアミノ酸の付加、ならびにユビキチン化が含まれる。例えば、PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York, 1993 and World, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, pgs.1-12 in POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter, et al., "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", Meth. Enzymol. (1990) 182: 626-646、ならびに Rattan, et al., "Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging", Ann NY Acad Sci (1992) 663: 48-62を参照されたい。

【0015】

本明細書で使用する「変異体」という用語は、それぞれ参照ポリヌクレオチドまたは参照ポリペプチドとは異なるが、本質的な特性は保持しているポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。ポリヌクレオチドの典型的な変異体は、別の参照ポリヌクレオチドとヌクレオチド配列の点で異なる。変異体のヌクレオチド配列における変化は、参照ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列と変わっていてもよく、変わっていてもよい。以下で論じるように、ヌクレオチドの変化は、参照配列によってコードされるポリペプチドにおけるアミノ酸の置換、付加、欠失、融合、およびトランケーションをもたらし得る。ポリペプチドの典型的な変異体は、別の参照ポリペプチドとアミノ酸配列の点で異なる。一般的に、差異は、参照ポリペプチドおよび変種の配列が全体的に非常に類似しており、多くの領域で同一であるように限定されている。変異体および参照ポリペプチドは、1つ以上の置換、付加、欠失の任意の組み合わせによりアミノ酸配列において異なってもよい。置換または挿入されたアミノ酸残基は遺伝子コードによりコードされる残基であっても、またはそうでなくてもよい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異体は、対立遺伝子変異体のように天然に存在してもよく、または天然に存在することが知られていない変異体であってもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの非天然変異体は、突然変異誘発技術または直接合成により作製され得る。

【0016】

「単離」とは、その天然状態から「ヒトの手により」変更されることを意味する。すなわち、それが天然に存在する場合、それはその元の環境から変化もしくは除去されているか、またはその両方である。例えば、天然の状態では生物に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離」されていないが、その天然状態で共存物質から分離された同一のポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離」されており、これは、このようなポリヌクレオチドまたはポリペプチドが導入されて、戻される時を含んでなるが、これに限定されない。

【0017】

「単離された」または「実質的に純粋」な核酸またはポリヌクレオチド（例えば、RNA、DNAもしくは混合ポリマー）は、その天然宿主細胞内のネイティブポリヌクレオチドを天然に伴う他の細胞成分、例えば、それに天然に付随するリボソーム、ポリメラーゼ、およびゲノム配列から実質的に分離された核酸またはポリヌクレオチドである。この用語は、（１）その天然環境から除去された核酸またはポリヌクレオチド、（２）「単離されたポリヌクレオチド」が自然界に見られるポリヌクレオチドの全部もしくは一部と会合

していない核酸またはポリヌクレオチド、(3)天然には連結されていないポリヌクレオチドと作動可能に連結されている核酸またはポリヌクレオチド、または(4)天然に存在しない核酸またはポリヌクレオチドを包含する。「単離」または「実質的に純粋」という用語は、組換えDNA分離体もしくはクローン化DNA分離体、化学合成ポリヌクレオチド類似体、または異種システムにより生物学的に合成されたポリヌクレオチド類似体に関しても用いられ得る。

【0018】

しかし、「単離」は、必ずしも、そのように記述される核酸またはポリヌクレオチドが、それ自体、その天然の環境から物理的に除去されている必要はない。例えば、生物のゲノム内の内在性核酸配列は、異種配列がこの内在性核酸配列に隣接して配置される結果、この内在性核酸配列の発現が変わる、例えば、増加する、減少する、または除去される場合、本明細書で「単離された」と考えられる。この文脈で、異種配列は、この異種配列がそれ自体、(同一宿主細胞もしくはその子孫から生じる)内在性または(異なる宿主細胞もしくはその子孫から生じる)外来性であろうとなかろうと、この内在性核酸配列と天然では隣接していない配列である。例として、プロモーター配列を、宿主細胞のゲノム中の遺伝子のネイティブプロモーターと(例えば、相同組換えによって)置換することができ、その結果、この遺伝子の発現パターンは変化し得る。この遺伝子は、天然ではその側面に位置する配列の少なくとも一部から分離されているので、今や「単離」されたことになる。

【0019】

核酸は、それがゲノム内の対応する核酸中に天然には生じない任意の修飾を含んでなる場合にも、「単離された」と考えられる。例えば、内在性コード配列は、それが人工的に、例えば、ヒトの介入によって導入される挿入、欠失または点変異を含んでなる場合に、「単離された」と考えられる。「単離された核酸配列」は、非相同部位において宿主細胞染色体に組込まれる核酸およびエピソームとして存在する核酸コンストラクトも含んでなる。さらに、「単離された核酸配列」は、実質的に他の細胞物質を含まないか、組換え技術によって産生される時に実質的に培地を含まないか、または化学合成される時に実質的に化学的前駆体もしくは他の化学物質を含んでなることができない。

【0020】

本明細書で使用する「炎症性メディエーター」には、炎症プロセスを誘発することができる任意の化合物が含まれる。炎症という用語は、一般に、傷害に対する血管新生した生体組織の反応プロセスを表す。このプロセスには、血流の増加、血管透過性の増加、および白血球滲出が含まれるが、これらに限定されない。炎症反応に動員される白血球は、強力な酵素および酸素フリーラジカル(すなわち、炎症性メディエーター)を放出することができるので、この炎症反応は、かなりの組織損傷を媒介することができる。炎症性メディエーターの例として、プロスタグランジン(例えば、PGE₂)、ロイコトリエン(例えば、LTB₄)、腫瘍壊死因子α(TNFα)、インターロイキン1(IL-1)、およびインターロイキン6(IL-6)などの炎症性サイトカイン、一酸化窒素(NO)、メタロプロテイナーゼ、および熱ショックタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

【0021】

本明細書で使用する「基質タンパク質」には、軟骨の細胞外基質を形成するために細胞から放出されるタンパク質が含まれる。軟骨の細胞外基質は、いくつかの別々のプロテオグリカンのファミリーに属するプロテオグリカンからなる。これらには、パルカン、ならびにアグリカンおよびパーシカンに代表されるヒアレクタン(hyallectans)、デコリン、パイグリカン、およびフィブロモジュリンを含んでなるプロテオグリカンの小さなロイシンリッチファミリーが含まれるが、これらに限定されない。細胞外基質は、また、軟骨オリゴマー基質タンパク質(COMP)、リンクタンパク質、およびフィブロネクチンなどのアクセサリタンパク質と共に、3つのコラーゲンアイソタイプ、すなわち、I型コラーゲン、IX型コラーゲン、およびXI型コラーゲンを含んでなるハイブ

リッドコラーゲン繊維からなる。軟骨は、ヒアレクチンと非共有結合を形成するヒアルロニン (h y a l u r o n i n) も含んでなる。さらに、特殊な細胞周囲基質は、プロテオグリカン、V I 型コラーゲン、およびアンコリン (a n c h o r i n) などのコラーゲン受容体タンパク質からなる軟骨細胞を取り囲んでいる。

【0022】

本明細書で使用する「基質分解酵素」は、細胞外基質タンパク質を切断することができる酵素を表す。軟骨細胞外基質の代謝回転は、軟骨細胞外基質タンパク質を分解するために活性化を必要とする潜在的な酵素前駆体として合成される基質メタロプロテイナーゼ (M M P) によって調節される。酵素の3つのクラス、すなわち、ネイティブなコラーゲン繊維の分解に関与する (M M P-13を含んでなるが、これに限定されない) コラゲナーゼ、プロテオグリカン、およびI X型コラーゲンを分解する (M M P-3を含んでなるが、これに限定されない) ストロメリシン、ならびに変性コラーゲンを分解する (M M P-2およびM M P-9を含んでなるが、これらに限定されない) ゼラチナーゼは、細胞外基質タンパク質の代謝回転を調節すると考えられている。O A内の軟骨分解に最も関係があると思われる基質分解酵素の群には、それらが、ジスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼのドメイン、ならびにそれらの構造内のトロンボスポンジンモチーフを保有するので、A D A M T Sと呼ばれるメタロプロテイナーゼのサブ群が含まれる。A D A M T S 4 (アグリカナーゼ1) はO A関節内で増加することが報告され、A D A M T S-5 (アグリカナーゼ2) と共に、ヒト変形性関節症軟骨で発現することが示されている。これらの酵素は、M M Pが加わることなくアグリカン分解に関与すると思われる。

【0023】

本明細書で使用するアグリカナーゼ活性の「減少 (r e d u c e)」または「減少 (r e d u c i n g)」は、A D A M T S 4およびA D A M T S 5を含んでなるが、これらに限定されない少なくとも1種類の天然に存在するアグリカナーゼと関連する活性のいずれかおよび／または全てにおける低下を表す。例えば、少なくとも1つのA D A M T S 5活性の「減少」は、天然に存在するA D A M T S 5と関連する活性のいずれかおよび／または全てにおける低下を表す。例として、哺乳類におけるA D A M T S 5活性の減少を、A D A M T S 5に結合することができる少なくとも1つのポリペプチドの対象への投与後に測定し、A D A M T S 5に結合することができるポリペプチドの投与前の、同一対象におけるA D A M T S 5活性と比較するか、またはプラセボを投与した第2の対象と比較することができる。本明細書で使用する少なくとも1つのA D A M T S 5の「減少」には、少なくとも1つ以上の酵素活性の減少が含まれる。少なくとも1つのA D A M T S 5活性の減少には、少なくとも1つのA D A M T S 5の完全抑止が含まれる。少なくとも1つの酵素活性の量の減少も本定義の範囲内に含まれる。すなわち、A D A M T S 5は、同一酵素の第2の活性が減少する間に維持される2種類以上の活性を有し得る。

【0024】

本明細書で使用する「軟骨分解に関連する疾患」には、癌、疼痛、慢性疼痛、神経因性疼痛、術後の疼痛、変形性関節症、スポーツ外傷、びらん性関節炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、ライム関節炎、若年性関節炎、強直性脊椎症、神経痛、神経障害、痛覚、神経損傷、虚血、神経変性、炎症性疾患、軟骨変性、喉頭、気管、耳道、椎間板、靱帯、腱、関節包や骨の発達に影響を与える疾患、無脊椎の椎間板変性、骨減少症、または歯周病、急性関節損傷、および／または関節破壊に関連した疾患が含まれるが、これらに限定されない。

【0025】

本明細書で使用する「同時投与 (c o - a d m i n i s t r a t i o n)」または「同時投与 (c o - a d m i n i s t e r i n g)」は、同一患者への2種類以上の化合物の投与を表す。このような化合物の同時投与は、同時もしくはほぼ同じ時 (例えば、同じ時間内) であってもよく、またはそれは、互いに数時間内もしくは数日以内であってもよい。例えば、第1の化合物は週1回投与されるが、第2の化合物は毎日同時に投与されてもよい。

【0026】

本明細書で使用する「減衰 (attenuate)」または「減衰 (attenuating)」は、異化刺激への暴露後に、細胞が産生および／または放出する基質分解酵素、炎症性メディエーター、または基質タンパク質の量の正常化（すなわち、増加または減少のいずれか一方）を表す。例えば、IL-1への暴露後に、プロテオグリカンなどの基質タンパク質の軟骨細胞産生は減少するが、基質分解酵素（例えば、MMP-13、ADAMTS4）および活性酸素種（例えば、NO）の産生は増加する。減衰は、異化刺激の非存在下で観察されるレベルへのこれらの多様な反応の正常化を表す。

【0027】

「ドメイン抗体」または「dAb」は、抗原に結合することができる「単一可変ドメイン」と同じであると考えられ得る。単一可変ドメインは、ヒトの抗体可変ドメインであり得るが、（例えば、国際特許WO00/29004に開示されているような）齧歯類、テンジクザメやラクダ科の動物などの他の種のVHH dAbに由来する単一抗体可変ドメインも含んでなる。ラクダ科の動物のVHHは、ラクダ、ラマ、アルパカ、ヒトコブラクダ、およびグアナコを含んでなる種に由来する免疫グロブリン単一可変ドメインのポリペプチドであり、これは、天然に軽鎖を欠く重鎖の抗体を産生する。このようなVHHドメインは、当該技術分野で利用可能な標準的な技術に従ってヒト化され得、このようなドメインは「ドメイン抗体」であると考えられる。本明細書で使用するVHには、ラクダ科の動物VHHドメインが含まれる。

【0028】

「単一可変ドメイン」という語句は、異なる可変領域または可変ドメインとは無関係に、抗原またはエピトープに特異的に結合する抗原結合タンパク質可変ドメイン（例えば、 V_H 、 V_{HH} 、 V_L ）を表す。

【0029】

本明細書で使用する「抗原結合タンパク質」という用語は、抗原に結合できる抗体、抗体断片、ならびに可変ドメインおよびドメイン抗体に限定されないドメインなどの他のタンパク質コンストラクトを表す。

【0030】

抗体の抗原結合ドメインは、2つの別々の領域：重鎖可変ドメイン (V_H) および軽鎖可変ドメイン (V_L ：これは V_K または V_λ のいずれか一方であり得る) を含んでなる。この抗原結合部位自体は、6つのポリペプチドループ： V_H ドメインの3つ (H1、H2 および H3) ならびに V_L ドメインの3つ (L1、L2 および L3) によって形成される。

【0031】

抗体の構造および配列の分析は、6つの抗原結合ループのうちの5つ (H1、H2、L1、L2、L3) が、限られた数の主鎖の構造または標準構造を有することを示している (Chothia and Lesk (1987) J.Mol.Biol., 196:901; Chothia et al. (1989) Nature, 342:877)。主鎖の構造は、(i) 抗原結合ループの長さ、ならびに (ii) 抗原結合ループおよび抗体フレームワークの中の特定の重要な位置における特定の残基、または残基の種類によって決定される。ループの長さおよび重要な残基の分析により、大部分のヒト抗体配列によってコードされるH1、H2、L1、L2、およびL3の主鎖の構造を予測することが可能になった (Chothia et al. (1992) J.Mol.Biol., 227:799; Tomlinson et al. (1995) EMBO J., 14:4628; Williams et al. (1996) J.Mol.Biol., 264:220)。このH3領域は配列、長さ、および構造の点で (Dセグメントの使用のため) 遥かに多様であるが、これは短いループ長のために限られた数の主鎖の構造も形成し、この構造は、このループおよび抗体フレームワークの中の重要な位置における特定残基の長さおよび存在、または残基の種類によって決まる (Martin et al. (1996) J.Mol.Biol., 263:800; Shirai et al. (1996) FEBS Letters, 399:1

10

20

30

40

50

）。

【0032】

V_H と V_L 領域の相補対を含んでなる2重特異性抗体が当該技術分野で公知である。これらの2重特異性抗体は、 V_H と V_L の2対を含まねばならず、各 V_H/V_L 対は単一の抗原またはエピトープに結合する。記載する方法には、ハイブリッドハイブリドーマ(Milstein & Cuello AC, Nature 305:537-40)、ミニボディ(Hu et al., (1996) Cancer Res 56:3055-3061)、ダイアボディ(Holliger et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448; 国際特許WO94/13804)、キレート組換え抗体(CRAbs; Neri et al., (1995) J. Mol. Biol. 246, 367-373)、biscFv(例えば、Atwell et al., (1996) Mol. Immunol. 33, 1301-1312)、「ノブインホール(knobs in holes)」安定化抗体(Carter et al., (1997) Protein Sci. 6, 781-788)が含まれる。それぞれの場合において、各抗体種は2つの抗原結合部位を含み、それぞれが V_H および V_L ドメインの相補対によって構築される。それによって各抗体は、2つの異なる抗原またはエピトープに同時に結合することができ、各抗原またはエピトープへの結合は、 V_H ドメインおよびその相補的 V_L ドメインによって媒介される。これらの技術のそれぞれにはそれぞれ特有の不都合があり、例えば、ハイブリッドハイブリドーマの場合には、不活性 V_H/V_L 対が2重特異性IgGの画分を非常に減少させることができる。さらに、ほとんどの2重特異性アプローチは、2つの異なる V_H/V_L 結合部位を再形成するために、異なる V_H/V_L 対の会合または V_H 鎖と V_L 鎖の会合に依存している。したがって、構築された分子において各抗原またはエピトープに対する結合部位の比を制御することは不可能であるので、構築された分子の多くは一方の抗原またはエピトープと結合するが、他方の抗原またはエピトープとは結合しないであろう。いくつかの場合において、両方の抗原もしくはエピトープに対する結合部位を有する分子の数を改善するために、サブユニットの界面に重鎖または軽鎖を遺伝子工学処理することが可能になったが(Carter et al., 1997)、これによって全ての分子が両方の抗原またはエピトープに結合するようには決してならない。

【0033】

2つの異なる抗体結合特異性を同じ結合部位に組み込むことができるという証拠がいくつかあるが、これらは一般に、構造的に関連した抗原もしくはエピトープに対応するか、または広く交差反応する抗体に対応する2つ以上の特異性を表す。例えば、交差反応性の抗体について記載されており、通常、ニワトリ卵白のリゾチームおよびシチメンチョウのリゾチーム(McCafferty et al., 国際特許WO92/01047)、または遊離ハプテンおよび担体に結合したハプテン(Griffiths AD et al., EMBO J 1994 13:143245-60)などの2つの抗原は配列および構造において関連する。さらなる例として、国際特許WO02/02773(Abbott Laboratories)は、「2重特異性」を有する抗体分子について記載している。言及する抗体分子は、それらの特異性が単一の抗原より多くに及ぶように、複数の抗原に対して産生または選択された抗体である。国際特許WO02/02773に記載の抗体の各相補的 V_H/V_L 対は、構造的に関連した2つ以上の抗原に対する単一結合特異性を示し、このような相補対の V_H ドメインおよび V_L ドメインはそれぞれ別々の特異性を保有しない。したがって、これらの抗体は構造的に関連する2つの抗原を包含する広範な単一特異性を有する。さらに、多反応性である天然の自己抗体について記載されており(Casali & Notions, Ann. Rev. Immunol. 7, 515-531)、これは、構造的に無関係の少なくとも2つ(通常はそれ以上)の異なる抗原またはエピトープと反応する。モノクローナル抗体に対するファージディスプレイ法を用いたランダムペプチドレパートリーの選択が、その抗原結合部位に適合する様々な範囲のペプチド配列を同定することも示されている。これらの配列の一部は高度に関連し、コンセンサス配列に適合するが、その他は非常に異なり、ミモトープと名付けられている(Lane & Ste

phen, Current Opinion in Immunology, 1993, 5, 268-271)。したがって、会合した相補的 V_H ドメインおよび V_L ドメインを含んでなる天然の4本鎖抗体が、非常に多数の既知抗原からの多くの異なる抗原と結合する能力を有することは明らかである。同一の抗体の中の2つの所定の抗原、特に、必ずしも構造的に関連のない抗原に対する結合部位を形成する方法はあまり分かっていない。

【0034】

これに関係し得るタンパク質工学的な方法が提唱されている。例えば、1つの可変ドメインを介して金属イオンに結合する活性を有し、かつこの金属イオンおよび相補的可変ドメインとの接触を介してハプテン（基質）と結合する活性を有する触媒抗体を作製できることも提案されている（Barbas et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6385-6389）。しかし、この場合には、基質（第1の抗原）の結合および触媒作用は、金属イオン（第2の抗原）の結合を必要とすると提唱されている。したがって、 V_H/V_L 対への結合は、単一だが多成分の抗原に関係する。

【0035】

ラクダ抗体の重鎖単一ドメインから2重特異性抗体を作製する方法について記載されており、その中で、1つの抗原に対する結合接点を1つの可変ドメインの中に作り、第2の抗原に対する結合接点を第2の免疫グロブリン可変ドメインの中に作る。しかし、これらの可変ドメインは相補的ではなかった。したがって、第1の重鎖可変ドメインを第1の抗原に対して選択し、第2の重鎖可変ドメインを第2の抗原に対して選択し、その後、両ドメインを同一鎖上で連結して、2重特異性抗体断片を得る（Conrath et al., J. Biol. Chem. 270, 27589-27594）。しかしながら、このラクダ重鎖単一ドメインは、それらが軽鎖をもたない天然のラクダ抗体に由来するという点で普通ではなく、実際、この重鎖単一ドメインは相補的な V_H と V_L の対を形成するようにラクダ軽鎖と会合することができない。

【0036】

通常、軽鎖と会合している天然の抗体に由来する（モノクローナル抗体からの、またはドメインのレパートリーからの；ヨーロッパ特許 EP-A-0368684 参照）単一重鎖可変ドメインについても記載されている。これらの重鎖可変ドメインは、1つ以上の関連抗原と特異的に相互作用することが示されているが、2つ以上の異なる抗原に対する特異性を有するリガンドを作製するために、他の重鎖または軽鎖の可変ドメインと組み合わせられたことはない。さらに、これらの単一ドメインは非常に短い生体内半減期を有することが示されている。したがって、このようなドメインの治療上の価値は限られたものとなる。

【0037】

異なる特異性の重鎖可変ドメインを（上記に記載したように）共に連結させることによって、2重特異性抗体断片を作製することが提案されている。このアプローチに伴う不都合は、単離した抗体可変ドメインが、通常は軽鎖と相互作用し、かつ溶媒に暴露される疎水性界面を有すること、ならびに「粘着性」であって、この単一ドメインを疎水性表面に結合させることができる可能性があることである。さらに、パートナーである軽鎖が存在しない場合において、2つ以上の異なる重鎖可変ドメインの組合せ、およびおそらく、それらの疎水性界面を介するそれらの会合により、それらが分離して結合することができるリガンドの両方ではなく一方に結合することを防ぐことができる。さらに、この場合において、この重鎖可変ドメインは相補的な軽鎖可変ドメインと会合しないので、安定性に乏しく、容易にアンフォールディングしてしまう（Worn & Pluckthun, 1998 Biochemistry 37, 13120-7）。

【0038】

本明細書で使用する、「抗体」という用語には、2つの重（H）鎖および2つの軽（L）鎖をジスルフィド結合により相互に連結した4つのポリペプチド鎖を含んでなる免疫グロブリン分子が含まれる。各重鎖は、（本明細書で V_H と省略する）重鎖可変領域および重鎖定常領域を含んでなる。この重鎖定常領域は、3つのドメイン、すなわち、 $CH1$ 、

C H 2、および C H 3 を含んでなる。各軽鎖は、(本明細書で V_L と省略する) 軽鎖可変領域および軽鎖定常領域を含んでなる。任意の脊椎動物種に由来する抗体(免疫グロブリン)の軽鎖は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ(κ)とラムダ(λ)と呼ばれる2つの明らかに異なる種類の1つに割り当てられ得る。 κ 軽鎖の可変領域を本明細書で V_K と称する。本明細書で使用する V_L 発現は、 κ 型軽鎖(V_K)および λ 型軽鎖の可変領域の両方を含んでなることを意図している。この軽鎖定常領域は、1つのドメイン、C L を含んでなる。この V_H および V_L の領域には、より保存されたフレームワーク領域(F R)と呼ばれる領域と共に分散される、相補性決定領域(C D R)と呼ばれる超可変領域が含まれる。それぞれの V_H および V_L は、3つの C D R および 4つの F R を含み、以下の順番: F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4 でアミノ末端からカルボキシ末端に配置される。

10

【0039】

これらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、抗体を異なるクラスに割り当てることができる。5つの主要なインタクトな抗体のクラス: I g A、I g D、I g E、I g G、および I g M があり、これらのいくつかは、サブクラス(アイソタイプ)、例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A、および I g A 2 にさらに分けられ得る。抗体の異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、および μ と呼ばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造および三次元配置は公知である。本発明は、前述のクラスまたはサブクラス(アイソタイプ)の全ての抗体を含んでなる。

20

【0040】

本明細書で使用する「抗体」という用語は、模倣抗体を含み、すなわち抗体もしくは特定断片もしくはその一部の構造および/または機能を模倣する抗体の部分を含み、一本鎖抗体およびそれらの断片を含んでなる抗体、消化断片、それらの特定部分ならびにそれらの変異体を包含するとも意図され、それぞれは少なくとも1つの C D R を含んでなる。機能的断片には、A D A M T S 5 抗原に結合する抗原結合断片が含まれる。例えば、(例えば、パペイン消化による) F a b 断片、(例えば、プラスミン消化による) f a c b 断片、(例えば、ペプシンまたはプラスミン消化による) p F c ' 断片、(例えば、ペプシン消化、部分的還元、および再凝集による) F d 断片、(例えば、分子生物学的手法による) F v 断片もしくは s c F v 断片を含んでなるが、これらに限定されない A D A M T S 5 またはその一部に結合することができる抗体断片は、本発明に包含される。抗体断片は、例えば、ドメイン除去抗体、ダイアボディ、直鎖抗体、一本鎖抗体分子、および抗体断片から形成される多特異性抗体を含んでなることも意図される。

30

【0041】

本明細書で使用する「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体を表し、例えば、この集団を含んでなる個々の抗体は、天然の可能性のある突然変異または存在し得るマイナーな翻訳後の変異を除いて実質的に同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一抗原部位に対して作られる。さらに、通常、異なる決定基(エピトープ)に対して作られる異なる抗体を含んでなる従来の(ポリクローナル)抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体はこの抗原上の単一の決定基に対して作られる。修飾因子「モノクローナル」は、実質的に均質な抗体集団から得られるという抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものとして解釈されるべきではない。本発明のモノクローナル抗体は、好ましくは、組換え D N A 法によって作製されるか、または本明細書の他の場所で記載するスクリーニング法によって得られる。

40

【0042】

本明細書で使用する「モノクローナル抗体」という用語は「キメラ」抗体(免疫グロブリン)を含み、それらが所望の生物学的活性を示す限り、キメラ抗体中の重鎖および/または軽鎖の一部は、特定の種に由来する抗体中の対応する配列と同一もしくは相同であるか、または特定の抗体クラスまたはサブクラスに属するが、この鎖(複数可)の残りは、

50

別の種（例えば、マウスまたはラット）に由来する抗体中の対応する配列と同一もしくは相同であるか、または別の抗体クラスまたはサブクラス、ならびにこのような抗体の断片に属する（Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)）。本明細書における対象のキメラ抗体には、非ヒト霊長類（例えば、ヒヒ、アカゲザルまたはカニクイザルなどの旧世界ザル）に由来する可変ドメイン抗原結合配列およびヒト定常領域配列を含んでなる「霊長類化」抗体が含まれる（米国特許第 5, 693, 780 号）。

【0043】

したがって、本発明には、例えば、キメラ重鎖および／またはキメラ軽鎖を含んでなるキメラモノクローナル抗体が含まれる。このキメラ重鎖は、本明細書に記載の重鎖可変（ V_H ）領域、または非ヒト抗体もしくはヒト抗体の重鎖定常領域に融合した重鎖可変領域の突然変異体もしくは変異体の全てを含み得る。このキメラ軽鎖は、本明細書に記載の軽鎖可変（ V_L ）領域、または非ヒト抗体もしくはヒト抗体の軽鎖定常領域に融合した軽鎖可変領域の突然変異体もしくは変異体の全てを含み得る。

【0044】

本明細書で使用する「ヒト抗体」という用語には、カバットら（Kabat, et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 参照）によって記載されるようなヒト生殖系列免疫グロブリン配列に対応する可変領域および定常領域を有する抗体が含まれる。本発明のヒト抗体は、例えば、CDR、特に、CDR3において、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列がコードしないアミノ酸残基（例えば、インビトロのランダム変異誘発もしくは部位特異的変異誘発によって、またはインビボの体細胞突然変異によって導入される変異）を含み得る。このヒト抗体は、アミノ酸残基、例えば、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列がコードしない、活性を高めるアミノ酸残基と置換される少なくとも1つの位置を有することができる。本発明の文脈において、このヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列の一部ではないアミノ酸残基と置換される最大で20の位置を有することができる。他の実施形態において、最大10、最大5、最大3、または最大2つの位置が置換される。しかし、本明細書で使用する「ヒト抗体」という用語は、マウスなどの別の哺乳類種の生殖系列に由来するCDR配列が、ヒトフレームワーク配列上に移植された抗体を含んでなることを意図しない。

【0045】

「組換えヒト抗体」という語句には、宿主細胞にトランスフェクトされる組換え発現ベクターを用いて発現させた抗体などの組換え手段によって調製、発現、作製または単離されるヒト抗体、組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体、ヒト免疫グロブリン遺伝子のトランスジェニック動物から単離された抗体、またはヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシングを含んでなる任意の他の手段によって調製、発現、作製または単離される抗体が含まれる。このような組換えヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する（Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 参照）。本発明による組換えヒト抗体は、インビトロ変異誘発（または、ヒトIg配列のトランスジェニック動物を用いる時は、インビボ体細胞変異誘発）に共されたヒト生殖系列免疫グロブリン配列を含んでなるので、この組換え抗体の V_H および V_L 領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列の V_H 配列および V_L 配列に由来し、かつ関連するが、インビボのヒト抗体生殖系列のレパートリー内に天然には存在し得ない配列である。しかし、特定の実施形態において、このような組換え抗体は、選択的変異誘発法もしくは逆突然変異またはその両方の結果である。

【0046】

本発明の抗体は単離された抗体であり得る。本明細書で使用する「単離された抗体」には、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体が含まれる。さらに、単離された抗体には、他の細胞物質および／または化学物質が実質的に含まれ得ない。

【0047】

インタクトな抗体には、少なくとも2つの重鎖および2つの軽鎖を含んでなるヘテロ多量体の糖タンパク質が含まれる。IgMは別として、インタクトな抗体は、通常、2つの同一の軽(L)鎖と2つの同一の重(H)鎖を含んでなる約150Kdaのヘテロ4量体の糖タンパク質である。典型的には、各軽鎖は、1つの共有ジスルフィド結合によって重鎖に連結されているが、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間のジスルフィド結合の数は異なる。各重鎖および各軽鎖は、鎖内ジスルフィド架橋も有する。各重鎖は、一端に可変ドメイン(V_H)を有し、その後多くの定常領域が続く。各軽鎖は、その他端に可変ドメイン(V_L)および定常領域を有する。この軽鎖の定常領域は、この重鎖の第1の定常領域と整列し、この軽鎖可変ドメインは、この重鎖の可変ドメインと整列する。ほとんどの脊椎動物種の抗体軽鎖を、この定常領域のアミノ酸配列に基づいて、κおよびλと呼ばれる2種類のうちの1種類に割り当てることができる。それらの重鎖の定常領域のアミノ酸配列に応じて、ヒト抗体を、5つの異なるクラス、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMに割り当てることができる。IgGおよびIgAを、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2のサブクラスにさらに分けることができる。種の変異体は、少なくともIgG2a、IgG2bを有するマウスおよびラットに存在する。この抗体の可変ドメインは、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる特定の可変性を示す特定領域で抗体に結合特異性を与える。この可変領域のより保存された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。インタクトな重鎖および軽鎖の可変ドメインは、それぞれ3つのCDRが結合した4つのFRを含んでなる。各鎖のCDRはFR領域が近接してまとめ、他の鎖のCDRと共に抗体の抗原結合部位の形成に寄与している。これらの定常領域は、抗体の抗原への結合に直接関与しないが、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)、Fcγ受容体への結合による食作用、新生児Fcレセプター(FcRn)による半減期／クリアランス率および補体カスケードのC1q成分による補体依存性細胞傷害などの様々なエフェクター機能を示す。

【0048】

ヒト抗体は、当該技術者に公知の多くの方法により産生され得る。ヒト抗体は、ヒト骨髓腫細胞株またはマウスーヒトヘテロ骨髓腫細胞株を用いるハイブリドーマ法によって作製することができる。Kozbor J. Immunol 133, 3001, (1984) および Brodeur, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp51-63 (Marcel Dekker Inc, 1987) を参照されたい。代替方法にはファージライブラリーまたはトランスジェニックマウスの使用が含まれ、それらの両方はヒトV領域のレパートリーを利用する(Winter G, (1994), Annu. Rev. Immunol 12, 433-455, Green LL (1999), J. Immunol. methods 231, 11-23 参照)。

【0049】

トランスジェニックマウスのいくつかの系統が現在利用可能であり、それらのマウスの免疫グロブリン遺伝子座は、ヒト免疫グロブリン遺伝子部分と置換されている(Tomizuka K, (2000) PNAS 97, 722-727; Fishwild D.M (1996) Nature Biotechnol. 14, 845-851, Mendez M J, 1997, Nature Genetics, 15, 146-156 参照)。抗原負荷の際、このようなマウスはヒト抗体のレパートリーを産生することができ、そのレパートリーから対象の抗体を選択することができる。特に注目すべきは、ヒトのリンパ球を放射線照射したマウスに移植する Trimer a (商標) システム (Eren Ret al, (1998) Immunology 93: 154-161 参照)、ヒト(または他の種)のリンパ球に対して、大規模プールインビトロ抗体の産生手順、その後デコンピュレー

トされた (deconvulated) 限界希釈および選択手順を効果的に施す選択リンパ球抗体システム (SLAM, Babcock et al, PNAS (1996) 93: 7843-7848 参照)、ならびに Xenomouse II (商標) (Abgenix Inc) である。別のアプローチは、モルフォテック社 (Morphotek Inc) から入手可能である Morphodoma (商標) 技術を用いる。

【0050】

ファージディスプレイ技術を用いて、ヒト抗体を（およびその断片）を産生することができる。McCafferty; Nature, 348, 552-553 (1990) および Griffiths AD et al (1994) EMBO 13: 3245-3260 を参照されたい。この手法によると、抗体Vドメイン遺伝子を、M13またはfdなどの系上バクテリオファージのメジャーコートタンパク質またはマイナーコートタンパク質のいずれか一方の遺伝子にインフレームでクローニングし、ファージ粒子の表面上の機能性抗体断片として（通常はヘルパーファージの助けを借りて）提示させる。この抗体の機能的特性に基づく選択は、それらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択をもたらす。ファージディスプレイ法を用いて、上記に記載の疾患または障害を患っている固体、または、免疫されていないヒトドナーから得られるヒトB細胞から作製されるライブラリーから抗原特異的抗体を選択することができる (Marks; J.Mol.Bio. 222, 581-597, 1991 参照)。インタクトなヒト抗体がFcドメインを含んでなることが望まれる場合、所望の定常領域を含み、安定な発現細胞株を確立する哺乳類発現ベクターに、ファージディスプレイ由来の断片を再クローニングすることが必要である。

【0051】

親和性成熟技術 (Marks; Bio/technology 10, 779-783 (1992)) を用いて結合親和性を改善してもよく、ヒト1次抗体の親和性は、天然に存在する変異体でH鎖およびL鎖のV領域を連続して置換し、改善された結合親和性に基づいて選択することによって改善される。「エピトープインプリンティング」などのこの技術の変法も今日では利用可能である。国際特許WO93/06213を参照されたい。Waterhouse; Nucl. Acids Res 21, 2265-2266 (1993) も参照されたい。

【0052】

特定の実施形態において、本発明の抗原結合タンパク質は、結合定数 (K_a) を測定すると、少なくとも約 5×10^4 L/モル、 1×10^5 L/モル、 5×10^5 L/モル、または 1×10^6 L/モルの親和性を有する。別の実施形態において、本発明の抗原結合タンパク質は、約 5×10^{-4} L/秒、 1×10^{-5} L/秒、 5×10^{-5} L/秒、または 1×10^{-6} L/秒未満の解離定数 (K_d) でヒトADAMTS5の中和エピトープに結合する。

【0053】

ヒトの疾患または障害の治療におけるインタクトな非ヒト抗体の使用は、今日十分に確立された免疫原性の問題が起きる可能性を伴い、この免疫原性は患者の免疫システムであり、非ヒトのインタクトな抗体を非自己として認識し、中和反応を開始する。この反応は、ヒト患者への非ヒト抗体の複数投与の際に特に顕著である。様々な技術がこれらの問題を克服するために長年にわたって開発され、一般的に、免疫された動物、例えば、マウス、ラットまたはウサギから非ヒト抗体を得ることに相対的な容易さを維持しつつ、インタクトな抗体中の非ヒトアミノ酸配列の組成の減少を含んでなる。大まかに2つのアプローチを用いてこれを達成する。第1のアプローチは、一般的に、ヒト定常領域に融合させた非ヒト（例えば、マウスなどの齧歯類）の可変ドメインを含んでなるキメラ抗体である。抗体の抗原結合部位は可変領域内に局在しているので、このキメラ抗体はこの抗原に対するその結合親和性を保持するが、ヒト定常領域のエフェクター機能を獲得するので、上記に記載したようなエフェクター機能を実行することができる。キメラ抗体は、典型的には、組換えDNA法を用いて産生される。これらの抗体をコードするDNA（例えば、cDNA）を、（例えば、本発明の抗体のH鎖およびL鎖をコードする遺伝子、例えば、上記

に記載の配列番号 2、3、4、5、6、および 7 をコードする DNA に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）従来の方法を用いて単離および配列解析をする。ハイブリドーマ細胞は、このような DNA の典型的な供給源として役立つ。単離した時点で、この DNA を発現ベクター中に置き、その後、抗体の合成をするために免疫グロブリンタンパク質を別の方法で産生しない大腸菌、COS 細胞、CHO 細胞または骨髓腫細胞などの宿主細胞にトランスフェクトする。この DNA は、ヒトの L 鎖および H 鎖のコード配列を、対応する非ヒト（例えば、マウス）の H 定常領域および L 定常領域に対して置換することによって改変されてもよい（Morrison; PNAS 81, 6851 (1984) 参照）。

【0054】

第 2 のアプローチはヒト化抗体の産生を伴い、この抗体の非ヒト内容物は、これらの可変領域をヒト化することによって減少する。ヒト化抗体は、CDR 移植によって作製することができる。CDR はこの抗体の N-末端近くにループを形成し、そこで CDR は、フレームワーク領域によって提供される足場に取り付けられた面を形成する。この抗体の抗原結合特異性は、主に局所分布によって、およびその CDR 表面の化学的特性によって定義される。これらの特徴は、順番に、個々の CDR 構造によって、これらの CDR の相対的配置によって、ならびにこれらの CDR を含んでなる残基の側鎖の性質および配置によって決定される。大規模な免疫原性の減少は、ヒトフレームワーク（「アクセプターフレームワーク」）および定常領域上に非ヒト（例えば、マウス）抗体（「ドナー」抗体）の CDR のみを移植することによって達成することができる（Jones et al (1986) Nature 321, 522-525 および Verhoeyen Met al (1988) Science 239, 1534-1536 参照）。しかし、CDR 移植それ自体は、抗原結合特性の完全な保持をもたらすことができず、重要な抗原結合親和性を回復すべき場合には、このドナー抗体の（「逆突然変異」とも呼ばれる場合がある）いくつかのフレームワーク残基は、ヒト化分子内に保持される必要があることが頻繁に明らかになっている（Queen C et al (1989) PNAS 86, 10, 029-10, 033, Co, Met al (1991) Nature 351, 501-502）。この場合において、ヒトフレームワーク（FR）を提供するために、この非ヒトドナー抗体に最も配列相同性を示すヒト V 領域をデータベースから選択する。ヒト FR の選択は、ヒトコンセンサスまたは個々のヒト抗体のいずれか一方から行うことができる。このドナー抗体の必須の重要な残基をヒトアクセプターフレームワークの中に置換し、CDR 構造を維持する。この抗体のコンピューターモデリングの使用は、このような構造的に重要な残基を同定するのにおそらく役立つ（国際特許 WO 99/48523 参照）。

【0055】

あるいは、ヒト化は、「上張り（veneering）」プロセスによって達成することができる。独特なヒトおよびマウスの免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の統計解析により、露出した残基の正確なパターンはヒトおよびマウスの抗体で異なっており、ほとんどの個々の表面の位置が、少数の異なる残基に対して優先度が高いことが明らかになった（Padlan E.A. et al; (1991) Mol. Immunol. 28, 489-498 および Pedersen J.T. et al (1994) J. Mol. Biol. 235; 959-973 参照）。したがって、通常、ヒト抗体に見られるものとは異なる、そのフレームワーク領域内の露出した残基を置換することによって、非ヒト Fv の免疫原性を減少させることができる。タンパク質の抗原性は表面接触性と相関し得るので、これらの表面残基の置換は、ヒトの免疫システムに対してこのマウス可変領域を隠すのに十分であり得る（Mark G.E. et al (1994) in Handbook of Experimental Pharmacology vol. 113: The pharmacology of monoclonal Antibodies, Springer-Verlag, pp 105-134 も参照）。このヒト化の方法は、抗体の表面のみを変えるので、「上張り」とも呼ばれ、これらの支持残基は影響を受けないままである。

【0056】

したがって、本発明は、アグリカナーゼに結合することができる少なくとも1つの第1の免疫グロブリン可変ドメインを含んでなる、単離した抗原結合タンパク質を提供する。一実施形態において、このアグリカナーゼはヒトADAMTS5である。いくつかの場合において、この抗原結合タンパク質は抗体またはその断片である。いくつかの場合において、この抗体は、ADAMTS5に特異的に結合する。この抗体はモノクローナル抗体またはその断片であってもよい。いくつかの場合において、本発明のモノクローナル抗体またはその断片は、マウス、キメラ、ヒト化、または完全なヒトの抗体またはその断片である。

【0057】

別の実施形態において、この抗原結合タンパク質は、少なくとも1つの相補性決定領域を含んでなる。いくつかの場合において、本発明の抗原結合タンパク質は、CDRH1、CDRH2、およびCDRH3を含んでなる重鎖ならびにCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含んでなる軽鎖を含んでなるモノクローナル抗体であり、この重鎖の相補性決定領域(CDR)は、

アミノ酸配列DAWMD(配列番号2)と少なくとも約80%の配列同一性を有するCDRH1；

アミノ酸配列EIRHKANDHAIIFYXESVKG(配列番号3)と少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは98%の配列同一性を有するCDRH2；

アミノ酸配列TYYYGSSYGYCDV(配列番号4)またはPFAY(配列番号5)と少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは98%の配列同一性を有するCDRH3；

の群から選択され、かつこの軽鎖の相補性決定領域は、

アミノ酸配列KASQSVGTTIV(配列番号6)またはRTSENIYSYLA(配列番号7)と少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは98%の配列同一性を有するCDRL1；

アミノ酸配列NAKTLAE(配列番号8)もしくはSASNRT(配列番号9)と少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、または98%の配列同一性を有するCDRL2；

アミノ酸配列QQYSSYPFT(配列番号10)またはQHGYGTPWT(配列番号11)と少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは98%の配列同一性を有するCDRL3；

の群から選択される。

【0058】

一実施形態において、CDRH2は、EIRHKANDHAIIFYAESVKG(配列番号12)、EIRNKANNHARHYAESVKG(配列番号13)、EIRHKANDYAIIFYDESVKG(配列番号14)、EIRHKANDHAIIFYDESVKG(配列番号15)、DIRNTANNHATFYAESVKG(配列番号16)、およびEIRHKANDHAIIFYDESVKG(配列番号17)から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは98%の配列同一性を有する。

【0059】

一実施形態において、CDRH3は、アミノ酸配列PFAY(配列番号5)を含んでなる。

【0060】

さらに別の実施形態において、本発明の抗原結合タンパク質は、CDRH1、CDRH2およびCDRH3を含んでなる重鎖ならびにCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含んでなる軽鎖を含んでなるモノクローナル抗体であり、この重鎖の相補性決定領域(CDR)は、

CDRH1が、アミノ酸配列DAWMD(配列番号2)であり；

10

20

30

40

50

CDRH2が、アミノ酸配列EIRHKANDHAIIFYAESVKG（配列番号12）、EIRNKANNHARHYAESVKG（配列番号13）、EIRHKANDYAIIFYDESVKG（配列番号14）、EIRHKANDHAIIFYDESVKG（配列番号15）、DIRNTANNHATFYAESVKG（配列番号16）、またはEIRHKANDHAIIFYDESVKG（配列番号17）であり；

CDRH3が、TYYYGSSYGYCDV（配列番号18）またはPFAY（配列番号5）である；

から選択され、かつこの軽鎖の相補性決定領域は、

CDRL1が、アミノ酸配列KASQSVGTTIV（配列番号19）、RTSENIYSYLA（配列番号20）、またはKASQNVGTAVV（配列番号21）から選択され；

CDRL2が、アミノ酸配列NAKTLE（配列番号22）、SASNRHT（配列番号23）、SASTRYT（配列番号24）、またはSASNRYT（配列番号25）から選択され；

CDRL3が、アミノ酸配列QQYSSYPFT（配列番号26）、QHHYGTPWT（配列番号27）、QQYVNYPFT（配列番号28）、またはQQYTSYPFT（配列番号29）から選択される；

から選択される。

【0061】

したがって、本発明の一実施形態において、6つのCDRを含んでなる単離したモノクローナル抗体を提供し、その中のCDRH1はDAWMD（配列番号2）であり、CDRH2はEIRNKANNHARHYAESVKG（配列番号13）であり、CDRH3はTYYYGSSYGYCDV（配列番号18）であり、CDRL1はRTSENIYSYLA（配列番号20）であり、CDRL2はNAKTLE（配列番号22）であり、CDRL3はQHHYGTPWT（配列番号27）である。

【0062】

本発明の別の実施形態において、6つのCDRを含んでなる単離したモノクローナル抗体を提供し、その中のCDRH1はDAWMD（配列番号2）であり、CDRH2はEIRHKANDHAIIFYDESVKG（配列番号15）であり、CDRH3はPFAY（配列番号5）であり、CDRL1はKASQSVGTTIV（配列番号19）であり、CDRL2はSASNRHT（配列番号23）であり、CDRL3はQQYTSYPFT（配列番号29）である。

【0063】

さらに別の実施形態において、本発明の抗原結合タンパク質は、CDRH1、CDRH2、およびCDRH3を含んでなる重鎖ならびにCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含んでなる軽鎖を含んでなるモノクローナル抗体であり、その中の重鎖の相補性決定領域（CDR）は、以下から選択される：

CDRH1が、アミノ酸配列DAWMD（配列番号2）であり、配列番号2の全てのアミノ酸配列は、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、スレオニン、トリプトファン、バリン、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、シスチン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、オルニチン、プロリン、セリン、タウリン、およびチロシンから選択されるアミノ酸によって一箇所置換されている；

CDRH2が、アミノ酸配列EIRHKANDHAIIFYAESVKG（配列番号12）、EIRNKANNHARHYAESVKG（配列番号13）、EIRHKANDYAIIFYDESVKG（配列番号14）、EIRHKANDHAIIFYDESVKG（配列番号15）、DIRNTANNHATFYAESVKG（配列番号16）、またはEIRHKANDHAIIFYDESVKG（配列番号17）から選択され、配列番号12～17の全てのアミノ酸配列は、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、スレオニン、トリプトファン、バリン、アラニン、アルギニン、アス

10

20

30

40

50

パラギン酸、システイン、シスチン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、オルニチン、プロリン、セリン、タウリン、およびチロシンから選択されるアミノ酸によって一箇所置換されている；

CDRH3が、TYYYGSSYG YCDV（配列番号18）またはPFAY（配列番号5）であり、配列番号18および配列番号5の全てのアミノ酸配列は、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、スレオニン、トリプトファン、バリン、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、シスチン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、オルニチン、プロリン、セリン、タウリン、およびチロシンから選択されるアミノ酸によって一箇所置換されている；

ならびに、この軽鎖の相補性決定領域は、以下から選択される；

CDRL1が、アミノ酸配列KASQSVGT TIV（配列番号19）、RTSENIYSYLA（配列番号20）、またはKASQNVGTAVV（配列番号21）から選択され、配列番号19～21の全てのアミノ酸配列は、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、スレオニン、トリプトファン、バリン、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、シスチン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、オルニチン、プロリン、セリン、タウリン、およびチロシンから選択されるアミノ酸によって一箇所置換されている；

CDRL2が、アミノ酸配列NAKT LAE（配列番号22）、SASN RHT（配列番号23）、SASTRYT（配列番号24）、またはSASNRYT（配列番号25）から選択され、配列番号22～25の全てのアミノ酸配列は、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、スレオニン、トリプトファン、バリン、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、シスチン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、オルニチン、プロリン、セリン、タウリン、およびチロシンから選択されるアミノ酸によって一箇所置換されている；

CDRL3が、アミノ酸配列QQYSSYPFT（配列番号26）、QH HYGTPWT（配列番号27）、QQYVNY PFT（配列番号28）、またはQQYTSYPFT（配列番号29）から選択され、配列番号26～29の全てのアミノ酸配列は、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、スレオニン、トリプトファン、バリン、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、シスチン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、オルニチン、プロリン、セリン、タウリン、およびチロシンから選択されるアミノ酸によって一箇所置換されている。

【0064】

特定の実施形態において、NAKT LAE（配列番号22）のThr4はロイシン、イソロイシンまたはメチオニンである。特定の実施形態において、QH HYGTPWT（配列番号27）のHis3はバリンである。特定の実施形態において、QH HYGTPWT（配列番号27）のGly5はトリプトファン、チロシン、フェニルアラニン、またはメチオニンである。特定の実施形態において、EIRNKANNHARHYAESVKG（配列番号13）のHis9はフェニルアラニンまたはチロシンである。特定の実施形態において、TYYYGSSYG YCDV（配列番号18）のSer6はフェニルアラニンまたはチロシンである。

【0065】

CDRのL1、L2、L3、H1、およびH2は、構造的に、有限数の主鎖の構造のうちの1つを示す傾向がある。CDRの特定の標準構造クラスは、CDRの長さおよびループのパッキングの両方によって定義され、これらのCDRおよびこれらのフレームワーク領域（構造決定残基、すなわちSDR）の両方の中の重要な位置にある残基によって決定される。MartinおよびThornton（1996；J Mol Biol 263：800－815）は、「重要な残基」の標準的な鑄型を定義するための自動化法を作製している。クラスター分析を用いて、CDRセットの標準的なクラスを定義し、その後、標準的な鑄型を、埋もれている疎水性の水素結合残基、保存されているグリシンおよびプロリンを分析することによって同定する。抗体配列のCDRを、重要な残基の鑄型とこれ

10

20

30

40

50

らの配列を比較し、同一性または類似性の行列を用いて各鋳型をスコア化することにより、標準クラスに割り当てることができる。

【0066】

本発明の範囲内のCDR標準の例を以下に示す。使用するアミノ酸の番号付けはカバットである。

【0067】

配列番号144に記載のCDRH1またはその変異体の標準の例は以下である：

Ala32がIle、His、Tyr、Phe、Thr、Asn、Cys、GluまたはAspに置換されている；Trp33がTyr、Ala、Gly、Thr、LeuまたはValに置換されている；Met34がIle、ValまたはTrpに置換されている；Asp35がHis、Glu、Asn、Gln、Ser、TyrまたはThrに置換されている。

10

【0068】

配列番号144に記載のCDRH2またはその変異体の標準の例は以下である：

Glu50がArgまたはGlnに置換されている；Ile51がLeu、Val、Thr、SerまたはAsnに置換されている。

【0069】

配列番号144に記載のCDRH3またはその変異体の標準の例は以下である：

Tyr102がHis、Val、Ile、Ser、AspまたはGlyに置換されている。

20

【0070】

配列番号146に記載のCDRL1またはその変異体の標準の例は以下である：

Ser28がAsn、Asp、ThrまたはGluに置換されている；Val29がIleに置換されている；Gly30がAsp、Leu、Tyr、Val、Ile、Ser、Asn、Phe、HisまたはThrに置換されている；Thr31がSer、Asn、LysまたはGlyに置換されている；Thr32がPhe、Tyr、Asn、Ala、His、SerまたはArgに置換されている；Ile33がMet、Leu、ValまたはPheに置換されている；Val34がAla、Gly、Asn、Ser、HisまたはPheに置換されている。

【0071】

配列番号144に記載のCDRL3またはその変異体の標準の例は以下である：

Gln89がSer、Gly、PheまたはLeuに置換されている；Gln90がAsnまたはHisに置換されている；Tyr91がAsn、Phe、Gly、Ser、Arg、Asp、His、ThrまたはValに置換されている；Thr92がAsn、Tyr、Trp、Ser、Arg、Gln、His、AlaまたはAspに置換されている；Ser93がGly、Asn、Thr、Arg、Glu、AlaまたはHisに置換されている；Tyr94がAsp、Thr、Val、Leu、His、Asn、Ile、Trp、ProまたはSerに置換されている；Phe96がPro、Leu、Tyr、Arg、IleまたはTrpに置換されている。

30

【0072】

他の態様において、この抗原結合タンパク質は、Fab断片またはF(ab)₂断片である。別の実施形態において、第1の免疫グロブリン可変ドメインは、一本鎖可変ドメインである。

40

【0073】

本発明の一実施形態において、本明細書に記載の本発明による、定常ドメイン領域を含んでなる抗体を提供し、その結果、この抗体は、ADCCおよび／または補体活性化またはエフェクター機能性を減少させた。このような一実施形態において、この定常ドメインは、IgG2またはIgG4アイソタイプの天然の機能しない定常領域または変異IgG1定常ドメインを含み得る。適切な修飾の例は、ヨーロッパ特許EP0307434に記載されている。一例として、235位および237位（EUインデックス番号付け）のア

50

ラニン残基の置換が挙げられる。一実施形態において、このような抗体は、配列番号 1 5 8 の重鎖を含んでなる。

【0074】

一実施形態において、この抗原結合タンパク質またはその断片は、配列番号 7 6、8 0、1 1 6、1 1 8、1 2 0、1 2 2、1 2 4、1 2 6、1 2 8、1 3 6、1 3 8、1 4 0、1 4 2、および 1 4 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体 V_H ドメインを含んでなる。

【0075】

一実施形態において、この抗原結合タンパク質またはその断片は、配列番号 7 8、8 2、1 3 0、1 3 2、1 3 4、および 1 4 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体 V_L ドメインを含んでなる。

10

【0076】

一実施形態において、この抗原結合タンパク質またはその断片は、配列番号 7 6、8 0、1 1 6、1 1 8、1 2 0、1 2 2、1 2 4、1 2 6、1 2 8、1 3 6、1 3 8、1 4 0、1 4 2、および 1 4 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体 V_H ドメイン、ならびに配列番号 7 8、8 2、1 3 0、1 3 2、1 3 4、および 1 4 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる V_L ドメインを含んでなる。

【0077】

一実施形態において、この抗原結合タンパク質またはその断片は、配列番号 7 6 含んでなる抗体 V_H ドメインおよび配列番号 7 8 を含んでなる V_L ドメインを含んでなる。

20

【0078】

一実施形態において、この抗原結合タンパク質またはその断片は、配列番号 8 0 含んでなる抗体 V_H ドメインおよび配列番号 8 2 を含んでなる V_L ドメインを含んでなる。

【0079】

一実施形態において、この抗原結合タンパク質またはその断片は、配列番号 1 1 6、1 1 8、1 2 0、1 2 2、1 2 4、1 2 6、および 1 2 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体 V_H ドメイン、ならびに配列番号 1 3 0、1 3 2、および 1 3 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる V_L ドメインを含んでなる。

【0080】

一実施形態において、この抗原結合タンパク質またはその断片は、配列番号 1 3 6、1 3 8、1 4 0、1 4 2、および 1 4 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体 V_H ドメイン、ならびに配列番号 1 4 6 を含んでなる V_L ドメインを含んでなる。

30

【0081】

一実施形態において、この抗原結合タンパク質またはその断片は、配列番号 6 8、7 2、8 4、8 6、8 8、9 0、9 2、9 4、9 6、1 0 4、1 0 6、1 0 8、1 1 0、1 1 2、および 1 5 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体重鎖を含んでなる。

【0082】

一実施形態において、この抗原結合タンパク質またはその断片は、配列番号 7 0、7 4、9 8、1 0 0、1 0 2、および 1 1 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体軽鎖を含んでなる。

40

【0083】

一実施形態において、この抗原結合タンパク質またはその断片は、配列番号 6 8、7 2、8 4、8 6、8 8、9 0、9 2、9 4、9 6、1 0 4、1 0 6、1 0 8、1 1 0、1 1 2、および 1 5 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体重鎖、ならびに配列番号 7 0、7 4、9 8、1 0 0、1 0 2、および 1 1 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体軽鎖を含んでなる。

【0084】

一実施形態において、この抗原結合タンパク質またはその断片は、配列番号 6 8 を含んでなる抗体重鎖および配列番号 7 0 を含んでなる抗体軽鎖を含んでなる。

50

【0085】

一実施形態において、この抗原結合タンパク質またはその断片は、配列番号72を含んでなる抗体重鎖および配列番号74を含んでなる抗体軽鎖を含んでなる。

【0086】

一実施形態において、この抗原結合タンパク質またはその断片は、配列番号84、86、88、90、92、94、および96からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体重鎖、ならびに配列番号98、100、および102からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体軽鎖を含んでなる。

【0087】

一実施形態において、この抗原結合タンパク質またはその断片は、配列番号104、106、108、110、112、および158からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体重鎖、ならびに配列番号114を含んでなる抗体軽鎖を含んでなる。

【0088】

本発明の別の態様は、ADAMTS5への結合に対して、表3にまとめる抗体のいずれか1つと競合する抗体を含んでなる。これらには、抗体1G10、1C9、2D3、1D4、3A12、1D7、5F10、1H6、11F12、1D12、12F4、1H7、および7B4、1E11が含まれる。

【0089】

さらに別の実施形態において、この抗原結合タンパク質は、第2の抗原に結合することができる第2の免疫グロブリン可変ドメインをさらに含んでなる。この第2の免疫グロブリン可変ドメインは、抗原結合ペプチドの投与の際に担体として機能を果たし得る抗原に結合することができる。例えば、この第2の免疫グロブリン可変ドメインは、ヒトの血清アルブミンまたはトランスフェリン（これらに限定されない）などの血液タンパク質に結合し得る。さらに、この第2の免疫グロブリン可変ドメインは、神経成長因子（NGF）、血管作動性腸管ペプチド（VIP）、および／もしくはTRPV1または他のパニロイド受容体（これらに限定されない）などの哺乳類の痛みの調節に関連する抗原に結合し得る。さらに、この第2の免疫グロブリン可変ドメインは、オンコスタチンM（OSM）、TNF- α 、IL-6、TRPV4、RANKL、およびIL-1（これらに限定されない）などの炎症反応および／または自己免疫疾患に関連するサイトカインまたはサイトカイン受容体に結合し得る。この第2の抗原は、ADAMTS4および／もしくはADAMTS5（これらに限定されない）などの第2のアグリカナーゼ、ならびに／またはADAMTS5上の第2のエピトープ、ならびに／またはMMP-13（これに限定されない）などの多くのメタロプロテイナーゼにも結合し得る。

【0090】

この第2の免疫グロブリン可変ドメインは、アグリカン、コラーゲンII、プロテオグリカンまたは軟骨に関連する他の分子にも結合し得る。本発明の一態様において、この第2の免疫グロブリン可変ドメインは、ADAMTS4、NGF、OSM、TNF- α 、IL-6、VIP、TRPV1、TRPV4、ADAMTS1、アグリカン、コラーゲンII、RANKL、シンデカン4、ヘッジホッグ、および／またはIL-1からなる群から選択される抗原に結合する。

【0091】

Delgado, et al. Nature Med. 7, 563-568は、VIP治療が、炎症誘発メディエーターの産生、ならびにメタロプロテイナーゼゼラチナーゼ（MMP-2）の発現を抑制すると報告している。MMP-2は、関節炎マウスの足の関節破壊に寄与すると考えられている。インビトロ試験は、間接的な作用もTh2サイトカインの産生の増強を経て仲介され得るが、VIPは滑膜細胞に直接作用し得ることを示している。それにもかかわらず、VIPは、CIAマウスモデルにおいて複数レベルで滑膜機能に影響を与えるように思われる。このペプチドはTh1機能を抑制するが、Th2機能を増大させ、おそらく免疫システムの「バランスを再びとる」。さらに、VIPは、マクロファージならびに滑膜細胞に直接的および間接的に影響を与え、IL-1、TNF- α 、ケモ

10

20

30

40

50

カイン、および基質分解酵素の発現低下をもたらし、関節の完全性を保護する (Firestein Nature Medicine 7, 537-538 (2001))。

【0092】

血管作動性腸管ペプチド (VIP) は、約20年前にリウマチ患者の滑液中で同定されており、本研究の目的は、VIPがOAの痛みの発生に関与し得るかどうかを検討することであった。後肢体重負荷は関節痛の方法として用いられるが、フォンフレイヘア (von Frey hair) 疼痛計を、2次性の機械的痛覚過敏について試験する同側後肢の足底面に適用した。正常ラットの膝関節へのVIPの関節内注射は、反対側の注射していない後肢に対する体重負荷で重要な変化を引き起こし、かつ同じ側足引っ込め閾値の低下を引き起こした。これらの疼痛反応を、VPAC受容体アンタゴニストの同時投与によって阻止した。VIP活性を阻害するアンタゴニストは、OAの痛みの緩和に有効であると立証することができる (McDougall, et al. Pain 2006 Jul; 123 (1-2): 98-105)。

【0093】

神経成長因子 (NGF) は同定された最初のニューロトロフィンであり、末梢神経および中枢神経の両方の発達および生存におけるその役割は十分に特徴づけられている。NGFは、末梢交感神経細胞および胚の感覚神経細胞の発達ならびに前脳基底部コリン作動性神経細胞の発達における重要な生存維持因子であることが示されている (Smeeyne et al., Nature 368: 246-249 (1994) および Crowley et al., Cell 76: 1001-1011 (1994))。NGFは感覚神経細胞における神経ペプチドの発現を上方制御し (Lindsay and Harmer, Nature 337: 362-364 (1989))、その活性は、2つの異なる膜結合受容体、すなわち TrkA 受容体および p75 共通ニューロトロフィン受容体 (それぞれ、「高親和性」NGF 受容体および「低親和性」NGF 受容体と呼ばれることもある) を介して媒介される (Chao et al., Science 232: 518-521 (1986))。NGFについての概説として、Huang et al., Annu. Rev. Neurosci. 24: 677-736 (2001); Bibel et al., Genes Dev. 14: 2919-2937 (2000) を参照されたい。NGF および TrkA 受容体と複合体を形成している NGF の結晶構造が決定されている (Nature 254: 411 (1991); Nature 401: 184-188 (1996) 参照)。

【0094】

オンコスタチンMは、サイトカインのインターロイキン6 (IL-6) ファミリーに属する28KDaの糖タンパク質であり、このIL-6ファミリーには、IL-6、白血球抑制因子 (LIF)、毛様体神経栄養因子 (CNTF)、カルジオトロフィン-1 (CT-1) およびカルジオトロフィン-1様サイトカインが含まれ (Kishimoto T et al (1995) Blood 86: 1243-1254) 参照)、gp130膜貫通シグナル伝達受容体を共有する (Taga T and Kishimoto T (1997) Annu. Rev. Immunol. 15: 797-819 参照)。OSMは、もともとメラノーマ細胞株A375の成長を阻害するその能力によって発見された (Malik Net al (1989) Mol Cell Biol 9: 2847-2853)。その後、より多くの効果が発見され、それは、IL-6ファミリーの他のメンバーのような多機能メディエーターであることがわかった。OSMは、マクロファージ、活性化T細胞 (Zarling JM (1986) PNAS (USA) 83: 9739-9743) 参照)、多形核好中球 (Grenier A et al (1999) Blood 93: 1413-1421) 参照)、好酸球 (Tamura S et al (2002) Dev. Dyn. 225: 327-331)、樹状細胞 (Suda T et al (2002) Cytokine 17: 335-340) 参照) を含んでなる様々な細胞型で産生される。OSMは、膵臓、腎臓、精巣、脾臓、胃、および脳 (Znoyko I et al (2005) Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 283: 182-186) 参照)、ならびに骨髄 (Psenak O et al (2003) Acta Ha

ematol 109:68-75 参照)でも発現している。その主要な生物学的効果には、内皮の活性化(Brown T J et al (1993) Blood 82:33-7 参照)、急性期反応の活性化(Benigni F et al (1996) Blood 87:1851-1854 参照)、細胞の増殖または分化の誘導、炎症性メディエーターの放出、および造血の調節(Tanaka M et al (2003) 102:3154-3162 参照)、骨のリモデリング(de Hooge A S K (2002) Am J Pathol 160:1733-1743 参照)、血管形成の促進(Vasse M et al (1999) Arterioscler Thromb Vasc Biol 19:1835-1842 参照)、ならびに創傷治癒が含まれる。

【0095】

腫瘍壊死因子- α (TNF α ;カケクチンとも称される)として知られるサイトカインは、エンドトキシンまたは他の刺激に応答して、17 kDタンパク質サブユニットの可溶性ホモ3量体として、主に単球およびマクロファージから分泌されるタンパク質である(Smith, R. A. et al., J. Biol. Chem. 262:6951-6954 (1987))。TNFの膜結合26 kD前駆体型についても記載されている(Kriegler, M. et al., Cell 53:45-53 (1988))。

【0096】

TNFが多面的な生物学的活性を有する調節サイトカインであることを示す証拠が蓄積している。これらの活性には、リボタンパク質のリパーゼ合成の阻害(「カケクチン」活性)(Beutler, B. et al., Nature 316:552 (1985))、多形核白血球の活性化(Klebanoff, S. J. et al., J. Immunol. 136:4220 (1986); Perussia, B., et al., J. Immunol. 138:765 (1987))、細胞増殖の阻害または細胞増殖の刺激(Vilcek, J. et al., J. Exp. Med. 163:632 (1986); Sugarman, B. J. et al., Science 230:943 (1985); Lachman, L. B. et al., J. Immunol. 138:2913 (1987))、特定の形質転換細胞型に対する細胞毒性作用(上述のLachman, L. B. et al.; Darzynkiewicz, Z. et al., Canc. Res. 44:83 (1984))、抗ウイルス活性(Kohase, M. et al., Cell 45:659 (1986); Wong, G. H. W. et al., Nature 323:819 (1986))、骨吸収の刺激(Bertolini, D. R. et al., Nature 319:516 (1986); Saklatvala, J., Nature 322:547 (1986))、コラゲナーゼ、およびプロスタグランジンE₂の産生の刺激(Dayer, J.-M. et al., J. Exp. Med. 162:2163 (1985))、T細胞の活性化を含んでなる免疫調節作用(Yokota, S. et al., J. Immunol. 140:531 (1988))、B細胞(Kehrl, J. H. et al., J. Exp. Med. 166:786 (1987))、単球(Philip, R. et al., Nature 323:86 (1986))、胸腺細胞(Ranges, G. E. et al., J. Exp. Med. 167:1472 (1988))、ならびに主要組織適合遺伝子複合体(MHC)のクラスI分子およびクラスII分子の細胞表面発現の刺激(Collins, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:446 (1986); Pujol-Borrel, R. et al., Nature 326:304 (1987))が含まれる。

【0097】

インターロイキン-6 (IL-6)は、増殖刺激および炎症誘発活性を示す22~27 kDaの分泌糖タンパク質である。IL-6は、インターフェロン- β 2 (IFN- β 2)、IL-1誘導性26-kDaタンパク質、肝細胞刺激因子、細胞独性T細胞分化因子、およびB細胞刺激因子としても知られる(Trikha et al., Clin. Cancer Res. 9:4653-4665 (2003))。IL-6は種々な細胞型から分泌される。IL-6は、2種類の膜糖タンパク質からなる高親和性受容体複合体への結合を経てその活性を発揮し、その2種類の膜糖タンパク質は、低い親和性でIL-6に結合

10

20

30

40

50

する 80 kDa の構成受容体、および単独では IL-6 には結合しないが、複合体による IL-6 の高親和性結合に必要である 130 kDa のシグナル伝達構成成分 (gp130) である。IL-6R を膜貫通メタロプロテイナーゼにより切断して、可溶性 IL-6R を得ることができる。

【0098】

RANK は TNF 受容体スーパーファミリーのメンバーであり、細胞外領域の CD40 と最も厳密に似ている。CD40 と同様に、(Rothe et al., Cell 83: 1243, 1995 に記載の共免疫沈降アッセイによって実質的に決定されるように) RANK は、TRAF2 および TRAF3 と会合する。TRAF は、免疫反応および炎症反応の調節において非常に重要である。TNF 受容体スーパーファミリーの様々なメンバーとの会合を経て、シグナルが細胞に伝達される。そのシグナルは、受容体 (複数可) が誘発し、TRAF (複数可) がこの受容体 (複数可) と会合することによって、細胞の増殖、分化またはアポトーシスをもたらす、異なるシグナルは、様々なシグナル伝達事象の協調により細胞に伝達され得る。したがって、このファミリーの一員を介して伝達されるシグナルは、この細胞に伝達される他のシグナルならびに／またはこの細胞の分化の状態に応じて、増殖性シグナル、分化のシグナルまたはアポトーシスシグナルであり得る。この増殖／アポトーシス経路のこのように絶妙な調節は、病原体からの保護を発展させ、維持するために必要であり、不均衡が自己免疫疾患をもたらす得る。

【0099】

RANK は、上皮細胞、一部の B 細胞株、および活性化 T 細胞上で発現する。しかし、活性化 T 細胞上でのその発現は、活性化の約 4 日後と遅い。発現のこの時間的経過は、アポトーシスの既知の作用因子である Fas の発現と一致する。RANK は、CD40 が行うことを知られているように抗アポトーシスシグナルとしての機能を果たし、RANK を発現する細胞をアポトーシスから救出し得る。あるいは、RANK は、再び CD40 と同じように、適切な状況下でアポトーシスシグナルを確認することができる。RANK およびそのリガンドは、免疫反応および炎症反応の調節に不可欠な役割を果たしている可能性がある。

【0100】

RANKL と呼ばれるリガンドは、約 50 個未満のアミノ酸の細胞内ドメイン、膜貫通ドメイン、および約 240～250 個のアミノ酸の細胞外ドメインを有する 2 型膜貫通タンパク質である。それが属する TNF ファミリーの他のメンバーと同様に、RANKL は膜貫通ドメインと受容体結合に必要な受容体結合ドメインの間に「スパーサー」の領域を有する。したがって、RANKL の可溶型は、この受容体結合領域を含んでなる全細胞外ドメインまたはその断片を含み得る。

【0101】

TRPV4 チャネル受容体は、一過性の受容体電位チャネルのバニロイドファミリーの 6 つの既知のメンバーの 1 つであり、TRPV1 とヌクレオチドレベルで 51 % の同一性を共有する。ヒトの TRPV4 チャネル受容体を含んでなるヒトバニロイド受容体型をコードするポリペプチドおよびポリヌクレオチドの例は、ヨーロッパ特許 EP1170365 および国際特許 WO00/32766 の中で見つけることができる。他のファミリーメンバーと同様に、TRPV4 チャネル受容体は、Ca²⁺ 透過性の、非選択的リガンド依存性陽イオンチャネル (ligand-gated cation channel) であり、浸透圧の低下、温度上昇、および小分子リガンドなどの様々な刺激に応答する (例えば、Voets, et al., J. Biol. Chem. (2002) 277: 33704-47051; Watanabe, et al., J. Biol. Chem. (2002) 277: 47044-47051; Watanabe, et al., J. Biol. Chem. (2002) 277: 13569-47051; Xu, et al., J. Biol. Chem. (2003) 278: 11520-11527 参照)。体組織のスクリーニングから、ヒト TRPV4 チャネル受容体が軟骨で最も顕著に発現している。1 次細胞培養およびクローン細胞培養のスクリーニングは、軟骨細胞のみにおいて顕著に発現していることを示す。

【0102】

このような応答は、共通のバニロイド部分を共有するカプサイシンの構造類似体によっても引き起こされる。このような類似体の1つは、レシニフェラトキシシン(RTX)、ユーホルビアの植物の天然産物である。バニロイド受容体(VR)という用語は、カプサイシンおよびこのような関連する刺激性化合物の神経細胞膜の認識部位について記載するために作り出された。カプサイシン応答は、別のカプサイシン類似体のカプサゼピンによって競合阻害され(かつそれによって拮抗され)、非選択的陽イオンチャネル阻害薬であるルテニウムレッドによっても阻害される。これらのアンタゴニストは、わずか中程度の親和性(典型的には、 $140\text{ }\mu\text{M}$ 以上の K_i 値)でVRに結合する。

【0103】

最近、ラットおよびヒトのカプサイシン受容体が、後根神経節細胞からクローニングされた。かかる受容体はVR1とも呼ばれており、「VR1」および「カプサイシン受容体」という用語は、この種のラットおよび／またはヒトの受容体、ならびに哺乳類ホモログを表すために本明細書中で互換的に使用される。痛覚におけるVR1の役割は、バニロイド誘発疼痛行動を示さず、熱と炎症に対する反応が損なっているこの受容体を欠損したマウスを用いて確認されている。このカプサイシン受容体は、温度上昇、低いpH、およびカプサイシン受容体アゴニストに反応して低下する、開口の閾値を有する非選択的陽イオンチャネルである。例えば、このチャネルは、通常、約 45°C よりも高い温度で開口する。このカプサイシン受容体チャネルが開口すると、一般に、この受容体を発現する神経細胞および近くの他の神経細胞からの炎症性ペプチドの放出が続き、疼痛反応を増加する。カプサイシンによる初期の活性化後、このカプサイシン受容体は、cAMP依存性タンパク質キナーゼによるリン酸化により迅速な脱感作を受ける。

【0104】

本発明の抗原結合タンパク質を、ヒトADAMTS5に対して約 $9.0 \times 10^{-9}\text{ M}$ 以下の解離定数によって特徴づけることができ、いくつかの場合において、それは、約 $2.5 \times 10^{-10}\text{ M}$ 以下である。ヒトADAMTS5などの標的に対する抗原結合タンパク質の親和性は、BIACOREまたはOctet(これらに限定されない)などの表面プラズモン共鳴によって測定することができる。BIAcore動態解析を用いて、ADAMTS5抗原に対する抗体またはその断片の結合定数および解離定数を決定することができる。BIAcore動態解析には、チップの表面上に抗体またはその断片を固定したチップからのADAMTS5抗原の結合および解離を解析することが含まれる(以下の実施例の欄参照)。

【0105】

本発明は、ADAMTS5の少なくとも1つの活性を阻止する、かつ／または減少させる抗原結合タンパク質も提供する。いくつかの場合において、本発明の抗原結合タンパク質は、 $\text{Glu}^{373}-\text{Ala}^{374}$ 切断部位におけるADAMTS5によるアグリカンの切断を阻止する、かつ／または減少させる。いくつかの態様において、本発明の抗原結合タンパク質は、非関節投与経路によって投与される時でも、軟骨を透過することができる。例えば、本発明の抗原結合タンパク質は、静脈内投与、筋肉内投与、関節内投与、皮下投与、経口投与、鼻腔内投与、および／または腹腔投与により投与されてもよい。

【0106】

本発明の抗原結合タンパク質をコードする単離したポリヌクレオチドも本発明の中で提供する。

【0107】

一実施形態において、この単離したポリヌクレオチドは、配列番号76、80、116、118、120、122、124、126、128、136、138、140、142、および144からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体 V_H ドメインを含んでなる抗原結合タンパク質またはその断片をコードする。一実施形態において、この単離したポリヌクレオチドは、配列番号75、79、115、117、119、121、123、125、127、135、137、139、141、143、および159から

なる群から選択される。一実施形態において、このポリペプチドは、配列番号 75、79、115、117、119、121、123、125、127、135、137、139、141、143、および 159 からなる群から選択されるポリヌクレオチドを発現する細胞から産生される抗体である。

【0108】

一実施形態において、この単離したポリヌクレオチドは、配列番号 78、82、130、132、134、および 146 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体 V_L ドメインを含んでなる抗原結合タンパク質またはその断片をコードする。一実施形態において、この単離したポリヌクレオチドは、配列番号 77、81、129、131、133、および 145 からなる群から選択される。一実施形態において、このポリペプチドは、配列番号 77、81、129、131、133、および 145 からなる群から選択されるポリヌクレオチドを発現する細胞から産生される抗体である。

10

【0109】

一実施形態において、この単離したポリヌクレオチドは、配列番号 68、72、84、86、88、90、92、94、96、104、106、108、110、112、および 158 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体重鎖を含んでなる抗原結合タンパク質またはその断片をコードする。一実施形態において、この単離したポリヌクレオチドは、配列番号 67、71、83、85、87、89、91、93、95、103、105、107、109、111、および 159 からなる群から選択される。一実施形態において、このポリペプチドは、配列番号 67、71、83、85、87、89、91、93、95、103、105、107、109、111、および 159 からなる群から選択されるポリヌクレオチドを発現する細胞から産生される抗体である。

20

【0110】

一実施形態において、この単離したポリヌクレオチドは、配列番号 70、74、98、100、102、および 114 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる抗体軽鎖を含んでなる抗原結合タンパク質またはその断片をコードする。一実施形態において、この単離したポリヌクレオチドは、配列番号 69、73、97、99、101、および 115 からなる群から選択される。一実施形態において、このポリペプチドは、配列番号 69、73、97、99、101、および 115 からなる群から選択されるポリヌクレオチドを発現する細胞から産生される抗体である。

30

【0111】

本発明の抗原結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含んでなる宿主細胞および前記宿主細胞でこの抗原結合タンパク質を発現させる方法も提供する。さらに、本発明の抗原結合タンパク質を作製する方法を提供する。

【0112】

本発明のベクター、宿主細胞、および抗体を作製する方法には、宿主細胞における複製および発現、ならびに／または宿主細胞からの分泌を制御することができる従来の調節制御配列と、この抗体のコード配列とを作動可能に結合させることによって作製される従来の発現ベクターまたは組換えプラスミドを用いることが含まれる。調節配列には、プロモーター配列、例えば、CMVプロモーター、および他の既知の抗体に由来し得るシグナル配列が含まれる。同様に、相補的な抗体軽鎖または重鎖をコードする DNA 配列を有する第 2 の発現ベクターを作製することができる。好ましくは、この第 2 の発現ベクターは、できるだけ各ポリペプチド鎖が機能的に発現することを保証するために、コード配列および選択マーカーに関する限りを除いて第 1 の発現ベクターと同一である。あるいは、改変抗体の配列をコードする重鎖および軽鎖は、単一ベクター上に存在してもよい。

40

【0113】

選択される宿主細胞を、従来の技術により、第 1 および第 2 のベクターの両方でトランスフェクト（または、単一ベクターでトランスフェクト）して、組換えもしくは合成の軽鎖および重鎖の両方を含んでなる本発明のトランスフェクト宿主細胞を作る。その後、このトランスフェクト細胞を従来の技術により培養し、本発明の遺伝子工学処理した抗体

50

を産生する。組換え重鎖および／または軽鎖の両方の会合を含んでなる抗体を、E L I S AまたはR I Aなどの適切なアッセイによって培養物からスクリーニングする。同様の従来の技術を使用して、他の改変抗体および改変分子を構築してもよい。

【0114】

本発明の方法および組成物の構築に使用されるクローニングステップおよびサブクローニングステップに適切なベクターは、当該技術者によって選択され得る。例えば、従来のp U Cシリーズのクローニングベクターを用いてもよい。1つのベクター、p U C 1 9は、アマシャム社（バッキンガムシャー州、英国）またはファルマシア社（ウプサラ、スウェーデン）などの供給メーカーから市販されている。さらに、容易に複製でき、多数のクローニング部位および選択遺伝子（例えば、抗生物質耐性）を有し、容易に操作できる任意のベクターをクローニングに用いてもよい。したがって、このクローニングベクターの選択は、本発明の制限要素ではない。

10

【0115】

同様に、当該技術者が、抗体の発現に使用するベクターを任意の従来のベクターから選択してもよい。これらのベクターは、選択された宿主細胞における異種D N A配列の複製および発現を指示する（C M VプロモーターまたはR S Vプロモーターなどの）選択された調節配列も含んでなる。これらのベクターは、この抗体または改変免疫グロブリンコード領域をコードする上記に記載のD N A配列を含んでなる。さらに、これらのベクターに、素早い操作で、所望の制限部位を挿入することによって改変し、選択した免疫グロブリン配列を組み込んでもよい。

20

【0116】

発現ベクターは、異種D N A配列、例えば、哺乳類のジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（D H F R）の発現を増幅するのに適した遺伝子によっても特徴付けられ得る。他の好ましいベクター配列には、ウシ成長ホルモン（B G H）などに由来するポリAシグナル配列およびβグロビンのプロモーター配列（b e t a g l o p r o）が含まれる。本明細書で有用な発現ベクターは、当該技術者に公知の技術によって合成されてもよい。

【0117】

このようなベクターの構成要素、例えば、レプリコン、選択遺伝子、エンハンサー、プロモーター、およびシグナル配列などは、商業的または天然の供給源から入手するか、または選択宿主における組換えD N A産物の発現および／または分泌を指示するのに使用する公知の手順により合成してもよい。当該技術分野で公知である、哺乳類、細菌、昆虫、酵母、および真菌での発現のための多数の種類のうちの他の適切な発現ベクターも、この目的のために選択されてもよい。

30

【0118】

本発明は、これらの抗体またはその改変された免疫グロブリン分子のコード配列を含んでなる組換えプラスミドでトランスフェクトした細胞株も包含する。これらのクローニングベクターのクローニングおよび他の操作に有用な宿主細胞も従来のものである。しかし、最も望ましくは、大腸菌の種々の菌株の細胞を、本発明の改変抗体の構築におけるクローニングベクターの複製および他のステップに用いる。

【0119】

本発明の抗体の発現に適した宿主細胞または細胞株は、好ましくは、N S 0、S p 2 / 0、C H O（例えば、D G 4 4）、C O S、線維芽細胞（例えば、3 T 3）、および骨髄腫細胞などの哺乳類細胞であり、より好ましくは、C H Oまたは骨髄腫細胞である。ヒト細胞を用いてもよいので、この分子をヒトのグリコシル化パターンで修飾することが可能になる。あるいは、他の真核生物の細胞株を使用してもよい。適切な哺乳類宿主細胞ならびに形質転換、培養、増幅、スクリーニング、産物生成、および精製のための方法の選択は、当該技術分野で公知である（例えば、上記で引用したS a m b r o o k e t a l 参照）。

40

【0120】

細菌細胞が、本発明の組換えF a bの発現に適した宿主細胞として有用であると判明し

50

得る（例えば、Pluckthun, A., Immunol. Rev., 130: 151-188 (1992) 参照）。しかし、細菌細胞内で発現したタンパク質の傾向が折り畳まれている形態か、不適切に折り畳まれた形態か、または非グリコシル化形態であるため、細菌の細胞内で産生された組換えFabは、抗原結合能の保持についてスクリーニングされなければならない。細菌細胞が発現した分子が正しく折り畳まれた形態で産生された場合は、その細菌細胞は望ましい宿主であろう。例えば、発現に用いられる大腸菌の様々な菌株は、バイオテクノロジーの分野において宿主細胞として公知である。枯草菌、放線菌、および他の桿菌などの様々な菌株も、本方法で使用されてもよい。

【0121】

望まれる場合、当該技術者に公知の酵母細胞株、ならびに昆虫細胞、例えば、ショウジョウバエ、鱗翅目、およびウイルスの発現システムも、宿主細胞として利用可能である（例えば、Miller et al., Genetic Engineering, 8: 277-298, Plenum Press (1986) および本明細書で引用する参考文献参照）。

【0122】

これらのベクターを構築することができる一般的な方法、本発明の宿主細胞を産生するのに必要とされるトランスフェクション法、およびこのような宿主細胞から本発明の抗体を産生するのに必要な培養方法は全て従来技術である。典型的には、本発明の培養方法は、通常、無血清な懸濁液中で細胞を培養することによる無血清培養法である。同様に、産生した時点で、本発明の抗体を、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、およびゲル電気泳動などを含んでなる当該技術分野の標準的な手順に従って細胞培養内容物から精製してもよい。このような技術は、当該技術者の技量の範囲内であり、本発明を限定するものではない。例えば、改変抗体の調製は国際特許WO 99/58679 およびWO 96/16990 に記載されている。

【0123】

抗体の発現のさらに別の方法は、米国特許第4,873,316号などに記載されているトランスジェニック動物における発現を利用してもよい。これは動物のカゼインプロモーターを用いる発現系に関し、そのカゼインプロモーターが哺乳類にトランスジェニック技術で組込まれた場合、そのメスはそのミルク中に所望の組換えタンパク質を産生することが可能になる。

【0124】

本発明のさらなる態様において、本発明の抗体を産生する方法を提供し、その方法は、本発明の抗体の軽鎖および／または重鎖をコードするベクターで形質転換またはトランスフェクトした宿主細胞を培養するステップおよびそれによって産生した抗体を回収するステップを含んでなる。

【0125】

一態様において、本発明は、触媒ドメインおよびディスインテグリンドメインの両方に同時に結合する分子を提供することによって、ADAMおよびADAMTS活性を阻害する方法を提供する。特定の実施形態において、このADAMTSは、ADAMTS4またはADAMTS5である。ADAMTS5ならびにADAMTS5mAbの12F4.1H7および7B4.1E11について別々の結晶構造を用いるインシリコの構造「最良適合」コンピューターモデルは、ADAMTS5の触媒ドメインおよびディスインテグリンドメインの両方の間での同時抗体／抗原相互作用を示唆する。ADAMプロテアーゼおよびADAMTSプロテアーゼの触媒ドメインおよびディスインテグリンドメインは、これらのドメイン間に可動性を与えるヒンジ領域で分離されており、このヒンジ領域は機能を調節するか、またはこの触媒部位への基質局在化を可能にするように作用し得る。エピトープに及ぶこのドメインで観察される高親和性mAb結合は、ADAMTS5の触媒ドメインおよびディスインテグリンドメインを共に固定するように思われ、それによって酵素活性を中和する。一実施形態において、この分子は、ディスインテグリンドメインおよび触媒ドメインの両方に同時に結合する抗体である。別の実施形態において、この分子は、

10

20

30

40

50

本発明の抗体または抗体断片である。別の実施形態において、本発明は、A M A M T S 5の酵素活性を中和する抗体に関係し、その中で、この抗体は、B i a C o r eまたはO c t e t Q Kによって測定した時、約 1×10^{-9} または 2×10^{-10} 未満のKDで触媒ドメインおよびディスインテグリンドメインに同時に結合する。

【0126】

本発明の別の実施態様において、本明細書に記載の抗原結合タンパク質の少なくとも1つを含んでなる医薬組成物を提供する。本発明は、ヒトにおける少なくとも1つのA D A M T S 5活性を減少させる薬剤の製造において、A D A M T S 5に対する少なくとも1つの抗原結合タンパク質の使用も提供する。本発明は、ヒトにおける少なくとも1つのA D A M T S 5活性を減少させるために、A D A M T S 5に対する少なくとも1つの抗原結合タンパク質の使用を提供し、それは、A D A M T S 5に対する少なくとも1つの抗原結合タンパク質を含んでなる組成物を、それを必要としている患者に投与することを含んでなる。

10

【0127】

本発明の医薬組成物は、さらに、第2の抗原結合タンパク質を含んでもよい。いくつかの場合において、この第2の抗原結合タンパク質はモノクローナル抗体であってもよい。一実施形態において、この第2のモノクローナル抗体は、A D A M T S 4、A D A M T S 5、N G F、O S M、T N F- α 、I L-6、V I P、T R P V 1、T R P V 4、A D A M T S 1、アグリカン、コラーゲンI I、R A N K L、および／またはI L-1の群から選択される少なくとも1つの抗原に結合する。例として、本発明の医薬組成物は、A D A M T S 5に対するモノクローナル抗体およびA D A M T S 5にも結合し得る第2のモノクローナル抗体であり得る第1の抗原結合タンパク質を含み得る。別の例として、本発明の医薬組成物は、A D A M T S 5に結合するモノクローナル抗体である第1の抗原結合タンパク質、ならびに以下のA D A M T S 4、N G F、O S M、T N F- α 、I L-6、V I P、T R P V 1、T R P V 4、A D A M T S 1、アグリカン、コラーゲンI I、R A N K L、および／またはI L-1のうちの1つに結合するモノクローナル抗体である第2の抗原結合タンパク質を含み得る。

20

【0128】

本発明の医薬組成物の少なくとも一回用量（one dose）を投与することを含んでなる、治療を必要としている患者を治療する方法も提供する。いくつかの態様において、この患者は、軟骨の疾患を患っている。患者は、癌、疼痛、慢性疼痛、神経因性疼痛、術後の疼痛、変形性関節症、スポーツ外傷、びらん性関節炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、ライム関節炎、若年性関節炎、強直性脊椎症、神経痛、神経障害、痛覚、神経損傷、虚血、神経変性、炎症性疾患、軟骨変性、咽頭、気管、耳管、椎間板、靱帯、腱、関節包、または骨の発達に影響を与える疾患、椎間板変性、骨減少症、または歯周病、急性関節損傷、および／または関節破壊に関連する疾患の群から選択される1つ以上の疾患を患っている可能性がある。いくつかの場合において、この患者は変形性関節症を患っている。

30

【0129】

別の実施形態において、前記医薬組成物の少なくとも一回用量を投与することで、前記患者における軟骨分解が減少する。別の実施形態において、前記医薬組成物の少なくとも一回用量を投与することで、前記患者におけるアグリカン切断が阻害され、かつ／または減少する。

40

【0130】

本明細書に記載の方法および使用によって産生および処方され、軟骨分解に関連する疾患を治療するか、または症状を緩和することができる医薬組成物も本明細書に提供する。本発明は、単独で投与するか、または少なくとも1種類のステロイドおよび／または鎮痛剤を含んでなるがそれらに限定されない少なくとも1つの他の治療薬と組み合わせて投与するための、軟骨の疾患の治療に使用するA D A M T S 5抗体を提供する。本発明の抗原結合タンパク質は、同じ用量でまたは別々に他の治療薬と同時投与することができる。本発明は、本明細書に記載の方法および使用の全てのためのA D A M T S 5抗体またはその

50

断片も提供する。

【0131】

本明細書で使用する「患者」は、ヒトまたは他の動物を表す。

【0132】

本明細書で使用する「治療」は、(1) 治療される病状または治療される病状の生物学的徴候の1つ以上の改善もしくは予防、(2) (a) 治療される病状につながるか、もしくは関与する生物学的カスケードの1つ以上のポイント、または(b) 治療される病状の生物学的徴候の1つ以上との干渉、または(3) 治療される病状に関連する症状もしくは効果の1つ以上の緩和を意味する。当該技術者は、「予防」が絶対的な言葉ではないことを理解するであろう。医学において、「予防」は、病状もしくはその生物学的徴候の可能性または重症度を実質的に軽減させるか、またはそのような病状もしくはその生物学的徴候の発症を遅らせる薬剤の予防投与を表すと理解されている。

10

【0133】

本明細書で使用する、「安全な有効量」とは、健全な医学的判断の範囲内で治療される病状の肯定的な変更を顕著に誘導するのに十分であるが、重篤な副作用を(妥当な利点/リスク比で)避けるのに十分低い少なくとも1つの抗原結合タンパク質の量を意味する。本発明の少なくとも1つの抗原結合タンパク質の安全な有効量は、(例えば、この化合物の効力、有効性、および半減期を考慮して)選択される特定の化合物、選択される投与経路、治療される病状、治療される病状の重症度、治療される患者の年齢、サイズ、体重、および健康状態、治療される患者の病歴、治療期間、併用療法の性質、および所望の治療効果などの要因により変化するであろうが、それでも日常的に当該技術者によって決定され得る。

20

【0134】

本発明の抗原結合タンパク質は、全身投与と局所投与の両方を含んでなる任意の適切な投与経路によって投与され得る。全身投与には、経口投与、非経口投与、経皮投与、直腸投与、および吸入による投与が含まれる。非経口投与は、経腸投与、経皮投与、または吸入以外の投与経路を表し、典型的には注射または点滴による。非経口投与には、静脈内投与、筋肉内投与、および皮下注射または点滴、関節内投与が含まれる。吸入は、口から吸入しようが、鼻腔から吸入しようが、患者の肺への投与を表す。局所投与には、皮膚への塗布、ならびに眼内投与、耳内投与、腔内投与、および鼻腔内投与が含まれる。

30

【0135】

本発明の抗原結合タンパク質は、1回だけまたは投与計画に従って投与されてもよく、その投与計画の中で、複数の用量が一定の期間中様々な時間間隔で投与される。例えば、用量は、1日あたり1、2、3、または4回投与され得る。用量は、所望の治療効果が達成されるまで、または所望の治療効果を維持するために無期限に投与され得る。本発明の抗原結合タンパク質に適した投与計画は、吸収、分布、および半減期などのその化合物の薬物動態学的特性によって決まり、当該技術者が決定することができる。さらに、このような療法が管理される機関を含んでなる、本発明の化合物に適した投与計画は、当該技術者の知識および専門知識内の治療される病状、治療される病状の重症度、治療される患者の年齢、および健康状態、治療される患者の病歴、併用療法の性質、所望の治療効果などの要因によって決まる。適切な投与計画が、個々の患者がこの投与計画へ反応するように施される調節または時間と共に個々の患者が変化を必要とするような調節を必要とし得ることを、かかる当該技術者はさらに理解するであろう。

40

【0136】

特定の実施形態において、この抗体を用いて、軟骨に薬物を送達する。このような薬剤は、アグリカナゼ阻害剤、抗炎症薬、ステロイドまたは疼痛管理に関連する薬物であり得る。したがって、一態様において、本発明は薬物を軟骨に送達する方法であり、本発明の抗体に薬物を裏打ちすることを含んでなる方法である。このような送達は、インビトロ、エキソビボ、またはインビボで行われ得る。

【0137】

50

別の実施形態において、この抗体を用いて軟骨に成長因子を送達し、これは、新しい軟骨の成長を促進する。このような成長因子には、骨形成タンパク質、特に、BMP-7が含まれる。このような送達は、インビトロ、エキソビボ、またはインビボで行われ得る。

【実施例】

【0138】

以下の実施例は、本発明の様々な態様を説明する。

【0139】

実施例1－ヒトADAMTS4およびヒトADAMTS5に対するMabの産生

ヒトADAMTS5タンパク質およびヒトADAMTS4タンパク質を、トランスフェクトしたCHO細胞および／またはBacMamにより形質転換したHEK293細胞内で産生し、従来のクロマトグラフィー法により単離した。

【0140】

SJLマウスを、精製したADAMTS4（完全長）およびADAMTS5（切断型、完全長、Catドメイン、Cat/disドメイン）で共免疫化した。免疫原性を、一連の出血の血清で試験した。

【0141】

脾細胞およびリンパ節を単離し、P3X63/Ag8.653由来の融合パートナーを用いてマウス骨髓腫細胞と融合させた。不死化抗体産生細胞を作製した。HAT選択を用いて、融合していない骨髓腫細胞を除外した。

【0142】

活性培養物から得られたハイブリドーマの上清を、組換えヒトADAMTS5およびADAMTS4の特異的結合および中和についてスクリーニングした。ヒットを、限界希釈または半固体培地での増殖のいずれか一方によって同定、確認およびクローニングし、単一クローンにした。

【0143】

所望の特性を有するモノクローナル抗体を、液体培養でスケールアップし、この抗体を標準的なクロマトグラフィー法により精製した。その後、得られた精製抗体クローンを、結合親和性と機能的効力についてさらに特徴づけた。

【0144】

実施例2－マウス抗体の特徴づけ

ADAMTS5mAbを、インビトロアグリカン基質切断アッセイを用いて、中和力価について特徴づけた（表1）。ADAMTS5mAbを、Octet QK（表1）およびBiacore（同程度だが図示せず）の両方の科学技術を用いて親和性について特徴づけた。抗体も、cellTRFおよびOctet QKによってヒトADAMTS1、ADAMTS4、ADAMTS13、MMP1、MMP3、MMP9およびMMP13に対する交差反応について試験し、それらの全ては陰性であった（図示せず）。全てのmAb、マウス、イヌ、およびカニクイザルのADAMTS5に対する結合および中和によるオルソログ交差反応についても評価した（表1）。ラットADAMTS5に対する結合も検出された（図示せず）。Octet QKにおける抗ヒトADAMTS5mAbのマウス型およびキメラ型の親和性比較を表2にまとめる。

【0145】

【表 1】

表 1：精製した抗ヒトADAMTS 5モノクローナル抗体の特徴

m A b	親和性 (O c t e t Q K)			アグリカ ン基質切 断	ADAMTS 5 オルソログ (結合／中和)		
	K a	K d	K D		マウス	カニクイザ ル	イヌ
1G10.1C9	4.47E+0 4	8.43E-0 6	1.88E-1 0	0.375	(+／+)	(+／+)	(+／+)
2D3.1D4	6.67E+0 4	5.75E-0 6	8.62E-1 1	0.031	(+／+)	(+／+)	(+／+)
3A12.1D7	5.67E+0 4	4.67E-0 6	8.24E-1 1	0.769	(+／+)	(+／+)	(+／+)
5F10.1H6	5.53E+0 4	6.99E-0 6	1.26E-1 0	0.05	(+／+)	(+／+)	(+／+)
11F12.1D1 2	6.57E+0 4	4.33E-0 5	6.58E-1 0	2.527	(+／+)	(+／+)	(+／+)
12F4.1H7	3.31E+0 4	1.44E-0 5	4.36E-1 0	0.06	(+／+)	(+／+)	(+／+)
7B4.1E11	4.86E+0 4	4.36E-0 5	8.99E-1 0	0.08	(+／+)	(+／+)	(+／+)

【0146】

【表 2】

表 2：精製したマウス抗ヒトADAMTS 5 m A b およびキメラ抗ヒトADAMTS 5 m A b の直接比較

m A b	親和性 (O c t e t Q K)		
	K a	K d	K D
マウス 12F4.1H7	5.64E+04	3.86E-06	6.85E-11
キメラ 12F4.1H7	5.55E+04	4.43E-06	7.99E-11
マウス 7B4.1E11	7.65E+04	2.74E-05	3.58E-10
キメラ 7B4.1E11	7.18E+04	2.47E-05	3.45E-10

【0147】

実施例 3－配列

実施例 2 で同定した特徴に基づいて、6 個のモノクローナル抗体を同定した。これらの抗体の可変領域の配列決定を行った。アラインメントを以下に示す（表 3）。コンセンサス（大多数）の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を、以下の配列番号 30 および 31 に示す。12F4.1H7、1G10.1C9、2D3.1D4、3A12.1D7、5F10.1H6、および 7B4.1E11 と命名する m A b の重鎖可変領域を、それぞれ、配列番号 32～37 に示し、それぞれ配列番号 147、157、151、153、155、および 149 がコードする。2D3.1D4、3A12.1D7、5F10.1H6、7B4.1E11、および 12F4.1H7 と命名する m A b の軽鎖可変領域を、それぞれ、配列番号 38～42 に示し、それぞれ、配列番号 152、154、156、150、および 148 がコードする。

【0148】

【表3】

表3：抗ADAMTS5mAb CDR配列アラインメント

V_HCDRアラインメント

CDR H1	
EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFS	DAWMDWVRQS 大多数
-----+-----+-----+-----+-----	
10 20 30 40	
-----+-----+-----+-----+-----	
1 EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFS	DAWMDWVRQS 12F4. 1H7 VH.pro
1 EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFNFS	DAWMDWVRQS 1G10. 1C9 VH.pro
1 EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGITFS	DAWMDWVRQS 2D3. 1D4 VH.pro
1 EVKFEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFI FS	DAWMDWVRQS 3A12. 1D7 VH.pro
1 EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFS	DAWMDWVRQS 5F10. 1H6 VH.pro
1 EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTSS	DAWMDWVRQS 7B4. 1E11 VH.pro
CDR H2	
PEKGLEWVAEIRHKANDHAI FYXESVKG	RFTISRDDSKSI 大多数
-----+-----+-----+-----+-----	
50 60 70 80	
-----+-----+-----+-----+-----	
41 PEKGLEWVAEIRHKANDHAI FYDES	VKGRFTISRDDSKNI 12F4. 1H7 VH.pro
41 PEKGLEWVAEIRHKANDHAI FYAES	VKGRFTISRDDSKSS 1G10. 1C9 VH.pro
41 PEKGLEWVAEIRNTANNHATFYAES	VKGRFTISRDDSKST 2D3. 1D4 VH.pro
41 PEKGLEWVAEIRHKANDYAI FYDES	VKGRFTISRDDSKSI 3A12. 1D7 VH.pro
41 PEKGLEWVAEIRHKANDHAI FYDES	VKGRFTISRDDSKSI 5F10. 1H6 VH.pro
41 PEKGLEWVAEIRNKANNHARHYAES	VKGRFTISRDDSKSS 7B4. 1E11 VH.pro
CDR H3	
VYLQMNSLRPEDTGIIYCTS PFAY	-----WGQGLVTVSA 大多数
(配列番号30)	
-----+-----+-----+-----+-----	
90 100 110 120	
-----+-----+-----+-----+-----	
81 VYLQMNSLRPEDTGIIYCTS PFAY	-----WGQGLVTVSA 12F4. 1H7 VH.pro
(配列番号32)	
81 VYLQMNSLRAEDTGIIYCTS PFAY	-----WGQGLVTVSA 1G10. 1C9 VH.pro
(配列番号33)	
81 VYLQMNTLRPEDTGIIYCTS PFAY	-----WGQGLVTVSA 2D3. 1D4 VH.pro
(配列番号34)	
81 VYLQMNNLRPEDTGIIYCTS PFAY	-----WGQGLVTVSA 3A12. 1D7 VH.pro
(配列番号35)	
81 VYLQMNSLRPEDTGIIYCTS PFAY	-----WGQGLVTVSA 5F10. 1H6 VH.pro
(配列番号36)	
81 VYLQMNSLRAEDSGIIYCTR	TYYYGSSYGYCDV WGTGTTVTSS 7B4. 1E11 VH.pro
(配列番号37)	

【0149】

【表 4】

V_L CDRアラインメント

CDR L1

DIVMTQSQKFMSVTVGDRVSITC **KASQSVGTTIV** WYQQKP 大多数

-----+-----+-----+-----+
 10 20 30 40
 -----+-----+-----+-----+

1 DIVMTQSQKFMSVTVGDRVSITC **KASQNVGTAVV** WFQQKP 2D3. 1D4VL.pro
 1 DIVMTQSQKFMSVTVGDRVSITC **KASQSVGTTIV** WYQQKP 3A12. 1D7VL.pro
 1 DIVMTQSQRFMSVTVGDRVSITC **KASQSVGTTIV** WYQQKP 5F10. 1H6VL.pro
 1 DIQMTQSPA SL SASVGETVTITC **RTSENI** YSYLA WYQQKQ 7B4. 1E11VL.pro

1 DIVMTQSQKFMSVTVGDRVSITC **KASQSVGTTIV** WYQQKP 12F4. 1H7VL.pro

CDR L2

GQSP KLL IY **SASNRXT** GVPDRFTGSGSGTDFILTINNVQS 大多数

-----+-----+-----+-----+
 50 60 70 80
 -----+-----+-----+-----+

41 GQSP KLL IY **SASNRVT** RVPDRFTGSGSGTDFLTISNVQS 2D3. 1D4VL.pro
 41 GQSP KLL IY **SASNRHT** GVPDRFTGSGSGTDFILTISNVQS 3A12. 1D7VL.pro
 41 GQSP KLL IY **SASTRYT** GVPDRFTGGGSGTDFILTINNVQS 5F10. 1HVL.pro
 41 GKSPQLLVY **NAKTLAE** GVPDRFTGSGSGTQFSLKINSLQP 7B4. 1E11VL.pro
 41 GQSP KLL IY **SASNRHT** GVPDRFTGSGSGTDFILTINNVQS 12F4. 1H7VL.pro

CDR L3

EDLADYFC **QQYSSYPFT** FGS GTKLEIKRA 大多数 (配列番号31)

-----+-----+-----+-----+
 90 100
 -----+-----+-----+-----+

81 EDLADYFC **QQYVNYPFT** FGS GTKLEIKRA 2D3. 1D4VL.pro (配列番号38)
 81 EDLADYFC **QQYSSYPFT** FGS GTKLEIKRA 3A12. 1DVL.pro (配列番号39)
 81 EDLADYFC **QQYSSYPFT** FGS GTKLEIKRA 5F10. 1HVL.pro (配列番号40)
 81 EDFG SYSC **QHGYGTPWT** FGGG GTKLEIKRA 7B4. 1E1VL.pro (配列番号41)
 81 EDLADYFC **QQYTSYPFT** FGS GTKLEIKRA 12F4. 1H7VL.pro (配列番号42)

【0150】

実施例4ーヒトOA軟骨外植片

ドナーのヒトOA軟骨を膝の置換手術から得た。軟骨を骨から処理し、直径3mmのディスクに切断した。ディスクを任意抽出し、96ウェルプレートで培養した。これらの組織中の内因性疾患因子が、エキソビポでの軟骨分解の進行を可能にした。試料を、以下の調和させた対照IgGアイソタイプ、(7B4. 1E11および12F4. 1H7と命名し) 選択した抗ADAMTS5抗体、(7E8. 1E3と命名し) 選択した抗ADAMTS4抗体、または以下のGSK571949 (CAS番号329040-94-0) などの既知のアグリカナゼ/MMP阻害剤で処理した。各処理条件を、各ドナープレート上で8回試験した。ARGSVIL (配列番号1) ネオエピトープ放出の阻害を、実験の過

10

20

30

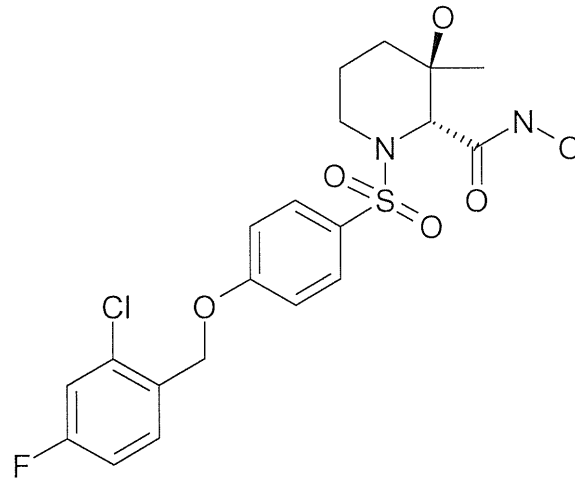
40

50

程の間の多数の時点で各試料について測定した。

【0151】

【化1】



GSK571949

10

【0152】

以前に記載したとおり、典型的には、アグリカナーゼによるアグリカンの切断は、アグリカンの球間ドメイン内の保存領域で起こる。酵素切断は、アグリカンのN末端アミノ酸配列（ARGSVIL）を有するネオエピトープを含んでなる遊離断片を産生する。この切断ネオエピトープを、この切断型に特異的に結合するが、インタクトなアグリカンには結合しないモノクローナル抗体を用いて検出および定量化することができる。ADAMTS5抗体およびADAMTS5阻害剤の両方は、対照およびADAMTS4抗体よりも、ARGSVIL放出を著しく阻害することを示した。ARGSVIL放出の阻害率（％）のまとめを図1に示す。これらの結果は、ADAMTS5特異的mAbが、小分子アッセイの対照化合物と比較して、2～3週間の評価期間中に約70％の割合で分解を阻害することができることを示す。これらの結果は、多くの個々のドナー試料内でおおよそ個々のドナー試料の全てで一貫している。

20

30

【0153】

実施例5－ヒトOA軟骨外植片におけるADAMTS5抗体用量反応

ARGSVIL放出の阻害率（％）を、選択した抗ADAMTS5抗体の用量反応について実施例4に記載したとおりに試験した（図2参照）。マウス抗体7B4、1E11を、以下の用量：1340nM、670nM、335nM、81.25nMで試験した。対照アグリカナーゼ／MMP阻害剤も用いた。ARGSVIL放出率（％）は、抗ADAMTS5の最高用量において最低であり、低用量で治療した際に減少した。調和させたアイソタイプ対照抗体の治療用量（図示せず）を用いて0％阻害を決定し、単一有効量のGSK571949を用いて100％阻害を計算した。このmAb治療は、670nMの用量で最大効果に達するように思える用量反応を示す（図2）。しかし、670nMの用量ポイントでドナーが多く（n＝22）示されたが、他の用量ではドナーは少ない（n≤5）ことは留意すべきである。

40

【0154】

実施例6－DMMのインビボ研究

抗ADAMTS5抗体の有効性を評価するために、不安定化内側半月（DMM）モデルを用いて、OAをマウスにおいて誘導した。2つの別々の実験を示す。DMM手術の3日前に、マウスを以下の抗体：抗ADAMTS5（7B4、1E11）、抗ADAMTS5（12F4、1H7）、またはIgGアイソタイプのうちの1つを0.5mg/用量で投与した。対照群には、DMM手術で処理していないマウス、偽手術を行ったマウス、および正常マウスが含まれた。投与後6日目に、マウスを屠殺し、盲目の研究者が病理組織診

50

断を行い、そこから、関節スコアを評価した各マウスの膝に与えた。抗ADAMTS5抗体は、IgG1アイソタイプ対照と比較して、著しく良好な平均関節スコアを示した。さらに、偽手術した膝および正常な膝の平均関節スコアは、未処理の膝およびIgGアイソタイプと比較して、著しく良好であった。

【0155】

実施例7ーモノクローナル抗体は、インビトロおよびインビボで軟骨を透過する。

治療抗体が組織を透過し、疾患部位に到達する能力およびそれらの特異的標的は、有効性にとって重要である。アグリカナーゼは、分泌タンパク質として分類されるが、軟骨基質内の軟骨細胞の細胞周囲の領域に優先的に局在することが示されている。そのために、治療mAbがアグリカナーゼの標的に到達するためには、軟骨基質を透過する必要性があり得る。

10

【0156】

初めに、mAbのヒト軟骨を透過する能力の評価を、選択した抗ADAMTS5mAbを含んでなる、複数の特異性を有するmAbを用いて、エキソビボ組織で行った。膝関節置換手術標本から、軟骨下骨を通して滑膜表面に及ぶ全層の軟骨プラグを、規定した期間、軟骨細胞または非特異的アイソタイプ対照の表面上に位置するヒトタンパク質に対して特異性を有するマウスモノクローナル抗体の存在下で組織培養した。各時点の終わりに、組織を全層評価のために処理し、切片を作り、FITC標識抗マウス検出抗体を用いて染色した。透過を、軟骨組織内の軟骨細胞染色の色の濃さと強度によって定義する。標的特異性に関係なく、mAb透過は主に軟骨の滑膜表面に由来し、濃度に依存して3～4日以内に全層透過に進む濃度依存性および時間依存的なプロセスであることが観察された（図示せず）。アイソタイプ対照mAbで処理した軟骨プラグについての染色は観察されなかった（図示せず）。

20

【0157】

軟骨透過のin vivo評価を、ADAMTS4、ADAMTS5、およびアイソタイプ対照に対する選択的mAbを含んでなる、近赤外(NIR)色素標識モノクローナル抗体を用いて行った。NIR標識mAbを、6週間前に変形性関節症の外科的誘導(DMM)を受けたマウスに全身(腹腔内)投与(0.5mg用量)した。mAbの体内分布を、Licor Odysseyシステムを用いて、投与後の多数の時点において動物の全体で監視した。mAb投与後4日目に、マウスを屠殺し、膝関節の画像化をOdysseyで行った。その後、NIR検出用のフィルタおよびカメラを備えた顕微鏡での高解像度解析のために、膝関節を処理し、切片を作った。mAbの全身投与後4日以内に、全層の軟骨透過を抗ADAMTS5mAbおよび抗ADAMTS4mAbでは観察することができたが、特異的な染色は、アイソタイプ対照mAbでは観察されなかった（図示せず）。特徴的な細胞周囲の軟骨細胞染色パターンは、ADAMTS5およびADAMTS4に特異的なmAbでは観察された（図示せず）。

30

【0158】

実施例8ー抗体のヒト化ーハイブリドーマ可変領域のクローニング

全RNAを、7B4.1E11および12F4.1H7のハイブリドーマ細胞から抽出し、その後、重鎖および軽鎖の可変ドメインcDNA配列を、逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によって作製した。RT-PCRのフォワードプライマーは、マウス免疫グロブリン遺伝子リーダー配列に特異的な縮重プライマーの混合物であり、リバースプライマーはこれらの抗体の定常領域に特異的であり、この場合、7B4.1E11に対してはアイソタイプIgG1、12F4.1H7に対してはIgG2であった。プライマーを、JonesとBendig(Bio/Technology 9:88,1991)によって記載された戦略に基づいて設計した。RT-PCRを両方のV領域配列について行い、正しいV領域配列の配列検証を可能にした。RT-PCRによって作製したV領域産物をクローニングし(インビトロジェンTAクローニングキット)、配列データを得た。

40

【0159】

50

実施例 9－抗体のヒト化－キメラのクローニング

キメラ抗体をコードする DNA 発現コンストラクトを、哺乳類発現ベクターにクローニングするための制限部位およびヒトシグナル配列を含んでなる重複オリゴヌクレオチドを構築することにより新たに調製した。ヒト $\gamma 1$ 定常領域を含んでなる哺乳類発現ベクター内にクローニングするために、H i n d I I I および S p e I の制限部位を導入し、シグナル配列（配列番号 45）を含んでなる V_H ドメインを構成した。ヒト κ 定常領域を含んでなる哺乳類発現ベクター内にクローニングするために、H i n d I I I および B s i W I の制限部位を導入し、シグナル配列（配列番号 45）を含んでなる V_L ドメインを構成した。

【0160】

10

実施例 10－抗体のヒト化－ヒト化変異体のクローニング

ヒト化抗体の変異体をコードする DNA 発現コンストラクトを、哺乳類発現ベクターにクローニングするための制限部位およびヒトシグナル配列を含んでなる重複オリゴヌクレオチドを構築することにより新たに調製した。ヒト $\gamma 1$ 定常領域を含んでなる哺乳類発現ベクター内にクローニングするために、H i n d I I I および S p e I の制限部位を導入し、シグナル配列（配列番号 45）を含んでなる V_H ドメインを構成した。ヒト κ 定常領域を含んでなる哺乳類発現ベクター内にクローニングするために、H i n d I I I および B s i W I の制限部位を導入し、シグナル配列（配列番号 45）を含んでなる V_L ドメインを構成した。

【0161】

20

【表 5】

表 4 : 抗体の変異体

抗体番号	別名	説明	ヌクレオチド配列の配列番号	アミノ酸配列の配列番号
BPC1622	7B4 キメラ	7B4 キメラ重鎖	67	68
		7B4 キメラ軽鎖	69	70
BPC1623	12F4 キメラ	12F4 キメラ重鎖	71	72
		12F4 キメラ軽鎖	73	74
BPC1634	7B4 H0L0	7B4 H0 重鎖	83	84
		7B4 L0 軽鎖	97	98
BPC1635	7B4 H1L0	7B4 H1 重鎖	85	86
		7B4 L0 軽鎖	97	98
BPC1636	7B4 H2L0	7B4 H2 重鎖	87	88
		7B4 L0 軽鎖	97	98
BPC1637	7B4 H3L0	7B4 H3 重鎖	89	90
		7B4 L0 軽鎖	97	98
BPC1638	7B4 H4L0	7B4 H4 重鎖	91	92
		7B4 L0 軽鎖	97	98
BPC1639	7B4 H5L0	7B4 H5 重鎖	93	94
		7B4 L0 軽鎖	97	98
BPC1640	7B4 H6L0	7B4 H6 重鎖	95	96
		7B4 L0 軽鎖	97	98
BPC1641	7B4 H0L1	7B4 H0 重鎖	83	84
		7B4 L1 軽鎖	99	100
BPC1642	7B4 H1L1	7B4 H1 重鎖	85	86
		7B4 L1 軽鎖	99	100
BPC1643	7B4 H2L1	7B4 H2 重鎖	87	88
		7B4 L1 軽鎖	99	100
BPC1644	7B4 H3L1	7B4 H3 重鎖	89	90
		7B4 L1 軽鎖	99	100
BPC1645	7B4 H4L1	7B4 H4 重鎖	91	92
		7B4 L1 軽鎖	99	100
BPC1646	7B4 H5L1	7B4 H5 重鎖	93	94
		7B4 L1 軽鎖	99	100
BPC1647	7B4 H6L1	7B4 H6 重鎖	95	96
		7B4 L1 軽鎖	99	100
BPC1648	7B4 H0L2	7B4 H0 重鎖	83	84
		7B4 L2 軽鎖	101	102
BPC1649	7B4 H1L2	7B4 H1 重鎖	85	86
		7B4 L2 軽鎖	101	102
BPC1650	7B4 H2L2	7B4 H2 重鎖	87	88
		7B4 L2 軽鎖	101	102
BPC1651	7B4 H3L2	7B4 H3 重鎖	89	90
		7B4 L2 軽鎖	101	102
BPC1652	7B4 H4L2	7B4 H4 重鎖	91	92
		7B4 L2 軽鎖	101	102

10

20

30

40

BPC1653	7B4 H5L2	7B4 H5 重鎖	93	94
		7B4 L2 軽鎖	101	102
BPC1654	7B4 H6L2	7B4 H6 重鎖	95	96
		7B4 L2 軽鎖	101	102
BPC1655	12F4 H0L0	12F4 H0 重鎖	103	104
		12F4 L0 軽鎖	113	114
BPC1656	12F4 H1L0	12F4 H1 重鎖	105	106
		12F4 L0 軽鎖	113	114
BPC1657	12F4 H2L0	12F4 H2 重鎖	107	108
		12F4 L0 軽鎖	113	114
BPC1658	12F4 H3L0	12F4 H3 重鎖	109	110
		12F4 L0 軽鎖	113	114
BPC1659	12F4 H4L0	12F4 H4 重鎖	111	112
		12F4 L0 軽鎖	113	114

10

【0162】

実施例11－抗体のヒト化－（抗体の定量化を含んでなる）組換え抗体の発現

重鎖および軽鎖をコードする発現プラスミドをそれぞれHEK2936E細胞に一過的に同時トランスフェクトし、小規模で発現させて、抗体を産生した。7B4および12F4キメラ抗体ならびに無関係の対照抗体の重鎖および軽鎖も発現させた。抗体をELISAで定量化した。ELISAプレートを、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗ヒトIgG（シグマI3382）でコーティングし、ブロッキング溶液（トリス緩衝生理食塩水中4%BSA）でブロッキングした。組織培養上清の種々な希釈物を加え、このプレートを室温で1時間インキュベートした。既知の標準抗体の希釈物もこのプレートに加えた。このプレートをTBSTで洗浄し、結合を、ブロッキング溶液で1/1000希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトκ軽鎖抗体（シグマA7164）を添加することによって検出した。このプレートを室温で1時間インキュベートし、TBSTで洗浄した。このプレートを、OPD基質（シグマP9187）を加えることによって展開し、色の展開を $2\text{M H}_2\text{SO}_4$ の添加によって止めた。吸光度を490nmで測定し、検量線を、既知の標準希釈物のデータを用いてプロットした。この標準曲線を用いて、組織培養上清中の抗体の濃度を予測した。

20

30

【0163】

実施例12－ADAMTS5結合ELISA

結合ELISAを行い、細胞培養上清中の発現抗体の組換えADAMTS5への結合を試験した。ELISAプレートを、 $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ の組換えヒトADAMTS5でコーティングし、ブロッキング溶液（トリス緩衝生理食塩水中4%BSA）でブロッキングした。この組織培養上清の種々の希釈物を加え、このプレートを室温で1時間インキュベートし、TBSTで洗浄した。結合を、ブロッキング溶液で1/1000希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトκ軽鎖抗体（シグマA7164）を添加することによって検出した。このプレートを室温で1時間インキュベートし、TBSTで洗浄した。このプレートを、OPD基質（シグマP9187）を加えることによって展開し、色の展開を $2\text{M H}_2\text{SO}_4$ の添加によって止めた。吸光度を、プレートリーダーを用いて490nmで測定し、平均吸光度を濃度に対してプロットした。

40

【0164】

図6～9に、ヒト化抗ADAMTS5抗体の組換え抗原への結合を示す。

【0165】

実施例13－Biacore

抗ヒトIgG（Biacore（商標）、BR-1008-39）を、第一級アミンカップリングによりCM5チップ上に固定化した。その後、この表面を用いてヒト化抗体を捕獲し、ADAMTS5（R&D Systems 2198-AD）を、64nmの単一濃度でこの捕獲抗体の上を通過させ、100mMリン酸、続いて3M MgCl_2 を用い

50

て再生を行った。結合曲線を、緩衝液注入（すなわち、0 nM）で二重参照し、このデータを、1：1モデルを用いてT100解析ソフトウェアに適合させた。ランニング緩衝液としてHBS-Epを用いて、25℃でBiacoreを稼働した。得られたデータを表5に示す。特定しない限り、全ての抗体を組織培養上清から捕獲した。

【0166】

【表6】

表5：ヒトADAMTS5への結合動態

試料	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
BPC1623 (精製)	6.463E+05	4.700E-05	0.07273
BPC1622 (精製)	8.723E+05	1.056E-03	1.211
BPC1622	1.159E+06	1.305E-03	1.125
BPC1623	6.234E+05	4.823E-05	0.07737
BPC1634	5.538E+05	4.811E-04	0.8687
BPC1635	7.041E+05	8.258E-04	1.173
BPC1636	1.073E+06	8.963E-04	0.8357
BPC1637	1.119E+06	9.625E-04	0.8604
BPC1638	8.749E+05	8.309E-04	0.9497
BPC1639	9.271E+05	8.937E-04	0.9639
BPC1640	7.870E+05	8.492E-04	1.079
BPC1641	7.144E+05	9.453E-04	1.323
BPC1642	8.874E+05	1.210E-03	1.364
BPC1643	1.362E+06	1.434E-03	1.053
BPC1644	1.491E+06	1.572E-03	1.054
BPC1645	1.119E+06	1.159E-03	1.036
BPC1646	1.788E+06	1.843E-03	1.031
BPC1647	1.485E+06	1.453E-03	0.9784
BPC1648	7.875E+05	9.512E-04	1.208
BPC1649	1.023E+06	1.297E-03	1.267
BPC1650	3.140E+06	3.427E-03	1.091
BPC1651	2.653E+06	3.150E-03	1.188
BPC1652	1.963E+06	2.122E-03	1.081
BPC1653	2.236E+06	2.597E-03	1.161
BPC1654	1.040E+06	1.137E-03	1.094
BPC1655	無	結合	見られる
BPC1656	6.327E+05	3.950E-04	0.6243
BPC1657	5.850E+05	7.540E-05	0.1289
BPC1658	4.483E+05	1.398E-04	0.3119
BPC1659	4.894E+05	4.147E-05	0.08475

【0167】

実施例14 マウス、キメラ、およびヒト化したADAMTS5 mAbの親和性の比較
親和性を、2種類の形式（Octet QKではセンサー上に抗原、およびBiacoreではセンサー上に抗体）でmAbについて評価した（表6）。細胞標的を代表するOctet QK形式の妥当性は、天然に存在する細胞とインビボで会合する酵素の形態により、ADAMTS5に関連する。しかし、ADAMTS5は分泌型でも見られ得るので、Biacoreを用いるセンサー形式でも抗体の親和性について評価した。OctetとBiacore解析との間で観察される違いは、形式の差異（すなわち、Octet QKではセンサー上に抗原およびBiacoreではセンサー上にmAb）ならびにシステム間の技術的な違いであり得る。しかし、同じ形式で稼働すると、これらのシステムは、これらのmAbの全体的なKDの観点から非常に似ていた。おそらく、機器の設計の違いにより、KdおよびKaの違いが観察された。

【0168】

ヒト化CSmAb（12F4 H4L0）は、Octet QKシステムの抗原ダウン形式（antigen down format）で測定した時、38.3 pMの全体的な親

和性 (KD) を示す。12F4 H4L0 mAb は、Biacore システムの mAb ダウン形式 (mAb down format) において 85 pM の KD を示す。参考のために示す 7B4 H0L0 は、Octet QK システムおよび Biacore システムにおいて、それぞれ 205 pM および 869 pM の KD を示す。各 mAb のマウス型およびキメラ型の親和性の値を参考のために本明細書に示し、その親和性はヒト化後に維持されたことを示す。この実験の全 mAb は、完全に機能的な Fc 部分を含んでいた (すなわち、Fc が機能しないことはなかった)。

【0169】

【表7】

表6. マウス、キメラおよびヒト化した ADAMTS5 mAb の親和性の比較

	結合活性のない mAb ダウン (Biacore) の親和性			結合活性を含む抗原ダウン (Octet) の親和性		
mAb	K _a	K _d	KD	K _a	K _d	KD
マウス 12F4.1H7	1.56E+06	1.04E-04	0.067 nM	6.99E+04	2.49E-06	0.0356 nM
キメラ 12F4.1H7	1.56E+06	7.86E-05	0.051 nM	6.85E+04	2.96E-06	0.0431 nM
ヒト化 12F4.1H7 H4L0	4.89E+05	4.15E-05	0.085 nM	7.54E+04	2.88E-06	0.0383 nM
マウス 7B4.1E11	4.81E+06	2.32E-03	0.483 nM	9.25E+04	2.59E-05	0.280 nM
キメラ 7B4.1E11	2.43E+06	1.14E-03	0.473 nM	1.00E+05	2.61E-05	0.260 nM
ヒト化 7B4.1E11 H0L0	5.54E+05	4.81E-04	0.869 nM	1.06E+05	2.16E-05	0.205 nM

【0170】

実施例 15. ヒト OA 軟骨外植片実験のヒト化 12F4 H4L0 用量範囲

ヒト化 12F4 H4L0 の Fc が機能しない mAb を、Fc が機能しない適切なアイソタイプ、他の陽性対照および陰性対照に対する用量反応形式で、ならびに単一用量における親のマウス 12F4.1H7 バージョンと比較して、このシステムにおいて評価した。複数ドナー (n=4) をこの研究において個々に評価し、結果を収集して、OA 患者の集団全体の平均阻害スコアを作成した。GSK571949 をアッセイ対照として単一濃度 (2 μM) で用い、最大阻害レベルを設定した。これらの結果は、無関係のヒト化アイソタイプ対照 mAb の用量範囲 (図 10) と比較して、最大反応が最高用量 (1333 nM) で達成される明らかな 12F4 H4L0 用量反応を示す。GSK571949 に関して ARG 5 ネオエピトープのほぼ完全な阻害は、最高用量 (2 μM) で達成された。さらに、12F4 H4L0 の阻害のレベルは、これらのドナーの 12F4.1H7 を超えることが示され、ヒト化後に有効性が維持されることが示唆された。この mAb のヒト化バージョンの有効性のレベルは高いが、これが真の増加であるのか、または mAb 調製における違いによるものかどうかは明らかではない。追加の OA ドナーを用いた別々の実験における mAb の 12F4.1H7 型で観察される有効性のレベル (図 1) は、本明細書

で観察されたものよりも高かったことは留意すべきである。このシステムのヒト疾患および観察される有効性との関連を考慮すると、このデータは、本方法およびこれらのmAbの確証を強く支持する。

【0171】

実施例16．ヒトOA軟骨外植片の治療的パルスチェイス実験

本実験を実施例15のように設計するが、これらのmAbまたはこのシステムの飽和を可能にする化合物を用いた5日の処理期間後に、この処理を止めて、この処理を行っていない新鮮な培地に置換した。このアッセイを4週間継続し、次の軟骨分解マーカーの評価のために培地を定期的にサンプリングした。各サンプリング後、サンプルの除去した量と同じ量の新鮮な培地で置換した。この形式は治療効果の効力および期間を調べることを目的としたものであり、この組織内のADAMTS5代謝回転速度を間接的に示唆する。4人の異なるヒトOAドナーを用いた同一実験から収集した結果を示す(図11)。これらの結果は、疾患状態が進行していても(すなわち、関節置換の時に)ヒトOA軟骨におけるADAMTS5mAb反応の期間が延長する証拠を提供する。さらに、これらの結果は、疾患組織におけるADAMTS5の低い代謝回転速度の証拠を提供する。

【0172】

実施例17．Fcが機能しないヒト化抗体

ヒト化12F4 H4のV_Hドメインをコードする遺伝子を、改変ヒトγ1定常領域であるIgG1m(AA)にクローニングした。このIgG1m(AA)定常領域は、L235位およびG237位(EUインデックス番号付け)におけるCH2ドメインに2つのアラニン置換を含んでなる。これらの変異は、この得られた抗体が必要なFc受容体または補体成分C1qに結合できないようにするので、抗体依存性細胞毒性(ADCC)または補体依存性細胞毒性(CDC)を誘導する抗体の能力を無能にする。

【0173】

【表8】

表7

			DNA配列	アミノ酸配列
BPC1661	12F4 H4L0 IgG1m(AA)	12F4 H4重鎖	159	158
		12F4 L0軽鎖	113	114

【0174】

抗体BPC1623(12F4キメラ)、BPC1659(12F4 H4L0 IgG1wt)およびBPC1661(12F4 H4L0 IgG1m(AA))の重鎖および軽鎖をコードする発現プラスミドをHEK細胞内で発現させた。抗体をタンパク質A親和性クロマトグラフィーにより精製し、分光光度法により定量化した。

【0175】

結合ELISAを行い、これらの精製抗体のADAMTS5への結合を比較した。無関係のIgG1wtアイソタイプの抗体およびFcが機能しない抗体を陰性対照として含めた。簡単に説明すると、プレートに、0.2μg/mlの組換えヒトADAMTS5でコーティングし、ブロッキング溶液(トリス緩衝生理食塩水中4%BSA)でブロッキングした。様々な濃度の精製抗体を加え、このプレートを室温で1時間インキュベートし、TBST(トリス緩衝生理食塩水+0.05%Tween20)で洗浄した。結合を、ブロッキング溶液で1/1000希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトκ軽鎖抗体(シグマA7164)を添加することによって検出した。このプレートを室温で1時間インキュベートし、TBSTで洗浄した。このプレートを、OPD基質(シグマP9187)を加えることによって展開し、色の展開を2MH₂SO₄の添加によって止めた。吸光度を、プレートリーダーを用いて490nmで測定し、平均吸光度を濃度に対してプロットした。

。

【0176】

図12は、精製した抗ADAMTS5抗体の組換え抗原への結合を示す。

【0177】

実施例18. Fcが機能しない抗体のBiacore

タンパク質Aを、第一級アミンカップリングによってCM5バイオセンサーチップ上に固定した。この表面を用いて、Fcが機能しない抗ADAMTS5抗体、12F4 H4L0 IgG1m(AA) (BPC1661)、(CHOおよびHEK発現物質)を捕獲した。組換えヒトADAMTS5 (R&D Systems 2198-AD)を、64 nM、16 nM、4 nM、1 nM、0.25 nM、および0.0625 nMで検体として用い、緩衝液注入(すなわち、0 nM)を用いて結合曲線を二重参照した。捕獲表面の再生(すなわち、捕獲抗体の除去)には50 mM NaOHを用いた。ランニング緩衝液はHBS-E Pであり、25℃でBiacore T100を稼働させた。データを、この機械解析ソフトウェアに備わっている1:1モデルに適合させた。これらの結果は、結合親和性の観点から異なる細胞株で産生させた物質間で違いは無かったことを示した。

10

【0178】

【表9】

結果

コンストラクト	ka	kd	KD (nM)
12F4 H4L0 IgG1m(AA) (HEK 発現)	9.43E+05	6.98E-05	0.074
12F4 H4L0 IgG1m(AA) (CHO 発現)	8.30E+05	5.85E-05	0.070

20

【0179】

実施例19. 抗原-抗体相互作用の結晶構造モデル-エピトープおよびMOAの意味

ADAMTS5およびADAMTS5 mAbの12F4.1H7のそれぞれの結晶構造を用いるインシリコの構造「最適」コンピューターモデルは、ADAMTS5の触媒ドメインおよびディスインテグリンドメインの両方の間の抗体/抗原相互作用が同時に起こることを示唆する。ADAMプロテアーゼおよびADAMTSプロテアーゼの触媒ドメインおよびディスインテグリンドメインは、これらのドメイン間に可動性を与えるヒンジ領域で分離されており、このヒンジ領域は機能を調節するか、またはこの触媒部位への基質局在化を可能にするように作用し得る。エピトープに及ぶこのドメインで観察される高親和性mAb結合は、おそらく、ADAMTS5の触媒ドメインおよびディスインテグリンドメインを共に固定し、それによって酵素活性を中和する。ADAMTS5と12F4.1H7 mAbおよび7B4.1E11 mAb間の相互作用の予測アミノ酸部位を図13に示す。

30

【0180】

【表 10】

配列の説明	配列識別名（配列番号）	
	アミノ酸配列	DNA配列
シグナルペプチド配列	46	45
7 B 4 マウス可変重鎖	48	47
7 B 4 マウス可変軽鎖	50	49
1 2 F 4 マウス可変重鎖	52	51
1 2 F 4 マウス可変軽鎖	54	53
7 B 4 CDRH 1	55	
7 B 4 CDRH 2	56	
7 B 4 CDRH 3	57	
7 B 4 CDRL 1	58	
7 B 4 CDRL 2	59	
7 B 4 CDRL 3	60	
1 2 F 4 CDRH 1	61	
1 2 F 4 CDRH 2	62	
1 2 F 4 CDRH 3	63	
1 2 F 4 CDRL 1	64	
1 2 F 4 CDRL 2	65	
1 2 F 4 CDRL 3	66	
7 B 4 キメラ重鎖	68	67
7 B 4 キメラ軽鎖	70	69
1 2 F 4 キメラ重鎖	72	71
1 2 F 4 キメラ軽鎖	74	73
7 B 4 キメラ重鎖可変領域	76	75
7 B 4 キメラ軽鎖可変領域	78	77
1 2 F 4 キメラ重鎖可変領域	80	79
1 2 F 4 キメラ軽鎖可変領域	82	81
7 B 4 H 0 重鎖	84	83
7 B 4 H 1 重鎖	86	85
7 B 4 H 2 重鎖	88	87
7 B 4 H 3 重鎖	90	89
7 B 4 H 4 重鎖	92	91
7 B 4 H 5 重鎖	94	93
7 B 4 H 6 重鎖	96	95
7 B 4 L 0 軽鎖	98	97
7 B 4 L 1 軽鎖	100	99
7 B 4 L 2 軽鎖	102	101
1 2 F 4 H 0 重鎖	104	103
1 2 F 4 H 1 重鎖	106	105
1 2 F 4 H 2 重鎖	108	107
1 2 F 4 H 3 重鎖	110	109
1 2 F 4 H 4 重鎖	112	111
1 2 F 4 L 0 軽鎖	114	113

10

20

30

40

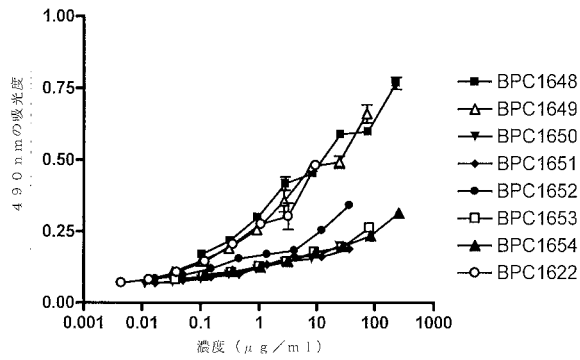
7 B 4 H 0 重鎖可変領域	116	115
7 B 4 H 1 重鎖可変領域	118	117
7 B 4 H 2 重鎖可変領域	120	119
7 B 4 H 3 重鎖可変領域	122	121
7 B 4 H 4 重鎖可変領域	124	123
7 B 4 H 5 重鎖可変領域	126	125
7 B 4 H 6 重鎖可変領域	128	127
7 B 4 L 0 軽鎖可変領域	130	129
7 B 4 L 1 軽鎖可変領域	132	131
7 B 4 L 2 軽鎖可変領域	134	133
1 2 F 4 H 0 重鎖可変領域	136	135
1 2 F 4 H 1 重鎖可変領域	138	137
1 2 F 4 H 2 重鎖可変領域	140	139
1 2 F 4 H 3 重鎖可変領域	142	141
1 2 F 4 H 4 重鎖可変領域	144	143
1 2 F 4 L 0 軽鎖可変領域	146	145
1 2 F 4 . 1 H 7 重鎖可変領域	32	147
1 G 1 0 . 1 C 9 重鎖可変領域	33	157
2 D 3 . 1 D 4 重鎖可変領域	34	151
3 A 1 2 . 1 D 7 重鎖可変領域	35	153
5 F 1 0 . 1 H 6 重鎖可変領域	36	155
7 B 4 . 1 E 1 1 重鎖可変領域	37	149
2 D 3 . 1 D 4 軽鎖可変領域	38	152
3 A 1 2 . 1 D 7 軽鎖可変領域	39	154
5 F 1 0 . 1 H 6 軽鎖可変領域	40	156
7 B 4 . 1 E 1 1 軽鎖可変領域	41	150
1 2 F 4 . 1 H 7 軽鎖可変領域	42	148
1 2 F 4 H 4 L 0 I g G 1 m (A A) 重鎖	158	159

10

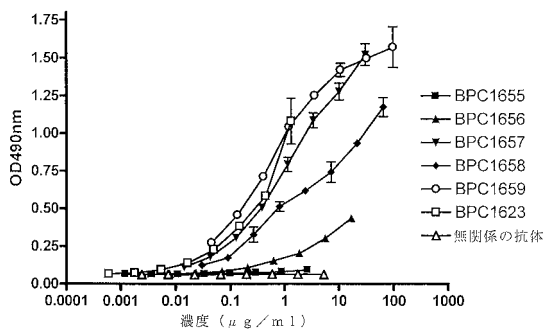
20

30

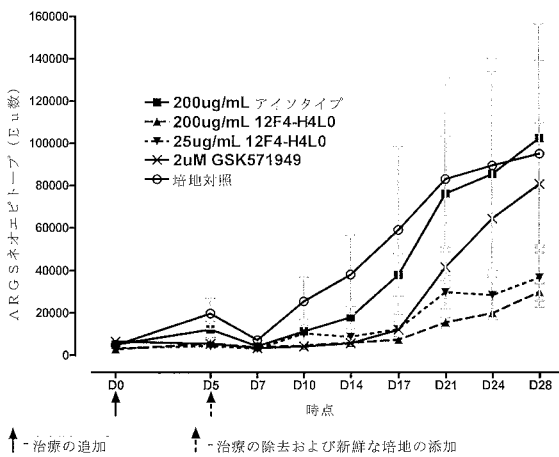
【図 8】



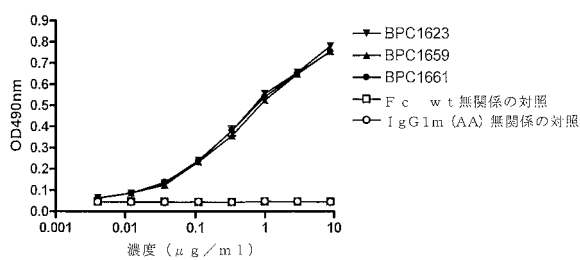
【図 9】



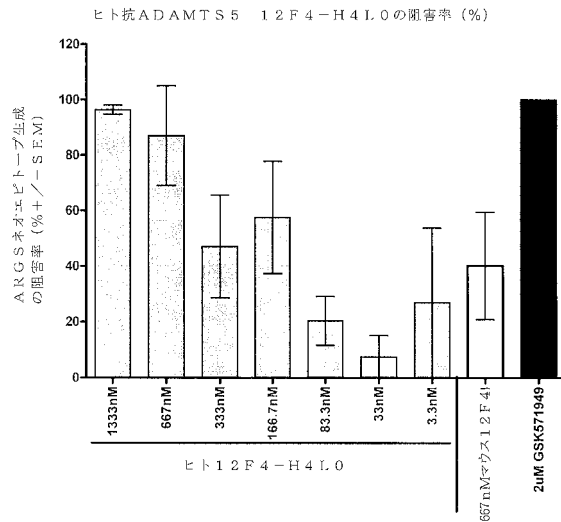
【図 11】



【図 12】



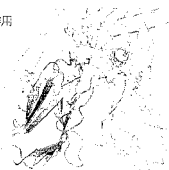
【図 10】



【図 13-1】

構造モデルがADAMTS5と12F4、1H7mAbの間のArg/Aa相互作用部位を提示する。

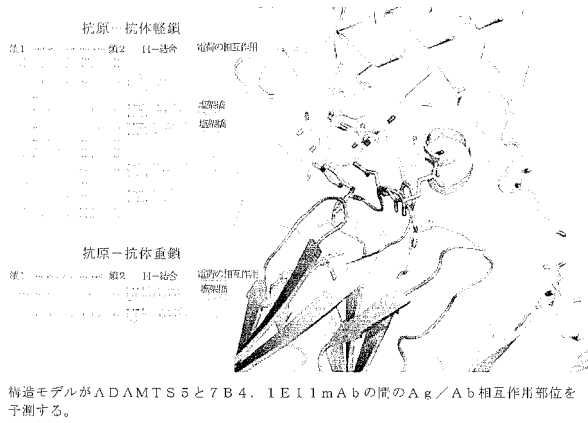
鎖1	res1/atm1	dist.	res2/atm2	鎖2	II 結合	電荷の相互作用
OUHKA	ARG281(HC2)	2.81	ASP1(CC1)	OUHKL	H-結合 [D-A-A-1]117.3° [A-D-1]112.3° 水素結合 22.3° 水素結合 17.9°	正電荷 正電荷
OUHKA	ARG281(CC2)	3.35	PRO3(CC2)	OUHKL		正電荷 正電荷
OUHKA	ASP364(CC2)	3.07	SER26(CC2)	OUHKL		正電荷 正電荷
OUHKA	ASP364(CC2)	2.82	SER26(CC2)	OUHKL	H-結合 [D-A-A-1]168.8° [A-D-1]120.2° 水素結合 16.4° 水素結合 15.5°	正電荷 正電荷
OUHKA	ASP364(CC2)	3.13	GLN27(CC1)	OUHKL		正電荷 正電荷
OUHKA	ASP364(CC2)	3.13	GLN27(CC1)	OUHKL		正電荷 正電荷
OUHKA	GLU504(CC2)	3.21	TYR91(CC1)	OUHKL		正電荷 正電荷
OUHKA	GLU504(CC2)	3.34	TYR91(CC1)	OUHKL		正電荷 正電荷
OUHKA	GLU504(CC2)	3.36	TYR91(CC1)	OUHKL		正電荷 正電荷
OUHKA	GLU504(CC2)	3.15	TYR91(CC1)	OUHKL	[E-A-1]120.2° 水素結合 13.3° 水素結合 14.7° 水素結合 14.7°	正電荷 正電荷
OUHKA	GLU504(CC2)	3.08	SER30(CC2)	OUHKL	H-結合 [D-A-A-1]92.6° [A-D-1]118.2° 水素結合 18.9° 水素結合 18.9°	正電荷 正電荷
OUHKA	VA_222(CC2)	3.08	ASN53(HC2)	OUHKL	H-結合 [D-A-A-1]122.2° [A-D-1]142.4° 水素結合 15.4° 水素結合 12.0°	正電荷 正電荷
OUHKA	ARG523(CC2)	3.20	ASN53(HC2)	OUHKL		正電荷 正電荷
OUHKA	GLN524(HC2)	2.74	SER32(CC2)	OUHKL	H-結合 [D-A-A-1]193.4° [A-D-1]149.8° 水素結合 17.2° 水素結合 14.4°	正電荷 正電荷
OUHKA	GLN524(CC2)	3.36	ARG54(HC1)	OUHKL	[D-A-1]120.2° 水素結合 17.1° 水素結合 15.9°	正電荷 正電荷



抗原-抗体重鎖

鎖1	res1/atm1	dist.	res2/atm2	鎖2	II 結合	電荷の相互作用
OUHKA	ALA280(CC2)	3.61	PRO55(CC2)	OUHKA		正電荷 正電荷
OUHKA	ALA280(CC2)	2.54	PRO55(CC2)	OUHKA		正電荷 正電荷
OUHKA	ARG281(CC2)	2.79	ARG52(HC2)	OUHKA	H-結合 [D-A-A-1]123.9° [A-D-1]129.7° 水素結合 17.2° 水素結合 14.4°	正電荷 正電荷
OUHKA	LEU282(CC2)	2.57	TRP32(CC2)	OUHKA		正電荷 正電荷
OUHKA	LEU282(CC2)	2.12	TRP32(CC2)	OUHKA		正電荷 正電荷
OUHKA	LEU282(CC2)	2.57	ARG52(HC2)	OUHKA		正電荷 正電荷
OUHKA	LEU282(CC2)	2.69	ARG52(HC2)	OUHKA	H-結合 [D-A-A-1]100.4° [A-D-1]120.2° 水素結合 13.0° 水素結合 13.0°	正電荷 正電荷
OUHKA	GLY284(CC2)	2.50	ARG52(HC2)	OUHKA		正電荷 正電荷
OUHKA	ASP364(CC2)	3.33	TYR91(CC1)	OUHKA		正電荷 正電荷
OUHKA	ASP364(CC2)	2.71	TYR91(CC1)	OUHKA		正電荷 正電荷

【図 13-2】



【配列表】

2012531902000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/40724

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12P 21/08 (2010.01) USPC - 530/388.26 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC- 530/388.26 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC- 424/146.1 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(PGPB, USPT, EPAB, JPAB), Google, Google Scholar, Google Patents: ADAMTS-5, aggrecanase-2, ADMP-2, ADAM-TS 11, ADAMTS11, ADAM-TS5, ADMP2, ADAM-TS 5, ADMP2, FLJ36738, monoclonal antibody, dissociation constant, Kd GenCora 6.3: SEQ ID NO: 2, 13, 18, 20, 22, 27, 67-70, 75-78, 83-102, 115-134		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 2008/0311113 A1 (Morris, et al.) 18 December 2008 (18.12.2008) claim 1; para [0028], [0085], [0583], Example 5;	1-4, 10 ----- 32, 59,34
Y	Steidl, et al. In vitro affinity maturation of human GM-CSF antibodies by targeted CDR-diversification. Mol Immunol. 2008, 46(1):135-44; pg 139, right col, last para to pg 140, left col, 1st para; pg 141, right col, 4th para	32 and 59
Y	Tabrizi, et al. Elimination mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies. Drug Discovery Today 2006, 11(1-2):81-88; pg 83, right col, last para	34
X	Matsumoto, et al. Expression of ADAMTS-5 in deformed human temporomandibular joint discs. Histo Histopathol. 2008, 23(12):1485-93; Abstract	1-2
X	Sieuwerts, et al. Study Patients with Recurrent Breast Cancer: a Retrospective Receptor Predict Response to Tamoxifen Treatment in How ADAM-9 and ADAM-11 Differentially From Estrogen. Clin Cancer Res 2005, 11(20):7311-7321; pg 7314, col 1, second para	1-2
X	Takahashi, et al. Deficits in spatial learning and motor coordination in ADAM11-deficient mice BMC Neuroscience 2006, 7:19 doi:10.1186/1471-2202-7-19. [Retrieved from the Internet 12 January 2011: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1420314/pdf/1471-2202-7-19.pdf> pg 9, left col, 3rd para	1-2
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 January 2011 (12.01.2011)		Date of mailing of the international search report 10 FEB 2011
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/40724

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 6-9, 11-28, 33, 35, 38-42, 45-49, and 58
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I: Claims 1-4, 10, 29-32, 34, 36-37, 43-44, 50-57, and 59, drawn to an isolated antigen binding protein, an isolated monoclonal antibody, and an isolated polynucleotide encoding an antibody domain, where the first named invention will be searched (claims 1-4, 10, 29, 31, 32, 34, 36-37, 43-44, 50-57, and 59) and is limited to an isolated monoclonal antibody or antigen binding domain comprising the six CDRs recited in claim 29, namely SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22 and SEQ ID NO:27, and the sequences which encode domains (e.g. VH or VL domains) comprising the sequences, namely, nucleic acid SEQ ID NOS: 67, 69, 75, 77, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, and 133, and the amino acid sequences which are encoded thereby, namely SEQ ID NOS: 68, 70, 76, 78, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, and 134, respectively. Applicant may have the set of CDRs recited in claim 30, and any domains (e.g. VH or VL domains) which comprise or encode the CDRs, searched for an additional search fee. Additionally or alternatively, Applicant may select one or more antibody VH or VL domains searched for an additional search fee(s) as follows.

***** See Supplemental Box to continue *****

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: claims 1-4, 10, 29, 31, 32, 34, 36-37, 43-44, 50-57, and 59, restricted to SEQ ID NO: 2, 13, 18, 20, 22, 27, 67-70, 75-78, 83-102, 115-134

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/40724

***** Supplemental Box *****

In continuation of Box III. LOU:

Additionally or alternatively, Applicant may select one or more antibody VH or VL domains searched for an additional search fee(s) as follows. Due to the number of sequences in this application, Groups I+ will be defined as necessary depending on Applicant's ultimate payment of additional fees. The additional sequences will be searched if applicant pays for each additional sequence or shows that the sequences share a special technical feature, i.e. a common structure or feature that defines a contribution over the prior art. Note that each additional sequence to be searched must be specified by the Applicant in the response to this invitation and must either (1) have an additional invention fee paid or (2) have a showing that the sequences share a common structure or feature that defines a contribution over the prior art.

The inventions listed as Group I+ does not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The inventions of Group I+ shares the technical feature of an isolated antigen binding protein comprising at least one first immunoglobulin variable domain capable of binding to human ADAMTS5. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art. Specifically US 2008/0311113 A1 to Morris et al. (hereinafter 'Morris') discloses an isolated antigen binding protein capable of binding to human ADAMTS5. (para [0028] - 'the agent is an anti-ADAMTS-5 antibody that is capable of inhibiting ADAMTS-5'; para [0160] - 'Positive serum was purified by affinity chromatography'; para [0583] - 'four monoclonal antibodies generated against recombinant human ADAMTS-5 demonstrated reactivity with ADAMTS-5').

The common structural feature between of inventions such as those recited in claims 29 and 30 is a CDR comprising SEQ ID NO: 2. However, US 20050032175 A1 to STAHL et al. discloses an antibody to hIL-6 VH comprising CDR sequences (para [0041] - 'CDR regions from hIL-6-specific antibodies selected from the group consisting of SEQ ID NOs:19-24'; Claim 16 - 'a V_H CDR selected from the group consisting of SEQ ID NOs:19-24'), wherein SEQ ID NO: 22 is 100% identical to the claimed SEQ ID NO: 2. Accordingly, an isolated antibody comprising SEQ ID NO: 2 does not represent an improvement over the prior art.

Furthermore, US 2006/0121022 A1 to KOGA et al. discloses an antibody to aPC having VL CDR sequence (Abstract - 'anti-aPC antibodies'; para [0081] - 'the L chain CDRs, it is preferable to use combinations of, for example, those comprising the amino acid sequences of RTSENIYSYLA (SEQ ID NO: 24)', which is 100% identical to the claimed SEQ ID NO: 20; and US 2008/0025977 A1 to Young et al. discloses an anti-CD59 antibody comprising a VL CDR sequence (para [0016] - 'a human mAb, directed against CD59'; Claim 51 - 'light chain variable region comprising the complementarity determining region amino acid sequences of ... SEQ ID NO:5'), which is 100% identical to the claimed SEQ ID NO: 22. Accordingly, although the claimed antibodies share a functional feature in that they bind ADAMTS5, these presence of the claimed CDRs in various prior art antibodies indicates that such a shared functional feature of ADAMTS5 binding is not dependent on shared structural features, as different combinations of CDR sequences resulted in antibodies having different function.

Groups I+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Accordingly, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	
	A 6 1 P 1/02	

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

(74)代理人 100091487

弁理士 中村 行孝

(74)代理人 100107342

弁理士 横田 修孝

(74)代理人 100111730

弁理士 伊藤 武泰

(74)代理人 100137497

弁理士 大森 未知子

(72)発明者 マイケル、ニール、バーデン

イギリス国ハートフォードシャー、スティーブネッジ、ガネルズ、ウッド、ロード

(72)発明者 ポール、アンドリュウ、ハン布林

イギリス国ハートフォードシャー、スティーブネッジ、ガネルズ、ウッド、ロード

(72)発明者 ジョナサン、デイビッド、ラーキン

アメリカ合衆国ペンシルバニア州、キング、オブ、プルシア、スウェドランド、ロード、7 0 9

(72)発明者 ジョン、リチャード、ホワイト

アメリカ合衆国ペンシルバニア州、キング、オブ、プルシア、スウェドランド、ロード、7 0 9

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA04 DA02 EA04 GA03 GA11

4B065 AA90X AA93Y AB01 AB05 AC14 BA02 BA08 CA25 CA44

4C085 AA13 AA14 BB31 CC23 DD62 DD63 GG01 GG02 GG03 GG04

4H045 AA11 DA76 EA20 FA74