



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년02월28일
(11) 등록번호 10-1833465
(24) 등록일자 2018년02월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/22 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7032545
(22) 출원일자(국제) 2012년05월08일
심사청구일자 2016년02월16일
(85) 번역문제출일자 2013년12월06일
(65) 공개번호 10-2014-0041532
(43) 공개일자 2014년04월04일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2012/051004
(87) 국제공개번호 WO 2012/153123
국제공개일자 2012년11월15일
(30) 우선권주장
61/483,491 2011년05월06일 미국(US)
61/531,439 2011년09월06일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2005061540 A2*
Vet. Immunol. Immunopathol. 110(3-4):
363-367(2006.02.09.)
WO2010128398 A1
Mol. Immunol. 43(8): 1243-1257(2005.08.22. 인
터넷 공지)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
넥스베트 오스트레일리아 피티와이 리미티드
오스트레일리아 빅토리아 3000 멜버른 쿤 스트리트 31 레벨 8
(72) 발명자
기어링 데이비드
호주 빅토리아 3006 사우스뱅크 미아든 스트리트 9
(74) 대리인
박장원

전체 청구항 수 : 총 11 항

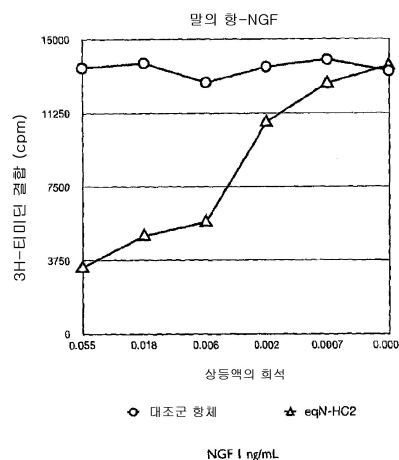
심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 항신경 성장 인자 항체 및 그의 제조방법과 이용방법

(57) 요약

말에게 사용하기 적합한 항체의 제조방법을 제공한다. 또한, 말의 신경 성장 인자 (NGF)에 특이적으로 결합하고 p75 또는 TrkA 개 NGF 수용체에 결합하는 개 NGF의 능력을 무력화하는 마화 (馬化:equinised) 항체를 제공한다. 본 발명은 이를 인코딩하는 핵산 및 상기 항체 및/또는 핵산을 이용하여 말의 통증 및 관절염을 치료하는 방법까지 확장된다.

대표도 - 도3



명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

말 신경 성장인자 (NGF)와 특이적으로 결합하고, p75 또는 TrkA 말 NGF 수용체에 결합하는 말 NGF의 능력을 억제하는 것이 가능한 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서,

상기 항체 또는 항원 결합 단편은,

SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 또는 그와 85% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역으로서, RASEDIYNALA (SEQ ID NO:1의 24-34 잔기)를 포함하는 CDR1 서열, NDTLHT (SEQ ID NO:1의 50-56 잔기)를 포함하는 CDR2 서열 및 QHYFHYPT (SEQ ID NO:1의 89-97 잔기)를 포함하는 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 및

SEQ ID NO:2의 아미노산 서열 또는 그와 85% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역으로서, GFSLTNNNVN (SEQ ID NO:2의 26-35 잔기)을 포함하는 CDR1 서열, GVVAGGATDYNALK (SEQ ID NO:2의 50-64 잔기)를 포함하는 CDR2 서열 및 DGGYSSSTLYAMDA (SEQ ID NO:2의 98-111 잔기)를 포함하는 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변영역

을 포함하고, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편이, 말의 그 위치에서 외래의 것인 임의 위치의 임의의 아미노산을 FR영역 내에 함유하지 않는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 경쇄는 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열 또는 그와 85% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고,

상기 중쇄는 SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 및 SEQ ID NO:9으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 그와 85% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 경쇄 가변영역은 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 중쇄 가변영역은 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 5

제2항에 있어서,

SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 또는 그와 85% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 상기 경쇄 가변영역은 아미노산 치환 S85V를 더 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 6

말 신경 성장인자 (NGF)와 특이적으로 결합하고, p75 또는 TrkA 말 NGF 수용체에 결합하는 말 NGF의 능력을 억제하는 것이 가능한 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서,

상기 항체 또는 항원 결합 단편은, 경쇄 가변영역 및 중쇄 가변영역을 포함하고,

- 상기 경쇄 가변영역은:

RASEDIYNALA (SEQ ID NO:1의 24-34 잔기)를 포함하는 CDR1 서열, NDTLHT (SEQ ID NO:1의 50-56 잔기)를 포함하는 CDR2 서열 및 QHYFHYPR (SEQ ID NO:1의 89-97 잔기)를 포함하는 CDR3 서열,

SEQ ID NO:10의 아미노산 서열 또는 그와 85% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지거나 이를 포함하는 FR1 구조영역,

SEQ ID NO:11의 아미노산 서열 또는 그와 85% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지거나 이를 포함하는 FR2 구조영역,

SEQ ID NO:12의 아미노산 서열 또는 그와 85% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지거나 이를 포함하는 FR3 구조영역, 및

SEQ ID NO:13의 아미노산 서열 또는 그와 85% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지거나 이를 포함하는 FR4 구조영역을 포함하고,

- 상기 중쇄 가변영역은:

GFSLTNNNVN (SEQ ID NO:2의 26-35 잔기)을 포함하는 CDR1 서열, GVWAGGATDYNALK (SEQ ID NO:2의 50-64 잔기)를 포함하는 CDR2 서열 및 DGGYSSSTLYAMDA (SEQ ID NO:2의 98-111 잔기)를 포함하는 CDR3 서열,

SEQ ID NO:14의 아미노산 서열 또는 그와 85% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지거나 이를 포함하는 FR1 구조영역,

SEQ ID NO:15의 아미노산 서열 또는 그와 85% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지거나 이를 포함하는 FR2 구조영역,

SEQ ID NO:16의 아미노산 서열 또는 그와 85% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지거나 이를 포함하는 FR3 구조영역, 및

SEQ ID NO:17의 아미노산 서열 또는 그와 85% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지거나 이를 포함하는 FR4 구조영역을 포함하고:

상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편이, 말의 그 위치에서 외래의 것인 임의 위치의 임의 아미노산을 FR영역 내에 함유하지 않는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 경쇄 가변영역은:

SEQ ID NO:10의 아미노산 서열로 이루어지거나 이를 포함하는 FR1 구조영역,

SEQ ID NO:11의 아미노산 서열로 이루어지거나 이를 포함하는 FR2 구조영역,

SEQ ID NO:12의 아미노산 서열로 이루어지거나 이를 포함하고, 아미노산 치환 S29V를 더 포함하는 FR3 구조영역, 및

SEQ ID NO:13의 아미노산 서열로 이루어지거나 이를 포함하는 FR4 구조영역을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하고,

상기 중쇄 가변영역은:

SEQ ID NO:14의 아미노산 서열로 이루어지거나 이를 포함하는 FR1 구조영역,

SEQ ID NO:15의 아미노산 서열로 이루어지거나 이를 포함하는 FR2 구조영역,

SEQ ID NO:16의 아미노산 서열로 이루어지거나 이를 포함하는 FR3 구조영역, 및

SEQ ID NO:17의 아미노산 서열로 이루어지거나 이를 포함하는 FR4 구조영역을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 8

제2항 또는 제6항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은, 하류 효과자 기능(effector functions)을

매개하지 않는 중쇄 불변 도메인을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 중쇄는 말의 아이소타입 HC2 또는 HC6인 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 10

하나 이상의 약학적으로 허용가능한 캐리어, 첨가제 또는 희석제와 함께, 제2항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 기재된 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는, 말의 통증 또는 염증의 치료, 억제 또는 경감용 약학적 조성물.

청구항 11

제2항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 있어서,

말의 통증 치료에 사용하기 위한, 또는

말에서 NGF에 의하여 증식 유도된 종양의 치료를 위한 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 12

말의 통증 치료에 사용하기 위한, 또는

말에서 NGF에 의하여 증식 유도된 종양의 치료를 위한,

제2항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 기재된 항체 또는 그의 항원 결합 단편과, 이들의 사용을 위한 지침을 포함하는 키트.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 말 (equine, 馬) 신경 성장 인자의 길항제로서 작용하는 항체 및 이들의 단편에 관한 것이다. 본 발명은 이를 제조하는 방법 및 말의 신경 성장 인자와 관련된 질병, 예컨대 통증, 통증 관련 질환 및 만성 통증을 발생시키는 질병을 치료하는 데 있어서의 이들 항체 및 단편들의 치료적 용도에까지 이른다.

배경 기술

[0002] 신경 성장 인자 (NGF)는 알파, 베타 및 감마 폴리펩타이드 사슬로 이루어지는 자연적으로 존재하는 분비 단백질이다. NGF는 뉴로트로핀 패밀리의 일원이고 여러 가지 많은 역할에 연루되어 있다. NGF는 감각 뉴런 및 교감 뉴런의 생존과 분화를 촉진하고 2개의 막 결합 수용체들, p75, 저친화 NGF 수용체 및 TrkA, 막관통 타이로신 인산화효소이자 고친화 NGF 수용체를 통하여 신호를 전달한다. NGF의 TrkA

- [0003] 또는 p75에의 결합은 감각 뉴런 신경펩타이드의 상승 조절이라는 결과를 낳는다.
- [0004] 인간의 통증 및 통증 감수성을 치료하는 NGF 길항제의 사용은 알려져 있다 (Cattaneo A., Curr. Op. Mol. Ther. 2010 12(1):94-106). 예컨대, 국제출원공보 WO 2006/131951호는 래트 알파D11 (α D11) 모노클로날 항체의 인간화형을 개시한다. 상기 α D11 항체는 마우스 NGF에 대한 결합 특이성을 갖지만, NGF의 인간형 및 래트형에 결합하는 것으로도 알려져 있다. 래트 유래 알파D11 (α D11) 모노클로날 항체의 인간화는 인간에게 투여하기 전에 필요한데, 이는 설치류 유래 항체들에 대응하여 증가하는 인간 항-마우스 항체 (HAMA)로부터 결과되는 무력화 항체의 생성을 최소화하기 위함이다. 또한, 마우스의 불변 도메인 (constant domain)의 인간의 불변 도메인으로의 교체는 하류 이펙터 (downstream effector) 기능이 선택될 수 있게 한다.
- [0005] 현재, 말의 통증 관리는 몇 가지의 진통제 투여, 예컨대 국소적 및 전신 마취제, 오피오이드 마취제, $\alpha 2$ 작용제, 비스테로이드계 항염증제 (NSAIDs) 및 스테로이드의 투여를 통하여 제공되고 있다. 이들 각각은 자주 투여될 필요성이 있고, 효능 및 안전성에 있어서 한계도 갖는다. 따라서, 만성 통증, 예컨대 암 통증이나 관절염으로 인한 통증으로 고통받는 말들을 위한 통증 완화형으로서, 덜 자주 투여되는 장기 지속적이고 효과적인 형태에 대한 요구가 있다.
- [0006] NGF가 말의 조직에서 발현되는 것으로 알려져 있으나, 말 NGF에 대한 어떠한 길항제도 알려져 있거나 말의 통증을 예방 또는 경감시키기 위한 NGF 매개 신호전달을 차단하는 용도를 갖고 있지 못하다. 다른 종들에서 항-NGF 길항제로서 작용하는 공지의 항체들을 말에게 사용하는 것은 적당하지 않은데, 무력화 항체의 생성 때문이다.
- [0007] 또한, 말 유래 불변 도메인과 공지의 항-NGF 항체, 예컨대 알파D11로부터 유래하는 가변 도메인을 포함하는 키메라 항체의 생성은 말의 NGF에의 결합을 장담할 수 없다. 또한, 이러한 항체는 말에는 존재하지만 그 항체가 애초에 유래한 종에는 존재하지 않을 수 있는 다른 표적 에피토프에 대하여 교차 반응성을 나타낼 수 있다. 또한, 무력화 항체의 생성은 항체의 장기 치료적 투여를 제한할 수 있는데, 이것은 만성 통증 관련 질환 또는 암 질환을 치료하는 경우 특히 중요한 요건이다. 마찬가지로, CDR 그래프팅 또는 관련 기술을 이용한 항-NGF 항체의 마화 (馬化:equinised) 형태를 생성하는 것은 무력화 항체 생성이라는 결과 역시 낳을 수 있고 또한 항원 결합 친화도 및 결합활성의 감소를 나타낼 수 있다. 따라서, 말 NGF에 대한 길항제로서 작용하는 한편, 결합 친화도와 결합활성은 높은 수준으로 유지하지만 그에 대한 무력화 항체의 생성은 회피하는, 말의 통증 관리에 이용되기 위한 결합원(binding members)이 절실히 필요한 상황이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 발명의 개요
- [0009] 많은 노력 끝에, 본 발명의 발명자는 놀랍게도 말 NGF에 특이적으로 결합하는 마화 (馬化:equinised) 항체 및 그로부터 유도된 결합 단편을 생산하였다. 정말로 예기치 않게, 본 발명의 항체 및 결합 단편들의 말 NGF로의 결합은, 고친화 TrkA 수용체 또는 p75 수용체와의 결합을 억제함으로써 말 NGF의 생물학적 활성을 차단한다. 이것은 차례로, 감각 뉴런 중의 신경펩타이드의 상승조절을 막고 그 결과적인 효과로서 통증 감각은 저감되거나 없어질 것이다. 이 항체는 실질적으로 비면역원성이 되도록, 즉, 말 대상체에게 투여될 경우 그에 대응하는 무력화 항체들이 생기지 않도록, 재조합 DNA 방법을 이용하여 생산되었다. 상기 항체들은 표준 방법론, 예컨대 CDR 그래프팅 등등을 이용하여 제조되지 않았으므로 이러한 발견은 전적으로 놀랍고도 예상치 못했던 것이다.
- [0010] 본 발명의 제1 측면에 따라,
- [0011] - 말 이외의 종들로부터 유래하는 공여자 항체를 제공하는 단계로서, 여기서 상기 공여자 항체는 말에 존재하는 표적 항원에 대한 결합 특이성을 갖는 것이고;
- [0012] - 하나 이상의 말 항체들의 구조영역들 (framework regions)의 아미노산 서열 내 대응하는 위치의 하나 이상의 아미노산 잔기들과 상이한, 공여자 항체의 구조영역들의 아미노산 서열 내 하나 이상의 아미노산 잔기들을 식별하기 위하여, 상기 하나 이상의 말 항체들의 구조영역들의 아미노산 서열 내 대응하는 위치에 존재하는 각 아미노산 잔기와 상기 공여자 항체의 구조영역들의 아미노산 서열의 각 아미노산 잔기를 비교하는 단계; 및
- [0013] - 상기 공여자 항체 내의 상기 식별된 하나 이상의 아미노산 잔기들을, 상기 하나 이상의 말 항체들 내 대응하는 위치에 존재하는 상기 하나 이상의 아미노산 잔기들로 치환하는 단계

- [0014] 를 포함하거나 필수적으로 이들 단계로 이루어지는, 말에 사용하기에 적합한 항체의 제조 방법이 제공된다.
- [0015] 본 발명자는 말에 사용하기 위해, 공여자 항체를 변형하는 방법을 발견하였는데, 상기 방법은 변형된 항체가, 말의 구조영역 내의 특정 위치의 어떠한 아미노산도 그 위치에서 외래의 것일 아미노산을 함유하지 않도록 하는 방식으로 공여자 항체를 변형한다. 그러므로, 상기 변형된 항체는 표적 항원에 대한 공여자 항체의 특이성 및 친화도를 유지하지만, 중요하게는 어떠한 잠재적으로 외래인 에피토프를 생성하지 않도록 변형된다. 그러므로, 상기 변형된 항체는 말에서 외래의 것으로 여겨지지 않고, 따라서, 특히 장기 투여 이후 항체의 효능 무력화를 나타낼 수 있는 말에서의 면역 반응을 유도하지 않는다.
- [0016] 특정 구체예에 있어서, 상기 하나 이상의 동정된 아미노산 잔기들을 치환하는 단계는, 상기 하나 이상의 동정된 아미노산 잔기들을, 하나 이상의 치환되는 아미노산 잔기들과 고도의 상동성을 갖는 대응하는 위치에 존재하는 하나 이상의 아미노산 잔기들로 치환하는 것을 포함한다.
- [0017] 특정 구체예에 있어서, 상기 방법은 공여자 항체의 중쇄 및/또는 경쇄의 불변 도메인들을, 말 항체로부터 유래하는 중쇄 및/또는 경쇄의 불변 도메인으로 교체하는 단계를 더 포함한다. 통상적으로, 상기 중쇄의 불변 도메인은 말의 HC2형 불변 도메인으로 대체된다.
- [0018] 특정 구체예에 있어서, 표적 항원은 신경 성장 인자 (NGF)이다.
- [0019] 본 발명의 제1 측면의 방법은 CDR 그래프팅을 포함하지 않는다. 본 발명의 제1 측면의 방법에 따라 제조된 항체들은 공여자 항체의 CDR들, 본 발명의 제1 측면의 방법에 따라 제조된 마화 구조영역들 및 말의 불변 도메인들을 포함한다.
- [0020] 본 발명은 하기에 개시되는 것들과 같은, 본 발명의 제1 측면에 따라 제조되는 항체들에 이른다.
- [0021] 따라서, 본 발명의 또 다른 측면에 따라 말의 신경 성장 인자 (NGF)에 특이적으로 결합하는 마화 항체 또는 그들의 결합 단편이 제공된다. 통상적으로, 상기 마화 항체 또는 그들의 결합 단편은 NGF에 결합되는 경우 그 생물학적 기능을 무력화시킨다. 즉, 상기 마화 항체 또는 결합 단편들의 NGF에의 결합은 NGF의 TrkA 수용체 또는 p75 수용체로의 결합하는 능력을 봉쇄한다. 특정 구체예에 있어서, 상기 마화 항체 또는 그들의 결합 단편은 결합 친화성 K_D 1×10^{-8} 이하로 NGF에 결합한다. 일반적으로, 마화 항체는 말에 있어서 면역원성이 아니다.
- [0022] 특정 구체예에서, 마화 항체는 본 발명의 제1 측면의 항체 제조 방법에 따라 제조된다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 또는 관련된 측면에 있어서, 말의 신경 성장 인자 (NGF)에 특이적으로 결합할 수 있는 무력화 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공되는데, 상기 항체 또는 항체 결합 단편은 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 또는 상기 서열과 85, 90, 95 또는 99% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하거나, 그 경쇄 가변영역으로 이루어지거나, 본질적으로 그 경쇄 가변영역으로 이루어진다. 특정 구체예에 있어서, 상기 상동성은 약 15개 이상의 아미노산 길이, 좋기로는 약 20개 이상의 아미노산 길이, 더욱 좋기로는 약 25개 이상의 아미노산 길이에 걸쳐 있다.
- [0024] 몇 가지 구체예에 있어서, 상기 무력화 항체는 모노클로날 항체이다. 몇 가지 구체예에 있어서, 상기 항체는 키메라 항체이다. 몇 가지 구체예에 있어서, 상기 항체는 마화 항체, 즉, 말 대상체에 투여되는 경우 그에 대하여 무력화 항체가 생성되지 않도록 탈면역화된 (de-immunised) 아미노산 서열을 갖는 항체이다. 몇 가지 구체예에 있어서, 상기 마화 항체는 본 발명의 제1 측면의 항체 제조 방법에 따라 제조된다. 통상적으로, 상기 항체의 중쇄 불변 도메인은, 상기 불변 도메인이 하류 이펙터 기능을 매개하지 않도록 아미노산 치환 또는 결실의 방식으로 선별되거나 변형된다. 일반적으로 상기 중쇄는 말의 HC2 또는 HC6 중쇄이다. 이들 아이소타입들은 이펙터 기능을 결여하는 것으로 알려져 있다 (Lewis et al, Mol Immunol. 2008 Feb; 45(3): 818-827). 더욱 일반적으로, 상기 중쇄는 말의 HC2 중쇄이다. 이 아이소타입은 본 발명자들에 의해 단백질 A (단백질 A)에 대한 결합에 의해 정제가능한 것으로 나타났다.
- [0025] 특정 구체예에 있어서, 상기 항체 또는 항체 결합 단편은 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열 또는 그들과 85, 90, 95 또는 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하거나, 그 경쇄로 이루어지거나, 본질적으로 그 경쇄로 이루어진다. 특정 구체예에 있어서, 상기 상동성은 약 15개 이상의 아미노산 길이, 좋기로는 약 20개 이상의 아미노산 길이, 더욱 좋기로는 약 25개 이상의 아미노산 길이에 걸쳐 있다.
- [0026] 또 다른 또는 관련된 구체예에 있어서, 말의 신경 성장 인자 (NGF)에 특이적으로 결합할 수 있는 무력화 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공되는데, 상기 항체 또는 항체 결합 단편은 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열 또는

그들과 85, 90, 95 또는 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하거나, 그 중쇄 가변영역으로 이루어지거나, 본질적으로 그 중쇄 가변영역으로 이루어진다. 특정 구체예에 있어서, 상기 상동성은 약 15개 이상의 아미노산 길이, 종기로는 약 20개 이상의 아미노산 길이, 더욱 종기로는 약 25개 이상의 아미노산 길이에 걸쳐 있다.

[0027] 통상적으로, 상기 중쇄의 가변영역 (VH)는 하나 이상의 면역글로불린 불변 도메인을 포함하는 또 다른 아미노산 서열과 결합된다. 특정 구체예에 있어서, 상기 면역글로불린 불변 도메인은 서브클래스 IgG (면역글로불린 G)의 항체로부터 유래하여 본 발명의 마화 항체의 온전한 중쇄를 형성한다. 7가지 서로 다른 말의 면역글로불린 감마 (IgG) 중쇄 불변 도메인이 알려져 있다. 통상적으로, 상기 불변 도메인은 CH1, CH2 및 CH3를 포함하고, 상기 CH1과 CH2 도메인 사이에 위치한 적절한 링커 (또는 "힌지")를 함께 포함한다. 통상적으로, 본 발명의 항-말(馬) NGF 항체는 불변 도메인과 결합된 중쇄 가변 도메인을 포함하는데, 여기서 상기 불변 도메인은 하류 이펙터 기능들, 예컨대 보체 고정, ADCC, Fc 수용체 결합 등등을 매개하지 않는다. 이러한 중쇄는 HC2 또는 HC6 아이소타입을 포함할 수 있고 SEQ ID NO:5, 6 또는 7의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 더욱 일반적으로, 상기 중쇄는 말의 HC2 중쇄이다.

[0028] 특정 구체예에 있어서, 상기 항체 또는 항체 결합 단편은 말의 불변 도메인 IgG2 (HC2)에 관계된 SEQ ID NO:6의 아미노산 서열 또는 말의 불변 도메인 IgG6 (HC6)에 관련된 SEQ ID NO:7 또는 이들과 85, 90, 95 또는 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함하거나, 그 중쇄로 이루어지거나, 본질적으로 그 중쇄로 이루어진다. 특정 구체예에 있어서, 상기 상동성은 약 15개 이상의 아미노산 길이, 종기로는 약 20개 이상의 아미노산 길이, 더욱 종기로는 약 25개 이상의 아미노산 길이에 걸쳐 있다.

[0029] 또 다른 특정 구체예에 있어서, 상기 항체 또는 결합 단편은, 그 잔기의 글리코실화를 막기 위하여 불변 도메인 내의 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환되거나 결실된 중쇄를 포함할 수 있다. 불변 도메인 잔기의 탈글리코실화는 세포 상에 제공된 Fc 수용체 (FcR)에 대한 불변 도메인의 결합을 방지함으로써 하류 이펙터 기능에 제약을 가할 수 있다. 따라서, 또 다른 특정 구체예에 있어서, 상기 항체 또는 항체 결합 단편은 SEQ ID NO:8 (IgG2 (HC2)의 탈글리코실화 버전)의 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO:9 (IgG6 (HC6)의 탈글리코실화 버전)의 아미노산 서열 또는 이들과 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함하거나, 그 중쇄로 이루어지거나, 본질적으로 그 중쇄로 이루어진다. 특정 구체예에 있어서, 상기 상동성은 약 15개 이상의 아미노산 길이, 종기로는 약 20개 이상의 아미노산 길이, 더욱 종기로는 약 25개 이상의 아미노산 길이에 걸쳐 있다.

[0030] 또 다른 또는 관련된 측면에 있어서, 본 발명은 말의 신경 성장 인자 (NGF)에 특이적으로 결합할 수 있는 무력화 항체, 또는 그의 항원 결합 단편에까지 이르는데, 상기 항체 또는 항체 결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 본질적으로 이들로 이루어지고, 여기서 상기 경쇄의 가변영역 (VL)은 SEQ ID NO:1 또는 이것과 85, 90, 95 또는 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 중쇄의 가변영역 (VH)은 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열과 동일하거나 실질적으로 상동인 아미노산 서열, 또는 이들과 85, 90, 95 또는 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 본질적으로 이들로 이루어진다. 특정 구체예에 있어서, 상기 상동성은 약 15개 이상의 아미노산 길이, 종기로는 약 20개 이상의 아미노산 길이, 더욱 종기로는 약 25개 이상의 아미노산 길이에 걸쳐 있다.

[0031] 특정 구체예에 있어서, 상기 항체 또는 결합원은 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열, 또는 이들과 85% 이상의 아미노산 상동성을 갖는 서열, 더욱 종기로는 95% 및 가장 종기로는 98% 이상의 아미노산 상동성을 갖는 서열을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 본질적으로 이들로 이루어지는 경쇄를 포함한다. 특정 구체예에 있어서, 상기 상동성은 약 15개 이상의 아미노산 길이, 종기로는 약 20개 이상의 아미노산 길이, 더욱 종기로는 약 25개 이상의 아미노산 길이에 걸쳐 있다.

[0032] 특정 구체예에 있어서, 상기 항체 또는 결합원은 SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, 또는 SEQ ID NO:7의 아미노산 서열 또는 이들과 85% 이상의 아미노산 상동성을 갖는 서열, 더욱 종기로는 90% 및 가장 종기로는 98% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 본질적으로 이들로 이루어지는 중쇄를 포함한다. 특정 구체예에 있어서, 상기 상동성은 약 15개 이상의 아미노산 길이, 종기로는 약 20개 이상의 아미노산 길이, 더욱 종기로는 약 25개 이상의 아미노산 길이에 걸쳐 있다.

[0033] 일반적으로, 상기 항체의 중쇄 불변 도메인은 그 불변부가 하류 이펙터 기능을 매개하지 않도록 선택되거나 또는 하류 이펙터 기능을 매개하지 않도록 아미노산 치환 또는 결실에 의해 변형된다. 일반적으로 상기 중쇄는 말의 HC2 또는 HC6 중쇄이다. 보다 일반적으로, 상기 중쇄는 말의 HC2 중쇄이다. 특정 구체예에서, 항체 또는 결합원은 SEQ ID NO:5 또는 SEQ ID NO:6의 아미노산 서열 또는 이들과 85% 이상, 더욱 종기로는 90% 이상 가장 종

기로는 98% 이상의 상동성을 갖는 서열을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 본질적으로 이들로 이루어지는 중쇄를 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 상동성은 약 15개 이상의 아미노산 길이, 종기로는 약 20개 이상의 아미노산 길이, 더욱 종기로는 약 25개 이상의 아미노산 길이에 걸쳐 있다.

- [0034] SEQ ID NO:5 및 SEQ ID NO:6는 이펙터 기능을 결여한 것으로 나타났으나, 단백질 A 컬럼을 이용하여 정제가 가능한 HC2 중쇄를 포함한다. 이에 의해, HC2 중쇄를 갖는 항체들을 제조시 대규모로 정제할 수 있기 때문에 유리하다.
- [0035] 특정 구체예에 있어서, 상기 항체는 하나 이상의 리포터 분자와 연결될 수 있다.
- [0036] 또 다른 특정 구체예에 있어서, 불변 도메인의 하나 이상의 잔기는 그 잔기의 글리코실화를 막기 위하여 치환 또는 결실될 수 있다. 따라서, 또 다른 특정 구체예에 있어서, 상기 항체 또는 항체 결합 단편은 SEQ ID NO:8 또는 SEQ ID NO:9의 아미노산 서열, 또는 이들과 적어도 85%, 더욱 종기로는 적어도 90%, 가장 종기로는 적어도 98% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 본질적으로 이들로 이루어진다. 특정 구체예에 있어서, 상기 상동성은 약 15개 이상의 아미노산 길이, 종기로는 약 20개 이상의 아미노산 길이, 더욱 종기로는 약 25개 이상의 아미노산 길이에 걸쳐 있다.
- [0037] 또한, 본 발명의 발명자는 상보성 결정 영역 (CDRs)과 조합되어 마화 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 형성할 수 있는 일련의 구조영역 (framework regions, FR)을 정의하였다. 말의 중쇄 및 경쇄 도메인 각각은 FR1, FR2, FR3 및 FR4로 명명된 4개의 구조영역들을 갖는다.
- [0038] 항체 분자는 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역들 및 사이에 위치하는 연관된 구조영역들을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다. 상기 중쇄 가변 도메인 (VH) CDRs은 카바트 넘버링 시스템 (Kabat numbering system)에 따라 하기 위치에서 발견되는 HCDRs로 알려져 있다: HCDR1 - 카바트 잔기 31-35, HCDR2 - 카바트 잔기 50-65, HCDR3 - 카바트 잔기 95-102 (Kabat EA et al. (1991) Sequences of Proteins of immunological interest, 5th edition. Bethesda: US Department of Health and Human Services).
- [0039] 또한, 항체는 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역들 및 사이에 위치하는 연관된 구조영역들을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다. 상기 경쇄 가변 도메인 (VL) CDRs은 카바트 넘버링 시스템에 따라 하기 위치에서 발견되는 HCDRs로 알려져 있다: LCDR1 - 카바트 잔기 24-34, LCDR2 - 카바트 잔기 50-56, LCDR3 - 카바트 잔기 89-97.
- [0040] 경쇄 가변 도메인 또는 중쇄 가변 도메인은 하기의 배열로 CDRs이 끼어든 4개의 구조영역, FR1, FR2, FR3 및 FR4를 포함한다: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.
- [0041] 또 다른 또는 관련 측면에 있어서, 본 발명은 항-NGF 항체 또는 그들의 NGF 항원 결합 단편에 관한 것이기도 한데, 상기 항체 또는 항체 결합 단편은:
- [0042] SEQ ID NO:10의 아미노산 서열로 이루어지거나, 이를 포함하는 FR1 구조영역,
- [0043] SEQ ID NO:11의 아미노산 서열로 이루어지거나, 이를 포함하는 FR2 구조영역,
- [0044] SEQ ID NO:12의 아미노산 서열로 이루어지거나, 이를 포함하는 FR3 구조영역,
- [0045] SEQ ID NO:13의 아미노산 서열로 이루어지거나, 이를 포함하는 FR4 구조영역
- [0046] 중 하나 이상을 포함하는 경쇄 가변부 및/또는
- [0047] SEQ ID NO:14의 아미노산 서열로 이루어지거나, 이를 포함하는 FR1 구조영역,
- [0048] SEQ ID NO:15의 아미노산 서열로 이루어지거나, 이를 포함하는 FR2 구조영역,
- [0049] SEQ ID NO:16의 아미노산 서열로 이루어지거나, 이를 포함하는 FR3 구조영역, 및
- [0050] SEQ ID NO:17의 아미노산 서열로 이루어지거나, 이를 포함하는 FR4 구조영역
- [0051] 중 하나 이상을 포함하는 중쇄 가변부를 포함한다.
- [0052] 통상적으로, 경쇄 및 중쇄 CDRs은 NGF, 종기로는 말의 NGF에 대한 결합 특이성을 갖는 항체로부터 유래하는 것이 바람직하다.
- [0053] 통상적으로, 본 발명의 마화된 항-말 NGF 항체의 생성은 상기 경쇄 또는 중쇄 가변 도메인의 구조영역 안으로 도입되는 복귀 돌연변이를 필요로 하지 않는다.

- [0054] 특정 구체예에 있어서, 전술한 상기 하나 이상의 구조영역을 포함하는 경쇄 가변 도메인은 말 유래 경쇄 불변 도메인, 통상적으로 경쇄 카파 불변 도메인과 연결되지만, 필요에 따라 람다 경쇄와 연결된다. 특정 구체예에 있어서, 상기 경쇄는 SEQ ID NO:10의 아미노산 서열을 갖는 FR1 영역, SEQ ID NO:11의 아미노산 서열을 갖는 FR2 영역, SEQ ID NO:12의 아미노산 서열을 갖는 FR3 영역, 및 SEQ ID NO:13의 아미노산 서열을 갖는 FR4 영역 또는 전술한 것들과 85, 90, 95 또는 98% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 구조영역을 포함한다. 특정 구체예에 있어서, 상기 상동성은 약 5개 이상의 아미노산 길이, 좋기로는 약 10개 이상의 아미노산 길이에 걸쳐 있다.
- [0055] 또 하나의 특정 구체예에 있어서, 전술한 하나 이상의 구조영역을 포함하는 중쇄 가변영역은 말 유래 중쇄 불변 도메인과 연결된다. 특정 구체예에 있어서, 상기 불변 도메인의 아미노산 서열은 임의의 번역 후 변형 (post-translational modification)을 갖지 않거나, 또는 N-결합 글리코실화 또는 O-결합 글리코실화의 대상일 수 있는 임의의 또는 모든 잔기들을 제거하도록 변형됨으로써 상기 불변 도메인은 비(非)글리코실화된다. 특정 구체예에 있어서, 상기 중쇄는 SEQ ID NO:14의 아미노산 서열을 갖는 FR1 영역, SEQ ID NO:15의 아미노산 서열을 갖는 FR2 영역, SEQ ID NO:16의 아미노산 서열을 갖는 FR3 영역 및 SEQ ID NO:17의 아미노산 서열을 갖는 FR4 영역 또는 전술한 것들과 85, 90, 95 또는 98% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 구조영역을 포함한다. 특정 구체예에 있어서, 상기 상동성은 약 5개 이상의 아미노산 길이, 좋기로는 약 10개 이상의 아미노산 길이에 걸쳐 있다.
- [0056] 또 하나의 특정 구체예에 있어서, 본 발명에 개시된 구조영역에 변형을 가할 수 있다. 즉, 본 발명의 발명자는 각각의 구조영역 중 일부 잔기들의 경우, 주어진 위치에서 아미노산을 선택할 수 있음을 밝혀냈다. 중요하게는, 이들 구조영역 변형은 상보성 결정 영역에 형태적 변화를 야기하지 않는다는 것인데, 이것은 결과물인 항체의 결합 특이성 및/또는 친화도를 변하게 할 수 있기 때문이다. 특정 구체예에 있어서, 본 발명은 경쇄 가변영역 및/또는 중쇄 가변영역의 구조영역의 아미노산 잔기에 2개 이상의 아미노산 치환을 도입하는 관한 것이기도 하다.
- [0057] 따라서, 또 하나의 특정 구체예에 있어서, 본 발명은 폴리펩타이드, 예컨대 항체 또는 이들의 항원 결합 단편에 까지 이르는데, 이는 하나 이상의 하기 아미노산 치환 (여기서 아미노산은 1글자 코드로 표기됨)으로 변형된, SEQ ID NO:10의 아미노산 서열을 포함하는 FR1 영역을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함한다: 2번 위치의 아미노산 잔기 I (I2)는 아미노산 잔기 V로 교체되고, S7은 T, A9은 E, L11은 V, S12는 T 또는 A, A13는 V, S14는 T, E17은 Q, T18은 R, T20은 E, I21은 I, L, M 또는 V 그리고 E22는 K로 교체된다. 또한, 하나 이상의 하기의 치환이 더 제공될 수 있다. D1은 G, K 또는 V, I2는 F, N, S 또는 T, V3는 A, G, I 또는 M, M4는 L, Q 또는 V, T5는 A 또는 I, S7은 F, A9은 D, P 또는 S, S10은 F, L 또는 T, L11은 S, S12는 E 또는 V, A13는 L, Q 또는 T, S14는 A 또는 P, L15는 P 또는 R, G16는 R, T18은 S, G 또는 K, V19은 A, T20은 D 또는 V, I21은 T 그리고 E22는 L, N, Q, R, S 또는 T로 교체된다.
- [0058] 또 하나의 특정 구체예에 있어서, SEQ ID NO:11의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 FR2 영역은 하나 이상의 하기 아미노산 치환에 의하여 변형될 수 있다: K5는 R, Q8은 E, S9은 A, K11은 R 또는 E, L12는 R에 의해 치환될 수 있다. 또한, 다음 중 하나 이상의 치환이 더 제공될 수 있다: Y2는 F 또는 H, Q3는 R 또는 S, Q4는 H, K, R 또는 V, K5는 V, P6는 I, L 또는 S, S9은 P, R, V 또는 T, P10은 L, K11은 I 또는 L, L12는 A, E, G, H, Q, 또는 W, L13는 F, I, M 또는 V, I14는 F, T, M 또는 V에 의해, 그리고 Y15는 A, C, D, E, F, G, H, Q, R, S, T 또는 V에 의해 치환될 수 있다.
- [0059] 또 하나의 특정 구체예에 있어서, SEQ ID NO:12의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 FR3 영역은 하나 이상의 하기 아미노산 치환에 의하여 변형될 수 있다: S4는 D, F6는 Y, D14는 E, Y15는 F, S16는 T, N20는 S, S24는 A, S29은 I, S 또는 T에 의해 그리고 F31은 Y로 치환될 수 있다. 또한, 다음 중 하나 이상의 치환이 더 제공될 수 있다: G1은 D 또는 F, V2는 A 또는 F, P3는 L 또는 S, S4는 A, E, G 또는 L, F6는 L, S7은 C, F, G, N, R 또는 T, G8은 A, S9은 D, E, G, K, R, T 또는 W, G10은 A, R 또는 V, S11은 A, F, T 또는 Y, G12는 E 또는 T, T13는 A, S 또는 W, S16는 A 또는 V, L17은 F 또는 P, T18은 A, I, S 또는 V, I19은 V, N20는 D, G 또는 T, S21은 D, E, P, R 또는 T, Q23는 E 또는 R, S24는 E 또는 T, E25는 A, D, G 또는 T, D26는 N, V27은 A, L, E, G 또는 S, A28은 G, S29은 D, E, F, L, M, N 또는 V, Y30는 C에 의해 그리고 F31은 H, S, T, V 또는 W에 의해 치환될 수 있다.
- [0060] 또 다른 특정 구체예에 있어서, SEQ ID NO:13의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 FR4 영역은 하나 이상의 하기 아미노산 치환에 의하여 변형될 수 있다: L9은 I에 의해 치환된다. 또한, 다음 치환들 중 하나 이상이 더 제공될 수

도 있다. F1은 I 또는 L, Q3는 L, T5는 S, K6는 M, N 또는 R, L7은 M 또는 V, E8은 A, D 또는 K, L9은 F, M 또는 V 그리고 K10은 A, E, G, I, Q, R, T 또는 V로 치환된다.

[0061] 또 다른 특정 구체예에 있어서, SEQ ID NO:14의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 FR1 영역은 하기 아미노산 치환에 의하여 변형될 수 있다: N13는 K에 의해 치환될 수 있다. 또한, 하기 치환 중 1 이상이 더 제공될 수 있다: K5는 Q에 의해, G10은 D에 의해, L11은 Q에 의해, V12는 M에 의해, N13는 M 또는 R에 의해, P14는 I 또는 S에 의해, S15는 A 또는 G에 의해, Q16는 E에 의해, T17은 A에 의해, S19은 T에 의해, T21은 S 또는 V에 의해, T23는 A, F 또는 S에 의해, V24는 I에 의해, S25는 T에 의해, G26는 AF27은 A, G, I, M, N Q 또는 S에 의해, S28은 D, H, I, L, N 또는 P에 의해, L29은 D, S, T 또는 V에 의해 그리고 T30는 E, I, N 또는 R에 의해 치환될 수 있다.

[0062] 또 하나의 특정 구체예에 있어서, SEQ ID NO:15의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 FR2 영역은 하기 아미노산 치환에 의하여 변형될 수 있다: W12는 F로 치환될 수 있다. 또한, 하기 치환들 중 1 이상의 치환이 더 제공될 수 있다: V2는 L로, A5는 P, S 또는 V로, K8은 W로, G9은 R로, L10은 P 또는 W로, W12는 E, H, R, V 또는 Y로 그리고 G14는 A, D 또는 S로 치환될 수 있다.

[0063] 또 하나의 특정 구체예에 있어서, SEQ ID NO:16의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 FR3 영역은 1 이상의 하기 아미노산 치환에 의해 변형될 수 있다: T3는 S, R6는 K, F14는 Y, Q16는 T, M17은 L, R32는 G로 치환될 수 있다. 또한, A2는 C, G, I, T 또는 V로, T3는 D, I, M N 또는 R, I4는 V, T5는 I, L 또는 S, R6는 E 또는 S, D7은 E 또는 N, T8은 A, E, I, P, S 또는 Y, S9은 E, G, K 또는 T, K10은 E, L, N, Q 또는 R, S11은 G, K, N 또는 R, Q12는 E, H 또는 R, V13는 A, I, L, F 또는 S, F14는 L, R,S, T 또는 V, L15는 V, Q16는 I, M17은 V, N18은 D, K, R, S 또는 T, S19은 D, E, G, K, M 또는 T, L20는 M 또는 V, T21은 S, S22는 D, E, G 또는 R, E23는 D 또는 G, T25는 A, A26는 S, V27은 D, Y29은 A, F, I 또는 W, A31은 E, G, I, S, T 또는 V 그리고 R32는 A, E, G, H, I, K 또는 S로 치환될 수 있다.

[0064] 또 하나의 특정 구체예에 있어서, SEQ ID NO:17의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 FR4 영역은 하기 아미노산 치환에 의하여 변형될 수 있다: Q3는 P로 치환될 수 있다.

[0065] 본 발명의 상기 측면의 특정 구체예에 있어서, 항체는 모노클로날 항체이다. 통상적으로 상기 항체는 마화 항체이다.

[0066] 본 발명의 또 다른 측면의 특정 구체예에 있어서, 본 발명의 마화 NGF 무력화 항체 또는 그들로부터 유래하는 결합 단편은 평형 해리 상수 (K_D) 1×10^{-8} 이하의 결합 친화성으로 말의 NGF (신경 성장 인자)에 특이적으로 결합한다. 또한, 상기 마화 항체는 말에 존재하는 어떠한 다른 에피토프들과도 교차 반응하지 않고, 또한 그들이 말에 투여되는 때 본 발명의 항체에 대응하여 무력화 항체를 생성하지 않는 것이 좋다. 또한, 이 항체들의 불변 도메인은 어떠한 하류 이펙터 기능, 예컨대 보체 고정 및 활성화, ADCC 및 Fc 수용체 결합 및 활성화를 포함하지만 이에 한정되는 것은 아닌 하류 이펙터 기능을 매개하지 않는 것이 좋다.

[0067] 또 하나의 특정 구체예에 있어서, 중쇄의 불변영역의 아미노산 서열에 대한 변형이 본 발명의 항체에 이루어질 수 있다. 상기 변형은 하나 이상의 아미노산 잔기의 첨가, 치환 또는 결실을 포함할 수 있다. 상기 아미노산 변화는 통상적으로 항체의 기능적 특징을 변형하기 위하여 수행된다. 예컨대, 아미노산 변형은 항체의 불변 도메인에 의하여 매개되는 하류 이펙터 기능을 막기 위하여 수행될 수 있는데, 예컨대 항체의 Fc 수용체에 결합하거나, 보체를 활성화시키거나 또는 ADCC를 유도하는 능력을 막음으로써 수행될 수 있다. 또한, 말에 투여되는 때 항체의 순환 반감기를 변형하기 위하여 중쇄 불변 도메인의 힌지 영역에 변형을 가할 수도 있다.

[0068] 일반적으로 항체의 중쇄 불변 도메인은 그 불변 도메인이 하류 이펙터 기능을 매개하지 않도록 선택되거나 또는 매개하지 않도록 아미노산 치환 또는 결실에 의해 변형된다. 일반적으로 상기 중쇄는 말의 HC2 또는 HC6 중쇄이다. 더욱 일반적으로, 상기 중쇄는 말의 HC2 중쇄이다.

[0069] 추가의 또는 관련 측면에서, 본 발명은 항체가 하류 이펙터 기능을 매개하지 않고, 그 항체가 단백질 A에 대한 결합에 의해 정제가능한 것인, 1 이상의 말의 가용성 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 결합 단편에 관한 것이기도 하다.

[0070] 특정 구체예에서, 상기 1 이상의 가용성 단백질은 CSF, 인터류킨, 성장인자 및 뉴로트로핀으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 구체예에서, 1 이상의 가용성 단백질은 뉴로트로핀이다. 특정 구체예에서, 1 이상의 가용성 단백질은 NGF이다.

- [0071] 특정 구체예에서, 항체는 하류 이펙터 기능을 매개하지 않도록 선택되거나 또는 매개하지 않도록 아미노산 치환 또는 결실에 의해 변형된 중쇄를 포함한다.
- [0072] 특정 구체예에서, 항체는 HC2 아이소타입을 갖는 중쇄를 포함한다. HC2 아이소타입들을 갖는 항체는 이펙터 기능이 없는 것으로 밝혀졌고 단백질 A 컬럼 또는 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제될 수 있는 것으로 나타났다.
- [0073] 특정 구체예에서, 항체는 예컨대 단백질 A 컬럼 또는 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 이용하여, 단백질 A에 대한 결합에 의해 정제된 후에 얻어진 항체이다.
- [0074] 특정 구체예에서, 항체는 경쇄 가변부 (VL)이 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 또는 상기 서열에 대해 적어도 85, 90, 95 또는 99%의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄 가변부 (VH)는 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열 또는 상기 서열에 대해 적어도 85, 90, 95 또는 99%의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열과 동일하거나 또는 실질적으로 상동성인 아미노산 서열을 포함하거나, 이 서열로 구성되거나 또는 이러한 서열로 본질적으로 구성된 것인, 경쇄 및 중쇄를 포함하는 것이다. 특정 구체예에서 상기 상동성은 적어도 약 15 아미노산, 좋기로는 약 20 아미노산, 더욱 좋기로는 약 25 아미노산 길이에 걸쳐 있다.
- [0075] 특정 구체예에서, 항체는 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열 또는 상기 서열에 대해 적어도 85%, 더욱 좋기로는 95% 그리고 더욱 좋기로는 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 이 서열로 구성되거나 또는 이러한 서열로 본질적으로 구성된 것인, 경쇄를 포함한다. 특정 구체예에서 상기 동일성은 적어도 약 15 아미노산, 좋기로는 약 20 아미노산, 더욱 좋기로는 약 25 아미노산 길이에 걸쳐 있다.
- [0076] 특정 구체예에서, 항체는 SEQ ID NO:5 또는 SEQ ID NO:6의 아미노산 서열 또는 상기 서열에 대해 적어도 85%, 더욱 좋기로는 90% 그리고 더욱 좋기로는 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 이 서열로 구성되거나 또는 이러한 서열로 본질적으로 구성된 것인, 경쇄를 포함한다. 특정 구체예에서 상기 동일성은 적어도 약 15 아미노산, 좋기로는 약 20 아미노산, 더욱 좋기로는 약 25 아미노산 길이에 걸쳐 있다.
- [0077] 특정 구체예에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 일반적으로 항체는 마화 항체이다.
- [0078] 또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 항체, 또는 그로부터 유래된 결합 단편은 평형 해리 상수 (K_D) 1×10^{-8} 이하의 결합 친화성으로 말의 NGF (신경 성장 인자)에 특이적으로 결합한다. 또한, 상기 항체는 말에 존재하는 어떠한 다른 에피토프들과도 교차 반응하지 않는 것이 바람직하며, 나아가, 본 발명의 항체들이 말에 투여될 때 본 발명의 항체에 대응하여 무력화 항체가 생성되지 않는 것이 좋다.
- [0079] 특정 구체예에서, 항체, 또는 그의 항원 결합 단편은 하류 이펙터 기능을 매개하지 않는다. 일반적으로 항체 또는 결합 단편은 말의 중쇄 서브타입 HC2을 갖는다.
- [0080] 특정 구체예에서, 마화 항체는 본 발명의 첫번째 측면의 항체의 제조 방법에 따라 제조된다.
- [0081] 본 발명은 말의 NGF에 결합하여 p75 또는 TrkA 수용체에 결합하는 그의 능력을 봉쇄하는 항체 단편에 관한 것이기도 하다.
- [0082] 특정 구체예에 있어서, 본 발명의 항체들의 상기 항체 결합 단편은 플렉시블 링커와 연결되어 단쇄 항체를 형성하는 본 발명의 중쇄 및 경쇄 서열을 포함할 수 있다.
- [0083] 단쇄 Fv (scFv)는 VH 및 VL 도메인을 포함한다. Vh 및 VL 도메인은 연관되어 표적 결합 부위를 형성한다. 이들 2개의 도메인은 펩타이드 링커에 의하여 공유결합적으로 연결된다. scFv 분자는 경쇄 가변 도메인이 N-말단에 요구되는 경우에는 VL-링커-VH의 형태를 가질 수 있고, 또는 VH 도메인이 N-말단에 요구되는 경우에는 VH-링커-VL의 형태일 수 있다. 따라서, 또 하나의 특정 구체예에 있어서, 상기 항원 결합 단편은 단쇄 Fv (scFv) 항체 단편이다. 또 하나의 특정 구체예에 있어서, 상기 항체 결합 단편은 Fab 항체 단편, Fab' 항체 단편, F(ab')₂ 항체 단편, Fv 항체 단편, sFv 항체 단편 등등으로 이루어지는 군으로부터 선택되지만 한정되는 것은 아니다.
- [0084] 특정 구체예에 있어서, 본 발명은 다특이적 (multispecific) 또는 다가의 (multivalent) 항체를 제공하며, 이는 병용요법에 사용하기 위한 여러 가지 결합 특이성을 갖는 다른 항체들과 커플링 또는 연결된 본 발명의 항-NGF 항체 또는 결합 단편을 포함한다. 다특이적 항체는 제1 NGF 에피토프에 특이적인 하나 이상의 항체 또는 결합 단편, 및 말의 NGF 상에 존재하는 다른 에피토프 또는 다른 항원에 특이적인 하나 이상의 결합 부위를 포함한다. 다가 항체는 말의 동일한 NGF 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 항체 또는 항체 결합 단편을 포함

한다. 따라서, 특정 구체예에 있어서, 본 발명은 본 발명의 마화 항체의 Fv 영역 또는 Fab 영역을 4개 이상 포함하는 항체 융합 단백질에 이른다. 또 다른 구체예는, 본 발명에 개시되는 항체로부터 유래하는 하나 이상의 Fab 영역과 함께 말의 NGF에 대하여 특이적인 항체들로부터 유래하는 하나 이상의 Fab 또는 Fv 영역을 포함하는 항체 융합 단백질에 이른다. 또 다른 특정 구체예에 있어서, 본 발명은 2특이적 (bispecific) 항체에까지 이르는데, 여기서 본 발명에 따른 항체 또는 그들의 결합 단편은 말의 NGF가 아닌 제2 표적에 대하여 결합 특이성을 갖는 제2 항체 또는 그들의 결합 단편과 연결된다. 종기로는 상기 제2 표적은 p75 또는 TrkA 수용체를 통한 NGF 매개 신호전달 방식을 보조한다. 이러한 다가의, 2특이적 또는 다특이적 항체들은 이 기술 분야의 숙련자에게 잘 알려진 다양한 재조합 방법들에 의하여 제조될 수 있다. 본 발명의 또 다른 측면은 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인 및/또는 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항-뉴로트로핀 무력화 항체를 제공한다. 특정 구체예에 있어서, 상기 뉴로트로핀은 말의 신경 성장 인자 (NGF)이다.

- [0085] 본 발명의 또 다른 측면은 말의 통증을 치료, 저해 또는 개선하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은:
- [0086] - 치료적 유효량의 항-말 NGF 항체, 또는 그의 항원 결합 단편을 제공하는 단계로서 상기 항체는 마화 항체인 것인 단계와,
- [0087] - 상기의 것을 이를 필요로 하는 말에게 투여하는 단계
- [0088] 를 포함한다.
- [0089] 특정 구체예에 있어서, 상기 항체는 마화 항체이다.
- [0090] 특정 구체예에서, 마화 항체는 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 또는 그에 대해 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인 및/또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열 또는 그에 대해 적어도 95%의 서열 상동성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0091] 특정 구체예에 있어서, 상기 마화 항체는 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열 또는 이들과 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 서열을 갖는 경쇄 및/또는 SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 또는 SEQ ID NO:9로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 이들과 95% 이상의, 및 더욱 종기로는 98% 이상의 아미노산 서열 상동성을 갖는 서열을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 또는 필수적으로 이들로 이루어지는 중쇄를 포함한다.
- [0092] 특정 구체예에 있어서, 항-말 NGF 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 전술한 본 발명의 측면들에 의하여 제공되는 것들이다.
- [0093] 특정 구체예에 있어서, 통증은 신경병증 통증이다. 특히, 상기 통증은 수술전후 (peri-operative), 수술 후 (post-operative) 또는 외과술 후 (post-surgical) 통증일 수 있다. 수술 후 통증은 말의 정형외과술, 연조직 수술, 난소자궁절제술 (ovariohysterectomy) 과정 등을 포함하는 임의의 수술 과정에 뒤따라 결과되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또 다른 특정 구체예에 있어서, 상기 통증은 암 또는 암 유사 질환과 관련된 만성 통증 (종양 통증)이다. 또 다른 특정 구체예에 있어서, 상기 통증은 염증, 소양증, 류마티스 관절염 또는 골관절염과 관련된 또는 이로부터 야기되는 것이다. 또 다른 특정 구체예에 있어서, 상기 통증은 염증성 통증 또는 소양증 통증이다. 상기 통증은 발바닥 통증, 말굽바닥 하부 타박상, 제염염, 말굽 농양, 전사회 후 외상, 경주 후 외상, 주상골 증후군 및 근위부 지지 인대염과 관련되거나 또는 이로부터 야기되는 것이다.
- [0094] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 말 대상체에서의 관절염 치료 방법이 제공되는데, 상기 방법은:
- [0095] - 본 발명에 따른 항-말 NGF 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료적 유효량을 제공하는 단계, 및
- [0096] - 상기의 것을 이를 필요로 하는 말에게 투여하는 단계
- [0097] 를 포함한다.
- [0098] 특정 구체예에 있어서, 상기 항체는 마화 항체이다. 특정 구체예에 있어서, 상기 항체는 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 서열 또는 이들과 85% 이상의 상동성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인 및/또는 SEQ ID NO:2 또는 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열 또는 이들과 85% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0099] 특정 구체예에 있어서, 관절염 또는 관절 질환은 면역 매개 다발성 관절염, 류마티스성 관절염, 골관절염 및 관

런 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 질환들을 포함한다.

- [0100] 통상적으로, 관절염 또는 관절 질환의 치료는 상기 관절 질환과 관련되거나 그것이 원인인 통증의 개시를 개선, 저해, 저감, 억제 또는 지연시키는 것을 포함한다.
- [0101] 본 발명의 또 다른 측면은 말 대상체에서 말의 신경 성장 인자(NGF)에 대한 감수성 증가에 기인하거나, 이와 관련되거나 또는 이를 야기하는 질환의 치료 방법을 제공하는데, 상기 방법은:
 - [0102] - 본 발명에 따른 마화 항-말 NGF 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료적 유효량을 제공하는 단계, 및
 - [0103] - 상기의 것을 이를 필요로 하는 말에게 투여하는 단계
 를 포함한다.
- [0104] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 말에서 NGF에 의하여 증식 유도된 종양 및 그와 관련된 질환의 치료 방법을 제공하는데, 상기 방법은:
 - [0106] - 본 발명에 따른 항-말 NGF 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료적 유효량을 제공하는 단계, 및
 - [0107] - 상기의 것을 이를 필요로 하는 말에게 투여하는 단계
 를 포함한다.
- [0108] 특정 구체예에 있어서, 상기 종양은 골육종이다. 특정 구체예에 있어서, 상기 종양은 자가분비 또는 측분비 NGF에 의하여 증식 유도된다.
- [0109] 특정 구체예에 있어서, 본 발명의 전술한 방법들은 상기 본 발명의 항-NGF 항체의 효과를 증강 및/또는 보완할 수 있는 하나 이상의 추가 제제를 공투여하는 단계를 더 포함한다. 예컨대, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 하나 이상의 진통제, NSAID, 오피오이드, 코르티코스테로이드, 스테로이드, 히알루로난 또는 히알루론산과 함께 공동 투여될 수 있다.
- [0110] 적절한 진통제의 예시로는 부토르파놀, 부프레노르핀, 펜타닐, 플루닉신 메글루민, 메르피딘, 모르핀, 날부핀 및 이들의 유도체를 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 적절한 NSAIDs는 아세트아미노펜, 아세틸살리실산, 카프로펜, 에토돌락, 케토프로펜, 멜록시캄, 피로콕시브, 로베나콕시브, 데라콕시브 등등을 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0111] 또 다른 특정 구체예에 있어서, 상기 하나 이상의 추가 제제는 항생제, 항진균제, 항원충제, 항바이러스제 또는 유사 치료제로부터 선택되는 하나 이상의 군일 수 있는 치료적 활성제일 수 있다. 또한, 상기 하나 이상의 추가 제제는 감염 매개자(들)의 억제제, 예컨대 PGE-수용체 길항제, 면역억제제, 예컨대 시클로스포린, 항염증 글루코코르티코이드일 수 있다. 또 다른 특정 구체예에 있어서, 상기 하나 이상의 추가 제제는 나이트 말들에게서 점점 만연될 수 있는 인지 기능장애 또는 손상, 예컨대 기억 상실 또는 관련 질환의 치료에 사용하기 위한 제제일 수 있다. 또한, 상기 하나 이상의 추가 제제는 항고혈압제 또는 심혈관 기능장애, 예컨대 고혈압, 심근허혈, 울혈성 심부전 등등의 치료에 사용하기 위한 기타 화합물일 수 있다. 그리고 또한, 상기 하나 이상의 추가 제제는 이노제, 혈관확장제, 베타-아드레날린성 수용체 길항제, 안지오텐신-II 전환 효소 억제제, 칼슘 채널 차단제 또는 HMG-CoA 환원효소 억제제, 페닐부타존, 히알루론산, 폴리설페이트화 글리코사미노글리칸, 인터류킨-1 수용체 길항제, IRAP, 디클로페낙 및 골관절염 약물일 수 있다.
- [0112] 특정 구체예에 있어서, 전술한 방법들의 일부로서 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 말에게 약 0.01 mg/체중kg 내지 약 10 mg/체중kg 범위의 투여량으로, 특히 약 0.03 mg/체중kg 내지 약 3 mg/체중kg 범위의 투여량으로 투여된다.
- [0113] 다양한 다른 측면에 있어서, 본 발명은 본 발명의 전술한 임의의 측면에 따른 항체 또는 그들의 결합 단편을 포함하는 조성물에 이른다. 특정 구체예에 있어서, 상기 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 캐리어를 더 포함한다.
- [0114] 본 발명의 또 다른 측면은 통증, 또는 말의 만성 통증을 일으키거나 또는 이레 의해 야기되는 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공하는데, 이는 본 발명에 따른 약학적 유효량의 항-말 NGF 마화 항체를 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제와 함께 포함한다.
- [0115] 특정 구체예에 있어서, 상기 조성물은 하나 이상의 진통제, NSAID, 오피오이드, 코르티코스테로이드 또는 스테

로이드를 더 포함할 수 있다.

- [0117] 다양한 다른 측면에 있어서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 항체 결합 단편을 인코딩하는 단리된 핵산에 이른다.
- [0118] 따라서, 본 발명의 또 다른 측면은 본 발명의 전술한 측면들 중 어느 하나에 따른 항체 또는 항원 결합 단편을 인코딩하는 단리된 핵산을 제공한다. 특정 구체예에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열을 갖는 항-말 NGF 마화 항체 또는 항체 단편의 경쇄 가변 도메인, 또는 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 인코딩한다.
- [0119] 또 다른 특정 구체예에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열을 갖는 항-말 NGF 항체 또는 항체 단편의 중쇄 가변 도메인, 또는 SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 또는 SEQ ID NO:9로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 인코딩한다.
- [0120] 특정 구체예에 있어서, 상기 단리된 핵산은 작동가능하게 그와 연결된 하나 이상의 조절 서열을 인코딩하는 핵산을 더 포함한다.
- [0121] 다른 측면에 있어서, 본 발명의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 도메인 또는 중쇄 및/또는 경쇄 불변 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터가 제공된다. 특정 구체예에 있어서, 상기 발현 벡터는 하나 이상의 조절 서열을 더 포함한다. 특정 구체예에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드 또는 레트로바이러스 벡터이다.
- [0122] 또 다른 측면은 본 발명의 전술한 측면의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 본 발명의 또 다른 측면은 본 발명의 전술한 측면들 중 어느 하나의 항체를 생산하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0123] 본 발명의 또 다른 측면은 마화된 항-말 NGF 무력화 항체를 생산하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 본 발명의 전술한 측면의 숙주 세포를 배양하여 세포로 하여금 마화된 항-말 NGF 무력화 항체를 발현하도록 하는 단계를 포함한다.
- [0124] 본 발명의 또 다른 측면은 본 발명에 따른 항-말 NGF 마화 항체를 생산하는 방법을 제공하는데, 이는 적절한 숙주 세포에서 본 발명의 항체의 경쇄 및/또는 중쇄를 발현하는 본 발명의 전술한 측면들의 폴리뉴클레오티드/핵산 또는 벡터 하나 이상을 발현시키는 단계와, 숙주 세포에서 함께 발현되거나 다른 숙주 세포에서 별개로 발현될 수 있는 그 발현된 폴리펩타이드를 회수하는 단계와, 항체를 단리하는 단계를 포함한다.
- [0125] 본 발명의 또 다른 측면은 말의 통증을 치료, 개선 또는 저해하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 본 발명의 전술한 측면들 중 어느 하나에 따른 폴리뉴클레오티드의 유효량을 상기 말에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0126] 본 발명의 또 다른 측면은 본 발명의 전술한 측면들 중 어느 하나에 따른 항체 또는 항체 결합 단편, 또는 본 발명의 전술한 측면들에 따른 약학적 조성물, 또는 말의 통증을 치료, 예방 또는 경감하는 데 사용하기 위한 본 발명의 전술한 측면들 중 어느 하나에 따른 것들을 포함하는 핵산 또는 벡터를 제공한다.
- [0127] 특정 구체예에 있어서, 상기 통증은 급성 통증이다. 또 다른 구체예에 있어서, 상기 통증은 만성 통증이다. 또한, 상기 통증은 비제한적인 예로서 수술 후 통증, 또는 정형외과술, 연조직 수술 등등 포함하는 말에 대한 임의의 수술 과정으로부터 야기되는 통증일 수 있다. 또 다른 특정 구체예에 있어서, 상기 통증은 암 또는 암 유사 질환과 관련된 만성 통증이다. 또 하나의 특정 구체예에 있어서, 상기 통증은 염증, 소양증, 류마티스 관절염 또는 골관절염과 관련되거나 그로부터 야기되는 것이다. 특정 구체예에 있어서, 상기 통증은 염증성 통증 또는 소양증 통증이다. 상기 통증은 발바닥 통증, 말굽바닥 하부 타박상, 제염염, 말굽 농양, 전신회 후 외상, 경주 후 외상, 주상골 증후군 및 근위부 지지 인대염과 관련되거나 또는 이로부터 야기되는 것이다.
- [0128] 본 발명의 또 다른 측면은 골관절염 및/또는 류마티스 관절염을 치료하는데 사용하기 위한, 본 발명의 전술한 측면들 중 어느 하나에 따른 항체 또는 항체 결합 단편, 또는 본 발명의 전술한 측면들에 따른 약학적 조성물, 또는 본 발명의 전술한 측면들에 따른 핵산, 또는 본 발명의 전술한 측면들 중 어느 하나에 따른 것들을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0129] 본 발명의 또 다른 측면은 본 발명의 전술한 측면들 중 어느 하나에 따른 항체 또는 항체 결합 단편, 또는 본 발명의 전술한 측면들에 따른 약학적 조성물, 또는 말에서 NGF에 의하여 증식 유도되는 종양 및 그와 관련된 질환들, 특히 골육종을 치료하는데 사용하기 위한 본 발명의 전술한 측면들 중 어느 하나에 따른 것들을 포함하는 핵산 또는 벡터를 제공한다. 특정 구체예에 있어서, 상기 종양은 자가분비 또는 측분비 NGF에 의하여 증식 유도된다.

- [0130] 본 발명의 또 다른 측면은 말의 통증을 치료 또는 예방하기 위한 의약의 제조에 있어서 본 발명의 전술한 측면들 중 어느 하나에 따른 항체 또는 항체 결합 단편, 또는 본 발명의 전술한 측면들에 따른 약학적 조성물, 또는 본 발명의 전술한 측면들에 따른 핵산, 또는 본 발명의 전술한 측면들 중 어느 하나에 따른 것들을 포함하는 벡터의 용도를 제공한다.
- [0131] 상기 통증은 만성 또는 급성 통증일 수 있다. 특정 구체예에서, 통증은 만성 통증이다. 또한, 상기 통증은 수술 후 통증, 또는 정형외과술, 연조직 수술, 난소자궁적출 과정, 거세 과정 등등을 포함하나 이에 한정되는 것은 아닌 말에 대한 임의의 수술 과정으로부터 야기되는 통증일 수 있다. 또 다른 특정 구체예에 있어서, 상기 통증은 암 또는 암 유사 질환과 관련된 만성 통증이다. 또 다른 특정 구체예에 있어서, 상기 통증은 염증, 소양증, 류마티스 관절염 또는 골관절염과 관련되거나 그로부터 야기되는 것이거나 또는, 발바닥 통증, 말굽바닥 하부 타박상, 제염염, 말굽 농양, 전사회 후 외상, 경주 후 외상, 주상골 증후군 및 근위부 지지 인대염과 관련되거나 또는 이로부터 야기되는 것일 수 있다.
- [0132] 본 발명의 또 다른 측면은 말의 류마티스 관절염 또는 골관절염을 치료, 저해, 개선 또는 예방하기 위한 의약의 제조에 있어서 본 발명의 전술한 측면들 중 어느 하나에 따른 항체 또는 항체 결합 단편, 또는 본 발명의 전술한 측면들에 따른 약학적 조성물, 또는 본 발명의 전술한 측면들 중 어느 하나에 따른 핵산 또는 본 발명의 전술한 측면들 중 어느 하나에 따른 벡터의 용도를 제공한다.
- [0133] 본 발명의 또 다른 측면은 말에서 NGF에 의하여 증식 유도되는 종양 및 그와 관련된 질환들, 특히 골육종 치료용 의약의 제조에 있어서 본 발명의 전술한 측면들 중 어느 하나에 따른 항체 또는 항체 결합 단편, 또는 본 발명의 전술한 측면들에 따른 약학적 조성물, 또는 본 발명의 전술한 측면들 중 어느 하나에 따른 것들을 포함하는 핵산 또는 벡터의 용도를 제공한다. 특정 구체예에 있어서, 상기 종양은 자가분비 또는 측분비 NGF에 의하여 증식 유도된다.
- [0134] 또 다른 측면에 있어서, 본 발명에 따른 항-말 NGF 무력화 모노클로날 항체 또는 그들의 단편을 생산하는 세포주 또는 그들의 유도체 또는 자손 세포가 제공된다.
- [0135] 본 발명의 또 하나의 측면은 말의 통증을 치료하기 위한, 또는 통증과 관련된 질환을 치료하기 위한, 또는 골관절염 또는 류마티스 관절염, 염증, 소양증, 발바닥 통증, 말굽바닥 하부 타박상, 제염염, 말굽 농양, 전사회 후 외상, 경주 후 외상, 주상골 증후군 및 근위부 지지 인대염과 관련되거나 또는 이로부터 야기되는 통증을 치료, 경감 또는 저해하기 위한 키트를 제공하는데, 상기 키트는 본 발명의 전술한 측면들 중 어느 하나에 따른 항-말 NGF 항체 및 이들의 사용에 대한 지침을 포함한다.
- [0136] 본 발명의 또 하나의 측면은 시험관 내 (*in vitro*), 생체 외 (*ex vivo*) 및 생체 내 (*in vivo*)에서 유액 중 항-말 NGF 모노클로날 항체를 검출하기 위한 진단 키트를 제공하는데, 이는 상기 항체의 농도를 측정하는 데 사용하기 위한 것이다. 상기 키트는 본 발명의 항체들 중 어느 하나 또는 그들의 결합 단편을 포함할 수 있다. 상기 키트는 이들을 사용하기 위한 지침을 포함할 수 있다.

과제의 해결 수단

[0137] 발명의 상세한 설명

- [0138] 방대한 실험 후, 본 발명의 발명자는 래트 항-마우스 NGF 모노클로날 항체 (MAb) aD11 아미노산 서열을 얻었고 이것을 사용하여 비변역원성 항-NGF 항체를 생산하였다. 결과물인 키메라 항체 또는 마화 항체일 수 있는 항체는 표준 CDR 그래프팅 방법을 이용하여 생산된 것이 아니며, 놀랍게도 말의 NGF에 대하여 고친화 결합을 나타냄을 보여준다. 더욱 놀라운 것은 이 항체가 말의 NGF 생물학적 기능, 가장 구체적으로는 수용체 TrkA 및 p75에 기초한 NGF의 세포로의 결합을 저해함으로써 말의 NGF 생물학적 기능을 무력화시킨다는 것이다. 또한, 예기치 않게도, 말에게 투여되는 경우 그에 대한 무력화 항체가 생성되지 않는다는 것 역시 밝혀졌다. 따라서, 본 발명의 상기 마화 항체는 말의 장기적 만성 통증 완화제로 적합하다.
- [0139] 본 발명의 발명자에 의하여 이용된 본 발명의 항체를 위한 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 생성하는 공정은, 경쇄 및 중쇄 가변 도메인의 구조영역 내에 존재하는 특이적인 래트 (공여자) 아미노산 잔기들을, 본 발명자들의 분석에 기초하여, 그것이 비변형된 형태로 말에게 투여된다면 그 항체에 대응하여 생성되는 무력화 항체를 야기할 수 있는 면역원성 에피토프의 존재를 감소시키면서 CDR 영역의 형태를 보유하므로 결합 특이성 및 결합 활성을 유지하는 잔기로 교체하게 되는 결과를 낳는다. 구체적으로, 본 발명의 항체 제조 방법은 (PETisation으로 알려짐) 말에게 투여하는 적합성에 대하여 공여자 항체의 구조영역의 서열을 말로부터 유래하는 항체 또는 항체 풀

의 서열과 비교함으로써 상기 공여자 (예컨대, 래트) 항체의 구조영역의 서열을 평가하는 단계를 포함한다. 공여자 서열과 표적 서열 중 단 하나의 제공원 간에만 상기 비교가 이루어질 수 있다고 하여도, 표적 서열의 풀과의 비교가 바람직하다는 것은 자명한데, 이것은 표적 종들에 있어서 각 카바트 위치에서 자연 선택의 수가 확장될 것이기 때문이다. 이것은 공여자와 표적 간의 "매치" 확률을 증가시킬 뿐 아니라, 매치가 존재하지 않는 교체에 대한 선택 역시 확장시킬 것이다. 그 결과로서, 공여자와 가능한 근접한 특징을 갖는 교체의 선택이 가능해질 것이다. 공여자 서열과 말의 서열이 임의의 카바트 번호 또는 대응하는 위치에서 상이한 경우, 공여자 서열은 문제의 아미노산 잔기가, 말에서 그 위치에 천연적으로 존재하는 것으로 알려진 아미노산 잔기로 치환되도록 변형된다.

[0140] 공여자 면역글로불린 구조영역에 존재하는 아미노산 잔기의 치환이 필요한 경우, 통상적으로 이것은, 아미노산 잔기가 말의 그 카바트 위치에서 자연적으로 존재하고, 크기, 전하 및 소수성에 있어서 공여자 서열에서 치환되는 아미노산과 가능한 근접하여 관련되는 아미노산 잔기로 교체되는 보존적 치환의 원리를 이용하여 이루어진다. 그 목적은 상기 공여자 항체의 3차원 구조에 어떠한 동요 또는 혼란을 야기하지 않거나, 또는 오직 최소한의 동요 또는 혼란만을 야기하는 교체를 선택하기 위함이다. 특정 경우에 있어서는, 어떠한 명확한 선택권이 없을 것이고 각각의 선택은 유리 및 불리를 동시에 가질 것이다. 최종 결정은 3차원 모델링이나 다양한 대안 서열의 발현을 필요로 할 수 있다. 그러나, 일반적으로, 명확한 선호가 있을 것이다. 이러한 방법의 결과로, 공여자 서열의 변화는 그 잔기가 표적에서 외래의 것이고 그 교체 아미노산이 대체되는 아미노산과 가능한 근접하게 관련된 경우에만 이루어진다. 따라서, 외래의 에피토프의 생성은 회피되지만, 총 3차원 구조는 보존되고 그 결과로 친화도 및 특이성 역시 보존된다.

[0141] 경쇄 및 중쇄 불변영역은 통상적으로 말 (표적) 유래 항체들로부터 유래한다. 중쇄 불변 도메인은 그들이 하류 이펙터 기능을 매개하지 않도록 선택되거나 변형된다. 상당히 놀랍게도, 본 발명에 따라 생성되는 항체들에 대응하여 무력화 항체가 전혀 생산되지 않거나 최소한으로 생산된다는 것이 밝혀졌기 때문에, 이 항체들은 놀랍게도 장기 순환 반감기 및 반복 투여에 대한 선택권과 관련된 이점을 갖는 것으로 밝혀졌다. 또한, 구조 잔기들의 치환이 CDR 영역의 3차원 형태에 영향을 미치지 않는 방식으로 이루어지기 때문에, 결합 특이성에 있어서 변화가 없을 것이다.

[0142] 하이브리드 쥐-말 키메라 항체가 알려져 있기는 하지만, 문헌상 완전히 마화된 모노클로날 항체의 예는 현재까지 없다. 따라서, 이러한 항체를 제조하여 이들이 치료적 유용성을 가짐을 밝혀냈다는 것은 매우 예기치 못한 성과이다.

[0143] 인간과 마우스에 있어서 4종의 주요 IgG 아이소타입이 있고, 명명법은 유사하지만 그들의 행동 및 기능, 예컨대 단백질 A 및 단백질 G와 같은 박테리아 산물에 대한 친화도, 보체 의존성 세포용해 (CDC)를 활성화시키는 그들의 능력 및 항체 의존성 세포 독성 (ADCC)를 통한 표적 세포의 사멸을 유도하는 그들의 능력 등에 있어서 상이하다. CDC 및 ADCC 활성인 IgG 아이소타입 또는 "무장된 (armed)" 불변 도메인의 선택은, 예컨대 종양학 또는 감염 통제에 있어서 항체가 그들의 동족 항원을 함유하는 표적 세포를 제거하기 위하여 설계될 때 임상적 이점으로 여겨진다 (예컨대, 인간에 대한 의학적 용도에 있어서, 인간의 IgG1 아이소타입이 상기 목적으로 바람직하다). 반대로, 감염, 통증 또는 자가면역의 완화에서와 같은 다른 환경에 있어서는 면역계의 활성화가 바람직하지 않은 것으로 여겨지므로, 최소한의 CDC 및 ADCC 활성을 갖는 인간 IgG 아이소타입이 선호된다 (예컨대, 이러한 인간에 대한 의학적 용도에 있어서는 IgG4 아이소타입이 종종 선호된다). 말의 면역계에 있어서 하나의 카파 및 람다 불변 도메인 서열과 더불어 7개의 특징적인 면역글로불린 감마 (IgG) 중쇄 불변 도메인 아이소타입이 개시되었다. 상기 7개의 말 중쇄 불변 도메인 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG5, IgG6 및 IgG7은 그들에 의하여 매개되는 기능적 활성의 측면에서 밝혀져 있다. CDC 및 ADCC 활성 불변 도메인을 갖는 IgG 아이소타입의 선택은, 예컨대 종양학 또는 감염 통제에 있어서 항체가 그들의 동족 항원을 함유하는 표적 세포를 제거하기 위하여 설계될 때 임상적 이점으로 여겨지며, 예컨대, 인간에 대한 의학적 용도에 있어서, 인간의 IgG1 아이소타입이 상기 목적으로 바람직하다. 반대로, 감염, 통증 또는 자가면역의 완화에서와 같은 다른 환경에 있어서는 면역계의 활성화가 바람직하지 않은 것으로 여겨지므로, 최소한의 또는 "비무장된 (disarmed)" CDC 및 ADCC 활성의 인간 IgG 아이소타입이 선호되며, 예컨대, 인간에 대한 의학적 용도에 있어서는 IgG4 아이소타입이 선택될 것이다. 말의 MAb 아이소타입들은 광범한 활성 스펙트럼을 가지며 무장된 중쇄 또는 비무장된 중쇄의 선택은 유사한 가치를 가질 것으로 예측된다.

[0144] 본 발명의 항체들은 말 유래 중쇄 및 경쇄 불변 도메인을 포함한다. 또한, 상보성 결정 영역은 래트 α D11 항-마우스 NGF 항체로부터 유래한다. 상기 α D11 항체는 Cattaneo 등에 의하여 최초로 개시되었다 [문헌 (Cattaneo A, Rapposelli B, Calissano P. (1988) "Three distinct types of monoclonal antibodies after long-term

immunization of rats with mouse nerve growth factor". J Neurochem 50(4):1003-1010).] 이어서, 상기 알파 D11 항체는 Ruberti 등에 의하여 클로닝되었다 (Ruberti, F. et al. (1993) "Cloning and Expression of an Anti-Nerve Growth Factor (NGF) Antibody for Studies Using the Neuroantibody Approach". Cellular and Molecular Neurobiology. 13(5):559-568).

[0145] 상기 αD11 항체로부터 유래되는 CDR 영역은 본 발명의 발명자에 의하여 결정된 구조영역 서열과 조합되어, 상기 항체가 말에게 투여되는 때에 그에 대응하여 무력화 항체가 생성되는 것은 막으면서 CDR 3차 구조를 보존하므로, 따라서 결합 특이성도 보존하게 된다.

[0146] 각각의 경쇄 및 중쇄 가변영역은 FR1~FR4라고 일컬어지는 4개의 구조영역을 함유한다. 이들 각각의 구조영역에 대하여, 본 발명의 발명자는 각각의 특이적 위치에 대하여 양호한 아미노산 (소위 선호 잔기) 및 또한 그 위치에 제공될 수 있는 대체 아미노산 잔기를 밝혔다. 하기 표 1 내지 8은 각각의 중쇄 및 경쇄에 대한 4개의 구조영역들을 나타내고 있다. 표는 구체적인 구조영역의 위치에 상대적이고, 또한 온전한 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인의 길이를 따라 특정 잔기의 위치를 동정하는 데 사용되는 카바트 넘버링 시스템에 따라 아미노산 위치를 제공한다. 그룹 1으로 나타낸 잔기 또는 잔기들이 선호 잔기들이고, 그룹 2 잔기들은 대체 잔기들이다. 그러나, 구체적인 위치와 관련하여, 이들은 일반적으로 그룹 1에 나타낸 잔기들만큼 선호되지는 않는다. 1 문자 명명 시스템을 이용하여 아미노산 잔기들이 식별된다.

[0147] 표 1

표 1 – 경쇄 가변 도메인 FR1 잔기

경쇄 FR1 위치	카바트 경쇄 넘버링	그룹 1 아미노산 잔기	그룹 2 아미노산 잔기
1	1	D	GKV
2	2	IV	FNST
3	3	V	AGIM
4	4	M	LQV
5	5	T	AI
6	6	Q	
7	7	ST	F
8	8	P	
9	9	AE	DPS
10	10	S	FLT
11	11	LV	S
12	12	STA	EV
13	13	AV	LQT
14	14	ST	AP
15	15	L	PR
16	16	G	R
17	17	EQ	
18	18	TR	SGK
19	19	V	A
20	20	ET	DV
21	21	ILMV	T
22	22	EK	LNQRST
23	23	C	

[0148]

[0149] 표 2

표 2 – 경쇄 가변 도메인 FR2 잔기

경쇄 FR2 위치	카바트 경쇄 넘버링	그룹 1 아미노산 잔기	그룹 2 아미노산 잔기
1	35	W	
2	36	Y	FH
3	37	Q	RS
4	38	Q	HKRV
5	39	KR	V
6	40	P	ILS
7	41	G	
8	42	QE	
9	43	AS	PRVT
10	44	P	L
11	45	KRE	IL
12	46	LR	AEGHQW
13	47	L	FIMV
14	48	I	FTMV
15	49	Y	ACDEFG HQRSTV

[0150]

[0151] 표 3

표 3 – 경쇄 가변 도메인 FR3 잔기

경쇄 FR3 위치	카바트 경쇄 넘버링	그룹 1 아미노산 잔기	그룹 2 아미노산 잔기
1	57	G	DF
2	58	V	AF
3	59	P	LS
4	60	SD	AEGL
5	61	R	
6	62	FY	L
7	63	S	CFGNRT
8	64	G	A
9	65	S	DEGKRTW
10	66	G	ARV
11	67	S	AFTY
12	68	G	ET
13	69	T	ASW
14	70	DE	
15	71	YF	
16	72	ST	AV
17	73	L	FP
18	74	T	AISV
19	75	I	V
20	76	NS	DGT
21	77	S	DEPRT
22	78	L	
23	79	Q	ER
24	80	AS	ET
25	81	E	ADGT
26	82	D	N

[0152]

27	82A	V	ALEGS
28	82B	A	G
29	82C	IST	DEFLMNV
30	83	Y	C
31	84	FY	HSTVW
32	85	C	

[0153]

[0154] 표 4

표 4 – 경쇄 가변 도메인 FR4 잔기

경쇄 FR4 위치	카바트 경쇄 넘버링	그룹 1 아미노산 잔기	그룹 2 아미노산 잔기
1	95	F	IL
2	96	G	
3	97	Q	L
4	98	G	
5	99	T	S
6	100	K	MNR
7	101	L	MV
8	102	E	ADK
9	103	IL	FMV
10	104	K	AEGIQRTV

[0155]

[0156] 표 5

표 5 - 중쇄 가변 도메인 FR1 잔기

중쇄 FR1 위치	카바트 중쇄 넘버링	그룹 1 아미노산 잔기	그룹 2 아미노산 잔기
1	1	Q	
2	2	V	
3	3	Q	
4	4	L	
5	5	K	Q
6	6	E	
7	7	S	
8	8	G	
9	9	P	
10	10	G	D
11	11	L	Q
12	12	V	M
13	13	NK	MR
14	14	P	IS
15	15	S	AG
16	16	Q	E
17	17	T	A
18	18	L	
19	19	S	T
20	20	L	
21	21	T	SV
22	22	C	
23	23	T	AFS
24	24	V	I
25	25	S	T
26	26	G	A

[0157]

27	27	FL	AGIMNQS
28	28	S	DHILNP
29	29	L	DSTV
30	30	TS	EINR

[0158]

[0159] 표 6

표 6 – 중쇄 가변 도메인 FR2 잔기

중쇄 FR2 위치	카바트 중쇄 넘버링	그룹 1 아미노산 잔기	그룹 2 아미노산 잔기
1	36	W	
2	37	V	L
3	38	R	
4	39	Q	
5	40	A	PSV
6	41	P	
7	42	G	
8	43	K	W
9	44	G	R
10	45	L	PW
11	46	E	
12	47	WF	EHRVY
13	48	V	
14	49	G	ADS

[0160]

[0161] 표 7

표 7 - 중쇄 가변 도메인 FR3 잔기

중쇄 FR3 위치	카바트 중쇄 넘버링	그룹 1 아미노산 잔기	그룹 2 아미노산 잔기
1	66	R	
2	67	A	CGITV
3	68	ST	DIMNR
4	69	I	V
5	70	T	ILS
6	71	RK	ES
7	72	D	EN
8	73	T	AEIPSY
9	74	S	EGKT
10	75	K	ELNQR
11	76	S	GKNR
12	77	Q	EHR
13	78	V	AILFS
14	79	FY	LRSTV
15	80	L	V
16	81	QT	I
17	82	ML	V
18	82A	N	DKRST
19	82B	S	DEGKMT
20	82C	L	MV
21	83	T	S
22	84	S	DEGR
23	85	E	DG
24	86	D	
25	87	T	A
26	88	A	S

[0162]

27	89	V	D
28	90	Y	
29	91	Y	AFIW
30	92	C	
31	93	A	EGISTV
32	94	RG	AEGHIKS

[0163]

[0164]

표 8

표 8 – 중쇄 가변 도메인 FR4 잔기

중쇄 FR4 위치	카바트 중쇄 넘버링	그룹 1 아미노산 잔기	그룹 2 아미노산 잔기
1	103	W	
2	104	G	
3	105	Q	P
4	106	G	
5	107	I	
6	108	L	
7	109	V	
8	110	T	
9	111	V	
10	112	S	
11	113	-	

[0165]

[0166]

그러므로, 본 발명의 마화 항체는, 예컨대 첫번째 종으로부터 유래하는 온전한 가변영역과 두번째 종으로부터 유래하는 불변영역으로 이루어지는 키메라 모노클로날 항체, 또는 중쇄 및 경쇄 가변영역의 상보성 결정 영역 (CDRs)이 공여자 항체로부터 유래한 아미노산 잔기를 포함하고 표적 항체로부터 유래한 구조영역 (FR)과 불변영역 (CR)으로 도입된 CDR-그래프트 마화 항체, 또는 말의 생식세포 서열들과는 상이하다.

[0167]

상기 마화 항체는 실질적으로 그 CDRs이 유래한 모체 (공여자) 항체의 결합 특성을 보유한다. 이것은 상기 마화 항체가 그 CDRs이 유래하는 공여자 항체와 동일한 또는 실질적으로 동일한 항원-결합 친화도 및 결합 활성을 나타낼 것을 의미한다. 이상적으로는, 표적 에피토프에 대한 상기 마화 항체의 친화도는 공여자 항체의 친화도 기준 10% 미만은 아닐 것이고, 더욱 좋기로는 약 30% 미만은 아니며, 가장 좋기로는 친화도는 모체 (공여자) 항체의 50% 미만은 아닐 것이다. 항원 결합 친화도 평가 방법은 이 기술 분야에 잘 알려져 있고 하프-맥시멀 결합 분석 (half-maximal binding assays), 경쟁 분석 및 스카트차드 분석 (Scatchard analysis)을 들 수 있다.

[0168]

앞서 기재한 바와 같이, 본 발명은 본 발명의 마화 항체로부터 유래하는 결합원 또는 항원 결합 단편에 이른다. 이러한 항원 결합 단편은 말의 NGF에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 말한다. 항체의 항원 결합 기능은 전장 항체의 단편들에 의하여 수행될 수 있다. 특정 구체예에 있어서, 상기 결합원 또는 항원 결합 단편들은 단리된 결합원들일 수 있다. 본 발명의 결합원 또는 항원 결합 단편은 본 발명의 항체의 단편, 예컨대 전장 마화 항체 분자의 단편, 예컨대 오로지 중쇄 또는 경쇄, 또는 예컨대 상기 중쇄 및/또는 경쇄의 가변 도메인을 포함할 수 있다. 특정 구체예에 있어서, 결합원은 통상적으로 항체 VH 및/또는 VL 도메인을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 또는 필수적으로 이들로 이루어질 수 있다. 결합원의 VH 도메인은 또한 본 발명의 일부로서 제공된다. 각각의 VH 및 VL 도메인 내에는, 3개의 상보성 결정 영역 ("CDRs")과 더불어 4개의 연관 구조영역 ("FRs")이 존재한다. VH 도메인은 통상적으로 3개의 HCDRs (중쇄 상보성 결정 영역)을 포함하고, VL 도메인은 통상적으로 3개의 LCDRs (경쇄 상보성 결정 영역)을 포함한다. 따라서, 결합원은, 서열상으로 VH CDR1 (또는 HCDR1), CDR2 (HCDR2) 및 CDR3 (HCDR3) 영역과 더불어 수많은 관련 구조영역을 포함하는 VH 도메인을 포함할 수 있다. 추가로, 또는 선택적으로 결합원은 VL CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인과 더불어 관련 구조영역을 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다. 상기 VH 또는 VL 도메인은 통상적으로 3개의 상보성 결정 영역이 사이 사이에 배치된 4개의 구조영역, FR1, FR2, FR3 및 FR4를 포함하는데, 그 결과 다음의 배치를 갖게 된다: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

- [0169] 도 5는 본 발명에 따른 항-NGF 항체의 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열을 보여준다. CDR1, CDR2 및 CDR3 영역은 밑줄로 나타내었다. 또한 도 6는 본 발명에 따른 항-NGF 항체의 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열을 보여준다. CDR1, CDR2 및 CDR3 영역은 밑줄로 나타내었다.
- [0170] 도 5 및 도 6에서, 경쇄 가변 도메인의 잔기 (도 5) 및 중쇄 가변 도메인의 잔기 (도 6)은 관용적으로 카바트 등에 의하여 고안된 넘버링 시스템에 따라 번호 매겨진다 (Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H., Gottesman, K. and Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242, Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391). 카바트 넘버링 시스템은 항체의 중쇄 및 경쇄 가변영역 또는 그의 항원 결합 부분에서 다른 아미노산 잔기들보다 더욱 가변적인 (즉, 초가변적) 아미노산 잔기들을 번호 매기는 시스템을 말한다. 그러므로, 카바트 넘버링 시스템은 일반적으로 가변 도메인의 잔기 (대략 경쇄의 1~104 잔기 및 중쇄의 1~113)를 일컬을 때 사용된다. 이 넘버링 시스템은, 본 명세서에서만 사용된다. 이것은 카바트 잔기 지정이 본 발명에 나열되는 관련 서열들로 제공되는 본 발명의 중쇄 및 경쇄 가변영역의 아미노산 잔기의 선형 번호와 항상 직접적으로 대응되는 것은 아니기 때문이다. 특히, 실제의 선형 아미노산 서열은, 중쇄 또는 경쇄의 기본적인 가변 도메인 구조의 구조영역 또는 상보성 결정 영역 (CDR)이 될지 아닐지, 구조적 요소의 단축 또는 그 요소로의 삽입에 대응하는 엄격한 카바트 번호에 비하여 아미노산을 덜 또는 더 함유할 수 있다. 주어진 임의의 항체에 대한 잔기들의 정확한 카바트 번호는, 카바트 번호가 적용된 표준 서열과 상기 항체의 서열상 잔기들을 정렬시킴으로써 결정될 수 있다.
- [0171] 또한, 도 6는 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 보여준다. 이것은 SEQ ID NO:2로도 나타내었다. 도 6에서, 번호는 카바트 넘버링에 따른 아미노산 잔기 80, 80A, 80B, 및 80C로 표시되는 반면, SEQ ID NO:2에서 상기 번호는 순차적으로 계속 매겨져서, 잔기 80, 80A, 80B, 및 80C는 80, 81, 82 및 83로 순차적으로 매겨진다. 이것은 도 7에서 카바트 잔기 100, 100A, 100B, 100C, 100D, 100E 및 100F에 대하여도 마찬가지이다.
- [0172] 앞서 설명한 바와 같이, 항체 결합 단편은 Fab 단편, Fab' 단편 및 scFv (단일 사슬 가변 단편)을 포함하는 군으로부터, 또는 펩티도미메틱 (peptidomimetic), 2가 항체 절편 (diabody), 또는 관련 다가 유도체들로부터 선택될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0173] 특정 구체예에 있어서, 상기 항체 결합 단편은 Fab, 또는 F(ab')₂ 단편이고, 이는 헤테로테트라머 항체의 VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진다. 특정 구체예에 있어서, 상기 VL 도메인은 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열을 갖고, 상기 VH 도메인은 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열을 갖는다. 특정 구체예에 있어서, 상기 CL 및 CH1 도메인은 말의 면역글로불린의 CL 및 CH1 도메인, 특히 IgG2 (HC2) 또는 IgG6(HC6) 말 유래 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초한다.
- [0174] Fab, Fab' 및 F(ab')₂ 단편의 재조합 생산에 사용되는 방법은 이 기술 분야의 숙련자에게 잘 알려져 있고, PCT 국제특허공보 WO 92/22324에 기재된 것, 및 Sawai 등의 문헌 ["Direct Production of the Fab Fragment Derived From the Sperm Immobilizing Antibody Using Polymerase Chain Reaction and cDNA Expression Vectors", 1995, AJRI 34:26-34]에 기재된 것들을 포함한다. scFv (단일 사슬 Fv 단편)를 생산하는데 사용될 수 있는 방법의 예시는 Huston 등의 문헌 ["Protein Engineering of Single-Chain Fv Analogs and Fusion Proteins", *Methods in Enzymology*, vol. 203:46-88 (1991)]에 기재되어 있고, 그 내용은 참조로서 본 발명에 포함된다.
- [0175] 특정 구체예에 있어서, 항체 단편은 모리모토 방법에 따른 단백질 분해에 의하여 전장 항체로부터 유래될 수 있다 (Morimoto et al., "Single-step purification of F(ab')₂ fragments of mouse monoclonal antibodies (immunoglobulins G1) by hydrophobic interaction high performance liquid chromatography using TSKgel Phenyl-5PW" *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992)). 또한, 항체 단편은 숙주 세포로부터 직접 생산될 수 있다 (Carter et al., "High level Escherichia coli expression and production of a bivalent humanized antibody fragment" *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)).
- [0176] 말의 NGF에 결합 특이성을 갖고 말의 NGF 기능에 대하여 길항 작용을 하는 마화 모노클로날 항체를 제공하는 것 외에도, 본 발명은 SEQ ID NO:1로 정의되는 VL (경쇄 가변) 영역 및 SEQ ID NO:2로 정의되는 VH (중쇄 가변) 영역의 아미노산 서열에 기반하는 한 쌍의 결합 도메인을 포함하는 항체들 이외의 결합원에까지도 이른다. 특히, 본 발명은 본 발명 항체들의 마화 항체의 VL 또는 VH 영역 중 어느 하나에 기반하는 단일 결합 도메인에 이른다.
- [0177] 따라서, 본 발명의 또 다른 특정 구체예에 있어서, 본 발명의 인간화 항체로부터 유래하는 단일 결합 도메인을

포함하거나, 그것으로 이루어지거나 또는 필수적으로 그것으로 이루어지는 결합원이 제공된다. 특정 구체예에 있어서, 상기 단일 결합 도메인은 SEQ ID NO:2 또는 SEQ ID NO:4로 정의되는 VH (중쇄 가변 도메인)의 아미노산 서열로부터 유래한다. 이러한 결합 도메인은 말의 NGF에 대한 표적 제제로서 사용될 수 있다.

[0178] 특정 구체예에 있어서, 본 발명의 항체를 변형시키기 위하여 추가적인 조작 방법이 사용될 수 있는데, 예컨대 혈청 반감기, 보체 고정, Fc 수용체 결합 및/또는 항원 의존성 세포 독성을 변화시킬 수 있는 Fc 영역의 변형 등에 의할 수 있다. 또한, 특정 구체예에 있어서, 글리코실화 패턴을 변화시킨 항체 또는 항체 단편이 생산될 수 있다. 특정 구체예에 있어서, 본 발명의 항체는 그 항체가 글리코실화되는 정도를 증가시키거나 감소시키도록 변화된다. 폴리펩타이드의 글리코실화는 통상적으로 N-결합 또는 O-결합된다. N-결합은 아스파라긴 잔기의 측쇄에 탄수화물 모이어티의 부착을 의미한다. 트리펩타이드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 이, 여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산인데, 아스파라긴 측쇄에의 탄수화물 모이어티 효소적 부착의 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩타이드 내에 이들 트리펩타이드 서열 중 어느 하나의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 형성한다. O-결합 글리코실화는 당류 N-아세틸갈락토사민, 갈락토오스 또는 자일로오스 중 하나의 하이드록시아미노산에의 부착을 의미하는데, 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록시리신 역시 사용될 수 있지만 가장 흔하게는 세린 또는 트레오닌에의 부착을 의미한다. 본 발명의 발명자는 비글리코실화된 말의 불변 도메인을 제공하는데, 이들은 본 발명에서 SEQ ID NO:8 또는 SEQ ID NO:9로 정의된다.

[0179] 또 하나의 특정 구체예에 있어서, 본 발명의 상기 항-말 NGF 항체들은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 유도체와 항체를 반응시킴으로써 PEG화될 수 있다. 특정 구체예에 있어서, 상기 항체는 탈퓨코오스화되어, 그러므로 퓨코오스 잔기가 없다.

[0180] 특정 구체예에 있어서, 항체의 생물학적 특성의 변형은 (a) 치환되는 구역의 폴리펩타이드 백본의 구조, 예컨대 시트 또는 나선형 형태와 같은 구조에 영향을 미치거나, (b) 표적 위치에서 그 분자의 전하 또는 소수성에 영향을 미치거나, 또는 (c) 측쇄의 크기에 영향을 미치는 치환을 선택함으로써 달성될 수 있다. 아미노산들은 그들의 측쇄 성질의 유사성에 따라 그룹화될 수 있다 (A. L. Lehninger, in Biochemistry, 2nd Ed., 73-75, Worth Publishers, New York (1975)): (1) 비극성: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M); (2) 비전하 극성: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q); (3) 산성: Asp (D), Glu (E); (4) 염기성: Lys (K), Arg (R), His(H). 또는, 자연적으로 존재하는 잔기들은 일반적인 측쇄 성질에 근거하여 그룹으로 나눌 수 있다: (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) 산성: Asp, Glu; (4) 염기성: His, Lys, Arg; (5) 사슬 배향에 영향을 미치는 잔기들: Gly, Pro; (6) 방향성: Trp, Tyr, Phe. 비보존적 치환은 이들 부류들 중 하나의 어떤 구성원을 다른 부류로 교환하는 것을 수반할 것이다. 이러한 치환 잔기들은 보존적 치환 위치 또는 나머지 (예컨대, 비보존되는) 위치로도 도입될 수 있다.

[0181] 다양한 다른 측면에 있어서, 본 발명은, 파트너 분자와 연결된 본 발명의 항-말 NGF 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 포함하는 면역결합제에 이른다. 특정 구체예에 있어서, 이러한 항체-파트너 분자 컨주게이트는 화학적 링커, 예컨대 펩티딜 링커, 하이드라진 링커 또는 이황화 링커의 수단으로 컨주게이션된다. 특정 구체예에 있어서, 커플링 파트너는 이펙터 분자, 표지, 약물 또는 캐리어 분자이다. 본 발명의 항체들을 펩티딜 및 비펩티딜 커플링 파트너들과 커플링시키기 위한 적절한 방법들은 이 기술 분야의 숙련자에게 잘 알려져 있을 것이다. 적절한 표지의 예시로는 검출가능한 표지, 예컨대 방사능표지, 또는 효소적 표지, 예컨대 호울스 래디쉬 퍼옥시다아제, 또는 화학적 모이어티, 예컨대 비오틴을 들 수 있다. 또는, 상기 표지는 기능적 표지, 예컨대, 리신 (ricin) 또는 항체 결합 부위에서 전구약물이 활성 약물로 변환될 수 있는 전구약물일 수 있다.

[0182] 다양한 다른 측면에 있어서, 본 발명은 본 발명의 마화 항체, 항체 단편들 및 결합원을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 및 특히 단리된 폴리뉴클레오타이드에 이른다. 본 발명에 정의된 바와 같이, "폴리뉴클레오타이드"는 폴리리보뉴클레오타이드 또는 폴리디옥시리보뉴클레오타이드를 포함하며, 이는 비변형 RNA 또는 DNA, 또는 변형 RNA 또는 DNA, 단일 가닥 및 이중 가닥 RNA, 및 단일 가닥 및 이중 가닥 영역의 혼합물인 RNA를 제한없이 포함한다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 본 발명의 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 그들의 대립형질 변이체 및/또는 중간 정도 또는 높은 스트린젠시 조건하에서 이러한 뉴클레오타이드 서열에 혼성화하는 폴리뉴클레오타이드 등 그들의 상보물 (complements)을 포함한다.

[0183] 또한, 본 발명은 항체 모방체 (antibody mimetics)에까지 이르는데, 예컨대 본 발명의 말 NGF 항체에 기반한 도메인 항체, 나노바디, 유니바디, 베르사바디 및 듀오칼린 (duocalins) 등이다. 매우 다양한 항체 모방체 기술이 이 기술 분야의 숙련자에게 알려져 있다. 예컨대, 소위 도메인 항체 (Domantis, UK)는 인간 항체의 경쇄 또는

중쇄 둘 중 하나의 가변영역에 해당하는, 항체의 기능성 결합 소유닛이다. 이러한 도메인 항체의 생산에 관한 설명은 미국 특허 제6,291,158호, 미국 특허 제6,582,915호 및 미국 특허 제6,593,081호에서 찾을 수 있다. 나노바디는 카멜리드 (camelids)에서 발견되는 자연적으로 존재하는 중쇄 항체의 고유 구조적 기능적 특성을 함유하는 항체 유래 치료 단백질이다. 유니바디는 IgG4 항체의 힌지 영역을 제외하는 것에 기반하는 또 하나의 항체 단편 기술이다. 힌지 영역의 결실은 대략 전통적인 IgG4 항체의 절반 크기이며 1개의 결합 영역을 갖는 분자를 야기한다. 유니바디는 불활성인 IgG4 항체의 특성을 보존하고 있으므로, 면역 반응을 유도하지 않는다.

[0184] 또 다른 결합 분자로써는 애프바디 (affibody) 분자 (미국 특허 제5,831,012호), 다르핀 (DARPin, 안키린 반복 설계된 단백질)(PCT 국제공개공보 WO 02/20565) 및 안티칼린 (anticalins)(미국 특허 제7,250,297호 및 WO 99/16873)을 들 수 있다. 베르사바디 역시 항체 모방체 기술이다. 베르사바디 (Amunix, 미국 공개공보 2007/0191272)는 마이크로단백질이라고 불리며, 시스테인 잔기가 15%를 초과하는 3~5 kDa의 작은 단백질로, 단백질이 통상적으로 나타내는 소수성 코어를 대신하는 이황화 결합의 밀도가 높은 스캐폴드를 형성한다.

[0185] 아비머 (avimers)는 또 다른 유형의 항체 모방체이다. 아비머는 인간의 혈청 단백질 패밀리의 재조합에서 기원한다. 이들은 모듈 결합 도메인으로 구성된 단일 단백질 사슬로서, 각각의 모듈 결합 도메인은 특정 표적 위치에 결합하도록 설계된다. 아비머는 하나의 단백질 표적 상의 위치 및/또는 다수의 단백질 표적 상의 위치에 동시에 결합할 수 있다. 다지점 부착 또는 결합 활성으로 알려진, 이러한 결합 메커니즘은 세포와 분자가 체내에서 상호작용하는 방식을 모방하고, 길항제 및 작용제의 생성을 뒷받침하며, 그 결과 다수의 기능과 강력한 활성을 갖는 약물이라는 결과를 낳는다. 아비머 라이브러리는 본 발명에 참조로서 포함된 WO 2004/044011 및, 예컨대 US 2005/0053973에 따라 생성될 수 있다. 아비머 라이브러리는 Avidia Inc, Mountain View, California, USA로부터도 시판, 구독이 가능하다.

[0186] 항체 생산

[0187] 본 발명의 항체 및 결합원은 전적으로 또는 부분적으로 화학적 합성에 의하여 생산될 수 있다. 예컨대, 상기 본 발명의 항체 및 결합원들은 이 기술 분야의 숙련자에게 잘 알려져 있는 방법들, 예컨대 표준 액체 펩타이드 합성 또는 고상 펩타이드 합성 방법에 의하여 제조될 수 있다. 또는, 상기 항체 및 결합원들은 액상 펩타이드 합성 기법을 이용하여 용액 중에서 제조되거나, 또는 고상, 액상 및 용액 화학의 조합에 의하여 제조될 수도 있다.

[0188] 또한, 본 발명은 적절한 발현 시스템으로 본 발명의 항체인 하나 이상의 아미노산을 인코딩하는 핵산 발현에 의하여, 그로써 목적하는 펩타이드 또는 폴리펩타이드가 인코딩될 수 있는 본 발명의 항체 또는 결합원들의 생산에까지 이른다. 예컨대, 아미노산 경쇄를 인코딩하는 핵산 및 아미노산 중쇄를 인코딩하는 제2 핵산은 발현되어 본 발명의 항체를 제공할 수 있다.

[0189] 따라서, 본 발명의 또 다른 특정 측면에 있어서, 본 발명의 항체 또는 결합원들을 형성하는 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산이 제공된다.

[0190] 통상적으로, 본 발명의 항체 또는 결합원을 형성하는 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산은 단리되거나 정제된 형태로 제공되거나, 또는 하나 이상의 조절 서열을 제외하고는 자연적으로 그와 관련되어 있을 수 있는 물질을 실질적으로 포함하지 않는 형태로 제공된다. 본 발명의 항체 또는 결합원을 발현하는 핵산은 전적으로 또는 부분적으로 합성된 것일 수 있고, DNA, cDNA 및 RNA를 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0191] 본 발명의 항체 또는 결합원들을 인코딩하는 핵산 서열은, 이 기술 분야의 숙련자에게 잘 알려진 기법들, 예컨대 문헌 [Sambrook et al. "Molecular Cloning", A laboratory manual, cold Spring Harbor Laboratory Press, Volumes 1-3, 2001 (ISBN-0879695773)], 및 문헌 [Ausubel et al. Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, 4th Edition, 1999 (ISBN - 0471250929)]에 기술된 기법들을 이용하여 숙련자에게 의하여 쉽게 제조될 수 있다. 상기 기법들은 (i) 핵산 시료를 증폭하기 위한 중합 효소 연쇄 반응 (PCR)의 이용, (ii) 화학적 합성, 또는 (iii) cDNA 서열의 제조 등을 포함한다. 본 발명의 항체 또는 결합원들을 인코딩하는 DNA는, 예컨대 DNA 인코딩시키고, 발현될 부분 양 옆의 적절한 제한 효소 인식 부위를 동정하고, DNA로부터 상기 부분을 잘라내는 등 이 기술 분야의 숙련자에게 알려진 임의의 적절한 방식으로 생성 및 사용될 수 있다. 잘려진 부분은 그 후 적절한 프로모터와 작동적으로 연결, 적절한 발현 시스템, 예컨대 시판 발현 시스템으로 발현될 수 있다. 또는, 관련 DNA 부분은 적절한 PCR 프라이머를 이용하여 증폭될 수 있다. DNA 서열에 대한 변형은 위치 지정 돌연변이법 (site directed mutagenesis)을 이용하여 이루어질 수 있다.

[0192] 본 발명의 항체 또는 결합원들을 인코딩하는 핵산 서열은 진술한 핵산 하나 이상을 포함하는 플라스미드, 벡터,

전사 또는 발현 카세트의 형태로 컨스트럭트로서 제공될 수 있다. 상기 컨스트럭트는 상기 컨스트럭트를 하나 이상 포함하는 재조합 숙주 세포 내에 포함될 수 있다. 편리하게는, 발현은 적당한 조건하에서, 적절한 핵산 서열을 함유한 재조합 숙주 세포를 배양함으로써 달성될 수 있다. 발현 이후, 항체 또는 항체 단편들은 임의의 적절한 기법을 이용하여 분리 및/또는 정제된 후, 적절히 사용될 수 있다.

[0193] 여러 다양한 숙주 세포에서 폴리펩타이드를 클로닝 및 발현하기 위한 시스템이 잘 알려져 있다. 적절한 숙주 세포로는 박테리아, 포유동물 세포, 효모, 곤충 및 배콜로바이러스 시스템을 들 수 있다. 이 기술 분야에서 이형접합 폴리펩타이드의 발현을 위하여 이용가능한 포유동물 세포주로는 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포, HeLa 세포, 베이비 햄스터 신장 세포 및 NSO 마우스 골수종 세포를 들 수 있다. 혼한, 양호한 박테리아 숙주는 이. 콜라이이다. 이. 콜라이와 같은 원핵 세포에서의 항체 및 항체 단편의 발현은 이 기술 분야에 잘 구축되어 있다. 진핵 세포에서의 배양 발현 역시 결합원 생산의 한 가지 선택지로서 이 기술 분야의 숙련자에게 이용 가능하다.

[0194] 예컨대, 문헌 [Kohler and Milstein (1975) Nature 256: 495-497]; 미국특허 제4,376,110호; 문헌 [Harlow and Lane, Antibodies: a Laboratory Manual, (1988) Cold Spring Harbor]에 기재된 방법들로 항체를 생산하는 일반적인 기술들이 이 기술 분야의 숙련자에게 잘 알려져 있다. 상기 참고 문헌들과, 예컨대 유럽특허 제 0,368,684호에는 재조합 항체 분자들의 제조 기술이 기술되어 있다.

[0195] 본 발명의 특정 구체예에 있어서, 항체 또는 결합원들의 중쇄 가변 도메인 및/또는 경쇄 가변 도메인을 코딩하는 삽입체 (insert)를 포함하는 재조합 핵산이 사용된다. 정의에 의하면, 이러한 핵산은 인코딩 단일 가닥 핵산, 상기 코딩 핵산과 그에 상보적인 핵산으로 이루어지는 이중 가닥 핵산, 또는 이들 상보적 (단일 가닥) 핵산 그들 자체를 포함한다.

[0196] 또한, 항체들의 중쇄 가변 도메인 및/또는 경쇄 가변 도메인을 인코딩하는 핵산은 자연적으로 존재하는 중쇄 가변 도메인 및/또는 경쇄 가변 도메인을 코딩하는 진정 서열 또는 그들의 돌연변이를 갖는 효소적으로 합성되거나 화학적으로 합성된 핵산일 수 있다.

[0197] 본 발명의 항체는 직접적인 방법이 아닌, 재조합 방법에 의하여 이형접합 폴리펩타이드를 갖는 융합 폴리펩타이드로서 생산될 수 있는데, 이형접합 폴리펩타이드는 종기로는 신호 서열 또는 성숙된 단백질 또는 폴리펩타이드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩타이드이다. 선택되는 이형접합 신호 서열은 종기로는 숙주 세포에 의하여 인식되고 가공되는 (즉, 신호 펩티다아제에 의한 분해) 것이다. 본래의 항체 신호 서열을 인식 및 가공하지 못하는 원핵 숙주 세포에 대하여는, 상기 신호 서열은 예컨대 알칼리 인산가수분해효소, 페니실리나아제, lpp 또는 열-안정 엔테로톡신 II 리더로 이루어지는 군으로부터 선택되는 진핵 세포 신호 서열에 의하여 치환된다.

[0198] 본 발명의 마화 항체, 또는 그들로부터 유래되는 결합원 또는 이들을 인코딩하는 폴리펩타이드에 관하여 사용되는 경우 "단리된"이라는 용어는 그 상태에서 상기 항체, 결합원들 또는 핵산 (폴리뉴클레오티드)이 단리된 및/또는 정제된 형태로 제공되는 상태를 말하고, 즉 그들이 그들의 자연적 조건으로부터 분리, 분리 또는 정제되었고 실질적으로 순수하거나 균질한 형태로 제공되거나, 또는 핵산의 경우, 필요로 되는 기능을 가진 폴리펩타이드를 인코딩하는 서열을 제외한 제공원의 핵산 또는 유전자가 없는 또는 실질적으로 없는 핵산을 말한다. 따라서, 이러한 단리된 항체, 결합원 및 단리된 핵산은 그들이 자연적으로 관련되어 있는 물질, 예컨대 그들의 자연 조건에서, 또는 그 제조가 시험관 내 또는 생체 내에서 실시되는 재조합 DNA 기술인 경우 그들이 제조되는 조건 (예컨대, 세포 배양)에서 함께 발견되는 다른 폴리펩타이드 또는 핵산을 함유하지 않거나 실질적으로 함유하지 않을 것이다.

[0199] 항체, 결합원 및 핵산은 회석제 또는 아췌반트와 함께 제제화될 수 있고, 또한, 실시 목적을 위하여 단리된 형태로 제공되는 것으로 고려될 수 있다. 예컨대, 상기 항체 및 결합원들은 면역분석에 사용하기 위한 마이크로타이터 플레이트를 피복하는 데 사용된다면 젤라틴 또는 기타 캐리어와 함께 혼합되거나, 진단 또는 치료요법에 사용되는 경우 약학적으로 허용가능한 캐리어나 회석제와 함께 혼합될 것이다. 상기 항체 또는 결합원들은 자연적으로 또는 이형접합 진핵 세포 시스템 (예컨대, CHO 또는 NSO 세포)에 의하여 글리코실화될 수 있고, 또는 이들은 (예컨대, 원핵 세포에서 발현에 의하여 생산된다면) 비글리코실화(aglycosylated)될 수 있다.

[0200] 항-말 NGF 마화 항체 분자를 포함하는 이종혼합 (heterogeneous) 제제 역시 본 발명의 일부를 형성한다. 예컨대, 이러한 제제는 전장 중쇄 및 C-말단 리신을 결여하는 중쇄를 갖는, 다양한 정도로 글리코실화 및/또는 유도 아미노산을 갖는, 예컨대 N-말단 글루탐산의 고리화로 피로글루탐산 잔기를 형성한, 항체들의 혼합물일 수

있다.

[0201] 약학적 조성물

[0202] 통상적으로 본 발명의 약학적 조성물은 액체 제형, 동결건조 제형, 액체로 재구성되는 동결건조 제형, 또는 에어로졸 제형으로 제형화된다. 특정 구체예에 있어서, 상기 제형의 항체는: 약 0.5 mg/ml 내지 약 250 mg/ml, 약 0.5 mg/ml 내지 약 45 mg/ml, 약 0.5 mg/ml 내지 약 100 mg/ml, 약 100 mg/ml 내지 약 200 mg/ml, 또는 약 50 mg/ml 내지 약 250 mg/ml의 농도이다.

[0203] 특정 구체예에 있어서, 상기 제형은 또한 완충액을 포함한다. 통상적으로 상기 제형의 pH는 약 pH 5.5 내지 약 pH 6.5이다. 특정 구체예에 있어서, 상기 완충액은 약 4 mM 내지 약 60 mM 히스티딘 완충액, 약 5 mM 내지 약 25 mM 숙시네이트 완충액, 또는 약 5 mM 내지 25 mM 아세테이트 완충액을 포함할 수 있다. 특정 구체예에 있어서, 상기 완충액은 약 10mM 내지 300mM 농도의, 통상적으로 약 125mM 농도의 염화나트륨을 포함하고, 약 5mM 내지 50mM 농도의, 통상적으로 25mM 농도의 시트르산나트륨을 포함한다. 특정 구체예에 있어서, 상기 제형은 약 0% 내지 약 0.2%를 초과하는 농도의 계면활성제를 더 포함할 수 있다. 특정 구체예에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리소르베이트-20, 폴리소르베이트-40, 폴리소르베이트-60, 폴리소르베이트-65, 폴리소르베이트-80, 폴리소르베이트-85, 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되지만 이에 한정되는 것은 아니다. 양호한 구체예에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리소르베이트-20이고, 약 125 mM 농도의 염화나트륨과 약 25 mM 농도의 시트르산나트륨을 더 포함할 수 있다.

[0204] 투여

[0205] 본 발명의 항체 또는 결합원은 단독으로 투여될 수 있으나, 목적하는 투여 경로에 따라 선택되는 약학적으로 허용가능한 적절한 첨가제, 희석제 또는 캐리어를 일반적으로 포함할 약학적 조성물로서 투여되는 것이 좋을 것이다. 적절한 약학적 캐리어의 예시로는; 물, 글리세롤, 에탄올 등등을 들 수 있다.

[0206] 본 발명의 모노클로날 항체 또는 결합원은 임의의 적절한 경로를 통하여 치료를 필요로 하는 말 환자에게 투여될 수 있다. 통상적으로, 상기 조성물은 주사 또는 투입에 의하여 비경구로 투여될 수 있다. 비경구 투여를 위한 양호한 경로의 예시로는 정맥 내, 심장 내, 동맥 내, 복강 내, 근육 내, 공동 내, 피하, 점막, 흡입 또는 경피 투여를 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 투여 경로는 또한, 국소적 투여 및 장 투여를 포함할 수 있으며, 예컨대 점막 (폐 포함), 구강, 비강, 직장 투여를 포함할 수 있다.

[0207] 상기 조성물이 주사가 가능한 조성물, 예컨대 정맥 내, 피내 또는 피하 적용과 같은 주사가 가능한 조성물인 경우 구체예에 있어서, 활성 성분은 피로겐-무함유이고 적절한 pH, 등장도 및 안정성을 갖는 비경구적으로 허용가능한 수용액의 형태일 수 있다. 이 기술 분야의 관련 기술들은, 예컨대 등장 비히클, 예컨대 염화나트륨 주사, Ringer 주사 또는 젖산화 Ringer 주사 등 적절한 용액을 잘 제조할 수 있다. 필요하다면 보존제, 안정화제, 완충액, 항산화제 및/또는 기타 첨가제가 포함될 수 있다.

[0208] 또한, 상기 조성물은 마이크로스피어, 리포솜, 기타 마이크로입자 전달 시스템 또는 혈액 등 특정 조직에 위치하는 지연 방출 제제를 통하여 투여될 수 있다.

[0209] 진술된 이 기술들 및 프로토콜 및 본 발명에 따라 사용될 수 있는 다른 기술들과 프로토콜의 예시는 그 전체가 본 발명에 참조로서 포함되는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, Gennaro, A.R., Lippincott Williams & Wilkins]; [20th edition ISBN 0-912734-04-3 and Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems]; [Ansel, H.C. et al. 7th Edition ISBN 0-683305-72-7]에서 찾을 수 있다.

[0210] 본 발명의 항체 및 조성물은 통상적으로 대상체에게 "치료적 유효량"으로 투여되는데, 이것은 그 조성물이 투여되는 대상체에게 유의함을 보여주는 충분량이다. 실제 투여량, 및 투여 속도 및 시간 코스는 치료될 질병의 성질 및 중증도, 및 치료 대상체의 연령, 성별 및 체중, 및 투여 경로에 의존적일 것이고, 이를 당연히 참조하여 결정될 수 있다. 또한, 예컨대 제제 중 항체 또는 결합원의 결합 활성 및 생체 내 혈장 수명, 농도 및 전달 경로, 위치 및 전달 속도 등 조성물의 성질도 당연한 고려의 대상이어야 한다.

[0211] 투여 방법 (dosage regimen)은 본 발명의 항체 또는 조성물의 1회 투여, 또는 상기 항체 또는 조성물의 다회 투여를 포함할 수 있다. 또한, 항체 또는 항체 함유 조성물은, 본 발명의 항체 또는 결합원이 치료를 위하여 투여되는 질병의 치료에 사용되는 다른 치료제 및 의약과 별개로 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

[0212] 대상체에게 투여될 수 있는 투여 방법의 예시로는 1 마이크로그램/kg/일 내지 10 mg/kg/일, 10 마이크로그램/kg/일 내지 1 mg/kg/일을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 특정 구체예에

있어서, 상기 투여량은 항체의 혈장 농도 1 마이크로그램/ml 내지 100 마이크로그램/ml이 얻어지는 것이다. 그러나, 투여되는 조성물의 실제 투여량 및 투여 속도 및 시간 코스는 치료되는 질병의 성질 및 중증도에 달려있을 것이다. 치료에 대한 처방, 예컨대 투여량 등에 대한 결정은 궁극적으로 수의학 종사자 및 기타 수의사들의 책임 및 재량 범위이고, 통상적으로 치료 대상인 질환, 개별적인 환자의 질병, 전달 부위, 투여 방법 및 종사자들에게 알려진 다른 인자들을 고려한다.

[0213] 정의

[0214] 달리 정의되지 않는 한, 본 발명에서 사용되는 모든 기술적 및 과학 용어는 본 발명의 기술 분야의 숙련자에 의하여 통상 이해되는 의미를 갖는다. 이 용어들의 의미 및 범위는 명확하여야 하나, 모호한 경우, 본 발명에서 제공되는 정의가 사전적 또는 외적 정의에 우선한다.

[0215] 명세서 전체에 걸쳐, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 용어 "포함하다 (comprise)" 또는 "포함하다 (include)" 또는 "포함한다" 또는 "포함하는"과 같은 변형은 서술된 정수 또는 정수들의 그룹을 포함하지만 기타 임의의 정수 또는 정수들의 그룹을 배제하는 것은 아닌 것으로 이해될 것이다.

[0216] 본 명세서에서 사용되는 바, "하나 (a, an)" 및 "그 (the)"와 같은 용어는 문맥상 명확히 달리 요구되지 않는 한 단수 및 복수의 지시 대상을 포함한다. 따라서, 예컨대 "활성 제제" 또는 "약학적으로 활성인 제제"라는 언급은 단일한 활성 제제 뿐 아니라 2 이상의 상이한 활성 제제의 조합을 포함하고, "캐리어"라는 언급은 2 이상의 캐리어의 혼합물 뿐 아니라 단일한 캐리어 등등을 포함한다. 또한, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수의 용어는 복수를 포함할 것이고, 복수의 용어는 단수를 포함할 것이다.

[0217] 본 발명에서 정의되는 바, "통증"이라는 용어는 실질적이거나 잠재적인 조직 손상과 관련된, 또는 이러한 손상의 측면에서 설명되는 불쾌한 감각 및 감정적 경험을 의미한다.

[0218] 수술 통증 또는 수술 후 통증과 관련하여, 미국 동물 복지법 (Animal Welfare Act 2002. AWA regulations, CFR, Title 9 (Animals and Animal Products), Chapter 1 (Animal and Plant Health Inspection Service, Department of Agriculture), Subchapter A (Animal Welfare), Parts 1-4)는 통증 과정을 그 과정이 가해지는 인간에게서 약간 이상의 또는 순간적인 통증 또는 고통, 즉, 주사 또는 기타 사소한 과정에 의하여 야기되는 것 이상의 고통을 야기할 것으로 합리적으로 예상되는 임의의 과정으로 정의한다. 그러므로, 말이 통증을 수반하는 외과 수술을 받는 경우라면, 그 동물은 수술 후 진통제를 투여 받아야 한다.

[0219] 또 다른 예에 있어서, 의학적 질병, 예컨대 관절염, 예컨대 다발성 관절염, 류마티스 관절염, 염증, 소양증, 골관절염, 또는 암 또는 악성 질환과 관련된 결과로 말은 심각한 또는 만성 통증을 경험할 수 있다.

[0220] "통각"이라는 용어는 유해 자극의 인식을 말한다. 본 발명에서 정의되는 바 "신경병증성 통증" (또한 '신경통'으로 알려짐)은 신경의 신호 문제로부터 발생하는 통증이다. 이것은 체성 감각 시스템에 영향을 미치는 장애 또는 질환의 결과로서 발생할 수 있다. 신경병증성 통증에는 원인이 있고, 이는 자연 발생적인 소위 감각장애 (dysesthesia)인 비정상적 감각과 관련된 것일 수 있다. 또는, 일반적으로는 통증을 야기하지 않을 터치 또는 자극으로 통증이 오거나 통증이 악화되는 경우 결과되는 이질통증과 연관된 것일 수 있다. 예컨대, 당신이 삼차 신경통이 있다면 얼굴에 약간의 터치가 통증을 촉발시키고, 또는 당신이 당뇨병성 신경병증을 갖는다면 침구의 압력이 통증을 촉발할 수 있다. 또한, 그 통증이 평소 통증을 야기하지 않을 터치 또는 자극으로 생기거나 악화되는 경우에는 신경병증 통증은 이질통증의 결과일 수 있다. 예컨대, 대상체가 삼차 신경통을 갖는다면 얼굴에의 약한 터치는 통증을 촉발시킬 수 있다. 통각 과민과 관련된 신경병증 통증은 통상 단지 약한 불편함만을 야기하는 자극 또는 터치로부터 심한 통증이 트여진다는 것을 의미하고, 감각이상은, 예컨대 핀 및 바늘통증을 야기하는 부위와 아무런 접촉이 없는 경우에도 불편하고 통증이 있는 느낌이 발생하는 것을 의미한다. 신경병증 통증의 다른 형태로는 소양증 또는 가려움을 포함하고, 이는 피부의 알레르기 반응 또는 염증 반응 및 조직 손상 및 복구 과정의 결과인 염증 통증과 관련될 수 있다.

[0221] 본 발명에서 정의되는 바, "NGF 무력화 항체" 또는 그 유사 용어는 NGF의 생물학적 활성화 및 신호를 무력화시킬 수 있는 항체를 말한다. 길항 항체, 또는 블로킹 항체라고도 말할 수 있는 무력화 항체는 특이적으로, 및 좋기로는 선택적으로 NGF에 결합하고 NGF의 하나 이상의 생물학적 활성을 억제한다. 예컨대, 상기 무력화 항체는 NGF의 그 표적 리간드, 예컨대 세포막에 결합된 TrkA 또는 p75 수용체 등으로의 결합을 억제할 수 있다.

[0222] 본 발명에서 사용되는 바, "생물학적 활성화"이라는 용어는 (생체 내에서 자연적으로 존재하는 것으로 발견되는, 또는 재조합 수단에 의하여 가능케 되거나 제공되는) 분자의 내재적 생물학적 성질 중 임의의 하나 이상의 것을 말한다. 생물학적 성질은 수용체 결합 및/또는 활성화; 세포 신호전달 또는 세포 증식의 유도, 세포 성장 억제,

사이토카인 생산 유도, 세포 사멸 유도, 및 효소 활성 유도 등을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0223] 본 발명에서 사용되는 바 "상보성 결정 영역 (CDR)"이라는 용어는, 카바트 등에 의하여 기술된 (Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H., Gottesman, K. and Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242), 본래 면역글로불린 결합 위치의 자연적 Fv 영역의 결합 친화도 및 특이성을 함께 정의하는 아미노산 서열을 말한다. 본 발명에서 사용되는 바 "구조영역 (FR)"이라는 용어는 CDRs 사이에 자리하는 아미노산 서열을 말한다. 항체 중 이들 부분은 CDRs를 적당한 배향으로 잡아주는 역할을 한다 (CDRs로 하여금 항원과 결합할 수 있도록 함).
- [0224] 본 발명에서 사용되는 바 "불변영역 (CR)"이라는 용어는 이펙터 기능을 부여하는 항체 분자의 부분을 말한다. 본 발명에서, 불변영역은 통상적으로 말의 불변영역을 의미, 즉, 대상 마화 항체의 불변영역이 말의 면역글로불린으로부터 유래한다는 것을 의미한다. 중쇄 불변영역은 말의 중쇄 아이소타입으로부터 선택될 수 있다.
- [0225] 본 발명에서 사용되는 바 "키메라 항체"라는 용어는 통상적으로 서로 다른 종의 것인 2개의 서로 다른 항체로부터 유래하는 서열을 함유하는 항체를 의미한다. 가장 통상적인 키메라 항체는 표적 에피토프에 특이적으로 결합하는 공여자로부터 유래하는 가변 도메인과, 상기 항체가 투여될 표적 종으로부터 얻어지는 항체로부터 유래하는 불변 도메인을 포함한다.
- [0226] 본 발명에서 사용되는 바 "면역원성"이라는 용어는 수용자에게 투여되는 경우 면역 반응 (체액성 또는 세포성 반응)을 이끌어내는 표적 단백질 또는 치료 모이어터 능력의 척도를 말한다. 본 발명은 대상 마화 항체의 면역원성에 관한 것이다. 본 발명의 상기 항체는 종기로는 어떠한 면역원성도 없는데, 즉, 말에게 투여되었을 때 그들에 대하여 어떠한 무력화 항체도 발생되지 않고, 또한 그 항체의 Fc 영역에 의하여 매개되는 어떠한 이펙터 기능도 없다는 것이다.
- [0227] 본 발명에서 사용되는 바 "동일성/상동성" 또는 "서열 동일성/서열 상동성"이라는 용어는 정렬된 서열 중 임의의 특정 아미노산 잔기 위치에 있어서 상기 정렬된 서열간 아미노산 잔기가 동일하다는 것을 의미한다. 본 발명에서 사용되는 바 "유사성" 또는 "서열 유사성"이라는 용어는 정렬된 서열 중 임의의 특정 위치에서, 상기 서열간 아미노산 잔기가 유사한 유형의 것이라는 것을 나타낸다. 예컨대, 유신은 이소류신 또는 발린 잔기를 치환할 수 있다. 이것을 보존적 치환이라고 부를 수 있다. 종기로는, 본 발명의 아미노산 서열이, 그에 함유된 임의의 아미노산 잔기가 보존적 치환 방식으로 변형되었을 때, 이러한 변화는 비변형 항체와 비교하는 경우 결과되는 항체의 결합 특이성 또는 기능적 활성에 어떠한 효과도 미치지 않는다.
- [0228] 본 발명의 (본래) 폴리펩타이드 및 그 기능적 유도체와 관련한 서열 상동성은 서열들을 정렬하고 겹을 도입한 후 대응하는 본래 폴리펩타이드의 잔기와 동일한, 필요하다면 최대의 상동성 백분율을 얻기 위하여 상기 서열 상동성의 일부분으로 어떠한 보존적 치환도 고려하지 않는, 후보 서열 중 아미노산 잔기의 백분율에 관한 것이다. N- 또는 C- 말단 연장이나 삽입 어떠한 것도 서열 상동성 (identity or homology)을 저감시키는 것으로 해석되지는 않을 것이다. 2 이상의 아미노산 서열 정렬을 수행하고 그들의 서열 상동성을 결정하기 위한 방법 및 컴퓨터 프로그램은 이 기술 분야의 숙련자에게 잘 알려져 있다. 예컨대 2 이상의 아미노산 서열의 상동성 또는 유사성 백분율은, 예컨대 BLAST (Altschul et al. 1990), FASTA (Pearson & Lipman 1988), 또는 Smith-Waterman 알고리즘 (Smith & Waterman 1981)을 이용하여 쉽게 계산될 수 있다.
- [0229] 본 발명에서 사용되는 바 제2 아미노산 잔기에 대하여 "가장 높은 상동성"을 갖는 아미노산 잔기는 제2 아미노산 잔기와 가장 공통되는 특징 또는 성질을 갖는 아미노산 잔기를 말한다. 아미노산 잔기가 제2 아미노산 잔기에 대하여 가장 높은 상동성을 갖는지를 결정하는 데 있어서, 평가는 통상적으로 전하, 극성, 소수성, 측쇄 질량 및 측쇄의 크기 등의 인자로 이루어질 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0230] 본 발명에서 사용되는 바 "대응하는 위치"라는 용어는 두 서열이 두 서열간 최대 서열 상동성을 갖도록 정렬될 때 제1 서열 중의 위치와 동일한 위치의 제 2 서열 중의 위치를 말하는 것으로 의도되는, 제1 서열 중의 특정 아미노산 잔기에 대응하는 위치의 제2 서열 중에 존재하는 아미노산 잔기를 말한다. 대응하는 위치의 아미노산 잔기들은 동일한 카바트 번호를 갖는다.
- [0231] 본 발명에서 사용되는 "본질적으로 ~로 이루어지다" 또는 "본질적으로 ~로 이루어지는"이라는 용어는 추가적인 특징 또는 요소가 말의 NGF에 결합 특이성을 갖는 항체 또는 항체 단편의 능력에 실질적으로 영향을 미치지 않는다면, 폴리펩타이드가 기술된 것을 넘어서 이러한 추가적인 특징 또는 요소를 가질 수 있음을 의미한다. 즉, 상기 폴리펩타이드를 포함하는 상기 항체 또는 항체 단편은 말의 NGF에 결합하고 말의 NGF 기능 활성에 길항 작용을 하는 항체 또는 항체 단편들의 능력을 간섭하지 않는 추가적인 특징 또는 요소를 가질 수 있다. 이러한 변

형은 항체의 면역원성을 감소시키기 위하여 아미노산 서열로 도입될 수 있다. 예컨대, 필수적으로 특정된 서열로 이루어지는 폴리펩타이드는 그 아미노산들이 말의 NGF에 대한 결합 및 그 생물학적 기능을 봉쇄하는 데 있어 상기 항체 또는 단편의 역할을 간섭, 억제, 차단 또는 중단시키지 않는다면, 상기 서열의 한쪽 말단 또는 양쪽 말단 모두에 하나, 둘, 셋, 넷, 다섯 또는 그 이상의 추가, 결실 또는 치환된 아미노산을 함유할 수 있다. 유사하게, 본 발명의 말 NGF 길항 항체로 기여하는 폴리펩타이드 분자는 그 기능기들이 말의 NGF에 결합하고 그 기능을 길항 작용하는 항체 또는 항체 단편의 능력을 간섭하지 않는다면 이러한 하나 이상의 기능기로 화학적 변형될 수 있다.

[0232] 본 발명에서 사용되는 "유효량" 또는 "치료적 유효량"이라는 용어는 p75 및/또는 TrkA 수용체로의 말 NGF 결합을 억제하는 데 요구되는 본 발명의 제제, 결합 화합물, 소분자, 융합 단백질 또는 펩티도미메틱의 양을 의미한다.

[0233] "폴리펩타이드", "펩타이드", 또는 "단백질"이라는 용어는 본 발명에서 인접 잔기들의 알파-아미노기와 카복시기 간 펩타이드 결합에 의하여 서로간에 연결된 일련의 선형 아미노산 잔기를 지명하기 위하여 상호 교환적으로 사용된다. 아미노산 잔기는 보통 천연 "L" 이성질형으로 존재한다. 그러나 "D" 이성질형 잔기들은 그 폴리펩타이드에 의하여 원하는 기능적 성질이 보유되는 한 임의의 L-아미노산 잔리를 치환할 수 있다.

[0234] 본 발명에서 정의되는 "항체"는, 면역글로불린 유전자 또는 면역글로불린 유전자들의 단편에 의하여 유전적으로 인코딩 가능하거나 재조합으로 제조될 수 있는 하나 이상의 폴리펩타이드를 갖는, 관심 대상 표적 항원에, 이 경우에는 말의 신경 성장 인자에 특이적으로 결합하는 항원-결합 단백질을 포함한다. "항체"라는 용어는 모노클로날 및 키메라 항체, 특히 마화 항체를 포함하고, 폴리클로날 항체 또는 임의의 부류 또는 서브타입의 항체들 역시 포함한다. "항체"는 혼성화 항체, 2특이적 항체, 헤테로항체 및 항원 결합을 보유하는 이들의 기능적 단편에까지 이른다.

[0235] "특이적으로 결합하는"이라는 구문은 이형혼합 집단의 단백질들 중에 존재하는 특정 단백질 또는 표적에 대한 항체의 결합을 말한다. 그러므로, 특정한 면역 분석 조건하에 존재하는 경우, 상기 항체들은 특정 단백질, 이 경우에는 말의 NGF에 결합하고, 그 시료 중에 존재하는 다른 단백질들에 대하여는 유의한 양으로 결합하지 않는다.

[0236] 본 발명에서 정의되는 "말/마(馬) (equine)"은 말(horse)이라고 칭할 수 있다. 말은 3항명 에쿠스 페루스 카발루스(Equus ferus caballus) 아종에 속하며, 이들은 유제류(발굽이 달린) 포유동물이다. 말이라는 용어는 에퀴데(Equidae)과 아종을 나타내고 이 분류에 속한 모든 종들을 포괄하며, 말에는 약 300여종의 품종이 있는 것으로 알려져 있다.

[0237] 본 발명은 설명의 목적으로 제공되고 본 발명을 제한하는 것으로 해석되지는 않는 하기 실시예들을 참조하여 설명될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0238] 도 1은 본 발명에 따라 생산된 마화 항체들의 쥐의 NGF 및 말의 NGF에 대한 결합을 보여주는 그래프이다.

도 2A 및 2B는 중쇄에 특이적인 항-말 폴리고날 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅에 의하여 밝혀진 본 발명의 마화 항체들의 단백질 A 정제를 보여주는 겔 (A), 및 SDS-PAGE를 사용한 마화 항체의 정제 결과 (B)를 보여주고 있다.

도 3는 마화 항체들에 의한, TF-1 세포의 NGF 유도 증식의 저해를 보여주는 그래프이다.

도 4는 항원 포획 마화 항체들에 의하여 유도된 보체 침적 결여를 보여주는 그래프이다.

도 5는 마화 항-NGF의 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열을 보여준다 (SEQ ID NO:1). 카바트 번호로 확인된 3개의 CDR 영역은 밑줄로 표시된다. 특정 잔기 위의 별표는 래트aD11 항-쥐 NGF 모노클로날 항체 간의 서열 차이를 나타낸다.

도 6는 마화 항-NGF의 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열을 보여준다 (SEQ ID NO:2). 카바트 번호로 확인된 3개의 CDR 영역은 밑줄로 표시된다. 특정 잔기 위의 별표는 마화 서열과 래트 알파D11 항-쥐 NGF 모노클로날 항체의 아미노산 서열 간의 서열 차이를 나타낸다.

도 7은 마화 항-NGF 경쇄 가변 도메인 말의 카파 경쇄 (eqN-kLC) 항체의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:4)을 보여준

다. 가변 도메인 잔기는 굵게 나타내었다.

도 8은 HC6 중쇄 불변 도메인을 갖는 마화 항-NGF 중쇄 가변 도메인 말의 IgG-2 중쇄 (eqN-HC2 (IgG2))의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:6)을 보여준다. 가변 도메인 잔기는 굵게 나타내었다.

도 9은 HC6 중쇄 불변 도메인을 갖는 마화 항-NGF 중쇄 가변 도메인 말의 IgG-6 중쇄 (eqN-HC6 (IgG2))의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:7)을 보여준다. 가변 도메인 잔기는 굵게 나타내었다.

도 10은 마화 항-NGF MAbs의 HC2 및 HC6 아이소타입 변이체들의 단백질 A 친화성 크로마토그래피 프로파일을 비교한 도면이다. 도 10A 및 10C는 타입 2 (HC2, 도 10A) 및 타입 6 (HC6, 도 10C) 항체의 CHO 형질감염 상등액 부하 후, UV 흡수도 (암회색 선) 및 전도성 프로파일 (연회색 선)을 도시한 도면이다. 도 10B 및 도 10D는 컬럼으로부터의 항체 회수율 (정량적 ELISA로 측정함)을 도시한 도면인데 실제로 모든 HC2 항체가 컬럼에 결합하였음과 특이적인 용리에 의해 회수된 반면 (도 10B), HC6 항체는 어느 것도 컬럼에 결합하지 않았음을 보여주는 것이다 (도 10D).

도 11은 본 발명의 방법에 해당하는 방법으로 제조된 항-건 NGF 모노클로날 항체가 개에 있어서 염증성 통증을 감소시켰음을 보여주는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0239] 실시예

[0240] 실시예 1 - 항체의 생산

[0241] SEQ ID NO:1 및 SEQ ID NO:2의 마화 경쇄 및 중쇄 가변 도메인들을 각각 C-말단 말 불변 중쇄 또는 불변 경쇄 도메인에 결합시킴으로써 전체 항체 서열을 만들었다. 마화 αD11 VH 도메인을 2개의 상이한 말 중쇄 불변 도메인들; HC2 (IgG2) 및 HC6 (IgG6)에 결합시키고 마화 αD11 VL 도메인을 말 캡과 경쇄 불변 도메인과 결합시켰다. 천연 전장 항체쇄 서열을 SEQ ID 4 (캡과 불변 도메인이 있는 경쇄) 및 6 (HC2 불변 도메인이 있는 중쇄)에 나타내었다.

[0242] 코돈의 적절한 선택 및 완전한 화학적 유전자 합성 그리고 포유동물 세포 발현 벡터 pcDNA3.1+ 내로의 클로닝에 의해, 상기 결합된 아미노산 서열들을 포유동물 세포에서 발현가능한 형태로 전환시켰다. 결과적인 cDNAs를 CHO 세포 내로 형질감염시키고 하기 실시예 2 내지 5에 상술된 바와 같이 상등액을 분석하였다.

[0243] 실시예 2 - 쥐 및 말 NGF에 대한 항체의 결합 측정

[0244] 마화 중쇄 및 경쇄 cDNA를 CHO 세포에 트랜스펙션하고, 상등액을 수집하고, 말의 NGF 또는 쥐의 NGF 둘 중 하나와 ELISA 포맷에서 반응시켰다. 반응 및 수세 단계 이후, 결합된 말 항체를 호올스래디쉬 퍼옥시다아제 (HRP)와 연결된 고트-항 말 IgG 특이적 폴리클로날 항체와 반응으로 검출하고 TMB를 이용하여 현상하였다. 결과 생성물의 광학 밀도를 450 nm에서 측정하고 비어있는 모크 (mock) 벡터 트랜스펙션된 상등액의 그것과 비교하였다 (도 1에서 "모크"로 나타냄).

[0245] 결과를 도 1의 그래프에 나타내었다. 마우스 NGF에 대한 결합을 HC2 (IgG2 불변 도메인) 마화 항체 (eqN-HC2+eqN-kLC-1라 명명됨)에 대해 나타내었다. 그래프의 두번째 부분에는, eqN-kLC-1 경쇄 및 eqN-HC2 (IgG2) 불변쇄를 포함하는 eqN-HC2+eqN-kLC-1 항체의 말 NGF에 대한 결합이 도시되어 있다.

[0246] 실시예 3 - 마화 항체의 정제

[0247] 실시예 2에서 얻은 상등액을 단백질 A 컬럼을 이용하여 정제, SDS-PAGE로 분리하고 항-말 IgG 폴리클로날 항체 HRP에 대한 반응성을 시험하였다. 중쇄 및 경쇄 탐지를 위해 쿠마씨 블루를 이용하여 SDS-PAGE 겔 역시도 염색하였다. 항-말 IgG 폴리클로날 항체 제제는 주로 말의 중쇄를 인식한다. 결과를 도 2A 및 B에 나타내었다.

[0248] 이들 결과는 항-말 폴리클로날 항체 HRP를 이용하여 현상시킨 웨스턴 블롯으로부터 알 수 있는 바와 같이, 단백질 A에 의해 타입 2 중쇄를 갖는 말 항-NGF가 정제된 것을 보여준다. 피크 분획을 쿠마씨 염색된 SDS-PAGE로 분석하였다. 쿠마씨 블루 염색된 겔 (도 2B)은 보체 항체 (MW 70) 뿐 아니라 중쇄 및 경쇄의 존재도 보여준다.

[0249] 실시예 4 - 마화 항체에 의한 TF-1 세포의 NGF 유도 증식 억제

[0250] 실시예 2로부터 CHO 세포 형질감염체 상등액의 시리즈 희석물 ("길항제")를 1.0 ng/mL NGF 존재 하에 TF-1 세포와 함께 인큐베이션시켰다. 결과적인 증식을 티미딘 결합에 의해 측정하였다.

- [0251] 결과를 도 3에 나타내었다. 계산된 3-8 ng/mL 모노클로날 항체 (MAb) (eqN-kLC-1 경쇄 및 eqN-HC2 (IgG2) 불변쇄를 포함하는 항체)에서 50% 억제에 관찰되었다.
- [0252] 실시예 5 - 항원 포획 마화 항체에 의하여 유도된 보체 침적
- [0253] 항체를 포획하기 위하여 실시예 2의 트랜스펙션된 단백질 A 정제된 세포 상층액을 0.1 ng/mL NGF로 코팅된 플레이트를 이용하여 반응시켰다. 상기 플레이트를 수세하고 0.1 ng/mL NGF로 코팅시켜 항체를 포획하였다. 플레이트를 수세한 후 인간 혈청과 반응시키고 결합된 보체 C1q를 항-인간 C1q 폴리클로날 항체 HRP와의 결합을 통하여 측정하고 전술한 대로 현상하였다. 항원-포획된 "eqN-HC2 + eqN-kLC-1"에 대한 C1q의 결합을 양성 대조군으로서 인간 IgG1 Fc 도메인을 갖는 인간 항-NGF MAb 및 음성 대조군으로서 IgG4 변이체와 비교하였다.
- [0254] 보체 결합 방법
- [0255] 플레이트를 5 마이크로그램/mL의 마우스 NGF 100 마이크로리터/웰로 코팅하고 5% BSA/PBS로 블로킹하였다. 코팅된 웰을, PBS/1% BSA (100 마이크로리터/웰)로 희석된 재조합 마화 항-NGF IgG를 함유하는 세포 배양 상층액과 함께 실온에서 1 시간 반응시켰다. 플레이트를 수세하고 0.5 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 0.05% 트윈-20, 0.1% 젤라틴 및 0.5% BSA를 함유하는 베로날 완충액에서 1/100 희석된 인간 혈청 100 마이크로리터/웰과 반응시켰다. 수세 후, 플레이트를 PBS/1% BSA 중에서 1/800 희석된 쉐프 (sheep) 항-C1q-HRP (Serotec) 100 마이크로리터와 반응시켰다. 수세 후, 100 마이크로리터의 TMB 기질 (Thermo Scientific)을 첨가함으로써 플레이트를 현상하였다. 100 마이크로리터의 2N H₂SO₄ 을 첨가하여 현상을 중지하고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0256] 그 결과를 도 4의 그래프로 나타내었다. 이들 결과는 놀랍게도 C1q가 마화 HC2 항체 (eqN-kLC-1 경쇄 및 eqN-HC2 중쇄를 포함하는 항체 (IgG2 불변 도메인 중쇄))에 결합하지 않는다는 것을 보여준다. 따라서, 이 결과는 중쇄 불변 도메인 타입 HC2 (말 IgG2 유래 불변 도메인)를 갖는 마화 항체가 NGF를 길항하는데 적합할 것임을 시사하는 것인데, 이는 NGF가 가용성 매개자이기 때문이다.
- [0257] 따라서, 본 발명에서는 상당히 놀랍게도, 본 발명의 항체가 HC2 (IgG2 말 중쇄 불변 도메인 서브타입)의 말 유래 중쇄를 갖는 경우, 말의 NGF에 대한 그 항체의 결합은 보체 활성화 또는 기타 하류 이펙터 기능, 예컨대 ADCC를 불러일으키지 않는다는 것을 입증하였다. 그러므로, 말 NGF의 막 결합 TrkA 또는 p75 수용체에 대한 결합을 막음으로써 말 NGF의 생물학적 기능적 활성을 길항 작용하는 데 있어서, 상기 항체는 그와 관련된 하류 세포 내 신호 전달 캐스케이드를 억제한다. 또한, NGF 발현은 자주 신경 등등에 근접하여 나타나므로, 말 유래 HC2(IgG2) 서브타입 중쇄를 갖는 본 발명의 상기 길항 또는 무력화 항체는 광범위한 면역 반응을 이끌어 내지 않아 말의 NGF 생물학적 활성을 방해할 수 있다. 이러한 기능적 특성은 예측된 것은 아니지만 매우 바람직한 것이다.
- [0258] 실시예 6 - 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 이용한 말 IgG 아이소타입 HC6이 아닌 말 IgG 아이소타입 HC2의 우선적 정제
- [0259] 마화 αD11의 HC2 및 HC6 변이체들의 형질감염체로부터 얻은 CHO 세포 상층액을 단백질 A 친화성 컬럼 (도 2에 따름)에 적재하고 항체를 함유하는 분획들을 ELISA를 이용하여 NGF에 대한 결합에 의해 정량하였다. 도 10으로부터 알 수 있는 바와 같이, HC6이 아닌 HC2 아이소타입이 단백질 A 크로마토그래피로부터 회수되었다. 이들 데이터는 단백질 A 크로마토그래피가 말 항-NGF 면역글로불린의 아이소타입 HC2 (HC6는 아님)을 정제하는데 유용한 도구가 될 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0260] 실시예 7 - 항-말 NGF 모노클로날 항체- 안전성 및 발열성
- [0261] 본 발명의 항-말 NGF 모노클로날 항체를 CHO 세포에서 발현시키고 단백질 A 크로마토그래피 및/또는 크기 배제 크로마토그래피의 조합에 의해 정제하여 인산염 완충 염수로 완충액 교환시켰다. 항체들을 말에게 0.01 - 10 mg/kg 체중의 양으로 정맥 주사하고 수의사가 육안 검사로 독성 징후, 체중 변화, 체온 및 혈장 생화학 등에 관하여 평가하였다. 이들 또는 어떠한 혈장 화학 피검물에서도 변화가 관찰될 것으로 예상되지 않는다.
- [0262] 실시예 8 - 생체 내에서의 항-말 NGF 모노클로날 항체의 혈장 약리학 - 혈청 반감기 및 면역원성
- [0263] 본 발명의 항-말 NGF 모노클로날 항체를 CHO 세포에서 발현시키고 단백질 A 크로마토그래피 및/또는 크기 배제 크로마토그래피의 조합에 의해 정제한 다음 인산염 완충 염수로 완충액 교환한다. 항체들을 말에게 0.01 - 10 mg/kg 체중의 양으로 정맥 주사하고 다음 2주일에 걸쳐 혈장 샘플을 여러 시점에서 채취하였다. 표적으로서 NGF를 그리고 항-말-폴리클로날 항체-호스래디쉬 퍼옥시다제 제2 시약을 이용하여 ELISA에 의해, 항-말 NGF 항체

농도에 대해 희석된 혈장 샘플을 검사하였다. 측정된 혈장 농도는 2-기 약력학, 즉 수일 간의 조직 분포기(알파) 및 제거기(베타)와 일치하였다.

[0264] 100 내지 300 시간 사이에 항-말 NGF 항체의 혈장 농도의 급격한 하락은 없을 것으로 예상된다. 이것은 말 혈액에서 재조합 항-NGF 모노클로날 항체 에 대한 기존의 무력화 항체도 존재하지 않고 주입 후에 생성되는 그러한 무력화 항체도 존재하지 않음을 입증하는 것이다.

[0265] 실시예 9 - 항-말 NGF 모노클로날 항체는 생체내에서 골관절염으로 인한 염증성 통증을 감소시킨다.

[0266] 골관절염 말들의 그룹에게 정맥 또는 동맥 주사에 의해 본 발명의 항-말 NGF 모노클로날 항체를 0.01 - 10 mg/kg 체중의 양으로, 또는 비히클 대조군으로서 인산염 완충 염수를 투여하였다 (제 0일). 4-14일에 걸쳐 말들의 다리 저는 정도를 육안 채점법으로 검사하였다 (예컨대 0점, 다리 절지 없음 (완전한 체중 지탱); 1점, 약간 절음 (체중을 완전히 지탱하지는 못하지만 잘 걸어다님); 2점, 보통 정도로 다리를 절음 (체중을 약간만 지탱하고 잘 걷지 못함), 3점, 심하게 다리를 절음 (체중을 지탱하지 못함). 어떤 말에게 어떤 주사를 놓았는지를 관찰자에게 알리지 않는 맹검 방식으로 채점하였다.

[0267] 비히클 대조군에 비해 항-말 NGF 모노클로날 항체가 투여된 말에 있어서 투여 후 시간이 지남에 따라 다리절음 점수가 저하될 것으로 예상되며, 이는 항-말 NGF 모노클로날 항체가 비히클 단독으로 관찰되는 것보다 말의 통증을 감소시키는데 더 효과적인 것임을 가리키는 것이다.

[0268] 실시예 10 - 생체내 염증성 통증을 감소하는데 있어서 항-건 NGF 모노클로날 항체의 효과를 나타내는 비교예

[0269] 항체 치료법:

[0270] 본 발명의 항체 제조 방법을 개에 사용하기에 적합한 건화 항체를 제조하는데 적용하였다. 건화 αD11 VL 도메인을 개의 갑과 경쇄 불변 도메인과 조합시키고 건화 αD11 VH 도메인을 개의 중쇄 아이소타입과 조합시켰다. 중쇄 및 경쇄를 발현 벡터로부터 유래한 항-건 NGF 모노클로날 항체들을 CHO 세포에서 발현시키고 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피의 조합에 의해 정제하고 인산염 완충 염수로 완충액 교환하였다.

[0271] 개의 염증 모델:

[0272] 모든 실험은 기관 윤리 위원회 (CRL, Ireland)의 사전 승인을 얻어 수행되었다. 대략 24 시간 후에 개시되고, 개를 일시적으로 절름발이가 되게 하는 자가-해소 염증을 생성하기 위하여 비글견의 한쪽 뒷다리 풋패드에 카울린을 주사하였다 (= -1 일). 이 모델에서, 카울린에 대한 초기의 염증 반응이 일단 약화되면, 대략 1~2 주의 시간에 걸쳐 개는 점차 덜 다리를 절게되고, 그 후 완전히 회복하게 된다.

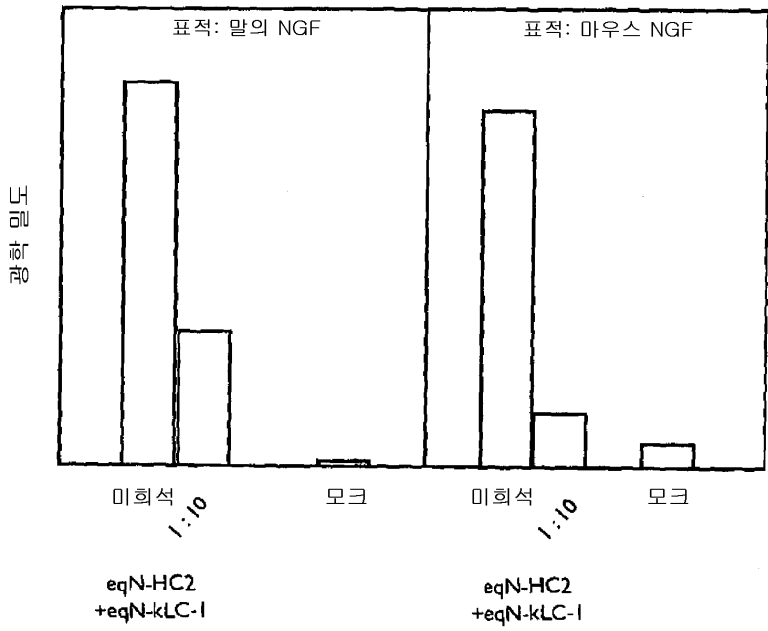
[0273] 3 마리 개로 이루어진 그룹들에 200 마이크로그램/체중 kg의 항-건 NGF 모노클로날 항체 또는 비히클 대조군으로서 인산 완충액 둘 중 하나를 정맥 내 주사하였다 (= 0 일). 육안 점수 방법으로, 7일에 걸쳐 개들의 다리 절음을 평가하였다 (점수 0, 절지 없음 (온전한 체중 지지); 점수 1, 약간 절음 (온전한 체중 지지는 아니나 잘 걸음); 점수 2, 중간 정도 절음 (약한 체중 지지 및 잘 걷지 못함), 점수 3, 심하게 절음 (체중 지지 못함)). 어떠한 개가 어떠한 주사를 맞았는지는 맹검 관찰되었다.

[0274] 그 결과를 도 11에 나타내었다. 비히클 대조군과 비교하여, 주사 3일 후에 항-NGF 모노클로날 항체를 투여받은 개들에서 다리 절음 점수가 감소하였고, 이는 상기 항-NGF 모노클로날 항체가 비히클만으로 나타나는 효과에 비하여 개의 통증을 저감시키는 효과가 있음을 나타내는 것이다. 지연된 활성은 대략 30 시간의 느린 조직 분산기(알파)를 보여주었던 항-건 NGF 모노클로날 항체의 혈장 약력학 및 비교적 좋지 않은 발바닥 부위의 혈관신생과 일치하는 것이다. 도 11에 나타낸 결과는 본 발명의 방법에 따른 방법에 의해 생산된 항-건 NGF 항체가 다리 절음에 있어서 결과적인 감소로 개의 염증성 통증을 감소시킨다는 것을 보여준다.

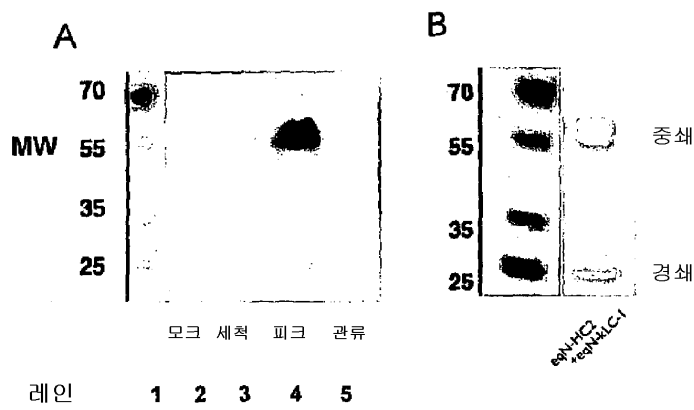
[0275] 본 명세서에 언급된 모든 문헌은 참조로서 본 발명에 포함된다. 본 발명의 범위를 벗어나지 않고 본 발명에 기재된 구체예들에 대한 다양한 변형 및 변경이 이 기술 분야의 숙련자에게 명백할 것이다. 구체적인 양호한 구체예와 관련하여 본 발명을 설명하였지만, 청구된 바 본 발명이 그러한 구체적인 구체예들로 부당하게 한정되어서는 아니됨이 이해되어야 한다. 실제로, 이 기술 분야의 숙련자에게 자명한 본 발명에 기재된 모드 수행에 대한 다양한 변형은 본 발명에 의하여 포함되는 것으로 의도된다.

도면

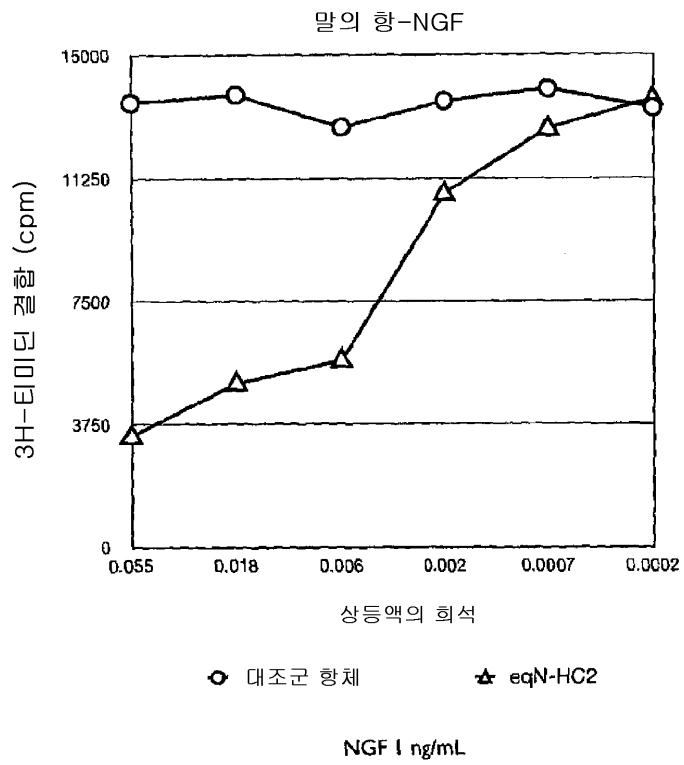
도면1



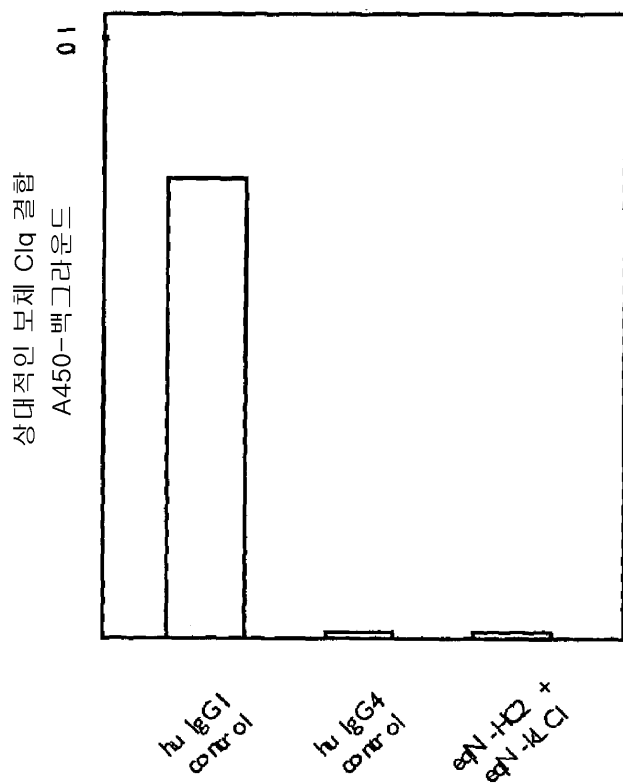
도면2



도면3



도면4



도면5

* * * * *
 DIVMTQSPASLSASLGETVTIECRASEDIYNALAWYQQKP
 ** * * *
 GQSPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSGTDYSLTINSLQS
 * * * *
 EDVASYFCQHYFHYPRTFGQGTKLELK

경쇄 가변 도메인

도면6

* * * * *
 QVQLKESGPGLVNPSQTLSTCTVSGFSLTNNNVNWVRQA40
 * * * * *
 PGKGLEWVGGVWAGGATDYNALSRATITRDTSKSQVFL80
 * * *
 QMNSLTSEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGILVTVSS

중쇄 가변 도메인

도면7

DIVMTQSPASLSASLGETVTIECRASEDIYNALAWYQQKPGQS
 PKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSGTDYSLTINSLQSE
 EDVASYFCQHYFHYPRTFGQGTKLELKRDDAKPSAFIFPPSSEELSSGSA
 SVVCLVYGFPYSGATINWKVDGLAKTSSFHSSLTEQDSKDNNTYS
 LSSTLTLPKADYEAHNVYACEVSHKTLSSPLVKSFKRQDC

마화 항-NGF VL 캄파 경쇄

도면8

QVQLKESGPGLVNPSQTLSTCTVSGFSLTNNNVNWVRQAPGKG
 LEWVGGVWAGGATDYNALSRATITRDTSKSQVFLQMNSLTSE
 DTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGILVTVSSASTTAPKYFQL
 TPSCGITSDATVALGCLVSDYYPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPSVL
 QSSGLYALSSMVTVPASTWTSETYICNVAHPASSTKVDKRIPPCVL
 SAEGVIPISVPKPCPPYTHSKFLGGPSVFIFPPNPKDALMISRTPV
 VTCVVVNLSDQYPDVQFSWYVDNTEVHSAITKQREAFNSTYRWV
 SVLPQHQDWLSGKEFKCSVTNVGVPQPISRRAISRGKGPSRVPQVY
 VLPPHPDELAKSKVSVTCLVKDFYPPDISVEWQSNRWPELEGKYST
 TPAQLDGDGSYFLYSKLSLETSRWQQVESFTCAVMHEALHNHFTK
 TDISESLGK

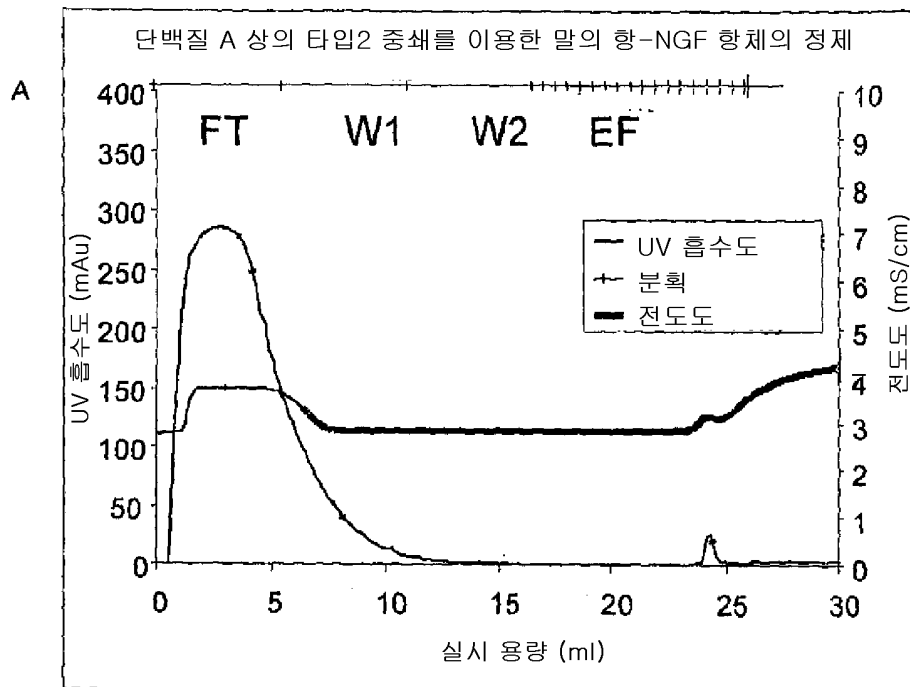
마화 항-NGF VH HC2 IgG 중쇄

도면9

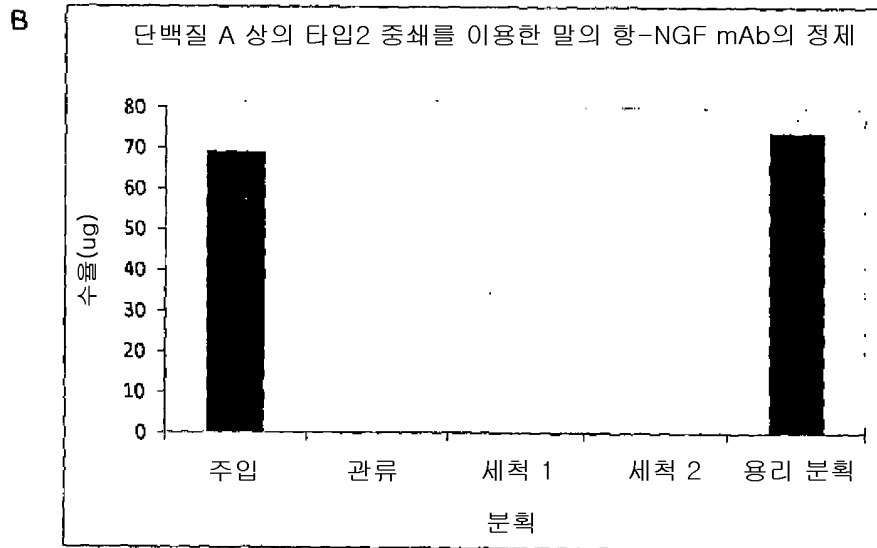
QVQLKESGPGLVNPSQTLSTCTVSGFSLTNNNVNWVRQAPGKG
LEWVGGVWAGGATDYNALKSRATITRDTSKSQVFLQMNSLTSE
DTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGILVTVSSASTTAPKVFQL
ASHSAGTSDSTVALGCLVSSYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPSV
RQSSGLYSLSSMVTVPASSLKSQTYICNVAHPASSTKVDKRIVKEP
CCCPKCPGRPSVFIFPPNPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQENPDVK
FNWYVDGVEAHTATTAKAKEKQDNSTYRVVSVLPQHWDWRRGKEF
KCKVNNRALPAPVERTITKAKGELQDPKVYILAPHREEVTKNTVSVT
CLVKDFYPPDINVEWQSNEEPEPEVKYSTTPAQLDGDGSYFLYSKL
TVETDRWEQGESFTCVVMHEAIRHTYRQKSITNFPKG

마화 항-NGF VH HC6 IgG 중쇄

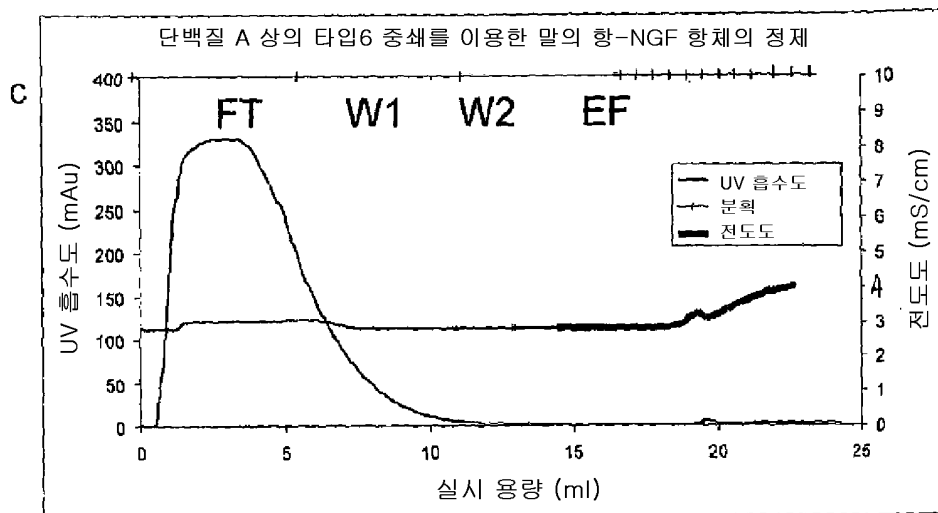
도면10a



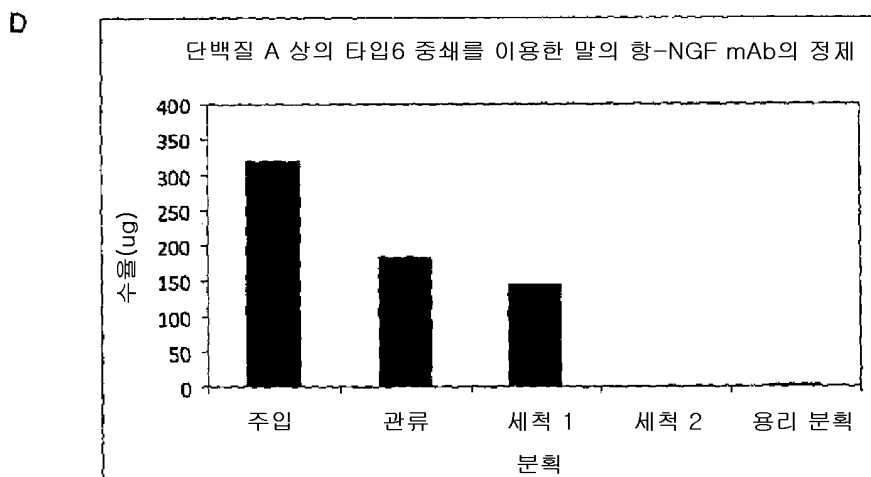
도면10b



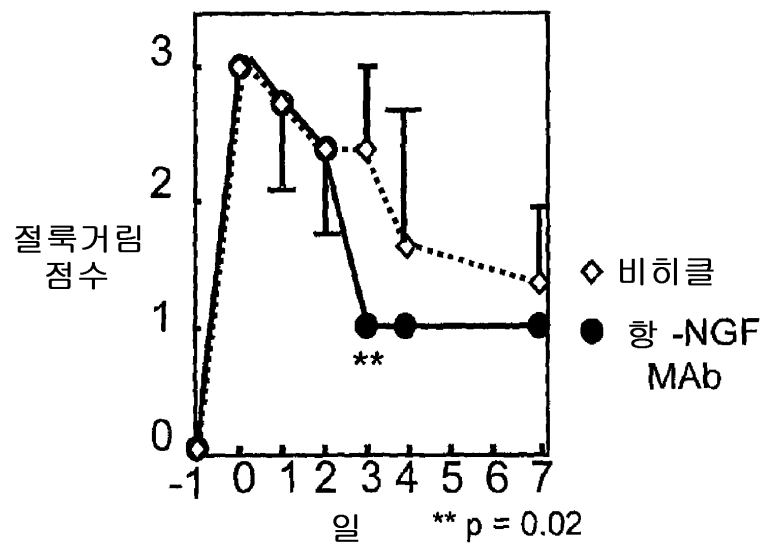
도면10c



도면10d



도면11



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> NVIP Pty Ltd

<120> ANTI-NERVE GROWTH FACTOR ANTIBODIES AND METHODS OF PREPARING AND
USING THE SAME

<130> P119713.W0.02

<150> US61/483491

<151> 2011-05-06

<150> US61/531439

<151> 2011-09-06

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

 $\langle 210 \rangle$ 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variable light chain (VL)

 $\langle 400 \rangle$ 1

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala

20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variable heavy chain (VH)

<400> 2

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Asn Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn

20 25 30
 Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Ala Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95
 Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120
 <210> 3
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> full light chain - VL and Kappa light chain constant domain with
 leader sequence and 2 stop codons
 <400> 3

Met Gly Val Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp Ile Thr

1 5 10 15
 Asp Ala Ile Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 20 25 30
 Ala Ser Leu Gly Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys Arg Ala Ser Glu Asp
 35 40 45
 Ile Tyr Asn Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 50 55 60
 Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser

65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn
 85 90 95
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe
 100 105 110
 His Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 115 120 125
 Asp Asp Ala Lys Pro Ser Ala Phe Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu

130 135 140
 Leu Ser Ser Gly Ser Ala Ser Val Val Cys Leu Val Tyr Gly Phe Tyr
 145 150 155 160
 Pro Ser Gly Ala Thr Ile Asn Trp Lys Val Asp Gly Leu Ala Lys Thr
 165 170 175
 Ser Ser Phe His Ser Ser Leu Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Asn Thr
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Pro Lys Ala Asp Tyr Glu Ala

195 200 205

His Asn Val Tyr Ala Cys Glu Val Ser His Lys Thr Leu Ser Ser Pro

210 215 220

Leu Val Lys Ser Phe Lys Arg Gln Asp Cys

225 230

<210> 4

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain - variable and constant domains

<400> 4

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Asp Asp Ala Lys

100 105 110

Pro Ser Ala Phe Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Ser Ser Gly

115 120 125

Ser Ala Ser Val Val Cys Leu Val Tyr Gly Phe Tyr Pro Ser Gly Ala

130 135 140

Thr Ile Asn Trp Lys Val Asp Gly Leu Ala Lys Thr Ser Ser Phe His

145 150 155 160
 Ser Ser Leu Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Asn Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Pro Lys Ala Asp Tyr Glu Ala His Asn Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Ser His Lys Thr Leu Ser Ser Pro Leu Val Lys Ser
 195 200 205

Phe Lys Arg Gln Asp Cys

210

<210> 5

<211> 483

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> full heavy chain - VH and HC2 (eqIgG2) with leader and stop codon

<400> 5

Met Ala Val Leu Val Leu Leu Leu Cys Leu Val Thr Phe Pro Thr Cys
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Asn
 20 25 30
 Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu

 35 40 45
 Thr Asn Asn Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser
 65 70 75 80
 Ala Leu Lys Ser Arg Ala Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln
 85 90 95
 Val Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr

 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met
 115 120 125
 Asp Ala Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr

130 135 140
 Thr Ala Pro Lys Tyr Phe Gln Leu Thr Pro Ser Cys Gly Ile Thr Ser
 145 150 155 160
 Asp Ala Thr Val Ala Leu Gly Cys Leu Val Ser Asp Tyr Tyr Pro Glu

 165 170 175
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190
 Thr Phe Pro Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ala Leu Ser Ser
 195 200 205
 Met Val Thr Val Pro Ala Ser Thr Trp Thr Ser Glu Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220
 Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Arg Ile Pro

 225 230 235 240
 Pro Cys Val Leu Ser Ala Glu Gly Val Ile Pro Ile Pro Ser Val Pro
 245 250 255
 Lys Pro Gln Cys Pro Pro Tyr Thr His Ser Lys Phe Leu Gly Gly Pro
 260 265 270
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Pro Lys Asp Ala Leu Met Ile Ser
 275 280 285
 Arg Thr Pro Val Val Thr Cys Val Val Val Asn Leu Ser Asp Gln Tyr

 290 295 300
 Pro Asp Val Gln Phe Ser Trp Tyr Val Asp Asn Thr Glu Val His Ser
 305 310 315 320
 Ala Ile Thr Lys Gln Arg Glu Ala Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 325 330 335
 Val Ser Val Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu
 340 345 350
 Phe Lys Cys Ser Val Thr Asn Val Gly Val Pro Gln Pro Ile Ser Arg

 355 360 365
 Ala Ile Ser Arg Gly Lys Gly Pro Ser Arg Val Pro Gln Val Tyr Val
 370 375 380

Leu Pro Pro His Pro Asp Glu Leu Ala Lys Ser Lys Val Ser Val Thr
 385 390 395 400
 Cys Leu Val Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Ser Val Glu Trp Gln
 405 410 415
 Ser Asn Arg Trp Pro Glu Leu Glu Gly Lys Tyr Ser Thr Thr Pro Ala
 420 425 430
 Gln Leu Asp Gly Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Leu
 435 440 445
 Glu Thr Ser Arg Trp Gln Gln Val Glu Ser Phe Thr Cys Ala Val Met
 450 455 460
 His Glu Ala Leu His Asn His Phe Thr Lys Thr Asp Ile Ser Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Gly Lys

<210> 6

<211> 464

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> full heavy chain - VH and HC2 (eqIgG2) w/o leader and stop codon

<400> 6

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Asn Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
 20 25 30
 Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Ala Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
115 120 125

Lys Tyr Phe Gln Leu Thr Pro Ser Cys Gly Ile Thr Ser Asp Ala Thr
130 135 140

Val Ala Leu Gly Cys Leu Val Ser Asp Tyr Tyr Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ala Leu Ser Ser Met Val Thr
180 185 190

Val Pro Ala Ser Thr Trp Thr Ser Glu Thr Tyr Ile Cys Asn Val Ala
195 200 205

His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Arg Ile Pro Pro Cys Val
210 215 220

Leu Ser Ala Glu Gly Val Ile Pro Ile Pro Ser Val Pro Lys Pro Gln
225 230 235 240

Cys Pro Pro Tyr Thr His Ser Lys Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
245 250 255

Ile Phe Pro Pro Asn Pro Lys Asp Ala Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
260 265 270

Val Val Thr Cys Val Val Val Asn Leu Ser Asp Gln Tyr Pro Asp Val
275 280 285

Gln Phe Ser Trp Tyr Val Asp Asn Thr Glu Val His Ser Ala Ile Thr
290 295 300

Lys Gln Arg Glu Ala Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
305 310 315 320

Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys
325 330 335

Ser Val Thr Asn Val Gly Val Pro Gln Pro Ile Ser Arg Ala Ile Ser

340 345 350
Arg Gly Lys Gly Pro Ser Arg Val Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro
355 360 365

His Pro Asp Glu Leu Ala Lys Ser Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Val
370 375 380
Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Ser Val Glu Trp Gln Ser Asn Arg
385 390 395 400
Trp Pro Glu Leu Glu Gly Lys Tyr Ser Thr Thr Pro Ala Gln Leu Asp
405 410 415
Gly Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Leu Glu Thr Ser
420 425 430

Arg Trp Gln Gln Val Glu Ser Phe Thr Cys Ala Val Met His Glu Ala
435 440 445
Leu His Asn His Phe Thr Lys Thr Asp Ile Ser Glu Ser Leu Gly Lys
450 455 460

<210> 7

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> - full heavy chain - VH and HC6 (eqIgG6) (without leader sequence
and stop codons)

<400> 7

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Asn Pro Ser Gln

1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
20 25 30
Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Ala Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu

65	70	75	80
Gln Met Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
	85	90	95
Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp			
	100	105	110
Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro			
	115	120	125
Lys Val Phe Gln Leu Ala Ser His Ser Ala Gly Thr Ser Asp Ser Thr			
	130	135	140
Val Ala Leu Gly Cys Leu Val Ser Ser Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr			
145	150	155	160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro			
	165	170	175
Ser Val Arg Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr			
	180	185	190
Val Pro Ala Ser Ser Leu Lys Ser Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Ala			
	195	200	205
His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Arg Ile Val Ile Lys Glu			
210	215	220	
Pro Cys Cys Cys Pro Lys Cys Pro Gly Arg Pro Ser Val Phe Ile Phe			
225	230	235	240
Pro Pro Asn Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val			
	245	250	255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asn Pro Asp Val Lys Phe			
	260	265	270
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Ala His Thr Ala Thr Thr Lys Ala			
275	280	285	
Lys Glu Lys Gln Asp Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro			
290	295	300	
Ile Gln His Gln Asp Trp Arg Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val			
305	310	315	320

Asn Asn Arg Ala Leu Pro Ala Pro Val Glu Arg Thr Ile Thr Lys Ala

325 330 335

Lys Gly Glu Leu Gln Asp Pro Lys Val Tyr Ile Leu Ala Pro His Arg

340 345 350

Glu Glu Val Thr Lys Asn Thr Val Ser Val Thr Cys Leu Val Lys Asp

355 360 365

Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asn Val Glu Trp Gln Ser Asn Glu Glu Pro

370 375 380

Glu Pro Glu Val Lys Tyr Ser Thr Thr Pro Ala Gln Leu Asp Gly Asp

385 390 395 400

Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Glu Thr Asp Arg Trp

405 410 415

Glu Gln Gly Glu Ser Phe Thr Cys Val Val Met His Glu Ala Ile Arg

420 425 430

His Thr Tyr Arg Gln Lys Ser Ile Thr Asn Phe Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 8

<211> 464

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH and aglycosylated HC2 (without leader sequence and stop
codons)

<400> 8

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Asn Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn

20 25 30

Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50 55 60

Ser	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu
65				70				75				80			
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
85				90				95							
Arg	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ser	Ser	Ser	Thr	Leu	Tyr	Ala	Met	Asp	Ala	Trp
100				105				110							
Gly	Gln	Gly	Ile	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Thr	Ala	Pro
115				120				125							
Lys	Tyr	Phe	Gln	Leu	Thr	Pro	Ser	Cys	Gly	Ile	Thr	Ser	Asp	Ala	Thr
130				135				140							
Val	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
145				150				155				160			
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
165				170				175							
Ser	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ala	Leu	Ser	Ser	Met	Val	Thr
180				185				190							
Val	Pro	Ala	Ser	Thr	Trp	Thr	Ser	Glu	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Ala
195				200				205							
His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Ile	Pro	Pro	Cys	Val
210				215				220							
Leu	Ser	Ala	Glu	Gly	Val	Ile	Pro	Ile	Pro	Ser	Val	Pro	Lys	Pro	Gln
225				230				235				240			
Cys	Pro	Pro	Tyr	Thr	His	Ser	Lys	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
245				250				255							
Ile	Phe	Pro	Pro	Asn	Pro	Lys	Asp	Ala	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
260				265				270							
Val	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asn	Leu	Ser	Asp	Gln	Tyr	Pro	Asp	Val
275				280				285							
Gln	Phe	Ser	Trp	Tyr	Val	Asp	Asn	Thr	Glu	Val	His	Ser	Ala	Ile	Thr
290				295				300							
Lys	Gln	Arg	Glu	Ala	Gln	Phe	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val

305 310 315 320
 Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys
 325 330 335
 Ser Val Thr Asn Val Gly Val Pro Gln Pro Ile Ser Arg Ala Ile Ser
 340 345 350
 Arg Gly Lys Gly Pro Ser Arg Val Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro
 355 360 365
 His Pro Asp Glu Leu Ala Lys Ser Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Val

 370 375 380
 Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Ser Val Glu Trp Gln Ser Asn Arg
 385 390 395 400
 Trp Pro Glu Leu Glu Gly Lys Tyr Ser Thr Thr Pro Ala Gln Leu Asp
 405 410 415
 Gly Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Leu Glu Thr Ser
 420 425 430
 Arg Trp Gln Gln Val Glu Ser Phe Thr Cys Ala Val Met His Glu Ala

 435 440 445
 Leu His Asn His Phe Thr Lys Thr Asp Ile Ser Glu Ser Leu Gly Lys
 450 455 460

<210> 9

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH and aglycosylated HC6(without leader sequence and stop codons)

<400> 9

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Asn Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn

 20 25 30
 Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50 55 60
 Ser Arg Ala Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

 85 90 95
 Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
 115 120 125
 Lys Val Phe Gln Leu Ala Ser His Ser Ala Gly Thr Ser Asp Ser Thr
 130 135 140
 Val Ala Leu Gly Cys Leu Val Ser Ser Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ser Val Arg Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ala Ser Ser Leu Lys Ser Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Ala
 195 200 205
 His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Arg Ile Val Ile Lys Glu

 210 215 220
 Pro Cys Cys Cys Pro Lys Cys Pro Gly Arg Pro Ser Val Phe Ile Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Asn Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asn Pro Asp Val Lys Phe
 260 265 270
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Ala His Thr Ala Thr Thr Lys Ala

 275 280 285
 Lys Glu Lys Gln Asp Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro
 290 295 300

Ile Gln His Gln Asp Trp Arg Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320
 Asn Asn Arg Ala Leu Pro Ala Pro Val Glu Arg Thr Ile Thr Lys Ala
 325 330 335
 Lys Gly Glu Leu Gln Asp Pro Lys Val Tyr Ile Leu Ala Pro His Arg

340 345 350
 Glu Glu Val Thr Lys Asn Thr Val Ser Val Thr Cys Leu Val Lys Asp
 355 360 365
 Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asn Val Glu Trp Gln Ser Asn Glu Glu Pro
 370 375 380
 Glu Pro Glu Val Lys Tyr Ser Thr Thr Pro Ala Gln Leu Asp Gly Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Glu Thr Asp Arg Trp

405 410 415
 Glu Gln Gly Glu Ser Phe Thr Cys Val Val Met His Glu Ala Ile Arg
 420 425 430
 His Thr Tyr Arg Gln Lys Ser Ile Thr Asn Phe Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 10

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL - FR1

<400> 10

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys
 20

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL - FR2

<400> 11

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 12

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL - FR3

<400> 12

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser

1 5 10 15

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Ser Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys

20 25 30

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL - FR4

<400> 13

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

1 5 10

<210> 14

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH - FR1

<400> 14

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Asn Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser

20 25

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH - FR2

<400> 15

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly

1 5 10

<210> 16

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH - FR3

<400> 16

Ser Arg Ala Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu

1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

20 25 30

Arg

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH - FR4

<400> 17

Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10