



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년01월13일
(11) 등록번호 10-2753603
(24) 등록일자 2025년01월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 17/04 (2006.01) A61P 25/04 (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01) C12N 15/63 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61P 17/04 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7018286
- (22) 출원일자(국제) 2022년10월31일
심사청구일자 2024년05월30일
- (85) 번역문제출일자 2024년05월30일
- (65) 공개번호 10-2024-0099394
- (43) 공개일자 2024년06월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2022/040580
- (87) 국제공개번호 WO 2023/074888
국제공개일자 2023년05월04일
- (30) 우선권주장
JP-P-2021-178982 2021년11월01일 일본(JP)
JP-P-2022-005967 2022년01월18일 일본(JP)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020160067846 A
KR1020210015898 A
KR1020150127618 A

- (73) 특허권자
시오노기세이야쿠가부시키가이샤
일본국 오오사카시 주우오쿠 도슈마찌 3쵸메 1방 8고
- (72) 발명자
요시카와 마이
일본국 오사카후 오오사카시 주우오쿠 도슈마찌 3쵸메 1방 8고 시오노기세이야쿠가부시키가이샤 나이
오노다 준지
일본국 오사카후 오오사카시 주우오쿠 도슈마찌 3쵸메 1방 8고 시오노기세이야쿠가부시키가이샤 나이
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 이미경

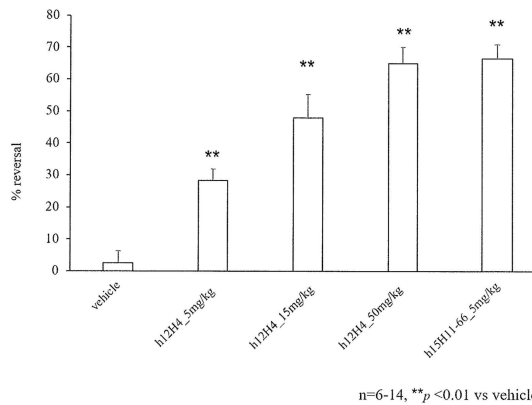
(54) 발명의 명칭 **신규한 Nav1.7 모노클로날 항체**

(57) 요약

본 발명의 목적은 신규의 Nav1.7 모노클로날 항체를 제공하는 것에 있다. 특정한 CDR 또는 특정한 중사슬 가변 영역/경사슬 가변 영역을 갖는 Nav1.7 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편을 개시한다. 그 모노클로날 항체 등은, 동통, 소양 등의 치료 또는 예방에 사용할 수 있다.

대표도 - 도3

좌골 신경 부분 결찰 모델에 대한 정맥내 투여에 의한 약효 평가



(52) CPC특허분류

A61P 25/04 (2018.01)

A61P 29/00 (2023.02)

C12N 15/63 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

(72) 발명자

나카모리 다이키

일본국 오사카후 오오사카시 주우오꾸 도슈마찌 3
쥬메 1방 8고 시오노기세이야쿠가부시키가이샤 나
이

다카하시 다츠야

일본국 오사카후 오오사카시 주우오꾸 도슈마찌 3
쥬메 1방 8고 시오노기세이야쿠가부시키가이샤 나
이

가사이 에리카

일본국 오사카후 오오사카시 주우오꾸 도슈마찌 3
쥬메 1방 8고 시오노기세이야쿠가부시키가이샤 나
이

명세서

청구범위

청구항 1

2) 서열 번호 4 의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1,
서열 번호 59 의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및
서열 번호 64 의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3 을 포함하는 중사슬 가변 영역 그리고
서열 번호 72 의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1,
서열 번호 9 의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및
서열 번호 10 의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3 을 포함하는 경사슬 가변 영역을 포함하는, 인간 Nav1.7 에
특이적으로 결합하는 모노클로날 항체 또는 그 항원 결합 단편.

청구항 2

제 1 항에 있어서,
그 모노클로날 항체가, 인간화 모노클로날 항체인 모노클로날 항체 또는 그 항원 결합 단편.

청구항 3

제 2 항에 있어서,
서열 번호 33 의 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역 그리고
서열 번호 55, 79 ~ 89, 93 ~ 102 중 어느 것의 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역을 포함하는 모
노클로날 항체 또는 그 항원 결합 단편.

청구항 4

제 3 항에 있어서,
추가로,
서열 번호 11 의 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 정상 영역 및
서열 번호 12 의 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 정상 영역을 포함하는 모노클로날 항체 또는 그 항원 결합
단편.

청구항 5

제 3 항에 기재된 모노클로날 항체의 중사슬 가변 영역 및
제 3 항에 기재된 모노클로날 항체의 경사슬 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 6

제 5 항에 있어서,
추가로, 제 4 항에 기재된 모노클로날 항체의 중사슬 정상 영역 및
제 4 항에 기재된 모노클로날 항체의 경사슬 정상 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 7

제 5 항에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 8

제 6 항에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 9

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 기재된 모노클로날 항체 또는 그 항원 결합 단편을 함유하는 의약 조성물로서, 동통, 소양, 또는 동통 및 소양의 치료제, 예방제, 또는 치료제 및 예방제인, 의약 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 신규의 Nav1.7 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편에 관한 것이다. 보다 상세하게는, Nav1.7 에 특이적으로 결합하는 항체 혹은 그 항체 단편에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, Nav1.7 을 선택적으로 저해하는 모노클로날 항체 혹은 그 항체 단편 또는 이것을 함유하는 의약 조성물 혹은 Nav1.7 검출용 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] Nav1.7 은 유전자 SCN9A 에 코드되어 있는 전위 의존성 나트륨 이온 채널이며, 주로 말초 신경에 발현된다 (비특허문헌 1). Nav1.7 은, 4 개의 도메인 A, B, C, 및 D (도메인 I ~ IV 라고도 언급된다) 를 포함하고, 각각이 6 개의 막 관통 단백질 헬릭스 (S1, S2, S3, S4, S5 및 S6) 그리고 3 개의 세포외 (친수성) 루프 E1, E2 및 E3 (세포외 영역 E1, E2 및 E3 이라고도 언급된다) 을 포함한다.

[0003] Nav1.7 녹아웃 마우스에 있어서 염증성 동통이 작아지는 것 (비특허문헌 2) 이 알려져 있으며, 저분자 화합물인 Nav1.7 저해제가 선단 흥통증 (비특허문헌 3), 삼차 신경통 (비특허문헌 4) 등에 효과를 나타내는 것이 확인되어 있다.

[0004] 또, 아픔 (동통) 이나 가려움 (소양) 에 효과가 있는 Nav1.7 모노클로날 항체가 특허문헌 1 ~ 10 등에서 보고되어 있다. 특허문헌 1 ~ 6 및 8 에는 인간 Nav1.7 도메인 C 의 E3 세포외 영역에 결합하는 항체가 기재되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) WO 2011/051350
- (특허문헌 0002) US 8734798
- (특허문헌 0003) US 8986954
- (특허문헌 0004) US 9266953
- (특허문헌 0005) WO 2014/159595
- (특허문헌 0006) WO 2015/032916
- (특허문헌 0007) WO 2015/035173

(특허문헌 0008) WO 2019/230856

(특허문헌 0009) WO 2022/109102

(특허문헌 0010) WO 2011/051349

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) PNAS (1997) 94 : 1527-1532
- (비특허문헌 0002) PNAS (2004) 101 : 12706-12711
- (비특허문헌 0003) Pain (2012) 153 (1) : 80-85
- (비특허문헌 0004) THE LANCET NEUROLOGY (2017) 16 (4) : 291-300

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은, 동통, 소양 등의 치료약으로서 이용 가능한 신규의 Nav1.7 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명자들은, 예의 연구의 결과, 하기 실시예 1 에 기재된 바와 같이, 「1424-QPKYEYSL (서열 번호 1)-1431 ; hCE3C 펩티드」를 항원으로서 선정하여, Nav1.7 의 도메인 C 의 E3 세포의 루프 C 말단 영역에 특이적으로 결합하고, Nav1.7 을 선택적으로 저해하는 모노클로날 항체를 알아냈다. 또한, 하기 실시예 9 에 기재된 바와 같이, 본 발명의 모노클로날 항체가, 동통 억제 효과를 갖는 것을 알아냈다. 또, 특허문헌 7 에는 Nav1.7 모노클로날 항체의 소양 억제 효과가 나타나 있어, 본 발명의 모노클로날 항체도 동일하게 소양 억제 효과가 있는 것이 시사된다.
- [0009] 특허문헌 1 ~ 4 에는, 토끼에 면역된 면역원인, 인간 Nav1.7 도메인 C 의 루프 E3 유래의 펩티드 (C31, C32 및 C33) 가 개시되어 있다 (TABLE 1). 그 중, C33 은, 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편의 면역원 과 동일하게, 인간 Nav1.7 도메인 C 의 루프 E3 의 C 말단 유래의 펩티드이다. 그러나, 특허문헌 1 ~ 4 에는, C33 의 면역에 의해 얻어진 항체 및 그 항체에 관한 친화성이나 생물학적 데이터는, 일절 개시되어 있지 않다.
- [0010] 특허문헌 5 에는, 인간 Nav1.7 세포의 루프 3-3 (도메인 C 의 E3 세포의 루프) 유래의 펩티드를 면역원으로 하여 얻어진 38 항체가 개시되어 있다. 단, 그 펩티드의 서열은 개시되어 있지 않아, 세포의 루프 3-3 의 전체 길이인지, 단편인지는 불명하다. H4H468P, H4H468B, H4H471P, H4H471B 및 H1M852N 만이, in vitro 에서 세포의 루프 3-3 펩티드 (특허문헌 5 의 서열 번호 670 (인간 Nav1.7 아미노산 서열) 의 1333-1382 잔기) 와의 친화성이나 Nav1.7 에 대한 특이성 등의 평가가 되어 있으며, 그들 중, 후보 항체로 기재된 H4H468P (REGN1064) 만이, in vivo 에서 평가되어 있다. 그러나, 특허문헌 5 의 [0213] 및 [0214] 에는, 래트에 대한 H4H468P 의 복강내 투여는, 기계적 자극 임계값 및 투여 후 48 시간 후의 열 침해 수용 임계값에 영향을 주지 않는다고 기재되어 있어, H4H468P 의 동통 억제 효과는 나타나 있지 않다.
- [0011] 특허문헌 6 에는, hNav1.7-loopC3-Illama Fc 융합체를 면역원으로 하여 얻어진 항체 (10B6 및 10C4) 가 개시되어 있다. 여기서, hNav1.7-loopC3 은, hNav1.7 의 도메인 C 의 E3 세포의 루프의 전체 길이 서열이며, hNav1.7-loopC3 의 C 말단 유래의 펩티드에 대한 항체는 일절 개시되어 있지 않다. 또한, 10B6 및 10C4 는, in vitro 에 있어서의 친화성이나 기능 평가는 되어 있지만, in vivo 평가는 일절 되어 있지 않다.
- [0012] 특허문헌 7 에는, Nav1.7 의 도메인 II (도메인 B) 에 결합하고, 동통 및 소양의 억제 효과를 갖는 항체 (SVmab1) 가 개시되어 있다.
- [0013] 특허문헌 9 및 10 에는, Nav1.7 의 도메인 I (도메인 A) 에 결합하는 항체가 개시되어 있다.

- [0014] 요컨대, 특허문헌 1 ~ 7, 9 및 10 에는, 인간 Nav1.7 도메인 C 의 E3 세포의 루프 C 말단 영역에 특이적으로 결합하고, 동통 억제 효과를 갖는 것이 나타난 항체는, 일절 개시되어 있지 않다.
- [0015] 특허문헌 8 에는, 실시예 1 에 기재된 바와 같이, 인간 Nav1.7 도메인 C 의 E3 세포의 루프 C 말단의 펩티드를 사용하여 면역원을 조제하고, in vivo 에서 동통 억제 효과를 갖는 항체가 나타나 있다. 또한, 특허문헌 8 에 기재된 면역원은, 「1418-SVNVDKQPKYEYSL (특허문헌 8 의 서열 번호 1 ; 본원 명세서에 있어서의 서열 번호 103)-1431 ; hCE3C 펩티드」를 항원으로서 선정하여 조제하고 있어, 본 발명의 모노클로날 항체의 면역원과는 동일하지 않다.
- [0016] 즉, 본 발명은, 이하에 관한 것이다.
- [0017] (1) 서열 번호 75 : Xaa1-Y-N-M-H (여기서 Xaa1 은 D 또는 E 이다) 의 아미노산 서열에 있어서 1 ~ 2 개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/혹은 부가되어 있어도 되는 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1,
- [0018] 서열 번호 76 : R-I-N-P-K-N-G-V-I-Xaa1-Xaa2-N-E-K-F-K-D (여기서 Xaa1 은 N, L, Q 또는 K 이고, Xaa2 는 S, L 또는 Y 이다) 의 아미노산 서열에 있어서 1 ~ 2 개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/혹은 부가되어 있어도 되는 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및
- [0019] 서열 번호 77 : S-Y-Xaa1-G-G-Xaa2-Xaa3-D-A-Y (여기서 Xaa1 은 Y 또는 F 이고, Xaa2 는 N, D, Q 또는 K 이고, Xaa3 은 T, D, S 또는 Q 이다) 의 아미노산 서열에 있어서 1 ~ 2 개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/혹은 부가되어 있어도 되는 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3 을 포함하는 중사슬 가변 영역 그리고
- [0020] 서열 번호 78 : R-Xaa1-S-Xaa2-S-V-D-N-Y-G-Xaa3-S-F-Xaa4-N (여기서 Xaa1 은, A 또는 V 이고, Xaa2 는 E 또는 D 이고, Xaa3 은 I 또는 F 이고, Xaa4 는 M 또는 L 이다) 의 아미노산 서열에 있어서 1 ~ 2 개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/혹은 부가되어 있어도 되는 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1,
- [0021] 서열 번호 9 의 아미노산 서열에 있어서 1 ~ 2 개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/혹은 부가되어 있어도 되는 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및
- [0022] 서열 번호 10 의 아미노산 서열에 있어서 1 ~ 2 개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/혹은 부가되어 있어도 되는 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3 을 포함하는 경사슬 가변 영역을 포함하는 Nav1.7 에 결합하는 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편.
- [0023] (2) 서열 번호 4 또는 58 의 아미노산 서열에 있어서 1 ~ 2 개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/혹은 부가되어 있어도 되는 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1,
- [0024] 서열 번호 5, 59 ~ 63 중 어느 것의 아미노산 서열에 있어서 1 ~ 2 개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/혹은 부가되어 있어도 되는 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및
- [0025] 서열 번호 6, 64 ~ 71 중 어느 것의 아미노산 서열에 있어서 1 ~ 2 개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/혹은 부가되어 있어도 되는 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3 을 포함하는 중사슬 가변 영역 그리고
- [0026] 서열 번호 8, 72 ~ 74 중 어느 것의 아미노산 서열에 있어서 1 ~ 2 개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/혹은 부가되어 있어도 되는 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1,
- [0027] 서열 번호 9 의 아미노산 서열에 있어서 1 ~ 2 개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/혹은 부가되어 있어도 되는 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및
- [0028] 서열 번호 10 의 아미노산 서열에 있어서 1 ~ 2 개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/혹은 부가되어 있어도 되는 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3 을 포함하는 경사슬 가변 영역을 포함하는 (1) 에 기재된 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편.
- [0029] (3) 1) 서열 번호 58 의 아미노산 서열에 있어서 1 ~ 2 개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/혹은 부가되어 있어도 되는 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1,
- [0030] 서열 번호 59 의 아미노산 서열에 있어서 1 ~ 2 개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/혹은 부가되어 있어도 되는 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및
- [0031] 서열 번호 64 의 아미노산 서열에 있어서 1 ~ 2 개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/혹은 부가되어 있어도 되는 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3 을 포함하는 중사슬 가변 영역 그리고

- [0284] 서열 번호 74 의 아미노산 서열에 있어서 1 ~ 2 개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/혹은 부가되어 있어도 되는 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1,
- [0285] 서열 번호 9 의 아미노산 서열에 있어서 1 ~ 2 개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/혹은 부가되어 있어도 되는 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및
- [0286] 서열 번호 10 의 아미노산 서열에 있어서 1 ~ 2 개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/혹은 부가되어 있어도 되는 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3 을 포함하는 경사슬 가변 영역 ; 혹은
- [0287] 44) 서열 번호 4 의 아미노산 서열에 있어서 1 ~ 2 개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/혹은 부가되어 있어도 되는 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1,
- [0288] 서열 번호 5 의 아미노산 서열에 있어서 1 ~ 2 개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/혹은 부가되어 있어도 되는 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및
- [0289] 서열 번호 6 의 아미노산 서열에 있어서 1 ~ 2 개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/혹은 부가되어 있어도 되는 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3 을 포함하는 중사슬 가변 영역 그리고
- [0290] 서열 번호 8 의 아미노산 서열에 있어서 1 ~ 2 개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/혹은 부가되어 있어도 되는 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1,
- [0291] 서열 번호 9 의 아미노산 서열에 있어서 1 ~ 2 개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/혹은 부가되어 있어도 되는 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및
- [0292] 서열 번호 10 의 아미노산 서열에 있어서 1 ~ 2 개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/혹은 부가되어 있어도 되는 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3 을 포함하는 경사슬 가변 영역 ; 을 포함하는 (2) 에 기재된 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편.
- [0293] (4) 그 모노클로날 항체가, 인간화 모노클로날 항체인, (1) ~ (3) 중 어느 하나에 기재된 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편.
- [0294] (5) 서열 번호 25, 32 ~ 54 중 어느 것의 아미노산 서열 또는
- [0295] 서열 번호 25, 32 ~ 54 중 어느 것의 아미노산 서열과 95 % 이상의 동일성의 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역 그리고
- [0296] 서열 번호 28, 55 ~ 57, 79 ~ 102 중 어느 것의 아미노산 서열 또는
- [0297] 서열 번호 28, 55 ~ 57, 79 ~ 102 중 어느 것의 아미노산 서열과 95 % 이상의 동일성의 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역 ; 을 포함하는, (4) 의 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편.
- [0298] (6) 1) 서열 번호 32 의 아미노산 서열과 95 % 이상의 동일성의 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역 및 서열 번호 55 의 아미노산 서열과 95 % 이상의 동일성의 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역 ;
- [0299] 2) 서열 번호 33 의 아미노산 서열과 95 % 이상의 동일성의 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역 및 서열 번호 55 의 아미노산 서열과 95 % 이상의 동일성의 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역 ;
- [0300] 3) 서열 번호 32 의 아미노산 서열과 95 % 이상의 동일성의 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역 및 서열 번호 28 의 아미노산 서열과 95 % 이상의 동일성의 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역 ;
- [0301] 4) 서열 번호 33 의 아미노산 서열과 95 % 이상의 동일성의 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역 및 서열 번호 28 의 아미노산 서열과 95 % 이상의 동일성의 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역 ;
- [0302] 5) 서열 번호 34 의 아미노산 서열과 95 % 이상의 동일성의 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역 및 서열 번호 55 의 아미노산 서열과 95 % 이상의 동일성의 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역 ;
- [0303] 6) 서열 번호 35 의 아미노산 서열과 95 % 이상의 동일성의 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역 및 서열 번호 55 의 아미노산 서열과 95 % 이상의 동일성의 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역 ;
- [0304] 7) 서열 번호 36 의 아미노산 서열과 95 % 이상의 동일성의 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역 및 서열 번호 55 의 아미노산 서열과 95 % 이상의 동일성의 아미노산 서열로 이루어지는 경사슬 가변 영역 ;
- [0305] 8) 서열 번호 37 의 아미노산 서열과 95 % 이상의 동일성의 아미노산 서열로 이루어지는 중사슬 가변 영역 및

- [0369] (7-1) Nav1.7 에 대한 결합 활성이 2 nM 또는 그 미만인, 상기 (1) ~ (7) 중 어느 하나에 기재된 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편.
- [0370] (7-2) Nav1.7 에 대한 결합 활성이 1 nM 또는 그 미만인, 상기 (7-1) 에 기재된 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편.
- [0371] (8) (1) ~ (7), (7-1), (7-2) 중 어느 하나에 기재된 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편을 함유하는 의약 조성물.
- [0372] (8-1) Nav1.7 관련 질환의 치료제 및/또는 예방제인, (8) 에 기재된 의약 조성물.
- [0373] (9) Nav1.7 관련 질환이, 동통 및/또는 소양인, (8-1) 에 기재된 의약 조성물.
- [0374] (10) (5) 또는 (6) 에 기재된 모노클로날 항체의 중사슬 가변 영역을 코딩하고,
- [0375] 추가로 (7) 에 기재된 모노클로날 항체의 중사슬 정상 영역을 코딩하고 있어도 되는 폴리뉴클레오티드.
- [0376] (11-1) (5) 또는 (6) 에 기재된 모노클로날 항체의 경사슬 가변 영역을 코딩하고,
- [0377] 추가로 (7) 에 기재된 모노클로날 항체의 경사슬 정상 영역을 코딩하고 있어도 되는 폴리뉴클레오티드.
- [0378] (11-2) (10) 및 (11-1) 에 기재된 폴리뉴클레오티드의 조합.
- [0379] (11-3) (1), (2) ~ (7) 중 어느 하나에 기재된 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [0380] (12) (10) 및/또는 (11-1) 에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.
- [0381] (12-1) (11-3) 의 폴리뉴클레오티드 또는 (12) 의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.
- [0382] (13) (1) ~ (7), (7-1), (7-2) 중 어느 하나에 기재된 모노클로날 항체 혹은 그 항체 단편을 투여하는 것을 포함하는, Nav1.7 관련 질환의 예방 또는 치료 방법.
- [0383] (14) Nav1.7 관련 질환의 치료제 및/또는 예방제를 제조하기 위한, (1) ~ (7), (7-1), (7-2) 중 어느 하나에 기재된 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편.
- [0384] (15) Nav1.7 관련 질환의 치료 혹은 예방을 위한, (1) ~ (7), (7-1), (7-2) 중 어느 하나에 기재된 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편.
- [0385] (16) Nav1.7 관련 질환의 치료 혹은 예방을 위한, (1) ~ (7), (7-1), (7-2) 중 어느 하나에 기재된 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편의 사용.
- [0386] (17) Nav1.7 관련 질환이, 동통 및/또는 소양인, (13) 에 기재된 예방 또는 치료 방법, (14) 혹은 (15) 에 기재된 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편 또는 (16) 에 기재된 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편의 사용.
- [0387] (18) (1) ~ (7), (7-1), (7-2) 중 어느 하나에 기재된 모노클로날 항체 혹은 그 항체 단편을 함유하는 Nav1.7 검출용 키트.

발명의 효과

- [0388] 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편은, Nav1.7 에 특이적으로 결합하므로, 생체 시료에 있어서 Nav1.7 을 검출하기 위해 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편은, Nav1.7 을 선택적으로 저해하는 활성을 가지므로, 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편을 포함하는 의약 조성물은, 의약품, 특히, Nav1.7 관련 질환의 치료 또는 예방을 위한 의약으로서 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0389] 도 1 은, 15H11 의 중사슬 가변 영역 (서열 번호 3) 및 경사슬 가변 영역 (서열 번호 7) 의 Kabat numbering 의 결과를 나타낸다. HFR1 ~ HFR4 는 각각 중사슬 프레임워크 영역 1 ~ 4 를 의미하고, CDR-H1 ~ CDR-H3 은 각각 중사슬 상보성 결정 영역 1 ~ 3 을 의미한다. LFR1 ~ LFR4 는 각각 경사슬 프레임워크 영역 1 ~ 4 를 의미하고, CDR-L1 ~ CDR-L3 은 각각 경사슬 상보성 결정 영역 1 ~ 3 을 의미한다.
 도 2 는, 인간화 항체 h15H11 의 중사슬 가변 영역 (IGHV7-4-1 Q43R, G44S, R94P (서열 번호 25)) 및 경사슬

가변 영역 (IGKV7-3 Y36F, V78M (서열 번호 28)) 의 Kabat numbering 의 결과를 나타낸다. HFR1 ~ HFR4 는 각각 중사슬 프레임워크 영역 1 ~ 4 를 의미하고, CDR-H1 ~ CDR-H3 은 각각 중사슬 상보성 결정 영역 1 ~ 3 을 의미한다. LFR1 ~ LFR4 는 각각 경사슬 프레임워크 영역 1 ~ 4 를 의미하고, CDR-L1 ~ CDR-L3 은 각각 경사슬 상보성 결정 영역 1 ~ 3 을 의미한다.

도 3 은, 좌골 신경 부분 결찰 모델에 대한 정맥내 투여에 의한 약효 평가이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0390] 본 명세서에 있어서 사용되는 용어는, 특별히 언급하는 경우를 제외하고, 당해 분야에서 통상적으로 사용되는 의미로 사용된다.
- [0391] 본 발명에 있어서는, 당해 분야에서 공지된 항체 제조 수법을 이용 가능하다. 예를 들어, *Immunochemistry in Practice* (Blackwell Scientific Publications) 에 기재된 방법 등을 들 수 있다.
- [0392] 또, 당해 분야에서 공지된 유전자 조작적 수법을 이용 가능하다. 예를 들어, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Forth Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012), *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, Current Protocols (2012) 에 기재된 방법 등을 들 수 있다.
- [0393] 인간 Nav1.7 은 유전자 SCN9A 에 코드되어 있는 아미노산으로 이루어지는 단백질 (UniProtKB/Swiss-Prot : Q15858) 이다.
- [0394] 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편은, 본 명세서에 기재된 CDR 또는 중사슬 가변 영역/경사슬 가변 영역을 갖는 모노클로날 항체 또는 그 항체의 단편이다. 그 항체 또는 항체 단편은, 면역 글로불린 분자의 임의의 클래스 (예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD 혹은 IgA) 또는 서브클래스 유래일 수 있으며, 예를 들어, 마우스, 래트, 상어, 토끼, 돼지, 햄스터, 낙타, 라마, 염소 또는 인간을 포함하는 임의의 종으로부터 취득되어도 된다. 그 항체 또는 항체 단편으로서, 바람직하게는 인간화 모노클로날 항체 또는 인간화 모노클로날 항체의 항체 단편이다.
- [0395] 본 발명에 있어서 「모노클로날 항체의 항체 단편」이란, 본 발명의 모노클로날 항체의 일부로서, 당해 모노클로날 항체와 동일하게 Nav1.7 에 특이적으로 결합하고, Nav1.7 을 선택적으로 저해하는 단편을 의미한다.
- [0396] 구체적으로는, 인간 Nav1.7 에 대해 특이적으로 결합하는 Fab (fragment of antigen binding), Fab', F(ab')₂, 1 본쇄 항체 (single chain Fv ; 이하, scFv 로 표기한다), 디설파이드 안정화 항체 (disulfide stabilized Fv ; 이하, dsFv 로 표기한다), 2 량화체 V 영역 단편 (이하, Diabody 로 표기한다), CDR 을 포함하는 펩티드 등을 들 수 있다 (엑스퍼트·오피니언·온·테라퓨틱·패턴즈, 제 6 권, 제 5호, 제 441 ~ 456 페이지, 1996년).
- [0397] Fab 는, IgG 의 힌지 영역에서 2 개의 H 사슬을 가교하고 있는 2 개의 디설파이드 결합 (S-S 결합) 의 상부의 펩티드 부분을 효소 파파인으로 분해하여 얻어지는, H 사슬의 N 말단측 약 절반과 L 사슬 전체로 구성되는, 분자량 약 5 만의 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다. 본 발명에서 사용되는 Fab 는, 본 발명의 모노클로날 항체를 파파인 처리하여 얻을 수 있다. 또, 본 발명의 모노클로날 항체의 Fab 를 코드하는 DNA 를 세포용 발현 벡터에 삽입하고, 그 벡터를 세포에 도입함으로써 발현시키는 것에 의해서도 Fab 를 제조할 수 있다.
- [0398] Fab' 는, F(ab')₂ 의 힌지 사이의 S-S 결합을 절단한 분자량 약 5 만의 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다. 본 발명에서 사용되는 Fab' 는, 본 발명의 모노클로날 항체의 F(ab')₂ 를 환원제 디티오프라이트톨 처리하여 얻을 수 있다. 또, 본 발명의 모노클로날 항체의 Fab' 를 코드하는 DNA 를 세포용 발현 벡터에 삽입하고, 그 벡터를 대장균, 효모 또는 동물 세포에 도입함으로써 발현시키는 것에 의해서도 Fab' 를 제조할 수 있다.
- [0399] F(ab')₂ 는, IgG 의 힌지 영역의 2 개의 S-S 결합의 하부를 효소 펩신으로 분해하여 얻어지는, 2 개의 Fab' 영역이 힌지 부분에서 결합하여 구성되는, 분자량 약 10 만의 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다. 본 발명에서 사용되는 F(ab')₂ 는, 본 발명의 모노클로날 항체를 펩신 처리하여 얻을 수 있다. 또, 본 발명의 모노클로날 항체의 F(ab')₂ 를 코드하는 DNA 를 세포용 발현 벡터에 삽입하고, 그 벡터를 대장균, 효모 또는 동물 세포에 도입함으로써 발현시키는 것에 의해서도 F(ab')₂ 를 제조할 수 있다.
- [0400] scFv 는, 1 개의 VH 와 1 개의 VL 을 적당한 펩티드 링커 (이하, P 로 표기한다) 를 사용하여 연결한, VH-P-VL 또는 VL-P-VH 폴리펩티드이며, 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다. 본 발명에서 사용되는 scFv 에 포함

되는 VH 및 VL 은, 본 발명의 모노클로날 항체의 것이면 된다. 본 발명에서 사용되는 scFv 는, 본 발명의 모노클로날 항체의 VH 및 VL 을 코딩하는 cDNA 를 사용하여, scFv 발현 벡터를 구축하고, 대장균, 효모 또는 동물 세포에 도입함으로써 발현시켜 제조할 수 있다.

- [0401] dsFv 는, VH 및 VL 중의 각각 1 아미노산 잔기를 시스테인 잔기로 치환한 폴리펩티드를 S-S 결합을 통하여 결합시킨 것을 말한다. 시스테인 잔기로 치환하는 아미노산 잔기는 Reiter 등에 의해 나타내어진 방법 (Protein Engineering, 7, 697 (1994)) 에 따라, 항체의 입체 구조 예측에 기초하여 선택할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 dsFv 에 포함되는 VH 또는 VL 은, 본 발명의 모노클로날 항체의 것이면 된다. 본 발명에서 사용되는 dsFv 는, 본 발명의 모노클로날 항체의 VH 및 VL 을 코딩하는 cDNA 를 사용하여, 적당한 발현 벡터에 삽입하여 dsFv 발현 벡터를 구축하고, 그 발현 벡터를 대장균, 효모 또는 동물 세포에 도입하고, 발현시키는 것에 의해 제조할 수 있다.
- [0402] Diabody 는, 항원 결합 특이성이 동일하거나 또는 상이한 scFv 가 2 량체를 형성한 항체 단편이며, 동일한 항원에 대한 2 개의 항원 결합 활성 또는 상이한 항원에 대한 2 종류의 특이적인 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다. 예를 들어, 본 발명의 모노클로날 항체에 특이적으로 반응하는 2 개의 Diabody 는, 본 발명의 모노클로날 항체의 VH 및 VL 을 코딩하는 cDNA 를 사용하여, 3 ~ 10 잔기의 펩티드 링커를 갖는 scFv 를 코딩하는 DNA 를 구축하고, 그 DNA 를 세포용 발현 벡터에 삽입하고, 그 발현 벡터를 대장균, 효모 또는 동물 세포에 도입함으로써 Diabody 를 발현시켜 제조할 수 있다.
- [0403] CDR 을 포함하는 펩티드는, VH 또는 VL 의 CDR 의 적어도 1 영역 이상을 포함하여 구성된다. 복수의 CDR 은, 직접 또는 적당한 펩티드 링커를 통하여 결합시킬 수 있다. 본 발명에서 사용되는 CDR 을 포함하는 펩티드는, 본 발명의 모노클로날 항체의 VH 및 VL 을 코딩하는 cDNA 를 사용하여, CDR 을 코딩하는 DNA 를 구축하고, 그 DNA 를 동물 세포용 발현 벡터에 삽입하고, 그 벡터를 대장균, 효모 또는 동물 세포에 도입함으로써 발현시키는 것에 의해 제조할 수 있다. 또, CDR 을 포함하는 펩티드는, Fmoc 법 (플루오레닐메틸옥시카르보닐법), tBoc 법 (t-부틸옥시카르보닐법) 등의 화학 합성법에 의해 제조할 수도 있다.
- [0404] 본 발명의 모노클로날 항체는, 인간 Nav1.7 의 아미노산 서열 또는 그 입체 구조를 특이적으로 인식하여 결합하는 모노클로날 항체에 방사성 동위원소, 저분자 혹은 고분자의 약제, 단백질 또는 본 발명의 모노클로날 항체와는 상이한 항체 의약 등을 화학적 혹은 유전자 공학적으로 결합시킨 항체의 유도체를 포함한다.
- [0405] 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편은, Nav1.7 에 특이적으로 결합하는 것이 특징이다. 이하, Nav1.7 특이적 결합능의 측정 순서의 일례를 기재한다.
- [0406] Nav1.7 의 특이적 결합은, 2 개의 분자가 특이적으로 결합하는지를 측정함으로써, 결합 활성으로서 평가할 수 있다. 예를 들어, 당해 기술 분야에서 주지된 방법 외에, 실시예 5 에 기재된 결합 ELISA 법, 표면 플라즈몬 공명 등을 들 수 있다.
- [0407] 결합 ELISA 법에 의한 Nav1.7 의 결합 결합 저해 활성의 저해율이 50 % 를 나타내는 항체의 유효 농도는, IC50 으로서 정의된다. IC50 은, 종종 항체의 결합 활성을 나타내는 지표 중 하나로서 사용된다. 본 발명의 모노클로날 항체의 IC50 값으로서 바람직하게는 2 nM 또는 그 미만이고, 보다 바람직하게는 1 nM 또는 그 미만, 특히 바람직하게는 0.6 nM 또는 그 미만이다.
- [0408] 표면 플라즈몬 공명에 의한 Nav1.7 의 결합 활성은, 평형 해리 정수 (KD) 로서 정의된다. 예를 들어, KD 가 작을수록, 보다 긴밀한 결합을 나타낸다. 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편의 KD 로서 바람직하게는 약 2 nM 또는 그 미만이고, 보다 바람직하게는 약 1 nM 또는 그 미만이다.
- [0409] 예를 들어, Nav1.7 에 대해 2 nM 또는 그 미만의 결합 활성을 갖는 항체는, IC50 및/또는 KD 가 2 nM 또는 그 미만인 Nav1.7 모노클로날 항체를 의미한다.
- [0410] 그러나, Nav1.7 을 특이적으로 결합하는 단리 항체는, 다른 종 유래의 Nav1.7 분자와 같은 다른 항원에 대한 교차 반응성을 나타내는 경우가 있다. 그럼에도 불구하고, 추가로, hNav1.7 및 1 이상의 추가적인 항원과 결합하는 다중 특이적 항체, 또는 hNav1.7 의 2 종의 상이한 영역 (예를 들어, 도메인 C 의 E1 세포외 루프 및 도메인 C 의 E3 세포외 루프) 과 결합하는 이중 특이적 항체는, hNav1.7 과 「특이적으로 결합하는」 항체로 간주된다.
- [0411] 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편은, Nav1.7 을 저해하는 것이 특징이다. 이하, Nav1.7 저해능의 측정 순서의 일례를 기재한다.

- [0412] Nav1.7 을 코딩하는 DNA 를 클로닝한 pcDNA3.1 (인비트로젠사 제조) 을 FreeStyle 293 세포 (Thermo Fisher Scientific 사 제조) 에 트랜스펙션함으로써 Nav1.7 안정 발현 세포를 구축한다. 이 세포를 사용하여 하기에 나타내는 방법에 의해 매뉴얼 패치 클램프를 실시함으로써, 항체의 Nav1.7 특이적인 저해를 평가할 수 있다. 폴리 L-리신 코팅한 유리편을, 35 mm 디시에 나열하고, 10 % FBS 함유 DMEM (SIGMA 사 제조) 에 현탁한 Nav1.7 안정 발현 세포를 과중한다 (4×10^4 cells/dish). 과중 다음날, 유리편을 측정 챔버로 옮겨 흡셀 형성하고, -70 mV 고정, 10 msec 구형파를 0.1 Hz 로 부여하면서 항체를 처치하여, 항체 처치 전과 처치 후 (> 2 min 처치) 에서 측정을 실시한다.
- [0413] 본 발명의 모노클로날 항체는, 본 명세서에 기재된 CDR 또는 중사슬 가변 영역/경사슬 가변 영역을 사용하여 당해 분야의 정법에 의해 제조할 수 있다.
- [0414] 본 발명의 모노클로날 항체는, 인간화 모노클로날 항체도 포함한다. 인간화 항체는 인간 체내에 있어서의 면역원성 (항원성) 이 저하되어 있기 때문에, 치료 목적 등으로 인간에게 투여하는 경우에 유용하다. 「면역원성이 낮다」란, 예를 들어, 치료 효과를 달성하는 데에 충분한 시간에 있어서, 투여된 본 발명의 모노클로날 항체가 생체에 의한 면역 응답을 유기 (誘起) 하지 않는 것을 의미한다. 인간에 있어서의 면역원성의 레벨은, T 세포 에피토프 예측 프로그램으로 예측할 수 있다. 예를 들어, T 세포 에피토프 예측 프로그램으로서, EpiBase (Lonza), iTope/TCED (Antitope), EpiMatrix (EpiVax) 등이 사용된다.
- [0415] 인간화 모노클로날 항체는, 인간 이외의 포유 동물, 예를 들어 마우스 항체의 상보성 결정 영역 (CDR ; complementarity determining region) 을 인간 항체의 프레임워크 영역 (FR ; framework region) 에 이식한 것이다. 따라서, 인간화 모노클로날 항체의 FR 은, 인간 유래의 것이다. 적당한 FR 은, Kabat E. A. 등의 문헌을 참조하면 선택할 수 있다. 이 경우의 FR 로는, CDR 이 양호한 항원 결합 부위를 형성하는 것이 선택된다. 필요에 따라, 재구성한 인간화 항체의 CDR 이 적절한 항원 결합 부위를 형성하도록 항체의 가변 영역의 FR 의 아미노산을 치환해도 된다 (Sato, K. 등, Cancer Res. 1993년, 제 53 권, 851 페이지). 치환되는 FR 의 아미노산의 비율은, 전체 FR 영역의 0 ~ 15 %, 바람직하게는 0 ~ 5 % 이다.
- [0416] 또한, 본 발명의 인간화 모노클로날 항체에는, 인간 항체의 정상 영역이 사용된다. 바람직한 인간 항체의 정상 영역으로는, 중사슬로는 C γ 를 들 수 있고, 예를 들어, C γ 1, C γ 2, C γ 3, C γ 4 를, 경사슬로는 C κ , C λ 를 사용할 수 있다. 또, 항체 또는 그 산생의 안정성을 개선하기 위해, 인간 항체의 정상 영역을 수식해도 된다. 인간화시에 사용되는 인간 항체는, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD 등 어떠한 아이소타입의 인간 항체여도 되지만, 본 발명에 있어서는 IgG 를 사용하는 것이 바람직하고, 나아가 IgG1 또는 IgG4 가 바람직하다. IgG1 을 선택하는 경우, 중사슬 정상 영역에 이펙터 기능을 저감시키기 위한 아미노산 변이를 갖는 것이 바람직하다. 바람직한 아미노산 변이로는, Kabat 의 numbering 에 있어서의 아미노산 잔기 N297, L234, L235, D265, 및/또는 P329 에 있어서, N297G/A, L234A, L235A, D265A, 및 P329G 등의 변이를 들 수 있다. IgG1 은, 이들 변이 중 어느 1 개 또는 복수의 조합을 포함하고 있어도 된다.
- [0417] 본 발명의 인간화 모노클로날 항체는, 바람직하게는 서열 번호 12 의 아미노산 서열의 경사슬 정상 영역 및 서열 번호 11 의 아미노산 서열의 중사슬 정상 영역을 갖고 있다. 단, 서열 번호 11 의 C 말단의 리신 또는 C 말단의 2 아미노산 잔기 (글리신-리신) 는, 존재하고 있어도 되고, 존재하고 있지 않아도 된다.
- [0418] 인간화 모노클로날 항체는 일반적인 제조 방법에 의해 제조할 수 있다 (예를 들어, 하기 실시예 4, WO 95/14041 호, WO 96/02576호 등 참조). 구체적으로는, 먼저 마우스 항체의 CDR 과 인간 항체의 FR 을 연결하도록 설계한 가변 영역을 코딩하는 DNA 서열을, 말단부에 오버랩되는 부분을 갖도록 제조한 몇 개의 올리고뉴클레오타이드로부터 PCR 법에 의해 합성한다 (WO 98/13388호 참조). 얻어진 DNA 를, 인간 항체의 정상 영역을 코딩하는 DNA 와 연결하고, 이어서 발현 벡터에 삽입한다. 또는, 항체의 가변 영역을 코딩하는 DNA 를, 항체의 정상 영역의 DNA 를 포함하는 발현 벡터에 삽입해도 된다. 본 발명에서 사용되는 항체를 제조하려면, 항체 유전자를 발현 제어 영역, 예를 들어, 인헨서/프로모터의 제어하에서 발현되도록 발현 벡터에 삽입한다. 다음으로, 이 발현 벡터에 의해 숙주 세포를 형질 전환하여, 항체를 발현시킬 수 있다.
- [0419] 상기의 형질 전환체의 숙주 세포로는, 예를 들어, COS 세포, CHO 세포 등의 척추동물 세포, 원핵세포, 효모 등을 들 수 있다. 형질 전환체는, 당업자에게 주지된 방법에 따라 배양할 수 있으며, 그 배양에 의해, 형질 전환체 세포내 또는 세포외에 본 발명의 모노클로날 항체가 산생된다. 그 배양에 사용되는 배지로는, 채용한 숙주 세포에 따라 관용되는 각종의 것을 적절히 선택할 수 있으며, 예를 들어, COS 세포인 경우, RPMI-1640 배지나 돌베코 수정 이글 최소 필수 배지 (DMEM) 등의 배지에, 필요에 따라 소 태아 혈청 (FBS) 등의 혈청 성분

을 첨가한 것을 사용할 수 있다. 그 형질 전환체의 배양시의 배양 온도는, 세포내의 단백질 합성능을 현저하게 저하시키지 않는 온도이면 어느 것이어도 되지만, 바람직하게는 32 ~ 42 °C, 가장 바람직하게는 37 °C 에서 배양하는 것이 바람직하다. 또 필요에 따라, 1 ~ 10 % (v/v) 의 탄산 가스를 포함하는 공기 중에서 배양할 수 있다.

- [0420] 상기에 의해 형질 전환체의 세포내 또는 세포외에 생산되는 본 발명의 모노클로날 항체를 포함하는 획분은, 그 단백질의 물리적 성질이나 화학적 성질 등을 이용한 각종 공지된 분리 조작법에 의해, 분리·정제할 수 있다. 이러한 방법으로는, 구체적으로는 예를 들어 통상적인 단백질 침전제에 의한 처리, 한외 여과, 분자체 크로마토그래피 (겔 여과), 흡착 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 어피니티 크로마토그래피, 고속 액체 크로마토그래피 (HPLC) 등의 각종 크로마토그래피, 투석법, 및 이들의 조합 등을 채용할 수 있다. 그 방법에 의해, 용이하게 고수율, 고순도로 본 발명의 모노클로날 항체를 제조할 수 있다.
- [0421] 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그 활성 단편은, 추가로, 폴리에틸렌글리콜 (PEG), 방사성 물질, 독신 등의 각종 분자에 의해 수식되어 있어도 된다. 항체의 수식 방법은 이 분야에서 공지된 방법을 이용할 수 있다.
- [0422] 또 본 발명의 모노클로날 항체는, 그 N 말단 혹은 C 말단에 다른 단백질을 융합시켜도 된다 (Clinical Cancer Research, 2004, 10, 1274-1281). 융합시키는 단백질은 당업자가 적절히 선택할 수 있다.
- [0423] 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편을 함유하는 의약 조성물 (본 발명의 의약 조성물) 은, 경구적 또는 비경구적으로 전신 혹은 국소적으로 투여할 수 있다. 비경구적 투여로는, 예를 들어, 점적 등의 정맥내 주사, 근육내 주사, 복강내 주사, 피하 주사, 비강내 투여, 흡입 등을 선택할 수 있다.
- [0424] 본 발명의 의약 조성물은, Nav1.7 관련 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 의약으로서 매우 유용하다.
- [0425] Nav1.7 관련 질환이란, 동통, 소양, 신경원성 염증, 기침 등을 들 수 있다.
- [0426] 「동통」으로는, 급성 동통, 만성 동통, 신경인성 동통, 염증성 동통, 관절염, 골관절염, 편두통, 군발 두통 증후군, 삼차 신경통, 포진성 신경통, 전신성 신경통, 신경 변성 질환, 운동 장애, 신경 내분비 장애, 실조증, 패혈증, 내장통, 급성 통풍, 헤르페스 후 신경통, 당뇨병성 신경 장애, 좌골 신경통, 배통, 두부 혹은 경부의 동통, 격통 혹은 난치성 동통, 돌발통, 수술 후의 아픔, 유전성 흥통증, 치통, 비염, 암 동통, 방광 장애 등을 들 수 있다.
- [0427] 「소양」으로는, 급성 소양, 만성 소양, 히스타민 의존 소양, 히스타민 비의존 소양 등을 들 수 있다.
- [0428] 「신경원성 염증」은, 천식, 관절염, 습진, 두통, 편두통, 혹은 건선, 또는 상기의 조합에 수반될 수 있다.
- [0429] 「기침」이란, 병리성 또는 만성적 기침을 들 수 있다.
- [0430] 본 발명의 의약 조성물의 유효 투여량은, 1 회에 대해 체중 1 kg 당 0.01 mg 내지 100 mg 의 범위에서 선택된다. 혹은, 환자당 5 ~ 5000 mg, 바람직하게는 10 ~ 500 mg 의 투여량을 선택할 수 있다. 그러나, 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편을 포함하는 의약 조성물은 이들 투여량에 제한되는 것은 아니다. 또, 투여 기간은, 환자의 연령, 증상에 따라 적절히 선택할 수 있다. 본 발명의 의약 조성물은, 투여 경로에 따라 의약적으로 허용되는 담체나 첨가물을 함께 포함하는 것이어도 된다. 이와 같은 담체 및 첨가물의 예로서, 물, 의약적으로 허용되는 유기 용매, 콜라겐, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈, 알긴산나트륨, 수용성 텍스트란, 펙틴, 메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 카세인, 디글리세린, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 바셀린, 인간 혈청 알부민 (HSA), 만니톨, 소르비톨, 락토오스, 의약 첨가물로서 허용되는 계면 활성제 등을 들 수 있다. 사용되는 첨가물은, 제형에 따라 상기 중에서 적절히 혹은 조합하여 선택되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0431] 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편은, 다른 유효 성분 혹은 다른 유효 성분을 포함하는 약제와 조합하여, 병용제로서 투여되어도 된다. 다른 유효 성분은, 예를 들어, 오피오이드, COX-2 저해제, 국소 마취제, NMDA 모듈레이터, 칸나비노이드 수용체 아고니스트, P2X 패밀리 모듈레이터, VR1 안타고니스트, 서브스텐스 P 안타고니스트, 항진간약 (가바펜틴, 프레가발린, 토피라메이트 등), 삼환계 항우울약 (아미트립틸린 등), 셀레록시브, 사이토카인 저해제 혹은 안타고니스트 (IL-6, IL-6R, IL-18 또는 IL-18R 에 대한 안타고니스트 등), Nav1.8 저해제, Nav1.9 저해제, NGF 저해제, Nav1.7 저해제 혹은 안타고니스트, Nav1.7 에 특이적인 다른 항체, Nav1.7 에 대한 폴리펩티드성 안타고니스트, siRNA, 안티센스 분자, 저분자량 약제, 단백질/폴리펩티드성 저해제 등을 들 수 있다.

- [0432] 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편과 다른 유효 성분의 병용제는, 1 개의 제제 중에 양 성분을 배합한 배합제의 형태로 투여해도 되고, 또 별개의 제제 (본 발명의 의약 조성물과 다른 유효 성분을 포함하는 약제) 로 하여 투여하는 형태를 취해도 된다. 이 별개의 제제로 하여 투여하는 경우에는, 동시 투여 및 시간차에 의한 투여가 포함된다. 또, 시간차에 의한 투여는, 본 발명의 의약 조성물을 먼저 투여하고, 다른 약제를 나중에 투여해도 되고, 다른 약제를 먼저 투여하고, 본 발명의 의약 조성물을 나중에 투여해도 상관없으며, 각각의 투여 방법은 동일해도 되고 상이해도 된다.
- [0433] 본 발명은, 본 발명의 모노클로날 항체의 중사슬 가변 영역 및/또는 경사슬 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 본 발명의 모노클로날 항체의 중사슬 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 추가로, 중사슬 정상 영역을 코딩하고 있어도 된다. 본 발명의 모노클로날 항체의 경사슬 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 추가로, 경사슬 정상 영역을 코딩하고 있어도 된다. 또, 본 발명은, 이들 폴리뉴클레오티드를 적어도 1 개 포함하는 발현 벡터를 포함한다.
- [0434] 그 폴리뉴클레오티드는, 본 발명의 모노클로날 항체의 중사슬 가변 영역 또는 경사슬 가변 영역을 코딩하는 한, 특별히 한정되지 않고, 복수의 대옥시리보 핵산 (DNA) 또는 리보 핵산 (RNA) 등의 뉴클레오티드로 이루어지는 중합체이다. 천연 이외의 염기를 포함하고 있어도 된다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 항체를 유전자 공학적인 수법에 의해 제조하기 위해 사용할 수 있다. 또 본 발명의 모노클로날 항체와 동등한 기능을 갖는 항체를 스크리닝하기 위해, 프로브로서 사용할 수도 있다. 즉 본 발명의 모노클로날 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 그 일부를 프로브로서 사용하여, 하이브리다이제이션, 유전자 증폭 기술 (예를 들어 PCR) 등의 기술에 의해, 그 폴리뉴클레오티드와 스트린젠트한 조건하에서 하이브리다이징하고, 또한 본 발명의 모노클로날 항체와 동등한 활성을 갖는 항체를 코딩하는 DNA 를 얻을 수 있다. 이와 같은 DNA 도 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 포함된다.
- [0435] 하이브리다이제이션 기술 (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989) 은 당업자에게 잘 알려진 기술이다. 하이브리다이제이션의 조건으로는, 예를 들어, 저스트린젠트한 조건을 들 수 있다. 저스트린젠트한 조건이란, 하이브리다이제이션 후의 세정에 있어서, 예를 들어 42 °C, 0.1 × SSC, 0.1 % SDS 의 조건이고, 바람직하게는 50 °C, 0.1 × SSC, 0.1 % SDS 의 조건이다. 보다 바람직한 하이브리다이제이션의 조건으로는, 고스트린젠트한 조건을 들 수 있다. 고스트린젠트한 조건이란, 예를 들어 65 °C, 5 × SSC 및 0.1 % SDS 의 조건이다. 이들 조건에 있어서, 온도를 올릴수록 높은 상동성을 갖는 폴리뉴클레오티드가 효율적으로 얻어지는 것을 기대할 수 있다. 단, 하이브리다이제이션의 스트린젠시에 영향을 미치는 요소로는 온도나 염 농도 등 복수의 요소가 생각되며, 당업자라면 이들 요소를 적절히 선택함으로써 동일한 스트린젠시를 실현하는 것이 가능하다.
- [0436] 이들 하이브리다이제이션 기술이나 유전자 증폭 기술에 의해 얻어지는 폴리뉴클레오티드가 코딩하는, 본 발명의 모노클로날 항체와 기능적으로 동등한 항체는, 통상적으로, 이들 항체와 아미노산 서열에 있어서 높은 상동성을 갖는다. 본 발명의 모노클로날 항체에는, 본 발명의 모노클로날 항체와 기능적으로 동등하고, 또한 그 항체의 아미노산 서열과 높은 상동성을 갖는 항체도 포함된다. 높은 상동성이란, 아미노산 레벨에 있어서, 통상적으로, 적어도 75 % 이상의 동일성, 바람직하게는 85 % 이상의 동일성, 더욱 바람직하게는 95 % 이상의 동일성을 가리킨다. 폴리펩티드의 상동성을 결정하려면, 문헌 (Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730) 에 기재된 알고리즘에 따르면 된다.
- [0437] 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편은, Nav1.7 에 특이적으로 결합하기 때문에, 생체 시료에 있어서 Nav1.7 을 검출하기 위해 사용할 수 있다. 생체 시료로는, 혈액, 혈장, 혈청, 요, 장기, 조직, 골수, 림프절 등을 들 수 있다. 그 때문에, 본 발명의 모노클로날 항체를 함유하는 키트는 Nav1.7 검출용 키트로서 이용 가능하다. 그 키트는, 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편을 포함하고, 추가로, 표지 2 차 항체, 표지의 검출에 필요한 기질, 담체, 세정 버퍼, 시료 희석액, 효소 기질, 반응 정지액, 정제된 표준 물질로서의 Nav1.7 단백질, 사용 설명서 등을 포함하고 있어도 된다.
- [0438] 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편은, 하기 중 어느 것, 혹은 모든 우수한 특징을 갖고 있다.
- [0439] a) Nav1.7 의 도메인 C 의 E3 세포외 루프 C 말단 영역에 강한 결합 활성을 갖는다.
- [0440] b) 동통 억제에 대한 강한 약효를 갖는다.
- [0441] c) 인간화 후의 인간에 대한 면역원성이 낮다.

- [0442] d) 인간화 후의 동등 억제에 대한 약효의 지속 시간이 길다.
- [0443] e) 다른 서브타입인, hNav1.1, hNav1.2, hNav1.3, hNav1.4, hNav1.5, hNav1.6, hNav1.8 및 hNav1.9 의 E3 세포의 루프 C 말단 영역의 에피토프 부위에 상당하는 펩티드에 대한 선택성이 매우 높다.
- [0444] 실시예
- [0445] 이하에 본 발명의 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명하지만, 본 발명은 이들에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0446] 실시예 1 : Nav1.7 항체의 조제
- [0447] 인간 Nav1.7 (UniProtKB/Swiss-Prot : Q15858) 의 도메인 C, E3 세포의 루프 C 말단 영역에 상당하는 펩티드 (1424-QPKYEYSL (서열 번호 1)-1431 ; hCE3C 펩티드) 를 항원으로로서 선정하였다.
- [0448] hCE3C 펩티드의 N 말단에 Cys 잔기를 부여한 펩티드 (CQPKYEYSL (서열 번호 2) ; Cys-hCE3C) 를 합성하고 (도레이 주식회사 제조), 말레이미드화 giant keyhole limpets 헤모시아닌 (말레이미드화 KLH, Thermo Scientific 사 제조) 에 결합시켜, 면역원을 조제하였다. 이 펩티드-KLH 복합체를 프로인트 완전 애주번트와 함께 A/J Jms Slc 자성 마우스에 면역시켰다. 그 후, 추가로 프로인트 불완전 애주번트와 함께 5 회 면역시켰다.
- [0449] 최종 면역의 3 일 후에 비장을 적출하고, 비장 세포와 마우스 미엘로마 세포 (p3 × 6363-Ag8., 도쿄 중류 연구소) 를 PEG 법으로 융합시키고, 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함하는 배지에서 선택하였다. 인간 Nav1.7 결합 항체는, 하이브리도마의 배양 상청을 사용하여, 면역원 펩티드에 대한 ELISA 를 실시함으로써 동정하였다. 구체적으로는, 항마우스 IgG 항체 고상화 플레이트에 하이브리도마 배양 상청을 첨가하고, ELISA 용 세정 버퍼로 2 회 세정한 후에, 비오틴 표지한 면역원 펩티드 (Cys-hCE3C) 와 Streptavidin-HRP (PIERCE 사 제조) 를 첨가하여 4 ℃ 에서 하룻밤 반응시켰다. ELISA 용 세정 버퍼로 2 회 세정하고, TMB-Substrate Chromogen (써모피셔 사이언티픽사 제조) 을 첨가하여 발색시킨 후에, 등량의 0.5 N 의 황산으로 반응을 정지하고, 450 nm 에 있어서의 흡광도를 측정하였다. ELISA 에 있어서 강한 결합 시그널을 나타낸 하이브리도마를 클론화하여 수립하였다.
- [0450] 실시예 2 : 항체 서열의 결정
- [0451] 수립한 클론의 하이브리도마 세포로부터, 통상적인 방법에 따라 마우스 모노클로날 항체 15H11 의 중사슬 가변 영역 및 경사슬 가변 영역의 아미노산 서열을 결정하였다 (표 1).

표 1

mAb	가변 영역	서열 번호	서열 번호	가변 영역	서열 번호	서열 번호
15H11	중사슬	3	CDR1 4	경사슬	7	CDR1 8
			CDR2 5			CDR2 9
			CDR3 6			CDR3 10

- [0452]
- [0453] 실시예 3 : 항체 서열의 얼라인먼트
- [0454] 15H11 의 중사슬 및 경사슬의 아미노산 서열에 대해 항체 서열 해석 소프트웨어 abYsis 를 사용한 Kabat numbering 을 실시하였다 (도 1).
- [0455] 실시예 4 : 항체의 인간화
- [0456] 15H11 에 대해, 하기의 방법으로 인간화를 실시하였다. 15H11 의 중사슬 및 경사슬의 V 유전자 영역 서열과 유사한 인간 생식계 억셉터 서열을 서열 해석 소프트웨어 AbYsis 에서 검색하고, 선택하였다. 또 J 사슬 영역에 대해서는, 마우스 항체 DNA 서열과 상동성이 높은 서열을 IMGT (<http://www.imgt.org/>) 에서 복수 검색하고, 인간 프레임워크 서열로 하였다. 이 인간 프레임워크 서열에 대해, Kabat numbering (Wu, T. T. and Kabat, E. A., J Exp. Med. Aug 1 ; 132 (2) : 211-50. (1970)) 에 의해 정의된 마우스 항체 중사슬 CDR1, CDR2, CDR3 및 마우스 항체 경사슬 CDR1, CDR2, CDR3 을 이식함으로써 표 2 의 인간화 항체 서열 (CDR graft 체) 을 설계하였다. 또한, h15H11 의 정상 영역에는, 중사슬에는 hIgG4Pro (서열 번호 11) 를, 경사슬에는

hIgK (서열 번호 12) 를 사용하였다. 인간화 항체 서열 (CDR graft 체) 을, Expi293 세포를 사용하여 배양 상청 중에 발현시키고, 그 상청 중에 존재하는 항체에 대해, 후술하는 방법으로 단위 IgG 량당 에피토프 펩티드에 대한 역가 (ratio) 를 산출하여, 표 2 에 나타냈다.

[0457] 상청 중의 IgG 량은 이하의 방법에 의해 실시하였다. 상청 중의 IgG 량을 평가하기 위해, 항인간 IgG 항체 (Jackson 사 제조) 고상화 플레이트에, 배양 상청을 첨가하여 실온에서 3 시간 반응시킨 후에, ELISA 용 세정 버퍼로 2 회 세정하고, HRP 표지 항인간 IgG 항체 (Jackson 사 제조) 를 4 °C 에서 하룻밤 반응시켰다. ELISA 용 세정 버퍼로 2 회 세정하고, TMB-Substrate Chromogen (써모피셔 사이언티픽사 제조) 을 첨가하여 발색시킨 후에, 등량의 0.5 N 의 황산으로 반응을 정지하고, 450 nm 에 있어서의 흡광도를 측정하여 OD 가 1.0 이 되는 배양 상청의 희석 배율 (A) 를 산출하였다.

[0458] 상청 중 IgG 의 에피토프 펩티드에 대한 역가는 이하의 방법에 의해 실시하였다. 상청 중의 IgG 의 에피토프 펩티드에 대한 역가를 평가하기 위해, 항인간 IgG 항체 (Jackson 사 제조) 고상화 플레이트에, 배양 상청을 첨가하여 실온에서 3 시간 반응시킨 후에, ELISA 용 세정 버퍼로 2 회 세정하고, 비오틴 표지한 에피토프 펩티드 (Cys-CE3C long : 서열 번호 13) 와 Streptavidin-HRP (PIERCE 사 제조) 를 첨가하여 4 °C 에서 하룻밤 반응시켰다. ELISA 용 세정 버퍼로 2 회 세정하고, TMB-Substrate Chromogen (써모피셔 사이언티픽사 제조) 을 첨가하여 발색시킨 후에, 등량의 0.5 N 의 황산으로 반응을 정지하고, 450 nm 에 있어서의 흡광도를 측정하여, OD 가 1.0 이 되는 배양 상청의 희석 배율 (B) 를 산출하였다.

[0459] 단위 IgG 량당 에피토프 펩티드 (Cys-CE3C long : 서열 번호 13) 에 대한 역가 (ratio) 는, (B)/(A) 로서 산출하였다. 표 2 의 결과로부터, 인간화 15H11 의 경사슬 인간 프레임워크 서열로는 IGKV7-3, 중사슬 인간 프레임워크 서열로는 IGHV7-4-1 (R94P), IGHV1-2 (R94P), IGHV1-18 (R94P), IGHV1-3 (R94P) 이 적합한 것을 알 수 있었다.

표 2

경사슬		중사슬		
프레임워크	가변 영역 서열 번호	프레임워크	가변 영역 서열 번호	(B) / (A)
IGKV7-3	1 4	IGHV1-2	1 9	0.04
		IGHV1-2 (R94P)	2 0	0.22
		IGHV1-3 (R94P)	2 1	0.21
		IGHV1-18 (R94P)	2 2	0.24
		IGHV1-46 (R94P)	2 3	0.18
		IGHV7-4-1 (R94P)	2 4	0.26
IGKV1-39	1 5	IGHV1-2	1 9	0.03
		IGHV1-2 (R94P)	2 0	0.14
		IGHV1-3 (R94P)	2 1	0.12
		IGHV1-18 (R94P)	2 2	0.13
		IGHV1-46 (R94P)	2 3	0.09
		IGHV7-4-1 (R94P)	2 4	0.16
IGKV3-11	1 6	IGHV1-2	1 9	0.05
		IGHV1-2 (R94P)	2 0	0.15
		IGHV1-3 (R94P)	2 1	0.12
		IGHV1-18 (R94P)	2 2	0.15
		IGHV1-46 (R94P)	2 3	0.12
		IGHV7-4-1 (R94P)	2 4	0.18
IGKV3-20	1 7	IGHV1-2	1 9	0.04
		IGHV1-2 (R94P)	2 0	0.12
		IGHV1-3 (R94P)	2 1	0.12
		IGHV1-18 (R94P)	2 2	0.13
		IGHV1-46 (R94P)	2 3	0.09
		IGHV7-4-1 (R94P)	2 4	0.15
IGKV4-1	1 8	IGHV1-2	1 9	0.03
		IGHV1-2 (R94P)	2 0	0.18
		IGHV1-3 (R94P)	2 1	0.15
		IGHV1-18 (R94P)	2 2	0.13
		IGHV1-46 (R94P)	2 3	0.13
		IGHV7-4-1 (R94P)	2 4	0.21

[0460]

[0461]

또한, 인간화 항체 서열 (CDR graft 체) 의 인간 프레임워크 서열에 변이를 도입 (백 뮤테이션) 함으로써, 마우스 항체인 15H11 과 대략 동등한 친화성이 되도록 에피토프 펩티드에 대한 친화성의 회복을 시도하였다. IGKV7-3 및 IGHV7-4-1 (R94P) 을 사용하여, 경사슬에 대해, 표 3 에 나타내는 지점에 백 뮤테이션을 도입한 변이체를 제조하고, 실시예 5 에 나타내는 방법으로 에피토프 펩티드에 대한 친화성을 평가한 결과, Y36F (Kabat 의 numbering 에 의한 L36 아미노산 부위가 Y 로부터 F 에 변이 도입됐다는 의미이며, 이하 동일하다.) 가 명확한 친화성 향상을, T72S, T74N, V78M 이 약한 친화성 향상 경향을 나타냈다. 표 3 에 있어서 ○ 는 명확한 친화성 향상을, △ 는 약한 친화성 향상을, × 는 친화성 향상이 보이지 않는 것을 의미한다.

표 3

경사슬 변이	친화성 향상 경향
A9V	×
T22Y	×
Y36F	○
T72S	△
T74N	△
N76H	×
V78M	△
A80E	×
N81D	×
N85M	×
Y87F	×

※아미노산 부위는 Kabat 의 numbering 에 의한 부위

[0462]

[0463]

또, 마우스 항체인 15H11 을 사용하여, 경사슬에 대해, 표 4 에 나타내는 지점에 인간화 변이를 도입한 변이체를 제조한 결과, F36Y 가 명확한 친화성 저하를, M85N 이 약한 친화성 저하 경향을 나타냈다. 표 4 에 있어서 ○ 는 명확한 친화성 저하를, △ 는 약한 친화성 저하를, × 는 친화성 저하가 보이지 않는 것을 의미한다.

표 4

경사슬 변이	친화성 저하 경향
V9A	×
Y22T	×
F36Y	○
S72T	×
N74T	×
H76N	×
M78V	×
E80A	×
D81N	×
M85N	△
F87Y	×

※아미노산 부위는 Kabat 의 numbering 에 의한 부위

[0464]

[0465]

추가로, IGKV7-3 및 IGHV1-2 (R94P) 를 사용하여, 중사슬에 대해, 표 5 에 나타내는 지점에 백 뮤테이션을 도입한 변이체를 제조한 결과, Q43R, G44S 가 명확한 친화성 향상을 나타냈다. 표 5 에 있어서 ○ 는 명확한 친화성 향상을, × 는 친화성 향상이 보이지 않는 것을 의미한다.

표 5

중사슬 변이	친화성 향상 경향
V5Q, A9P	×
V11L, K12L	×
A40S, P41H	×
Q43R, G44S	○
T73K	×

※아미노산 부위는 Kabat 의 numbering 에 의한 부위

[0466]

[0467]

상기 서술한 결과로부터, 경사슬에 대해 Y36F, V78M, N85M, T72S, T74N 을, 중사슬에 대해 Q43R, G44S, R94P 를 선택하고, 그들을 조합한 변이체를 표 6 과 같이 제조하고, 그 에피토프 펩티드 (Cys-CE3C long : 서열 번호 13) 에 대한 친화성을 평가하였다. 마우스 15H11 의 친화성에 대한 각 변이체의 친화성의 비율을 Fold change (FC ; 변이체의 친화성 (IC50)/마우스 15H11 의 친화성 (IC50)) 로서 계산한 결과, 마우스 15H11 의 친화성에 가까운 친화성을 얻기 위해 필요한 중사슬 백 뮤테이션으로서 Q43R, G44S, R94P 를, 경사슬 백 뮤테이션으로서 Y36F, V78M 을 동정하였다. h15H11 (IGHV7-4-1 Q43R, G44S, R94P/IGKV7-3 Y36F, V78M), h15H11 (IGHV1-2 Q43R, G44S, R94P/IGKV7-3 Y36F, V78M) 에 대해 in vivo 약효 평가 모델로 평가한 결과, 쌍방 모두 강력한 약리 효과, 즉 동통 억제 작용을 나타냈다. 또한, 이들 약리 효과는 WO 2019/230856 의 실시예 7 에 기재된 방법에 의해 측정할 수 있다.

표 6

중사슬 가변 영역			경사슬 가변 영역			FC
프레임 워크	변이	서열 번호	프레임 워크	변이	서열 번호	
IGHV7-4-1	Q43R, G44S, R94P	25	IGKV7-3	Y36F, V78M, N85M	27	1.8
				Y36F, V78M	28	1.8
				Y36F, N85M	29	3.2
				Y36F, T72S, T74N	30	2.9
IGHV1-2	Q43R, G44S, R94P	26		Y36F, V78M, N85M	27	1.5
				Y36F, V78M	28	1.5
				Y36F, N85M	29	1.9
				Y36F, T72S, T74N	30	2.0
			Y36F	31	1.9	
mouse		3	mouse		7	1

※아미노산 부위는 Kabat 의 numbering 에 의한 부위

[0468]

[0469]

실시예 5 : 친화성 평가

[0470]

본 명세서의 실시예 4, 6 및 7 에서, 항체의 에피토프 펩티드 (Cys-CE3C long : 서열 번호 13) 에 대한 친화성을 이하에 나타내는 경합 ELISA 법에 의해 측정하였다.

[0471]

항인간 IgG 항체 고상화 플레이트에, 취득한 리콤비넨트 인간화 항체의 희석액과 비오틴 표지한 면역원 펩티드와 Streptavidin-HRP (PIERCE 사 제조) 를 첨가하여 4 °C 에서 하룻밤 반응시켰다. ELISA 용 세정 버퍼로 2 회 세정하고, TMB-Substrate Chromogen (썬모피셔 사이언티픽사 제조) 을 첨가하여 발색시킨 후에, 등량의 0.5 N 의 황산으로 반응을 정지하고, 450 nm 에 있어서의 흡광도를 측정하여, OD 가 1.1 이 되는 각각의 리콤비넨트 인간 항체의 희석 배율을 산출하였다. 다음으로 그 희석 배율의 리콤비넨트 인간 항체와 비오틴 표지한 면역원 펩티드와 Streptavidin-HRP (PIERCE 사 제조) 를 첨가하였다. 이것과 동시에 미표지의 면역원 펩티드의 희석 계열을 첨가하여, 4 °C 에서 하룻밤 반응시켰다. ELISA 세정액으로 2 회 세정 후, TMB-Substrate Chromogen (썬모피셔 사이언티픽사 제조) 을 첨가하여 발색시킨 후에, 등량의 0.5 N 의 황산으로 반응을 정지하고, 450 nm 에 있어서의 흡광도를 측정하였다. 비오틴 표지 펩티드의 시그널을 2 분의 1 로 감

약하는 미표지 펩티드의 농도를 친화성 (IC50) 으로 하였다.

[0472] 실시예 6 : 인간화 15H11 의 결합에 중요한 아미노산의 특정

[0473] 실시예 4 에서 제조한 인간화 항체 h15H11 (중사슬 가변 영역 : IGHV7-4-1 Q43R, G44S, R94P (서열 번호 25)/경사슬 가변 영역 : IGKV7-3 Y36F, V78M (서열 번호 28)) 에 대해 항체 서열 해석 소프트웨어 abYsis 를 사용하여 Kabat 의 numbering 및 CDR 의 정의를 실시하였다. 이 결과를 도 2 에 나타낸다. 인간화 15H11 의 결합에 중요한 아미노산을 특정하기 위해, h15H11 (중사슬 가변 영역 : IGHV7-4-1 Q43R, G44S, R94P (서열 번호 25)/경사슬 가변 영역 : IGKV7-3 Y36F, V78M (서열 번호 28)) 을 기본 골격으로 하고, 15H11 의 각 CDR 서열 (서열 번호 4 ~ 6, 서열 번호 8 ~ 10, 이하, 야생형 CDR 이라고 한다.) 에 점변이를 도입한 변이체를 제조하였다. 그 친화성을 실시예 5 에 기재한 방법으로 산출하고, 야생형 CDR 의 친화성 (IC50) 에 대한 각 CDR 변이체의 친화성 (IC50) 의 비 (CDR 변이체의 IC50/야생형 CDR 의 IC50) 를 Fold change (FC) 로서 산출하였다. 중사슬의 결과를 표 7 에, 경사슬의 결과를 표 8 에 나타낸다. n. d. 는 not detectable 을 의미한다. 그 결과, 중사슬의 M34, A101 및 경사슬의 Q90, P95, W96 은 그 아미노산을 다른 아미노산으로 치환하면, 이 펩티드에 대한 결합 활성이 검출 한계 이하가 되었다. 이 점에서, 경사슬의 Q90, P95, W96 및 중사슬의 M34, A101 은 결합에 특히 중요한 아미노산인 것으로 생각된다. 또, 중사슬의 N33, N52, I57, F63, S95, Y96, G98, 및 경사슬의 F32, N34, Q89, S91, F94 는 그 아미노산을 다른 아미노산으로 치환하면 1.5 배 이상 친화성이 저하되었다. 이 점에서, 경사슬의 F32, N34, Q89, S91, F94, 중사슬의 N33, N52, I57, F63, S95, Y96, G98 은, 결합에 중요한 아미노산인 것으로 생각된다.

표 7

중사슬 변이체		FC
CDR1	D31E	0.92
	Y32F	1.14
	N33Q	1.72
	M34L	n.d
CDR2	R50K	0.91
	I51L	1.40
	N52Q	1.70
	P52aG	1.07
	K53R	1.03
	N54Q	0.96
	N54D	1.09
	V56L	0.92
	I57L	1.69
	N58Q	0.94
	S59T	0.80
	N60Q	1.46
	E61D	0.96
	K62R	1.14
	F63L	1.58
	K64R	1.12
D65E	1.03	
CDR3	S95T	2.45
	Y96R	1.59
	Y97F	0.92
	G98A	1.92
	G99A	1.34
	N100Q	1.01
	T100aS	0.81
	D100bE	1.17
	A101V	n.d
Y102F	1.20	

※아미노산 부위는 Kabat 의 numbering 에 의한 부위

[0474]

표 8

경사슬 변이체		FC
CDR1	R24K	1.07
	A25V	1.21
	S26T	1.11
	E27D	0.92
	S27aT	1.08
	V27bL	0.82
	D27cE	0.80
	N27dQ	1.04
	Y28F	0.88
	G29A	1.44
	S31T	1.14
	F32L	1.76
	M33L	0.88
	N34Q	1.80
CDR2	A50V	1.36
	A51V	0.85
	S52T	0.90
	S53T	0.96
	Q54N	0.91
	G55A	0.90
	S56T	0.88
CDR3	Q89N	1.75
	Q90N	n.d
	S91T	2.01
	K92R	0.90
	E93D	1.21
	F94L	2.46
	P95G	n.d
	W96Y	n.d
T97S	1.17	

※아미노산 부위는 Kabat 의 numbering 에 의한 부위

[0475]

[0476]

실시예 7 항체의 친화성 향상

[0477]

15H11 의 친화성 향상체를 제조할 목적에서, 실시예 6 에 있어서, FC > 1.5 를 나타내어 항체의 친화성 향상에 기여하고 있는 것으로 동정된 아미노산, 및 FC < 1 을 나타낸 항체의 친화성 향상에 기여할 가능성이 있는 아미노산을 중심으로 실시예 4 의 인간화 항체 h15H11 (중사슬 가변 영역 : IGHV7-4-1 Q43R, G44S, R94P (서열 번호 25)/경사슬 가변 영역 : IGKV7-3 Y36F, V78M (서열 번호 28)) 을 야생형 항체 (h15H11-wt) 로 하여, 어느 것의 CDR 에 아미노산 변이를 갖는 다양한 변이체를 제조하였다. 실시예 5 에 기재된 방법으로 친화성 평가를 실시하여, 표 9 및 표 10 에 나타내는 43 종의 친화성 향상체 (h15H11-1 ~ 43) 를 얻었다.

표 9

mAb	경사슬 가변 영역		중사슬 가변 영역		IC50 (nM)
	경사슬 CDR 에 있어서의 변이 부위	서열 번호	중사슬 CDR 에 있어서의 변이 부위	서열 번호	
h15H11-1	E27D, M33L	55	D31E, N58L, N100D, T100aD	32	0.47
h15H11-2	E27D, M33L	55	N58L, N100D, T100aD	33	0.48
h15H11-3	WT	28	D31E, N58L, N100D, T100aD	32	0.50
h15H11-4	WT	28	N58L, N100D, T100aD	33	0.51
h15H11-5	E27D, M33L	55	D31E, N58L, N100D	34	0.52
h15H11-6	E27D, M33L	55	N100D, T100aD	35	0.57
h15H11-7	E27D, M33L	55	D31E, N58L, T100aD	36	0.58
h15H11-8	WT	28	N58L, T100aD	37	0.60
h15H11-9	E27D, M33L	55	N58L, T100aD	37	0.61
h15H11-10	WT	28	D31E, N58L, T100aD	36	0.61
h15H11-11	E27D, M33L	55	N58L, N100D	38	0.62
h15H11-12	WT	28	D31E, N58L, N100D	34	0.62
h15H11-13	E27D, M33L	55	D31E, T100aD	39	0.64
h15H11-14	WT	28	N100D, T100aD	35	0.66
h15H11-15	WT	28	N58L, N100D	38	0.66
h15H11-16	WT	28	D31E, T100aD	39	0.68
h15H11-17	E27D, M33L	55	T100aD	40	0.70
h15H11-18	A25V, E27D, M33L	56	T100aD	40	0.74
h15H11-19	E27D, M33L	55	D31E, N100D	41	0.74
h15H11-20	WT	28	T100aD	40	0.77

*아미노산 부위는 Kabat 의 numbering 에 의한 부위

[0478]

표 10

mAb	경사슬 가변 영역		중사슬 가변 영역		IC50 (nM)
	경사슬 CDR 에 있어서의 변이 부위	서열 번호	중사슬 CDR 에 있어서의 변이 부위	서열 번호	
h15H11-21	E27D, M33L	55	D31E, N58L	42	0.80
h15H11-22	WT	28	D31E, N100D	41	0.80
h15H11-23	E27D, M33L	55	D31E, T100aS	43	0.83
h15H11-24	E27D, M33L	55	D31E, N58Q, T100aS	44	0.85
h15H11-25	WT	28	D31E, N58L	42	0.86
h15H11-26	A25V, E27D, M33L	56	N100D	45	0.88
h15H11-27	A25V, E27D, M33L	56	N58L	46	0.91
h15H11-28	WT	28	D31E, T100aS	43	0.91
h15H11-29	WT	28	N58L	46	0.91
h15H11-30	E27D, M33L	55	N100D	45	0.92
h15H11-31	WT	28	D31E, N58Q, T100aS	44	0.93
h15H11-32	A25V, E27D, M33L	56	D31E, T100aS	43	0.95
h15H11-33	E27D, M33L	55	N58Q, T100aS	47	0.98
h15H11-34	E27D, M33L	55	D31E, Y97F, N100Q, T100aS	48	0.99
h15H11-35	E27D, M33L	55	T100aQ	49	1.00
h15H11-36	E27D, M33L	55	S59L	50	1.02
h15H11-37	A25V, E27D, M33L	56	T100aQ	49	1.04
h15H11-38	A25V, E27D, M33L	56	N58K	51	1.04
h15H11-39	E27D, M33L	55	S59Y	52	1.05
h15H11-40	A25V, E27D, M33L	56	S59L	50	1.06
h15H11-41	E27D, M33L	55	Y97F, T100aS	53	1.07
h15H11-42	WT	28	N100K	54	0.83
h15H11-43	I30F	57	WT	25	0.83
h15H11-WT	WT	28	WT	25	1.44

※아미노산 부위는 Kabat 의 numbering 에 의한 부위

[0479]

[0480] 표 11 및 12 에, 표 9 및 10 에 기재된 각 항체의 각 CDR 의 서열 번호를 기재한다.

표 11

mAb	중사슬			경사슬		
	CDR 1	CDR 2	CDR 3	CDR 1	CDR 2	CDR 3
h15H11-1	58	59	64	72	9	10
h15H11-2	4	59	64	72	9	10
h15H11-3	58	59	64	8	9	10
h15H11-4	4	59	64	8	9	10
h15H11-5	58	59	65	72	9	10
h15H11-6	4	5	64	72	9	10
h15H11-7	58	59	66	72	9	10
h15H11-8	4	59	66	8	9	10
h15H11-9	4	59	66	72	9	10
h15H11-10	58	59	66	8	9	10
h15H11-11	4	59	65	72	9	10
h15H11-12	58	59	65	8	9	10
h15H11-13	58	5	66	72	9	10
h15H11-14	4	5	64	8	9	10
h15H11-15	4	59	65	8	9	10
h15H11-16	58	5	66	8	9	10
h15H11-17	4	5	66	72	9	10
h15H11-18	4	5	66	73	9	10
h15H11-19	58	5	65	72	9	10
h15H11-20	4	5	66	8	9	10

[0481]

표 12

mAb	중사슬			경사슬		
	CDR 1	CDR 2	CDR 3	CDR 1	CDR 2	CDR 3
h15H11-21	58	59	6	72	9	10
h15H11-22	58	5	65	8	9	10
h15H11-23	58	5	67	72	9	10
h15H11-24	58	60	67	72	9	10
h15H11-25	58	59	6	8	9	10
h15H11-26	4	5	65	73	9	10
h15H11-27	4	59	6	73	9	10
h15H11-28	58	5	67	8	9	10
h15H11-29	4	59	6	8	9	10
h15H11-30	4	5	65	72	9	10
h15H11-31	58	60	67	8	9	10
h15H11-32	58	5	67	73	9	10
h15H11-33	4	60	67	72	9	10
h15H11-34	58	5	68	72	9	10
h15H11-35	4	5	69	72	9	10
h15H11-36	4	61	6	72	9	10
h15H11-37	4	5	69	73	9	10
h15H11-38	4	62	6	73	9	10
h15H11-39	4	63	6	72	9	10
h15H11-40	4	61	6	73	9	10
h15H11-41	4	5	70	72	9	10
h15H11-42	4	5	71	8	9	10
h15H11-43	4	5	6	74	9	10
h15H11-WT	4	5	6	8	9	10

[0482]

- [0483] 또한, 표 9 ~ 표 12 에 기재된 항체의 각 CDR 서열은 그 공통성으로부터 이하와 같이 정리하여 표현할 수 있다.
- [0484] 중사슬의 CDR1 은, Xaa1-Y-N-M-H (여기서 Xaa1 은 D 또는 E 이다 : 서열 번호 75) 의 5 아미노산으로 구성된다.
- [0485] 중사슬의 CDR2 는, R-I-N-P-K-N-G-V-I-Xaa1-Xaa2-N-E-K-F-K-D (여기서 Xaa1 은 N, L, Q 또는 K 이고, Xaa2 는 S, L 또는 Y 이다 : 서열 번호 76) 의 17 아미노산으로 구성된다.
- [0486] 중사슬의 CDR3 은, S-Y-Xaa1-G-G-Xaa2-Xaa3-D-A-Y (여기서 Xaa1 은 Y 또는 F 이고, Xaa2 는 N, D, Q 또는 K 이고, Xaa3 은 T, D, S 또는 Q 이다 : 서열 번호 77) 의 10 아미노산으로 구성된다.
- [0487] 경사슬의 CDR1 은, R-Xaa1-S-Xaa2-S-V-D-N-Y-G-Xaa3-S-F-Xaa4-N (여기서 Xaa1 은, A 또는 V 이고, Xaa2 는 E 또는 D 이고, Xaa3 은 I 또는 F 이고, Xaa4 는 M 또는 L 이다 : 서열 번호 78) 의 15 아미노산으로 구성된다.
- [0488] 경사슬의 CDR2 는 서열 번호 9 의 7 아미노산으로 구성된다.
- [0489] 경사슬의 CDR3 은 서열 번호 10 의 9 아미노산으로 구성된다.
- [0490] 실시예 8 변이체 제조
- [0491] 실시예 7 에서 제조한 h15H11-2 (중사슬 가변 영역 : IGHV7-4-1 Q43R, G44S, N58L, N100D, T100aD, R94P (서열 번호 33)/경사슬 가변 영역 : IGKV7-3 E27D, M33L, Y36F, V78M (서열 번호 55)) 의 경사슬 인간 프레임워크 서열에 다양한 변이를 도입한 변이체 (h15H11-44 ~ 54) 를 제조하였다. 제조한 변이체에 대해, 실시예 5 에 기재된 방법으로 친화성 평가를 실시하였다. 얻어진 결과를 표 13 에 나타낸다.
- [0492] IGHV7-4-1 Q43R, G44S, N58L, N100D, T100aD, R94P (서열 번호 33) 로 나타내는 중사슬 가변 영역 및 실시예 3 에서 제조한 IGKV4-1 (서열 번호 18) 로 나타내는 경사슬 가변 영역을 갖는 변이체를 제조하였다. 제조한 변이체의 경사슬 인간 프레임워크 서열에 다양한 변이를 도입한 새로운 변이체 (h15H11-55 ~ 67) 를 제조하고, 실시예 5 에 기재된 방법으로 친화성 평가를 실시하였다. 얻어진 결과를 표 14 에 나타낸다.

표 13

mAb	중사슬 가변 영역			경사슬 가변 영역			IC50 (nM)
	프레임 워크	중사슬 변이	서열 번호	프레임 워크	경사슬 변이	서열 번호	
h15H11-44	IGHV7-4-1	Q43R, G44S, N58L, N100D, T100aD, R94P	33	IGKV7-3	E27D, M33L, Y36F, V78M, N81E	79	0.51
h15H11-45					E27D, M33L, Y36F, V78M, N81A	80	0.50
h15H11-46					E27D, M33L, Y36F, V78M, N81Q	81	0.50
h15H11-47					E27D, M33L, Y36F, V78M, N81F	82	0.53
h15H11-48					E27D, M33L, Y36F, V78M, N81L	83	0.51
h15H11-49					E27D, M33L, Y36F, V78M, N81V	84	0.62
h15H11-50					E27D, M33L, Y36F, V78M, N81I	85	0.55
h15H11-51					E27D, M33L, Y36F, V78M, N81D	86	0.63
h15H11-52					E27D, M33L, Y36F, V78M, N81R	87	0.50
h15H11-53					E27D, M33L, Y36F, V78M, N81G	88	0.55
h15H11-54					E27D, M33L, Y36F, V78M, D82P	89	0.72

*아미노산 부위는 Kabat 의 numbering 에 의한 부위

[0493]

표 14

mAb	중사슬 가변 영역			경사슬 가변 영역			IC50 (nM)
	프레임 워크	중사슬 변이	서열 번호	프레임 워크	경사슬 변이	서열 번호	
h15H11-55	IGHV7-4-1	Q43R, G44S, N58L, N100D, T100aD, R94P	33	IGKV4-1	Y36F, L78M, V85M	90	0.82
h15H11-56					Y36F, S76N, S77P, L78M	91	0.85
h15H11-57					Y36F, L78M	92	0.89
h15H11-58					E27D, M33L, Y36F, L78M, V85M	93	0.78
h15H11-59					E27D, M33L, Y36F, S76N, S77P, L78M	94	0.80
h15H11-60					E27D, M33L, Y36F, L78M	95	0.79
h15H11-61					E27D, M33L, Y36F, S76N, S77P, L78M, Q79E, V83T, V85N	96	0.79
h15H11-62					E27D, M33L, Y36F, L78M, Q79E	97	0.73
h15H11-63					E27D, M33L, Y36F, L78M, V83T	98	0.64
h15H11-64					E27D, M33L, Y36F, D60A, L78M	99	0.68
h15H11-65					E27D, M33L, Y36F, D60A, L78M, V85M	100	0.75
h15H11-66					M4L, D9A, E27D, M33L, Y36F, D60A, L78M	101	0.53
h15H11-67					M4L, D9A, E17Q, E27D, M33L, Y36F, D60A, L78M	102	0.46

*아미노산 부위는 Kabat 의 numbering 에 의한 부위

[0494]

[0495]

표 13 및 표 14 에 기재된 각 항체의 각 CDR 의 서열 번호를 나타낸다. h15H11-44 ~ h15H11-54, h15H11-58 ~ h15H11-67 은, 서열 번호 4 의 중사슬 CDR1 서열, 서열 번호 59 의 중사슬 CDR2 서열 및 서열 번호 64 의 중사슬 CDR3 서열 그리고 서열 번호 72 의 경사슬 CDR1 서열, 서열 번호 9 의 경사슬 CDR2 서열 및 서열 번호 10 의 경사슬 CDR3 서열을 갖는다. h15H11-55 ~ h15H11-57 은, 서열 번호 4 의 중사슬 CDR1 서열, 서열 번호 59 의 중사슬 CDR2 서열 및 서열 번호 64 의 중사슬 CDR3 서열 그리고 서열 번호 8 의 경사슬 CDR1 서열, 서열 번호 9 의 경사슬 CDR2 서열 및 서열 번호 10 의 경사슬 CDR3 서열을 갖는다. 표 15 에도 동일한 내용을 기재한다.

표 15

mAb	중사슬			경사슬		
	CDR 1	CDR 2	CDR 3	CDR 1	CDR 2	CDR 3
h15H11-44 ~ h15H11-54 및 h15H11-58 ~ h15H11-67	4	59	64	72	9	10
h15H11-55 ~ h15H11-57	4	59	64	8	9	10

[0496]

[0497]

또한, 표 13 및 표 14 에 기재된 항체의 중사슬 가변 영역 서열은 서열 번호 33 으로 나타내고, 각 경사슬 가변

영역 서열은 그 공통성으로부터 이하와 같이 정리하여 표현할 수 있다.

- [0498] h15H11-44 ~ h15H11-53 의 경사슬 가변 영역 서열은, 서열 번호 55 (IGKV7-3 (E27D, M33L, Y36F, V78M)) 의 Kabat numbering 에 의한 N81 위치의 아미노산 잔기가 E, A, Q, F, L, V, I, D, R 또는 G 로 치환되어 있는 서열로 이루어진다.
- [0499] h15H11-58 ~ h15H11-65 의 경사슬 가변 영역 서열은, 서열 번호 95 (IGKV4-1 (E27D, M33L, Y36F, L78M)) 의 Kabat numbering 에 의한 76, 77, 79, 83 및 85 위치의 1 ~ 5 의 아미노산이 변이되어 있어도 되는 서열로 표현된다.
- [0500] 실시예 9 약효 평가
- [0501] (9-1) 래트 좌골 신경 부분 결찰 모델 (Partial Sciatic Nerve Ligation 모델) 의 제조
- [0502] 이소플루란 마취하에서, 래트의 좌측의 대퇴 상부의 피부를 절개하고, 근육을 갈라 좌골 신경을 노출시켰다. 좌골 신경의 약 절반을 나일론실로 강하게 결찰하여, 근육 및 피부를 봉합하였다. 이것을 수술측으로 하였다. 우지 (右肢) 에 대해서는 좌골 신경 결찰 이외의 동일한 처치를 실시하여, 가짜 수술측으로 하였다.
- [0503] (9-2) 정맥내 투여에 의한 약효 평가
- [0504] (9-1) 에서 제조한 래트를 사용하여, 수술의 약 2 주일 후, 본 프레이 필라멘트에 의해 기계적 알로디니아에 대한 작용을 평가하였다. 철망 상에 올린 플라스틱제 케이지에 래트를 넣고, 순화 후에 평가를 실시하였다. 항체의 투여 전후에, 철망측으로부터 래트의 족저에 본 프레이 필라멘트 (0.4 ~ 26 g) 를 사용하여, 가는 필라멘트부터 순서대로 갖다 대어, 래트가 도피 행동을 나타내는 최소의 필라멘트의 압치 (壓値) 를 동통 임계값으로 하였다. 좌우의 후지 (後肢) 에 대해 동통 임계값을 평가하였다. 수술 후의 동통 임계값이 0.6 ~ 2 g, 또한 가짜 수술측의 동통 임계값이 8 ~ 15 g 인 동물을 약효 평가에 채용하였다. 항체를 생리 식염수로 5, 15, 50 mg/kg 이 되도록 조제하여 정맥내 투여하였다. 투여 5 시간 후, 좌우 후지의 동통 임계값을 평가하였다. 하기의 방법에 의해 %reversal 값을 산출하고, 화합물의 동통 억제 효과로서 비교하였다.
- [0505] %reversal 값 = (수술측 투여 후의 동통 임계값의 로그 - 수술측 투여 전의 동통 임계값의 로그)/(가짜 수술측 투여 전의 동통 임계값의 로그 - 수술측 투여 전의 동통 임계값의 로그)
- [0506] 특허문헌 8 의 실시예 4 에 기재된 h12H4 와 본 발명에 포함되는 h15H11-66 의 결과를 도 3 에 나타낸다. h15H11-66 은, 5 mg/kg 의 정맥내 투여에 의해, 동통에 대해 유의한 약효를 나타냈다. h15H11-66 의 5 mg/kg 의 정맥내 투여는, h12H4 의 50 mg/kg 의 정맥내 투여와 동일한 정도의 동통 억제 효과를 나타냈다.
- [0507] 산업상 이용가능성
- [0508] 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편은, 생체 시료에 있어서 Nav1.7 을 검출하기 위해 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그 항체 단편을 포함하는 의약 조성물은, Nav1.7 관련 질환의 치료 또는 예방을 위한 의약으로서 매우 유용하다.

도면
도면1

Kabat Number m15H11 VK (SEQ ID NO.7)	LFR1										CDR-L1																											
	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L27	L27	L27	L27	L30	L31	L32	L33	L34		
	D	I	V	L	T	Q	S	P	V	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	Y	C	R	A	S	E	S	V	D	N	Y	G	I	S	F	M	N

L35	L36	L37	L38	L39	L40	L41	L42	L43	L44	L45	L46	L47	L48	L49	L50	L51	L52	L53	L54	L55	L56	L57	L58	L59	L60	L61	L62	L63	L64	L65	L66	L67	L68	L69	L70	L71	L72	LFR2										LFR3									
																																						W	F	Q	Q	K	P	G	Q	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	Q	G

L73	L74	L75	L76	L77	L78	L79	L80	L81	L82	L83	L84	L85	L86	L87	L88	L89	L90	L91	L92	L93	L94	L95	L96	L97	L98	L99	L100	L101	L102	L103	L104	L105	L106	L107	L108	L109	LFR3										LFR4									
																																					L	N	I	H	P	M	E	E	D	T	A	M	Y	F	C	Q	S	K	E	F

(상단) 15H11 의 경사슬 기반 영역 (서열 번호 7) 및 (하단) 15H11 의 중사슬 기반 영역 (서열 번호 3) 의 Kabat numbering 의 결과

Kabat Number m15H11 VH (SEQ ID NO.3)	HFR1										CDR-H1										HFR2																		
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39
	E	V	Q	L	Q	S	G	P	E	L	K	P	G	A	S	V	K	I	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	D	Y	N	M	H	W	V	K	Q	S	

H41	H42	H43	H44	H45	H46	H47	H48	H49	H50	H51	H52	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62	H63	H64	H65	H66	H67	H68	H69	H70	H71	H72	H73	H74	H75	H76	H77	H78	H79	CDR-H2										HFR3									
																																							H	G	R	S	L	E	W	I	G	R	I	N	P	K	N	G	V	I	N	S

H80	H81	H82	H83	H84	H85	H86	H87	H88	H89	H90	H91	H92	H93	H94	H95	H96	H97	H98	H99	H100	H101	H102	H103	H104	H105	H106	H107	H108	H109	H110	H111	H112	H113	H114	H115	H116	H117	H118	H119	H120	H121	H122	H123	H124	H125	H126	H127	H128	H129	H130	H131	H132	H133	H134	H135	H136	H137	H138	H139	H140	HFR3										CDR-H3										HFR4									
																																																													M	D	L	R	S	L	T	S	E	D	S	A	V	F	C	A	P	S	Y	Y	G	N	T	I	D	A	Y	W	G	H

도면2

Kabat Number H15H11 (GNV-3 (Y8F, V78M)) (SEQ ID NO.2 b)	LFR1																																			
	CDR-L1					LFR2																														
	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L27	L27	L27	L27	L31	L32	L33	L34	
D	I	V	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	P	G	Q	R	A	T	I	C	R	A	S	E	S	V	D	N	Y	G	I	S	F	M	N

Kabat number H15H11 (GNV-4-1 (Q9K, G4S, R9P)) (SEQ ID NO.2 b)	LFR3																																				
	CDR-L2					LFR4																															
	L35	L36	L37	L38	L39	L40	L41	L42	L43	L44	L45	L46	L47	L48	L49	L50	L51	L52	L53	L54	L55	L56	L57	L58	L59	L60	L61	L62	L63	L64	L65	L66	L67	L68	L69	L70	L71
W	F	Q	K	P	G	Q	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	Q	G	S	G	V	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T		

Kabat number H15H11 (GNV-4-1 (Q9K, G4S, R9P)) (SEQ ID NO.2 b)	LFR4																																				
	CDR-L3					LFR5																															
	L73	L74	L75	L76	L77	L78	L79	L80	L81	L82	L83	L84	L85	L86	L87	L88	L89	L90	L91	L92	L93	L94	L95	L96	L97	L98	L99	L100	L101	L102	L103	L104	L105	L106	L107	L108	L109
L	T	I	N	P	E	A	N	D	T	A	N	Y	C	Q	S	K	E	F	P	N	T	F	G	T	K	V	E	I	K	R	T						

(상단) h15H11의 경사슬 가변 영역 (서열 번호 26) 및 (하단) h15H11의 중사슬 가변 영역 (서열 번호 25)의 Kabat numbering의 결과

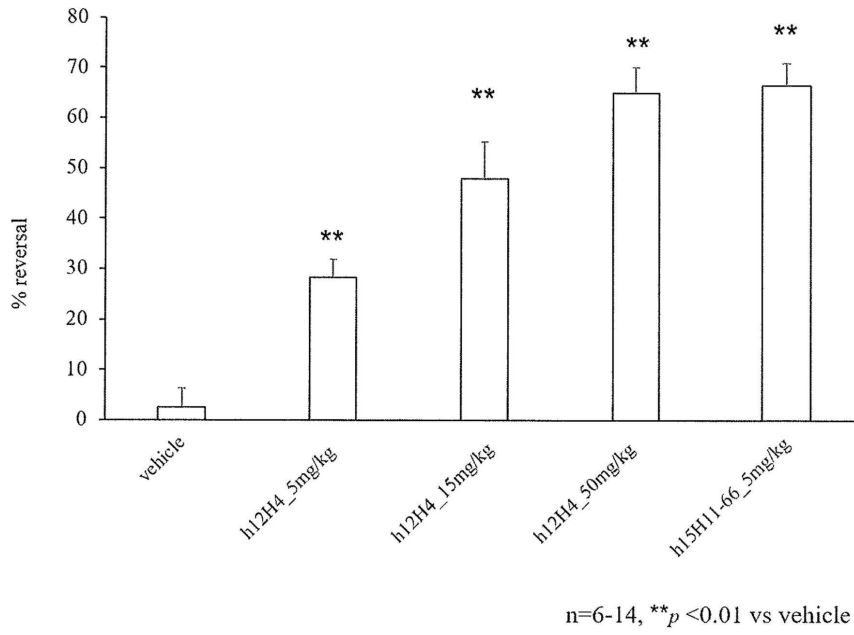
Kabat number H15H11 (GNV-4-1 (Q9K, G4S, R9P)) (SEQ ID NO.2 b)	HFR1																																						
	CDR-H1					HFR2																																	
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39
Q	V	Q	L	V	Q	S	G	S	E	L	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	D	Y	N	M	M	N	V	R	Q	A

Kabat number H15H11 (GNV-4-1 (Q9K, G4S, R9P)) (SEQ ID NO.2 b)	HFR3																																						
	CDR-H3					HFR4																																	
	H41	H42	H43	H44	H45	H46	H47	H48	H49	H50	H51	H52	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62	H63	H64	H65	H66	H67	H68	H69	H70	H71	H72	H73	H74	H75	H76	H77	H78	H79
P	G	R	S	L	E	W	I	G	R	I	N	P	K	N	G	V	I	N	S	N	E	K	F	K	D	R	F	V	F	S	L	D	T	S	V	S	I	A	Y

Kabat number H15H11 (GNV-4-1 (Q9K, G4S, R9P)) (SEQ ID NO.2 b)	HFR5																																									
	CDR-H5					HFR6																																				
	H80	H81	H82	H83	H84	H85	H86	H87	H88	H89	H90	H91	H92	H93	H94	H95	H96	H97	H98	H99	D	DA	DB	DC	DD	DE	DF	DG	DH	DI	DD	DF	DI	DF	DI	DF	DI	DF	DI	DF	DI	
L	Q	I	S	S	L	K	A	E	D	I	A	Y	Y	C	A	P	S	Y	G	N	I	D	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S							

도면3

좌골 신경 부분 결찰 모델에 대한 정맥내 투여에 의한 약효 평가



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.