(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-543139
(P2024-543139A)
(43)公表日　令和6年11月19日(2024.11.19)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07K 16/22	*(2006.01)*	C07K	16/22		4B065
C07K 16/46	*(2006.01)*	C07K	16/46	ZNA	4C084
C12N 1/15	*(2006.01)*	C12N	1/15		4H045
C12N 1/19	*(2006.01)*	C12N	1/19		
C12N 1/21	*(2006.01)*	C12N	1/21		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全73頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-531129(P2024-531129)
(86)(22)出願日　令和4年11月23日(2022.11.23)
(85)翻訳文提出日　令和6年7月17日(2024.7.17)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/080428
(87)国際公開番号　WO2023/097275
(87)国際公開日　令和5年6月1日(2023.6.1)
(31)優先権主張番号　63/282,590
(32)優先日　令和3年11月23日(2021.11.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/383,173
(32)優先日　令和4年11月10日(2022.11.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　522439847
インベテックス インコーポレイテッド
ＩＮＶＥＴＸ，ＩＮＣ．
アメリカ合衆国 ０２１０８ マサチューセッツ州 ボストン ワシントン ストリート ２０１ ワン ボストン プレイス スイート ３９３０
(74)代理人　100103610
弁理士　▲吉▼田 和彦
(74)代理人　100109070
弁理士　須田 洋之
(74)代理人　100119013
弁理士　山崎 一夫
(74)代理人　100123777
弁理士　市川 さつき
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　抗ＮＧＦ抗体及びその使用

(57)【要約】
本発明は、ＮＧＦとＴｒｋＡ及び／またはｐ７５との会合を阻害し、イヌまたはネコ対象への投与に適した新規抗ＮＧＦタンパク質、抗体、及びそのＮＧＦ結合断片を提供する。本発明はまた、有効量の抗ＮＧＦタンパク質、抗体またはその断片を投与することを含む、イヌまたはネコ対象における疼痛を治療するかまたは鎮痛効果を誘発する新規組成物及び方法を提供する。この方法及び組成物は、ＮＧＦ関連障害を治療または予防するために使用される。
【選択図】図５

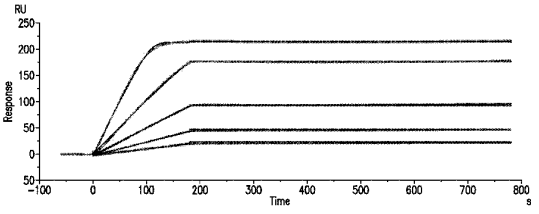


FIG. 5

【特許請求の範囲】
【請求項１】
神経成長因子（ＮＧＦ）に特異的に結合する抗原結合タンパク質であって、
（ａ）アミノ酸配列$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$（配列番号１４６）を含む重鎖相補性決定領域１（ＶＨ－ＣＤＲ１）であって、式中、X_1が、Ａ、Ｇ、またはＮを含み、X_2が、ＬまたはＭを含み、X_3が、Ａ、Ｄ、Ｅ、またはＳを含み、X_4が、Ｆ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、またはＶを含み、X_5が、ＮまたはＴを含み、X_6が、Ｅ、Ｓ、またはＴを含み、X_7が、Ｇ、Ｈ、Ｎ、Ｓ、またはＱを含み、X_8が、ＡまたはＳを含む、前記ＶＨ－ＣＤＲ１、
（ｂ）アミノ酸配列$X_1X_2SNX_5GT$（配列番号１４７）を含む重鎖相補性決定領域２（ＶＨ－ＣＤＲ２）であって、式中、X_1が、ＩまたはＬを含み、X_2が、ＷまたはＹを含み、X_5が、ＧまたはＲを含む、前記ＶＨ－ＣＤＲ２、
（ｃ）アミノ酸配列$AX_2IX_4X_5YX_7X_8X_9YLX_{12}X_{13}YX_{15}X_{16}X_{17}$（配列番号１４８）を含む重鎖相補性決定領域３（ＶＨ－ＣＤＲ３）であって、式中、X_2が、Ｄ、Ｅ、Ｋ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、またはＴを含み、X_4が、ＷまたはＹを含み、X_5が、Ｆ、Ｈ、Ｗ、またはＹを含み、X_7が、ＤまたはＥを含み、X_8が、ＡまたはＳを含み、X_9が、ＤまたはＹを含み、X_{12}が、ＨまたはＹを含み、X_{13}が、ＦまたはＷを含み、X_{15}が、Ｆ、Ｉ、Ｌ、Ｗ、またはＹを含み、X_{16}が、ＤまたはＱを含み、X_{17}が、Ｆ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｗ、またはＹを含む、前記ＶＨ－ＣＤＲ３、
（ｄ）アミノ酸配列$X_1X_2IX_4X_5X_6$（配列番号１４９）を含む軽鎖相補性決定領域１（ＶＬ－ＣＤＲ１）であって、式中、X_1が、Ｄ、Ｅ、またはＫを含み、X_2が、Ａ、Ｇ、またはＮを含み、X_4が、Ｇ、Ｎ、Ｑ、またはＳを含み、X_5が、ＮまたはＳを含み、X_6が、Ａ、Ｇ、Ｎ、Ｓ、またはＴを含む、前記ＶＬ－ＣＤＲ１、
（ｅ）アミノ酸配列AX_2X_3（配列番号１５０）を含む軽鎖相補性決定領域２（ＶＬ－ＣＤＲ２）であって、式中、X_2が、Ａ、Ｓ、またはＴを含み、X_3が、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、またはＴを含む、前記ＶＬ－ＣＤＲ２、及び
（ｆ）アミノ酸配列$QX_2GX_4X_5X_6PX_8T$（配列番号１５１）を含む軽鎖相補性決定領域３（ＶＬ－ＣＤＲ３）であって、式中、X_2が、ＨまたはＱを含み、X_4が、Ｆ、Ｈ、Ｗ、またはＹを含み、X_5が、ＫまたはＱを含み、X_6が、ＦまたはＷを含み、X_8が、ＬまたはＭを含む、前記ＶＬ－ＣＤＲ３
を含む、前記抗原結合タンパク質。
【請求項２】
（ａ）アミノ酸配列$X_1X_2X_3X_4TX_6X_7S$（配列番号１５２）を含む重鎖相補性決定領域１（ＶＨ－ＣＤＲ１）であって、式中、X_1が、ＡまたはＧを含み、X_2が、ＬまたはＭを含み、X_3が、ＥまたはＳを含み、X_4が、ＦまたはＬを含み、X_6が、ＳまたはＴを含み、X_7が、Ｈ、Ｎ、またはＳを含む、前記ＶＨ－ＣＤＲ１、
（ｂ）アミノ酸配列$IWSNX_5GT$（配列番号１５３）を含む重鎖相補性決定領域２（ＶＨ－ＣＤＲ２）であって、式中、X_5が、ＧまたはＲを含む、前記ＶＨ－ＣＤＲ２、
（ｃ）アミノ酸配列$AX_2IYYYX_7ADYLHX_{13}YX_{15}DX_{17}$（配列番号１５４）を含む重鎖相補性決定領域３（ＶＨ－ＣＤＲ３）であって、式中、X_2が、Ｎ、Ｑ、またはＳを含み、X_7が、ＤまたはＥを含み、X_{13}が、ＦまたはＷを含み、X_{15}が、Ｆ、Ｉ、Ｌ、Ｗ、またはＹを含み、X_{17}が、Ｆ、Ｉ、Ｌ、またはＭを含む、前記ＶＨ－ＣＤＲ３、
（ｄ）アミノ酸配列$X_1GIX_4NX_6$（配列番号１５５）を含む軽鎖相補性決定領域１（ＶＬ－ＣＤＲ１）であって、式中、X_1が、ＤまたはＥを含み、X_4が、ＱまたはＳを含み、X_6が、Ｇ、Ｎ、Ｓ、またはＴを含む、前記ＶＬ－ＣＤＲ１、
（ｅ）アミノ酸配列ATX_3（配列番号１５６）を含む軽鎖相補性決定領域２（ＶＬ－ＣＤＲ２）であって、式中、X_3が、Ｄ、Ｅ、Ｎ、Ｑ、またはＳを含む、前記ＶＬ－ＣＤＲ２、及び
（ｆ）アミノ酸配列$QQGX_4X_5X_6PLT$（配列番号１５７）を含む軽鎖相補性決定領域３（ＶＬ－ＣＤＲ３）であって、式中、X_4が、Ｆ、Ｈ、またはＹを含み、X_5が、

ＫまたはＱを含み、X_6が、ＦまたはＷを含む、前記ＶＬ－ＣＤＲ３
を含む、請求項１に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項３】
配列番号１３７と比較してＶＨ－ＣＤＲ当たり２つ以下の置換を含み、配列番号１３８と比較してＶＬ－ＣＤＲ当たり２つ以下の置換を含む、請求項１または２に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項４】
配列番号１３７と比較してＶＨ－ＣＤＲ当たり１つ以下の置換を含み、配列番号１３８と比較してＶＬ－ＣＤＲあたり１つ以下の置換を含む、請求項１または２に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項５】
配列番号１、配列番号３、配列番号５、配列番号７、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、配列番号３１、配列番号５５、配列番号５９、配列番号６１、配列番号６９、配列番号７７、配列番号１０３、配列番号１０９、配列番号１１３、配列番号１２１、配列番号１３３、配列番号１３７、配列番号１４１、または配列番号２０７のいずれか１つのＶＨ－ＣＤＲを１つ以上、及び配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、配列番号３２、配列番号５６、配列番号６０、配列番号６２、配列番号７０、配列番号７８、配列番号１０４、配列番号１１０、配列番号１１４、配列番号１２２、配列番号１３４、配列番号１３８、または配列番号１４２のＶＬ－ＣＤＲを１つ以上含む、請求項１に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項６】
配列番号１、配列番号３、配列番号５、配列番号７、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、配列番号３１、配列番号５５、配列番号５９、配列番号６１、配列番号６９、配列番号７７、配列番号１０３、配列番号１０９、配列番号１１３、配列番号１２１、配列番号１３３、配列番号１３７、配列番号１４１、または配列番号２０７のいずれか１つのＶＨ－ＣＤＲ、及び配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、配列番号３２、配列番号５６、配列番号６０、配列番号６２、配列番号７０、配列番号７８、配列番号１０４、配列番号１１０、配列番号１１４、配列番号１２２、配列番号１３４、配列番号１３８、または配列番号１４２のＶＬ－ＣＤＲを含む、請求項１に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項７】
２１６６、ＳＣ－４２＿００６、ＳＣ－４２＿００７、ＳＣ－４２＿００８、ＳＣ－４２＿０１０、ＳＣ－４２＿０１１、ＳＣ－４２＿０２３、ＳＣ－４２＿０３２、ＳＣ－４２＿０４５、ＳＣ－４２＿０４７、ＳＣ－４２＿０４８、ＳＣ－４２＿０５２、ＳＣ－４２＿０７０、ＳＣ－４２＿０７３、ＳＣ－４２＿０７７、ＳＣ－４２＿０８２、ＳＣ－４２＿０９０、またはＳＣ－４２＿１０１のＶＨ－ＣＤＲ及びＶＬ－ＣＤＲを含む、請求項１に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項８】
前記ＣＤＲが、ＩＭＧＴ系に従う、請求項１～７のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項９】
前記ＣＤＲが、Ｋａｂａｔに従う、請求項１～７のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項１０】
前記ＣＤＲが、Ｃｈｏｔｈｉａに従う、請求項１～７のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項１１】
配列番号１、配列番号３、配列番号５、配列番号７、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、配列番号３１、配列番号５５、配列番号５９、配列番号６１、配列番号６９、配列番号７７、配列番号１０３、配列番号１０９、配列番号１１３、配列番号１２１、配

列番号１３３、配列番号１３７、配列番号１４１、または配列番号２０７と少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９３％、または少なくとも９５％同一である重鎖フレームワーク（ＦＲ１Ｈ＋ＦＲ２Ｈ＋ＦＲ３Ｈ＋ＦＲ４Ｈ）を含む、請求項１～７のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項１２】

配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、配列番号３２、配列番号５６、配列番号６０、配列番号６２、配列番号７０、配列番号７８、配列番号１０４、配列番号１１０、配列番号１１４、配列番号１２２、配列番号１３４、配列番号１３８、または配列番号１４２と少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９３％、または少なくとも９５％同一である軽鎖フレームワーク（ＦＲ１Ｌ＋ＦＲ２Ｌ＋ＦＲ３Ｌ＋ＦＲ４Ｌ）を含む、請求項１～１１のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項１３】

配列番号１、配列番号３、配列番号５、配列番号７、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、配列番号３１、配列番号５５、配列番号６１、配列番号６９、配列番号７７、配列番号１０３、配列番号１０９、配列番号１１３、配列番号１２１、配列番号１３３、配列番号１３７、配列番号１４１、または配列番号２０７と少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９３％、または少なくとも９５％同一であるV_Hドメインを含む、請求項１～１２のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項１４】

配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、配列番号３２、配列番号５６、配列番号６２、配列番号７０、配列番号７８、配列番号１０４、配列番号１１０、配列番号１１４、配列番号１２２、配列番号１３４、配列番号１３８、または配列番号１４２と少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９３％、または少なくとも９５％同一であるV_Lドメインを含む、請求項１～１３のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項１５】

ＮＧＦに特異的に結合する抗原結合タンパク質であって、

（ａ）アミノ酸配列X_1Ｌ$X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ＭX_{10}を含む重鎖相補性決定領域１（ＶＨ－ＣＤＲ１）であって、式中、X_1が、Ａ、Ｇ、Ｌ、Ｎ、またはＱを含み、X_3が、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｍ、Ｓ、Ｔ、またはＹを含み、X_4が、Ｌ、Ｍ、またはＶを含み、X_5が、Ａ、Ｍ、Ｎ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、またはＶを含み、X_6が、Ａ、Ｅ、Ｇ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｓ、またはＴを含み、X_7が、Ａ、Ｄ、Ｈ、Ｉ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、Ｔ、またはＹを含み、X_8が、ＡまたはＳを含み、X_{10}が、ＳまたはＶが含む、前記ＶＨ－ＣＤＲ１、

（ｂ）アミノ酸配列$X_1X_2X_3X_4X_5$ＧＴX_8ＹX_{10}ＤX_{12}ＶX_{14}を含む重鎖相補性決定領域２（ＶＨ－ＣＤＲ２）であって、式中、X_1が、ＩまたはＬを含み、X_2が、ＷまたはＹを含み、X_3が、Ａ、Ｐ、またはＳを含み、X_4が、Ｄ、Ｅ、Ｎ、Ｑ、Ｒ、またはＳを含み、X_5が、Ｇ、Ｒ、またはＹを含み、X_8が、ＤまたはＹを含み、X_{10}が、Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｓ、またはＴを含み、X_{12}が、ＤまたはＳを含み、X_{14}が、Ｄ、Ｅ、またはＫを含む、前記ＶＨ－ＣＤＲ２、

（ｃ）アミノ酸配列$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$Ｌ$X_{12}X_{13}X_{14}$Ｆ$X_{16}X_{17}$を含む重鎖相補性決定領域３（ＶＨ－ＣＤＲ３）であって、式中、X_1が、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｋ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、またはＴを含み、X_2が、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、またはＹを含み、X_3が、Ｉ、Ｌ、Ｗ、またはＹを含み、X_4が、Ｆ、Ｔ、Ｗ、またはＹを含み、X_5が、Ｆ、Ｈ、またはＹを含み、X_6が、ＨまたはＹを含み、X_7が、ＤまたはＥを含み、X_8が、Ａ、Ｓ、またはＶを含み、X_9が、Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｎ、Ｑ、またはＹを含み、X_{10}が、Ｆ、Ｈ、またはＹを含み、X_{12}が、Ｈま

たはＹを含み、X_{13}が、ＦまたはＷを含み、X_{14}が、Ｄ、Ｉ、Ｌ、Ｗ、またはＹを含み、X_{16}が、ＤまたはＱを含み、X_{17}が、Ｅ、Ｆ、Ｈ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｗ、またはＹを含む、前記ＶＨ－ＣＤＲ３、

（ｄ）アミノ酸配列X_1ＡＳ$X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ＬX_{11}を含む軽鎖相補性決定領域１（ＶＬ－ＣＤＲ１）であって、式中、X_1が、ＦまたはＲを含み、X_4が、Ｅ、Ｋ、またはＮを含み、X_5が、ＡまたはＧを含み、X_6が、Ｉ、Ｌ、またはＶを含み、X_7が、Ａ、Ｄ、Ｇ、Ｌ、Ｐ、Ｑ、Ｓ、Ｖ、またはＹを含み、X_8が、Ｋ、Ｑ、Ｎ、Ｓ、またはＹを含み、X_9が、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｋ、Ｌ、Ｎ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、またはＴを含み、X_{11}が、Ａ、Ｇ、またはＳを含む、前記ＶＬ－ＣＤＲ１、

（ｅ）アミノ酸配列Ａ$X_2X_3X_4X_5X_6X_7$を含む軽鎖相補性決定領域２（ＶＬ－ＣＤＲ２）であって、式中、X_2が、Ａ、Ｄ、Ｌ、Ｑ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、またはＹを含み、X_3が、Ｄ、Ｅ、Ｋ、Ｎ、Ｑ、またはＳを含み、X_4が、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、またはＶを含み、X_5が、ＨまたはＬを含み、X_6が、Ｈ、Ｉ、Ｌ、またはＭを含み、X_7が、Ｄ、Ｅ、Ｎ、Ｓ、またはＴを含む、前記ＶＬ－ＣＤＲ２、

（ｆ）アミノ酸配列ＱＱ$X_3X_4X_5X_6X_7X_8$Ｔを含む軽鎖相補性決定領域３（ＶＬ－ＣＤＲ３）であって、式中、X_3が、ＧまたはＹを含み、X_4が、Ｄ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｋ、Ｌ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、またはＹを含み、X_5が、Ｅ、Ｋ、Ｑ、Ｒ、またはＳを含み、X_6が、Ｉ、Ｆ、Ｔ、またはＷを含み、X_7が、ＥまたはＰを含み、X_8が、Ｌ、Ｍ、またはＷを含む、前記ＶＬ－ＣＤＲ３

を含む、前記抗原結合タンパク質。

【請求項１６】

ＶＨ－ＣＤＲ１が、ＧＬＳＬＴＳX_7ＳＭX_{10}を含み、式中、X_7が、Ａ、Ｄ、またはＮを含み、X_{10}が、ＳまたはＶを含み、

ＶＨ－ＣＤＲ２が、X_1X_2ＳＮX_5ＧＴを含み、式中、X_1が、ＩまたはＬを含み、X_2が、ＷまたはＹを含み、X_5が、ＧまたはＲを含み、

ＶＨ－ＣＤＲ３が、ＡＳＩＹＹＹX_7ＡX_9ＹＬＨＷＹＦＤX_{12}を含み、式中、X_7が、ＤまたはＥを含み、X_9が、ＤまたはＥを含み、X_{12}が、ＥまたはＦを含み、

ＶＬ－ＣＤＲ１が、ＲＡＳX_4ＧＩX_7X_8ＮＬＳを含み、式中、X_4が、ＥまたはＫを含み、X_7が、Ａ、Ｑ、またはＳを含み、X_8が、ＫまたはＮを含み、

ＶＬ－ＣＤＲ２が、Ａ$X_2X_3X_4$ＬＨＳを含み、式中、X_2が、ＱまたはＴを含み、X_3が、ＤまたはＳを含み、X_4が、Ｉ、Ｎ、またはＶを含み、

ＶＬ－ＣＤＲ３が、ＱＱＧX_4ＫＷＰＬＴを含み、式中、X_4が、Ｆ、Ｗ、またはＹを含む、請求項１５に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項１７】

配列番号２０４と比較してＶＨ－ＣＤＲ当たり２つ以下の置換を含み、配列番号１９９と比較してＶＬ－ＣＤＲ当たり２つ以下の置換を含む、請求項１５または１６に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項１８】

配列番号２０４と比較してＶＨ－ＣＤＲ当たり１つ以下の置換を含み、配列番号１９９と比較してＶＬ－ＣＤＲあたり１つ以下の置換を含む、請求項１５または１６に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項１９】

配列番号１４１、配列番号１８４、配列番号１８５、配列番号１８６、配列番号１８７、配列番号１８８、配列番号１８９、配列番号１９０、配列番号１９８、配列番号２００、配列番号２０２、配列番号２０４、配列番号２０５、または配列番号２０６のいずれか１つのＶＨ－ＣＤＲを１つ以上、及び配列番号１４２、配列番号１９１、配列番号１９２、配列番号１９３、配列番号１９４、配列番号１９５、配列番号１９６、配列番号１９７、配列番号１９９、配列番号２０１、または配列番号２０３のいずれか１つのＶＬ－ＣＤＲを１つ以上含む、請求項１５に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項２０】

配列番号１４１、配列番号１８４、配列番号１８５、配列番号１８６、配列番号１８７、配列番号１８８、配列番号１８９、配列番号１９０、配列番号１９８、配列番号２００、配列番号２０２、配列番号２０４、配列番号２０５、または配列番号２０６のいずれか１つのＶＨ－ＣＤＲ、及び配列番号１４２、配列番号１９１、配列番号１９２、配列番号１９３、配列番号１９４、配列番号１９５、配列番号１９６、配列番号１９７、配列番号１９９、配列番号２０１、または配列番号２０３のいずれか１つのＶＬ－ＣＤＲを含む、請求項１５に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項２１】

クローンＡＨＦ１７５９１、ＡＨＦ１７５９２、ＡＨＦ１７５９３、ＡＨＦ１７５９５、ＡＨＦ１７５９７、ＡＨＦ１７６０２、ＡＨＦ１７６０７、ＳＣ－１８４＿７６、ＳＣ－１８４＿１０２、ＳＣ－１８４＿１１０、ＳＣ－１８４＿７６－Ａｒｇ、ＳＣ－１８４＿１０２－Ａｒｇ、またはＳＣ－１８４＿１１０－ＡｒｇのＶＨ－ＣＤＲ及びＶＬ－ＣＤＲを含む、請求項１５に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項２２】

配列番号１４１、配列番号１８４、配列番号１８５、配列番号１８６、配列番号１８７、配列番号１８８、配列番号１８９、配列番号１９０、配列番号１９８、配列番号２００、配列番号２０２、配列番号２０４、配列番号２０５、または配列番号２０６と少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９３％、または少なくとも９５％同一である重鎖フレームワーク（ＦＲ１Ｈ＋ＦＲ２Ｈ＋ＦＲ３Ｈ＋ＦＲ４Ｈ）を含む、請求項１５～２１のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項２３】

配列番号１４２、配列番号１９１、配列番号１９２、配列番号１９３、配列番号１９４、配列番号１９５、配列番号１９６、配列番号１９７、配列番号１９９、配列番号２０１、または配列番号２０３と少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９３％、または少なくとも９５％同一である軽鎖フレームワーク（ＦＲ１Ｌ＋ＦＲ２Ｌ＋ＦＲ３Ｌ＋ＦＲ４Ｌ）を含む、請求項１５～２２のいずれか１項に記載のタンパク質。

【請求項２４】

配列番号１４１、配列番号１８４、配列番号１８５、配列番号１８６、配列番号１８７、配列番号１８８、配列番号１８９、配列番号１９０、配列番号１９８、配列番号２００、配列番号２０２、配列番号２０４、配列番号２０５、または配列番号２０６と少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９３％、または少なくとも９５％同一であるV_Hドメインを含む、請求項１５～２３のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項２５】

配列番号１４２、配列番号１９１、配列番号１９２、配列番号１９３、配列番号１９４、配列番号１９５、配列番号１９６、配列番号１９７、配列番号１９９、配列番号２０１、または配列番号２０３と少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９３％、または少なくとも９５％同一であるV_Hドメインを含む、請求項１５～２４のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項２６】

請求項１～２５のいずれか１項に記載の抗ＮＧＦ抗体または抗体断片をコードする単離された核酸配列。

【請求項２７】

請求項２６に記載の核酸を含むベクター。

【請求項２８】

請求項２６または２７のいずれか１項に記載の核酸を含む、組換え細胞。

【請求項２９】

請求項１～２５のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質または請求項２６もしくは

２７に記載の核酸を発現する細胞。
【請求項３０】
前記抗原結合タンパク質の産生をもたらす条件下で請求項２９に記載の細胞を培養することを含む、請求項１～２５のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質の産生方法。
【請求項３１】
治療有効量の請求項１～２５のいずれか１項に記載の抗ＮＧＦタンパク質を含む、医薬組成物。
【請求項３２】
対象における疼痛の治療または軽減方法であって、治療有効量の請求項１～２５のいずれか１項に記載の抗ＮＧＦタンパク質を前記対象に投与することを含む、前記治療または軽減方法。
【請求項３３】
前記疼痛が、炎症性疼痛、術後切開疼痛、がん性疼痛、原発性または転移性骨がん性疼痛、骨折痛、骨粗鬆症性骨折痛、火傷に起因する疼痛、外傷由来の疼痛、筋骨格痛、リウマチ性疼痛、または骨粗鬆症の痛みを含む、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
前記対象が、イヌを含む、請求項３３に記載の方法。
【請求項３５】
前記対象が、ネコを含む、請求項３３に記載の方法。
【請求項３６】
前記対象が、ヒトを含む、請求項３３に記載の方法。
【請求項３７】
試料中のＮＧＦの検出方法であって、請求項１～２５のいずれか１項に記載の抗ＮＧＦタンパク質の存在下でＮＧＦを含む試料をインキュベートし、前記試料中のＮＧＦに結合した前記抗ＮＧＦタンパク質を検出することを含む、前記検出方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願及び参照による援用
本出願は、２０２１年１１月２３日に出願された米国仮出願第６３／２８２，５９０号、及び２０２２年１１月１０日に出願された米国仮出願第６３／３８３，１７３号に対する優先権を主張し、それぞれその全体が参照により本明細書に援用される。
【０００２】
本明細書で引用または参照される全ての文献（「本明細書で引用される文献」）、及び本明細書で引用される文献中で引用または参照される全ての文献は、本明細書で、または本明細書で参照により援用される文献中で言及される製品についての製造業者の取扱説明書、説明書、製品仕様書、及び製品パンフレットとともに、参照により本明細書に援用され、本発明の実施において採用され得る。より具体的には、全ての参照文献は、あたかも各個別の文献が参照により援用されることが明示的かつ個別に示されるかのように、同様に参照により援用される。
【０００３】
配列表
本出願は、ＥＦＳ－Ｗｅｂを経由してＡＳＣＩＩ形式で提出された配列表を含み、その全体は参照により本明細書に援用される。２０２２年１１月２２日に作成された前記ＡＳＣＩＩコピーは、Ｇ９４３２－９９００３．ｘｍｌという名称であり、サイズは２９２，９８４バイトである。
【０００４】
本発明は、ＮＧＦとＴｒｋＡ及び／またはｐ７５との会合を阻害し、イヌまたはネコ対象への投与に適した新規抗ＮＧＦタンパク質、抗体、及びそのＮＧＦ結合断片を提供する。本発明はまた、有効量の抗ＮＧＦタンパク質、抗体またはその断片を投与することを含

む、イヌまたはネコ対象における疼痛を治療するかまたは鎮痛効果を誘発する新規組成物及び方法を提供する。この方法及び組成物は、ＮＧＦ関連障害を治療または予防するために使用される。

【背景技術】

【０００５】

神経成長因子（ＮＧＦ）は、末梢交感神経ニューロン、胎児感覚ニューロン、及び前脳基底部コリン作動性ニューロンの発達及び維持に重要である。ＮＧＦは、感覚ニューロンにおける神経ペプチドの発現を上方制御し、その活性は２つの異なる膜結合受容体を介して媒介される。ＮＧＦを含むいくつかのニューロトロピン（ＮＴ）は、ｐ７５として同定される低親和性受容体に結合する。ＮＧＦは、高親和性ニューロトロフィン受容体ＴｒｋＡに選択的に結合し、高い親和性を示す。

【０００６】

ニューロトロフィンが結合すると、ＴｒｋＡは自己リン酸化を受けるだけでなく、ＭＡＰＫ経路のメンバーをリン酸化する。このキナーゼの存在は細胞分化をもたらし、感覚ニューロンのサブタイプを特定するうえで役割を果たしている可能性がある。

【０００７】

ＮＧＦは、がんに関連する痛み、神経障害性疼痛、及び神経原性疼痛など、広範囲の疾患及び障害に関連する痛みを含むがこれらに限定されない、いくつかの疾患及び障害において役割を果たす。広範な疼痛関連疾患及び障害におけるＮＧＦの関与により、当技術分野では、ＮＧＦに関連する疾患及び障害、特にイヌ、ネコ、及び他の動物を含む疼痛に関連する疾患及び障害を予防または治療するのに有用な組成物及び方法が必要とされている。特に好ましい抗ＮＧＦ組成物は、対象に投与した場合に炎症などの有害反応が最小限であるか最小限に抑えられる組成物である。

【０００８】

本出願におけるいずれかの文献の引用または特定は、そのような文献が本発明の先行技術として利用可能であることを承認するものではない。

【発明の概要】

【０００９】

本発明は、ＮＧＦ関連障害の治療または改善のための新規抗ＮＧＦ結合タンパク質を提供し、特にイヌ及びネコでの使用に適しているが、それに限定されない。

【００１０】

本発明は、ＮＧＦに特異的に結合する結合タンパク質を提供する。特定の実施形態では、結合タンパク質を、イヌへの投与用に最適化する。特定の実施形態では、結合タンパク質を、ネコへの投与用に最適化する。

【００１１】

一態様では、本発明は、抗体の様式で、すなわち１つ以上の相補性決定領域（ＣＤＲ）によってＮＧＦに結合するように設計または適合された結合タンパク質を提供する。ＣＤＲは、国際ＩｍＭｕｎｏＧｅｎｅＴｉｃｓ（ＩＭＧＴ）情報システムによって識別され得る。したがって、特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、（ａ）アミノ酸配列$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$（配列番号１４６）を含む重鎖相補性決定領域１（ＶＨ－ＣＤＲ１）（式中、X_1は、Ａ、Ｇ、またはＮを含み、X_2は、ＬまたはＭを含み、X_3は、Ａ、Ｄ、Ｅ、またはＳを含み、X_4は、Ｆ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、またはＶを含み、X_5は、ＮまたはＴを含み、X_6は、Ｅ、Ｓ、またはＴを含み、X_7は、Ｇ、Ｈ、Ｎ、Ｓ、またはＱを含み、X_8は、ＡまたはＳを含む）、（ｂ）アミノ酸配列$X_1X_2SNX_5GT$（配列番号１４７）を含む重鎖相補性決定領域２（ＶＨ－ＣＤＲ２）（式中、X_1は、ＩまたはＬを含み、X_2は、ＷまたはＹを含み、そしてX_5は、ＧまたはＲを含む）、（ｃ）アミノ酸配列$AX_2IX_4X_5YX_7X_8X_9YLX_{12}X_{13}YX_{15}X_{16}X_{17}$（配列番号１４８）を含む重鎖相補性決定領域３（ＶＨ－ＣＤＲ３）（式中、X_2は、Ｄ、Ｅ、Ｋ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、またはＴを含み、X_4は、ＷまたはＹを含み、X_5は、Ｆ、Ｈ、Ｗ、またはＹを含み、X_7は、ＤまたはＥを含み、X_8は、ＡまたはＳを含み、X_9は、ＤまたはＹを含み、X_{12}は

、ＨまたはＹを含み、X_{13}は、ＦまたはＷを含み、X_{15}は、Ｆ、Ｉ、Ｌ、Ｗ、またはＹを含み、X_{16}は、ＤまたはＱを含み、X_{17}は、Ｆ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｗ、またはＹを含む）、（ｄ）アミノ酸配列$X_1X_2IX_4X_5X_6$（配列番号１４９）を含む軽鎖相補性決定領域１（ＶＬ－ＣＤＲ１）（式中、X_1は、Ｄ、Ｅ、またはＫを含み、X_2は、Ａ、Ｇ、またはＮを含み、X_4は、Ｇ、Ｎ、ＱまたはＳを含み、X_5は、ＮまたはＳを含み、X_6は、Ａ、Ｇ、Ｎ、ＳまたはＴを含む）、（ｅ）アミノ酸配列AX_2X_3（配列番号１５０）を含む軽鎖相補性決定領域２（ＶＬ－ＣＤＲ２）（式中、X_2は、Ａ、Ｓ、またはＴを含み、X_3は、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、またはＴを含む）、及び（ｆ）アミノ酸配列$QX_2GX_4X_5X_6PX_8T$（配列番号１５１）を含む軽鎖相補性決定領域３（ＶＬ－ＣＤＲ３）（式中、X_2は、ＨまたはＱを含み、X_4は、Ｆ、Ｈ、ＷまたはＹを含み、X_5は、ＫまたはＱを含み、X_6は、ＦまたはＷを含み、X_8は、ＬまたはＭを含む）、のうちの１つ以上を含む抗原結合部分を含む。

【００１２】

特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、（ａ）アミノ酸配列$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$（配列番号１５２）を含む重鎖相補性決定領域１（ＶＨ－ＣＤＲ１）（式中、X_1は、ＡまたはＧを含み、X_2は、ＬまたはＭを含み、X_3は、ＥまたはＳを含み、X_4は、ＦまたはＬを含み、X_5は、ＮまたはＴを含み、X_6は、Ｅ、Ｓ、またはＴを含み、X_7は、Ｈ、Ｎ、またはＳを含み、X_8は、ＡまたはＳを含む）（ｂ）アミノ酸配列X_1WSNX_5GT（配列番号１５３）を含む重鎖相補性決定領域２（ＶＨ－ＣＤＲ２）（式中、X_1は、ＩまたはＬを含み、X_5は、ＧまたはＲを含む）、（ｃ）アミノ酸配列$AX_2IYYYX_7ADYLHX_{13}YX_{15}DX_{17}$（配列番号１５４）を含む重鎖相補性決定領域３（ＶＨ－ＣＤＲ３）（式中、X_2は、Ｎ、Ｑ、Ｓ、またはＴを含み、X_7は、ＤまたはＥを含み、X_{13}は、ＦまたはＷを含み、X_{15}は、Ｆ、Ｉ、Ｌ、Ｗ、またはＹを含み、X_{17}は、Ｆ、Ｉ、Ｌ、またはＭを含む）、（ｄ）アミノ酸配列$X_1GIX_4X_5X_6$（配列番号１５５）を含む軽鎖相補性決定領域１（ＶＬ－ＣＤＲ１）（式中、X_1は、ＤまたはＥを含み、X_4は、Ｎ、Ｑ、またはＳを含み、X_5は、ＮまたはＳを含み、X_6は、Ｇ、Ｎ、Ｓ、またはＴを含む）、（ｅ）アミノ酸配列ATX_3（配列番号１５６）を含む軽鎖相補性決定領域２（ＶＬ－ＣＤＲ２）（式中、X_3は、Ｄ、Ｅ、Ｎ、Ｑ、またはＳを含む）、及び（ｆ）アミノ酸配列$QQGX_4X_5X_6PX_8T$（配列番号１５７）を含む軽鎖相補性決定領域３（ＶＬ－ＣＤＲ３）（式中、X_4は、Ｆ、Ｈ、Ｗ、またはＹを含み、X_5は、ＫまたはＱを含み、X_6は、ＦまたはＷを含み、X_8は、ＬまたはＭを含む）を含む抗原結合部分を含む。

【００１３】

特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、図１に示す重鎖ＣＤＲ１を含む。特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、図１に示す重鎖ＣＤＲ２を含む。特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、図１に示す重鎖ＣＤＲ３を含む。特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、図２に示す軽鎖ＣＤＲ１を含む。特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、図２に示す軽鎖ＣＤＲ２を含む。特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、図２に示す軽鎖ＣＤＲ３を含む。

【００１４】

特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、図１に示す重鎖可変ドメインの重鎖ＣＤＲを含む。

【００１５】

特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、図１に示すV_Hドメインと少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９３％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、または同一である重鎖可変ドメイン（V_H）を含む。

【００１６】

特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、図２に示す軽鎖可変ドメインの軽鎖ＣＤＲを含む。

【００１７】

特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、図２に示す軽鎖可変ドメインに対して、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９３％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、または同一である軽鎖可変ドメイン（V_L）を含む。

【００１８】

特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、図１及び図２に示すＦｖ由来のV_H及びV_Lを含む。

【００１９】

図１及び図２では、ＣＤＲは、ＩＭＧＴ系によって識別される。あるいは、ＣＤＲは、Ｋａｂａｔ付番系またはＣｈｏｔｈｉａ付番系に従って識別され得る。したがって、特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、本明細書でさらに記載されるようにＫａｂａｔまたはＣｈｏｔｈｉａ付番系に従って、ＶＨ－ＣＤＲ１、ＶＨ－ＣＤＲ２、ＶＨ－ＣＤＲ３、ＶＬ－ＣＤＲ１、ＶＬ－ＣＤＲ２、及びＶＬ－ＣＤＲ３のうちの１つ以上を含む抗原結合部分を含む。

【００２０】

本明細書に記載のV_HドメインとV_Lドメインのペアリングでは、任意のV_Hドメインを任意のV_Lドメインとともに使用することができる。同様に、任意のV_HドメインのＣＤＲを任意のV_LドメインのＣＤＲとともに使用することができる。一実施形態では、本発明の抗体は、配列番号１３７のV_HＣＤＲ（ＳＣ－４２＿１０１）及び配列番号３のV_LＣＤＲ（ＳＣ－４２＿００６）を含む。ＶＨ－ＣＤＲ２の５５位にアミノ酸アルギニンを含む実施形態では、本発明の抗体は、配列番号２０７のV_HＣＤＲ（ＳＣ－４２＿１０１Ｒ）及び配列番号３のV_LＣＤＲ（ＳＣ－４２＿００６）を含む。

【００２１】

特定の実施形態では、本発明の抗体には、一緒に選択された、すなわち、同じクローン内で同定されたV_H及びV_Lドメインが組み込まれている。一緒に選択されたV_H及びV_Lクローンは、図１においても図２においても同じクローン名を有するものとして識別される。同様に、図１のクローン名によって識別されるV_HドメインのＣＤＲを、図２の同じクローン名によって識別されるV_LドメインのＣＤＲとともに使用することができる。対のV_H及びV_Lドメインは、保存的置換、例えば、限定されないが、V_HＣＤＲ及びV_LＣＤＲの特定の位置、V_H及びV_LＣＤＲに隣接する位置、ならびに本明細書に記載のV_Hドメイン及びV_Lドメインの位置で観察される保存的変異をさらに含み得る。

【００２２】

特定の実施形態では、本発明の抗体は、クローン２１６６、ＳＣ－４２＿００６、ＳＣ－４２＿００７、ＳＣ－４２＿００８、ＳＣ－４２＿０１０、ＳＣ－４２＿０１１、ＳＣ－４２＿０２３、ＳＣ－４２＿０３２、ＳＣ－４２＿０４５、ＳＣ－４２＿０４７、ＳＣ－４２＿０４８、ＳＣ－４２＿０５２、ＳＣ－４２＿０７０、ＳＣ－４２＿０７３、ＳＣ－４２＿０７７、ＳＣ－４２＿０８２、ＳＣ－４２＿０９０、またはＳＣ－４２＿１０１のV_H及びV_LＣＤＲを含む（図１及び図２）。

【００２３】

特定の実施形態では、本発明の抗体は、クローン２１６６、ＳＣ－４２＿００６、ＳＣ－４２＿００７、ＳＣ－４２＿００８、ＳＣ－４２＿０１０、ＳＣ－４２＿０１１、ＳＣ－４２＿０２３、ＳＣ－４２＿０３２、ＳＣ－４２＿０４５、ＳＣ－４２＿０４７、ＳＣ－４２＿０４８、ＳＣ－４２＿０５２、ＳＣ－４２＿０７０、ＳＣ－４２＿０７３、ＳＣ－４２＿０７７、ＳＣ－４２＿０８２、ＳＣ－４２＿０９０、またはＳＣ－４２＿１０１に対して、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９３％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、または同一であるV_H及びV_Lドメインを含む。

【００２４】

特定の実施形態では、ネコ化抗ＮＧＦ結合タンパク質は、（ａ）アミノ酸配列X_1ＬＸ$_3$$X_4$$X_5$$X_6$$X_7$$X_8$ＭＸ$_{10}$（配列番号２０８）を含む重鎖相補性決定領域１（ＶＨ－ＣＤＲ１）（式中、X_1は、Ａ、Ｇ、Ｌ、Ｎ、またはＱを含み、X_3は、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｍ、Ｓ、Ｔ、またはＹを含み、X_4は、Ｌ、Ｍ、またはＶを含み、X_5は、Ａ、Ｍ

、Ｎ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、またはＶを含み、X_6は、Ａ、Ｅ、Ｇ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｓ、またはＴを含み、X_7は、Ａ、Ｄ、Ｈ、Ｉ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、Ｔ、またはＹを含み、X_8は、ＡまたはＳを含み、X_{10}は、ＳまたはＶを含む）、（ｂ）アミノ酸配列$X_1X_2X_3X_4X_5$ＧＴX_8ＹX_{10}ＤX_{12}ＶX_{14}（配列番号２０９）を含む重鎖相補性決定領域２（ＶＨ－ＣＤＲ２）（式中、X_1は、ＩまたはＬを含み、X_2は、ＷまたはＹを含み、X_3は、Ａ、Ｐ、またはＳを含み、X_4は、Ｄ、Ｅ、Ｎ、Ｑ、Ｒ、またはＳを含み、X_5は、Ｇ、Ｒ、またはＹを含み、X_8は、ＤまたはＹを含み、X_{10}は、Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｓ、またはＴを含み、X_{12}は、ＤまたはＳを含み、X_{14}は、Ｄ、Ｅ、またはＫを含む）、（ｃ）アミノ酸配列$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$Ｌ$X_{12}X_{13}X_{14}$Ｆ$X_{16}X_{17}$（配列番号２１０）を含む重鎖相補性決定領域３（ＶＨ－ＣＤＲ３）（式中、X_1は、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｋ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、またはＴを含み、X_2は、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、またはＹを含み、X_3は、Ｉ、Ｌ、Ｗ、またはＹを含み、X_4は、Ｆ、Ｔ、Ｗ、またはＹを含み、X_5は、Ｆ、Ｈ、またはＹを含み、X_6は、ＨまたはＹを含み、X_7は、ＤまたはＥを含み、X_8は、Ａ、Ｓ、またはＶを含み、X_9は、Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｎ、Ｑ、またはＹを含み、X_{10}は、Ｆ、Ｈ、またはＹを含み、X_{12}は、ＨまたはＹを含み、X_{13}は、ＦまたはＷを含み、X_{14}は、Ｄ、Ｉ、Ｌ、Ｗ、またはＹを含み、X_{16}は、ＤまたはＱを含み、X_{17}は、Ｅ、Ｆ、Ｈ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｗ、またはＹを含む）、（ｄ）アミノ酸配列X_1ＡＳ$X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ＬX_{11}（配列番号２１１）を含む軽鎖相補性決定領域１（ＶＬ－ＣＤＲ１）（式中、X_1は、ＦまたはＲを含み、X_4は、Ｅ、Ｋ、またはＮを含み、X_5は、ＡまたはＧを含み、X_6は、Ｉ、Ｌ、またはＶを含み、X_7は、Ａ、Ｄ、Ｇ、Ｌ、Ｐ、Ｑ、Ｓ、Ｖ、またはＹを含み、X_8は、Ｋ、Ｑ、Ｎ、Ｓ、またはＹを含み、X_9は、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｋ、Ｌ、Ｎ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、またはＴを含み、X_{11}は、Ａ、Ｇ、またはＳを含む）、（ｅ）アミノ酸配列Ａ$X_2X_3X_4X_5X_6X_7$（配列番号２１２）を含む軽鎖相補性決定領域２（ＶＬ－ＣＤＲ２）（式中、X_2は、Ａ、Ｄ、Ｌ、Ｑ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、またはＹを含み、X_3は、Ｄ、Ｅ、Ｋ、Ｎ、Ｑ、またはＳを含み、X_4は、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、またはＶを含み、X_5は、ＨまたはＬを含み、X_6は、Ｈ、Ｉ、Ｌ、またはＭを含み、X_7は、Ｄ、Ｅ、Ｎ、Ｓ、またはＴを含む）、及び（ｆ）アミノ酸配列ＱＱ$X_3X_4X_5X_6X_7X_8$Ｔ（配列番号２１３）を含む軽鎖相補性決定領域３（ＶＬ－ＣＤＲ３）（式中、X_3は、ＧまたはＹを含み、X_4は、Ｄ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｋ、Ｌ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、またはＹを含み、X_5は、Ｅ、Ｋ、Ｑ、Ｒ、またはＳを含み、X_6は、Ｉ、Ｆ、Ｔ、またはＷを含み、X_7は、ＥまたはＰを含み、X_8は、Ｌ、Ｍ、またはＷを含む）を含む。

【００２５】

特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、図１７Ａに示す重鎖ＣＤＲ１を含む。特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、図１７Ａに示す重鎖ＣＤＲ２を含む。特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、図１７Ａに示す重鎖ＣＤＲ３を含む。特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、図１７Ｂに示す軽鎖ＣＤＲ１を含む。特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、図１７Ｂに示す軽鎖ＣＤＲ２を含む。特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、図１７Ｂに示す軽鎖ＣＤＲ３を含む。

【００２６】

特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、図１７Ａに示す重鎖可変ドメインの重鎖ＣＤＲを含む。

【００２７】

特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、図１７Ａに示すV_Hドメインに対して、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９３％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、または同一である重鎖可変ドメイン（V_H）を含む。

【００２８】

特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、図１７Ｂに示す軽鎖可変ドメインの軽鎖ＣＤＲを含む。

【００２９】
特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、図１７Ｂに示す軽鎖可変ドメインに対して、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９３％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、または同一である軽鎖可変ドメイン（V_L）を含む。
【００３０】
図１７Ａに示すV_HＣＤＲは、図１７Ｂに示すV_LＣＤＲと任意の組み合わせで使用することができる。図１７Ａに示すV_Hドメインは、図１７Ｂに示すV_Lドメインと任意の組み合わせで使用することができる。表１１及び表１２は、例示的な組み合わせを示している。
【００３１】
特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、Ｆｖ由来のV_H及びV_Lを含み、V_Hは図１７Ａに示され、V_Lは図１７Ｂに示される。
【００３２】
図１７では、ＣＤＲは、ＩＭＧＴ系によって識別される。あるいは、ＣＤＲは、Ｋａｂａｔ付番系またはＣｈｏｔｈｉａ付番系に従って識別され得る。したがって、特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、本明細書でさらに記載されるようにＫａｂａｔまたはＣｈｏｔｈｉａまたはＩＭＧＴ付番系に従って、ＶＨ－ＣＤＲ１、ＶＨ－ＣＤＲ２、ＶＨ－ＣＤＲ３、ＶＬ－ＣＤＲ１、ＶＬ－ＣＤＲ２、及びＶＬ－ＣＤＲ３のうちの１つ以上を含む抗原結合部分を含む。
【００３３】
特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、上記のようなＣＤＲを含み、各ＣＤＲは、本明細書に記載される特定の抗体重鎖及び軽鎖、例えば、その配列が図１、図２、図１７Ａ、及び図１７Ｂに示される重鎖及び軽鎖ＣＤＲ（同様の配列であり、高い親和性でＮＧＦに結合する）と比較して、１つまたは２つ以下のアミノ酸差異を含むというさらなる制限を有する。特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、本明細書に開示されるV_H及びV_LのＣＤＲを含む。
【００３４】
特定の実施形態では、抗ＮＧＦタンパク質は、本明細書に記載される特定のイヌ化抗体重鎖及び軽鎖、例えば、同様の配列であり、最も高い親和性でＮＧＦに結合する、図１及び図２に記載される重鎖及び軽鎖ＣＤＲと比較して、ＣＤＲ当たり１つまたは２つ以下のアミノ酸差異を含む。そのような抗体としては、ＶＨ－ＣＤＲ当たり２つ以下の変化を含み、すなわち、配列番号１、配列番号３、配列番号５、配列番号７、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、配列番号３１、配列番号５５、配列番号６１、配列番号６９、配列番号７７、配列番号１０３、配列番号１０９、配列番号１１３、配列番号１２１、配列番号１３３、配列番号１３７、または配列番号１４１と比較して、ＣＤＲ当たり２つ、１つの変化を含むか、または全く変化を含まず、ＶＬ－ＣＤＲ当たり２つ以下の変化を含み、すなわち、配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、配列番号３２、配列番号５６、配列番号６２、配列番号７０、配列番号７８、配列番号１０４、配列番号１１０、配列番号１１４、配列番号１２２、配列番号１３４、配列番号１３８、または配列番号１４２と比較して、ＣＤＲ当たり２つ、１つの変化を含むか、または全く変化を含まない抗体が挙げられる。
【００３５】
特定の実施形態では、抗ＮＧＦタンパク質は、本明細書に記載される特定のネコ化抗体重鎖及び軽鎖、例えば、同様の配列であり、最も高い親和性でＮＧＦに結合する、図１７Ａ及び図１７Ｂに記載される重鎖及び軽鎖ＣＤＲと比較して、ＣＤＲ当たり１つまたは２つ以下のアミノ酸差異を含む。そのような抗体としては、ＶＨ－ＣＤＲ当たり２つ以下の変化を含み、すなわち、配列番号１４１、配列番号１８４、配列番号１８５、配列番号１８６、配列番号１８７、配列番号１８８、配列番号１８９、配列番号１９０、配列番号１９８、配列番号２００、配列番号２０２、配列番号２０４、配列番号２０５、または配列

番号２０６と比較して、ＣＤＲ当たり２つ、１つの変化を含むか、または全く変化を含まず、ＶＬ－ＣＤＲ当たり２つ以下の変化を含み、すなわち、配列番号１４２、配列番号１９１、配列番号１９２、配列番号１９３、配列番号１９４、配列番号１９５、配列番号１９６、配列番号１９７、配列番号１９９、配列番号２０１、または配列番号２０３と比較して、ＣＤＲ当たり２つ、１つの変化を含むか、または全く変化を含まない抗体が挙げられる。

【００３６】

許容される変異及び有利な変異を含む、ＣＤＲ内及びＣＤＲ間の変異及びその組み合わせは、図１及び図２、ならびに図１７Ａ及び図１７Ｂに示される配列データセットから明らかである。例えば、データセット全体の様々なＣＤＲ位置における配列の多様性または欠如を比較することにより、特定のアミノ酸が結合に有利となるＣＤＲ位置を観察することができる。同様に、同じ生殖系列に由来するV_H鎖間またはV_L鎖間での配列の多様性を比較することにより、アミノ酸変化が協調的であり得るＣＤＲの位置を観察することができる。さらに、このデータセットにより、結合に重要と思われるＣＤＲ位置を同定することができる。

【００３７】

本明細書に開示される特定の抗体は、他の抗ＮＧＦ抗体とのＣＤＲ配列類似性に基づいてイヌまたはネコのライブラリから選択された。したがって、ＣＤＲ及びＦＲは、双方ともイヌ様またはネコ様であり、同じ生殖系列の配列に由来する抗体重鎖及び軽鎖間に一定程度の均一性が観察されるであろう。そのような均一性は必須ではなく、採用されたイヌ化及びネコ化方法の結果であることを理解されたい。また、抗原結合に有害ではない程度で、配列変動が許容されるか、またはＦＲに導入され得ることも理解されたい。特定の実施形態では、抗ＮＧＦタンパク質は、図１に示す重鎖と少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９３％、または少なくとも９５％同一である重鎖フレームワーク（ＦＲ１Ｈ＋ＦＲ２Ｈ＋ＦＲ３ＨＨ）を含む。特定の実施形態では、抗ＮＧＦタンパク質は、配列番号１、配列番号３、配列番号５、配列番号７、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、配列番号３１、配列番号５５、配列番号６１、配列番号６９、配列番号７７、配列番号１０３、配列番号１０９、配列番号１１３、配列番号１２１、配列番号１３３、配列番号１３７、または配列番号１４１と少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９３％、または少なくとも９５％同一である重鎖フレームワーク（ＦＲ１Ｈ＋ＦＲ２Ｈ＋ＦＲ３Ｈ＋ＦＲ４Ｈ）を含む。

【００３８】

特定の実施形態では、抗ＮＧＦタンパク質は、図１７Ａに示す重鎖と少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９３％、または少なくとも９５％同一である重鎖フレームワーク（ＦＲ１Ｈ＋ＦＲ２Ｈ＋ＦＲ３ＨＨ）を含む。特定の実施形態では、抗ＮＧＦタンパク質は、配列番号１４１、配列番号１８４、配列番号１８５、配列番号１８６、配列番号１８７、配列番号１８８、配列番号１８９、配列番号１９０、配列番号１９８、配列番号２００、配列番号２０２、配列番号２０４、配列番号２０５、または配列番号２０６と少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９３％、または少なくとも９５％同一である重鎖フレームワーク（ＦＲ１Ｈ＋ＦＲ２Ｈ＋ＦＲ３Ｈ＋ＦＲ４Ｈ）を含む。

【００３９】

特定の実施形態では、抗ＮＧＦタンパク質は、図２に示す軽鎖と少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９３％、または少なくとも９５％同一である軽鎖フレームワーク（ＦＲ１＋ＦＲ２＋ＦＲ３＋ＦＲ４）を含む。特定の実施形態では、抗ＮＧＦタンパク質は、配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、配列番号３２、配列番号５６、配列番号６２、配列番号７０、配列番号７８、配列番号１０

４、配列番号１１０、配列番号１１４、配列番号１２２、配列番号１３４、配列番号１３８、または配列番号１４２と少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９３％、または少なくとも９５％同一である軽鎖フレームワーク（ＦＲ１Ｌ＋ＦＲ２Ｌ＋ＦＲ３Ｌ＋ＦＲ４Ｌ）を含む。

【００４０】

特定の実施形態では、抗ＮＧＦタンパク質は、図１７Ｂに示す軽鎖と少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９３％、または少なくとも９５％同一である軽鎖フレームワーク（ＦＲ１＋ＦＲ２＋ＦＲ３＋ＦＲ４）を含む。特定の実施形態では、抗ＮＧＦタンパク質は、配列番号１４２、配列番号１９１、配列番号１９２、配列番号１９３、配列番号１９４、配列番号１９５、配列番号１９６、配列番号１９７、配列番号１９９、配列番号２０１、または配列番号２０３と少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９３％、または少なくとも９５％同一である軽鎖フレームワーク（ＦＲ１Ｌ＋ＦＲ２Ｌ＋ＦＲ３Ｌ＋ＦＲ４Ｌ）を含む。

【００４１】

抗体のＶ（Ｈ）及びＶ（Ｌ）機能をサポートするアミノ酸の天然に保存されたネットワークの議論については、例えば、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｃｏｎｓｅｒｖｅｄ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｎｅｔｗｏｒｋｓ ｉｎｖｏｌｖｅｄ ｉｎ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｖａｒｉａｂｌｅ ｄｏｍａｉｎ ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ．Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ２００９ Ｊｕｌ；７６（１）：９９－１１４を参照のこと。Ｗａｎｇは、抗体のV_H及びV_Lドメイン、V_H－C_H1可変－定常ドメイン界面、さらにはV_L及びC_H1との相互作用を欠くように進化したラクダ科のV_{HH}ドメインにおける保存アミノ酸ペア及び非保存アミノ酸ペアを同定した。特定の実施形態では、治療用抗体の有効性、安全性、及び製造可能性、ならびに安定性などの生物医薬品特性及び生物物理学的特性を最適化するために変異を導入する。例えば、Ｄｏｕｉｌｌａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｏｐｔｉｍｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ａｎ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｌｉｇｈｔ Ｃｈａｉｎ Ｆｒａｍｅｗｏｒｋ Ｅｎｈａｎｃｅｓ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ａｎｄ Ｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔｉｃｓ．Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ（Ｂａｓｅｌ）２０１９ Ｓｅｐ ６；８（３）：４６を参照のこと。

【００４２】

特定の実施形態では、本発明は、可変重鎖が、図１に示す重鎖可変ドメインに対して、少なくとも約８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離された組換えＮＧＦ結合タンパク質を提供する。特定の実施形態では、重鎖可変ドメインは、配列番号１３、配列番号３１、配列番号５５、配列番号６１、配列番号６９、配列番号７７、配列番号１０３、配列番号１０９、配列番号１１３、配列番号１２１、配列番号１３３、または配列番号１３７に対して、少なくとも約８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００４３】

特定の実施形態では、本発明は、可変軽鎖が、図２に示す軽鎖可変ドメインに対して、少なくとも約８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離された組換えＮＧＦ結合タンパク質を提供する。特定の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、配列番号１４、配列番号３２、配列番号５６、配列番号６２、配列番号７０、配列番号７８、配列番号１０４、配列番号１１０、配列番号１１４、配列番号１２２、配列番号１３４、または配列番号１３８に対して、少なくとも約８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の同一性を有するアミノ酸配列を

含む。

【００４４】

別の態様では、本発明は、本発明の抗ＮＧＦタンパク質をコードする核酸を提供する。別の態様では、本発明は、本発明の抗ＮＧＦタンパク質をコードする核酸を含むベクターを提供する。

【００４５】

別の態様では、本発明は、本発明のベクターの核酸を含むか、または本発明の抗ＮＧＦタンパク質を発現する細胞を提供する。

【００４６】

抗ＮＧＦ結合タンパク質、例えば、限定されないが、抗体及び抗体断片は、ＮＧＦと特異的に結合し、ＮＧＦとＴｒｋＡとの会合を阻害し、さらにＮＧＦとｐ７５との会合を阻害する。特定の実施形態では、これらの新規抗ＮＧＦ結合タンパク質は、ＮＧＦを検出するのに、ならびに疼痛及び疼痛に関連する障害及び病態、例えば、炎症に関連する疼痛、がん、特定の疼痛、及び炎症に関連する障害、特にＮＧＦレベルの上昇と関連する疼痛関連障害の治療に適しており、単独で投与してもよく、別の生物学的製剤、限定されないが、ＮＳＡＩＤまたはオピオイド鎮痛薬などの別の活性薬剤と組み合わせて投与してもよい。

【００４７】

したがって、本出願人が権利を保有し、任意の以前に既知である製品、プロセス、または方法の免責事項を開示するように、任意の以前に既知である製品、製品を作製するプロセス、または製品を使用する方法を本発明内に包含しないことが、本発明の目的である。本発明は、本発明の範囲内に、本出願人が権利を保有し、任意の前述の製品、製品の製造プロセス、または製品の使用方法の免責事項を開示するように、ＵＳＰＴＯ（米国特許法第１１２条、第１段落）またはＥＰＯ（ＥＰＣの第８３条）の書面による記述要件及び実施可能要件を満たさない任意の製品、プロセス、または製造方法、または製品の使用方法を包含することを意図していないことに更に留意されたい。本発明の実施において、ＥＰＣ第５３条（ｃ）及びＥＰＣ規則２８（ｂ）及び（ｃ）に準拠することが有利であり得る。本出願の系統もしくは任意の他の系統、または任意の第三者の任意の先行出願における本出願人の任意の付与された特許（複数可）の主題である任意の実施形態を明示的に除外する全ての権利は明示的に保有される。本明細書では、いかなるものも約束事項と解釈されるべきではない。

【００４８】

本開示において、特に特許請求の範囲及び／または段落において、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」、「含まれる（ｃｏｍｐｒｉｓｅｄ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」などの用語は、米国特許法ではそれに帰属する意味を有することができ、例えば、それらは、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」、「含まれる（ｉｎｃｌｕｄｅｄ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」などを意味することができ、「本質的にからなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」及び「本質的にからなる（ｃｏｎｓｉｓｔｓ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」などの用語は、米国特許法ではそれらに帰属する意味を有し、例えば、それらは、明示的に記載されていない要素を許容するが、従来技術において見出されるか、または本発明の基本的もしくは新規な特徴に影響を与える要素を除外することに留意すべきである。

【００４９】

これら及び他の実施形態は、以下の詳細な説明から開示されるか、または該詳細な説明から明らかであり、かつ、これに包含される。

【図面の簡単な説明】

【００５０】

【図１Ａ】本発明の例示的なV_H重鎖可変ドメインのアミノ酸配列のアラインメントを示す。アラインメントされる可変ドメインは、２つの部分に分かれる：部分（Ａ）はＮ末端を示す。アラインメントの目的で、フレームワーク（ＦＲ）と相補性決定領域（ＣＤＲ）

をＩＭＧＴ系に従って識別する。ＣＤＲ及びＦＲを、本明細書で開示される他の系に従ってマッピングしてもよい。
【図１Ｂ】本発明の例示的なＶ$_H$重鎖可変ドメインのアミノ酸配列のアラインメントを示す。アラインメントされる可変ドメインは、２つの部分に分かれる：部分（Ｂ）はＣ末端を示す。アラインメントの目的で、フレームワーク（ＦＲ）と相補性決定領域（ＣＤＲ）をＩＭＧＴ系に従って識別する。ＣＤＲ及びＦＲを、本明細書で開示される他の系に従ってマッピングしてもよい。
【図２Ａ】本発明の例示的なＶ$_K$軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列のアラインメントを示す。アラインメントされる可変ドメインは、２つの部分に分かれる：部分（Ａ）はＮ末端を示す。アラインメントの目的で、フレームワーク（ＦＲ）と相補性決定領域（ＣＤＲ）をＩＭＧＴ系に従って識別する。ＣＤＲ及びＦＲを、本明細書で開示される他の系に従ってマッピングしてもよい。各Ｖ$_L$ドメインは、図１に示されるＶ$_H$ドメインのいずれかとペアリングするのに適している。図１と合わせて、クローンの名称は、結合について試験される例示的なＶ$_H$－Ｖ$_L$ペアの選択を示す。
【図２Ｂ】本発明の例示的なＶ$_K$軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列のアラインメントを示す。アラインメントされる可変ドメインは、２つの部分に分かれる：部分（Ｂ）はＣ末端を示す。アラインメントの目的で、フレームワーク（ＦＲ）と相補性決定領域（ＣＤＲ）をＩＭＧＴ系に従って識別する。ＣＤＲ及びＦＲを、本明細書で開示される他の系に従ってマッピングしてもよい。各Ｖ$_L$ドメインは、図１に示されるＶ$_H$ドメインのいずれかとペアリングするのに適している。図１と合わせて、クローンの名称は、結合について試験される例示的なＶ$_H$－Ｖ$_L$ペアの選択を示す。
【図３】ＴＦ－１細胞の増殖の阻害を示す。
【図４】キメラ２１６６抗体の重鎖（配列番号１４４）及び軽鎖（配列番号１４５）のアミノ酸配列を示す。エフェクター活性を除去するために、Ｆｃに２つの残基変更（「ＡＡ」、下線及び太字）を加えた。この変化は、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃについて記載されている「ＬＡＬＡ」変異と類似している。キメラ２１６６抗体は、イヌＩｇＧＢ重鎖定常領域及びκ軽鎖定常領域を含む。
【図５】イヌＮＧＦに結合するイヌ２１６６キメラ抗体のセンサーグラムである。ＮＧＦ濃度は、０．７８、１．５６、３．１２、６．２５、及び１２．５ｎＭであった。
【図６】イヌｐ７５－Ｆｃに結合するイヌＮＧＦのみのセンサーグラムである。ＮＧＦ濃度は、０．７８、１．５６、３．１２、６．２５、１２．５、２５、及び５０ｎＭであった。
【図７】イヌＴｒｋＡ－Ｆｃに結合するイヌＮＧＦのみのセンサーグラムである。ＮＧＦ濃度は、０．７８、１．５６、３．１２、６．２５、１２．５、２５、及び５０ｎＭであった。
【図８】イヌｐ７５－Ｆｃに結合するイヌ２１６６キメラ抗体－ＮＧＦ混合物のセンサーグラムである。ＮＧＦ濃度は、１２．５、２５、及び５０ｎＭであった。
【図９】イヌＴｒｋＡ－Ｆｃに結合するイヌ２１６６キメラ抗体－ＮＧＦ混合物のセンサーグラムである。ＮＧＦ濃度は、１２．５、２５、及び５０ｎＭであった。
【図１０】イヌＮＧＦに結合する７０個のイヌ化クローンのセンサーグラムを示す。ＮＧＦ濃度は、０．２３、０．６９、２．０６、６．１７、及び１８．５２ｎＭであった。
【図１１】イヌｐ７５－Ｆｃに結合するイヌＮＧＦのみのセンサーグラムである。ＮＧＦ濃度は、０．７８、１．５６、３．１２、６．２５、１２．５、２５、及び５０ｎＭであった。
【図１２】イヌＴｒｋＡ－Ｆｃに結合するイヌＮＧＦのみのセンサーグラムである。ＮＧＦ濃度は、０．７８、１．５６、３．１２、６．２５、１２．５、２５、及び５０ｎＭであった。
【図１３】イヌｐ７５－Ｆｃに結合するイヌ化ＳＣ４２＿１０１抗体－ＮＧＦ混合物のセンサーグラムである。ＮＧＦ濃度は、１２．５、２５、及び５０ｎＭであった。
【図１４】イヌＴｒｋＡ－Ｆｃに結合するイヌ化ＳＣ４２＿１０１抗体－ＮＧＦ混合物の

センサーグラムである。ＮＧＦ濃度は、１２．５、２５、及び５０ｎＭであった。
【図１５】ネコ化抗ＮＧＦ抗体のV_H（配列番号１４１）及びV_L（配列番号１４２）アミノ酸配列を示す。
【図１６】ＮＧＦに結合するネコ化クローン１０１のセンサーグラムである。ＮＧＦ濃度は、１．２３、３．７、１１、３３、及び１００ｎＭであった。
【図１７Ａ】本発明の例示的なネコ化及び親和性成熟ネコ化V_H重鎖可変ドメインのアミノ酸配列のアラインメントを示す。アラインメントの目的で、フレームワーク（ＦＲ）と相補性決定領域（ＣＤＲ）をＩＭＧＴ系に従って識別する。ＣＤＲ及びＦＲを、本明細書で開示される他の系に従ってマッピングしてもよい。例えば、表４、及びＫａｂａｔとＩＭＧＴ手法の組み合わせを使用して定義されるＣＤＲを参照のこと。
【図１７Ｂ】本発明の例示的なネコ化及び親和性成熟ネコ化V_K軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列のアラインメントを示す。アラインメントの目的で、フレームワーク（ＦＲ）と相補性決定領域（ＣＤＲ）をＩＭＧＴ系に従って識別する。ＣＤＲ及びＦＲを、本明細書で開示される他の系に従ってマッピングしてもよい。例えば、表４、及びＫａｂａｔとＩＭＧＴ手法の組み合わせを使用して定義されるＣＤＲを参照のこと。
【図１８Ａ】親和性成熟ネコ抗体のセンサーグラムを示す：クローン１０１。ＮＧＦ濃度は、５０、２５、１２．５、６．２５、３．１２５、及び１．５６ｎＭであった。
【図１８Ｂ】親和性成熟ネコ抗体のセンサーグラムを示す：ＡＨＦ１７６０２。ＮＧＦ濃度は、５０、２５、１２．５、６．２５、３．１２５、及び１．５６ｎＭであった。
【図１８Ｃ】親和性成熟ネコ抗体のセンサーグラムを示す：ＳＣ－１８４＿７６。ＮＧＦ濃度は、５０、２５、１２．５、６．２５、３．１２５、及び１．５６ｎＭであった。
【図１８Ｄ】親和性成熟ネコ抗体のセンサーグラムを示す：ＳＣ－１８４＿７６－Ａｒｇ。ＮＧＦ濃度は、５０、２５、１２．５、６．２５、３．１２５、及び１．５６ｎＭであった。
【図１８Ｅ】親和性成熟ネコ抗体のセンサーグラムを示す：ＳＣ－１０２。ＮＧＦ濃度は、５０、２５、１２．５、６．２５、３．１２５、及び１．５６ｎＭであった。
【図１８Ｆ】親和性成熟ネコ抗体のセンサーグラムを示す：ＳＣ－１８４＿１０２－Ａｒｇ。ＮＧＦ濃度は、５０、２５、１２．５、６．２５、３．１２５、及び１．５６ｎＭであった。
【図１８Ｇ】親和性成熟ネコ抗体のセンサーグラムを示す：ＳＣ－１１０。ＮＧＦ濃度は、５０、２５、１２．５、６．２５、３．１２５、及び１．５６ｎＭであった。
【図１８Ｈ】親和性成熟ネコ抗体のセンサーグラムを示す：ＳＣ－１８４＿１１０－Ａｒｇ。ＮＧＦ濃度は、５０、２５、１２．５、６．２５、３．１２５、及び１．５６ｎＭであった。
【００５１】
本特許または出願書類は、カラーで作成された少なくとも１つの図面を含む。カラー図面（複数可）を含む本特許または特許出願公開の複写は、要請かつ必要な料金の支払により特許庁より提供される。
【００５２】
以下の詳細な説明は、例として与えられ、記載される特定の実施形態のみに本発明を限定することを意図するものではないが、添付の図面と併せて最もよく理解され得る。
【発明を実施するための形態】
【００５３】
本発明の特定の例示的な実施形態によれば、ＮＧＦ結合タンパク質は、抗ＮＧＦ抗体またはその抗原結合断片である。本明細書で使用される用語「抗体」には、ジスルフィド結合によって相互接続された４つのポリペプチド鎖、２つの重（Ｈ）鎖及び２つの軽（Ｌ）鎖を含む免疫グロブリン分子、ならびにその多量体（例えば、ＩｇＭ）が含まれる。典型的な抗体では、各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではＨＣＶＲまたはV_Hと略記される）及び重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、３つのドメインC_H1、C_H2、及びC_H3を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書でＬＣＶＲまたはV_Lと略記される）及び

軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、１つのドメイン（C_L）を含む。V_H及びV_L領域は、フレームワーク領域（ＦＲ）と称されるより保存された領域と共に散在する、相補性決定領域（ＣＤＲ）と称される超可変性の領域に、さらに細分することができる。各V_H及びV_Lは、３つのＣＤＲ及び４つのＦＲからなり、アミノ末端からカルボキシ末端へ向かって、以下の順序で配列される：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４。本発明の異なる実施形態において、抗ＮＧＦ抗体（またはその抗原結合部分）のＦＲは、イヌ生殖系列配列と同一であってもよく、または天然もしくは人工的に修飾されていてもよい。アミノ酸コンセンサス配列は、２つ以上のＣＤＲの並列分析に基づいて定義され得る。

【００５４】

標的抗原への結合の親和性及び特異性に実質的な影響を与える抗体残基は、主にＣＤＲに存在する。Ｋａｂａｔらは、免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の配列を編集及びアラインし、保存及び超可変領域及び残基を同定する免疫グロブリンの可変領域の標準化された付番スキームを最初に提案した。（Ｋａｂａｔ ＥＡ ｅｔ ａｌ．，１９７９，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ Ｃｈａｉｎｓ：Ｔａｂｕｌａｔｉｏｎ ａｎｄ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ Ａｍｉｎｏ Ａｃｉｄ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｅｃｕｒｓｏｒｓ，Ｖ－ｒｅｇｉｏｎｓ，Ｃ－ｒｅｇｉｏｎｓ，Ｊ－Ｃｈａｉｎ ａｎｄ ＢＰ－Ｍｉｃｒｏｇｌｏｂｕｌｉｎｓ，Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｅｄｕｃａｔｉｏｎ，ａｎｄ Ｗｅｌｆａｒｅ，Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ）。Ｋａｂａｔ系は、抗体残基の付番に広く採用されている標準であるが、Ｋａｂａｔによって定義された超可変領域は、抗原結合ループの構造的態様と正確には一致しない。Ｃｈｏｔｈｉａ及びＬｅｓｋは、抗体可変領域の結晶構造をアラインすることによって構造に基づく付番スキームを開発し、ＣＤＲループを少数の「標準」クラスに分類した（ＣｈｏｔｈｉａＣ，ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｃａｎｏｎｉｃａｌ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｆｏｒ ｔｈｅ ｈｙｐｅｒｖａｒｉａｂｌｅ ｒｅｇｉｏｎｓ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎｓ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－１７．ｄｏｉ：１０．１０１６／００２２－２８３６（８７）９０４１２－８）。Ｃｈｏｔｈｉａ付番スキームの利点は、異なる抗体のトポロジー的にアラインされた残基が同じ位置番号に局在し、ＣｈｏｔｈｉａのＣＤＲ定義がほとんどの抗体配列で構造的抗原結合ループに対応することである。Ｌｅｆｒａｎｃは、Ｔ細胞受容体鎖を含む免疫グロブリンスーパーファミリーのすべてのタンパク質の付番を標準化することを目的とした、生殖系列配列に基づく新たな系を導入し（Ｇｉｕｄｉｃｅｌｌｉ Ｖ ｅｔ ａｌ．，１９９７，ＩＭＧＴ，ｔｈｅ ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＩｍＭｕｎｏＧｅｎｅＴｉｃｓ ｄａｔａｂａｓｅ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：２０６－１１）、その後、可変ドメイン全体に拡張された（Ｌｅｆｒａｎｃ Ｍ－Ｐ ｅｔ ａｌ．，２００３，ＩＭＧＴ ｕｎｉｑｕｅ ｎｕｍｂｅｒｉｎｇ ｆｏｒ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ ａｎｄ Ｔ ｃｅｌｌ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｖａｒｉａｂｌｅ ｄｏｍａｉｎｓ ａｎｄ Ｉｇ ｓｕｐｅｒｆａｍｉｌｙ Ｖ－ｌｉｋｅ ｄｏｍａｉｎｓ．Ｄｅｖ Ｃｏｍｐ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２７：５５－７７．ｄｏｉ：１０．１０１６／Ｓ０１４５－３０５Ｘ（０２）０００３９－３）。非従来型のフレームワークをアラインし（Ａｂｈｉｎａｎｄａｎ ＫＲ ｅｔ ａｌ．，２００８，Ａｎａｌｙｓｉｓ ａｎｄ ｉｍｐｒｏｖｅｍｅｎｔｓ ｔｏ Ｋａｂａｔ ａｎｄ ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌｌｙ ｃｏｒｒｅｃｔ ｎｕｍｂｅｒｉｎｇ ｏｆ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｖａｒｉａｂｌｅ ｄｏｍａｉｎｓ．Ｍｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ．４５：３８３２－９．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｍｏｌｉｍｍ．２００８．０５．０２２）、可変鎖配列を構造的に不変な「コア」を含む複数の断片に細分化する（Ｇｅｌｆａｎｄ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ａｌｇｏｒｉｔｈｍｉｃ ｄｅｔｅｒｍｉｎａｔｉｏｎ ｏｆ ｃｏｒｅ ｐｏｓｉｔｉｏｎｓ ｉｎ ｔｈｅ V_L ａｎｄ V_H ｄｏｍａｉｎｓ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ．Ｊ Ｃｏｍｐｕｔ Ｂｉｏｌ．（１９９８）５：４６７－７７）ための追加の付番系が提案されている。本発明の特定の実施形態

では、ＣＤＲ残基を、上記のような標準系に従って同定する。特定の実施形態では、本発明の抗体を、本明細書に記載の抗体配列のＫａｂａｔ　ＣＤＲ残基のすべてまたはサブセットによって同定する。特定の実施形態では、本発明の抗体を、本明細書に記載の抗体配列のＣｈｏｔｈｉａ　ＣＤＲ残基のすべてまたはサブセットによって同定する。特定の実施形態では、本発明の抗体を、本明細書に記載の抗体配列のＩＭＧＴ　ＣＤＲ残基のすべてまたはサブセットによって同定する。特定の実施形態では、本発明の抗体を、例えば、限定されないが、ＫａｂａｔによるＶＨ－ＣＤＲ１の残基の全部またはサブセット、ＣｈｏｔｈｉａによるＶＨ－ＣＤＲ２の残基の全部またはサブセット、ＫａｂａｔによるＶＨ－ＣＤＲ３の残基の全部またはサブセット、ＫａｂａｔによるＶＬ－ＣＤＲ１の残基の全部またはサブセット、ＩＭＧＴによるＶＬ－ＣＤＲ２の残基の全部またはサブセット、及びＣｈｏｔｈｉａによるＶＬ－ＣＤＲ３の残基の全部またはサブセットを含む、２つ以上の系によって定義されるＣＤＲ残基によって同定される。表１は、図１及び２に示される抗体配列に対するＦＲ及びＣＤＲの対応を示す。

【表１】

表１－ＣＤＲアミノ酸

	VH-FR1	VH-CDR1	VH-FR2	VH-CDR2	VH-FR3	VH-CDR3	VH-FR4
IMGT	1-25	26-33	34-50	51-57	58-95	96-112	113-123
Kabat	1-30	31-35	36-49	50-65	66-97	98-112	113-123
Chothia	1-25	26-32	33-51	52-56	57-97	98-112	113-123
	VL-FR1	VL-CDR1	VL-FR2	VL-CDR2	VL-FR3	VL-CDR3	VL-FR4
IMGT	1-26	27-32	33-49	50-52	53-88	89-97	98-107
Kabat	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107
Chothia	1-25	26-32	33-49	50-52	53-90	91-96	97-107

【００５５】

ＫａｂａｔによってＣＤＲを同定すると、特定の実施形態では、イヌ化抗ＮＧＦ結合タンパク質は、（ａ）アミノ酸配列$X_1X_2X_3X_4X_5$（配列番号１５８）を含む重鎖相補性決定領域１（ＶＨ－ＣＤＲ１）（式中、X_1は、Ｅ、Ｓ、またはＴを含み、X_2は、Ｇ、Ｈ、Ｎ、Ｓ、またはＱを含み、X_3は、ＡまたはＳを含み、X_4は、Ｉ、Ｍ、またはＶを含み、X_5は、ＤまたはＳを含む）、（ｂ）アミノ酸配列$X_1X_2X_3SNX_6GTX_9YX_{11}X_{12}AX_{14}X_{15}X_{16}$（配列番号１５９）を含む重鎖相補性決定領域２（ＶＨ－ＣＤＲ２）（式中、X_1は、Ｖ、Ｌ、Ｍ、またはＴを含み、X_2は、ＩまたはＬを含み、X_3は、ＷまたはＹを含み、X_6は、ＧまたはＲを含み、X_9は、Ｄ、Ｑ、またはＳを含み、X_{11}は、Ａ、Ｎ、またはＴを含み、X_{12}は、ＤまたはＳを含み、X_{14}は、ＩまたはＶを含み、X_{15}は、ＥまたはＫを含み、X_{16}は、ＧまたはＳを含む）、（ｃ）アミノ酸配列$IX_2X_3YX_5X_6X_7YLX_{10}X_{11}YX_{13}X_{14}X_{15}$（配列番号１６０）を含む重鎖相補性決定領域３（ＶＨ－ＣＤＲ３）（式中、X_2は、ＷまたはＹを含み、X_3は、Ｆ、Ｈ、Ｗ、またはＹを含み、X_5は、ＤまたはＥを含み、X_6は、ＡまたはＳを含み、X_7は、ＤまたはＹを含み、X_{10}は、ＨまたはＹを含み、X_{11}は、ＦまたはＷを含み、X_{13}は、Ｆ、Ｉ、Ｌ、Ｗ、またはＹを含み、X_{14}は、ＤまたはＱを含み、X_{15}は、Ｆ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｗ、またはＹを含む）、（ｄ）アミノ酸配列$X_1ASX_4X_5IX_7X_8X_9X_{10}X_{11}$（配列番号１６１）を含む軽鎖相補性決定領域１（ＶＬ－ＣＤＲ１）（式中、X_1は、ＬまたはＲを含み、X_4は、Ｄ、Ｅ、またはＫを含み、X_5は、Ａ、Ｇ、またはＮを含み、X_7は、Ｇ、Ｎ、Ｑ、またはＳを含み、X_8は、ＮまたはＳを含み、X_9は、Ａ、Ｇ、Ｎ、Ｓ、またはＴを含み、X_{10}は、ＬまたはＶを含み、X_{11}は、ＡまたはＮを含む）、（ｅ）アミノ酸配列$AX_2X_3X_4X_5X_6X_7$（配列番号１６２）を含む軽鎖相補性決定領域２

（ＶＬ－ＣＤＲ２）（式中、X_2は、Ａ、Ｓ、またはＴを含み、X_3は、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、またはＴを含み、X_4は、Ａ、Ｅ、Ｋ、Ｌ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、またはＴを含み、X_5は、Ｌ、Ｍ、またはＮを含み、X_6は、ＡまたはＱを含み、X_7は、Ｇ、Ｄ、Ｒ、Ｓ、またはＴを含む）、及び（ｆ）アミノ酸配列$X_1X_2GX_4X_5X_6PX_8T$（配列番号１６３）を含む軽鎖相補性決定領域３（ＶＬ－ＣＤＲ３）（式中、X_1は、Ｈ、Ｍ、Ｑ、またはＲを含み、X_2は、Ｈ、Ｎ、Ｑ、またはＳを含み、X_4は、Ｆ、Ｈ、Ｗ、またはＹを含み、X_5は、ＫまたはＱを含み、X_6は、ＦまたはＷを含み、X_8は、ＬまたはＭを含む）のうちの１つ以上を含む抗原結合部分を含む。

【００５６】

特定の実施形態では、イヌ化抗ＮＧＦ結合タンパク質は、（ａ）アミノ酸配列$X_1X_2X_3X_4S$（配列番号１６４）を含む重鎖相補性決定領域１（ＶＨ－ＣＤＲ１）（式中、X_1は、Ｅ、Ｓ、またはＴを含み、X_2は、ＨまたはＮを含み、X_3は、ＡまたはＳを含み、X_4は、ＩまたはＭを含む）、（ｂ）アミノ酸配列$TIWSNX_6GTDYX_{11}X_{12}AVKG$（配列番号１６５）（式中、$X_6$は、ＧまたはＲを含み、$X_{11}$は、ＡまたはＴを含み、$X_{12}$は、ＤまたはＳを含む）、（ｃ）アミノ酸配列$IYYYX_5ADYLX_{10}X_{11}YX_{13}DX_{15}$（配列番号１６６）を含む重鎖相補性決定領域３（ＶＨ－ＣＤＲ３）（式中、X_5は、ＤまたはＥを含み、X_{10}は、ＨまたはＹを含み、X_{11}は、ＦまたはＷを含み、X_{13}は、Ｆ、Ｉ、Ｌ、Ｗ、またはＹを含み、X_{15}は、Ｆ、Ｉ、Ｌ、またはＭを含む）、（ｄ）アミノ酸配列$RASEGIX_7X_8X_9X_{10}A$（配列番号１６７）を含む軽鎖相補性決定領域１（ＶＬ－ＣＤＲ１）（式中、X_7は、Ｎ、Ｑ、またはＳを含み、X_8は、ＮまたはＳを含み、X_9は、Ｇ、Ｎ、Ｓ、またはＴを含み、X_{10}は、ＬまたはＶを含む）、（ｅ）アミノ酸配列$ATX_3X_4LX_6X_7$（配列番号１６８）を含む軽鎖相補性決定領域２（ＶＬ－ＣＤＲ２）（式中、X_3は、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｎ、Ｑ、またはＳを含み、X_4は、Ｅ、Ｋ、Ｑ、またはＳを含み、X_6は、ＡまたはＱを含み、X_7は、ＲまたはＴを含む）、及び（ｆ）アミノ酸配列$QQGX_4X_5X_6PLT$（配列番号１６９）を含む軽鎖相補性決定領域３（ＶＬ－ＣＤＲ３）（式中、X_4は、Ｆ、Ｈ、Ｗ、またはＹを含み、X_5は、ＫまたはＱを含み、X_6は、ＦまたはＷを含む）を含む抗原結合部分を含む。

【００５７】

Ｃｈｏｔｈｉａによって ＣＤＲを同定すると、特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、（ａ）アミノ酸配列$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$（配列番号１７０）を含む重鎖相補性決定領域１（ＶＨ－ＣＤＲ１）（式中、X_1は、Ａ、Ｇ、またはＮを含み、X_2は、ＬまたはＭを含み、X_3は、Ａ、Ｄ、Ｅ、またはＳを含み、X_4は、Ｆ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、またはＶを含み、X_5は、ＮまたはＴを含み、X_6は、Ｅ、Ｓ、またはＴを含み、X_7は、Ｇ、Ｈ、Ｎ、Ｓ、またはＱを含む）、（ｂ）アミノ酸配列X_1SNX_4G（配列番号１７１）を含む重鎖相補性決定領域２（ＶＨ－ＣＤＲ２）（式中、X_1は、ＷまたはＹを含み、X_4は、ＧまたはＲを含む）、（ｃ）アミノ酸配列$IX_2X_3YX_5X_6X_7YLX_{10}X_{11}YX_{13}X_{14}X_{15}$（配列番号１７２）を含む重鎖相補性決定領域３（ＶＨ－ＣＤＲ３）（式中、X_2は、ＷまたはＹを含み、X_3は、Ｆ、Ｈ、Ｗ、またはＹを含み、X_5は、ＤまたはＥを含み、X_6は、ＡまたはＳを含み、X_7は、ＤまたはＹを含み、X_{10}は、ＨまたはＹを含み、X_{11}は、ＦまたはＷを含み、X_{13}は、Ｆ、Ｉ、Ｌ、Ｗ、またはＹを含み、X_{14}は、ＤまたはＱを含み、X_{15}は、Ｆ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｗ、またはＹを含む）、（ｄ）アミノ酸配列$SX_2X_3IX_5X_6X_7$（配列番号１７３）を含む軽鎖相補性決定領域１（ＶＬ－ＣＤＲ１）（式中、X_2は、Ｄ、Ｅ、またはＫを含み、X_3は、Ａ、Ｇ、またはＮを含み、X_5は、Ｇ、Ｎ、Ｑ、またはＳを含み、X_6は、ＮまたはＳを含み、X_7は、Ａ、Ｇ、Ｎ、Ｓ、またはＴを含む）、（ｅ）アミノ酸配列AX_2X_3（配列番号１７４）を含む軽鎖相補性決定領域２（ＶＬ－ＣＤＲ２）（式中、X_2は、Ａ、Ｓ、またはＴを含み、X_3は、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、またはＴを含む）、及び（ｆ）アミノ酸配列$GX_2X_3X_4PX_6$（配列番号１７５）を含む軽鎖相補性決定領域３（ＶＬ－ＣＤＲ３）（式中、X_2は、Ｆ、Ｈ、Ｗ、またはＹを含み、X_3は、ＫまたはＱを含み、X_4は、ＦまたはＷを含み、X_6は、ＬまたはＭを含む）のうちの１つ以上を含む抗原結合部分を含む。

【００５８】

特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、（ａ）アミノ酸配列$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$（配列番号１７６）を含む重鎖相補性決定領域１（ＶＨ－ＣＤＲ１）（式中、X_1は、Ａ、Ｇ、またはＮを含み、X_2は、ＬまたはＭを含み、X_3は、Ａ、Ｅ、またはＳを含み、X_4は、ＦまたはＬを含み、X_5は、ＮまたはＴを含み、X_6は、Ｅ、Ｓ、またはＴを含み、X_7は、Ｈ、Ｎ、またはＳを含む）、（ｂ）アミノ酸配列ＷＳＮX_4Ｇ（配列番号１７７）を含む重鎖相補性決定領域２（ＶＨ－ＣＤＲ２）（式中、X_4は、ＧまたはＲを含む）、（ｃ）アミノ酸配列ＩＹX_3ＹX_5ＡＤＹＬ$X_{10}X_{11}$ＹX_{13}ＤX_{15}（配列番号１７８）を含む重鎖相補性決定領域３（ＶＨ－ＣＤＲ３）（式中、X_3は、ＦまたはＹを含み、X_5は、ＤまたはＥを含み、X_{10}は、ＨまたはＹを含み、X_{11}は、ＦまたはＷを含み、X_{13}は、Ｆ、Ｉ、Ｌ、Ｗ、またはＹを含み、X_{15}は、Ｆ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｗ、またはＹを含む）、（ｄ）アミノ酸配列ＳX_2ＧＩ$X_5X_6X_7$（配列番号１７９）を含む軽鎖相補性決定領域１（ＶＬ－ＣＤＲ１）（式中、X_2は、ＤまたはＥを含み、X_5は、Ｎ、Ｑ、またはＳを含み、X_6は、ＮまたはＳを含み、X_7は、Ｇ、Ｎ、Ｓ、またはＴを含む）、（ｅ）アミノ酸配列ＡＴX_3（配列番号１８０）を含む軽鎖相補性決定領域２（ＶＬ－ＣＤＲ２）（式中、X_3は、Ｄ、Ｅ、Ｎ、Ｑ、またはＳを含む）、及び（ｆ）アミノ酸配列Ｇ$X_2X_3X_4$ＰX_6（配列番号１８１）を含む軽鎖相補性決定領域３（ＶＬ－ＣＤＲ３）（式中、X_2は、Ｆ、Ｈ、Ｗ、またはＹを含み、X_3は、ＫまたはＱを含み、X_4は、ＦまたはＷを含み、X_6は、ＬまたはＭを含む）を含む抗原結合部分を含む。

【００５９】

別の態様では、本発明は、哺乳動物、例えば、限定されないが、ネコでの使用に適した結合タンパク質を提供する。特定の実施形態では、ネコ化抗ＮＧＦ結合タンパク質は、（ａ）アミノ酸配列X_1Ｌ$X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ＭX_{10}（配列番号２０８）を含む重鎖相補性決定領域１（ＶＨ－ＣＤＲ１）（式中、X_1は、Ａ、Ｇ、Ｌ、Ｎ、またはＱを含み、X_3は、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｍ、Ｓ、Ｔ、またはＹを含み、X_4は、Ｌ、Ｍ、またはＶを含み、X_5は、Ａ、Ｍ、Ｎ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、またはＶを含み、X_6は、Ａ、Ｅ、Ｇ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｓ、またはＴを含み、X_7は、Ａ、Ｄ、Ｈ、Ｉ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、Ｔ、またはＹを含み、X_8は、ＡまたはＳを含み、X_{10}は、ＳまたはＶを含む）、（ｂ）アミノ酸配列$X_1X_2X_3X_4X_5$ＧＴX_8ＹX_{10}ＤX_{12}ＶX_{14}（配列番号２０９）を含む重鎖相補性決定領域２（ＶＨ－ＣＤＲ２）（式中、X_1は、ＩまたはＬを含み、X_2は、ＷまたはＹを含み、X_3は、Ａ、Ｐ、またはＳを含み、X_4は、Ｄ、Ｅ、Ｎ、Ｑ、Ｒ、またはＳを含み、X_5は、Ｇ、Ｒ、またはＹを含み、X_8は、ＤまたはＹを含み、X_{10}は、Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｓ、またはＴを含み、X_{12}は、ＤまたはＳを含み、X_{14}は、Ｄ、Ｅ、またはＫを含む）、（ｃ）アミノ酸配列$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$Ｌ$X_{12}X_{13}X_{14}$Ｆ$X_{16}X_{17}$（配列番号２１０）を含む重鎖相補性決定領域３（ＶＨ－ＣＤＲ３）（式中、X_1は、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｋ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、またはＴを含み、X_2は、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、またはＹを含み、X_3は、Ｉ、Ｌ、Ｗ、またはＹを含み、X_4は、Ｆ、Ｔ、Ｗ、またはＹを含み、X_5は、Ｆ、Ｈ、またはＹを含み、X_6は、ＨまたはＹを含み、X_7は、ＤまたはＥを含み、X_8は、Ａ、Ｓ、またはＶを含み、X_9は、Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｎ、Ｑ、またはＹを含み、X_{10}は、Ｆ、Ｈ、またはＹを含み、X_{12}は、ＨまたはＹを含み、X_{13}は、ＦまたはＷを含み、X_{14}は、Ｄ、Ｉ、Ｌ、Ｗ、またはＹを含み、X_{16}は、ＤまたはＱを含み、X_{17}は、Ｅ、Ｆ、Ｈ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｗ、またはＹを含む）、（ｄ）アミノ酸配列X_1ＡＳ$X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ＬX_{11}（配列番号２１１）を含む軽鎖相補性決定領域１（ＶＬ－ＣＤＲ１）（式中、X_1は、ＦまたはＲを含み、X_4は、Ｅ、Ｋ、またはＮを含み、X_5は、ＡまたはＧを含み、X_6は、Ｉ、Ｌ、またはＶを含み、X_7は、Ａ、Ｄ、Ｇ、Ｌ、Ｐ、Ｑ、Ｓ、Ｖ、またはＹを含み、X_8は、Ｋ、Ｑ、Ｎ、Ｓ、またはＹを含み、X_9は、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｋ、Ｌ、Ｎ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、またはＴを含み、X_{11}は、Ａ、Ｇ、またはＳを含む）、（ｅ）アミノ酸配列Ａ$X_2X_3X_4X_5X_6X_7$（配列番号２１２）を含む軽鎖相補性決定領域２（ＶＬ－ＣＤＲ２）（式中、X_2は、Ａ、Ｄ、Ｌ、Ｑ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、またはＹを含み、X_3は、Ｄ、Ｅ、Ｋ、

Ｎ、Ｑ、またはＳを含み、X_4は、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、またはＶを含み、X_5は、ＨまたはＬを含み、X_6は、Ｈ、Ｉ、Ｌ、またはＭを含み、X_7は、Ｄ、Ｅ、Ｎ、Ｓ、またはＴを含む）、（ｆ）アミノ酸配列ＱＱ$X_3X_4X_5X_6X_7X_8$Ｔ（配列番号２１３）を含む軽鎖相補性決定領域３（ＶＬ－ＣＤＲ３）（式中、X_3は、ＧまたはＹを含み、X_4は、Ｄ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｋ、Ｌ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、またはＹを含み、X_5は、Ｅ、Ｋ、Ｑ、Ｒ、またはＳを含み、X_6は、Ｉ、Ｆ、Ｔ、またはＷを含み、X_7は、ＥまたはＰを含み、X_8は、Ｌ、Ｍ、またはＷを含む）を含む。

【００６０】

特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、ＶＨ－ＣＤＲ１（ＧＬＳＬＴＳX_7ＳＭX_{10}（配列番号２１４）を含み、式中、X_7は、Ａ、Ｄ、またはＮを含み、X_{10}は、ＳまたはＶを含む）、ＶＨ－ＣＤＲ２（X_1X_2ＳＮX_5ＧＴ（配列番号２１５）を含み、式中、X_1は、ＩまたはＬを含み、X_2は、ＷまたはＹを含み、X_5は、ＧまたはＲを含む）、ＶＨ－ＣＤＲ３（ＡＳＩＹＹＹX_7ＡX_9ＹＬＨＷＹＦＤX_{12}（配列番号２１６）を含み、式中、X_7は、ＤまたはＥを含み、X_9は、ＤまたはＥを含み、X_{12}は、ＥまたはＦを含む）、ＶＬ－ＣＤＲ１（ＲＡＳX_4ＧＩX_7X_8ＮＬＳ（配列番号２１７）を含み、式中、X_4は、ＥまたはＫを含み、X_7は、Ａ、Ｑ、またはＳを含み、X_8は、ＫまたはＮを含む）、ＶＬ－ＣＤＲ２（Ａ$X_2X_3X_4$ＬＨＳ（配列番号２１８）を含み、式中、X_2は、ＱまたはＴを含み、X_3は、ＤまたはＳを含み、X_4は、Ｉ、Ｎ、またはＶを含む）、及びＶＬ－ＣＤＲ３（ＱＱＧX_4ＫＷＰＬＴ（配列番号２１９）を含み、式中、X_4は、Ｆ、Ｗ、またはＹを含む）を含む。

【００６１】

特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、本明細書に開示されるネコ化抗体１０１の１つ以上（すなわち、１、２、３、４、５、または６つすべて）のＣＤＲを含む。特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、本明細書に開示される親和性成熟ネコ化抗体の１つ以上（すなわち、１、２、３、４、５、または６つすべて）のＣＤＲを含む。特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、本明細書で提供されるネコ化抗体１０１及び親和性成熟バリアントの１つ以上に由来するＣＤＲを含む。特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、図１７Ａに示すV_HＣＤＲを含む。特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、図１７Ｂに示すV_LＣＤＲを含む。特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、図１７Ａに示す抗体V_HドメインのV_HＣＤＲを含む。特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、図１７Ｂに示す抗体V_LドメインのV_LＣＤＲを含む。

【００６２】

本発明によれば、特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、本明細書に開示されるネコ化抗体１０１バリアントのアミノ酸、例えば、V_H内の以下のアミノ酸：Ｓ２８Ｈ、Ｔ３０Ｎ、Ｔ３０Ｒ、Ｓ３１Ｈ、Ｓ３５Ｖ、Ｙ５２Ｗ、Ｓ５３Ｐ、Ｇ５５Ｒ、Ｇ５５Ｙ、Ｙ５８Ｄ、Ｔ６０Ｄ、Ｔ６０Ｅ、Ｔ６０Ｈ、Ｔ６０Ｓ、Ｓ６２Ｄ、Ｋ６４Ｄ、Ｋ６４Ｅ、Ｓ９７Ｈ、Ｓ９７Ｋ、Ｓ９７Ｍ、Ｓ９７Ｎ、Ｓ９７Ｑ、Ｓ９７Ｔ、Ｙ９９Ｆ、Ｙ１０１Ｈ、Ｄ１０４Ｅ、Ｄ１０４Ｋ、Ｄ１０４Ｎ、Ｄ１０４Ｑ、Ｆ１１２Ｅ、Ｄ１１２Ｈ、Ｆ１１２Ｎ、Ｆ１１２Ｐ、及び／またはV_L内の以下のアミノ酸：Ｒ２４Ｆ、Ｓ３０Ａ、Ｓ３０Ｌ、Ｓ３０Ｐ、Ｓ３０Ｑ、Ｓ３０Ｖ、Ｓ３０Ｙ、Ｎ３１Ｑ、Ｓ３４Ａ、Ｓ３４Ｇ、Ｎ５３Ｈ、Ｎ５３Ｉ、Ｎ５３Ｋ、Ｎ５３Ｌ、Ｎ５３Ｍ、Ｎ５３Ｖ、Ｌ５４Ｈ、Ｈ５５Ｉ、Ｈ５５Ｌ、Ｈ５５Ｍ、Ｓ５６Ｄ、Ｓ５６Ｅ、Ｓ５６Ｎ、Ｓ５６ＴのうちのＮ１つ以上を含む。特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、上記に挙げたアミノ酸バリアントの１つ以上を含まない。例えば、特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、Ｇ５５Ｒのアルギニンを含まない。アミノ酸の位置は、ネコ化抗体１０１の残基及び番号によって示され、例えば、Ｓ２８Ｈは、V_Hまたは抗体１０１のＳ２８に対応する位置のＨを示す。前述の位置には、ＣＤＲ及びフレームワークアミノ酸残基が含まれる。

【００６３】

特定の実施形態では、抗ＮＧＦ結合タンパク質は、V_Hに以下のアミノ酸：Ｓ３５Ｖ、

Ｇ５５Ｒ、Ｓ９７Ｑ、Ｆ１１２Ｅの１つ以上を含み、及び／またはV_Lに以下のアミノ酸：Ｓ３０Ａ、Ｓ３０Ｑ、Ｎ５３Ｉ、Ｎ５３Ｖの１つ以上を含む。上記の配列変異を含むＶＨ鎖とＶＬ鎖の対形成は、ＶＨ及びＶＬ変異の適合性、ならびに変異を含むＶＨ及びＶＬドメインの互換性を示す。

【００６４】

特定の実施形態では、結合タンパク質は、イヌ抗体またはイヌ化抗体を含む。特定の実施形態では、結合タンパク質は、ネコ抗体またはネコ化抗体を含む。

【００６５】

特定の実施形態では、アミノ酸残基を、アミノ酸側鎖の特性が保存され得るアミノ酸残基へ変異させる。アミノ酸側鎖の特性の例としては、疎水性アミノ酸（Ａ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｆ、Ｐ、Ｗ、Ｙ、Ｖ）、親水性アミノ酸（Ｒ、Ｄ、Ｎ、Ｃ、Ｅ、Ｑ、Ｇ、Ｈ、Ｋ、Ｓ、Ｔ）、及び以下の側鎖：脂肪族側鎖（Ｇ、Ａ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｐ）、水酸基含有側鎖（Ｓ、Ｔ、Ｙ）、硫黄原子含有側鎖（Ｃ、Ｍ）、カルボン酸及びアミド含有側鎖（Ｄ、Ｎ、Ｅ、Ｑ）、塩基含有側鎖（Ｒ、Ｋ、Ｈ）、ならびに芳香族含有側鎖（Ｈ、Ｆ、Ｙ、Ｗ）を含むアミノ酸が挙げられる。括弧内の文字は１文字表記のアミノ酸コードを示す。各グループ内のアミノ酸置換は保存的置換と呼ばれる。１つ以上のアミノ酸残基が欠失、付加、及び／または置換された修飾アミノ酸配列を含むポリペプチドが、元の生物学的活性を保持できることはよく知られている（Ｍａｒｋ　Ｄ．Ｆ．ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８１：５６６２－５６６６（１９８４）；Ｚｏｌｌｅｒ　Ｍ．Ｊ．ａｎｄ　Ｓｍｉｔｈ　Ｍ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１０：６４８７－６５００（１９８２）；Ｗａｎｇ　Ａ．ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２４：１４３１－１４３３；Ｄａｌｂａｄｉｅ－ＭｃＦａｒｌａｎｄ　Ｇ．ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．７９：６４０９－６４１３（１９８２））。変異アミノ酸の数は限定されないが、通常、各ＣＤＲのアミノ酸の４０％以内、好ましくは３５％以内、さらに好ましくは３０％以内（例えば２５％以内）である。アミノ酸配列の同一性は、本明細書に記載されるように決定することができる。

【００６６】

本発明は、イヌ及びネコにおける抗原性を最小限に抑えるように設計または修飾された組換え抗体を提供する。特定の実施形態では、抗体を、Ｔ細胞エピトープを除去するためにさらに修飾する。

【００６７】

本明細書で使用される場合、用語「イヌ」には、別段の指示がない限り、すべてのイエイヌ、Ｃａｎｉｓ　ｌｕｐｕｓ　ｆａｍｉｌｉａｒｉｓ、またはＣａｎｉｓ　ｆａｍｉｌｉａｒｉｓが含まれる。

【００６８】

本明細書で使用される場合、用語「ネコ」とは、ネコ科の任意のメンバーを指す。イエネコ、純血種及び／または雑種の伴侶ネコ、及び野生または野良ネコはすべてネコ科である。

【００６９】

本明細書で使用される用語「イヌフレームワーク」または「ネコフレームワーク」とは、本明細書でＣＤＲ残基として定義される超可変領域残基以外のイヌ抗体の重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を指す。イヌ化抗体に関して、特定の実施形態では、他の種に由来するＮＧＦ結合抗体のＣＤＲと密接に一致するイヌ抗体重鎖及び軽鎖可変ドメイン配列において、イヌＣＤＲを同定する。特定の実施形態では、天然のイヌＣＤＲを、対応する外来ＣＤＲ（例えば、ラットまたはマウス抗体由来の）に、両鎖において置換する。ネコ化抗体に関して、特定の実施形態では、他の種に由来するＮＧＦ結合抗体のＣＤＲと密接に一致するネコ抗体重鎖及び軽鎖可変ドメイン配列において、ネコＣＤＲを同定する。特定の実施形態では、天然のネコＣＤＲを、対応する外来ＣＤＲ（例えば、ラットまたはマウス抗体由来の）に、両鎖において置換する。任意選択で、イヌ化抗体またはネコ化抗体の重鎖及び／または軽鎖は、いくつかの変異したまたは外来の非ＣＤＲ残基、例えば、生殖系列抗

体配列間で異なるフレームワークアミノ酸残基、または抗体内の外来ＣＤＲの立体構造を保存する変異を含み得る。

【００７０】

イヌには５つの主要なアイソタイプ（ＩｇＡ、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＥ）ならびに２つの形態の軽鎖（κ及びλ）が存在する。イヌでは、ＩｇＧに４つのサブタイプが存在し、それらは、ＩｇＧＡ、ＩｇＧＢ、ＩｇＧＣ、及びＩｇＧＤである（Ｂｅｒｇｅｒｏｎ ｅｔａｌ ａｌ，２０１４，Ｃｏｍｐａｒａｔｉｖｅ ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ｃａｎｉｎｅ ＩｇＧ ｓｕｂｃｌａｓｓｅｓ．Ｖｅｔｅｒｉｎａｒｙ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｐａｔｈｏｌｏｇｙ．１５７：３１－４１）。ネコの場合、ＩｇＧにはＩｇＧ１ａ、ＩｇＧ１ｂ、及びＩｇＧ２の３つのサブタイプが存在する（Ｓｔｒｅｉｔｚｅｌ ｅｔ ａｌ．２０１４，Ｉｎ ｖｉｔｒｏ ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ｆｅｌｉｎｅ ＩｇＧｓ．Ｖｅｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｐａｔｈｏｌ １５８，２１４－２２３，ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０１６／ｊ．ｖｅｔｉｍｍ．２０１４．０１．０１２）。

【００７１】

本発明は、１つ以上のエフェクター機能または循環半減期を調節するように改変されたイヌ化抗体及びネコ化抗体を提供する。抗体のヒンジ及び定常ドメインは、宿主の受容体または補体タンパク質と結合して、エフェクター機能を媒介し、抗体循環を調節する。特定の実施形態では、１つ以上のエフェクター機能を増強する。特定の実施形態では、１つ以上のエフェクター機能を低減または排除する。特定の実施形態では、本発明の抗体は、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）及び／または補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を調節するための修飾を含む。非限定的な例としては、エフェクター機能を低下させるためのイヌＩｇＧＢ定常領域残基Ｍｅｔ２４２及び／またはＬｅｕ２４３の改変が挙げられる。特定の実施形態では、本発明のＩｇＧＢ定常領域は、Ｍ２４２Ａ及びＬ２４３Ａ置換を含む。特定の実施形態では、第２の定常ドメイン（ＣＨ２）及び／または第３の定常ドメイン（ＣＨ３）は、ＦｃＲｎ（新生児Ｆｃ）受容体への結合を調節するように設計された野生型からの変異及び変異の組み合わせを含む。イヌ定常領域では、そのような変異には、限定されないが、Ａｌａ４２６の置換、例えばＡ４２６ＹまたはＡ４２６Ｈ、Ｔｈｒ２８６の置換、例えばＴ２８６ＬまたはＴ２８６Ｙ、Ｔｙｒ４３６の置換、例えばＹ４３６Ｈ、ならびにＡ４２６Ｙ＋Ｔ２８６Ｌ、Ａ４２６Ｙ＋Ｙ４３６Ｈ、Ａ４２６Ｈ＋Ｔ２８６Ｌ、及びＡ４２６Ｈ＋Ｔ２８６Ｙを含むがこれらに限定されないそのような変異の組み合わせが含まれる。特定の実施形態では、本発明のキメラ抗体またはイヌ化抗体は、アミノ酸Ａｓｎ４３４における置換、例えば、限定されないが、Ｎ４３４Ｈを含む。ネコ定常領域では、そのような変異には、限定されないが、Ｓ４２８ＹまたはＳ４２８Ｌを含むがこれらに限定されないＳｅｒ４２８の置換、Ｑ３１１Ｖを含むがこれに限定されないＧｌｎ３１１の置換、Ｌ３０９Ｖを含むがこれに限定されないＬｅｕ３０９の置換、Ｔ２８６Ｅを含むがこれに限定されないＴｈｒ２８６の置換、Ｅ３８０Ｔを含むがこれに限定されないＧｌｕ３８０の置換、ならびにＳ４２８Ｙ＋Ｑ３１１Ｖ、Ｓ４２８Ｙ＋Ｌ３０９Ｖ、Ｓ４２８Ｙ＋Ｑ３１１Ｖ＋Ｔ２８６Ｅ、Ｓ４２８Ｙ＋Ｑ３１１Ｖ＋Ｅ３８０Ｔ、及びＳ４２８Ｙ＋Ｌ３０９Ｖ＋Ｅ３８０Ｔを含むがこれらに限定されないそのような変異の組み合わせが含まれる。特定の実施形態では、本発明のキメラ抗体またはネコ化抗体は、Ｓ４２８Ｌ及び／またはＳ４３４Ｈを含むがこれらに限定されないアミノ酸Ｓｅｒ４２８及び／またはＳｅｒ４３４における置換を含む。

【００７２】

本明細書で使用される場合、用語「抗体」には、完全な抗体分子の抗原結合断片が含まれる。本明細書で使用される場合、抗体の「抗原結合部分」、抗体の「抗原結合断片」などの用語には、抗原に特異的に結合して複合体を形成する、任意の天然の、酵素的に入手可能な、合成の、または遺伝子改変されたポリペプチドもしくは糖タンパク質が含まれる。本明細書で使用される場合、用語「特異的に結合する（ｓｐｅｃｉｆｉｃａｌｌｙ ｂ

ｉｎｄｓ）」または「特異的に結合する（ｂｉｎｄｓ　ｓｐｅｃｉｆｉｃａｌｌｙ）」とは、本発明のＮＧＦ結合タンパク質が、代替抗原に比べて、より頻繁に、より迅速に、より長い持続時間で、及び／またはより高い親和性でＮＧＦと反応または会合することを意味する。例えば、ＮＧＦ結合タンパク質は、他のタンパク質またはペプチドに比べて、実質的により高い親和性（例えば、少なくとも２倍、もしくは５倍、もしくは１０倍、もしくは２０倍、もしくは５０倍、もしくは１００倍、もしくは５００倍、もしくは１０００倍、もしくは１０，０００倍、またはそれ以上）でＮＧＦに結合する。特定の実施形態では、ＮＧＦ結合タンパク質は、その結合するエピトープまたは標的について、例えば、10^{-4}Ｍ以下、例えば、10^{-5}Ｍ、10^{-6}Ｍ、10^{-7}Ｍ、10^{-8}Ｍ、10^{-9}Ｍ、10^{-10}Ｍ、10^{-11}Ｍ、または10^{-12}Ｍの平衡解離定数K_DでＮＧＦに結合する。当業者であれば、１つの種に由来する標的（例えば、ＮＧＦ）に特異的に結合する抗体が、ＮＧＦのオルソログにも特異的に結合し得ることを認識するであろう。

【００７３】

抗体の抗原結合断片は、任意の好適な標準的技術、例えば、タンパク質の分解消化、または抗体の可変ドメイン及び任意選択で定常ドメインをコードするＤＮＡの操作及び発現を伴う組換え遺伝子工学技術を使用して、例えば、完全な抗体分子から誘導され得る。そのようなＤＮＡは既知であり、及び／または例えば商業的供給元、ＤＮＡライブラリ（例えばファージ抗体ライブラリを含む）から容易に入手可能であるか、または合成することができる。ＤＮＡを、化学的に、または分子生物学技術を使用して配列決定し、操作して、例えば、１つ以上の可変ドメイン及び／または定常ドメインを適切な構成に配置し、コドンを導入し、システイン残基を作成し、アミノ酸を修飾、付加、または欠失させる、などを行ってよい。

【００７４】

抗原結合断片の非限定的な例としては、（ｉ）Ｆａｂフラグメント、（ｉｉ）Ｆ（ａｂ’）２フラグメント、（ｉｉｉ）Ｆｄフラグメント、（ｉｖ）Ｆｖフラグメント、（ｖ）一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）分子、（ｖｉ）ｄＡｂフラグメント、及び（ｖｉｉ）抗体の超可変領域（例えば、ＣＤＲ３ペプチドなどの単離された相補性決定領域（ＣＤＲ））、または拘束ＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４ペプチドを模倣するアミノ酸残基からなる最小認識単位が挙げられる。他の改変分子、例えばドメイン特異的抗体、単一ドメイン抗体、ドメイン欠失抗体、キメラ抗体、ＣＤＲ移植抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、ナノボディ（例えば、一価ナノボディ、二価ナノボディなど）、小型モジュラー免疫医薬品（ＳＭＩＰ）、及びサメ可変ＩｇＮＡＲドメインもまた、本明細書で使用される表現「抗原結合断片」に包含される。

【００７５】

特定の実施形態では、抗体の抗原結合断片は、少なくとも１つの可変ドメインを含む。可変ドメインは、任意のサイズまたはアミノ酸組成であってもよく、一般に、１つ以上のフレームワーク配列に隣接するか、またはフレーム内にある少なくとも１つのＣＤＲを含む。V_Lドメインに会合したV_Hドメインを有する抗原結合断片において、V_H及びV_Lドメインは、任意の好適な配置で相互に配置してよい。例えば、可変領域は二量体であり、V_H-V_H、V_H-V_L、またはV_L-V_L二量体を含み得る。あるいは、抗体の抗原結合断片は、単量体V_HまたはV_Lドメインを含み得る。

【００７６】

特定の実施形態では、抗体の抗原結合断片は、少なくとも１つの定常ドメインに共有結合した少なくとも１つの可変ドメインを含み得る。本発明の抗体の抗原結合断片内に見出され得る可変ドメイン及び定常ドメインの非限定的な例示的な構成としては、（ｉ）V_H-C_H1；（ｉｉ）V_H-C_H2；（ｉｉｉ）V_H-C_H3；（ｉｖ）$V_H-C_H1-C_H2$；（Ｖ）$V_H-C_H1-C_H2-C_H3$；（ｖｉ）$V_H-C_H2-C_H3$；（ｖｉｉ）V_H-C_L；（ｖｉｉｉ）V_L-C_H1；（ｉｘ）V_L-C_H2、（ｘ）V_L-C_H3；（ｘｉ）$V_L-C_H1-C_H2$；（ｘｉｉ）$V_L-C_H1-C_H2-C_H3$；（ｘｉｉｉ）$V_L-C_H2-C_H3$；及び（ｘｉｖ）V_L-C_Lが挙げられる。上記に列挙した例示的な構成のいずれか

を含む、可変ドメイン及び定常ドメインの任意の構成において、可変ドメイン及び定常ドメインは、互いに直接連結され得るか、または完全もしくは部分的なヒンジもしくはリンカー領域によって連結され得る。ヒンジ領域は、単一ポリペプチド分子内の隣接する可変ドメイン及び／または定常ドメイン間に屈曲性または半屈曲性の結合をもたらす少なくとも２個（例えば、５、１０、１５、２０、４０、６０個、またはそれ以上）のアミノ酸からなり得る。さらに、本発明の抗体の抗原結合断片は、互いに、及び／または１つ以上の単量体V_HまたはV_Lドメインと（例えば、ジスルフィド結合（複数可）により）非共有結合した、上記で列挙した可変及び定常ドメイン構成のいずれかのホモ二量体またはヘテロ二量体（または他の多量体）を含み得る。

【００７７】

用語「ダイアボディ（Ｄｂ）」とは、遺伝子融合によって構築された二価の抗体断片を指す（例えば、Ｐ．Ｈｏｌｌｉｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：６４４４－６４４８（１９９３），ＥＰ４０４，０９７，ＷＯ９３／１１１６１）。一般に、ダイアボディは、２つのポリペプチド鎖の二量体である。各ポリペプチド鎖において、同一鎖内の軽鎖可変領域（V_L）と重鎖可変領域（V_H）は、短いリンカー、例えば約５残基のリンカーを介して接続しており、その結果、それらは相互に結合することができない。２つの間のリンカーが短すぎるため、同じポリペプチド鎖内のV_LとV_Hは、一本鎖Ｖ領域フラグメントを形成することができず、代わりに二量体を形成する。したがって、ダイアボディは、２つの抗原結合ドメインを有する。２種類の抗原（ａ及びｂ）に対するV_L領域とV_H領域を約５残基のリンカーを介して結合させて$V_{La}-V_{Hb}$及び$V_{Lb}-V_{Ha}$を形成し、次いで共発現させると、それらは二重特異性Ｄｂとして分泌される。本発明の抗体は、そのようなＤｂであってもよい。

【００７８】

一本鎖抗体（「ｓｃＦｖ」とも呼ばれる）は、抗体の重鎖Ｖ領域と軽鎖Ｖ領域を連結することによって調製することができる（ｓｃＦｖの総説については、Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ“Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ”Ｖｏｌ．１１３，ｅｄｓ．Ｒｏｓｅｎｂｕｒｇ ａｎｄ Ｍｏｏｒｅ，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ，Ｎ．Ｙ．，ｐｐ．２６９－３１５（１９９４）を参照のこと）。一本鎖抗体の調製方法は当技術分野で公知である（例えば、米国特許第４，９４６，７７８号、第５，２６０，２０３号、第５，０９１，５１３号、及び第５，４５５，０３０号を参照のこと）。そのようなｓｃＦｖでは、重鎖Ｖ領域と軽鎖Ｖ領域は、リンカー、好ましくはポリペプチドリンカーを介して互いに連結される（Ｈｕｓｔｏｎ，Ｊ．Ｓ．ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ，１９８８，８５，５８７９－５８８３）。ｓｃＦｖにおける重鎖Ｖ領域及び軽鎖Ｖ領域は、同じ抗体に由来してもよく、または異なる抗体に由来してもよい。Ｖ領域を連結するために使用されるペプチドリンカーは、１２～１９残基からなる任意の一本鎖ペプチドであってよい。ｓｃＦｖをコードするＤＮＡは、上記の抗体の重鎖または重鎖のＶ領域をコードするＤＮＡ、及び上記の抗体の軽鎖または軽鎖のＶ領域をコードするＤＮＡから選択される、所望のアミノ酸配列をコードする全ＤＮＡまたは部分ＤＮＡを鋳型として使用し、両端を規定するプライマーペアを使用して、ＰＣＲによって増幅することができる。続いて、ペプチドリンカー部分をコードするＤＮＡと、それぞれ重鎖及び軽鎖に連結されるＤＮＡの両端を規定するプライマーペアとの組み合わせを使用して、さらなる増幅を行うことができる。ｓｃＦｖをコードするＤＮＡを構築した後、従来の方法を使用して、これらのＤＮＡを含む発現ベクター、及びこれらの発現ベクターによって形質転換された宿主を取得することができる。さらに、得られた宿主を用いて従来の方法に従ってｓｃＦｖを取得することができる。これらの抗体断片は、抗体断片をコードする遺伝子を取得し、上記で概説したようにこれらを発現させることによって宿主内で産生することができる。修飾された抗体として、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）などの各種分子に結合させた抗体を使用してもよい。抗体の修飾方法は当技術分野ですでに確立されている。本発明における「抗体」には、上記の抗体も包含される。

【００７９】
本明細書で使用される用語「Ｋｄ」とは、抗体－抗原相互作用の解離定数を指す。解離定数Ｋｄと結合定数Ｋａは、親和性の定量的な尺度である。平衡状態では、遊離抗原（Ａｇ）及び遊離抗体（Ａｂ）は、抗原抗体複合体（Ａｇ－Ａｂ）と平衡状態にあり、速度定数ｋａ及びｋｄは、個々の反応の速度を定量化する。平衡状態では、ｋａ［Ａｂ］［Ａｇ］＝ｋｄ［Ａｇ－Ａｂ］である。解離定数Ｋｄは、Ｋｄ＝ｋｄ／ｋａ＝［Ａｇ］［Ａｂ］／［Ａｇ－Ａｂ］で求められる。Ｋｄは濃度の単位を有しており、最も一般的にはＭ、ｍＭ、ｎＭ、ｐＭなどである。Ｋｄとして表される抗体親和性を比較する場合、ＮＧＦに対する親和性が高いほど、より低い値が示される。結合定数Ｋａは、Ｋａ＝ｋａ／ｋｄ＝［Ａｇ－Ａｂ］／［Ａｇ］［Ａｂ］で求められる。Ｋａは、濃度の逆数の単位を有し、最も一般的には、M^{-1}、mM^{-1}、nM^{-1}、pM^{-1}などである。本明細書で使用される場合、用語「結合力」とは、価数を考慮した抗原抗体結合の強度を指す。

【００８０】
得られた抗体は均一になるまで精製することができる。タンパク質の単離及び精製に通常用いられる方法により、抗体を単離し、精製することができる。例えば、カラムクロマトグラフィー、濾過、限外濾過、塩析、透析、分取ポリアクリルアミドゲル電気泳動、及び等電点電気泳動から選択される１つ以上の方法を適宜組み合わせて、抗体を単離し、精製することができる（Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｆｏｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｃｏｕｒｓｅ Ｍａｎｕａｌ，Ｄａｎｉｅｌ Ｒ．Ｍａｒｓｈａｋ ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）；Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，１９８８）。そのような方法は、上記に列挙したものに限定されない。クロマトグラフィー法には、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、及び吸着クロマトグラフィーが含まれる。これらのクロマトグラフィー法は、ＨＰＬＣ及びＦＰＬＣなどの液相クロマトグラフィーを用いて実施することができる。アフィニティークロマトグラフィーに使用されるカラムとしては、プロテインＡカラム及びプロテインＧカラムが挙げられる。例えば、プロテインＡカラムとしては、Ｈｙｐｅｒ Ｄ、ＰＯＲＯＳ、及びＳｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆ．Ｆ．（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）が挙げられる。また、抗原を固定化した担体を用いて、抗原の結合を利用して抗体を精製することもできる。

【００８１】
本明細書で使用される場合、用語「治療薬」とは、哺乳動物レシピエントに対して有益な効果を有する任意の薬剤または材料を指す。したがって、「治療薬」は、核酸またはタンパク質成分を有する治療用分子と予防用分子の両方を包含する。

【００８２】
本明細書で使用される「治療する」とは、所与の疾患または病態の少なくとも１つの症状を改善すること、治癒すること、及び／またはその発症を予防することを指す。

【００８３】
抗体またはその断片を含む、本明細書に記載の抗ＮＧＦタンパク質は、ＮＧＦに関連する疾患及び障害を改善するか、またはその症状を軽減するか、または治療するか、または予防するのに有用である。抗ＮＧＦタンパク質または断片、ならびに他の薬剤との組み合わせを、本明細書に記載の医薬組成物の形態で、ＮＧＦに関連する疾患及び障害の治療を必要とする対象に治療有効量で投与する。

【００８４】
特定の実施形態では、本方法は、対象における疼痛を改善するか、またはその症状を軽減するか、または治療するか、または予防することを含む。特定の実施形態では、抗ＮＧＦタンパク質、抗体、またはそれらの断片は、ＮＧＦとＴｒｋＡ及び／またはｐ７５との会合を阻害し、例えば、単独でまたは第２の薬剤と併用して投与され、炎症性疼痛、術後

切開痛、複雑ながん性疼痛（原発性または転移性骨がん性疼痛を含むがこれらに限定されない）、骨折痛、骨粗鬆症性骨折痛、骨粗鬆症による痛み、火傷による痛み、及び他の侵害受容性疼痛を治療するか、改善するか、その症状を軽減するか、または予防するために使用される。

【００８５】

特定の実施形態では、抗体組成物及び方法を、変形性関節症（ＯＡ）の痛みを改善するか、その症状を軽減するか、治療するか、または予防するために使用する。ＯＡは、関節軟骨、滑膜、軟骨下骨、及び関節周囲成分を含む関節全体の構造変化を特徴とする、緩やかに進行する変性関節疾患であり、痛み及び関節機能の喪失をもたらす。慢性的な痛み及びＯＡは、イヌ及びネコによく見られる。イヌの２０～３０％が臨床的に影響を受けており、ＯＡの兆候がある。すべてのネコの最大４０％が臨床的に影響を受けており、１２歳以上のすべてのネコの９０％にＯＡの兆候がある。

【００８６】

イヌのＯＡの最も一般的な部位は股関節であり、次いで膝関節、肩、及び手根骨である。ネコでは、股関節、膝関節、手根骨、または脊椎が最もよく影響を受ける。

【００８７】

抗ＮＧＦタンパク質、抗体または抗体断片を、任意選択で、他の鎮痛剤を含む１つ以上の活性薬剤と組み合わせて投与する。そのような活性薬剤には、鎮痛剤、抗ヒスタミン剤、解熱剤、抗炎症剤、抗生物質、抗ウイルス剤、及び抗サイトカイン剤が含まれる。活性薬剤としては、ＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１８、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－γ、ＢＡＦＦ、ＣＸＣＬ１３、ＩＰ－１０、ＶＥＧＦ、ＥＰＯ、ＥＧＦ、ＨＲＧ、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）、ヘプシジンのアゴニスト、アンタゴニスト、及び調節因子が挙げられる（前述のいずれかに対して反応する抗体、及びそれらの受容体のいずれかに対して反応する抗体を含む）。活性薬剤としてはまた、限定されないが、２－アリールプロピオン酸、アセクロフェナク、アセメタシン、アセチルサリチル酸（アスピリン）、アルクロフェナク、アルミノプロフェン、アモキシプリン、アンピロン、アリールアルカン酸、アザプロパゾン、ベノリレート／ベノリラート、ベノキサプロフェン、ブロムフェナク、カルプロフェン、セレコキシブ、コリンマグネシウムサリチル酸塩、クロフェゾン、ＣＯＸ－２阻害剤、デキシブプロフェン、デキケトプロフェン、ジクロフェナク、ジフルニサル、ドロキシカム、エテンザミド、エトドラク、エトリコキシブ、フェイスラミン、フェナム酸、フェンブフェン、フェノプロフェン、フルフェナム酸、フルノキサプロフェン、フルルビプロフェン、イブプロフェン、イブプロキサム、インドメタシン、インドプロフェン、ケブゾン、ケトプロフェン、ケトロラク、ロモキシカム、ロキソプロフェン、ルミラコキシブ、サリチル酸マグネシウム、メクロフェナム酸、メフェナム酸、メロキシカム、メタミゾール、サリチル酸メチル、モフェブタゾン、ナブメトン、ナプロキセン、ｎ－アリールアントラニル酸、神経成長因子（ＮＧＦ）、オキサメタシン、オキサプロジン、オキシカム、オキシフェンブタゾン、パレコキシブ、フェナゾン、フェニルブタゾン、フェニルブタゾン、ピロキシカム、ピルプロフェン、プロフェン、プログルメタシン、ピラゾリジン誘導体、ロフェコキシブ、サリチル酸サリチル、サリチルアミド、サリチル酸塩、スルフィンピラゾン、スリンダク、スプロフェン、テノキシカム、チアプロフェン酸、トルフェナム酸、トルメチン、及びバルデコキシブも挙げられる。

【００８８】

抗ヒスタミン剤は、ヒスタミンの作用または細胞（例えばマスト細胞）からのヒスタミンの放出に対抗する任意の化合物であり得る。抗ヒスタミン薬としては、アクリバスチン、アステミゾール、アザタジン、アゼラスチン、ベタタスチン、ブロムフェニラミン、ブクリジン、セチリジン、セチリジン類似体、クロルフェニラミン、クレマスチン、ＣＳ５６０、シプロヘプタジン、デスロラタジン、デキスクロルフェニラミン、エバスチン、エピナスチン、フェキソフェナジン、ＨＳＲ６０９、ヒドロキシジン、レボカバスチン、ロラチジン、メスコポラミン、ミゾラスチン、ノルアステミゾール、フェニンダミン、プロ

メタジン、ピリラミン、テルフェナジン、及びトラニラストが挙げられるが、これらに限定されない。

【００８９】

抗生物質としては、アミカシン、アミノグリコシド、アモキシシリン、アンピシリン、アンサマイシン、アルスフェナミン、アジスロマイシン、アズロシリン、アズトレオナム、バシトラシン、カルバセフェム、カルバペネム、カルベニシリン、セファクロル、セファドロキシル、セファレキシン、セファロチン、セファロチン、セファマンドール、セファゾリン、セフジニル、セフジトレン、セフェピム、セフィキシム、セフォペラゾン、セフォタキシム、セフォキシチン、セフポドキシム、セフプロジル、セフタジジム、セフチブテン、セフチゾキシム、セフトビプロール、セフトリアキソン、セフロキシム、セファロスポリン、クロラムフェニコール、シラスタチン、シプロフロキサシン、クラリスロマイシン、シリンダマイシン、クロキサシリン、コリスチン、コトリモキサゾール、ダルホプリスチン、デメクロサイクリン、ジクロキサシリン、ジリスロマイシン、ドリペネム、ドキシサイクリン、エノキサシン、エルタペネム、エリスロマイシン、エタンブトール、フルクロキサシリン、ホスホマイシン、フラゾリドン、フシジン酸、ガチフロキサシン、ゲルダナマイシン、ゲンタマイシン、糖ペプチド、ハービマイシン、イミペネム、イソニアジド、カナマイシン、レボフロキサシン、リンコマイシン、リネゾリド、ロメフロキサシン、ロラカルベフ、マクロライド、マフェニド、メロペネム、メチシリン、メトロニダゾール、メズロシリン、ミノサイクリン、モノバクタム、モキシフロキサシン、ムピロシン、ナフシリン、ネオマイシン、ネチルマイシン、ニトロフラントイン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、オキサシリン、オキシテトラサイクリン、パロモマイシン、ペニシリン、ペニシリン類、ピペラシリン、プラテンシマイシン、ポリミキシンＢ、ポリペプチド、プロントシル、ピラジナミド、キノロン、キヌプリスチン、リファンピシン、リファンピン、ロキシスロマイシン、スペクチノマイシン、ストレプトマイシン、スルファセタミド、スルファメチゾール、スルファニルイミド、スルファサラジン、スルフィソオキサゾール、スルホンアミド、テイコプラニン、テリスロマイシン、テトラサイクリン、テトラサイクリン、チカルシリン、チニダゾール、トブラマイシン、トリメトプリム、トリメトプリム－スルファメトキサゾール、トロレアンドマイシン、トロバフロキサシン、及びバンコマイシンが挙げられるが、これらに限定されない。

【００９０】

活性薬剤としてはまた、アルドステロン、ベクロメタゾン、ベタメタゾン、コルチコステロイド、コルチゾール、酢酸コルチゾン、酢酸デオキシコルチコステロン、デキサメタゾン、酢酸フルドロコルチゾン、グルココルチコイド、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾン、ステロイド、及びトリアムシノロンも挙げられる。これらの活性薬剤の任意の好適な組み合わせもまた企図される。

【００９１】

ＯＡ及びＯＡに関連する痛みの現在の最も一般的な治療法は、ＮＳＡＩＤ（抗疼痛薬でもある）である。ＮＳＡＩＤは常に十分な効果があるとは限らず、通常は毎日投与する必要があり、米国ではネコへの長期使用が承認されているものはない。さらに、イヌとネコの両方でＮＳＡＩＤを使用する場合、特に長期治療の場合、安全性と忍容性に関する懸念がある。ＮＳＡＩＤを抗ＮＧＦ　ｍＡｂと長期間にわたって共投与することは推奨されない。

【００９２】

特定の実施形態では、治療は、関節の健康を補助するために、オメガ３脂肪酸、マイクロラクチン、及び／またはグルコサミン／コンドロイチンを含有する栄養補助食品の共投与を含む。Ａｄｅｑｕａｎ（多硫酸化グリコサミノグリカン）は、軟骨の損失を抑制するＦＤＡ承認の疾患修飾薬であり、これも共投与してよい。

【００９３】

製剤及び投与方法

【００９４】

ｉｎ ｖｉｖｏで使用する場合、本明細書に記載の治療薬を、一般に、投与前に医薬組成物に組み込む。そのような組成物中には、本明細書に記載の１つ以上の治療化合物が活性成分（複数可）として存在する（すなわち、代表的なアッセイを使用して測定した場合、嚢胞性線維症の症状に対して統計的に有意な効果をもたらすのに十分なレベルで存在する）。医薬組成物は、特定の投与様式に適していることが当業者に公知である任意の薬学的に許容される担体（複数可）と組み合わせて、１つ以上のそのような化合物を含む。さらに、他の医薬活性成分（他の治療薬を含む）を組成物中に存在させてもよいが、必ずしも存在させる必要はない。

【００９５】

本発明の抗体は、標準的な方法に従って製剤化することができ（例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ、最新版、Ｍａｒｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｅａｓｔｏｎ，Ｕ．Ｓ．Ａを参照のこと）、薬学的に許容される担体及び／または添加剤を含み得る。本発明は、本発明の抗体と、薬学的に許容される担体及び／または添加剤とを含む組成物（試薬及び医薬品を含む）に関する。例示的な担体としては、界面活性剤（例えば、ＰＥＧ及びＴｗｅｅｎ）、賦形剤、酸化防止剤（例えば、アスコルビン酸）、着色剤、香料、保存剤、安定剤、緩衝剤（例えば、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸）、キレート剤（例えば、ＥＤＴＡ）、懸濁化剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動促進剤、及び矯味剤が挙げられる。しかしながら、本発明で使用してもよい担体は、このリストに限定されない。実際には、他の一般的に使用される担体：軽質無水ケイ酸、乳糖、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセリド、ポリオキシエチレン水添ヒマシ油６０、ショ糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩などを適宜使用することができる。組成物はまた、他の低分子量ポリペプチド、タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、及び免疫グロブリン、ならびにアミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、及びリジンを含み得る。組成物を注射用の水溶液として調製する場合、組成物は、例えば生理食塩水、ブドウ糖、ならびに例えばＤ－ソルビトール、Ｄ－マンノース、Ｄ－マンニトール、及び塩化ナトリウムを含む他のアジュバントを含む等張液を含み得、これには、適切な可溶化剤、例えば、アルコール（例えば、エタノール）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール及びＰＥＧ）、ならびに非イオン性界面活性剤（ポリソルベート８０及びＨＣＯ－５０）も含有され得る。

【００９６】

必要に応じて、本発明の抗体をマイクロカプセル（ヒドロキシセルロース、ゼラチン、ポリメチルメタクリレートなどからなるマイクロカプセル）に封入し、コロイド状薬物送達系（リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルション、ナノ粒子、及びナノカプセル）の構成要素としてもよい（例えば、“Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ １６ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ”，Ｏｓｌｏ Ｅｄ．（１９８０）を参照のこと）。さらに、徐放性薬剤の製造方法も知られており、これらを本発明の抗体に適用することができる（Ｌａｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｍａｔｅｒ．Ｒｅｓ．１５：１６７－２７７（１９８１）；Ｌａｎｇｅｒ，Ｃｈｅｍ．Ｔｅｃｈ．１２：９８－１０５（１９８２）；米国特許第３，７７３，９１９号；欧州特許出願第５８，４８１号；Ｓｉｄｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ ２２：５４７－５５６（１９８３）；ＥＰ：１３３，９８８）。

【００９７】

イヌ及びネコの両方における好ましい投与経路は、通常、首の付け根の皮膚への皮下注射による投与である。特定の実施形態では、抗ＮＧＦタンパク質は、皮下投与用のペンまたはプレフィルドシリンジなどの統合送達系にパッケージングされる。Ｇｈｉｌ ｅｔ ａｌ．は、関節リウマチ（ＲＡ）における注射部位の痛み、患者の好み、及び安全性に基づいて、プレフィルドシリンジ（ＰＦＳ）及び自動注射器（ＡＩ）ペンを介したアダリム

マブのバイオシミラーＳＢ５の投与について説明している（Ｇｈｉｌ ｅｔ ａｌ．，Ｕｓａｂｉｌｉｔｙ ａｎｄ ｓａｆｅｔｙ ｏｆ ＳＢ５（ａｎ ａｄａｌｉｍｕｍａｂ ｂｉｏｓｉｍｉｌａｒ）ｐｒｅｆｉｌｌｅｄ ｓｙｒｉｎｇｅ ａｎｄ ａｕｔｏｉｎｊｅｃｔｏｒ ｉｎ ｐａｔｉｅｎｔｓ ｗｉｔｈ ｒｈｅｕｍａｔｏｉｄ ａｒｔｈｒｉｔｉｓ．Ｃｕｒｒ Ｍｅｄ Ｒｅｓ Ｏｐｉｎ ２０１９ Ｍａｒ；３５（３）：４９７－５０２を参照のこと）。本発明の組成物を、イヌ、ネコ、及び他の哺乳動物に同様に投与する。

【００９８】

疾患状態／病態の治療に関して、用語「治療有効量」とは、単回用量または複数回用量として投与した場合に、疾患状態／病態の任意の症状、態様、もしくは特徴に対して検出可能なプラスの効果を有し得る、単独であるか、または医薬組成物に含有されるかのいずれかの化合物の量を指す。そのような効果は、絶対的に有効である必要はない。

【００９９】

本明細書で使用される用語「治療する」、「治療すること」、及び「治療」には、症状を予防するために疾患状態／病態の臨床症状の発症前に化合物を投与すること、ならびに疾患状態／病態の任意の症状、態様、または特徴を軽減または除去するために、疾患状態／病態の臨床症状の発症後に化合物を投与することが含まれる。そのような治療は、絶対的に有用である必要はない。

【０１００】

特定の実施形態では、本治療薬を、不活性希釈剤または吸収可能な食用担体などの薬学的に許容されるビヒクルと組み合わせて、例えば経口的に全身投与してもよい。それらを、硬質または軟質のゼラチンカプセルに封入してもよく、錠剤に圧縮してもよく、または患者の食事の食物に直接組み込んでもよい。経口治療投与の場合、活性化合物を１つ以上の賦形剤と組み合わせて、摂取可能な錠剤、口腔錠、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、ウエハースなどの形態で使用してもよい。そのような組成物及び調製物は、少なくとも０．１％の活性化合物を含有すべきである。組成物及び製剤の割合は、当然ながら変動させてもよく、所与の単位剤形の重量の約２～約６０％であることが好都合であり得る。そのような治療上有用な組成物中の活性化合物の量は、有効な用量レベルが得られるような量である。

【０１０１】

錠剤、トローチ、丸薬、カプセルなどは、以下を含有し得る：トラガカントゴム、アカシア、コーンスターチ、もしくはゼラチンなどの結合剤、リン酸二カルシウムなどの賦形剤、コーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸などの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、及びスクロース、フルクトース、ラクトース、もしくはアスパルテームなどの甘味料、またはペパーミント、ウィンターグリーン油、もしくはチェリー香料などの香味料を加えてもよい。単位剤形がカプセルである場合、上記のタイプの材料に加えて、植物油またはポリエチレングリコールなどの液体担体を含有してもよい。他の様々な材料を、コーティングとして、または固体単位剤形の物理的形態を改変するために存在させてもよい。例えば、錠剤、丸薬、またはカプセルを、ゼラチン、ワックス、シェラック、または砂糖などでコーティングしてもよい。シロップまたはエリキシルには、活性化合物、甘味剤としてのスクロースまたはフルクトース、防腐剤としてのメチルパラベン及びプロピルパラベン、染料及びチェリー香料またはオレンジ香料などの香味料が含有され得る。当然のことながら、単位剤形の調製に使用される材料はいずれも、薬学的に許容され、使用される量において実質的に無毒であるべきである。さらに、活性化合物を徐放性製剤及び装置に組み込んでもよい。

【０１０２】

活性化合物はまた、点滴または注射によって静脈内または腹腔内に投与してもよい。活性化合物またはその塩の溶液は、任意選択で非毒性界面活性剤と混合して、水中で調製してもよい。分散液はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、トリアセチン、及びそれらの混合物中、ならびに油中で調製することもできる。これらの調製物は、通常

の保存条件及び使用条件下で、微生物の発育を阻止するための保存剤を含有する。

【０１０３】

注射または注入に適した医薬剤形には、任意選択でリポソームにカプセル化された、滅菌注射もしくは注入溶液もしくは分散液の即時調製に適合した、活性成分を含む滅菌水溶液もしくは分散液または滅菌粉末が含まれ得る。すべての場合において、最終的な剤形は無菌で、流動性があり、製造及び保管の条件下で安定であるべきである。液体担体またはビヒクルは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、植物油、非毒性グリセリルエステル、及びこれらの好適な混合物を含む、溶媒または液体分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、リポソームの形成、分散液の場合には必要な粒子径の維持、または界面活性剤の使用によって、維持することができる。微生物の作用の抑制は、様々な抗細菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサールなどによってもたらされ得る。多くの場合、等張剤、例えば、糖、緩衝液、または塩化ナトリウムを含むことが好ましいであろう。注射可能な組成物の吸収の延長は、吸収を遅延させる作用物質、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンの組成物中の使用によってもたらされ得る。

【０１０４】

無菌注射用溶液は、上述の様々な他の成分とともに、活性化合物を必要な量で適切な溶媒中に組み込み、必要に応じて、その後濾過滅菌することによって調製される。無菌注射用溶液の調製のための無菌粉末の場合、その調製の好ましい方法は、予め滅菌濾過した溶液中に存在する活性成分と任意の所望の追加成分とを合わせた粉末が得られる、真空乾燥及び凍結乾燥技術である。

【０１０５】

本発明の化合物の有用な用量は、それらのｉｎ　ｖｉｔｒｏ活性と動物モデルにおけるｉｎ　ｖｉｖｏ活性を比較することによって決定することができる。特定の実施形態では、有用な用量は、約０．１ｍｇ／ｋｇ～約５ｍｇ／ｋｇ、または約０．５ｍｇ／ｋｇ～約２ｍｇ／ｋｇである。異なるサイズのヒト及び動物における有効用量の外挿方法は当技術分野で公知であり、例えば、米国特許第４，９３８，９４９号を参照されたい。

【０１０６】

治療に使用するために必要な化合物、またはその活性塩もしくは誘導体の量は、選択される特定の塩だけでなく、投与経路、治療中の病態の性質、ならびに患者の年齢及び病態によっても変動し、最終的には主治医または臨床医の裁量に委ねられる。

【０１０７】

しかしながら、一般に、好適な用量は、１日当たり約０．５～約１００ｍｇ／ｋｇ体重、例えば、約１０～約７５ｍｇ／ｋｇ体重、例えば、３～約５０ｍｇ／レシピエント体重ｋｇ／日の範囲、好ましくは６～９０ｍｇ／ｋｇ／日の範囲、最も好ましくは１５～６０ｍｇ／ｋｇ／日の範囲である。

【０１０８】

この化合物は、例えば、単位剤形当たり５～１０００ｍｇ、好都合には１０～７５０ｍｇ、最も好都合には５０～５００ｍｇの活性成分を含有する単位剤形で投与するのが好都合である。

【０１０９】

理想的には、活性成分は、約０．５～約７５μＭ、好ましくは約１～５０μＭ、最も好ましくは約２～約３０μＭの活性化合物のピーク血漿濃度を達成するように投与すべきである。これは、例えば、任意選択で生理食塩水中の活性成分の０．０５～５％溶液の静脈内注射によって、または約１～１００ｍｇの活性成分を含有するボーラスとして経口投与することによって、達成され得る。望ましい血中レベルは、約０．０１～５．０ｍｇ／ｋｇ／時間を提供する連続注入によって、または約０．４～１５ｍｇ／ｋｇの活性成分（複数可）を含有する断続注入によって、維持され得る。

【０１１０】

所望の用量を、単回用量で、または適切な間隔で投与される分割用量として、例えば１日当たり２回、３回、４回、もしくはそれ以上の分割用量として、好都合に与えてもよい。分割用量自体を、例えば、複数の個別の緩やかな間隔の投与にさらに分割してもよい。

【０１１１】

本発明及びその利点は詳細には記載されているが、添付の特許請求の範囲で定義されている本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく、様々な変化、置換、及び変更が行われ得ることを理解されたい。

【０１１２】

本発明を以下の実施例においてさらに例示するが、実施例は、例示目的のために与えられたものであって、本発明をいかなる方法でも限定することを意図しない。

【実施例】

【０１１３】

実施例１

イヌＮＧＦに結合するラット抗体２１６６の生成及び特性評価

【０１１４】

Ｌｅｗｉｓラットを、８週間にわたって毎週、ヒトＮＧＦ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，２５６－ＧＦ－１００／ＣＦ）で免疫化した。ヒトＮＧＦコーティングビーズを使用したフローサイトメトリーアッセイで力価を測定した。ビーズとヒトＮＧＦ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，２５６－ＧＦ－１００／ＣＦ）を複合体化し、異なる希釈率の血清（１：１００、１：５００、１：２５００）とともに３０分間インキュベートした。ビーズを洗浄し、蛍光標識した抗ラットＩｇＧ二次抗体を使用して結合を検出した。Ｉｎｔｅｌｌｉｃｙｔ　ｉＱｕｅ　Ｓｃｒｅｅｎｅｒ　Ｐｌｕｓを使用して蛍光を測定した。３匹すべてのラットについて１：２５００希釈で力価を測定したが、それらは正常なＬｅｗｉｓラット血清の値より約１００倍高かった。

【０１１５】

有意なＮＧＦ力価を有するラットから、大腿骨、脛骨、及び骨盤由来のリンパ節（上腕、腋窩、鼠径部、膝窩、及び坐骨）ならびに骨髄を採取した。両方の組織から細胞を分離し、フローサイトメトリーを使用して形質細胞を濃縮した。濃縮された形質細胞懸濁液を、９１，０００または１５３，０００ナノリットル容量の個別の反応チャンバーを備えたＡｂＣｅｌｌｅｒａのマイクロ流体スクリーニング装置に注入した。ＮＧＦ特異的抗体を分泌する単一細胞を、ビーズベースのアッセイを使用して同定及び単離した。抗ラットＩｇＧ抗体でコーティングされたビーズをマイクロ流体スクリーニング装置上に流し、単一の抗体分泌細胞とともにインキュベートした。形質細胞によって分泌されたＩｇＧを、定常領域を使用してビーズ上に捕捉した。続いて、蛍光標識されたヒトＮＧＦ抗原を使用して、ビーズ上に固定化された分泌ＩｇＧへの結合を評価した。陽性のヒットをマシンビジョンを使用して特定し、自動ロボットベースのプロトコルを使用して回収した。およそ２６９，０００個の個々のＢ細胞をＮＧＦ結合アッセイでスクリーニングし、５９２個の細胞がＮＧＦを認識する抗体を発現していた。これらの陽性細胞から、１９０個の固有の抗体配列を同定した。クロノタイプの多様性に基づいて、１９０個の抗体から８８個の抗体を選択した。

【０１１６】

単一細胞ポリメラーゼ連鎖反応及びカスタム分子生物学プロトコルにより、自動ワークステーション（Ｂｒａｖｏ，Ａｇｉｌｅｎｔ）を使用してＮＧＳシーケンシングライブラリ（ＭｉＳｅｑ，Ｉｌｌｕｍｉｎａ）を生成した。カスタムバイオインフォマティクスパイプラインを使用して配列データを解析し、回収された各抗体分泌細胞について重鎖と軽鎖のペア配列を取得した（Ｊｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０２０，ｂｉｏＲｘｉｖ　２０２０．０９．３０．３１８９７２．ｄｏｉ：１０．１１０１／２０２０．０９．３０．３１８９７２）。ラット抗体２１６６の重鎖及び軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列をそれぞれ図１及び図２に示し、ＣＤＲを示す。各抗体鎖の可変（Ｖ（Ｄ）Ｊ）領域を合成し、カスタム自動ハイスループットクローニングパイプラインを使用して哺乳動物発現プラスミ

ドに挿入した。
【０１１７】
メーカー推奨プロトコルを使用して、２４ディープウェルプレート内のＥｘｐｉ２９３－Ｆ細胞（Ｇｉｂｃｏ，ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に発現ベクターをトランスフェクトした。トランスフェクションの４日後、馴化培地をプロテインＡビーズで精製し、１００ｍＭグリシン、ｐＨ２．０を添加することにより抗体を溶出し、１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣＬ、ｐＨ８．０を添加することによりｐＨ７．０に中和した。中和された抗体をＰＢＳ、ｐＨ７．２にバッファー交換した。
【０１１８】
精製された抗体の分析には、ＣＥ－ＳＤＳ（変性キャピラリードデシル硫酸ナトリウムゲル電気泳動）及びＤＳＦ（示差走査蛍光分析）が含まれていた。ＣＥ－ＳＤＳを使用して精製抗体の純度を決定し、ＬａｂＣｈｉｐ　ＧＸＩＩ　Ｔｏｕｃｈ装置（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を使用して完了した。ＰＢＳ中の３５０μｇ／ｍＬの濃度の抗体溶液２マイクロリットルを非還元変性緩衝液（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）と混合し、７０℃で１０分間インキュベートした。ＬａｂＣｈｉｐ装置（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）のＨＴ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　２００アッセイの設定を使用して、分離及び検出を実施した。ＬａｂＣｈｉｐ　ＧＸ　Ｒｅｖｉｅｗｅｒ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を使用して、純度の百分率によって蛍光データを分析した。ラットモノクローナル抗体２１６６の純度の百分率は９６％であった。
【０１１９】
抗体の融点（Ｔｍ）を、ＳＹＰＲＯ（商標）Ｏｒａｎｇｅ蛍光プローブ（５０００倍濃縮溶液、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用した示差走査蛍光分析（ＤＳＦ）によって評価した。ＰＢＳ中の３５０μｇ／ｍＬのｍＡｂ溶液６μＬを、ＰＢＳ中に希釈した１９倍濃縮ＳＹＰＲＯ（商標）Ｏｒａｎｇｅ溶液６μＬと混合した。蛍光の変化によって評価される熱変性を、ＣＦＸ９６　Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ　Ｓｙｓｔｅｍリーダーヘッド（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を使用してＢｉｏ－Ｒａｄ　Ｃ１０００　Ｔｏｕｃｈ　Ｔｈｅｒｍａｌ　Ｃｙｃｌｅｒ装置（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）において測定した。励起及び発光の波長は、それぞれ４５０～４９０ｎｍ及び５６０～５８０ｎｍであった。蛍光シグナルを、２５℃の開始温度で測定し、０．５℃／分ずつ増加させ、９５℃まで上昇させた。データを分析し、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　ＣＦＸ　Ｍａｅｓｔｒｏソフトウェア（ｖ１．１）を使用して融解曲線を統合した。Ｔｍは、融解曲線の導関数から得られる極小値として定義した。ラット抗体２１６６のＴｍは６６．５℃であった。
【０１２０】
結合アッセイを完了して、ＮＧＦ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，２５６－ＧＦ－１００／ＣＦ）に対する抗体の結合を確認した。さらに、抗体の特異性を、密接に関連したタンパク質であるＮＴ－３及びＢＤＮＦへの抗体の結合を試験することによって決定した。ハイスループットフローサイトメーターでのマルチプレックスビーズアッセイを使用して、固有の抗体配列がスクリーニング標的に結合することを確認した。異なる光学的にコード化されたビーズを、ヒトＮＧＦ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，２５６－ＧＦ－１００／ＣＦ）、ＮＴ－３（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，２６７－Ｎ３－０２５／ＣＦ）、またはＢＤＮＦ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，２４８－ＢＤＢ－０５０／ＣＦ）のいずれかと複合体化させた。精製した抗体を、異なる抗体濃度で多重化ビーズとともに室温で３０分間インキュベートした。ビーズを洗浄し、蛍光標識した二次抗体を使用して結合を検出した。Ｉｎｔｅｌｌｉｃｙｔ（登録商標）ｉＱｕｅ　Ｓｃｒｅｅｎｅｒ　Ｐｌｕｓにおいて、ハイスループットのプレートベースのフローサイトメトリーを使用して蛍光を測定した。
【０１２１】
各抗体の蛍光強度の中央値を、個々のビーズタイプの適切なアイソタイプ対照の蛍光強度の中央値に対して正規化した。アイソタイプの１０倍を超える抗体値を結合剤とみなした。

【０１２２】
抗体２１６６はバックグラウンドレベルより５９倍超高くＮＧＦに結合し、この抗体のＮＴ－３及びＢＤＮＦへの結合はバックグラウンドレベルであった。
【０１２３】
ＴＦ－１細胞を用いた機能アッセイを使用して、２１６６抗体のイヌＮＧＦへの結合が、ＮＧＦに対する高親和性受容体であるヒトＴｒｋＡによるシグナル伝達を誘導するイヌＮＧＦの能力を遮断するかどうかを判定した（Ｃｈｅｖａｌｉｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９４．Ｂｌｏｏｄ，８３：１４７９）。これらの試験では、イヌＮＧＦ（ＧｅｎｂａｎｋＮＰ＿００１１８１８７９．１）をＮＧＦ源として使用した。Ｃ末端にｓｔｒｅｐタグ（Ｔｒｐ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｐｒｏ－Ｇｌｎ－Ｐｈｅ－Ｇｌｕ－Ｌｙｓ）を有するイヌＮＧＦをＤｍｅｌ－２細胞内で安定して発現させ、ＳｔｒｅｐＴａｃｔｉｎＸＴクロマトグラフィーとそれに続くＳｕｐｅｒｄｅｘ ２００ １６／６００クロマトグラフィーによる研磨ステップを使用して精製した。ＴＦ－１細胞の増殖は、ＧＭ－ＣＳＦ及びＮＧＦなどの様々な成長因子によって刺激され得る。ＴＦ－１細胞（ＡＴＣＣ－ＣＲＬ２００３）を、１０％ウシ胎仔血清、１００Ｕ／ｍＬペニシリン、１００μｇ／ｍｌストレプトマイシン、及び２ｎｇ／ｍＬ組換えヒトＧＭ－ＣＳＦを含有するＲＰＭＩ－１６４０培地中で培養した。細胞を、3×10^{4}～5×10^{5}生細胞／ｍＬに維持し、４８時間ごとに継代した。各条件を３つ組のウェル中で実行した。細胞を収集し、計数した。ＧＭ－ＣＳＦを含まない培地に細胞を1.75×10^{5}細胞／ｍｌで再懸濁し、加湿した３７℃、５％ＣＯ２のインキュベーター内でフラスコ中にて４時間インキュベートした。インキュベーション中、ＮＧＦ／抗体混合物を、ＧＭ－ＣＳＦを含まない完全培地及び１０ｎｇ／ｍＬイヌＮＧＦを含む完全培地中の２×培地溶液として培地中で調製した。抗体を適切な２×培地溶液に添加し、ＮＧＦ／抗体溶液を細胞に添加する前に室温で少なくとも１時間インキュベートした。次いで、細胞を回収し、ＧＭ－ＣＳＦを含まない培地中で0.5×10^{6}細胞／ｍｌの懸濁液を達成するために、適切な培地量に再懸濁した。５０μｌの細胞懸濁液を９６ウェルプレートのウェルごとに加え、これに５０μｌの２×ＮＧＦ／抗体培地を細胞プレートのウェルごとに加えた。加湿した３７℃、５％ＣＯ２のインキュベーター内で細胞を４８時間インキュベートし、次いで２０μｌのＡｑｕｅｏｕｓ Ｏｎｅ ｓｏｌｕｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ）をウェルごとに添加した。加湿した３７℃、５％ＣＯ２のインキュベーター内で細胞をさらに４時間インキュベートし、次いでＢｉｏＴｅｋ Ｓｙｎｅｒｇｙ／ｎｅＯ２において４９０ｎｍで吸光度を読み取った。すべての測定値からブランクウェルを差し引くことによってデータを分析した。阻害率は以下の式を使用して計算した：阻害率（％）＝１００×［１－（Ｘ－ＭＩＮ）／（ＭＡＸ－ＭＩＮ）］、式中、Ｘ＝所与の濃度でのシグナル、ＭＡＸ＝０％阻害＝イヌＮＧＦのみ、及びＭＩＮ＝１００％阻害＝ＮＧＦなし対照。各条件について、三つ組で平均を計算した。ラット抗体２１６６及びアイソタイプラット抗体対照の増殖データを図３に示す。データは、ラット抗体２１６６がＮＧＦのＴｒｋＡへの結合を効果的に遮断することを示している。
【０１２４】
抗体２１６６のＶＨドメインを、イヌＩｇＧＢ定常ドメインと融合させ（Ｔａｎｇ ｅｔ ａｌ．２００１．Ｖｅｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｐａｔｈｏｌ．８０：２５９）、抗体２１６６のＶＬドメインをイヌκ定常ドメインに融合させて、イヌキメラ抗体を生成した（図４）。Ｆｃに２つの残基変更（ＡＡ）（下線及び太字）を行ってエフェクター活性を排除し、これらの変更は、ヒトＩｇＧ１ Ｆｃについて説明されている「ＬＡＬＡ」変異と類似している（Ｔａｍｍ＆Ｓｃｈｍｉｄｔ，１９９７．Ｉｎｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６：５７）。これら２つの構築物をｐｃＤＮＡ３．４（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）にサブクローニングし、Ｅｘｐｉ２９３システム（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて共トランスフェクトし、ＨｉＴｒａｐプロテインＡ ＨＰクロマトグラフィーで精製した。ＳＤＳ／ＰＡＧＥにより測定した抗体の純度は＞９５％であり、ＳＥＣ（サイズ排除クロマトグラフィー）により

、抗体の単量体率は９８％であった。

【０１２５】

イヌＮＧＦに対するイヌ２１６６キメラ抗体の親和性を、ＳＰＲ（表面プラズモン共鳴）によって測定した。これらの試験のために、Ｃ末端にＦｌａｇタグ（ＤＹＫＤＤＤＤＫ）を融合し、バキュロウイルス技術でイヌＮＧＦ構築物を発現させ、次いで抗ＤＹＫＤＤＤＤＫ　Ｇ１アフィニティークロマトグラフィーでこのＮＧＦを精製することによって、イヌＮＧＦ（Ｇｅｎｂａｎｋ　ＮＰ＿００１１８１８７９．１）を生成した。イヌＮＧＦに対するイヌ２１６６キメラ抗体の結合速度を、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００装置を用いて測定した。アッセイの形式は、２１６６抗体のＦｃをプロテインＡセンサーチップ上に捕捉し、分析物としてイヌＮＧＦを使用することであった。ランニングバッファーはＨＢＳ－ＥＰ緩衝液（１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、３ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．００５％ｔｗｅｅｎ２０）であり、装置温度を２５℃に設定した。流速は４０μｌ／分であり、二つ組で試験した５つの分析物の濃度は０．７８ｎＭ～１２．５ｎＭの範囲であった。結合シグナルをブランクについて補正し、得られたセンサーグラム（図５）を使用して、ＢＩＡＥＶＡＬソフトウェアによる１対１結合モデルを使用して速度定数（k_a及びk_d）ならびに結合親和性（K_D）を決定した。これらの結合条件下で、イヌ２１６６キメラ抗体の結合速度は、k_a（１／Ｍｓ）＝１．２Ｅ＋７、k_d（１／ｓ）＝３．５Ｅ－６、及びK_D＝３Ｅ－１３であった。この抗体の測定された親和性（K_D）は、Ｂｉａｃｏｒｅ装置の感度を超えているが、これらのデータから少なくとも５０ｐＭであると推定される。

【０１２６】

イヌ２１６６キメラ抗体がイヌＮＧＦ受容体（ＴｒｋＡ及びｐ７５）へのイヌＮＧＦの結合を遮断する能力を、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００でのＳＰＲアッセイで測定した。アッセイの形式は、センサーチップ上でＮＧＦ受容体を捕捉し、イヌＮＧＦのみ、イヌ２１６６キメラ抗体と混合したＮＧＦ、またはイヌ２１６６キメラ抗体のみのいずれかを流すことであった。

【０１２７】

アッセイで使用するＮＧＦ受容体は、受容体とＦｃとの間の２×Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒリンカーを用いてヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ　Ｐ０１８５７）に融合させたイヌｐ７５（ＸＰ＿０３８３４０４３９．１）及びイヌＴｒｋＡ（ＸＰ＿０３８３９８９０６．１）の細胞外ドメインからなる。融合タンパク質をＣＨＯ細胞で発現させ、プロテインＡクロマトグラフィーで精製した。このアッセイでは、タンパク質ｐ７５－Ｆｃ及びＴｒｋ－Ｆｃをヒト抗Ｆｃセンサーチップ上に捕捉した。

【０１２８】

ＮＧＦのみ、イヌ２１６６キメラ抗体のみ、及びイヌ２１６６キメラ抗体－ＮＧＦ混合物（モル比２：１）を分析物とした。ＮＧＦのみの条件におけるＮＧＦの７種類の濃度は、０．７８ｎＭ～５０ｎＭの範囲であった。イヌ２１６６キメラ抗体－ＮＧＦ混合物中のイヌＮＧＦの濃度は、５０ｎＭ、２５ｎＭ、及び１２．５ｎＭであった。最後に、イヌ２１６６キメラ抗体単独条件の４種類の濃度は、１２．５ｎＭ～１００ｎＭの範囲であった。装置の温度及び流速を、それぞれ２５℃及び４０μＬ／分に設定した。

【０１２９】

結合シグナルを参照について補正し、得られたセンサーグラムを使用して、ＢＩＡＥＶＡＬソフトウェアによる１対１結合モデルを使用して速度定数（k_a及びk_d）ならびに結合親和性（K_D）を決定した。センサーグラム（図５、６、７、８）は、ｐ７５－Ｆｃ及びＴｒｋＡ－Ｆｃ受容体の両方について、ＮＧＦのみの条件及びイヌ２１６６キメラ抗体－ＮＧＦ混合物を表す。これらの結合条件下で、二量体形式のイヌｐ７５に対するイヌＮＧＦのみの結合速度は、k_a（１／Ｍｓ）＝１．２Ｅ＋１０、k_d（１／ｓ）＝４５、及びK_D＝３．７Ｅ－９であった（図６）。二量体形式のイヌＴｒｋＡに対するイヌＮＧＦのみの結合速度は、k_a（１／Ｍｓ）＝１．３Ｅ＋７、k_d（１／ｓ）＝１．７Ｅ－４、及びK_D＝１．３Ｅ－１１であった（図７）。イヌ２１６６キメラ抗体のみの条件では

、イヌＮＧＦ受容体への結合は観察されなかった（データは示さず）。センサーグラム（図８及び図９）によって示されるように、イヌ２１６６キメラ抗体は、イヌＴｒｋＡ及びｐ７５へのイヌＮＧＦの結合を効果的に遮断する。

【０１３０】

実施例２

ラット２１６６抗体のイヌ化

【０１３１】

イヌＰＢＭＣ（末梢血単核球）に対してＮＧＳ（次世代シーケンシング）を実施することによって、イヌ抗体データベースを生成した。このデータベースには、５．０×10^6個のＶＨドメイン、３．７×10^6個のＶＫドメイン、及び２．６×10^6個のＶＬドメインの配列が含まれている。２１６６親抗体のＨＣＤＲ１、２及びＬＣＤＲ１、２、３配列をアルゴリズムに使用して、イヌ抗体データベース内の最も近いイヌＣＤＲ配列及びそれらに連結されたフレームワーク配列を同定した。これらの連結フレームワーク配列を、最も近いフレームワーク生殖系列配列、及び最も近い生殖系列に戻された１～３残基を有する連結フレームワーク配列とともにｓｃＦｖファージディスプレイライブラリに含めた。独自のアルゴリズムを使用して、元の２１６６のＣＤＲに類似し、生殖系列及び発現させたＣＤＲ配列との同一性がより近いＣＤＲ配列のセットを同定した。これらのＣＤＲとフレームワーク配列を使用して、理論上の複雑度３×10^{12}のｓｃＦｖ抗体ファージディスプレイライブラリを生成した。抗体ファージの選択は、イヌＮＧＦを用いて４ラウンドで完了し、各ラウンドで抗原濃度を下げ、洗浄回数を増やすことによってストリンジェンシーを高めた。具体的には、９６マルチウェルプレートを、第１ラウンドでは２００ｐｍｏｌ、第２ラウンドでは１００ｐｍｏｌ、そして第３ラウンド及び第４ラウンドでは５０ｐｍｏｌのＮＧＦでコーティングした。選択後のＰＢＳ－ｔｗｅｅｎ２０（０．０１％）での洗浄回数は、第１ラウンドで６回、第２ラウンドで７回、第３ラウンドで８回、第４ラウンドで９回であった。第３ラウンド及び第４ラウンドから出力されたｓｃＦｖクローンの配列を決定し、固有のクローンをＩｇＧに再フォーマットし、ＳＰＲによってイヌＮＧＦへの結合についてスクリーニングした。親クローン２１６６とともに上位６９個のイヌ化クローンの配列及びイヌＮＧＦに対する結合速度を、図１及び２ならびに表２に示す。

【表２－１】

表２－イヌＮＧＦへの結合			
クローン	ka	kd	KD
2166	2.38E+06	1.00E-05	4.20E-12
SC-42_006	2.22E+06	1.75E-04	7.88E-11
SC-42_007	1.32E+06	1.38E-04	1.05E-10
SC-42_008	1.96E+06	9.40E-05	4.79E-11
SC-42_010	2.06E+06	8.55E-05	4.16E-11
SC-42_011	1.27E+06	7.28E-05	5.75E-11
SC-42_023	4.19E+06	4.66E-04	1.11E-10
SC-42_024	3.63E+06	5.22E-04	1.44E-10
SC-42_025	3.90E+06	5.88E-04	1.51E-10
SC-42_026	4.26E+06	9.20E-04	2.16E-10
SC-42_027	3.43E+06	6.51E-04	1.90E-10
SC-42_028	3.19E+06	4.96E-04	1.56E-10
SC-42_029	4.09E+06	5.44E-04	1.33E-10
SC-42_030	4.10E+06	6.34E-04	1.55E-10
SC-42_031	4.23E+06	6.46E-04	1.53E-10
SC-42_032	4.61E+06	2.64E-04	5.73E-11
SC-42_033	3.73E+06	5.81E-04	1.56E-10
SC-42_034	2.81E+06	1.51E-03	5.39E-10
SC-42_035	3.02E+06	6.24E-04	2.06E-10
SC-42_036	3.40E+06	8.77E-04	2.58E-10
SC-42_037	3.25E+06	4.82E-04	1.49E-10
SC-42_038	3.21E+06	5.30E-04	1.65E-10
SC-42_040	4.82E+06	7.09E-04	1.47E-10
SC-42_041	3.42E+06	5.55E-04	1.62E-10
SC-42_042	3.51E+06	9.76E-04	2.78E-10
SC-42_043	2.79E+06	7.13E-04	2.55E-10
SC-42_044	3.12E+06	4.53E-04	1.45E-10
SC-42_045	3.34E+06	4.12E-04	1.23E-10
SC-42_046	3.45E+06	4.89E-04	1.42E-10
SC-42_047	3.55E+06	4.41E-04	1.24E-10
SC-42_048	4.25E+06	4.89E-04	1.15E-10
SC-42_049	3.80E+06	5.49E-04	1.44E-10
SC-42_050	3.49E+06	5.02E-04	1.44E-10
SC-42_051	3.27E+06	6.09E-04	1.86E-10
SC-42_052	3.35E+06	4.13E-04	1.23E-10
SC-42_053	3.41E+06	4.71E-04	1.38E-10
SC-42_054	3.32E+06	5.91E-04	1.78E-10
SC-42_055	4.23E+06	7.73E-04	1.83E-10
SC-42_057	3.73E+06	5.53E-04	1.48E-10

【表２－２】

SC-42_058	3.31E+06	5.88E-04	1.78E-10
SC-42_059	3.20E+06	6.38E-04	2.00E-10
SC-42_060	3.87E+06	5.85E-04	1.51E-10
SC-42_061	3.16E+06	4.94E-04	1.56E-10
SC-42_062	3.27E+06	6.36E-04	1.95E-10
SC-42_063	3.57E+06	8.52E-04	2.39E-10
SC-42_064	2.43E+06	6.51E-04	2.68E-10
SC-42_065	3.47E+06	5.95E-04	1.71E-10
SC-42_066	3.16E+06	5.21E-04	1.65E-10
SC-42_067	3.57E+06	7.02E-04	1.97E-10
SC-42_068	3.59E+06	4.87E-04	1.36E-10
SC-42_069	2.39E+06	4.67E-04	1.96E-10
SC-42_070	4.70E+06	5.43E-04	1.15E-10
SC-42_071	1.45E+06	6.89E-04	4.74E-10
SC-42_072	3.98E+06	7.86E-04	1.98E-10
SC-42_073	5.83E+06	5.46E-04	9.37E-11
SC-42_075	4.54E+06	1.55E-03	3.42E-10
SC-42_077	3.35E+06	2.91E-04	8.71E-11
SC-42_079	3.53E+06	8.49E-04	2.40E-10
SC-42_080	3.31E+06	4.46E-04	1.35E-10
SC-42_081	3.41E+06	2.17E-03	6.35E-10
SC-42_082	3.45E+06	2.52E-04	7.29E-11
SC-42_083	4.17E+06	6.23E-04	1.49E-10
SC-42_084	3.60E+06	4.73E-04	1.32E-10
SC-42_085	4.28E+06	8.34E-04	1.95E-10
SC-42_088	3.39E+06	1.06E-03	3.11E-10
SC-42_089	4.26E+06	7.74E-04	1.82E-10
SC-42_090	1.91E+06	1.52E-04	7.99E-11
SC-42_091	1.00E+04	1.00E-04	1.00E-08
SC-42_101	3.41E+06	3.80E-04	1.11E-10
SC-42_102	2.91E+06	1.07E-03	3.67E-10

【０１３２】

６９個のクローンすべてのセンサーグラムを図１０に示す。ＥＤＣ／ＮＨＳ活性化によって抗体（約５μｇ／ｍｌ）をＨＣ３０Ｍセンサーチップにアミンカップリングし、その後エタノールアミンＨＣＬでクエンチすることによってＳＰＲを完了した。ＳＰＲ分析の分析物として使用したイヌＮＧＦ（Ｇｅｎｂａｎｋ　ＮＰ＿００１１８１８７９．１）は、Ｃ末端にＦｌａｇタグ（ＤＹＫＤＤＤＤＫ）を付けたイヌＮＧＦについて実施例１に記載したものと同じ調製物であった。

【０１３３】

イヌ化ＳＣ４２＿１０１抗体がイヌＮＧＦ受容体（ＴｒｋＡ及びｐ７５）へのイヌＮＧＦの結合を遮断する能力を、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００でのＳＰＲアッセイで測定した。アッセイの形式は、センサーチップ上でＮＧＦ受容体を捕捉し、イヌＮＧＦのみ、イヌ化ＳＣ４２＿１０１抗体と混合したＮＧＦ、またはイヌ化ＳＣ４２＿１０１抗体のみのいず

れかを流すことであった。受容体の遮断方法は、実施例１のイヌ２１６６キメラ抗体について記載した方法と同一である。センサーグラム（図１１、１２、１３、１４）は、ｐ７５－Ｆｃ及びＴｒｋＡ－Ｆｃ受容体の両方について、ＮＧＦのみの条件及びイヌ化ＳＣ４２＿１０１抗体－ＮＧＦ混合物を表す。これらの結合条件下で、二量体形式のイヌｐ７５に対するイヌＮＧＦのみの結合速度は、k_a（１／Ｍｓ）＝３．８Ｅ＋７、k_d（１／ｓ）＝０．１、及びK_D＝２．７Ｅ－９であった（図１１）。二量体形式でのイヌＴｒｋＡに対するイヌＮＧＦのみの結合速度は、k_a（１／Ｍｓ）＝２．４Ｅ＋７、k_d（１／ｓ）＝１．６Ｅ－４、及びK_D＝６．６Ｅ－１２であった（図１２）。イヌ化ＳＣ４２＿１０１抗体のみの条件では、イヌＮＧＦ受容体への結合は観察されなかった（データは示さず）。センサーグラム（図１３及び１４）によって示されるように、イヌ化ＳＣ４２＿１０１抗体は、イヌＴｒｋＡ及びｐ７５へのイヌＮＧＦの結合を効果的に遮断する。

【０１３４】

実施例３

ラット２１６６抗体のネコ化

【０１３５】

ネコＰＢＭＣ（末梢血単核球）に対してＮＧＳ（次世代シーケンシング）を実施することによって、ネコ抗体データベースを生成した。このデータベースには、７．５×10^6個のＶＨドメイン、１．３×10^6個のＶＫドメイン、及び３．８×10^6個のＶＬドメインの配列が含まれている。２１６６親抗体のＨＣＤＲ１、２及びＬＣＤＲ１、２、３配列をアルゴリズムに使用して、ネコ抗体データベース内の最も近いネコＣＤＲ配列及びそれらに連結されたフレームワーク配列を同定した。これらの連結フレームワーク配列を、最も近いフレームワーク生殖系列配列、及び最も近い生殖系列に戻された１～３残基を有する連結フレームワーク配列とともにｓｃＦｖファージディスプレイライブラリに含めた。独自のアルゴリズムを使用して、元の２１６６のＣＤＲに類似し、生殖系列及び発現させたＣＤＲ配列との同一性がより近いＣＤＲ配列のセットを同定した。これらのＣＤＲとフレームワーク配列を使用して、理論上の複雑度３×10^{12}のｓｃＦｖ抗体ファージディスプレイライブラリを生成した。ネコＮＧＦのプロセシングされた形態（ＸＰ＿００４００１１６６．１）は、イヌＮＧＦのプロセシングされた形態（ＮＰ＿００１１８１８７９．１）と同一であるため、ネコ化試験では、実施例１に記載されているＦｌａｇタグ（ＤＹＫＤＤＤＤＫ）をＣ末端にタグ付けしたイヌＮＧＦを使用した。

【０１３６】

抗体ファージの選択は、ＮＧＦを用いて４ラウンドで完了し、各ラウンドで抗原濃度を下げ、洗浄回数を増やすことによってストリンジェンシーを高めた。具体的には、９６マルチウェルプレートを、第１ラウンドでは２００ｐｍｏｌ、第２ラウンドでは１００ｐｍｏｌ、そして第３ラウンド及び第４ラウンドでは５０ｐｍｏｌのＮＧＦでコーティングした。選択後のＰＢＳ－ｔｗｅｅｎ２０（０．０１％）での洗浄回数は、第１ラウンドで６回、第２ラウンドで７回、第３ラウンドで８回、第４ラウンドで９回であった。第３ラウンド及び第４ラウンドから出力されたｓｃＦｖクローンの配列を決定し、固有のクローンをＩｇＧに再フォーマットし、ＳＰＲによってＮＧＦへの結合についてスクリーニングした。クローン１０１の可変ドメインを図１５に示し、ＣＤＲ領域に下線を付している。ネコ化クローン１０１のＮＧＦに対する親和性をＳＰＲによって測定した。このアッセイの形式は、ＥＤＣ／ＮＨＳを使用してシリーズＳ　ＣＭ５バイオセンサー上にヤギ抗ネコＩｇＧ（３０μｇ／ｍｌ）を固定化し、残りの部位をエタノールアミンでクエンチすることであった。ネコ化クローン１０１（１μｇ／ｍｌ）をヤギ抗ネコＩｇＧセンサーチップ上に捕捉した。単一サイクルの反応速度を使用して、５つの濃度のＮＧＦを捕捉した。ネコ化クローン１０１のＮＧＦに対する結合速度は、k_a（１／Ｍｓ）＝３．８Ｅ＋５、k_d（１／ｓ）＝３Ｅ－３、及びK_D＝７．８Ｅ－９であった。

【０１３７】

実施例４

ＣＤＲの部位特異的変異誘発を使用したネコ化クローン１０１の親和性成熟

【０１３８】

第１の親和性成熟アプローチでは、ネコクローン１０１の重鎖可変ドメインとＣＨ１ドメイン（表３）をＧｅｎＳｃｒｉｐｔ　ＦＡＳＥＢＡプラスミドにサブクローニングした。この構築物は、重鎖（ＶＨ－ＣＨ１）のＣ末端に、アルブミンに対して低いｐＭ親和性を有する血清アルブミン（ＳＡＳＡ）タグに対する単一ドメイン抗体を含んでおり（例えば、ＵＳ２０１３／０１２９７２７Ａ１を参照のこと）、さらに下流には、精製用のＨｉｓタグを含んでいた。軽鎖可変ドメインをネコＣκを用いて独自のＥ．ｃｏｌｉ発現ベクターにサブクローニングした（表３）。ＴＧ１　Ｅ．ｃｏｌｉで発現させた場合にＦａｂの分泌が促進されるように、重鎖と軽鎖の双方がＮ末端にＰｅｌＢ（ペクチン酸リアーゼＢ）シグナルペプチドを有していた。可変ドメインの発現を、Ｌａｃプロモーターによって調節した。

【表３】

表３－配列

クローン101 VH-CH1 (IgG1)	DVQLVESGGD LVKPGGSLRL TCVASGLSLT SSSMSWVRQA PGKGLQWVST IYSNGGTYYT DSVKGRFTIS KDNAENTLYL QMNNLKTEDT ATYYCASIYY YDADYLHWYF DFWGQGALVT VSSASTTAPS VFPLAPSCGT TSGATVALAC LVLGYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QASGLYSLSS MVTVPSSRWL SDTFTCNVAH PPSNTKVDKT V
クローン1 VL-Cκ1	EIQMTQSPTS LSASVGDRVT ITCRASEGIS NNLSWYQQTP GKAPKLLIYA TSNLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ GYKWPLTFGG GTKLEITRSD AQPSVFLFQP SLDELHTGSA SIVCILNDFY PKEVNVKWKV DGVVQNKGIQ ESTTEQNSKD STYSLSSTLT MSSTEYQSHE KFSCEVTHKS LASTLVKSFN RSECQRE

【０１３９】

半導体ベースのオリゴヌクレオチド合成技術を利用するＧｅｎＳｃｒｉｐｔ独自のＰｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｍｕｔａｎｔ　Ｌｉｂｒａｒｙ（ＰＭＬ）を使用して、重鎖及び軽鎖内の各ＣＤＲ位置についてバリアントライブラリを生成した。変異体の生成では、ＫａｂａｔとＩＭＧＴの方法論を組み合わせて使用してＣＤＲを定義し、各ＣＤＲについて選択された残基を以下の表４に示す。ＣＤＲの残基番号を括弧内に示す。

【表４】

表４－ＣＤＲ配列及び付番

	VH		VL
CDR1	GLSLTSSSMS (26-35)	CDR1	RASEGISNNLS (24-34)
CDR2	TIYSNGGTYYTDSVKG (50-65)	CDR2	ATSNLHS (50-56)
CDR3	ASIYYYDADYLHWYFDF (96-112)	CDR3	QQGYKWPLT (89-97)

【０１４０】

ライブラリの品質を、ＮＧＳ（次世代シーケンシング）を使用して検証した。２ＹＴ培地に播種し、室温で一晩０．２ｍＭ　ＩＰＴＧで誘導することによって、９６ディープウェルプレート中のＥ．ｃｏｌｉ内で発現させるために各ライブラリから４４個のＰＭＬクローンを選択した。ＥＬＩＳＡを完了することによって、培地中に分泌されたＦａｂを結合活性について分析した。このＥＬＩＳＡでは、プレートを１０μｇ／ｍｌのＢＳＡで一晩４℃でコーティングし、０．１％ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳ、ｐＨ７．４（ＰＢＳＴ）で３回洗浄し、３％脱脂粉乳を含有するＰＢＳ（リン酸緩衝食塩水、ｐＨ７．４）

中で３７℃にて１時間、非特異的相互作用を遮断し、ＰＢＳＴで３回洗浄し、粗製Ｆａｂ上清（ＰＢＳＴで１：１に希釈）を加え、３７℃で１時間インキュベートし、ＰＢＳＴで３回洗浄し、０．１５μｇ／ｍｌのＮＧＦを添加し、３７℃で１時間インキュベートし、ＰＢＳＴで３回洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）をコンジュゲートした抗Ｆｌａｇタグ抗体（ＮＧＦ上に存在するＦｌａｇタグ）を添加し、室温で４５分間インキュベートし、ＰＢＳＴで３回洗浄し、ＴＭＢ基質を用いて室温で１０分間インキュベートし、４５０ｎｍで吸光度を測定することによってＨＲＰ複合体を検出した。ＥＬＩＳＡで測定して親和性が明らかに増加した上位１００個のクローンを配列決定してＣＤＲ内のバリアントを検出し、５７個のユニークなクローンを同定した。５７個のクローンそれぞれのクローン１０１からの変異を表５にまとめる。

【表５】

表５－クローン１０１と比較した各位置の個々の変異

	CDR1H				CDR2H							CDR3H				
	28	30	31	35	52	53	55	58	60	62	64	97	99	101	104	112
101	S	T	S	S	Y	S	G	Y	T	S	K	S	Y	Y	D	F
	H	N	H	V	W	P	R	D	H	D	E	Q	F	H	K	E
		R					Y		D		D	M			E	P
									S			N			N	H
									E			K			Q	N
												H				
												T				

	CDR1L				CDR2L			
	24	30	31	34	53	54	55	56
101	R	S	N	S	N	L	H	S
	F	A	Q	G	I	H	M	T
		Q		A	V		I	D
		V			K		L	E
		L			H			N
		P			M			
		Y			L			

【０１４１】

５７個のユニークなクローンの結合を、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００で実施するＳＰＲアッセイにおける解離速度スクリーニングアッセイによって確認した。ＳＰＲ分析では、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）をＣＭ５センサーチップに固定した。センサーチップ表面を、５０ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド及び２００ｍｍｏｌ／Ｌ　１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩で４２０秒間活性化した。その後、１０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ４．５で希釈したＢＳＡを注入した。アミンカップリング反応後、チップ表面に残っている活性カップリング部位を１ｍＭエタノールアミン塩酸塩で遮断した。馴化培地中の選択されたＦａｂ－ＳＡＳＡバリアントを、ＢＳＡでコーティングされたチップ上に捕捉した。ランニングバッファーは、ＨＢＳ－ＥＰ（１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、５００ｍＭ　ＮａＣｌ、３ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０、ｐＨ７．４）であった。平衡化後、抗原を１２０秒間注入し（結合相）、続いてランニングバッファーを４２０秒間注入した（解離相）。Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００評価

ソフトウェアを使用して実験データを１：１相互作用モデルに局所的にフィッティングすることにより、Ｆａｂ－ＳＡＳＡクローンの解離速度を取得した。Ｆａｂバリアントを、表６に示す解離速度定数（解離速度、ｋｄ）によってランク付けした。

【表６－１】

表６－解離定数に基づくＦａｂバリアントのランク付け

配列解析	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi^2 (RU^2)	WT-kd / クローン-kd の比
G55R	1.20E+05	1.47E-04	1.23E-09	19.7	0.00634	6.41
S30A	2.77E+05	2.92E-04	1.05E-09	152.2	0.618	3.23
H55M	3.33E+05	3.12E-04	9.35E-10	137.7	0.712	3.02
S30Q	2.59E+05	3.24E-04	1.25E-09	132.5	0.462	2.91
D104K	6.09E+04	3.32E-04	5.45E-09	64.6	0.0316	2.84
S35V	3.09E+05	3.60E-04	1.17E-09	106.1	0.414	2.62
N53I	2.76E+05	3.89E-04	1.41E-09	118	0.347	2.42
F112E	2.84E+05	3.99E-04	1.41E-09	147.2	0.488	2.36
S97Q	2.97E+05	4.03E-04	1.36E-09	79.5	0.287	2.34
N53V	2.88E+05	4.07E-04	1.42E-09	108.7	0.375	2.32
H55L	2.64E+05	4.18E-04	1.58E-09	91.8	0.494	2.26
G55Y	2.29E+05	4.19E-04	1.83E-09	17.7	0.0131	2.25
D104E	2.37E+05	4.26E-04	1.80E-09	66.4	0.126	2.21
H55I	3.34E+05	4.36E-04	1.31E-09	100.7	0.67	2.16
D104N	2.39E+05	4.46E-04	1.87E-09	52.8	0.0774	2.11
S97M	2.66E+05	4.66E-04	1.75E-09	64.3	0.149	2.02
Y99F	3.21E+05	4.69E-04	1.46E-09	100.8	0.439	2.01
K64E	1.96E+05	4.76E-04	2.42E-09	50.2	0.164	1.98
D104Q	2.20E+05	4.78E-04	2.17E-09	49.6	0.056	1.97
N31Q	3.27E+05	4.80E-04	1.47E-09	80.2	0.343	1.96
S97N	3.73E+05	4.81E-04	1.29E-09	69.6	0.317	1.96
S30V	2.87E+05	4.83E-04	1.68E-09	59.3	0.22	1.95
Y101H	3.07E+05	4.96E-04	1.62E-09	61.8	0.194	1.90
S30L	2.70E+05	5.07E-04	1.87E-09	92.6	0.914	1.86
S97K	3.31E+05	5.11E-04	1.54E-09	62.3	0.226	1.85
S34G	4.56E+05	5.14E-04	1.13E-09	65.8	0.571	1.83
S97H	2.97E+05	5.33E-04	1.79E-09	72	0.198	1.77
F112P	3.98E+05	5.52E-04	1.39E-09	48	0.164	1.71
K64D	3.40E+05	5.54E-04	1.63E-09	48.1	0.189	1.70
S62D	3.01E+05	5.60E-04	1.86E-09	103.3	0.405	1.68
L54H	3.40E+05	5.60E-04	1.65E-09	75.6	0.357	1.68
T60H	3.12E+05	5.61E-04	1.80E-09	77.5	0.316	1.68
Y58D	3.81E+05	5.62E-04	1.47E-09	108.4	0.571	1.68

【表６－２】

T60D	2.94E+05	5.67E-04	1.93E-09	90.6	0.299	1.66
T60S	3.25E+05	5.73E-04	1.76E-09	80.6	0.33	1.65
N53K	2.92E+05	5.96E-04	2.04E-09	60.5	0.172	1.58
S31H	3.10E+05	6.12E-04	1.98E-09	66.6	0.291	1.54
N53H	3.22E+05	6.27E-04	1.95E-09	69.4	0.177	1.50
F112H	3.28E+05	6.39E-04	1.95E-09	81.8	0.407	1.48
F112N	3.47E+05	6.43E-04	1.85E-09	72	0.316	1.47
N53M	3.46E+05	6.48E-04	1.87E-09	53.7	0.312	1.46
Y52W	4.34E+05	6.51E-04	1.50E-09	41.3	0.258	1.45
R24F	2.87E+05	6.55E-04	2.28E-09	89.3	0.273	1.44
N53L	3.21E+05	6.67E-04	2.08E-09	60	0.188	1.41
S30P	2.62E+05	6.70E-04	2.56E-09	75.4	0.211	1.41
T60E	2.87E+05	6.83E-04	2.38E-09	77.7	0.289	1.38
S53P	3.23E+05	6.95E-04	2.15E-09	56.6	0.183	1.36
T30N	3.33E+05	7.04E-04	2.12E-09	71.2	0.287	1.34
F112E	2.94E+05	7.08E-04	2.41E-09	64.9	0.221	1.33
S56T	3.58E+05	7.14E-04	1.99E-09	65.5	0.414	1.32
S97T	3.80E+05	7.16E-04	1.88E-09	51.1	0.207	1.32
T30R	3.57E+05	7.30E-04	2.05E-09	61.2	0.261	1.29
S56D	3.72E+05	7.55E-04	2.03E-09	49.1	0.224	1.25
S30Y	3.55E+05	7.82E-04	2.20E-09	60.5	0.4	1.21
S34A	4.50E+05	7.83E-04	1.74E-09	50.4	0.361	1.20
S28H	3.15E+05	8.02E-04	2.55E-09	79.8	0.244	1.18
S56E	3.70E+05	8.09E-04	2.19E-09	54.6	0.249	1.17
S56N	3.41E+05	9.03E-04	2.64E-09	50.6	0.178	1.04
野生型	3.59E+05	9.39E-04	2.62E-09	59.1	0.241	1.00
野生型	3.55E+05	9.43E-04	2.655E-09			1.00
野生型	3.51E+05	9.47E-04	2.69E-09	60.1	0.235	1.00

【０１４２】

ＦａｂバリアントＧ５５Ｒ、Ｓ３０Ａ、Ｓ３０Ｑ、Ｓ３５Ｖ、Ｎ５３Ｉ、Ｆ１１２Ｅ、Ｓ９７Ｑ、及びＮ５３Ｖをコンビナトリアルライブラリ構築のために選択した（表７）。

【表７】

表７－コンビナトリアルライブラリ用に選択されたＦａｂバリアント						
	VH				VL	
位置	35	55	97	112	30	53
野生型	S	G	S	F	S	N
バリアント	V	R	Q	E	A	I
					Q	V

【０１４３】
コンビナトリアルライブラリを、上記と同じＦａｂ－ＳＡＳＡベクター内に構築した。コンビナトリアルライブラリの理論上の多様性は、２×２×２×２×３×３＝１４４であり、構築されたライブラリのサイズは５．６×１０^{7}ＣＦＵ（コロニー形成単位）であった。ライブラリのインフレーム率と多様性を、ＤＮＡ配列決定によって評価し、結果を以下の表に示す。

【表８】

表８－コンビナトリアルライブラリにおけるフレーム内Ｆａｂ－ＳＡＳＡ構築物の割合				
	配列決定用のクローン	終止コドンを有する配列	インフレーム率	ユニークなクローン
VH	47	3	44/47 = 93.6%	12
VL	47	2	45/47 = 95.7%	9

【表９】

表９－コンビナトリアルライブラリにおける重鎖バリアントの多様性					
鎖	クローンの数	S35V	G55R	S97Q	F112E
VH	44	S(30), V(14)	G(10), R(34)	S(36), Q(8)	F(33), E(11)

【表１０】

表１０－コンビナトリアルライブラリにおける軽鎖バリアントの多様性			
鎖	クローンの数	S30A/Q	N53I/V
VL	43	S(16), A(21), Q(8)	N(13), I(17), V(15)

【０１４４】
コンビナトリアルライブラリから１８４個のクローンをランダムに選択し、ＮＧＦ　ＥＬＩＳＡによる結合を完了した。ＮＧＦ　ＥＬＩＳＡは上記と同じ方法であった。ＥＬＩＳＡ結合の上位２０クローンを配列決定し、ＳＰＲ解離速度アッセイで試験した。結合結果をアミノ酸の組み合わせごとに表１１に示す。表１２は、上位２０クローンの可変ドメイン配列ＩＤを示す。ＶＨとＶＬの対形成は、ＶＨとＶＬの変異に実質的な互換性があり、及びＶＨとＶＬドメインに互換性があることを示している。

【表１１】

表１１－コンビナトリアルライブラリからの親和性成熟Ｆａｂバリアント

抗体ID	VH				VL		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	(kd) WT / クローン比	(KD) WT / クローン比	Rmax (RU)
	35	55	97	112	30	53						
	S	G	S	F	S	N						
AHF17591	V	R	S	E	A	I	2.68E+05	1.00E-06	3.73E-12	1685.00	925.94	19.3
AHF17598	V	R	S	E	A	I	2.94E+05	5.25E-05	1.79E-10	32.10	19.30	25.9
AHF17592	V	R	S	F	S	V	1.92E+05	1.46E-05	7.61E-11	115.41	45.40	28.5
AHF17600	V	R	S	F	S	V	1.77E+05	5.81E-05	3.29E-10	29.00	10.50	26.7
AHF17593	V	R	Q	F	A	V	1.63E+05	1.00E-06	6.13E-12	1685.00	563.17	24.4
AHF17594	V	G	S	F	A	V	3.53E+05	3.28E-04	9.31E-10	5.14	3.71	86.1
AHF17595	V	R	S	E	Q	N	1.78E+05	1.00E-06	5.62E-12	1685.00	614.99	41.6
AHF17596	V	R	S	F	A	V	2.27E+05	1.82E-05	8.02E-11	92.58	43.08	31.5
AHF17608	V	R	S	F	A	V	2.28E+05	1.00E-06	4.39E-12	1685.00	787.74	28.8
AHF17599	V	R	S	F	A	V	2.12E+05	1.00E-06	4.72E-12	1685.00	732.46	34.9
AHF17597	V	R	S	F	Q	I	1.99E+05	1.08E-05	5.44E-11	156.02	63.51	37.6
AHF17601	V	R	Q	E	A	N	2.91E+05	1.00E-06	3.44E-12	1685.00	1005.41	42.6
AHF17602	V	R	S	F	A	N	2.10E+05	1.00E-06	4.76E-12	1685.00	725.55	27.9
AHF17606	V	R	S	F	A	N	1.87E+05	2.01E-05	1.07E-10	83.83	32.29	46.3
AHF17610	V	R	S	F	A	N	1.82E+05	1.00E-06	5.49E-12	1685.00	628.81	35
AHF17610	V	R	S	F	A	N	1.82E+05	1.00E-06	5.49E-12	1685.00	628.81	35
AHF17603	V	G	S	E	A	I	3.68E+05	2.45E-04	6.64E-10	6.88	5.20	108.7
AHF17604	V	R	Q	F	Q	I	1.45E+05	4.66E-05	3.21E-10	36.16	10.76	27.9
AHF17605	V	G	Q	F	A	I	2.53E+05	2.07E-04	8.20E-10	8.14	4.21	94.2
AHF17607	V	R	S	E	S	I	2.26E+05	1.00E-06	4.42E-12	1685.00	780.83	36.9
AHF17609	V	R	S	F	A	I	2.28E+05	1.00E-06	4.39E-12	1685.00	787.74	35.9
ブランク							1.92E+04	NA	NA	NA	NA	NA
ブランク							1.45E+04	NA	NA	NA	NA	NA
野生型							**5.69E+05**	**1.79E-03**	**3.15E-09**	**0.94**	**0.00**	**28.7**
野生型							**4.19E+05**	**1.58E-03**	**3.78E-09**	**1.07**	**0.00**	**30.2**
野生型							**4.94E+05**	**1.69E-03**	**3.47E-09**	**1.00**	**0.00**	**29.45**

【表１２】

表１２－親和性成熟Ｆａｂバリアントの ＶＨ及びＶＬ可変ドメイン配列

抗体 ID	VH					VL		
	配列番号	35	55	97	112	配列番号	30	53
		S	G	S	F		S	N
AHF17591	184	V	R	S	E	198	A	I
AHF17598	184	V	R	S	E	198	A	I
AHF17592	188	V	R	S	F	192	S	V
AHF17600	188	V	R	S	F	192	S	V
AHF17593	185	V	R	Q	F	193	A	V
AHF17594	186	V	G	S	F	193	A	V
AHF17595	184	V	R	S	E	194	Q	N
AHF17596	188	V	R	S	F	193	A	V
AHF17608	188	V	R	S	F	193	A	V
AHF17599	188	V	R	S	F	193	A	V
AHF17597	188	V	R	S	F	195	Q	I
AHF17601	187	V	R	Q	E	196	A	N
AHF17602	188	V	R	S	F	196	A	N
AHF17606	188	V	R	S	F	196	A	N
AHF17610	188	V	R	S	F	196	A	N
AHF17610	188	V	R	S	F	196	A	N
AHF17603	189	V	G	S	E	198	A	I
AHF17604	187	V	R	Q	F	195	Q	I
AHF17605	190	V	G	Q	F	198	A	I
AHF17607	184	V	R	S	E	197	S	I
AHF17609	188	V	R	S	F	198	A	I

【０１４５】

実施例５

ｓｃＦｖファージディスプレイによるネコ化クローン１０１の親和性成熟

【０１４６】

第２の親和性成熟アプローチでは、ネコ化クローン１０１のフレームワーク、ならびに表１３に示す重鎖及び軽鎖ＣＤＲ配列について以下の配列を含むｓｃＦｖファージディスプレイライブラリを構築した。

【表１３－１】

表１３－ｓｃＦｖファージディスプレイコンビナトリアルライブラリにおけるネコ化クローン１０１及びバリアントのＣＤＲ

HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
GLSLTSSS ------H-	IYSNGGT -W-----	ASIYYYDADYLHWYFDF -N----------------	EGISNN Q-----	ATS --E	QQGYKWPLT ---W-----

【表１３－２】

------TN-	---Q---	-E----------	N------	-S-	---H------
--E---N-	--A----	-Q----------	K------	--N	---F------
A-------	---E---	-D----------	-A-----	--D	----R-----
L-------	---R---	-K----------	--L----	--Q	----E-----
N-------	---S---	--L---------	--V----	--K	----S-----
--E-----	LW-----	---T--------	---G---	-A-	----Q-----
--G-----	-W-S----	---W--------	---D---	-Q-	-----F----
--A------	-W-E----	---F--------	----S--	-D-	-----I----
--D-----	-W-D----	----H-------	----K--	-Y-	------E---
--T-----		----F-------	----Y--	-V-	-------M-
---M----		------E------	-----S	-L-	---S------
---V----		-------S------	-----G		---T------
----A---		-------V------	-----Q		---H------
----S---		--------E------	-----E		---G------
----V---		---------H------	-----K		---L------
----N---		-A----------	-----D		---V------
----M---		-Y----------	-----T		---R------
-----TH-		-T----------	-----L		---D------
-----H--		-V----------	-----A		---K------
-----G--		-L----------	-----H		--Y-ST-W-
------E--		-P----------	-----F		
-----R--		-H----------	-----R		
-----K--		-R----------			
-------I-		-I----------			
-------T-		-G----------			
------D-		--Y---------			
------N-		S-----------			
-------Q-		T-----------			
------A-		D-----------			
Q-------		N-----------			
------Y-		E-----------			
-------A		Q-----------			
-----A--		K-----------			
--Y-----		--Y----------M			
--M-----		--W---------			
		-D-F--------			
		-N-W--------			
		-Q--F-------			
		------E-E------			
		-------SY------			
		--------Y------			
		----------Y-----			
		----------F----			
		---------F------			
		----------L---			
		----------W---			
		----------I---			

【表１３－３】

		----------D--- ----------Q- ----------YF---- ----------Y ----------L ----------M ----------I ----------W			

【０１４７】

重鎖のライブラリ多様性は、３７（ＨＣＤＲ１）×１１（ＨＣＤＲ２）×５７（ＨＣＤＲ３）＝２３，１９９であり、軽鎖のライブラリ多様性は、２４（ＬＣＤＲ１）×１３（ＬＣＤＲ２）×２２（ＬＣＤＲ３）＝６，８６４であった。重鎖と軽鎖を組み合わせたライブラリの多様性は1.59×10^{8}である。抗体ファージの選択は、ＮＧＦを用いて５ラウンドで完了し、各ラウンドで抗原濃度を下げ、洗浄回数を増やすことによってストリンジェンシーを高めた。具体的には、９６マルチウェルプレートを、第１ラウンドでは２００ｐｍｏｌのＮＧＦ、第２ラウンド及び第３ラウンドでは５０ｐｍｏｌのＮＧＦ、第４ラウンドでは２５ｐｍｏｌ、及び第５ラウンドでは１０ｐｍｏｌでコーティングした。選択ステップ後のＰＢＳ、ｐＨ７．４－Ｔｗｅｅｎ２０（０．０１％）での洗浄回数は、第１ラウンド後に３回、第２ラウンド後に４回、第３ラウンド後に５回、第４ラウンド後に６回、及び第５ラウンド後に７回であった。ＮＧＦ結合ＥＬＩＳＡでスクリーニングされた第３、第４、及び第５ラウンドの各出力から７６０クローンのファージを単離した。陽性クローンを配列決定し、１４０個のユニークな陽性クローンをネコＩｇＧ１ａに再フォーマットし、ＣＨＯ細胞内で発現させ、プロテインＡで精製した。ＥＤＣ／ＮＨＳ活性化によって抗体（約５μｇ／ｍｌ）をＨＣ３０Ｍセンサーチップにアミンカップリングし、その後エタノールアミンＨＣＬでクエンチすることによってＳＰＲを完了した。ＮＧＦは、０．０１％のｔｗｅｅｎ２０及び０．５ｍｇ／ｍｌ　ＢＳＡを含むＨＥＰＥＳ緩衝生理食塩水で希釈した分析物であった。ＮＧＦは、５００ｎＭ、１６６ｎＭ、５５ｎＭ、１８ｎＭ、６．２ｎＭ、２．０ｎＭ、０．６８ｎＭ、及び０．２３ｎＭの濃度で実行した。上位３つの親和性成熟クローンの親和性を以下の表１４に示す。上位３つのクローン（ＳＣ－１８４＿７６、ＳＣ－１８４＿１０２、ＳＣ－１８４＿１１０）の可変ドメインの配列を図１７に示す。

【表１４】

表１４－上位３つの親和性成熟ネコ抗体のＳＰＲデータ

クローン	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
101	1.10E+05	2.20E-04	2.10E-09
SC-184_76	2.70E+05	6.90E-05	2.50E-10
SC-184_102	2.10E+05	6.30E-05	6.30E-10
SC-184_110	1.60E+05	3.60E-05	3.60E-10

【０１４８】

実施例６

ネコＮＧＦに対する親和性成熟ネコ抗体のＳＰＲ及びＮＧＦ受容体遮断データ

【０１４９】

第１の親和性成熟アプローチで記載された、親和性成熟抗体ＡＨＦ１７６０２、ＳＣ－

１８４＿７６、ＳＣ－１８４＿１０２、及びＳＣ－１８４＿１１０、ならびにＧ５５Ｒ変異を含む後者の３つのクローン（ＳＣ－１８４＿７６－Ａｒｇ、ＳＣ－１８４＿１０２－Ａｒｇ、及びＳＣ－１８４＿１１０－Ａｒｇ）を、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００装置を備えたＳＰＲを使用して、ＮＧＦに対する親和性を評価した。ＡＨＦ１７６０２、ＳＣ－１８４＿７６－Ａｒｇ、ＳＣ－１８４＿１０２－Ａｒｇ、及びＳＣ－１８４＿１１０－Ａｒｇの可変ドメイン配列を図１７に示す。さらに、クローン１０１も評価した。抗体を、抗ネコをカップリングしたＣＭ５チップを使用して捕捉した。次いで、ＰＢＳＰ＋ランニングバッファー（Ｃｙｔｉｖａ）を流速３０μＬ／分で使用して、ＮＧＦ結合を５０ｎＭから開始する複数の濃度で評価した。結合時間の長さは１２０秒であり、解離時間は６００秒で実行した。チップ表面を１０ｍＭグリシンで再生させた。Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウェアを使用して、参照を差し引いたセンサーグラムを１：１結合モデルにフィッティングした。データを以下の表１５に示し、センサーグラムを図１８に示す。

【表１５】

表１５－ネコＮＧＦ抗体の親和性

クローン	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD	Rmax (RU)
101	7.84E+05	1.38E-03	1.75E-09	26.3
AHF17602	3.94E+05	6.32E-05	1.61E-10	61.4
SC-184_76	8.38E+05	3.96E-04	4.72E-10	61.9
SC-184_76-Arg	5.85E+05	9.01E-05	1.54E-10	73.4
SC-184_102	4.71E+05	1.98E-04	4.20E-10	82.1
SC-184_102-Arg	3.43E+05	4.43E-05	1.29E-10	87.8
SC-184_110	4.92E+05	3.80E-04	7.73E-10	43.2
SC-184_110-Arg	3.87E+05	5.48E-05	1.42E-10	53.2

【０１５０】

ＮＧＦ受容体遮断実験のために、ネコＴｒｋＡ及びｐ７５　ＮＧＦ受容体を生成し、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００を用いたＳＰＲ実験において使用した。ネコＴｒｋＡの細胞外ドメイン（ＸＰ＿０２３１０３３１１）を、Ｃ末端にＡｖｉＴａｇ（ＧＬＮＤＩＦＥＡＱＫＩＥＷＨＥ）と８×Ｈｉｓタグを付けてクローニングし、ＨＥＫ２９３細胞で発現させた。組換えネコＴｒｋＡタンパク質を、ニッケルクロマトグラフィーを使用して馴化培地から精製した。ネコｐ７５の細胞外ドメイン（ＸＰ＿０２３０９９５３４）を、Ｃ末端にＡｖｉＴａｇ（ＧＬＮＤＩＦＥＡＱＫＩＥＷＨＥ）と８×Ｈｉｓタグを付けてクローニングし、ＨＥＫ２９３細胞で発現させた。組換えネコｐ７５タンパク質を、ニッケルクロマトグラフィーを使用して馴化培地から精製した。ＢｉｒＡビオチンタンパク質リガーゼ反応キット（Ａｖｉｄｉｔｙ）を使用して、両方の受容体をＡｖｉＴａｇ部位でビオチン化した。Ｓｅｒｉｅｓ　Ｓ　ＣＡＰチップ及びＢｉｏｔｉｎ　ＣＡＰｔｕｒｅ試薬（Ｃｙｔｉｖａ）でビオチン化受容体を捕捉した。抗体をランニングバッファー（１×ＰＢＳＰ＋、Ｃｙｔｉｖａ）中で滴定し、１０ｎＭ　ＮＧＦ（ＴｒｋＡアッセイ）または５０ｎＭ　ＮＧＦ（ｐ７５アッセイ）とともに指定の比率でプレインキュベートした。捕捉した受容体上にこれらの試料を１８０秒間注入することによって結合を評価した。Ｒｍａｘを使用して、事前に混合した試料のＲｍａｘを、アッセイ全体で回収したＮＧＦのみのＲｍａｘ試料の平均で割ることにより、阻害の割合を計算した。ネコＴｒｋＡ及びｐ７５へのＮＧＦの結合を遮断する各抗体の能力を表１６に示す。

【表１６】

表１６－ＮＧＦ受容体に結合するＮＧＦ能力を遮断する抗体

	TrkA		p75	
クローン	Ab対NGF比	遮断(%)	Ab対NGF比	遮断(%)
101	10:1	15	1:1	42
101	50:1	76	5:1	87
SC-184_76-Arg	10:1	99	1:1	100
SC-184_76-Arg	50:1	100	5:1	100
SC-184_110-Arg	10:1	100	1:1	100
SC-184_110-Arg	50:1	100	5:1	100
AHF17602	10:1	99	1:1	100
AHF17602	50:1	100	5:1	100

【０１５１】

実施例７

イヌクローンＳＣ－４２＿１０１＿００６における親和性成熟変異Ｇ５５Ｒの試験

【０１５２】

ネコクローン１０１は、イヌクローンＳＣ－４２＿１０１＿００６（ＳＣ－４２＿１０１のV_Hドメイン；ＳＣ－４２＿００６のV_Lドメイン）と顕著なＣＤＲ類似性を有する。親和性成熟したネコクローンＡＨＦ１７６０２は、Ｇ５５Ｒの変異により潜在的なＮＧ脱アミド部位を除去しており、この潜在的な脱アミド部位はイヌクローンにも存在する。クローンＳＣ－４２＿１０１＿００６をＲ５５に変異させ、親及びＲ５５バリアントの両方をＣＨＯ細胞で一時的に発現させ、プロテインＡによって精製した。可変ドメイン配列を図１及び図２に示す。Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００装置を備えたＳＰＲを使用して、ＮＧＦに対する親和性を評価した。Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ　Ｓｅｒｉｅｓ　Ｓチップを使用して抗体を捕捉した。次いで、ＰＢＳＰ＋ランニングバッファー（Ｃｙｔｉｖａ）を流速３０μＬ／分で使用して、ＮＧＦ結合を５０ｎＭから開始する複数の濃度で評価した。結合時間の長さは１２０秒であり、解離時間は６００秒で実行した。チップ表面を１０ｍＭグリシンで再生させた。Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウェアを使用して、参照を差し引いたセンサーグラムを１：１結合モデルにフィッティングした。データを以下の表１７に示す。

【表１７】

表１７－イヌＮＧＦ抗体の親和性

クローン	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)
SC-42_101_006	1.51E+06	1.74E-04	1.15E-10	46.7
SC-42_101_006-Arg	1.38E+06	1.89E-04	1.39E-10	39

【０１５３】

本発明を、以下の番号付きの段落によってさらに説明する：

【０１５４】

１．　イヌＮＧＦに特異的に結合する単離されたタンパク質であって、

（ａ）アミノ酸配列$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$（配列番号１４６）を含む重鎖相補性

決定領域１（ＶＨ－ＣＤＲ１）であって、式中、X_1が、Ａ、Ｇ、またはＮを含み、X_2が、ＬまたはＭを含み、X_3が、Ａ、Ｄ、Ｅ、またはＳを含み、X_4が、Ｆ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、またはＶを含み、X_5が、ＮまたはＴを含み、X_6が、Ｅ、Ｓ、またはＴを含み、X_7が、Ｇ、Ｈ、Ｎ、Ｓ、またはＱを含み、X_8が、ＡまたはＳを含む、前記ＶＨ－ＣＤＲ１、

（ｂ）アミノ酸配列X_1X_2ＳＮＧＧＴ（配列番号１４７）を含む重鎖相補性決定領域２（ＶＨ－ＣＤＲ２）であって、式中、X_1が、ＩまたはＬを含み、X_2が、ＷまたはＹを含む、前記ＶＨ－ＣＤＲ２、

（ｃ）アミノ酸配列ＡX_2ＩX_4X_5Ｙ$X_7X_8X_9$ＹＬ$X_{12}X_{13}$Ｙ$X_{15}X_{16}X_{17}$（配列番号１４８）を含む重鎖相補性決定領域３（ＶＨ－ＣＤＲ３）であって、式中、X_2が、Ｄ、Ｅ、Ｋ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、またはＴを含み、X_4が、ＷまたはＹを含み、X_5が、Ｆ、Ｈ、Ｗ、またはＹを含み、X_7が、ＤまたはＥを含み、X_8が、ＡまたはＳを含み、X_9が、ＤまたはＹを含み、X_{12}が、ＨまたはＹを含み、X_{13}が、ＦまたはＷを含み、X_{15}が、Ｆ、Ｉ、Ｌ、Ｗ、またはＹを含み、X_{16}が、ＤまたはＱを含み、X_{17}が、Ｆ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｗ、またはＹを含む、前記ＶＨ－ＣＤＲ３、

（ｄ）アミノ酸配列X_1X_2Ｉ$X_4X_5X_6$（配列番号１４９）を含む軽鎖相補性決定領域１（ＶＬ－ＣＤＲ１）であって、式中、X_1が、Ｄ、Ｅ、またはＫを含み、X_2が、Ａ、Ｇ、またはＮを含み、X_4が、Ｇ、Ｎ、Ｑ、またはＳを含み、X_5が、ＮまたはＳを含み、X_6が、Ａ、Ｇ、Ｎ、Ｓ、またはＴを含む、前記ＶＬ－ＣＤＲ１、

（ｅ）アミノ酸配列ＡX_2X_3（配列番号１５０）を含む軽鎖相補性決定領域２（ＶＬ－ＣＤＲ２）であって、式中、X_2が、Ａ、Ｓ、またはＴを含み、X_3が、Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、またはＴを含む、前記ＶＬ－ＣＤＲ２、及び

（ｆ）アミノ酸配列ＱX_2Ｇ$X_4X_5X_6$ＰX_8Ｔ（配列番号１５１）を含む軽鎖相補性決定領域３（ＶＬ－ＣＤＲ３）であって、式中、X_2が、ＨまたはＱを含み、X_4が、Ｆ、Ｈ、Ｗ、またはＹを含み、X_5が、ＫまたはＱを含み、X_6が、ＦまたはＷを含み、X_8が、ＬまたはＭを含む、前記ＶＬ－ＣＤＲ３

を含む抗原結合部分を含む、前記単離されたタンパク質。

【０１５５】

２．

（ａ）アミノ酸配列$X_1X_2X_3X_4$ＴX_6X_7Ｓ（配列番号１５２）を含む重鎖相補性決定領域１（ＶＨ－ＣＤＲ１）であって、式中、X_1が、ＡまたはＧを含み、X_2が、ＬまたはＭを含み、X_3が、ＥまたはＳを含み、X_4が、ＦまたはＬを含み、X_6が、ＳまたはＴを含み、X_7が、Ｈ、Ｎ、またはＳを含む、前記ＶＨ－ＣＤＲ１、

（ｂ）アミノ酸配列ＩＷＳＮＧＧＴ（配列番号１５３）を含む重鎖相補性決定領域２（ＶＨ－ＣＤＲ２）、

（ｃ）アミノ酸配列ＡX_2ＩＹＹＹX_7ＡＤＹＬＨX_{13}ＹX_{15}ＤX_{17}（配列番号１５４）を含む重鎖相補性決定領域３（ＶＨ－ＣＤＲ３）であって、式中、X_2が、Ｎ、Ｑ、またはＳを含み、X_7が、ＤまたはＥを含み、X_{13}が、ＦまたはＷを含み、X_{15}が、Ｆ、Ｉ、Ｌ、Ｗ、またはＹを含み、X_{17}が、Ｆ、Ｉ、Ｌ、またはＭを含む、前記ＶＨ－ＣＤＲ３、

（ｄ）アミノ酸配列X_1ＧＩX_4ＮX_6（配列番号１５５）を含む軽鎖相補性決定領域１（ＶＬ－ＣＤＲ１）であって、式中、X_1が、ＤまたはＥを含み、X_4が、ＱまたはＳを含み、X_6が、Ｇ、Ｎ、Ｓ、またはＴを含む、前記ＶＬ－ＣＤＲ１、

（ｅ）アミノ酸配列ＡＴX_3（配列番号１５６）を含む軽鎖相補性決定領域２（ＶＬ－ＣＤＲ２）であって、式中、X_3が、Ｄ、Ｅ、Ｎ、Ｑ、またはＳを含む、前記ＶＬ－ＣＤＲ２、及び

（ｆ）アミノ酸配列ＱＱＧ$X_4X_5X_6$ＰＬＴ（配列番号１５７）を含む軽鎖相補性決定領域３（ＶＬ－ＣＤＲ３）であって、式中、X_4が、Ｆ、Ｈ、またはＹを含み、X_5が、ＫまたはＱを含み、X_6が、ＦまたはＷを含む、前記ＶＬ－ＣＤＲ３

を含む抗原結合部分を含む、段落１に記載のタンパク質。

【０１５６】

３．配列番号１３７と比較してＶＨ－ＣＤＲ当たり２つ以下の変化を含み、配列番号１３８と比較してＶＬ－ＣＤＲ当たり２つ以下の変化を含む、段落１または２に記載のタンパク質。

【０１５７】

４．配列番号１３７と比較してＶＨ－ＣＤＲ当たり１つ以下の変化を含み、配列番号１３８と比較してＶＬ－ＣＤＲ当たり１つ以下の変化を含む、段落１または２に記載のタンパク質。

【０１５８】

５．配列番号１３、配列番号３１、配列番号５５、配列番号６１、配列番号６９、配列番号７７、配列番号１０３、配列番号１０９、配列番号１１３、配列番号１２１、配列番号１３３、配列番号１３７、または配列番号１４１に対して、少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９３％、または少なくとも９５％同一である重鎖フレームワーク（ＦＲ１Ｈ＋ＦＲ２Ｈ＋ＦＲ３Ｈ＋ＦＲ４Ｈ）を含む、段落１～４のいずれか１項に記載のタンパク質。

【０１５９】

６．配列番号１４、配列番号３２、配列番号５６、配列番号６２、配列番号７０、配列番号７８、配列番号１０４、配列番号１１０、配列番号１１４、配列番号１２２、配列番号１３４、配列番号１３８、または配列番号１４２に対して、少なくとも７５％、または少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９３％、または少なくとも９５％同一である軽鎖フレームワーク（ＦＲ１Ｌ＋ＦＲ２Ｌ＋ＦＲ３Ｌ＋ＦＲ４Ｌ）を含む、段落１～５のいずれか１項に記載のタンパク質。

【０１６０】

７．配列番号１３、配列番号３１、配列番号５５、配列番号６１、配列番号６９、配列番号７７、配列番号１０３、配列番号１０９、配列番号１１３、配列番号１２１、配列番号１３３、配列番号１３７、または配列番号１４１を含むV_Hドメインを含む、段落１～６のいずれか１項に記載のタンパク質。

【０１６１】

８．配列番号１４、配列番号３２、配列番号５６、配列番号６２、配列番号７０、配列番号７８、配列番号１０４、配列番号１１０、配列番号１１４、配列番号１２２、配列番号１３４、配列番号１３８、または配列番号１４２を含むV_Lドメインを含む、段落１～７のいずれか１項に記載のタンパク質。

【０１６２】

９．段落１～８のいずれか１項に記載の抗ＮＧＦ抗体または抗体断片をコードする単離された核酸配列。

【０１６３】

１０．段落９に記載の核酸を含むベクター。

【０１６４】

１１．段落９または１０のいずれか１項に記載の核酸を含む、組換え細胞。

【０１６５】

１２．段落１のいずれか１項に記載のタンパク質、治療有効量の段落１～８のいずれか１項に記載の抗ＮＧＦタンパク質、または段落９もしくは１０に記載の核酸を発現する細胞。

【０１６６】

１３．前記抗ＮＧＦタンパク質の産生をもたらす条件下で段落１１に記載の宿主細胞を培養することを含む、段落１～８のいずれか１項に記載の抗ＮＧＦタンパク質の産生方法。

【０１６７】

１４．治療有効量の段落１～８のいずれか１項に記載の抗ＮＧＦタンパク質を含む、医薬組成物。

【０１６８】

１５．対象における疼痛の治療方法であって、治療有効量の段落１～８のいずれか１項に記載の抗ＮＧＦタンパク質を前記対象に投与することを含む、前記治療方法。

【０１６９】

１６．前記疼痛が、炎症性疼痛、術後切開疼痛、がん性疼痛、原発性または転移性骨がん性疼痛、骨折痛、骨粗鬆症性骨折痛、火傷に起因する疼痛、外傷由来の疼痛、筋骨格痛、リウマチ性疼痛、または骨粗鬆症の痛みを含む、段落１５に記載の方法。

【０１７０】

１７．前記対象が、イヌを含む、段落１６に記載の方法。

【０１７１】

１８．前記対象が、ネコを含む、段落１６に記載の方法。

【０１７２】

１９．前記対象が、ヒトを含む、段落１６に記載の方法。

【０１７３】

２０．試料中のＮＧＦの検出方法であって、段落１～８のいずれか１項に記載の抗ＮＧＦタンパク質の存在下でＮＧＦを含む試料をインキュベートし、前記試料中のＮＧＦに結合した前記抗ＮＧＦタンパク質を検出することを含む、前記検出方法。

【０１７４】

本発明の好ましい実施形態について詳細に説明してきたが、本発明の趣旨または範囲から逸脱することなく、その多くの明らかな変形形態が可能であるため、上記の段落によって定義される本発明は、上記の説明に記載された特定の詳細に限定されるものではないことを理解されたい。

【図面】

【図１Ａ－１】

配列番号	クローンの名称	FR1H	CDR1H	FR2H	CDR2H
1	2166	QVQLKESGPGLVQPSQTLSLTCTVS	GLSLTSNS	VSWIRQPPGKGLEWMGV	IWSNGGT
3	SC-42_006	EVQLVESGGDLVQPAGSLRLSCVAS	GLSLNSNS	MSWVRQAPEKGLQLVAT	IWSNGGT
5	SC-42_007	EVQLVESGGDLVAPSQSLSITCTVS	GLSLTSNA	ISWVRQPPGRGLEWLGT	IWSNGGT
7	SC-42_008	EVQLVESGGDLVKPEGSLRLSCVVS	GLEITSNS	MSWVRQAPGKGLQWVGV	LWSNGGT
9	SC-42_010	EVQLVESGGDLVKPEGSLSLSCVVS	GLSLTSNA	MSWVRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
11	SC-42_011	EVQLVESGGDLVAPSQSLSITCTVS	GLSLTENS	ISWVRQPPGRGLEWLGV	IWSNGGT
13	SC-42_023	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
15	SC-42_024	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
17	SC-42_025	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLNSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
19	SC-42_026	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
21	SC-42_027	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
23	SC-42_028	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLALTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
25	SC-42_029	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLELTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
27	SC-42_030	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	NLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
29	SC-42_031	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
31	SC-42_032	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTTNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
33	SC-42_033	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
35	SC-42_034	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLALTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
37	SC-42_035	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GIALTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
39	SC-42_036	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	NLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
41	SC-42_037	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLNSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
43	SC-42_038	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLELTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
45	SC-42_040	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSHS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
47	SC-42_041	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTTNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT

【図１Ａ－２】

（続き）

配列番号	クローンの名称	FR1H	CDR1H	FR2H	CDR2H
49	SC-42_042	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
51	SC-42_043	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLALTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
53	SC-42_044	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLALTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
55	SC-42_045	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLELTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
57	SC-42_046	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
59	SC-42_047	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	NLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
61	SC-42_048	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSHS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
63	SC-42_049	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLALTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
65	SC-42_050	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTTNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
67	SC-42_051	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSHS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
69	SC-42_052	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLELTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
71	SC-42_053	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLNSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
73	SC-42_054	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTTNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
75	SC-42_055	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
77	SC-42_057	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSHS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
79	SC-42_058	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSITSHS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
81	SC-42_059	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	NLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
83	SC-42_060	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLALTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
85	SC-42_061	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
87	SC-42_062	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLALTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
89	SC-42_063	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLNSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
91	SC-42_064	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSHS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
93	SC-42_065	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSHS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
95	SC-42_066	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSHS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT

【図１Ａ－３】

（続き）

配列番号	クローンの名称	FR3H	CDR3H	FR4
49	SC-42_042	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHWYYDF	WGQGTLVTVSS
51	SC-42_043	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ADIYYYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
53	SC-42_044	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ANIYYYDADILHWYFDF	WGQGTLVTVSS
54	SC-42_045	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHWYWDF	WGQGTLVTVSS
55	SC-42_046	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHFYFDF	WGQGTLVTVSS
59	SC-42_047	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYEADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
61	SC-42_048	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ANIYYYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
63	SC-42_049	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHWYFDL	WGQGTLVTVSS
65	SC-42_050	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYEADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
67	SC-42_051	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHFYFDF	WGQGTLVTVSS
69	SC-42_052	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	AQIYYYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
71	SC-42_053	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHWYFDL	WGQGTLVTVSS
73	SC-42_054	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHWYYDF	WGQGTLVTVSS
75	SC-42_055	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHWYFDL	WGQGTLVTVSS
77	SC-42_057	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHFYFDF	WGQGTLVTVSS
79	SC-42_058	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHFYFDF	WGQGTLVTVSS
81	SC-42_059	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ANIYYYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
83	SC-42_060	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHWYFDI	WGQGTLVTVSS
85	SC-42_061	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHWYYDF	WGQGTLVTVSS
87	SC-42_062	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ADIYYYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
89	SC-42_063	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ANIYYYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
91	SC-42_064	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	AKIYYYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
93	SC-42_065	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHWYYDF	WGQGTLVTVSS
95	SC-42_066	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYEADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS

【図１Ｂ－１】

配列番号	クローンの名称	FR3H	CDR3H	FR4
1	2166	DYNSAIESRLSINRDTSKSQVFLKMNSLQPEDTAMYFC	ASIYYYDADYLHWYFDF	WGPGTMVTVSS
3	SC-42_006	QYTDAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAMYYC	ATIYYYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
5	SC-42_007	SYTDAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRTEDTARYYC	ASIYYYDADYLHWYFDM	WGQGTLVTVSS
7	SC-42_008	DYTDAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRTEDTARYYC	ASIYYYDADYLHWYIDY	WGQGTLVTVSS
9	SC-42_010	SYNSAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRTEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHWYYDF	WGQGTLVTVSS
11	SC-42_011	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHWYLDF	WGPGTLVTISS
13	SC-42_023	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHWYFDL	WGQGTLVTVSS
15	SC-42_024	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHFYFDF	WGQGTLVTVSS
17	SC-42_025	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYFYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
19	SC-42_026	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYFYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
21	SC-42_027	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHWYYDF	WGQGTLVTVSS
23	SC-42_028	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ADIYYYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
25	SC-42_029	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHWYIDF	WGQGTLVTVSS
27	SC-42_030	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ANIYYYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
29	SC-42_031	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHWYYDF	WGQGTLVTVSS
31	SC-42_032	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHWYFDM	WGQGTLVTVSS
33	SC-42_033	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ANIYYYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
35	SC-42_034	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ANIYYYDADYLHWYIDF	WGQGTLVTVSS
37	SC-42_035	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHWYFDI	WGQGTLVTVSS
39	SC-42_036	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	AEIYYYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
41	SC-42_037	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHWYWDF	WGQGTLVTVSS
43	SC-42_038	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	AQIYYYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
45	SC-42_040	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHWYFDW	WGQGTLVTVSS
47	SC-42_041	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	AQIYYYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS

【図１Ｂ－２】

（続き）

配列番号	クローンの名称	FR3H	CDR3H	FR4
97	SC-42_067	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYFYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
99	SC-42_068	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ANIYYYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
101	SC-42_069	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHWYFDL	WGQGTLVTVSS
103	SC-42_070	DYTDAVKGRFTISRDNVKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHFYFDF	WGQGTLVTVSS
105	SC-42_071	DYTDAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAMYYC	ASIYYYDAYYLHWYYDF	WGQGTLVTVSS
107	SC-42_072	DYADAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAMYYC	ASIYYYDADYLHWYFQF	WGQGTLVTVSS
109	SC-42_073	DYTDAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAMYYC	ASIYYYDADYLHWYWDF	WGQGTLVTVSS
111	SC-42_075	DYTDAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAMYYC	ASIYYYDADYLHWYFDM	WGQGTLVTVSS
113	SC-42_077	DYADAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAMYYC	AQIYYYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
115	SC-42_079	DYTDAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAMYYC	AKIYYYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
117	SC-42_080	DYNDAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLQTEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
119	SC-42_081	DYTDAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRTEDTARYYC	ASIYYYDSDYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
121	SC-42_082	DYTSAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRTEDTAVYYC	ASIYYYDADYLHWYWDF	WGQGTLVTVSS
123	SC-42_083	DYTDAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRTEDTAVYYC	ASIYYYEADYLHWYYDF	WGQGTLVTVSS
125	SC-42_084	DYTDAVKGRFTISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTARYYC	ASIYYYDADYLHWYIDF	WGQGTLVTVSS
127	SC-42_085	DYTDAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLQTDDTAVYYC	ASIYYYDADYLHWYWDF	WGQGTLVTVSS
129	SC-42_088	DYTDAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTGMYYC	ASIYYYDADYLHWYFDL	WGQGTLVTVSS
131	SC-42_089	DYTDAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAMYYC	ASIYYYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
133	SC-42_090	DYTDAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAMYYC	ASIYYYDADYLHWYILDF	WGQGTLVTVSS
135	SC-42_091	QYADAVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASIWYYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
137	SC-42_101	DYTDAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAMYYC	AQIYYYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
207	SC-42_101R	DYTDAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAMYYC	AQIYYYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS
139	SC-42_102	QYADAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAMYYC	AKIYYYDADYLHWYFDF	WGQGTLVTVSS

【図１Ｂ－３】

（続き）

配列番号	クローンの名称	FR1H	CDR1H	FR2H	CDR2H
97	SC-42_067	EVQLVESGGELVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
99	SC-42_068	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSHS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
101	SC-42_069	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTTNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
103	SC-42_070	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWIRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
105	SC-42_071	EVQLVESGGDLVKPEGSLRLSCVVS	GLSLTSGS	MSWVRQAPGKGLQWVGV	IYSNGGT
107	SC-42_072	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCVVS	GLDLTSNS	MSWVRQAPGKGLQWTV	IWSNGGS
109	SC-42_073	EVQLVESGGDLVKPAGSLRLSCVAS	ALSLTSNS	MSWVRQAPGKGLQLVAT	IWSNGGT
111	SC-42_075	EVQLVESGGDLVQPASLRLSCVAS	GLSLTSQS	MSWVRQAPGKGLQLVAI	IWSNGGT
113	SC-42_077	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCVVS	GLSLTTNS	MSWVRQAPGKGLQWVTT	IWSNGGT
115	SC-42_079	EVQLVESGGDLVKPGGSLSLSCVAS	GLSVTSNS	MDWVRQAPGKGLQWLSI	IWSNGGT
117	SC-42_080	EVQLVESGGDLVKPEGSLSLSCVVS	GLSLTSSS	MSWVRQAPGKGLEWVAT	IWSNGGT
119	SC-42_081	EVQLVESGGDLVKPEGSLRLTCVVS	GLSMTSNS	MSWVRQAPGKGLQWVAT	IWSNGCT
121	SC-42_082	EVQLVESGGDLVKPASQSLSITCTVS	GLSLTSHS	ISWVRQAPGKGLQWVAT	IWSNGGT
123	SC-42_083	EVQLVESGGDLVKPEGSLRLSCVVS	GLSLTSNG	MSWVRQAPGKGLEWVAT	IWSNGGT
125	SC-42_084	EVQLVESGGDLVKPEGSLSLSCVVS	GLSLTSHS	MSWVRQAPGKGLQWVST	IWSNGGT
127	SC-42_085	EVQLVESGGDLVKPEGSLRLSCVVS	GLELTSNS	MSWVRQAPGKGLQWVGT	IWSNGGT
129	SC-42_088	EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVAS	GLSLTSNS	MSWVRQAPEKGLQLVAT	IWSNGGT
131	SC-42_089	EVQLVESGGDLVKPAGSLRLSCVAS	GLSLTSHS	MSWVRQAPGKGLQLVAT	IWSNGGT
133	SC-42_090	EVQLVESGGDLVKPASLRLSCVAS	GLSFTSNS	MSWVRQAPGKGLQLVAT	IWSNGGT
135	SC-42_091	QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFS	GFSLSTSG	VGWIRQPPGKALEWLAH	IFSNDEK
137	SC-42_101	EVQLVESGGDLVAPSQSLSITCTVS	GMSLTSNS	ISWVRQPPGRGLEWLGT	IWSNGGT
207	SC-42_101R	EVQLVESGGDLVKPAGSLRLSCVAS	GLGLTSNS	MSWVRQAPEKGLQLVAV	IWSNGGT
139	SC-42_102	EVQLVESGGDLVKPAGSLRLSCVAS	GLGLTSNS	MSWVRQAPEKGLQLVAV	IWSNGGT

【図２Ａ－１】

配列番号	クローンの名称	FR1L	CDR1L	FR2L	CDR2L
2	2166	DIQMTQSPASLSASLGETVSIECLAS	EGISNS	LAWYQLKPGKSPQFLIY	ATS
4	SC-42_006	EIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATN
6	SC-42_007	EIVMTQSPASLSLVEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
8	SC-42_008	EIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCRAS	EGISNN	VAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
10	SC-42_010	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISSS	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
12	SC-42_011	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGINNS	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATQ
14	SC-42_023	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
16	SC-42_024	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
18	SC-42_025	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
20	SC-42_026	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
22	SC-42_027	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
24	SC-42_028	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
26	SC-42_029	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
28	SC-42_030	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
30	SC-42_031	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
32	SC-42_032	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
34	SC-42_033	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
36	SC-42_034	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
38	SC-42_035	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
40	SC-42_036	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
42	SC-42_037	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
44	SC-42_038	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
46	SC-42_040	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
48	SC-42_041	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS

【図２Ａ－２】

（続き）

配列番号	クローンの名称	FR1L	CDR1L	FR2L	CDR2L
50	SC-42_042	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
52	SC-42_043	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
54	SC-42_044	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
56	SC-42_045	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
58	SC-42_046	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATD
60	SC-42_047	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATD
62	SC-42_048	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATD
64	SC-42_049	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATD
66	SC-42_050	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATD
68	SC-42_051	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATD
70	SC-42_052	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
72	SC-42_053	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
74	SC-42_054	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
76	SC-42_055	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
78	SC-42_057	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
80	SC-42_058	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
82	SC-42_059	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
84	SC-42_060	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATD
86	SC-42_061	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATD
88	SC-42_062	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATD
90	SC-42_063	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATD
92	SC-42_064	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATD
94	SC-42_065	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATD
96	SC-42_066	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS

【図２Ａ－３】

（続き）

配列番号	クローンの名称	FR1L	CDR1L	FR2L	CDR2L
98	SC-42_067	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
100	SC-42_068	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
102	SC-42_069	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
104	SC-42_070	EIVMTQSPASLSLSQEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
106	SC-42_071	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
108	SC-42_072	EIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	AAS
110	SC-42_073	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGiQNS	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATN
112	SC-42_075	EIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCRAS	EGISNA	LAWYQQKPGKAPKLLIY	ATE
114	SC-42_077	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATE
116	SC-42_079	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGIGNS	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
118	SC-42_080	EIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCRAS	DGISNS	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATQ
120	SC-42_081	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EAISNS	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ASS
122	SC-42_082	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNG	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
124	SC-42_083	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGTSSS	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATA
126	SC-42_084	EIVMTQSPASLSLSQEDKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
128	SC-42_085	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	DGISNS	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
130	SC-42_088	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EAISNS	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATT
132	SC-42_089	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	KGISNS	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
134	SC-42_090	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNT	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATE
136	SC-42_091	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	ENISNS	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS
138	SC-42_101	EIVMTQSPASLSASQEEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIH	ATS
140	SC-42_102	EIVMTQSPASLSLSQGEKVTITCRAS	EGISNN	LAWYQQKPGQAPKLLIY	ATS

【図２Ｂ－１】

配列番号	クローンの名称	FR3L	CDR3L	FR4L
2	2166	SLQDGVPSRFSGSGSGTQYSLKISGMQPEDEGVYYC	QQGYKFPLT	FGSGTKLKIK
4	SC-42_006	SLATGVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLEPEDVAVYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
6	SC-42_007	SLATGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGWKFPLT	FGQGTKVEIK
8	SC-42_008	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLEPEDVAVYYC	QQGYKFPMT	FGQGTKVEIK
10	SC-42_010	QLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
12	SC-42_011	SLATGVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLEPEDVAVYYC	QQGFKFPLT	FGQGTKVEIK
14	SC-42_023	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
16	SC-42_024	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
18	SC-42_025	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
20	SC-42_026	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
22	SC-42_027	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
24	SC-42_028	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
26	SC-42_029	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
28	SC-42_030	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
30	SC-42_031	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
32	SC-42_032	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
34	SC-42_033	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
36	SC-42_034	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
38	SC-42_035	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
40	SC-42_036	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
42	SC-42_037	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
44	SC-42_038	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
46	SC-42_040	QLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
48	SC-42_041	QLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK

10

20

30

40

50

【図２Ｂ－２】

（続き）

配列番号	クローンの名称	FR3L	CDR3L	FR4L
50	SC-42_042	QLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
52	SC-42_043	QLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
54	SC-42_044	QLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
56	SC-42_045	QLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
58	SC-42_046	SLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
60	SC-42_047	SLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
62	SC-42_048	SLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
64	SC-42_049	SLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
66	SC-42_050	SLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
68	SC-42_051	SLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
70	SC-42_052	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
72	SC-42_053	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
74	SC-42_054	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
76	SC-42_055	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
78	SC-42_057	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
80	SC-42_058	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
82	SC-42_059	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
84	SC-42_060	SLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
86	SC-42_061	SLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
88	SC-42_062	SLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
90	SC-42_063	SLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
92	SC-42_064	SLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
94	SC-42_065	SLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
96	SC-42_066	ELATGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK

【図２Ｂ－３】

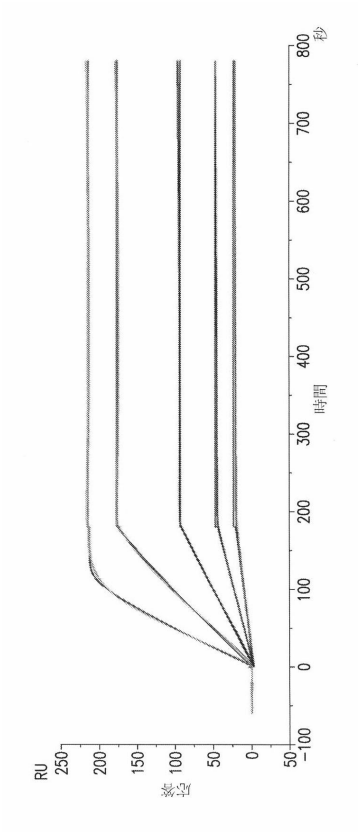
（続き）

配列番号	クローンの名称	FR3L	CDR3L	FR4L
98	SC-42_067	ELATGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
100	SC-42_068	ELATGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
102	SC-42_069	ELATGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
104	SC-42_070	ELATGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
106	SC-42_071	SMATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKFPLT	FGAGTKVELK
108	SC-42_072	SLQTGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QHGYKFPLT	FGAGTKVELK
110	SC-42_073	SLATGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGHKFPLT	FGAGTKVLLK
112	SC-42_075	SLATGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGFKFPLT	FGAGTKVELK
114	SC-42_077	SLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLQPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
116	SC-42_079	QLATGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGHKFPLT	FGQGTKVEIK
118	SC-42_080	SLARGVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLEPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGAGTKVELK
120	SC-42_081	SLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGWKFPLT	FGAGTKVELK
122	SC-42_082	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVAVYYC	QQGYKWPLT	FGAGTKVELK
124	SC-42_083	SLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
126	SC-42_084	KLATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
128	SC-42_085	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVATYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
130	SC-42_088	SLATGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGQGTKVEIK
132	SC-42_089	ELATGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLEPEDVAVYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK
134	SC-42_090	SLATGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGFKFPLT	FGQGTKVEIK
136	SC-42_091	TLATGVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLEPEDVATYYC	QQGFKFPLT	FGQGTKVEIK
138	SC-42_101	SLQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYQFPLT	FGQGTKVEIK
140	SC-42_102	ALATGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKFPLT	FGQGTKVEIK

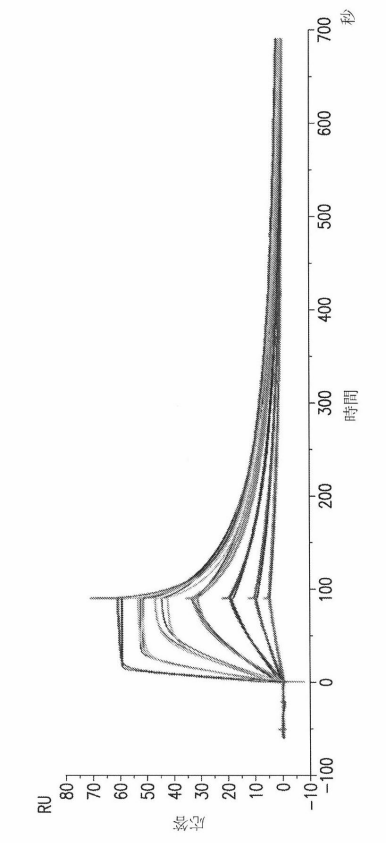
【図３】

【図４】

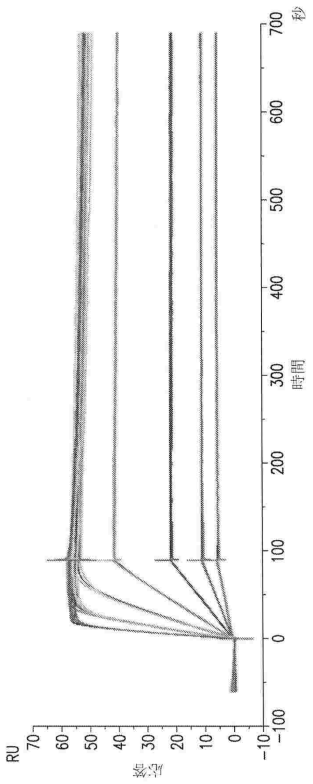
【図５】


RU
250
200
150
100
50
0
−50
応答
時間
−100
0
100
200
300
400
500
600
700
800
秒

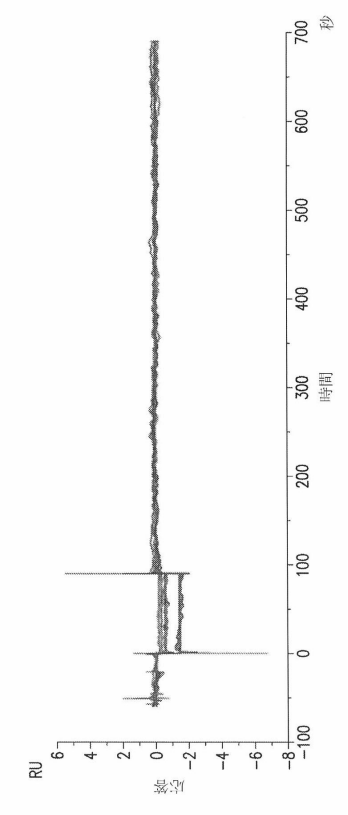
【図６】


RU
80
70
60
50
40
30
20
10
0
−10
応答
時間
−100
0
100
200
300
400
500
600
700
秒

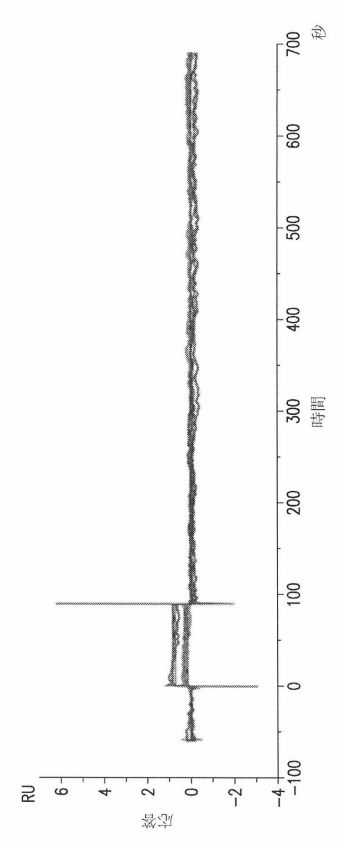
【図７】


RU
70
60
50
40
30
20
10
0
−10
応答
時間
−100
0
100
200
300
400
500
600
700
秒

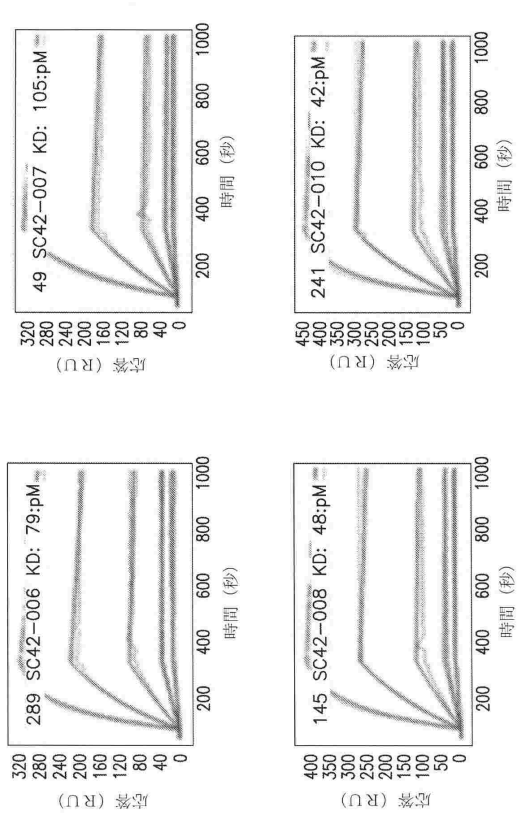
【図８】


RU
6
4
2
0
−2
−4
−6
−8
応答
時間
−100
0
100
200
300
400
500
600
700
秒

【図９】

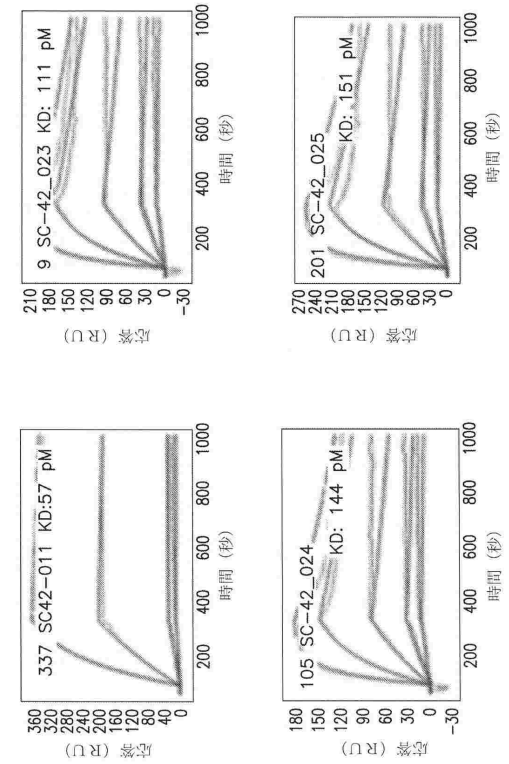


【図１０－１】



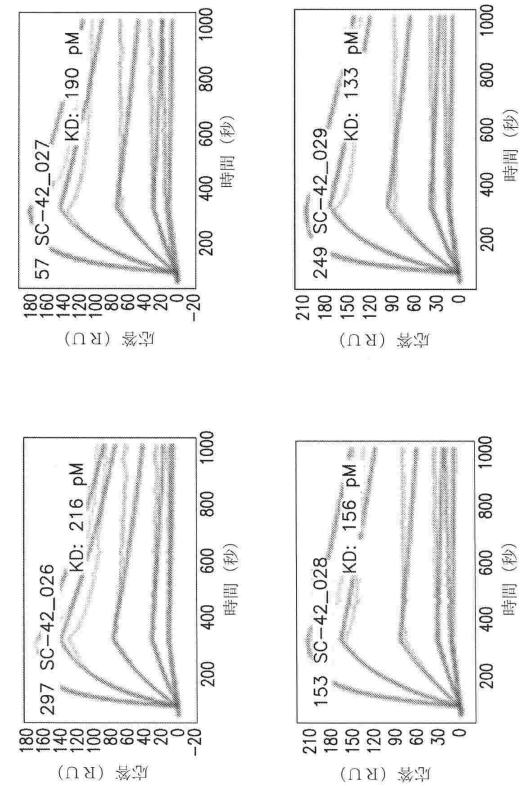
【図１０－２】

（続き）

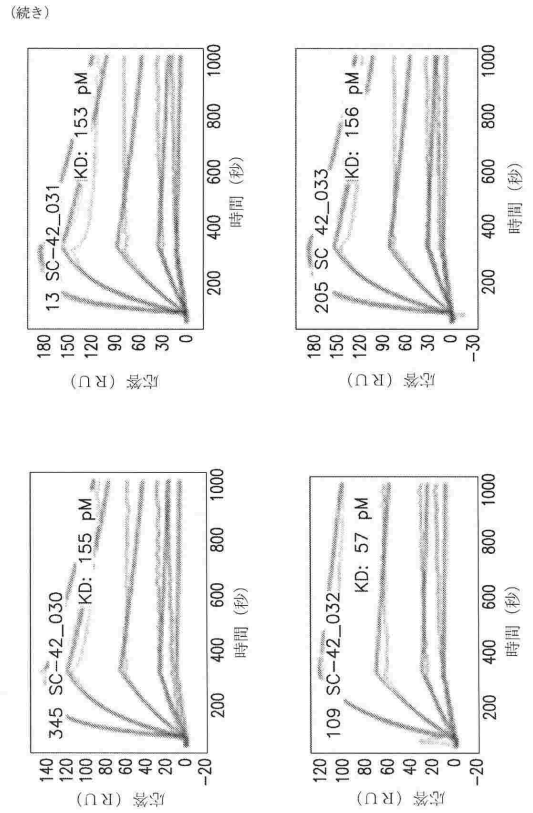


【図１０－３】

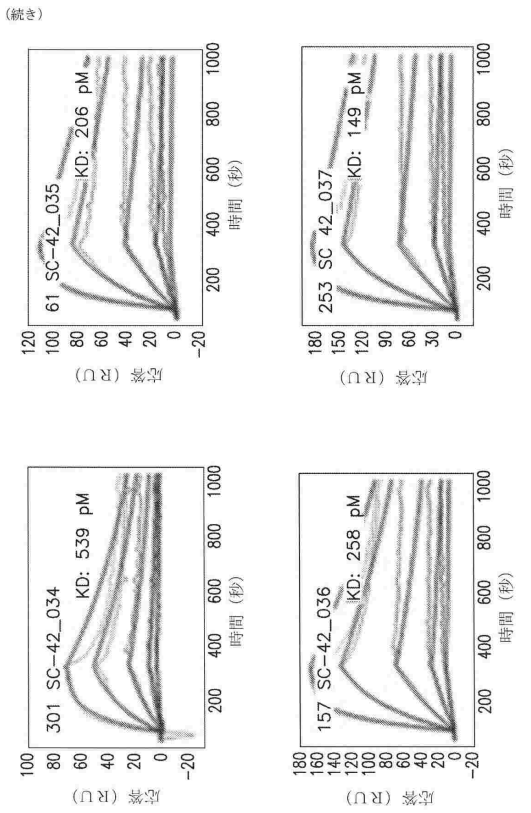
（続き）



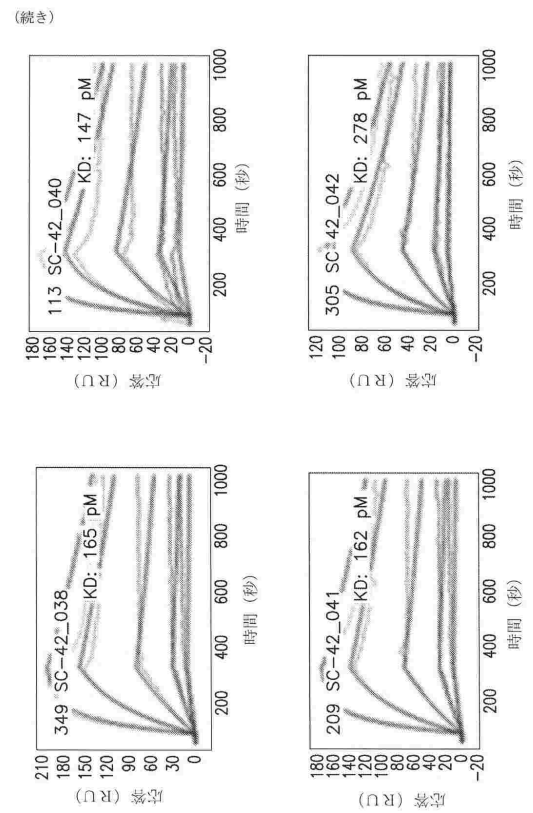
【図１０－４】



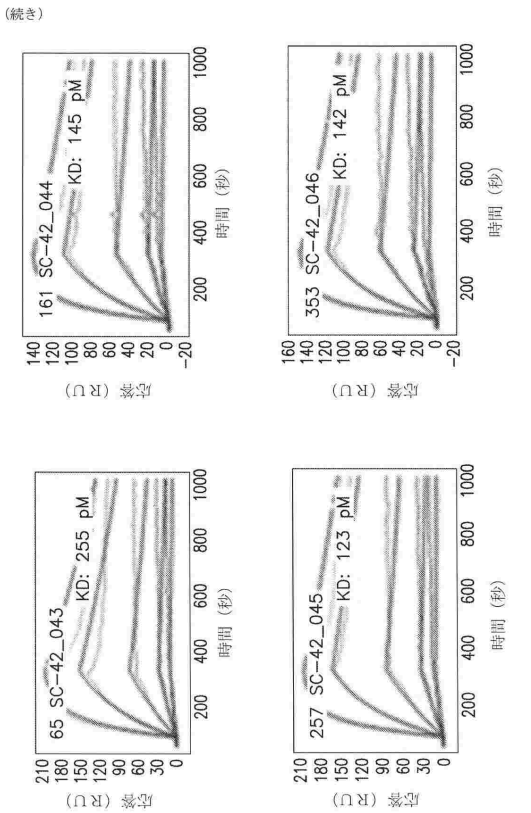
【図１０－５】



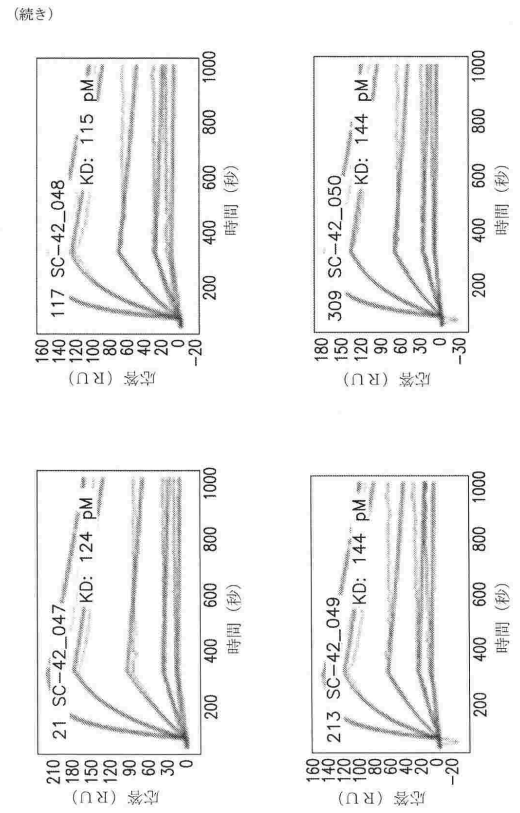
【図１０－６】



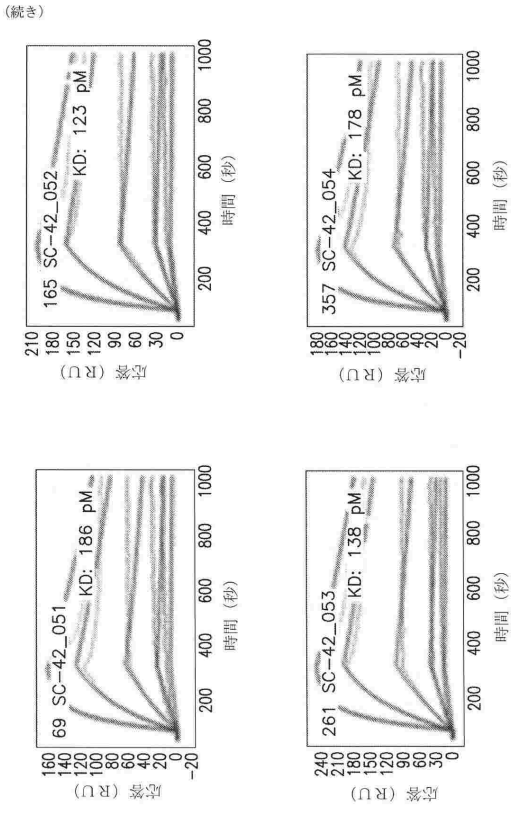
【図１０－７】



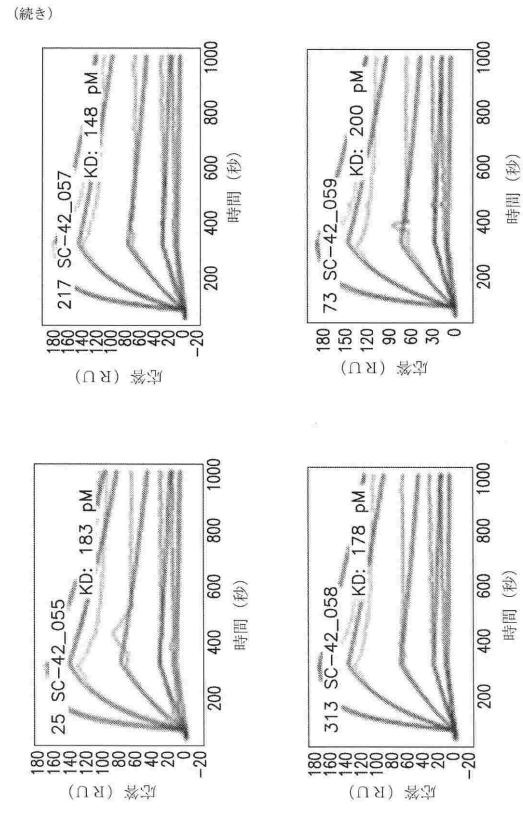
【図１０－８】



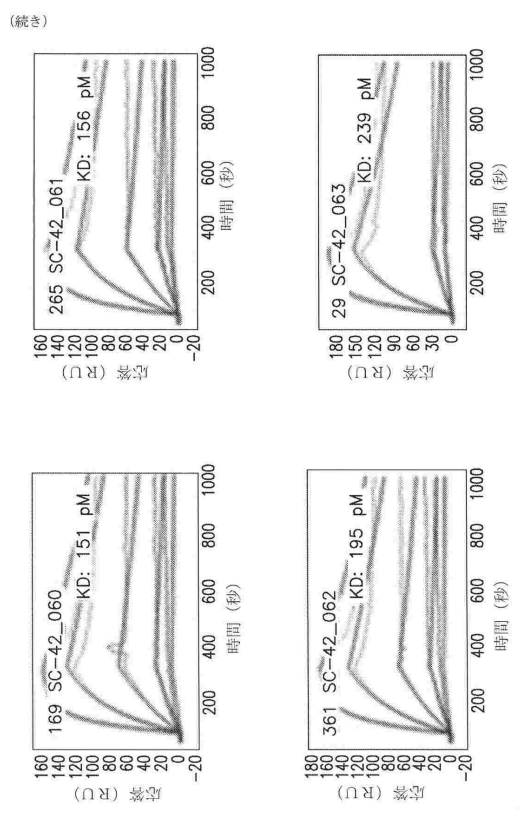
【図１０－９】



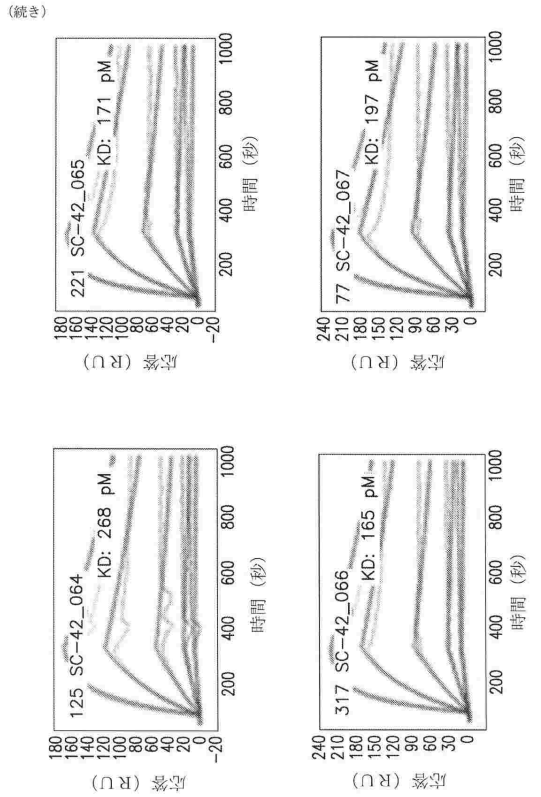
【図１０－１０】



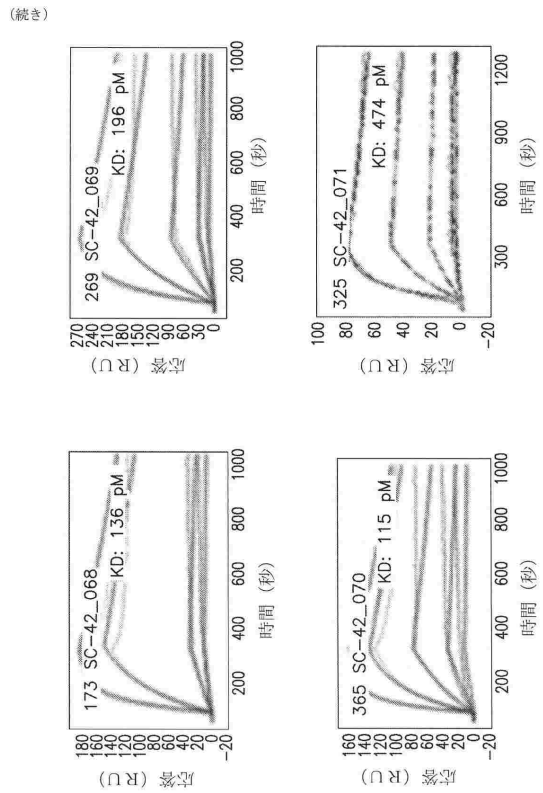
【図１０－１１】



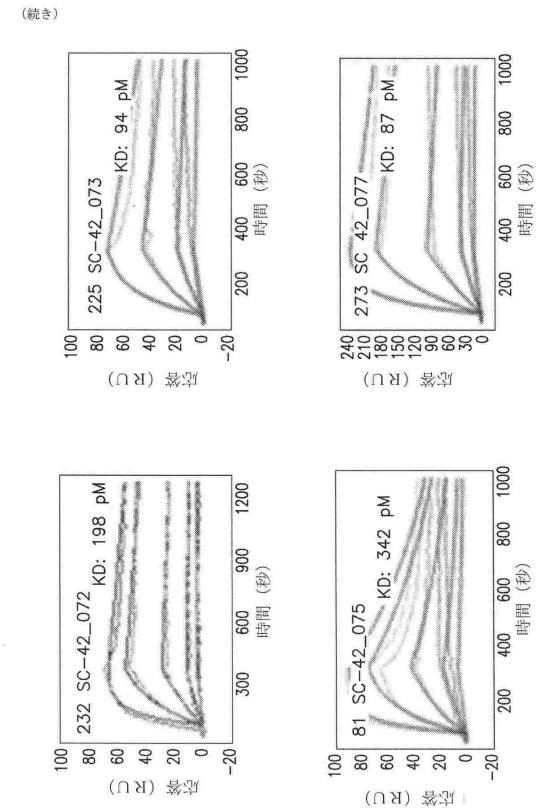
【図１０－１２】



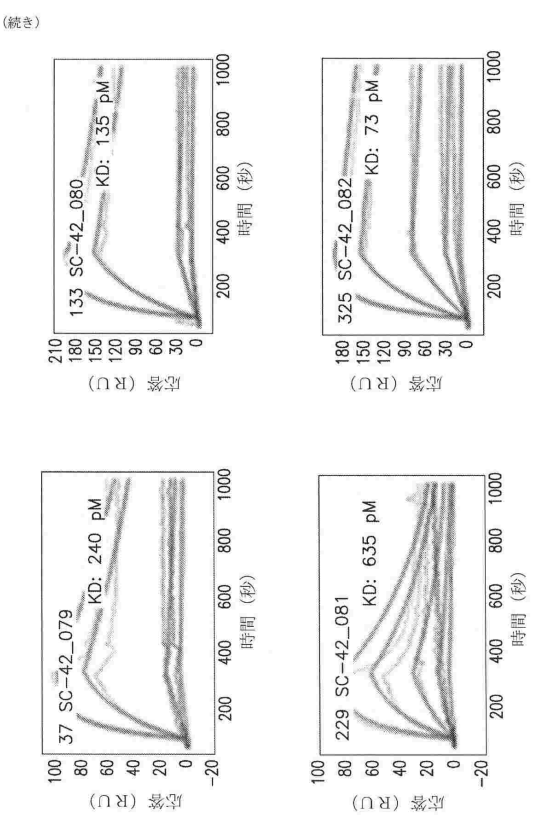
【図１０－１３】



【図１０－１４】

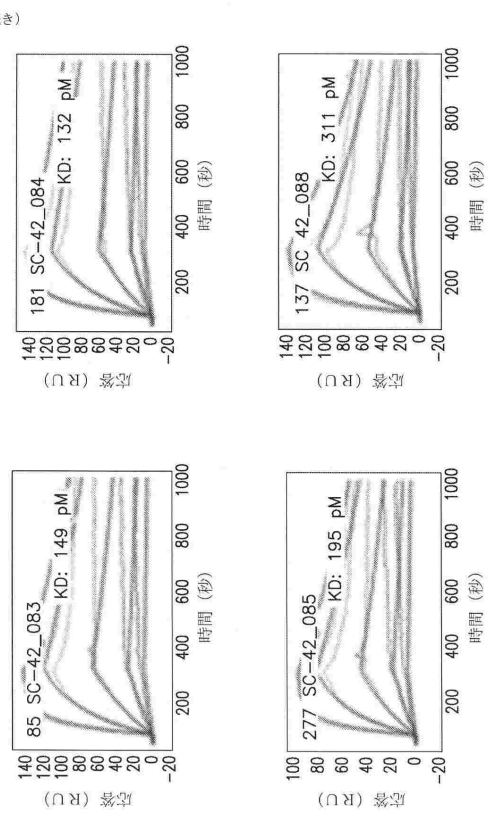


【図１０－１５】



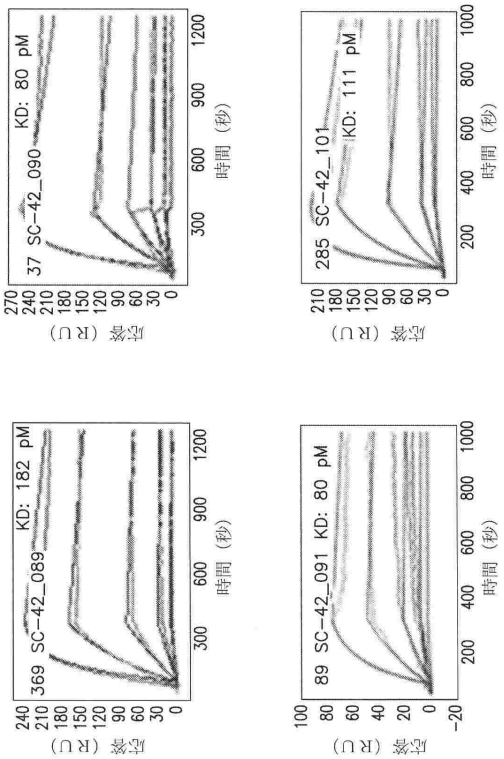
【図１０－１６】

（続き）



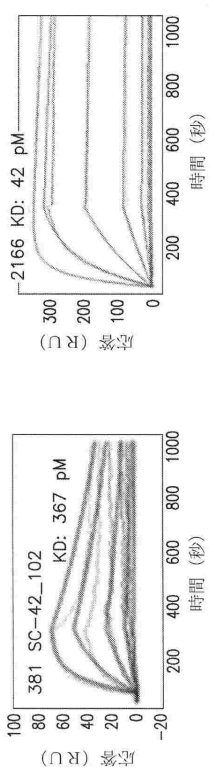
【図１０－１７】

（続き）

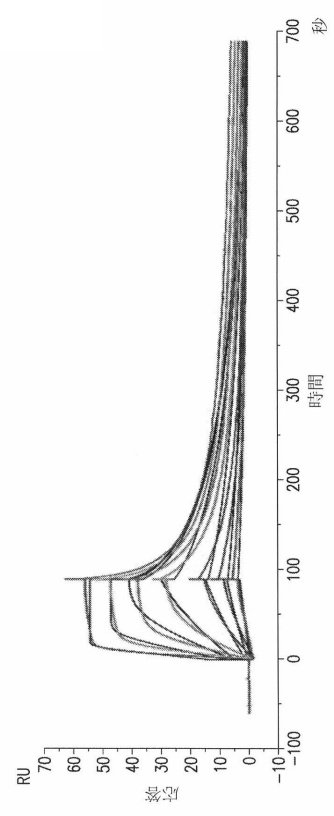


【図１０－１８】

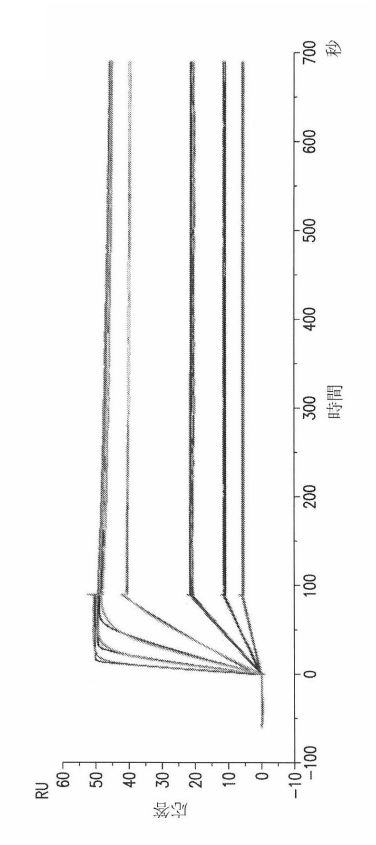
（続き）



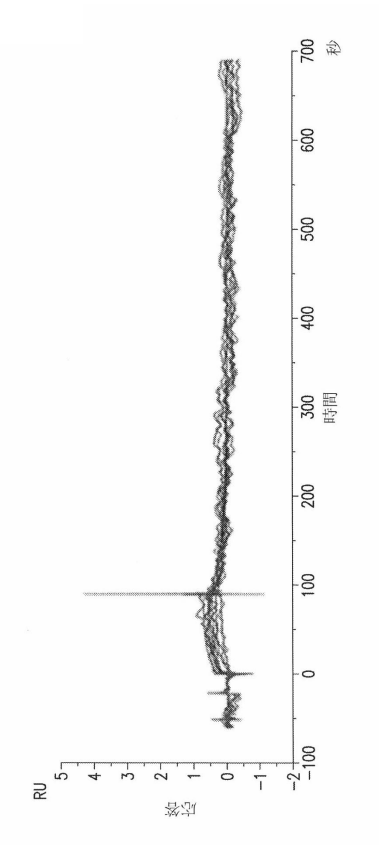
【図１１】



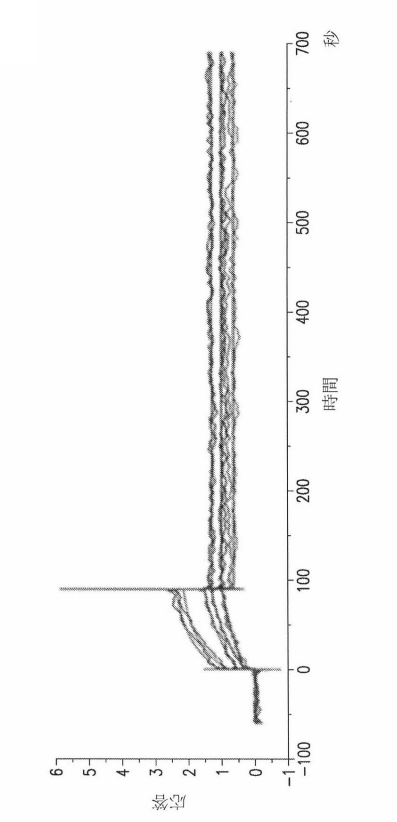
【図１２】



【図１３】



【図１４】



【図１５】

重鎖可変ドメイン
DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVASGLSLTSSSMSWVRQAPGKGLQWVSTIYSNGGTYYTDSVKGRFTISKDN
AENTLYLQMNNLKTEDTATYYCASIYYYDADYLHWYFDFWGQGALVTVSS

軽鎖可変ドメイン
EIQMTQSPTSLSASVGDRVTITCRASEGISNNLSWYQQTPGKAPKLLIYATSNLHSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQGYKWPLTFGGGTKLEIT

10

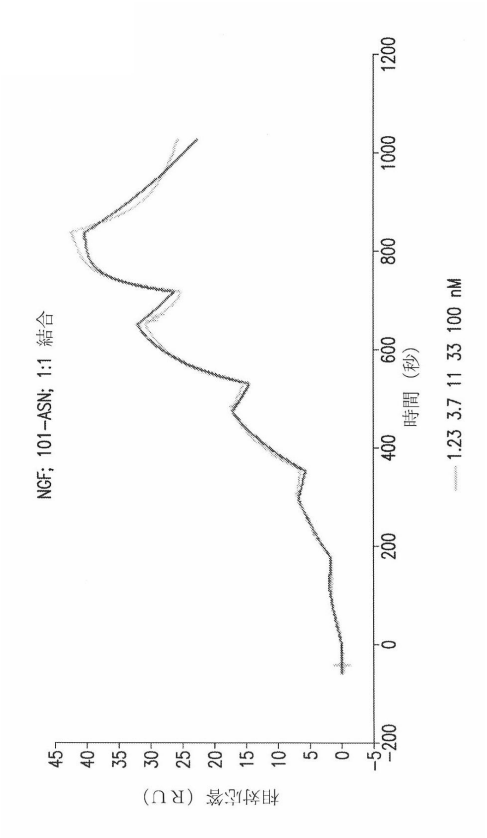
20

30

40

50

【図１６】



【図１７Ａ－１】

配列番号	クローンの名称	FR1H	CDR1H	FR2H	CDR2H
141	101	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSSS	MSWVRQAPGKGLQWVST	IYSNGGT
184	AHF17591	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSSS	MVWVRQAPGKGLQWVST	IYSNRGT
185	AHF17593	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSSS	MVWVRQAPGKGLQWVST	IYSNRGT
186	AHF17594	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSSS	MVWVRQAPGKGLQWVST	IYSNGGT
187	AHF17601	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSSS	MVWVRQAPGKGLQWVST	IYSNRGT
188	AHF17602	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSSS	MVWVRQAPGKGLQWVST	IYSNRGT
189	AHF17603	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSSS	MVWVRQAPGKGLQWVST	IYSNGGT
190	AHF17605	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSSS	MVWVRQAPGKGLQWVST	IYSNGGT
198	SC-184_76	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSDS	MSWVRQAPGKGLQWVST	LWSNGGT
200	SC-184_102	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSNS	MSWVRQAPGKGLQWVST	IWSNGGT
202	SC-184_110	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSAS	MSWVRQAPGKGLQWVST	IYSNGGT
204	SC-184_76-Arg	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSDS	MSWVRQAPGKGLQWVST	LWSNRGT
205	SC-184_102-Arg	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSNS	MSWVRQAPGKGLQWVST	IWSNRGT
206	SC-184_110-Arg	DVQLVESGGDLVKPGGSLRLTCVAS	GLSLTSAS	MSWVRQAPGKGLQWVST	IYSNRGT

【図１７Ａ－２】

（続き）

配列番号	クローンの名称	FR3H	CDR3H	FR4
141	101	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	ASIYYYDADYLHWYFDF	WGQGALVTVSS
184	AHF17591	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	ASIYYYDADYLHWYFDE	WGQGALVTVSS
185	AHF17593	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	AQIYYYDADYLHWYFDF	WGQGALVTVSS
186	AHF17594	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	ASIYYYDADYLHWYFDF	WGQGALVTVSS
187	AHF17601	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	AQIYYYDADYLHWYFDE	WGQGALVTVSS
188	AHF17602	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	ASIYYYDADYIHWYFDF	WGQGALVTVSS
189	AHF17603	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	ASIYYYDADYLHWYFDE	WGQGALVTVSS
190	AHF17605	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	AQIYYYDADYLHWYFDF	WGQGALVTVSS
198	SC-184_76	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	ASIYYYEADYLHWYFDF	WGQGALVTVSS
200	SC-184_102	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	ASIYYYEAEYLHWYFDF	WGQGALVTVSS
202	SC-184_110	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	ASIYYYEAEYLHWYFDF	WGQGALVTVSS
204	SC-184_76-Arg	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	ASIYYYEADYLHWYFDF	WGQGALVTVSS
205	SC-184_102-Arg	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	ASIYYYEAEYLHWYFDF	WGQGALVTVSS
206	SC-184_110-Arg	YYTDSVKGRFTISKDNAENTLYLQMNNLKTEDTATYYC	ASIYYYEAEYLHWYFDF	WGQGALVTVSS

【図１７Ｂ－１】

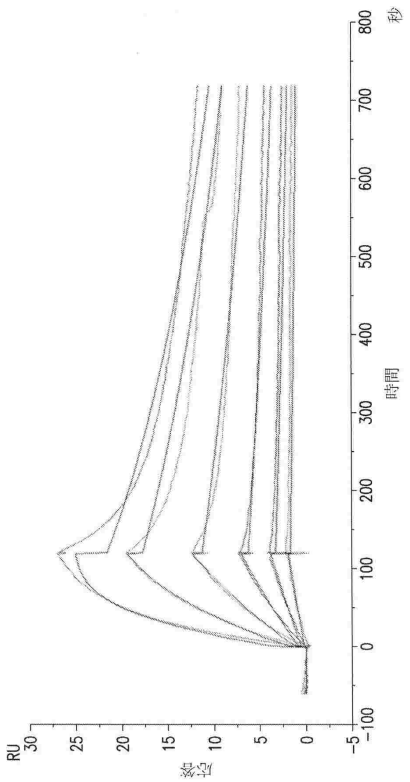
配列番号	クローンの名称	FR1L	CDR1L	FR2L	CDR2L
142	101	EIQMTQSPTSLSASVGDRVTITCRAS	EGISNN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	ATS
191	AHF17591	EIQMTQSPTSLSASVGDRVTITCRAS	EGIANN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	ATS
192	AHF17592	EIQMTQSPTSLSASVGDRVTITCRAS	EGISNN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	ATS
193	AHF17593	EIQMTQSPTSLSASVGDRVTITCRAS	EGIANN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	ATS
194	AHF17595	EIQMTQSPTSLSASVGDRVTITCRAS	EGIQNN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	ATS
195	AHF17597	EIQMTQSPTSLSASVGDRVTITCRAS	EGIQNN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	ATS
196	AHF17602	EIQMTQSPTSLSASVGDRVTITCRAS	EGIANN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	ATS
197	AHF17607	EIQMTQSPTSLSASVGDRVTITCRAS	EGISNN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	ATS
199	SC-184_76	EIQMTQSPTSLSASVGDRVTITCRAS	EGIANN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	ATS
201	SC-184_102	EIQMTQSPTSLSASVGDRVTITCRAS	KGISNN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	AQS
203	SC-184_110	EIQMTQSPTSLSASVGDRVTITCRAS	EGISKN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	ATD
199	SC-184_76-Arg	EIQMTQSPTSLSASVGDRVTITCRAS	EGIANN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	ATS
201	SC-184_102-Arg	EIQMTQSPTSLSASVGDRVTITCRAS	KGISNN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	AQS
203	SC-184_110-Arg	EIQMTQSPTSLSASVGDRVTITCRAS	EGISKN	LSWYQQTPGKAPKLLIY	ATD

【図１７Ｂ－２】

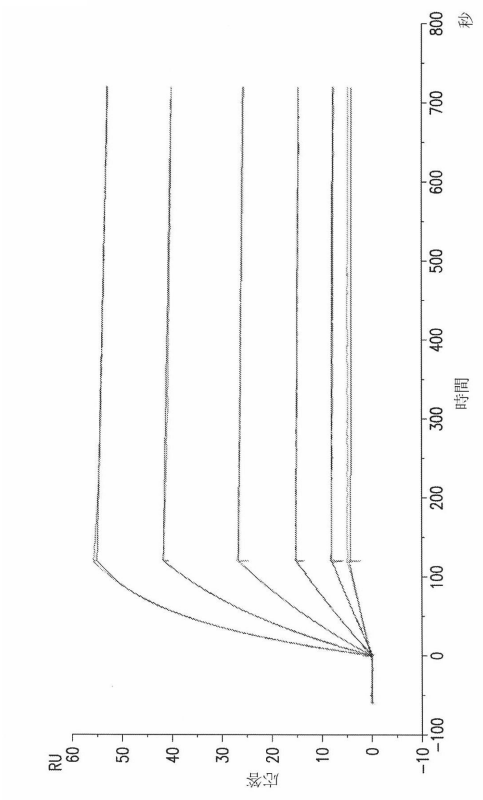
（続き）

配列番号	クローンの名称	FR3L	CDR3L	FR4L
142	101	NLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGGGTKLEIT
191	AHF17591	ILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGGGTKLEIT
192	AHF17592	VLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGGGTKLEIT
193	AHF17593	VLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGGGTKLEIT
194	AHF17595	NLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGGGTKLEIT
195	AHF17597	ILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGGGTKLEIT
196	AHF17602	NLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGGGTKLEIT
197	AHF17607	ILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGGGTKLEIT
199	SC-184_76	NLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGFKWPLT	FGGGTKLEIT
201	SC-184_102	NLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGGGTKLEIT
203	SC-184_110	NLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGWKWPLT	FGGGTKLEIT
199	SC-184_76-Arg	NLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGFKWPLT	FGGGTKLEIT
201	SC-184_102-Arg	NLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGYKWPLT	FGGGTKLEIT
203	SC-184_110-Arg	NLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGWKWPLT	FGGGTKLEIT

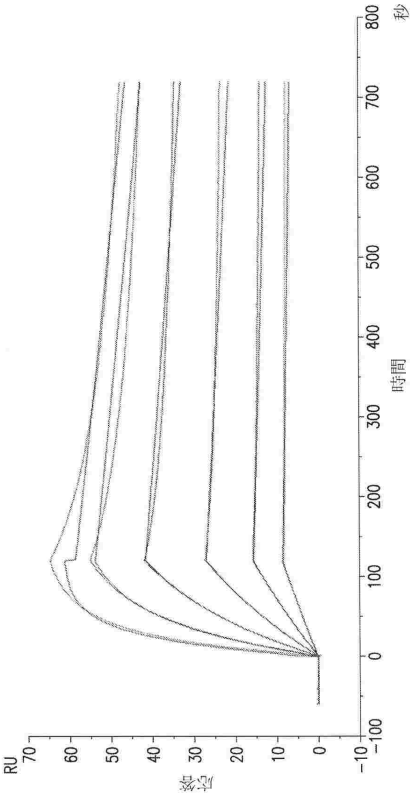
【図１８Ａ】



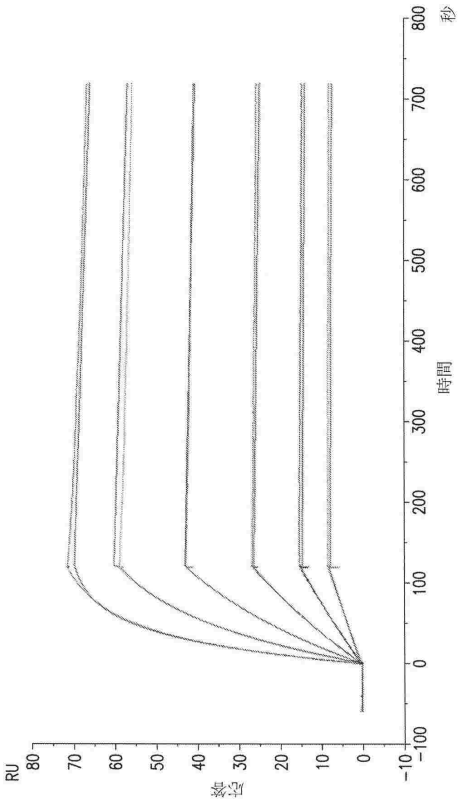
【図１８Ｂ】



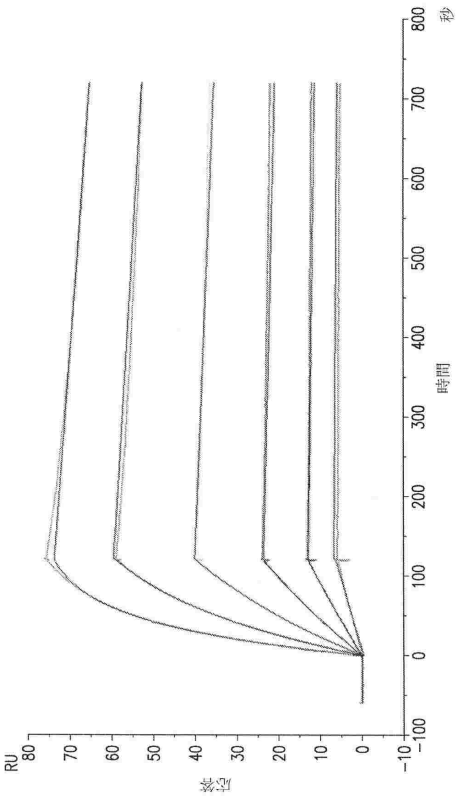
【図１８Ｃ】



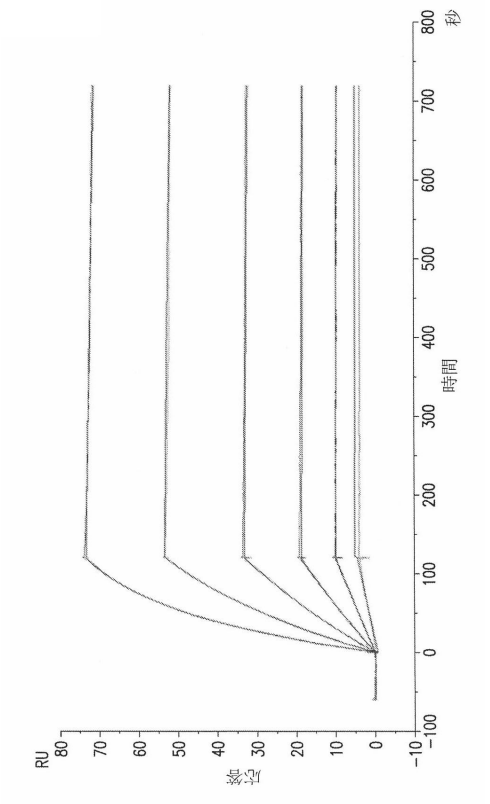
【図１８Ｄ】



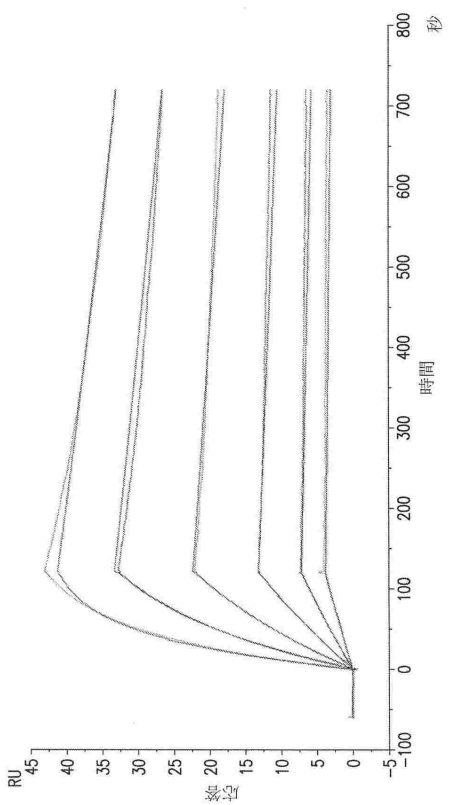
【図１８Ｅ】



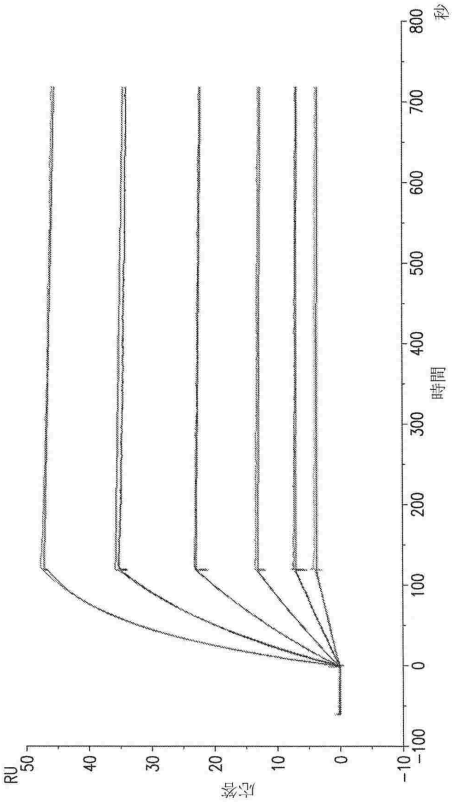
【図１８Ｆ】



【図１８Ｇ】



【図１８Ｈ】



【配列表】

2024543139000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/80428

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. A61K 39/39 (2023.01)
ADD. C07K 16/22 (2023.01)

CPC - INV. A61K 39/3955, C07K 16/2875
ADD. A61K 2039/505, C07K 2317/24, C07K 2317/565

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010/0111970 A1 (PONS et al.) 6 May 2010 (06.05.2010) Abstract	1-6
A	WO 2012/012750 A1 (TRUSTEES OF BOSTON UNIVERSITY) 26 January 2012 (26.01.2012) Claim 15; SEQ ID NO 15	1-6
A	WO 2020/092554 A1 (DELINIA, INC.) 7 May 2020 (07.05.2020) Claim 4; SEQ ID NO 455	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 February 2023	MAY 08 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Karl Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/80428

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed.

   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),

      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/80428

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 8-14, 22-37
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
—Please see continuation in first extra sheet ----------

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-6, limited to SEQ ID NOs:137 and 138

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/80428

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking.

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I+, Claims 1-7, 15-21, directed to an antigen binding protein that specifically binds to nerve growth factor (NGF). The antigen binding protein will be searched to the extent that the antigen binding protein encompasses wherein the VH-CDRs comprises SEQ ID NO:137 and the VL-CDRs comprises SEQ ID NO:138 (note, these are the first claimed sequences for the inventive antigen binding protein). The first named invention was determined based on the first fully defined VH-CDRs and VL-CDRs sequences (claim 5) for the inventive antigen binding protein embodiment. This first named invention has been selected based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines. It is believed that claims 1-6 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the antigen binding protein encompasses the VH-CDRs comprises SEQ ID NO:137 and the VL-CDRs comprises SEQ ID NO:138. Additional antigen binding protein(s) comprising additional sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected antigen binding protein(s) comprising additional sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be an antigen binding protein comprising the VH-CDRs of SEQ ID NO:1 and the VL-CDRs of SEQ ID NO:2 (claims 1-7).

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

Special technical features
The inventions of Group I+ each include the special technical feature of a unique amino acid sequence. Each amino acid sequence comprises a unique peptide, and is considered a distinct technical feature.

Common technical features

No technical features are shared between the antigen binding protein amino acid sequences in each of Group I+ inventions and, accordingly, these inventions lack unity a priori.

Additionally, even if Group I+ inventions were considered to share the technical features of including:
an antigen binding protein that specifically binds to nerve growth factor (NGF), which comprises:
(a) a heavy chain complementarity determining region 1 (VH-CDR1) comprising an amino acid sequence;
(b) a heavy chain complementarity determining region 2 (VH-CDR2) comprising an amino acid sequence;
(c) a heavy chain complementarity determining region 3 (VH-CDR3) comprising an amino acid sequence;
(d) a light chain complementarity determining region 1 (VL-CDR1) comprising an amino acid sequence
(e) a light chain complementarity determining region 2 (VL-CDR2) comprising an amino acid sequence; and (f) a light chain complementarity determining region 3 (VL-CDR3) comprising an amino acid sequence;
these shared technical features are previously disclosed by US 2010/0111970 A1 to Pons et al., (hereinafter 'Pons').

Pons teaches an antigen binding protein that specifically binds to nerve growth factor (NGF), which comprises:
(a) a heavy chain complementarity determining region 1 (VH-CDR1) comprising an amino acid sequence;
(b) a heavy chain complementarity determining region 2 (VH-CDR2) comprising an amino acid sequence;
(c) a heavy chain complementarity determining region 3 (VH-CDR3) comprising an amino acid sequence;
(d) a light chain complementarity determining region 1 (VL-CDR1) comprising an amino acid sequence
(e) a light chain complementarity determining region 2 (VL-CDR2) comprising an amino acid sequence; and (f) a light chain complementarity determining region 3 (VL-CDR3) comprising an amino acid sequence (Abstract - 'The invention concerns anti-NGF antibodies (such as anti-NGF antagonist antibodies), and polynucleotides encoding the same.'; Claim 34 - 'An isolated antibody or fragment thereof comprising
1) a heavy chain variable region comprising:
(a) the CDR1 region as shown in SEQ ID NO:3,
(b) the CDR2 region as shown in SEQ ID NO:4, and
(c) the CDR3 region as shown in SEQ ID NO:5, and
2) a light chain variable region comprising:
(a) the CDR1 region as shown in SEQ ID NO:6,
(b) the CDR2 region as shown in SEQ ID NO:7, and
(c) the CDR3 region as shown in SEQ ID NO:8,
wherein the antibody or fragment thereof binds human NGF.').

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I+ inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

Continuation of item 4 above: claims 8-14, 22-37 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*5/10*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		
Ｃ１２Ｎ	*15/06*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/06	１００	
Ｃ１２Ｎ	*15/09*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/13*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/13		
Ｃ１２Ｎ	*15/62*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/62	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/63*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	
Ａ６１Ｋ	*38/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/16		
Ａ６１Ｐ	*25/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/04		
Ｃ１２Ｎ	*15/88*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/88	Ｚ	

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

(74)代理人　100111796
弁理士　服部 博信
(74)代理人　100123766
弁理士　松田 七重
(72)発明者　ブロンディク ウィリアム
アメリカ合衆国 ０２１０８ マサチューセッツ州 ボストン ワシントン ストリート ２０１ ワン ボストン プレイス スイート ３９３０ インベテックス インコーポレイテッド内
(72)発明者　ウィリス ジョーダン
アメリカ合衆国 ０２１０８ マサチューセッツ州 ボストン ワシントン ストリート ２０１ ワン ボストン プレイス スイート ３９３０ インベテックス インコーポレイテッド内
(72)発明者　セヴィニー レイラ
アメリカ合衆国 ０２１０８ マサチューセッツ州 ボストン ワシントン ストリート ２０１ ワン ボストン プレイス スイート ３９３０ インベテックス インコーポレイテッド内

Ｆターム（参考）　4B065 AA01X AA57X AA72X AA90 AA90X AA90Y AB01 AB05 BA02 CA25 CA43 CA44
4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 DB70 NA14 ZA08
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 FA74 GA26