



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년01월28일

(11) 등록번호 10-1486085

(24) 등록일자 2015년01월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7000315

(22) 출원일자(국제) 2006년06월07일

심사청구일자 2011년06월07일

(85) 번역문제출일자 2008년01월04일

(65) 공개번호 10-2008-0026593

(43) 공개일자 2008년03월25일

(86) 국제출원번호 PCT/IT2006/000426

(87) 국제공개번호 WO 2006/131951

국제공개일자 2006년12월14일

(30) 우선권주장

RM 2005 A 000290 2005년06월07일 이탈리아(IT)

(56) 선행기술조사문헌

WO2005019266 A2

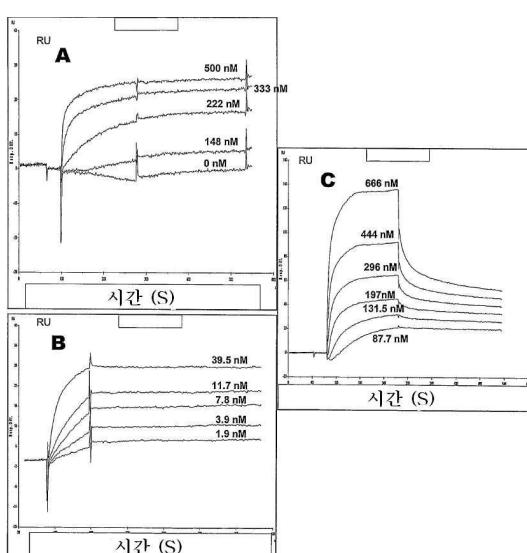
전체 청구항 수 : 총 21 항

심사관 : 박영관

(54) 발명의 명칭 연장된 효과를 가지는 진통제로서 NGF와 TrkA리셉터 사이의 결합을 억제할 수 있는 분자

(57) 요약

본 발명은 만성 통증을 치료 및/또는 예방하기 위한 약제의 제조를 위한 TrkA의 생리적 활성을 막을 수 있는, NGF와 TrkA 사이의 결합을 억제할 수 있는 항-NGF 항체의 용도로 제공한다.

대 표 도 - 도1

(72) 발명자

카타네오, 안토니노

이탈리아 로마 I-00128 비아 디 캐스틀 로마노 100
래이라인제노믹스 에스.피.에이. 내

우꼴리니, 가브리엘

이탈리아 로마 I-00128 비아 디 캐스틀 로마노 100
래이라인제노믹스 에스.피.에이. 내

특허청구의 범위

청구항 1

활성성분으로서 NGF와 TrkA 사이의 결합을 억제할 수 있는 항-NGF IgG4 이소타입 항체를 함유하는, 만성 통증의 치료 및/또는 예방용 약제로서,

상기 항체의 경쇄 가변 영역은 다음의 서열들을 갖는 세 개의 상보성 결정 영역들(CDRs) 전부를 포함하고: SEQ ID No.1의 아미노산 24 내지 아미노산 34; SEQ ID No.1의 아미노산 50 내지 아미노산 56; 및 SEQ ID No.1의 아미노산 89 내지 아미노산 97, 그리고

상기 항체의 중쇄 가변 영역은 다음의 서열들을 갖는 세 개의 상보성 결정 영역들(CDRs) 전부를 포함하는 약제: SEQ ID No.2의 아미노산 26 내지 아미노산 35; SEQ ID No.2의 아미노산 50 내지 아미노산 65; 및 SEQ ID No.2의 아미노산 98 내지 아미노산 111.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체는 인간 혹은 랫트 NGF의 아미노산 41-49 영역: EVNINNSVF(SEQ ID No. 9)을 함유하는 NGF 분자 도메인을 인식하고 그에 결합할 수 있는 것인 약제.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체는 아미노산 23-35 영역: GDKTTATDIKGKE(SEQ ID No. 10)을 함유하는 NGF 분자 도메인을 인식하고 그에 결합할 수 있는 것인 약제.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체는 TrkA의 생리적 활성을 차단할 수 있는 것인 약제.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체 경쇄의 가변 영역은 SEQ ID No.1의 서열을 포함하는 것인 약제.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체 중쇄의 가변 영역은 SEQ ID No.2의 서열을 포함하는 것인 약제.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체는 단쇄 형태이고, 연결자에 의해 결합된 경쇄 가변 영역과 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인 약제.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체는 두 개의 경쇄 및 두 개의 중쇄를 포함하는 것인 약제.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항-NGF 항체는 인간 혹은 인간화 항체인 것인 약제.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 인간화 항체 경쇄의 가변 영역은 SEQ ID No.3의 서열을 포함하는 것인 약제.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 인간화 항체 중쇄의 가변 영역은 SEQ ID No.4의 서열을 포함하는 것인 약제.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 인간화 항체 경쇄는 SEQ ID No.8의 서열을 포함하는 것인 약제.

청구항 19

제15항에 있어서, 상기 인간화 항체 중쇄는 SEQ ID No.5, SEQ ID No.6, SEQ ID No.7로부터 선택되는 서열을 갖는 것인 약제.

청구항 20

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 통증은 만성 염증성 타입인 것인 약제.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 만성 통증은 췌장염, 신장결석, 두통, 생리통, 근육통, 염좌, 복강 통증, 난소 포낭, 전립선염, 방광염, 간질성 방광염, 수술 후 동통, 편두통, 삼차신경통, 화상 및/또는 상처에 의한 통증, 외상과 관련된 통증, 신경병증성 통증, 근골육계 질환과 관련된 통증, 류마티스 관절염, 골관절염, 강직성 척추염, 관절주위의 질병, 종양성 통증, 글 전이에 의한 통증, HIV에 의한 통증에 기인한 것인 약제.

청구항 22

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 통증은 신경병증성 통증인 약제.

청구항 23

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 통증은 종양성 통증인 약제.

청구항 24

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체는 긴 활성 지속시간을 갖는 것인 약제.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 항체의 긴 활성 지속시간이 약제의 투여 후 1주 이상 분명히 나타나는 것인 약제.

청구항 26

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체는 주 1회 이하의 주기로 투여되는 것인 약제.

청구항 27

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체는 4주당 1회 이하의 주기로 투여되는 것인 약제.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 NGF와 이것의 TrkA 리셉터 간의 결합을 저해할 수 있는 분자의 용도에 관한 것이다. 특히 본 발명은 NGF의 생물적 활성을 막는 것에 의해 진통제의 연장된 효과를 갖는 두 개의 분자 중 하나에 대한 항체에 관한 것이다. 이의 지속적인 진통 효과 때문에, 이들은 비록 신경병증성 혹은 종양성 통증에 제한되지는 않으나 이러한 통증과 같은 만성 통증으로 알려진 통증의 지속적인 양상을 갖는 병리에 대해 이로운 치료법이다.

배경기술

[0002] 연수에 구심성인 침해수용성 신호는, 이들(1차 감각 뉴런)의 세포체가 척수 후근 신경절(DRG)에 위치한, Aδ 및 C 섬유들에 의해 전달된다. 1차 감각 뉴론은 흥분 전달물질로서 ATP와 함께 글루타메이트와 P와 CGRP(Calcitonin-gene-related-peptide)와 같은 다양한 다른 물질들을 방출한다(Hunt and Mantyh, 2001). 이러한 흥분전달 물질의 방출은 캡사이신(vanilloid receptor, VR1)에 민감한 것, GABA에 의해 활성화되는 것, ATP 자체에 의해 활성화되는 것 및 칸나비노이드(CB1)에 의해 활성화되는 것을 포함하여 구심 신경 말단에 존재하는 리셉터의 여러 계열에 의해 조절된다(Sivilotti and Nistri, 1991; Hunt and Mantyh, 2001; Khakh, 2001; Morisset et al., 2001). 만성 통증이 발생하는 병태생리학적 기작의 하나가 이질 통(alldynia), 즉, 일반적으로 아프지 않은 자극의 통각으로의 변형을 말한다. 이 현상은 캡사이신 리셉터인 VR1 및 ATP에 대한 이오노트 롱 리셉터를 포함하는, 다양한 이온 흐름과 이로 인한 "리간드-게이트(ligand-gated)" 타입의 다양한 채널을 포함한다(Khakh, 2001). 척수의 침해수용성 개재뉴런에서 ATP에 대한 리셉터와 VR1에 대한 리셉터의 동시 활성은 통증적 자극의 전달을 보강하는 것으로 흥분성 시냅스 신호의 상당한 축적을 야기했다(Nakatsuka et al., 2002). 그러므로 이것을 기반으로, ATP 리셉터(특히 P2X3 계통에 속하는 리셉터들)가 통증 경로에서 기본적인 역할을 수행하는 것이 명확하다(Burnstock, 2001). 이러한 리셉터는 통증유발성 자극에 의해 활성화되는 말초신경 말단, DRGs의 뉴론 세포체 및 이의 시냅스 앞부분 말단, 및 천연적으로 연수의 시냅스 후부의 말단에 존재한다(Khakh, 2001). 신경성장인자(NGF)와 이의 고친화 리셉터, TrkA(Levi-Montalcini, 1987; Levi-Montalcini et al., 1996; Fraude and Barde, 1998; 1998)에 의해 구성된 시스템이 "지속적인" 통증의 주요 양상을 기본으로 하는 분자 과정에서 기초적인 역할을 수행한다는 것을 보여주는 상당한 증거가 있다. 이것은 NGF/TrkA 시스템을 막는 항체에 대한 주요 치료 부분(특히 "tonic" 형태라는 통증의 하나)을 가리킨다(Levine, 1998). 신경 침해수용성 뉴런의 발달은 NGF에 많이 의존하고, 성인 침해수용성의 반응들이 같은 인자에 의해 조절된다(Julius and Vasbaum, 2001). 특히, NGF는 캡사이신 통증유발성 자극의 급성 감작을 일으킨다(Shu and Mendell, 1999). 기능적 관점에서 부터, 만성 염증에 이어, 침해수용성 뉴론은 그들의 활성 전위의 빈도 및 지속시간의 변화를 진행시킨다. 만성통증 상태의 전형인 과홍분의 상당한 감소를 이끄는 내인성 NGF를 막아 이러한 현상을 억제한다(Djouhri et al., 2001). 성인 침해수용기에서 통증 역치를 정의하는데 있어 NGF 활성은 TrkA 리셉터에 의해, 또한 침해수용성 말단에 존재하는 VR1 리셉터에 의해 매개되는 반응의 조절을 통해 매개된다. VR1 반응의 TrkA 의존성 상승작용은 포스포리파제 C의 감마 모델의 세포내 형질도입(transduction)통로를 통해 나타나는 것으로 생각된다(PLCgamma, Chuang et al., 2001). 말초 NGF의 수준은 염증과정에서 증가하는 반면, 외인성 NGF의 투여는 랙트에서는 통각과민효과를 가지고 인간에게는 근육통을 야기한다. 더욱이, NGF는 일반적으로 인간 및 포유동물에서 열 자극에 대한 과민성을 야기했다. NGF는 거대세포, 섬유아세포, 및 염증과정이 일어나는 말초부분의 다른 세포 타입에 의해 방출된다. 특히 거대세포는 기본적인 역할을 수행하는 것 같다(Woolf et al., 1996). 이러한 세포가 NGF를 생산하고 동시에 그들 세포 표면에서 기능성 TrkA 리셉터를 발현하므로(Nilsson et al., 1997), 이들은 라이소포스파티딜세린의 존재하에 NGF 그 자체에 반응할 수 있다(Horigome et al., 1993; Kawamoto et al., 2002). 그 결과 NGF/TrkA 시스템은 통증유발 염증 신호의 국부적 증폭을 허용하는 양성피드백(autocrine) 기작을 통하여 거대세포 활성을 매개하는 것 같다.

[0003] 높은 수준의 NGF는 또한 뉴론에서도 발견되는데, 이 neurotropin은 통증에 연관된 신경섬유의 변형에 확실히 책임이 있다(Harpf et al., 2002). 어떤 형태의 암에서, 과도한 NGF는 종양성 통증을 야기하는 신경섬유의 성장 및 침윤을 촉진한다(Zhu et al., 1999). 최근 실험적 연구에서 NGF를 막는 것에 의해, 손상된 뉴론의 세포체를 손상하지 않고, 신경병증성 통증에 책임이 있는 신경종의 형성을 상당히 줄일 수 있음을 보여주었다(Kryger et al., 2001). 이러한 결과는 만성 통증의 치료를 위한 NGF의 효과의 감소를 기반으로 한 치료 접근 방법에 중요한 관심을 이끌어 내었다(Saragovi and Gehring, 2000). 최근, 통증 도입의 분자적 과정에서 NGF/TrkA 시스템

의 수반은 유전적인 토대에서 또한 증명되어 왔다. 특히, (염색체 1q21-q22에 위치하는)TrkA 유전자의 돌연변이 는 CIPA("congenital insensitivity to pain with anhydrosis")로 알려진 유전성 열성 상염색체 중후군을 담당 한다. CIPA는 재관류성 일시적인 열, 발한장애, 통증 유발 자극 반응 결손, 정신 지체와 자해의 경향을 갖는 것이 특징이다(Indo et al., 1996; Saragovi and Gehring, 2000; Indo, 2001; Indo et al., 2001). 침해수용성 반응에서 NGF의 수반인 추가적으로 확인된 것은 최근 항-NGF 유전자 도입 랫트(AD11)의 표현형 특성에 대한 작업으로 얻어졌다. 이러한 동물에서 항-NGF 항체 α D11의 이소형 발현은 성인에서 NGF의 기능적 차단을 발생시킨다. 이 차단은 일관된 방식에서 해로운 열 자극에 대한 반응의 잠복기 증가로 해석된다(Capsoni et al., 2000; Ruberti et al., 2000). 리간드나 리셉터를 막음으로써 NGF/TrkA 시스템의 생물학적 활성을 중화할 수 있는 항체들은 통증 치료에서, 특히 지속적 형태의 통증에서 중요한 요인으로 나타날 수 있다. 이러한 상황에서 가장 최근의 발표물은 항-NGF 항체를 중화하는 것으로 치료하는 것이 젖과 동물의 종양학적 통증 모델에서 상당한 통증의 감소를 야기한다는 것을 나타낸다(Sevcik et al., 2005). 그럼에도 불구하고, Sevcik et al에 의하여 사용된 투여 프로토콜에서 항-NGF의 마지막 주입과 행동 관찰 사이의 최대 지연시간은 4일을 초과하지 않아, 이것은 장기적인 효과가 없다.

[0004] 장기적인 효과는 항체의 마지막 투여 후, 최소 1~2주 동안 지속적으로 확인되는 효과로서 항체 그 자체의 효과 및 혈류농도 간 상호작용이 필요 없음을 의미하는 것으로 정의될 수 있다. 장기적인 효과는 새로운 유전자 발현을 요구할 수 있고 원래의 병태생리학적 상태의 반영구적이거나 연장된 변형을 나타낼 수 있다. 많은 사례에서, 장기간의 효과를 낼 수 있는 약제는 "질병-변형적" 활성 원리로 정의될 수 있는데, 다시 말해 증상에 대해 단순한 약물학적 효과를 나타내는 제품과는 다르게, 병의 경과를 철저하게 개조할 수 있다는 것이다.

[0005] 본 발명자들은 TrkA 리간드에 의해 매개되는 NGF의 생리적 효과를 막을 수 있는 (NGF 리간드에 대한)항체의 패널을 처리했다. 두 개의 시약: α D11(항-NGF) 및 MNAC13 (항-TrkA)이 특히 흥미롭다. 하나는 리간드에 대한 항체와 리셉터에 대한 나머지 항체인 이 두 항체 간의 비교는, NGF 리간드의 저해제가 TrkA 리셉터의 억제에 기능적으로 동등하지 않기 때문에 상당히 중요하다. 사실상 세 가지 점을 고려해야 한다:

[0006] i) 같은 시스템의 맥락에서, 화학량적 근거인 리간드 및 리셉터의 유용성은 시간에 따라, 다른 식으로 다양하고, 상당히 다를 수 있다.

[0007] ii) 모든 신경성장인자에 의해 나누어지고, TrkA에 대한 명확한 생리적 기능을 매개하는 NGF (p75)에 대한 두번 째 리셉터 존재(Hempstead, 2002);

[0008] iii) 생리활성의 면에서 독특한 성질과 바람직하게 p75 리셉터에 결합되는 것으로 특성화되는 천연적으로 NGF (pre-pro-NGF)의 "미성숙" 형태로의 존재(Lee et al., 2001).

[0009] α D11은 마우스 NGF에 대한 랫트 단일클론의 항체이다(그러나 랫트 및 인간의 NGF도 인식할 수 있음). NGF와 이것의 상호작용은 생리적 활성을 막아 TrkA와의 결합을 억제할 수 있다(Cattaneo et al., 1988). α D11 역시 p75 리셉터로의 NGF의 결합을 억제한다. 이 항-NGF 항체는 인 비트로(*in vitro*) 및 인 비보(*in vivo*) 둘 다에서 보여진, 항원(picomolar)과의 결합에 대한 친화성 및 중성화 특성을 통해 (모든 신경성장 인자와 비교하여)이 항원과의 결합의 특이성 면에서 절대적으로 독특하다(Cattaneo et al., 1988; Berardi et al., 1994; Molnar et al., 1997; Molnar et al., 1998). 알파D11 에피토프는 분자의 바깥 부분에 노출되어 있고, 공간적으로 서로 매우 근접한 NGF 루프 I 및/또는 NGF 루프 II의 레벨에 있다. 더욱이 다른 종에서 알파D11의 보존된 반응성은 이러한 두 개의 루프의 아미노산 잔기가 많이 보존되어 있기 때문에 에피토프 할당과 일치한다. 알파D11의 강력한 중화 활성은 인지된 에피토프가 NGF 리셉터 결합 부위에 매우 근접함을 나타낸다. 더욱이 신경성장인자군의 다른 구성원의 알파D11의 교차 반응성의 부족은 다음을 제시한다: i) 에피토프는 다른 신경성장인자와 공유하지 않는 NGF 영역에 위치한다, ii) 에피토프 그 자체는 NGF-TrkA 인지를 매개하는 "특성화 경로 (specificity path)"에 포함될 수 있다. NGF 분자상에서 알파D11 항체에 의해 인지된 에피토프는 NGF 돌연변이체의 광범위한 패널에 대한 항체의 결합 활성을 테스트하여 확인하였다. 이 조직적인 선별을 기본으로, NGF 분자의 영역(aa.41-49, 루프 I)은 NGF 분자의 꼭대기에서 높게 발현되고 항원에 대한 항체의 결합의 (비록 배타적 이지는 않지만)원인이 되는 것으로 확인이 되었다(Gonfloni, 1995). 사실상 NGF aa. 영역 23-35(루프II) 역시 이 결합에 기여할 수 있다.

[0010] MNAC13 항체는 인간 TrkA 리셉터에 대한 마우스 단일클론성 항체로(Cattaneo et al., 1999; Pesavento et al., 2000), 즉, 인 비트로와 인 비보 모두에서 NGF에 의한 TrkA 활성화 과정의 억제와 하류의 생리적 기능의 억제에 서 특히 효과적이다(Cattaneo et al., 1999; Pesavento et al., 2000). 항체는 구조 면에서(Covaceuszach et

al., 2001), 그리고 TrkA 리셉터와의 분자적 상호작용에서 상세히 특성화되었다(Covaceuszach et al., 2005).

[0011] 이러한 구조에 관한 깊이있는 지식을 기반으로 혁신적인 방법에 의하여, 모체 변형물과 같은 항원 결합 특성을 나타내는 α D11 및 MNAC13의 인간화 변형물(Hu- α D11 및 Hu-MNAC13)이 만들어졌다(특허 출원 WO 05/061540).

[0012] 신경병성 기원(1차 병변 혹은 신경계의 기능장애에 기인함, 예를 들어, 연수의 병변에 의한 통증)의 통증을 치료하고, 종양적 통증을 치료하고, 그리고 (역시 염증성 특징의) 지속적인 통증의 수많은 다른 형태에 대해 현재 유용한 치료법은 제한적인 효과가 있음을 발견하였다. 그러므로 부작용과 관련된 문제를 해결하기 위해 진통제 활성을 가지고 있으면서, 현재 사용되는 진통제와 비교하여 다른 기작을 통해 작용하는 새로운 분자를 확인하고 개발할 명백한 필요성이 있다. 국제 특허 출원 WO 02/20479는 강력한 진통제 활성을 가지는, TrkA 리셉터를 억제하는 작은 합성 분자를 개시한다. 그럼에도 불구하고, 특정 통증 모델에서 이러한 분자의 효과가 증명되지 않았다. 더욱이 항체와 비교하여 작은 분자는 심각한 부작용을 일으킬 수 있는 해마토엔세팔릭(haematoencephalic) 막에 쉽게 침투하는 결점이 있다. 사실 알츠하이머를 포함한(Saper et al., 1985) 진행성 신경퇴화의 다양한 형태에 의해 영향을 받는 신경성 개체인 전뇌기저부의 콜린성 뉴론은 TrkA 리셉터를 발현하고 정확한 기능을 위해 NGF에 의존한다(Holtzman et al., 1992). 국제 특허출원 WO 01/78698은 신경병성 혹은 종양성 통증을 제외한, 만성 복통을 치료하거나 예방하기 위한 NGF 길항제의 사용을 제안하였다. 비록 상기 출원은 길항제가 NGF와 TrkA 리셉터 둘 다에 결합할 수 있다고 기재하고 있지만, 이것은 길항제가 TrkA 리셉터에 결합할 때, 이 리셉터가 기능적으로 차단된다는 것을 증명하는 것은 아니다. NGF/TrkA의 생리적 활성을 막는 두 개의 항체 MNAC13과 α D11의 능력을 기반으로 하여, 두 개의 항체 MNAC13 및 α D11 그리고 이들 각각의 인간화 변형물은 지속적인 통증의 다양한(설치류) 동물 모델, 특히 신경병적 특성의 만성 통증의 평가에 유용한 모델 중 하나인 모델 CCI("만성 협색 장애(Chronic Constriction Injury)", 좌골 신경의 만성 협색증)에서 실험되었다(Bennett and Xie, 1988).

발명의 상세한 설명

[0013] 본 발명의 목적은 만성 통증 치료를 위한 약제의 제조를 위한, NGF와 TrkA간의 결합을 억제할 수 있는 항-NGF의 용도이다.

[0014] TrkA의 생리적 활성을 막는 항-NGF 분자는 TrkA 리셉터와 결합하는 NGF의 관점에서 길항제로서 작용하는 분자로 정의되며 다음을 포함한다 : 합성 분자 또는 단일클론성의 항체 또는 이들의 생리적/합성 유도체로서:

[0015] i) TrkA에 결합하는 것;

[0016] ii) 살아있는 세포의 표면에 발현되는 "선천적(native)" TrkA 리셉터에 대한 NGF의 결합을 억제하는 것 ("선천적"이란 의미는 "인 비보 형태에서 자연적으로"); 및

[0017] iii) 같은 TrkA 리셉터와 NGF 결합으로부터 유래하는 생리적 활성을 차단하는 것.

[0018] "생리적 활성을 차단하는"이라는 용어는 "활성" 상태로 리셉터 그 자체가 전환되는 과정을 차단하는 것으로 정의되는, 단순히 리셉터의 활성을 막는다는 것뿐만 아니라, 활성 과정의 하류로 향하는 생리적 결과의 기능적 중화: 제 2 메신저, 새로운 유전자 발현, 표현형적 기능적 변형을 의미한다. 이 분자는 고전적인 인 비트로 테스트(PC12 세포에서 신경염 성장의 테스트) 뿐만 아니라 인 비보 테스트(기저전뇌의 콜린성 뉴론의 기능적 차단과 고전적 "hot plate" 테스트에서 침해수용의 차단)에서도 TrkA를 차단할 수 있다.

[0019] 본 발명의 목적은 만성 통증을 치료 및/또는 예방하기 위한 약제의 제조를 위한, NGF와 TrkA 사이의 결합을 억제할 수 있는 항-NGF 항체의 용도이다. 바람직하기는, 항체는 인간이나 랫트 NGF의 aa.41-49 영역 EVNNINNSVF(SEQ ID No.9)을 포함하는 NGF 분자 도메인을 인지하여 결합할 수 있고, 더 바람직하기는 이 도메인이 또한 aa 23-35 영역 GDKTTATDIKGKE(SEQ ID No.10)을 포함하는 것이다. 더 바람직하기는, 상기 항체가 TrkA의 생리적 활성을 차단할 수 있는 것이다.

[0020] 본 발명의 한 면에 따르면, 개체의 만성통증을 치료 및/또는 예방하기 위하여 항-NGF 항체의 유효량을 상기 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체의 만성통증을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 개체의 만성통증을 치료 및/또는 예방하기 위하여 만성통증을 치료 및/또는 예방할 필요가 있는 개체에 항-NGF 항체를 포함하는 조성물을 투여를 지도하는 지침서와 함께 상기 조성물을 포함하는 키트(kit)를 제공한다.

[0021] 바람직한 면에 있어서 항체 경쇄의 가변 영역은 SEQ ID No. 1의 aa.34; SEQ ID No. 1의 aa.50에서

aa.56; SEQ ID No. 1의 aa.89에서 aa.97로 부터 선택되는 서열을 갖는 상보성 결정 영역(CDRs) 중 적어도 하나, 더 바람직하게는 두 개, 가장 바람직하게는 세 개를 포함한다.

[0022]

추가의 바람직한 면에 있어서, 항체 경쇄의 가변 영역은 본질적으로 SEQ ID No.1의 서열을 포함한다.

(VL, SEQ ID NO. 1):

<u>L CDR1</u>	<u>L CDR2</u>
<u>DIQMTQSPASLSASLGETVTIECRASEDIYNALAWYQQKPGKSPQLLIYNTDTLHTGVP</u>	
<u>L CDR3</u>	
<u>SRFSGSGSGTQYSLKINSLOSEDVASYFCQHYFHYPRTFGGGTKLELK</u>	

[0023]

바람직한 면에 있어서, 항체 중쇄의 가변 영역은 SEQ ID No. 2의 aa.26에서 aa.35; SEQ ID No.2의 aa.50에서 aa.65; SEQ ID No.2의 aa.98에서 aa.111로 부터 선택되는 서열을 갖는 상보성 결정 영역(CDRs) 중 적어도 하나, 더 바람직하게는 두 개, 가장 바람직하게는 세 개를 포함한다.

[0024]

추가의 바람직한 면에 있어서, 항체 중쇄의 가변 영역은 본질적으로 SEQ ID No.2의 서열을 포함한다.

(VH, SEQ ID NO 2):

<u>H CDR1</u>	<u>H CDR2</u>
<u>QVQLKESGPGLVQPSQTLSLTCTVSGFSLTNNNVNWVRQATGRGLEWMGGVWAGGATDY</u>	
<u>H CDR3</u>	
<u>NSALKSRLTITRDTSKSQVFLKMHSLOSEDTATYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGTTV</u>	

TVSA

항체는 단쇄(single chain) 형태일 수 있고, 연결자(linker)에 의해 결합되는 경쇄 가변 영역과 중쇄 가변 영역을 포함한다.

선택적으로, 항체는 두 개의 경쇄 및 두 개의 중쇄를 포함할 수 있다.

본 발명의 바람직한 면에서, 항-NGF 항체는 인간 또는 인간화된 항체이다. 당업자는 항체를 디자인하기 위해 적절한 인간화 방법을 선택하여야 하며, 바람직한 방법은 WO 2005/061540에 개시된 방법이다.

간단히 말해, 항체 가변 영역의 "인간화된" 변형물은 인간 면역 글로불린 구조에 랫트 항체의 상보성 결정 영역을 이식하여 얻어졌다. aD11 항체의 Fab 단편에 관한 X-ray 회절 연구로부터 얻어진 완벽한 구조적 정보는 인간 기원의 수용체(acceptor)구조를 선택하는데 공헌하였다. 두 개의 다른 기준은 랫트 aD11 및 수용체 인간 항체 사이의 구조적 차이를 최소화하도록 채택되었다: 1) 일차 구조 상동성 수준, 2) 3차원 구조 유사성 수준. 구조를 선택한 후 랫트 대응물에 의한 인간 잔기의 대체가 얻어진 인간화 항체의 잠재적 면역원성을 낮추기 위해 최소화되었다.

전형적인 인간화 항체는 SEQ ID No 1(랫트 기원 서열)의 인간화 유도체인 경쇄 가변 영역을 포함한다. 전형적인 인간화 항체는 SEQ ID No 2(랫트 기원 서열)의 인간화 유도체인 중쇄 가변 영역을 포함한다.

본 발명의 바람직한 면에 있어서, 인간화 항체 경쇄의 가변 영역은 SEQ ID No. 3의 서열을 본질적으로 포함한다.

SEQ ID NO 3 (VL, Hu-aD11의 경쇄의 가변 영역)

<u>L CDR1</u>	<u>L CDR2</u>
<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVТИTCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVP</u>	
<u>L CDR3</u>	
<u>SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGTTKVEIK</u>	

[0033]

[0034] 인간화 항체 중쇄의 가변 영역은 SEQ ID No.4의 서열을 본질적으로 포함한다.

SEQ ID NO 4 (VH, Hu-aD11의 중쇄의 가변 영역)

H CDR1 H CDR2
EVQLVESGGGLVQP~~GGSLRLSCAASGFSLTNNNVNVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDY~~
H CDR3
NSALKSRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGTLV

TVSS

[0035]

[0036] 상기한 인간화 가변 영역은 인간 IgG1이나 IgG4 아이소타입 형태의 적절한 발현 벡터로 클론되었고 발현, 정제, 및 약물학적 특성화를 준비하기 위해 포유동물 세포주로 트랜스펙션 되었다.

[0037] Hu-aD11의 다른 변형물(완전한 IgG: 중쇄 + 경쇄)이 최종적으로 생성되었다(다른 불변부분 때문에 구별됨).

[0038] 본 발명의 바람직한 면에 있어서, 인간화 항체 경쇄의 가변 영역은 SEQ ID No 8의 서열을 본질적으로 가진다.

SEQ ID NO.8, Hu-aD11 Vk 인간 Ck

**DIQMTQSP~~S~~SLASVGDRVITC~~R~~A~~E~~D~~I~~Y~~N~~ALAWYQQKPGKA~~P~~KLLIY~~N~~T~~D~~TLHTGV~~P~~
 SRFSGSGSGT~~D~~Y~~T~~L~~T~~IS~~S~~LQ~~P~~E~~D~~F~~A~~T~~Y~~FC~~Q~~H~~Y~~F~~H~~Y~~P~~R~~T~~F~~G~~Q~~G~~T~~K~~V~~E~~I~~K~~R~~T~~V~~A~~A~~P~~S~~V~~F~~I~~
 PPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
 TLTLSKADY~~E~~KHKVYACEVTHQGLSSPVT~~K~~S~~F~~NRGEC**

(이탈리체 = 가변영역; 진한부분 = 인간화 과정에서 랫트 서열의 돌연변이; 밑줄부분 = CDRs)

[0039]

[0040] 바람직한 구체예에서, 인간화 항-NGF 중쇄는 본질적으로 다음 3개의 서열 중 하나를 갖는다.

SEQ ID NO.5, Hu- 항 NGF (VH) 인간 IgG1

**EVQLVESGGGLVQP~~GGSLRLSCAASGFSLTNNNVNVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDY~~
 NSALKSRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGTLV
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA~~L~~GCLVKDYFPEPVTVWSN~~G~~ALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH~~T~~C~~P~~CPA
 PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV~~K~~FNWYVDGVEVHN~~A~~KT~~K~~
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
 TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT~~P~~VLSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

[0041]

SEQ ID NO 6, Hu-aD11 (VH) 인간 IgG* (Bolt et al., 1993에 개시된 N297A 돌연변이를 갖는 IgG1)

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWRQAPGKGLEWVGWAGGATDY
NSALKSRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGTLV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKVDKRVEPKSCDKTHCPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPDKTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREGQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

[0042]

SEQ ID NO 7, Hu-aD11 (VH) 인간 IgG4

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWRQAPGKGLEWVGWAGGATDY
NSALKSRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGTLV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEF
LGGPSVFLFPPKPDKTLMSRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREGQVYTL
PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLT
VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK**

(이탈릭체=가변영역; 진한부분=인간화 과정에서 랫트 서열의 돌연변이; 밑줄부분=CDRs; 당화부위를 파괴하기 위한 N297A 돌연변이)

[0043]

바람직한 면에서, 본 발명의 분자는, 바람직하기는, 체장염, 신장결석, 두통, 월경불순, 근골격 통증, 염좌, 복부 통증, 난소낭포, 전립선염, 방광염, 간질성 방광염, 수술 후 통증, 편두통, 삼차신경통, 화상 및/또는 상처로 인한 통증, 외상과 관련된 통증, 신경병증성 통증, 근골격계 질환과 관련된 통증, 류마티스 관절염, 골관절염, 강직성 척추염, 관절주위의 질병, 종양성 통증, 골 전이에 의한 통, HIV에 의한 통증으로부터 유발되는 만성 염증 타입의 통증을 위한 약제의 제조를 위해 사용된다.

[0045]

선택적으로, 상기 통증은 신경병증성 통증이나 종양성 통증이다.

[0046]

International Association for the Study of Pain(IASP, www.iasp-pain.org)에 따르면, 통증은 일반적으로 "실질적 또는 잠재적 조직 손상과 관련되거나, 또는 그러한 손상이나 양자 모두의 면으로 설명되는 불쾌한 감각적 그리고 감정적인 경험"으로 정의된다. 통증의 모든 형태에서 기본적인 요소는 잠재적 조직 손상의 유기체를 경고하는 특수화된 높은 역치(threshold) 리셉터 및 신경 섬유의 활성이다. 염증 세포의 관여 및 과정은 많은 통증 상태에서 일반적인 요소이다. "급성 통증"이라는 용어는 즉각적인 일반적으로 높은 역치로 절단, 압박, 화상 혹은 화학적 자극과 같은 상처에 의한 일어나는 통증을 의미한다. 여기에서 사용된 "만성 통증"이라는 용어는 급성 통증 이외의 통증을 의미한다. 만성통증은 종종 상대적으로 길게, 예를 들어 몇 달 혹은 몇 년 동안 지속되고, 지속적이거나 간헐적일 수 있는 것으로 이해된다.

[0047]

항-NGF 항체는 적절하게 전신적으로 투여된다. 항-NGF 항체의 전신적 투여는 주사, 예를 들어 지속적인 정맥 투여, 약제 정맥 투여, 피하 혹은 정맥내 주사에 의해 수행될 수 있다. 선택적으로, 투여의 다른 형태(예를 들어, 구강, 접막, 흡입, 혀아래 등등) 역시 사용될 수 있다. 항체의 국부 전달은, 예를 들어 병에 걸린 조직의 부근에 관절 강내 투여 혹은 피하, 근육 내 주사와 같은 국부 투여에 의해 수행될 수 있다.

[0048]

항-NGF 항체는 의도한 투여 경로에 적합한 약제학적 조성물로 적절하게 제형화될 것이다. 투여용 용액은 적절한 완충액과 물농도 변형제, 예를 들어 인산염, 염 및/혹은 텍스트로즈가 함유된 수용성 매질(예를 들어 투여용

물)에 녹거나 혹은 분산된 항체를 적절히 함유할 것이다.

[0049] 치료 처방계획, 즉 투여량, 타이밍과 반복은 선택된 투여 경로에 의해 단일 혹은 반복된 투여(예를 들어, 주사)로 나타낼 수 있다. 약제 투여 간격은 임상 반응의 범위와 기간뿐만 아니라 특정 개인과 개인적 임상 기록이 변형될 수 있다. 적절하게는, 항-NGF 항체는 장기간 지속적인 활성을 갖는다. 특히 항체의 임상적 효과는 투여 후 동물 연구로 부터 결정된 21일 만큼이나 연장된다. 더욱이 예비적 데이터는 항-NGF 항체가, 이것의 투여 후 혈청이나 혈장과 같은 관련있는 생리적 매트릭스에서 확인될 수 있는 이것의 존재보다 오랜 기간 동안 임상적 이득을 나타낸다는 것을 암시한다. 의도된 활성의 장기적 지속의 측면에서 (즉, 최소 한 주 혹은 바람직하기는 최소 2 주, 예컨대 최소 3 주 혹은 최소 4 주 적절하게 지속되는 효과), 적절하게는 항체가 매주 한번 이하의 주기, 예컨대 2주에 한 번 이하, 또는 3주에 한번 또는 4주에 한 번의 주기로 개체에 투여될 수 있다.

[0050] 항-NGF의 적절한 투여량은 전형적으로 0.1mg/kg에서 10mg/kg 체중의 범위가 될 것이다.

[0051] 여기 개시된 신규한 항체와 이들을 포함하는 조성물은 본 발명의 양상으로서 청구된다.

실 시 예

[0062] 방법

단일클론 항체의 생산

[0064] 단일클론 항체 MNAC13 및 αD11은 상기의 표준 방법(Galfre and Milstein, 1981; Cattaneo et al., 1988; Cattaneo et al., 1999)에 따른 혼성 종양세포 상층액에서 생산되었다. 각각의 항체를 포함한 상층액을 침전시키고(29% 황산암모늄), PBS 1X(Spectra-Por 12/14K 막, Spectrum 사)로 투석하였다. 그리고 세파로즈 단백질 G 컬럼(4-Fast Flow, Amersham Biosciences 사)로 친화성 크로마토그래피 하였다. 용출은 수집 후 중성화되는 낮은 pH (HCl 5mM)의 용액에 의해 발생하였다. 최종 용출물은 농축시켜(Amicon Ultra-15, 50K, Millipore사) 1~5mg/ml의 농도로 정제된 항체의 제제를 얻었다.

[0065] αD11 항체의 Fab(Fragments Antigen binding) 버전을 이전에 명시한 바(특허출원 WO 05/061540, Covaceuszach et al., 2004)와 같이 생산하였다. αD11 항-NGF 항체는 NGF와 TrkA 사이의 결합을 억제할 수 있는 항-NGF IgG4 이소타입 항체로, 상기 항체의 경쇄 가변 영역이 다음의 서열들을 갖는 세 개의 상보성 결정 영역들(CDRs) 전부를 포함하고: SEQ ID No.1의 아미노산 24 내지 아미노산 34; SEQ ID No.1의 아미노산 50 내지 아미노산 56; 및 SEQ ID No.1의 아미노산 89 내지 아미노산 97, 그리고 상기 항체의 중쇄 가변 영역이 다음의 서열들을 갖는 세 개의 상보성 결정 영역들(CDRs) 전부를 포함한다: SEQ ID No.2의 아미노산 26 내지 아미노산 35; SEQ ID No.2의 아미노산 50 내지 아미노산 65; 및 SEQ ID No.2의 아미노산 98 내지 아미노산 111.

[0066] 간결하게, Fab 단편은 상응하는 전체 단일클론의 항체(IgG 형태)로부터 파파인(papain) 단백질 분해에 의해 그리고 이온 교환 크로마토그래피 정제 단계 및 통과물(flow-through)에 모인 Fab 단편의 농축에 의해 얻었다. 여전히 존재하는 꽤 적은 량의 분리되지 않은 IgG로부터 Fab 단편을 분리하기 위해, Superdex G75 컬럼(Pharmacia 사)상의 크기 배제 크로마토그래피를 FPLC 시스템(Pharmacia 사)을 사용하여 수행하고, 마지막 농축 단계를 수행하였다.

[0067] 두 개의 항체(Hu-αD11과 Hu-MNAC13)의 인간화된 버전(IgG1/IgG1*/IgG4)을 고려하는 한, 이들은 또한 안정적으로 트랜스펙션된 세포계의 상층으로부터 시작하여 상기와 같이 정제되었고, 이것은 각각의 항체의 중쇄(pVH/CMV 발현) 및 경쇄(pVL/CMV 발현)에 대한 안정한 공동 트랜스펙션체였다. 사용된 백터는 이전에 기재되었다(특허출원 WO 05/061540). 안정한 공동트랜스펙션된 클론을 G418과 마이코페놀산의 이중 선택을 통해 얻었다. pVH/CMV 발현 백터는 인간 IgG1의 불변의 부분을 포함하기 때문에, Hu-αD11의 IgG4 변형체를 생산하기 위해, 이것을 (인간 림프구 RNA로부터 RT-PCR에 의해 클론된) IgG4의 상응하는 Fc 영역으로 대체하였다. IgG1* 변형체(=Bolt et al., 이 설명한 N297A 돌연변이를 갖는 IgG1)을 부위 지향된 돌연변이 유발에 의해 생성하였다.

표면 플라스몬 공명 연구

[0069] BIACore 2000기계를 사용하여 아민 커플링을 갖는 CM5 칩에서 연구를 수행하였다. 커플링은 BIACore에서 구매한 특정 키트로 수행하였고 결합 반응은 제조사 지침에 따라 수행하였다.

[0070] 항-NGF 항체는 칩에 고정시킨 반면 마우스 NGF(m-NGF, Alomone 사) 혹은 재조합 마우스 proNGF(rm-proNGF)는 결합 곡선을 얻기 위해 감소된 농도로 투여하였다.

[0071] 실험에 사용된 흐름은 다른 언급이 없는 한, 30μl/분이었다. 칩의 재생을 10 mM 글라이신 pH 1.5의 웰스(10uL)

로 모든 경우에서 수행하였다. 수집된 결과를 Package BIAevaluaion 3.0을 사용하여 분석하였다. 걸보기 평형 상수 K_D 는 k_a/k_d 비율로 정의된다.

[0072] 뮤린 통증 모델에서 연구

[0073] 동물은 연구에서의 동물의 사용에 대한 IASP 윤리위원회의 방침과 이탈리아 국법(DL116/92, European Direction 86/609/EEC)에 맞게 처리되고 이루어졌다. 동물의 통증을 최소화하기 위한 모든 필요한 노력을 하였고, 신뢰성 있는 과학적 결과를 생성하는데 요구되는 동물의 수를 최소화하였다.

[0074] 포르말린 테스트

[0075] 사전의 포르말린 테스트를 위해(Porro and Cavazzuti, 1993), 실험 초기에는 몸무게가 35-40g인 CD1 수컷 마우스들(Charles River Labs, Como, Italy)를 사용하였다. 실험실에 도착한 후(실험 전 적어도 2주), 랙트들을 규칙적인 빛/어둠 스케줄(빛 7.00-19.00) 하에서, 일정한 온도($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$)와 상대 습도(60%)에서 정해진 표준 투명 플라스틱 우리(한 우리당 4마리)에서 보관하였다. 먹이와 물은 무제한이었다. 실험은 9시에서 14시 사이에 수행하였다. 포르말린 테스트를 위해 한 번에 동물 한 마리를 투명 플렉시 유리 우리($30 \times 12 \times 13 \text{ cm}$)에 놓고, 테스트 시작 전 30분 동안 자유롭게 움직이도록 하였다. 이 적응기간 후, 포르말린 용액 $20 \mu\text{l}$ (식염수 중 5%)을 26-게이지 바늘이 장착된 초소형 주사기를 이용하여 랙트의 오른쪽 뒷발의 뒤쪽 표면에 피하주사 하고, 관찰 기간을 시작하였다. 거울을 우리 뒤에, 비디오 카메라는 우리 앞에 두어 동물의 뒷발을 보는데 방해받지 않도록 하였다. 훑는 행동, 즉 동물이 훑거나 또는 주사맞은 발을 무는데 보내는 시간의 전체 양을 통증의 지수로서 측하였다. 훑는 행동은 40분 동안 지속적으로 기록되었고, 연속 5분 기간의 블록으로 계산하였다(2단계는 블록 15-40분에 상응하고 염증과 관련된 통증으로 확인될 수 있다). 게다가, 무의식적 행동에 대한 포르말린 투여의 효과에 접근하기 위해, 포르말린 테스트 동안 일반적 행동(걷고, 뒷다리로 서고, 기대는 동안 환경에 노출된 시간) 및 털 다듬기(얼굴과 몸을 깨끗이 하는데 보낸 시간)를 40분 동안 연속적으로 기록하였다. 이러한 매개변수에 대해서 항-NGF 항체 처리에 따른 심각한 차이는 발견되지 않았다. 이 실험 세트에서 항체는 Fabs로 투여되었다(fragments antigen binding; 각 항체의 단일 투여량: 동물 당 12.5 ug).

[0076] 테스트 45분 전에 각각의 마우스의 피하에 어버이 또는 인간화된 항-NGF 항체 또는 관련없는 Fab를 26-게이지 바늘이 장착된(주입량 = $20 \mu\text{l}$) Hamilton 초미세 주사기를 이용하여 오른쪽 뒷발의 등 표면에 투여하였다. 각각의 동물은 오직 하나의 치료만 받았다. 테스트는 주제에 속한 처리 그룹에 대해 선입관 없이 수행했다. 포르말린 테스트를 특징짓는 두 단계를 일방 ANOVAs에 의해 개별적으로 분석하였다.

[0077] 좌골신경 수술

[0078] 중량이 약 35g인 CD1 수컷 마우스들을 마취시키고(500mg/kg 클로랄 하이드레이트로 복강내 주사) 오른쪽 뒷다리의 좌골 신경을 Bennett과 Xie(1988)에 의해 알려진 좌골신경의 만성협심손상 모델(chronic constriction lesion model, CCI)에 따라 박음질 실로 느슨하게 결찰되도록 드러내었다. 윗쪽 허벅지의 수준에서 좌골신경의 느슨한 결찰은 가열성/기계성 이질통 및 통각과민으로 특징되는 말초 단일 신경병증을 초래하였다. 가깝지만 다른 3개의 지점에서 신경의 결찰에 의해, 신경병이 손상에 이어 3일에 완전히 발생되었고 2-3개월 동안 지속되었다.

[0079] 약물학적 치료

[0080] 손상 후 셋째 날에 시작된 항-NGF(α D11) 차단 항체 혹은 항-TrkA (MNAC13) 항체들은 표1에 제시된 것과 같이 식염수(매개물)에서 희석되어진 완전 형태(Mab)로 투여하였다. 대조군으로서 마우스 혹은 랙트에 차단 항체로서 동일 용량으로 (만약 2회 투여량이 사용되었다면 더 많은 투여량으로) 영향을 주지 않는 면역글로부린(IgG) 또는 식염수를 사용하였다. 각각의 실험 그룹은 (명백한 다른 언급이 없는 한) N=10 마리를 포함한다.

[0081] 표 I: 투여 프로토콜과 기계적 이상통증의 측정

항체	투여량	i.p. 투여	이질통 측정
MNAC 13 αD11	50 µg/마우스 = 1.4 mg/kg	손상 후 3, 4, 5, 6일에서 4일	3 내지 14일
MNAC 13 αD11	70 µg/마우스 = 2 mg/kg	손상 후 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10일에서 8일	3 내지 31일
MNAC 13	30 µg/마우스 = 0.9 mg/kg		

[0082]

[0083] 기계적 이상통증은 표 I에 제시된 것과 같이, 발 동세적 각막지도검사기(plantar dynamic aesthesiometer, Ugo Basile 사)에 의해 측정되었다. 3일은 기준선으로 고려된다.

[0084] 두 개의 항체 MNAC13 및 αD11의 인간화 모델의 진통제 활동을 평가하기 위해 동일한 프로토콜을 사용하였다.

[0085] 결과의 통계 분석 (CCI 실험들)

[0086] 결과를 2개의 다른 방법, 손상부위의 반대인 동물의 뒷다리를 수축시키기에 충분한 역력값(그램으로)의 절대값으로, 또는 뒷 다리(동측성/대측성)의 절대값 간의 비율로서 백분율 값으로 나타내었다. 값을 반복된 측정에 대해 분산분석법 (ANOVA)에 의해 통계분석을 하였다. 그리고 "치료" 인자와 반복된 측정은 모두 $p<0.01$ 로 유효하였다.

[0087] 결과

[0088] 결합

[0089] BIACORE 연구는 마우스 NGF와 재조합한 마우스 pro-NGF에 대한 이 항체의 결합 친화력을 평가함에 αD11 항-NGF 항체(그리고 이것의 인간화된 변형체)의 결합 성질을 더욱 특성화하는 것을 목적으로 수행하였다. 도 1은 이러한 실험의 결과를 나타낸다: αD11 항체는 NGF와 proNGF에서 다른 동역학으로 결합한다. 비슷한 결과가 Hu-αD11에서도 얻어졌다.

[0090] NGF로부터 매우 작은 해리상수는 항체가 이것의 항원에 매우 단단히 결합한다는 것을 나타내고, 항체 결합 동역학 중에서 매우 독특한 예이다.

[0091] NGF와 proNGF에 대한 항-NGF 항체 결합을 비교함에 의해, 후자의 경우 친화력이 크고 작은 것의 거의 3차수(피코몰 대신 나노몰)임을 알 수 있다. proNGF이 NGF와 오직 추가된 아미노산의 짧은 스트레치만이 다르다는 것을 고려할 때 결합 친화성에서의 이 차이는 전적으로 예측되지 않았고 놀라웠다.

[0092] 성숙한 NGF는 TrkA 리셉터에 대해 높은 친화력을 갖는 반면 proNGF는 바람직하기는 p75에 결합됨에 따라 항-NGF 중성화 항체의 임상적 사용의 견해에서 특이한 타당성을 지닌 현저한 특성인 αD11 및 Hu αD11은 TrkA 매개 경로의 새로운 선택적 억제제로 생각될 수 있다.

[0093] 염증성 통증

[0094] 생체 내 실험에서 첫 번째 세트는 마우스들에서 포르말린-유래 통증(염증성 통증)에 관하여 수행되었고, 다음을 증명하였다:

[0095] (i) αD11 항-NGF 항체(Fab 형태에서)은 관련없는 Fab와 비교하여, 통증 반응(포르말린 테스트:2단계)을 상당히 감소시킬 수 있었다.

[0096] (ii) 같은 결과가 인간화된 변형체(Hu-αD11, 도 2)로 αD11를 대체함에 의해 얻어질 수 있다.

[0097] 이것은 Hu-αD11가 염증성 통증에 관련된 모델에서 αD11만큼 강력한 진통제 특성을 보여준다는 것을 의미한다.

[0098] 신경병증성 통증

[0099]

CCI 모델에서의 결과는 두 개의 차단 항체 MNAC13 및 α D11(도 3과 도 4)가 상당한 진통제 효과를 가지는 것을 보여준다. 특히, 1.4 mg/kg의 투여량에서 두 개의 항체에서 비슷한 결과가 발견되었다. 도 3과 도 4에서 보여지는 것과 같이, 이들은 투여 두번째 날(4일)에서부터 진통제 효과를 가지기 시작하였고, 6일 쯤 최대 효과에 도달하였으며 14일까지 전체 관찰 기간동안 같은 진통 효과를 충분히 유지하였다. 도 4에서와 같이, 결과는 백분율(손상부위의 뒤쪽 발 동측성의 역력과 대측성 뒤쪽 발의 역력 사이의 비율)로 명시되었고, 이것은 두 개의 차단 항체 각각에 대해 최대 백분율 값이 60%정도였고, 대조 그룹(IgG와 식염수)에 대해 대략 40%였다는 것을 나타낸다.

[0100]

동물을 4주 동안 최대 31일까지 관찰하였을 때, NGF-TrkA 조작(도 5 및 도 6)을 차단하는 항체의 투여는 2 단계 효과를 나타내었다. 진통제 효과의 첫 번째 단계(3일부터 17일까지, 즉, 마지막 투여 후 한 주까지)는 대략 11-12일 정도에 최대 효과가 있는 특성이었다. 효과 감소 후(17일까지), 두 번째 진통제 단계가 31일까지 효과 증가와 함께 나타났다. 그러므로 NGF/TrkA 차단 항체의 진통작용에서 두 단계는 구별할 수 있다: 첫 번째("약리학적" 효과), 치료기간과 항체의 마지막 투여 후 첫 번째 주(항체의 혈액의 농도에 동시에 효과가 사라지는 동안의 주)을 포함; 두번째, 장기적인 효과를 확인하는 것으로 아마도 새로운 유전자 발현이 요구될 것이고, 이것은 "질병-개조" 활동 원리인, 즉, 정후에서 단순한 약학적 효과를 증명하는 현재 치료 배경에서 사용되고 있는 상품과는 달리 질병의 경로에서 넓은 범위에 걸쳐 개조될 수 있는 이러한 항체에 독특한 특성(신경병증성 통증의 분야에서)을 준다. 도 5에서 MNAC13 항-TrkA (2와 0.9mg/kg)의 2회 투여의 진통효과를 α D11(2mg/kg)의 것과 비교하였다. 그 결과를 백분율로 나타냈다. α D11 효과의 일시적인 프로파일은 비록 17일에 α D11로 처리한 동물이 대조군(IgG)으로부터 구별되지 않았지만 MNAC13의 것과 비슷하였다. 반면 MNAC13으로 처리한 모든 동물들은 여전히 상당히 달랐다($p<0.01$). 21일부터 α D11가 진통제 효과를 나타내었고, MNAC13 (대조군의 40%와 비교하여, 60%초과)과 비슷한 최종수단(31일)에 도달했다.

[0101]

실질적으로 상기 설명된 것과 동일한 결과가 α D11항체 대신 이것의 인간화 버전(Hu- α D11)의 변형체가 사용되었을 때(각 항체 당 사용된 복용량: 2mg/kg) 얻어졌고, 후자가 어버이 모델로서 같은 진통제 특성을 갖는다는 것을 확인한다. 항체는 경쇄(SEQ ID No.3) 및 중쇄(SEQ ID No.4) 가변영역 모두에서 WO2005/061540의 방법으로 인간화되었다. 전체 인간화 항체를 구성하기 위해 위에 제시한 대로 (SEQ ID No.5-8) 다른 불변의 영역을 사용하였다.

[0102]

부모 및 인간화 항체의 진통제 활성(CCI)에 대하여 동등한 전형적인 예로서 도 6에 α D11과 Hu- α D11(IgG4 형태)간의 비교를 나타내었다.

[0103]

이를 기본으로, Hu- α D11은 이것의 부모 모델과 동일한 장기적인 효과를 갖는다고 말할 수 있다.

[0104]

참고문헌

- Bennett GJ, Xie YK (1988). Pain 33:87-107.
- Berardi N, Cellerino A, Domenici L, Fagiolini M, Pizzorusso T, Cattaneo A, Maffei L (1994) Proc Natl Acad Sci U S A 91:684-688.
- Bolt S, Routledge E, Lloyd I, Chatenoud L, Pope H, Gorman SD, Clark M, Waldmann H (1993) Eur J Immunol 23: 403-411.
- Burnstock G (2001) Trends Pharmacol Sci 22:182-188.
- Capsoni S, Ugolini G, Comparini A, Ruberti F, Berardi N, Cattaneo A (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97:6826-6831.
- Cattaneo A, Rapposelli B, Calissano P (1988) J Neurochem 50:1003-1010.
- Cattaneo A, Capsoni S, Margotti E, Righi M, Kontsekova E, Pavlik P, Filipcik P, Novak M (1999) J Neurosci 19:9687-9697.
- Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D (2001) Nature 411:957-962.
- Covaceuszach S, Cattaneo A, Lamba D (2001) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 57:1307-1309.
- Covaceuszach S, Casetta, A., Cattaneo A, Lamba D (2004) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 60:1323-1327.
- Covaceuszach S, Cattaneo A, Lamba D (2005) Proteins 58:717-727.
- Djouhri L, Dawbarn D, Robertson A, Newton R, Lawson SN (2001) J Neurosci 21:8722-8733.
- Frade JM, Barde YA (1998) Bioessays 20:137-145.

- Galfre G, Milstein C (1981) Methods Enzymol 73:3-46.
- Gonfloni S (1995) Recombinant antibodies as structural probes for neurotrophins. SISSA PhD Thesis.
- Harpf C, Dabernig J, Humpel C (2002) Muscle Nerve 25:612-615.
- Hempstead BL (2002) Curr Opin Neurobiol 12:260-267.
- Holtzman DM, Li Y, Parada LF, Kinsman S, Chen CK, Valletta JS, Zhou J, Long JB, Mobley WC (1992) Neuron 9:465-478.
- Horigome K, Pryor JC, Bullock ED, Johnson EM, Jr. (1993) J Biol Chem 268:14881-14887.
- Hunt SP, Mantyh PW (2001) Nat Rev Neurosci 2:83-91.
- Indo Y (2001) Hum Mutat 18:462-471.
- Indo Y, Tsuruta M, Hayashida Y, Karim MA, Ohta K, Kawano T, Mitsubuchi H, Tonoki H, Awaya Y, Matsuda I (1996) Nat Genet 13:485-488.
- Indo Y, Mardy S, Miura Y, Moosa A, Ismail EA, Toscano E, Andria G, Pavone V, Brown DL, Brooks A, Endo F, Matsuda I (2001) Hum Mutat 18:308-318.
- Julius D, Basbaum AI (2001) Nature 413:203-210.
- Kaplan DR (1998) Prog Brain Res 117:35-46.
- Kawamoto K, Aoki J, Tanaka A, Itakura A, Hosono H, Arai H, Kiso Y, Matsuda H (2002) J Immunol 168:6412-6419.
- Khakh BS (2001) Nat Rev Neurosci 2:165-174.
- Kryger GS, Kryger Z, Zhang F, Shelton DL, Lineaweaver WC, Buncke HJ (2001) J Hand Surg [Am] 26:635-644.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001) Science 294:1945-1948.
- Levi-Montalcini R (1987) Science 237:1154-1162.
- Levi-Montalcini R, Skaper SD, Dal Toso R, Petrelli L, Leon A (1996) Trends Neurosci 19:514-520.
- Levine JD (1998) Neuron 20:649-654.
- Molnar M, Ruberti F, Cozzari C, Domenici L, Cattaneo A (1997) Neuroreport 8:575-579.
- Molnar M, Tongiorgi E, Avignone E, Gonfloni S, Ruberti F, Domenici L, Cattaneo A (1998) Eur J Neurosci 10:3127-3140.
- Morisset V, Ahluwalia J, Nagy I, Urban L (2001) Eur J Pharmacol 429:93-100.

- Nakatsuka T, Furue H, Yoshimura M, Gu JG (2002) J Neurosci 22:1228-1237.
- Nilsson G, Forsberg-Nilsson K, Xiang Z, Hallbook F, Nilsson K, Metcalfe DD (1997) Eur J Immunol 27:2295-2301.
- Porro CA, Cavazzuti M (1993) Spatial and temporal aspects of spinal cord and brainstem activation in the formalin pain model. Prog Neurobiol 41: 565-607.
- Pesavento E, Margotti E, Righi M, Cattaneo A, Domenici L (2000) Neuron 25:165-175.
- Ruberti F, Capsoni S, Comparini A, Di Daniel E, Franzot J, Gonfioni S, Rossi G, Berardi N, Cattaneo A (2000) J Neurosci 20:2589-2601.
- Saper CB, German DC, White CL, 3rd (1985) Neurology 35:1089-1095.
- Saragovi HU, Gehring K (2000) Trends Pharmacol Sci 21:93-98.
- Sevcik MA, Ghilardi JR, Peters CM, Lindsay TH, Halvorson KG, Jonas BM, Kubota K, Kuskowski MA, Boustany L, Shelton DL, Mantyh PW (2005) Pain 115:128-141.
- Shu X, Mendell LM (1999) Neurosci Lett 274:159-162.
- Sivilotti L, Nistri A (1991) Prog Neurobiol 36:35-92.
- Woolf CJ, Ma QP, Allchorne A, Poole S (1996) J Neurosci 16:2716-2723.
- Zhu Z, Friess H, diMola FF, Zimmermann A, Gruber HU, Korc M, Buchler MW (1999) J Clin Oncol 17:2419-2428.

[0106]

[0107]

도면의 간단한 설명

[0052]

본 발명의 비제한적 구체예는 이제 하기 도면과 특별히 관련되어 기재될 것이다.

[0053]

도 1: 마우스 NGF (m -NGF)에 대한 α D11 항-NGF 항체의 결합에 대한 BIACore 분석과 재조합 마우스 proNGF(rm-proNGF). α D11 항-NGF항체는 흐름 셀(flow cell) 2에 고정되는 반면 흐름 셀 1은 블랭크로 남겨두었다. 각각의 곡선은 셀 2에서 측정된 신호에 (세포 1에서 측정된)주변 신호를 빼서 얻는다. 표면 플라스문 공명 신호는 각 단계에서 표면-결합 성분의 양을 나타내고, 공명 단위(RU)로 표현된다.

[0054]

m -NGF 결합을 위해, 항체의 고정화는 패널A의 실험에서 3000 공명 단위(RU)였고 패널B의 실험에서 6000 RU였다. m -NGF의 주입농도는 각 곡선의 상부에 나타내었다. 결과의 완벽한 분석으로부터, 친화성 매개변수가 산정되었고 그 결과는 다음과 같다: KA= $3,55 \cdot 10^{11}$ 1/M; KD= $2,81 \cdot 10^{-12}$ M (0.123의 chi² 값).

[0055]

rm-proNGF 결합(패널C)을 위해, 항체의 고정화는 3000 RU였다. rm-proNGF의 주입 농도는 각 곡선의 상부에 나타내었다. 결과의 속도분석은 다음의 매개변수를 산출하였다: KA= $1,2 \cdot 10^9$ 1/M; MD= $1,9 \cdot 10^{-9}$ M (0.09의 chi² 값).

[0056]

도 2: 포르말린 유발 통증에 대한 Fab α D11 (알파D11) 및 Fab Hu- α D11 (Hu-알파D11) 항-NGF 항체의 효과(포르말린 테스트 2단계: 15-40 분. 염증과 관계된 통증에 상응하는 2단계). 마우스들은 오른쪽 뒷발의 등 부분에 5% 포르말린을 피하에 주사했다.

[0057]

항체 주사로 이루어진 치료(Fab 알파D11 또는 Fab Hu-알파D11 vs mock(모조) Fab 또는 식염수)는 포르말린 주사와 시험(각각 항체의 단일 투여량: 12.5 ug)하기 전에 45분(포르말린을 같은 발에) 실시하였다. 각 실험 그룹은 최소 8마리로 구성되었다. 결과의 통계적 분석은 통증 반응 (핥는데 소요되는 시간)의 두번째 단계(염증)에 대해 명확하게 특이성이 있는 (항체의 어버이형과 인간화형 모두에 대해) 항-NGF 처리의 상당한 진통 효과를 보여주었다: 항-NGF 항체(어버이형과 인간화형 모두에 대해)의 효과는 통계적으로 식염수(** p<0.01) 혹은 mock Fab 처리 (#p<0.05)에 대해서 달랐다(ANOVA).

[0058]

도 3: 신경병증성 통증에 대한 항-TrkA 단일 클론성 항체 MNAC13 (1.4 mg/kg) 및 항-NGF 단일 클론성의 항체 α D11 (1.4 mg/kg)의 효과: 기계적 이질 통이 발 동세적 각막지도검사기(planter dynamic aesthesiometer)에 의해 측정되었고; CD1 마우스는 좌골신경의 만성 협심증 처리되었고; 항체는 좌골신경의 병변 후 3, 4, 5, 6일에

복강 내로 주사되었다. 관찰 기간: 3일에서 14일. 음성대조군으로서, 식염수 (sa1) 및 마우스 면역글로부린 (IgG, 1.4 mg/kg) 둘 다 사용되었다. 결과는 병변에 동측인 뒤쪽 발에 역치힘의 절대 값(그램)으로 나타냈다. 값은 반복된 측정에 하여 분산분석법(ANOVA)에 의하여 통계적으로 분석되었다. 여기서, "치료" 인자 및 반복 측정(일) 둘 다 P<0.01로 유의적이었다. 항-TrkA 혹은 항-NGF로 처리한 동물은 4일에서 14일까지의 대조군과 상당히 달랐다.

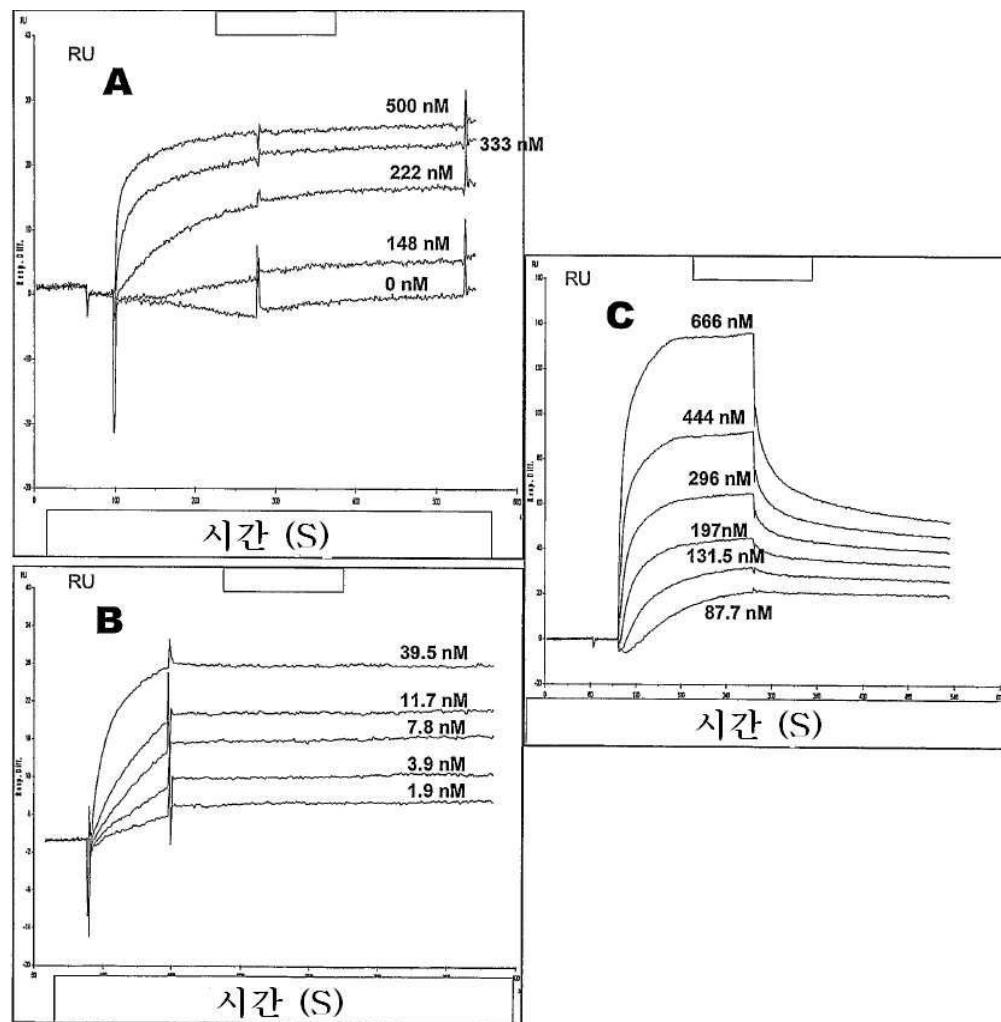
[0059] 도 4: 신경병증성 통증에 대한 항-TrkA 단일 클론성 항체 MNAC13 (1.4 mg/kg) 및 항-NGF α D11 항체 (1.4 mg/kg)의 효과: 기계적 이질통은 발 동세적 각막지도검사기(plantar dynamic aesthesiometer)에 의해 측정되었고; CD1 마우스는 좌골신경의 만성 협심증 처리되었고; 항체는 좌골 신경 병변 후 3, 4, 5, 6일에 복강 내로 주사되었다. 관찰기간: 3일에서 14일. 대조군으로서, 식염수(sa1)와 마우스 면역글로부린(IgG, 1.4 mg/kg) 둘 다 사용되었다. 결과는 백분율, %(병변에 동측인 뒤쪽 발의 역치힘과 반대 측 뒷발에 상응하는 힘 사이의 비)로 표현되었다. 상응하는 절대값을 반복된 측정에 대하여 분산분석법(ANOVA)에 하여 통계적으로 분석하였다. 여기서 "치료" 인자와 반복 측정(일) 둘 다 P<0.01(최소)에서 유의적이었다. 항-TrkA 혹은 항-NGF로 처리한 동물은 4일에서 14일까지 대조군과 상당히 달랐다.

[0060] 도 5: 신경병증성 통증에 대한 항-TrkA 단일 클론성 항체 MNAC13 (2회 투여: 0.9와 2 mg/kg) 및 항-NGF α D11 항체 (2 mg/kg 투여)의 효과 간의 비교: 기계적 이질통은 발 동세적 각막지도검사기에 의해 측정되었고; CD1 마우스는 좌골신경의 만성 협심증 처리되었고; 항체는 좌골 신경 병변 후 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10일에 복강 내로 주사되었다. 관찰기간: 3일에서 31일. 대조군으로서, 식염수(sa1)와 마우스 면역글로불린(IgG, 2 mg/kg) 둘 다 사용되었다. 결과는 백분율 %(병변에 동측인 뒤쪽 발의 역치힘과 상응하는 힘 사이의 비)로 표현되었다. 상응하는 절대값을 반복된 측정에 대하여 분산분석법(ANOVA)에 하여 통계적으로 분석을 하였다. 여기서 "치료" 인자와 반복 측정(일) 둘 다 P<0.01(최소)에서 유의적이었다. MNAC13을 처리한 동물은 5일(MNAC13의 더 많은 투여량)부터 혹은 7일(MNAC13의 더 적은 투여량)부터 마지막 관찰일(31일)까지 한 대조군과 상당히 달랐다. α D11을 처리한 동물은 마지막 관찰일(31일)까지, 4일부터 14일, 그리고 21일에서 31일까지 대조군과 상당히 달랐다.

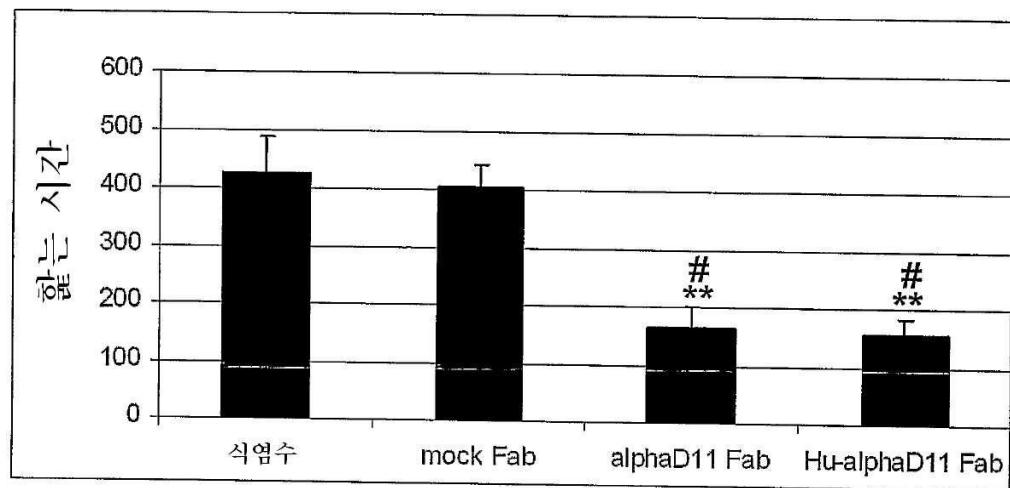
[0061] 도 6: 신경병증성 통증에 대한 항-NGF 중화 항체 시험된(1 회 투여량: 2mg/Kg)의 어버이형(α D11)와 인간화형 (Hu- α D11, 인간 IgG4 형태) 모델의 효과: 발 동세적 각막지도검사기에 의해 측정되었고; CD1 마우스는 좌골신경의 CCI(만성 협심증) 처리되었고,; 항체는 좌골 신경 병변 후 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10일에 복강 내로 주사되었다. 관찰기간: 3일에서 31일. 음성 대조군(IgG, 2mg/kg)이 마우스 면역글로불린이 사용되었다. 결과는 백분율 %(병변에 동측인 뒤쪽 발의 역치힘과 반대 측 뒷발에 상응하는 힘 사이의 비)로 표현되었다. 상응하는 절대값을 반복된 측정에 대하여 분산분석법(ANOVA)에 하여 통계적으로 분석하였다. 여기서 "치료" 인자와 반복된 측정(일) 둘 다 P<0.01(최소)에서 유의적이었다. α D11이나 Hu- α D11가 처리된 동물은 마지막 관찰, 4일부터 14일, 그리고 21일에서 31일까지 대조군과 상당히 달랐다.

도면

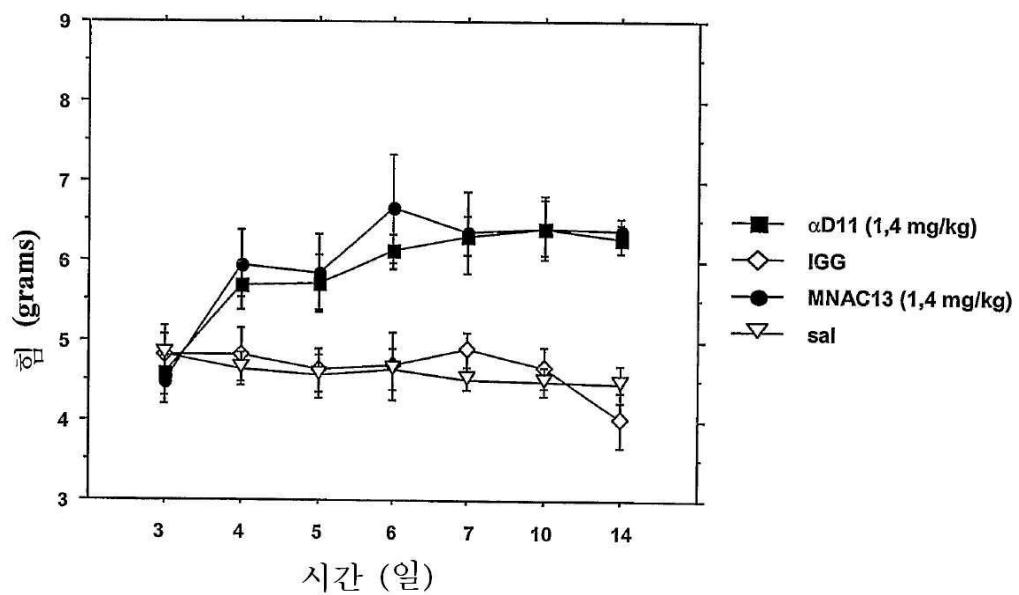
도면1



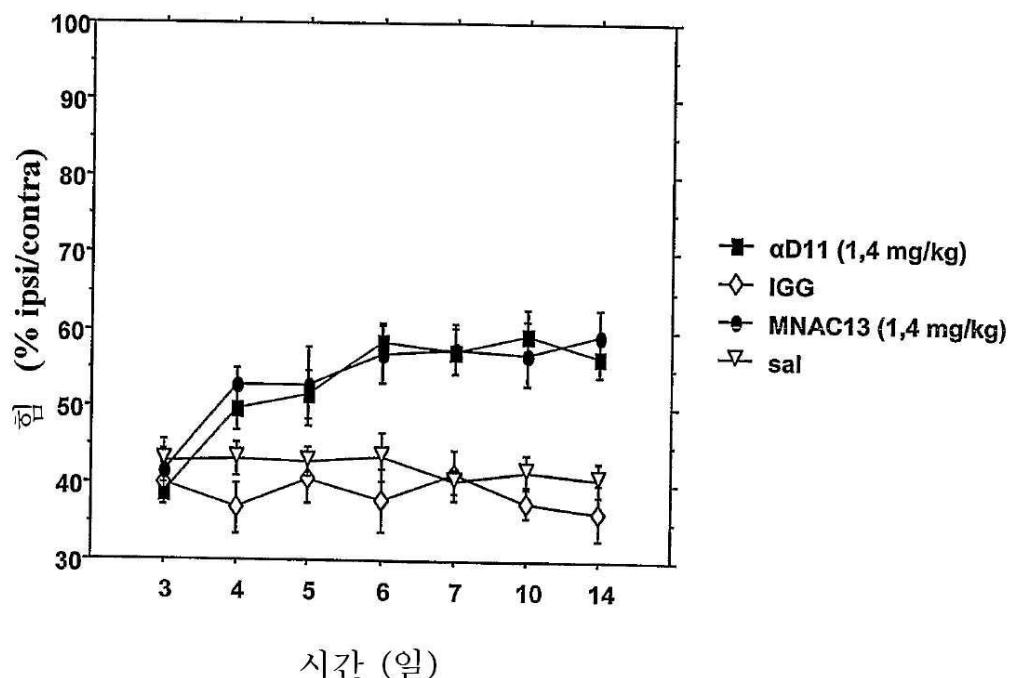
도면2



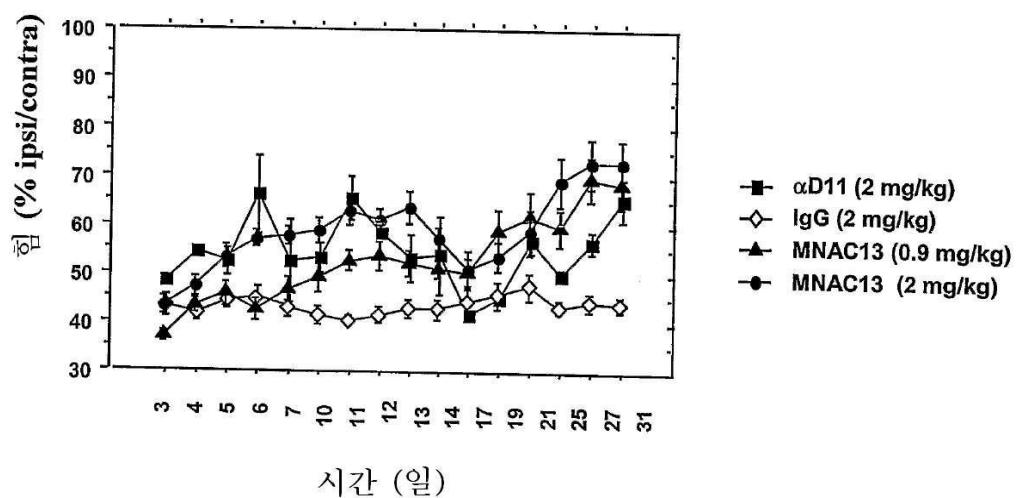
도면3



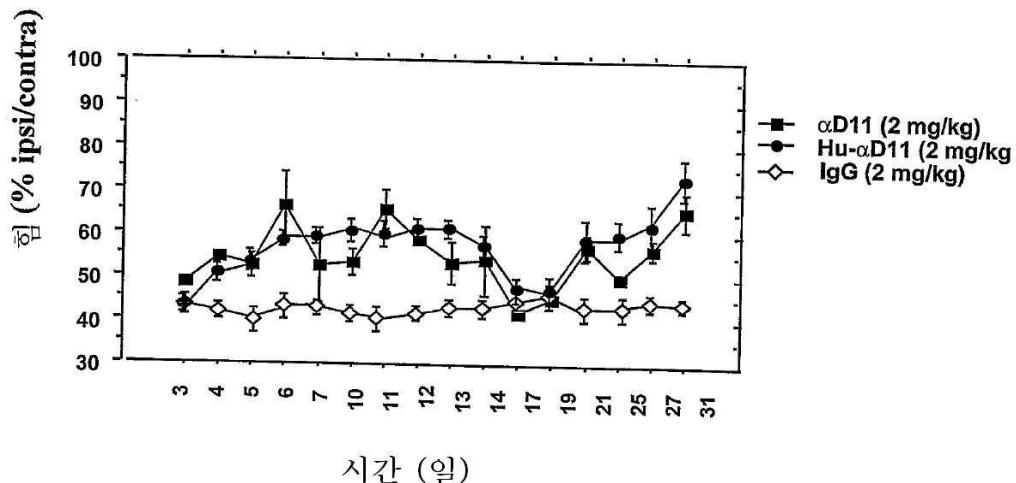
도면4



도면5



도면6



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Pavone, Flaminia
Martinelli, Sara
Cattaneo, Antonino
Ugolini, Gabriele

<120> Molecules that are able to inhibit the binding between NGF and the TrkA receptor as analgesics with prolonged effect

<130> P80563US00

<140> 11921826
<141> 2009-03-05

<150> IT2005RM00290
<151> 2005-06-07

<150> PCT/IT2006/000426
<151> 2006-06-07

<160> 10

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide antibody light chain variable region

<400> 1

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

Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 2
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide antibody heavy chain variable region

<400> 2

Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Ser	Gln
1															15

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Asn	Asn
															30
							25								

Asn	Val	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Thr	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
															45
35							40								

Gly	Gly	Val	Trp	Ala	Gly	Gly	Ala	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys
50							55								60

Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu
															80
65							70								75

Lys	Met	His	Ser	Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala
															95
85															
							90								

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

Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ala
115							120		

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide variable region of the light chain of Hu-alpha D11

<400> 3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 4
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide variable region of the heavy chain of Hu-alpha D11

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
20 25 30

Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5
<211> 452
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide humanised anti-NGF

<400> 5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
20 25 30

Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

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

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

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140

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

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

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

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 6
<211> 452
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide humanised Hu-alpha D11

<400> 6

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
20 25 30

Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

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

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

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140

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

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

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

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr
 290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 7
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic peptide humanised Hu-alpha D11

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
 20 25 30

Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

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

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

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140

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

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

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

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

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

385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445

Lys

<210> 8
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic peptide Humanised Hu-alpha D11

<400> 8

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe
1 5

<210> 10
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu
1 5 10

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 21

【변경전】

관절주위의 병리

【변경후】

관절주위의 질병

【직권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 21

【변경전】

및 또는

【변경후】

및/또는