(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-542958
(P2024-542958A)
(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	*14/71*	*(2006.01)*	C07K	14/71		4B065
C12N	*15/12*	*(2006.01)*	C12N	15/12	ZNA	4C076
C12N	*15/63*	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z	4C084
C12N	*1/15*	*(2006.01)*	C12N	1/15		4H045
C12N	*1/19*	*(2006.01)*	C12N	1/19		

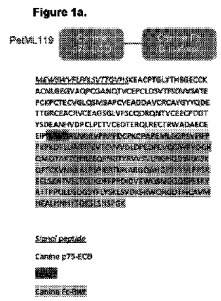
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全68頁）　最終頁に続く

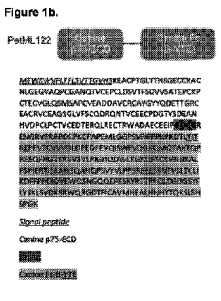
(21)出願番号　特願2024-523649(P2024-523649)
(86)(22)出願日　令和4年10月21日(2022.10.21)
(85)翻訳文提出日　令和6年6月13日(2024.6.13)
(86)国際出願番号　PCT/GB2022/052692
(87)国際公開番号　WO2023/067358
(87)国際公開日　令和5年4月27日(2023.4.27)
(31)優先権主張番号　2115098.2
(32)優先日　令和3年10月21日(2021.10.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(31)優先権主張番号　17/506,876
(32)優先日　令和3年10月21日(2021.10.21)
(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　522414327
ペットメディックス・リミテッド
英国 シービー２２・３エフエイチ ケンブリッジ・ケンブリッジシャー，バブラハム，バブラハム・リサーチ・キャンパス，ザ・グレン・ベージ・ビルディング，ビルディング ９４０
(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　100111796
弁理士　服部 博信
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　Ｐ７５ＮＴＲの細胞外ドメインを含むタンパク質

(57)【要約】
本発明は、コンパニオンアニマルにおける有効な疼痛療法に関する。特に、コンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質、又はそれ若しくはそれの一部分を含有する融合タンパク質が企図される。タンパク質をコードする核酸並びにそれを使用する方法もまた、本発明に包含される。
【選択図】なし





【特許請求の範囲】
【請求項１】
単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分。
【請求項２】
コンパニオンアニマルが、ネコ、イヌ、ブタ、ウシ又はウマである、請求項１に記載の単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分。
【請求項３】
コンパニオンアニマルがイヌである、請求項２に記載の単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分。
【請求項４】
コンパニオンアニマルがネコである、請求項２に記載の単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分。
【請求項５】
配列番号１を含む、請求項３に記載の単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分。
【請求項６】
配列番号３を含む、請求項４に記載の単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分。
【請求項７】
細胞外ドメイン又はその一部を含む、先行請求項に記載の単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分。
【請求項８】
コンパニオンアニマルがイヌであり、配列番号７を含む請求項７に記載の単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲ細胞外ドメイン。
【請求項９】
コンパニオンアニマルがネコであり、配列番号３８を含む請求項７に記載の単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲ細胞外ドメイン。
【請求項１０】
請求項１～９のいずれか１項に記載のコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分をコードする、単離された核酸。
【請求項１１】
コンパニオンアニマルがイヌであり、配列番号２を含む請求項１０に記載の単離された核酸。
【請求項１２】
コンパニオンアニマルがネコであり、配列番号４を含む請求項１０に記載の単離された核酸。
【請求項１３】
請求項１０～１２のいずれか１項に記載の核酸を含む、ベクター。
【請求項１４】
請求項１０～１２のいずれか１項に記載の核酸又は請求項１３に記載のベクターを含む、宿主細胞。
【請求項１５】
単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲ細胞外ドメイン又はその一部分と、半減期延長部分と、を含む、融合タンパク質。
【請求項１６】
半減期延長部分が、Ｆｃドメイン、血清アルブミン結合因子又はＰＥＧから選択される、請求項１５に記載の融合タンパク質。
【請求項１７】
半減期延長部分が野生型又は変異体Ｆｃドメインである、請求項１６に記載の融合タンパク質。

【請求項１８】
半減期延長部分がＦｃドメインであり、ｐ７５ＮＴＲ細胞外ドメイン又はその一部分と前記Ｆｃドメインとがリンカーで連結している、請求項１５～１７のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項１９】
リンカーがペプチドリンカーである、請求項１８に記載の融合タンパク質。
【請求項２０】
ペプチドリンカーが（G_4S）$_n$であり、式中、ｎが１～４である、請求項１９に記載の融合タンパク質。
【請求項２１】
コンパニオンアニマルがネコ、イヌ又はウマである、請求項１５～２０のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項２２】
コンパニオンアニマルがイヌである、請求項２１に記載の融合タンパク質。
【請求項２３】
ｐ７５ＮＴＲ細胞外ドメインが、配列番号７、又は配列番号３４などのその一部分を含む、請求項２２に記載の融合タンパク質。
【請求項２４】
Ｆｃドメインがイヌ Ｆｃドメインである、請求項１５～２３のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項２５】
配列番号１１又は１３を含む、請求項２４に記載の融合タンパク質。
【請求項２６】
コンパニオンアニマルがネコである、請求項２１に記載の融合タンパク質。
【請求項２７】
ｐ７５ＮＴＲ細胞外ドメインが配列番号３８を含む、請求項２６に記載の融合タンパク質。
【請求項２８】
配列番号３９を含む、請求項２７に記載の融合タンパク質。
【請求項２９】
請求項１５～２８のいずれか一項に記載の融合タンパク質をコードする核酸。
【請求項３０】
請求項２９に記載の核酸を含むベクター。
【請求項３１】
請求項２９に記載の核酸又は請求項３０に記載のベクターを含む宿主細胞。
【請求項３２】
請求項１～９のいずれか一項に記載の単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質、又は請求項１５～２８のいずれか一項に記載の融合タンパク質を含む、医薬組成物。
【請求項３３】
コンパニオンアニマルにおけるＮＧＦ関連障害を治療するための方法であって、請求項１～９のいずれか一項に記載の単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質、請求項１５～２８のいずれか一項に記載の融合タンパク質、又は請求項３２に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。
【請求項３４】
コンパニオンアニマルにおけるＮＧＦ関連障害の治療における、請求項１～９のいずれか一項に記載の単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質、請求項１５～２８のいずれか一項に記載の融合タンパク質、又は請求項３２に記載の医薬組成物の使用。
【請求項３５】

ＮＧＦ関連障害が、心血管疾患、アテローム性動脈硬化症、肥満、２型糖尿病、メタボリックシンドローム、疼痛、及び炎症である、請求項３３に記載の方法又は請求項３４に記載の使用。
【請求項３６】
ＮＧＦ関連障害が疼痛関連障害である、請求項３５に記載の方法又は使用。
【請求項３７】
疼痛が、変形性関節症疼痛、関節リウマチ疼痛、手術及び術後疼痛、切開疼痛、全身炎症性疼痛、がん疼痛、外傷による疼痛、神経障害性疼痛、神経痛、糖尿病性神経障害疼痛、リウマチ性疾患に関連する疼痛、筋骨格疾患に関連する疼痛、内臓痛、並びに胃腸痛から選択される、請求項３６に記載の方法又は使用。
【請求項３８】
コンパニオンアニマルにおけるＮＧＦ活性を阻害する方法であって、請求項１～９のいずれか一項に記載の単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質、請求項１５～２８のいずれか一項に記載の融合タンパク質、又は請求項３２に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。
【請求項３９】
疼痛を治療する第２の化合物の投与を含む、請求項３６若しくは３７に記載の方法若しくは使用、又は請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
請求項１～９のいずれか一項に記載の単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質、請求項１５～２８のいずれか一項に記載の融合タンパク質、又は請求項３２に記載の医薬組成物、及び、任意選択的に使用説明書、を含むキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願及び参照による組み込み
本明細書において引用又は参照される全ての文書（「本明細書に引用される文書」）、及び本明細書に引用される文書において引用又は参照される全ての文書、並びに本明細書に言及される任意の製品に関する任意の製造業者の指示、説明、製品仕様、及び製品シート、又は本明細書に参照により組み込まれる任意の文書は、参照により本明細書に組み込まれ、本発明の実施に際して採用され得る。より具体的には、参照される全ての文書は、各個々の文書が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されるのと同じ程度に、参照により組み込まれる。
【０００２】
発明の分野
本発明は、コンパニオンアニマルにおける有効な疼痛療法に関する。
【背景技術】
【０００３】
概論
特に疼痛の緩和のために、獣医学における療法に対する必要性は非常に大きい。
【０００４】
イヌのための疼痛緩和治療には、現在、一般的にＮＳＡＩＤと呼ばれる非ステロイド性抗炎症薬、及び変形性関節症に関連する疼痛及び炎症を制御するのに役立ついくつかの非ステロイド性抗炎症薬が含まれる。いくつかのＮＳＡＩＤはＦＤＡによって承認されている。しかしながら、最小限の副作用を伴うコンパニオンアニマルにおける更なる有効な疼痛治療が必要とされている。
【０００５】
神経成長因子（ＮＧＦ）は、１９５０年代に初めて発見された。次いで、ＮＧＦタンパク質がクローニングされ、脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）、ニューロトロフィン３及び４／５（ＮＴ－３、ＮＴ－４－５）の一部として同定された。これらは全て、末梢神経系

の生存及び成長を促進する分泌タンパク質である。

【０００６】

ＮＧＦは、その存在下での温度又はカプサイシンに対するＤＲＧニューロンの応答の増加によって示されるように、インビトロ及びインビボの両方で末梢感作を引き起こす。ＮＧＦはまた、くも膜下腔内ＮＧＦ治療後のＢＤＮＦの上方調節を示す免疫染色によって示されるように、逆行性軸索輸送後に転写調節をもたらす。更に、ＮＧＦは、疾患のある関節及びがん組織への末梢求心性神経の発芽を引き起こす可能性がある（Ｄｅｎｋ ｅｔ ａｌ，Ａｎｎｕａｌ Ｒｅｖｉｅｗ ｏｆ Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｖｏｌ．４０：３０７－３２５，２０１７）。

【０００７】

ＮＧＦは、成人期には低レベルで発現されるが、損傷、炎症、又はＮＧＦの放出により、炎症性細胞の活性化が引き起こされる。そして、これらの細胞は同様にＮＧＦを産生及び分泌し、これにより、短期的及び長期的な効果が得られる。ＮＧＦは、侵害受容性過程において周知の多機能的な役割を有するが、侵害受容を媒介するＮＧＦ受容体活性化の下流の正確なシグナル伝達経路は複雑であり、完全には理解されていない。侵害受容、並びに慢性疼痛の生成及び／又は維持におけるＮＧＦの役割は、慢性疼痛状態の治療のための疼痛療法の魅力的な標的となった（Ｂａｒｋｅｒ ｅｔ ａｌ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐａｉｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０２０：１３ １２２３－１２４１）。

【０００８】

ＮＧＦに対する非常に低用量のモノクローナル抗体（ｍＡｂ）は、慢性疼痛を軽減することができる。しかしながら、ヒトにおける臨床試験中に、ＮＧＦに対するｍＡｂで治療された少数の患者が、ＮＳＡＩＤ治療との相互作用に起因して急速に進行性の関節変性を発症した。完全なＮＧＦ除去は、骨及び軟骨修復の障害を引き起こすことが示されている（Ｄｅｎｋ ｅｔ ａｌ，Ａｎｎｕａｌ Ｒｅｖｉｅｗ ｏｆ Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｖｏｌ．４０：３０７－３２５，２０１７）。ＮＧＦを標的とする種特異的ｍＡｂに基づくイヌ及びネコにおける使用のための治療が、変形性関節症（ＯＡ）関連疼痛の管理のために現在開発中である（Ｅｎｏｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ，Ｖｅｔ Ｒｅｃ．２０１９ Ｊａｎ ５；１８４（１）：２３及びＷＯ２０１９１７７６９０）。しかしながら、ヒトにおける臨床試験で生じた副作用を考慮すると、ＮＧＦを標的とする代替治療を開発する必要がある。

【０００９】

本出願におけるいずれかの文書の引用又は特定は、そのような文書が本発明の先行技術として利用可能であることを認めるものではない。

【発明の概要】

【００１０】

本発明は、コンパニオンアニマルにおける有効な疼痛療法の必要性に対処することを目的とする。

【００１１】

本発明は、抗ＮＧＦ抗体療法と比較して副作用が減少した、コンパニオンアニマルのための疼痛療法を提供する。本発明のタンパク質は、疼痛状態において上昇したレベルであるＮＧＦに結合し、したがって、ＮＧＦシグナル伝達を完全に遮断することなく、過剰なＮＧＦに結合して、正常なＮＧＦレベルを回復させる。理論に拘束されることを望まないが、本発明者らは、これが健康な機能に必要なＮＧＦシグナル伝達のレベルを確実にすると考えている。更に、本発明の融合タンパク質は非常に低用量で動作することができるが、非常に有効であると考えられている。

【００１２】

発明者らは、鎮痛戦略を使用して循環中のＮＧＦを減少させるが、完全に枯渇させるわけではない。この目的のために、ｐ７５ニューロトロフィン受容体（ｐ７５ＮＴＲ）の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）を使用し、Ｆｃに融合してその半減期を増加させた。ｐ７５ＮＴＲは、ＮＧＦ及び他の脳由来神経栄養因子（ＮＴ３、ＮＴ４）を結合し、異なる細胞活性

を媒介する。
【００１３】
ヒトｐ７５の使用は、ヒトにおける疼痛の治療用に記載されている（ＷＯ２０１３１３６０７８）。
【００１４】
したがって、第１の態様では、本発明は、単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分に関する。本発明はまた、タンパク質又はその一部分をコードする、単離された核酸に関する。
【００１５】
本発明はまた、上記の核酸列を含むベクターに関する。
【００１６】
本発明は、上記の核酸を含む宿主細胞に関する。
【００１７】
別の態様では、本発明は、単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲ細胞外ドメイン又はその一部分と、半減期延長部分と、を含む、融合タンパク質に関する。
【００１８】
別の態様では、本発明は、上記の融合タンパク質をコードする核酸に関する。
【００１９】
別の態様では、本発明は、上記の核酸を含むベクターに関する。
【００２０】
別の態様では、本発明は、上記の核酸、又は上記のベクターを含む宿主細胞に関する。
【００２１】
別の態様では、本発明は、上記及び本明細書に記載の単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質、又は上記及び本明細書に記載の融合タンパク質を含む、医薬組成物に関する。
【００２２】
別の態様では、本発明は、コンパニオンアニマルにおけるＮＧＦ関連障害を治療するための方法であって、上記の単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質、上記及び本明細書に記載の融合タンパク質、又は上記及び本明細書に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法に関する。
【００２３】
別の態様では、本発明は、コンパニオンアニマルにおけるＮＧＦ関連障害の治療における、上記の単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質、上記の融合タンパク質、又は上記及び本明細書に記載の医薬組成物の使用に関する。
【００２４】
別の態様では、本発明は、コンパニオンアニマルにおけるＮＧＦ活性を阻害する方法であって、上記の単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質、上記及び本明細書に記載の融合タンパク質、又は上記及び本明細書に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法に関する。
【００２５】
別の態様では、本発明は、上記の単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質、上記の融合タンパク質、又は上記の医薬組成物、及び任意選択的に使用説明書を含む、キットに関する。
【００２６】
したがって、本発明の目的は、出願人が権利を留保し、任意の以前に知られている製品、プロセス、又は方法の否認を開示するように、製品を製造する任意の以前に知られている製品、プロセス、又は製品を使用する方法を本発明の中に包含しないことである。本発明は、本発明の範囲内に、ＵＳＰＴＯ（米国特許法第１１２条第１段落）又はＥＰＯ（ＥＰＣ第８３条）の書面による説明及び実施可能要件を満たさない、任意の製品、プロセス、又は製品の製造、若しくは製品の使用方法を包含することを意図するものではなく、そ

の結果、出願人は、権利を留保し、それによって任意の以前に記載された製品、製品の製造プロセス、又は製品の使用方法の否認を本明細書に開示することに更に留意されたい。本発明の実施においては、ＥＰＣ第５３条（ｃ）並びにＥＰＣ規則第２８条（ｂ）及び（ｃ）に準拠することが有利であり得る。本出願の系統において、又は任意の他の系統において、又は任意の第三者の任意の先行出願において、出願人の任意の付与された特許の主題である任意の実施形態を明示的に否認する全ての権利は、明示的に留保される。本明細書中のいかなる内容も、約束として解釈されるべきではない。

【００２７】

本開示、特に特許請求の範囲及び／又は段落において、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」、「含まれる（ｃｏｍｐｒｉｓｅｄ）」「含むこと（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」などの用語は、米国特許法においてそれに起因する意味を有することができ、例えば、それらは、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」、「含まれる（ｉｎｃｌｕｄｅｄ）」、「含むこと（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」などを意味することができ、「から本質的になること（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」及び「から本質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｓ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」などの用語が米国特許法においてそれらに起因する意味を有することができ、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、先行技術において見出される要素、又は本発明の基本的又は新規の特徴に影響を与える要素を除外する。

【００２８】

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ているか、又は明らかであり、以下の詳細な説明によって包含される。

【００２９】

本発明は、以下の非限定的な図において記載される。

【図面の簡単な説明】

【００３０】

【図１ａ】例示的な融合タンパク質（ａ）ＰｅｔＭＬ１１９。

【図１ｂ】例示的な融合タンパク質（ｂ）ＰｅｔＭＬ１２２。

【図２ａ】ａ）本発明の融合タンパク質で使用されるｐ７５ＮＴＲのＥＣＤの一部の配列アラインメント。種間には非常に高い類似性がある：イヌ対ネコ：１／１６４（９９％以上同一）；イヌ対ウマ：４／１６４（９７．６％）；ネコ対ウマ：５／１６４（９７％）；イヌ対ウシ：２／１６４（９８．８％同一）。

【図２ｂ】ｂ）異なる種／異なるアイソタイプからのＦｃ領域（ＣＨ３、ＣＨ２及びＣＨ２－ＣＨ１ヒンジを含む）の配列アラインメント。

【図３ａ】単離された融合タンパク質の純度。ａ）Ｈ－ＳＥＣ。ＰｅｔＭＬ１１９は、分析サイズ排除クロマトグラフィーによって非常に純粋であるように見える。

【図３ｂ】単離された融合タンパク質の純度。ｂ）Ｈ－ＳＣＸ。カチオン交換クロマトグラフィーは、１つの主な種（約８０％）及び２つのマイナー電荷バリアントの存在を示した。

【図４ａ】ＰｅｔＭＬ１１９の安定性。ａ）Ｔｏｎｓｅｔ分析。

【図４ｂ】ＰｅｔＭＬ１１９の安定性。ｂ）熱及び化学的ストレス。

【図４ｃ】ＰｅｔＭＬ１１９の安定性。ｃ）凍結及び融解ストレス。

【図４ｄ】ＰｅｔＭＬ１１９の安定性。ｄ）熱安定性。

【図４ｅ】ＰｅｔＭＬ１１９の安定性。ｅ）凝集分析。

【図５ａ】プロテインＡ結合。ａ）ＰｅｔＭＬ１１９プロテインＡ結合。

【図５ｂ】プロテインＡ結合。ｂ）ＰｅｔＭＬ１１９プロテインＡ結合。

【図５ｃ】プロテインＡ結合。ｃ）ＰｅｔＭＬ１２２プロテインＡ結合。

【図５ｄ】プロテインＡ結合。ｄ）ＰｅｔＭＬ１２２プロテインＡ結合。

【図５ｅ】プロテインＡ結合。ｅ）ベジンベトマブプロテインＡ結合。ベジンベトマブは、抗ＮＧＦ　ＩｇＧ対照である。

【図５ｆ】プロテインＡ結合。ｆ）動態を示す表。

【図６ａ】ＰｅｔＭＬ１１９イヌＦｃＲＮ結合。ａ）イヌＦｃＲＮ結合ＰｅｔＭＬ１１９。
【図６ｂ】ＰｅｔＭＬ１１９マウスＦｃＲＮ結合。ｂ）マウスＦｃＲＮ結合ＰｅｔＭＬ１１９。
【図６ｃ】ＰｅｔＭＬ１１９イヌ及びマウスＦｃＲＮ結合。ｃ）イヌ及びマウス結合ＦｃＲＮの親和性表。
【図６ｄ】ＰｅｔＭＬ１２２イヌＦｃＲＮ結合。ｄ）イヌＦｃＲＮ結合ＰｅｔＭＬ１２２。
【図６ｅ】ＰｅｔＭＬ１２２マウスＦｃＲＮ結合。ｅ）マウスＦｃＲＮ結合ＰｅｔＭＬ１２２。
【図６ｆ】ＰｅｔＭＬ１２２イヌ及びマウスＦｃＲＮ結合。ｆ）イヌ及びマウスＦｃＲＮ結合の親和性表。
【図７ａ】ＮＧＦ結合。ａ）ヒトＮＧＦへのＰｅｔＭＬ１１９結合。
【図７ｂ】ＮＧＦ結合。ｂ）ラットＮＧＦへのＰｅｔＭＬ１１９。
【図７ｃ】ＮＧＦ結合。ｃ）動態親和性表。
【図７ｄ】ＮＧＦ結合。ｄ）ヒトＮＧＦへのベジンベトマブ結合。
【図７ｅ】ＮＧＦ結合。ｅ）動態親和性表。
【図８ａ】ＴＦ－１細胞増殖アッセイ。２．５ｕＭの３０分間ＲＴでＣＦＳＥ細胞トレースで標識したＴＦ－１。ＴＦ－１を、９６ウェルプレートに10^4個の細胞／ウェルで播種した。陽性対照：ＲＰＭＩ培地中のＴＦ－１細胞＋１０％ＦＢＳ＋１０ｎｇ／ｍＬのｈＮＧＦ　３時間点（ｔ　２時間、ｔ　４ｄ及びｔ　７ｄ）。ａ）ＮＧＦの活性：２ｎｇ／ｍＬのＥＣ５０。
【図８ｂ】ＴＦ－１細胞増殖アッセイ。２．５ｕＭの３０分間ＲＴでＣＦＳＥ細胞トレースで標識したＴＦ－１。ＴＦ－１を、９６ウェルプレートに10^4個の細胞／ウェルで播種した。陽性対照：ＲＰＭＩ培地中のＴＦ－１細胞＋１０％ＦＢＳ＋１０ｎｇ／ｍＬのｈＮＧＦ　３時間点（ｔ　２時間、ｔ　４ｄ及びｔ　７ｄ）。ｂ）ＴＦ－１細胞増殖アッセイの読み出し。
【図８ｃ】ＴＦ－１細胞増殖アッセイ。２．５ｕＭの３０分間ＲＴでＣＦＳＥ細胞トレースで標識したＴＦ－１。ＴＦ－１を、９６ウェルプレートに10^4個の細胞／ウェルで播種した。陽性対照：ＲＰＭＩ培地中のＴＦ－１細胞＋１０％ＦＢＳ＋１０ｎｇ／ｍＬのｈＮＧＦ　３時間点（ｔ　２時間、ｔ　４ｄ及びｔ　７ｄ）。ｃ）ＰｅｔＭＬ１１９、ＰｅｔＭＬ１２２及びベジンベトマブを使用したＴＦ－１細胞増殖アッセイ読み出し。
【図９】インビボモデル。
【図１０ａ】インビボでの鎮痛効果。ａ）ＩＶ治療の２時間後。
【図１０ｂ】インビボでの鎮痛効果。ｂ）ＩＶ治療の３日後。
【図１０ｃ】インビボでの鎮痛効果。ｃ）ＩＶ治療の１１日後。
【図１０ｄ】インビボでの鎮痛効果。ｄ）ＩＶ治療の１８日後。
【図１１ａ】関節直径及び体重。ａ）関節直径分析。
【図１１ｂ】関節直径及び体重。ｂ）体重分析。
【図１２ａ】ｐｋ分析－半減期。ａ）ラット血清中のＰｅｔＭＬ１１９の標準曲線。
【図１２ｂ】ｐｋ分析－半減期。ｂ）ラット血清中のＰｅｔＭＬ１２２の標準曲線。
【図１２ｃ－ｆ】ｐｋ分析－半減期。ｃ－ｆ）ラット研究のｐＫ結果。異なる濃度でのＰｅｔＭＬ１１９の計算された半減期は、５６～７０時間である。
【図１３ａ】イヌにおけるＰｅｔＭＬ１１９／ＰｅｔＭＬ１２２の安全性分析。ａ）体重。上の表中の上の行は、群１の個々の動物を示し、上の表中の下の行は、群２の個々の動物を示す。群１の動物をＰｅｔＭＬ１１９で処理し、群２の動物をＰｅｔＭＬ１２２で処理した（表３を参照されたい）。下の表は平均値を示している。
【図１３ｂ】イヌにおけるＰｅｔＭＬ１１９／ＰｅｔＭＬ１２２の安全性分析。ｂ）抗薬物抗体（ＡＤＡ）分析。上部パネルＰｅｔＭＬ１１９、下部パネルＰｅｔＭＬ１２０。
【図１４】ａ～ｄ：イヌにおけるＰｅｔＭＬ１１９／ＰｅｔＭＬ１２２の有効性分析。

ＰｅｔＭＬ１１９／ＰｅｔＭＬ１２２のフォースプレート分析及び視覚的跛行分析。
【図１４ａ】イヌにおけるＰｅｔＭＬ１１９の有効性分析。　ＰｅｔＭＬ１１９のフォースプレート分析。
【図１４ｂ】イヌにおけるＰｅｔＭＬ１１９の有効性分析。　ＰｅｔＭＬ１１９の視覚的跛行分析。
【図１４ｃ】イヌにおけるＰｅｔＭＬ１２２の有効性分析。　ＰｅｔＭＬ１２２のフォースプレート分析。
【図１４ｄ】イヌにおけるＰｅｔＭＬ１２２の有効性分析。　ＰｅｔＭＬ１２２の視覚的跛行分析。
【図１５ａ】イヌのｐｋ分析－半減期。上の（ａ）は、血清を使用した６５０ｎｍ及び４５０ｎｍでのエンドポイント吸光度を示す。
【図１５ｂ】イヌのｐｋ分析－半減期。下の（ｂ）は、ＰｅｔＭＬ１１９／ＰｅｔＭＬ１２２の半減期を推定するための一相減衰フィッティングを示す。
【発明を実施するための形態】
【００３１】
次に、本発明を更に記載する。次の段落では、本発明の異なる態様をより詳細に定義する。そのように定義された各態様は、反対のことが明確に示されない限り、任意の他の態様又は態様と組み合わせることができる。特に、好ましい又は有利であると示される任意の特徴は、好ましい又は有利であると示される任意の他の１つ以上の特徴と組み合わせてもよい。
【００３２】
一般に、本明細書に記載される細胞及び組織培養、病理学、腫瘍学、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、並びにタンパク質及び核酸の化学及びハイブリダイゼーションに関連して使用される命名法、及びそれらの技術は、当技術分野で周知であり、一般的に使用されるものである。別途示されない限り、本開示の方法及び技術は、一般に、当技術分野で周知の従来方法に従って実行され、本明細書全体を通じて引用され及び考察される様々な一般的及びより具体的な参照文献に記載されるように実行される。例えば、Ｇｒｅｅｎ ａｎｄ Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，４ｔｈ ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（２０１２）、Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｆｒｏｍ Ｂｅｎｃｈ ｔｏ Ｃｌｉｎｉｃ，Ｚｈｉｑｉａｎｇ Ａｎ（Ｅｄｉｔｏｒ），Ｗｉｌｅｙ，（２００９）、及びＡｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，２ｎｄ Ｅｄ．，Ｖｏｌｓ．１ ａｎｄ ２，Ｏｎｔｅｒｍａｎｎ ａｎｄ Ｄｕｅｂｅｌ，ｅｄｓ．，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ（２０１０）を参照されたい。
【００３３】
酵素反応及び精製技術は、製造業者の仕様に従って、当技術分野で一般的に達成されるように、又は本明細書に記載されるように実行される。本明細書に記載される分析化学、合成有機化学、並びに医薬的及び薬学的化学に関連して使用される命名法、並びにそれらの実験室の手順及び技術は、当技術分野で周知であり、一般的に使用されるものである。標準的な技術は、化学合成、化学分析、薬学的調製、製剤、及び送達、並びに患者の治療に使用される。
【００３４】
本発明は、獣医学的使用のための生物学的治療薬、特にイヌ、ネコ、ウシ、又はウマなどのコンパニオンアニマルの治療における使用のための融合タンパク質を提供する。
【００３５】
第１の態様では、本発明は、単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分に関する。
【００３６】

本明細書で使用される場合、ｐ７５ＮＴＲタンパク質という用語は、ＮＧＦ及び／又は他のニューロトロフィン（ＢＤＮＦ、ＮＴ－３及び／又はＮＴ－４／５）を結合するｐ７５ＮＴＲタンパク質を指す。本明細書で使用される場合、これは、タンパク質がＮＧＦに結合し、ＮＧＦ生物学的活性及び／又はＮＧＦシグナル伝達によって媒介される下流の経路を阻害することができることを意味する。ＮＧＦ結合タンパク質は、ＮＧＦシグナル伝達によって媒介される下流経路を含むＮＧＦ生物学的活性を低減し、及び／又は循環中の、その受容体ｔｒｋＡ及びＮＧＦＲ（ｐ７５ＮＴＲ）に結合することができるＮＧＦの量を低減する。

【００３７】

本明細書で使用される「コンパニオンアニマル」という用語は、イヌ、ネコ、又はウマを指す。一実施形態では、コンパニオンアニマルは、イヌである。別の実施形態では、治療される動物は、ウシ又はブタであってもよい。

【００３８】

「単離された」タンパク質又はポリペプチドという用語は、異なる抗原特異性を有する他のタンパク質又はポリペプチドを実質的に含まないタンパク質又はポリペプチドを指す。更に、タンパク質又はポリペプチドは、他の細胞物質及び／又は化学物質を実質的に含まないであろう。したがって、本明細書に記載のタンパク質、核酸、及びポリペプチドは、好ましくは単離されている。したがって、本明細書で使用される場合、「単離された」タンパク質又はポリペプチドは、その天然の細胞培養環境の構成要素から同定され、分離され、かつ／又は回収されたタンパク質又はポリペプチドを意味する。その天然の環境の混入構成要素は、タンパク質又はポリペプチドのための診断的又は治療的使用を妨げるであろう物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質性又は非タンパク質性溶質を挙げることができる。

【００３９】

「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、互換的に使用され、アミノ酸残基のポリマーを指し、最小長に限定されない。ペプチド、オリゴペプチド、二量体、多量体などもまた、ペプチド結合によって連結された直鎖状に配置されたアミノ酸から構成され、生物学的に、組換え的に、又は合成的に産生されるかどうか、及び天然に存在するアミノ酸から構成されるか、又は天然に存在しないアミノ酸から構成されるかどうかは、この定義に含まれる。全長タンパク質及びその断片の両方が、定義に包含される。これらの用語はまた、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、タンパク質分解切断（例えば、フリン又はメタロプロテアーゼ及びプロホルモン変換酵素（ＰＣ）による切断）などの、ポリペプチドの共翻訳修飾及び翻訳後修飾も含む。更に、本発明の目的のために、「ポリペプチド」は、タンパク質が所望の活性を維持する限り、天然配列への、欠失、付加、及び置換（当業者に既知であるように、概して本質的に保存的である）などの改変を含むタンパク質を包含する。これらの改変は、部位特異的変異導入などによって意図的であり得るか、又はタンパク質を産生する宿主の変異、若しくはＰＣＲ増幅若しくは他の組換えＤＮＡ方法によるエラーなどによって偶発的であり得る。ポリペプチド又はタンパク質は、ペプチド結合によって連結された直鎖状に配置されたアミノ酸で構成されるが、ペプチドとは対照的に、明確に定義されたコンフォメーションを有する。

【００４０】

ペプチドとは対照的に、タンパク質は、一般に、５０以上のアミノ酸の鎖からなる。本発明の目的のために、本明細書で使用される「ペプチド」という用語は、典型的には、Ｄ－アミノ酸若しくはＬ－アミノ酸の一本鎖、又はペプチド結合によって結合されたＤ－アミノ酸及びＬ－アミノ酸の混合物からなるアミノ酸の配列を指す。一般に、ペプチドは、少なくとも２つのアミノ酸残基を含有し、約５０アミノ酸未満の長さである。

【００４１】

本明細書における「アミノ酸」とは、特定の定義された位置に存在し得る２０種の天然に存在するアミノ酸又は任意の非天然類似体のうちの１つを意味する。アミノ酸は、天然

に存在するアミノ酸及び合成アミノ酸の両方を包含する。ただし、ほとんどの場合、タンパク質が組換え的に産生される場合、天然に存在するアミノ酸のみが使用される。

【００４２】

一実施形態では、単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質は、イヌ、ネコ又はウシのｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分若しくはバリアントを含むか、又はそれからなる。したがって、一実施形態では、単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質は、配列番号１、３、５若しくは３６、その一部分若しくはバリアント、又は一部分のバリアントを含むか、又はそれからなる。

【００４３】

天然形態のｐ７５ニューロトロフィン受容体ｐ７５ＮＴＲは、膜貫通糖タンパク質として存在する。ファミリーメンバーは、リガンド結合のための複数のシステインリッチドメイン、単一の膜貫通配列細胞外ドメイン（ＥＣＤ）、及び非触媒性細胞質ドメインを特徴とする。

【００４４】

ｐ７５ＮＴＲの内因性可溶性ＥＣＤは、ＥＣＤの膜接合部の近くでタンパク質を切断するα－セクレターゼ及びγ－セクレターゼによって調節されたタンパク質分解によって産生される。これは、ＮＧＦシグナル伝達に対する天然アンタゴニストとしてＮＧＦを自由に結合する細胞質ドメインの放出をもたらす切断である。

【００４５】

一実施形態では、単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分は、細胞外ドメイン（ＥＣＤ）、又はその一部若しくはそのバリアントを含むか、又はそれからなる。一実施形態では、単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分は、細胞外ドメイン（ＥＣＤ）を含むか、又はそれからなる。一実施形態では、単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分は、ＥＣＤに隣接するコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）及び追加のＣ末端アミノ酸を含む。例えば、コンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質の部分は、ＥＣＤ及びＥＣＤに隣接するコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質の少なくとも１～５個又は５～１０個のアミノ酸、例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０個のＣ末端アミノ酸、又はＥＣＤ及び少なくとも１０～２０個のアミノ酸、又はＥＣＤ及び少なくとも２０～３０個のアミノ酸、又はＥＣＤ及び少なくとも３０～４０個のアミノ酸、又はＥＣＤ及び少なくとも４０～５０個のアミノ酸、又はＥＣＤ及び少なくとも５０～６０個のアミノ酸、又はＥＣＤ及び少なくとも６０～７０個のアミノ酸、又はＥＣＤ及び少なくとも７０～８０個のアミノ酸、又はＥＣＤ及び少なくとも８０～９０個のアミノ酸、又はＥＣＤ及び少なくとも９０～１００個のアミノ酸、又はＥＣＤ及び少なくとも１００～１１０個のアミノ酸、又はＥＣＤ及び少なくとも１１０～１２０個のアミノ酸、又はＥＣＤ及び少なくとも１２０～１３０個のアミノ酸、又はＥＣＤ及び少なくとも１３０～１４０個のアミノ酸、又はＥＣＤ及び少なくとも１４０～１５０個のアミノ酸、又はＥＣＤ及び少なくとも１５０～１６０個のアミノ酸、又はＥＣＤ及び少なくとも１６０～１７０個のアミノ酸、又はＥＣＤ及びＥＣＤに隣接するコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質の少なくとも１７０～１８０個のアミノ酸であるＣ末端アミノ酸を含んでもよい。

【００４６】

一実施形態では、ＥＣＤ内のα－セクレターゼ及びγ－セクレターゼ切断部位は除去される。一実施形態では、ストーク領域が除去される。一実施形態では、ＥＣＤ内のストーク領域、並びにα－セクレターゼ及びγ－セクレターゼ切断部位を除去する。

【００４７】

一実施形態では、単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲ細胞外ドメインはイヌ由来であり、配列番号７又はそのバリアント若しくはその一部分、例えば、配列番号３４を含むか、又はそれからなる。

【００４８】

別の実施形態では、単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲ細胞外ドメインはネコ由来であり、配列番号３８又はそのバリアント若しくはその一部分を含むか、若しくはそれからなる。

【００４９】

ｐ７５ＮＴＲのＥＣＤは、Ｏ－グリコシル化される傾向があるストーク領域（例えば、配列番号９、イヌストーク領域）を有する。タンパク質中のグリコシル化は、製造上の困難を引き起こす可能性がある。したがって、一実施形態では、単離されたコンパニオンアニマルＥＣＤは、例えば、短縮型ストーク領域を形成するために、ストーク領域内のＯ－グリコシル化部位の数を減少させるべく、ストーク領域内に欠失を含み得る。短縮型ストーク領域は、ストーク領域の任意の数のアミノ酸を含み得る。例えば、ストーク領域は、１～１０、１～２０、１～３０個のアミノ酸を含み得る。ストーク領域は、本明細書に記載の融合タンパク質の実施形態において除去され得る。したがって、本明細書で使用される場合、ＥＣＤの一部分は、ストーク領域及び３’配列α－セクレターゼ及びγ－セクレターゼ切断部位を伴わないＥＣＤ（例えば、イヌ配列配列番号３４）であり得る。

【００５０】

したがって、一実施形態では、単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲは、Ｏ－グリコシル化ストーク部領域を除去した短縮型タンパク質である。

【００５１】

一実施形態では、単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質は、野生型タンパク質と比較して１つ以上のアミノ酸改変を含む野生型タンパク質のバリアントであり得る。改変は、アミノ酸の置換、欠失、又は付加であり得る。

【００５２】

本明細書で「バリアント」又は「変異体」とは、少なくとも１つのアミノ酸改変により野生型配列のそれとは異なるポリペプチド配列を意味する。本明細書で使用される場合、本明細書に記載のタンパク質又はポリペプチドのアミノ酸配列における別のアミノ酸残基による「アミノ酸残基の置換」は、別のアミノ酸残基による「アミノ酸残基を置き換えること」と等価であり、元の（例えば、野生型／生殖細胞系列）アミノ酸配列における特定の位置での特定のアミノ酸残基が異なるアミノ酸残基によって置き換えられている（又は置換されている）ことを示す。これは、当業者に利用可能な標準的な技術、例えば、組換えＤＮＡ技術を使用して行うことができる。アミノ酸は、野生型（ｗｔ）における自然界に見出されるような天然の（野生型／生殖細胞系列）配列と比較して変化するが、天然の配列と比較して他の変化を含有するＩｇＧ分子において作製され得る。

【００５３】

本明細書で使用されるｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分のバリアントは、ＮＧＦに結合する野生型タンパク質の生物学的機能を保持する。

【００５４】

アミノ酸改変は、一般に、置換、挿入、及び欠失を指し、かつそれらを含み、多くの場合、前者が好ましい。本発明のバリアントは、アミノ酸置換を含み、本明細書に記載されるように、タンパク質の機能が依然として存在する限り、それらは任意の数の更なる改変を含むことができる。一実施形態では、一般に、最小数の改変で機能を変更することが目標である場合が多いため、１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０個の改変が一般的に利用される。バリアントポリペプチド配列は、好ましくは、野生型配列又は親配列に対して少なくとも約８０％、８５％、９０％、９５％、又は最大９８％若しくは９９％の同一性を有する。配列のサイズに応じて、同一性パーセントはアミノ酸の数に依存することに留意すべきである。バリアントは、ヒト配列を含まない。

【００５５】

本明細書における「タンパク質バリアント」又は「バリアントタンパク質」とは、少なくとも１つのアミノ酸改変により野生型タンパク質とは異なるタンパク質を意味する。親ポリペプチドは、天然に存在するか、又は野生型（ＷＴ）ポリペプチドであってもよく、又はＷＴポリペプチドの改変されたバージョンであってもよい。バリアントポリペプチド

とは、ポリペプチド自体、ポリペプチドを含む組成物、又はそれをコードするアミノ配列を指し得る。好ましくは、バリアントポリペプチドは、親ポリペプチドと比較して少なくとも１つのアミノ酸改変、例えば、親と比較して約１～約１０個のアミノ酸改変、好ましくは約１～約５個のアミノ酸改変を有する。本明細書のバリアントポリペプチド配列は、好ましくは、親ポリペプチド配列と少なくとも約８０％の同一性、及び最も好ましくは少なくとも約９０％の同一性、より好ましくは少なくとも約９５％の同一性を有する。バリアントは、ヒト配列を含まない。

【００５６】

本明細書で使用される場合、「親ポリペプチド」、「親タンパク質」とは、バリアントを生成するようにその後に改変される非改変ポリペプチドを意味する。当該親ポリペプチドは、天然に存在するポリペプチド、又は天然に存在するポリペプチドのバリアント若しくは操作されたバージョンであってもよい。親ポリペプチドとは、ポリペプチド自体、親ポリペプチドを含む組成物、又はそれをコードするアミノ酸配列を指し得る。

【００５７】

本明細書における「野生型」又は「ＷＴ」、「ｗｔ」又は「天然」とは、対立遺伝子変異を含む、自然界に見出されるアミノ酸配列又はヌクレオチド配列を意味する。ＷＴタンパク質、ポリペプチド、Ｆｃドメイン、免疫グロブリンなどは、意図的に改変されていないアミノ酸配列又はヌクレオチド配列を有する。

【００５８】

別の態様では、本発明は、コンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分、例えば、ＥＣＤ若しくはその一部分又はバリアントをコードする単離された核酸に関する。本明細書で使用される場合、ｐ７５ＮＴＲの一部分又はｐ７５ＮＴＲのＥＣＤの一部分は、少なくとも１つのニューロトロフィン結合ドメインを含む。一実施形態では、コンパニオンアニマルはイヌである。例えば、単離された核酸は、配列番号２、４、６、８若しくは３７、又はそのバリアント若しくはその一部分を含むか、又はそれからなる。

【００５９】

「単離された核酸分子」とは、ゲノム、ｍＲＮＡ、ｃＤＮＡ、若しくは合成起源のＤＮＡ若しくはＲＮＡ、又はそれらのある組み合わせであって、単離されたポリヌクレオチドが自然界に見出されるポリヌクレオチドの全て若しくは一部と会合していないか、又は単離されたポリヌクレオチドが自然界では連結されていないポリヌクレオチドに連結されているものを意味する。

【００６０】

別の態様では、本発明は、コンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分、例えば、上記のＥＣＤ又はその一部分をコードする核酸を含む、ベクター、プラスミド、転写、発現カセット又は核酸構築物に関する。

【００６１】

構築物は、好適なリーダー配列を含み得る。リーダー配列という用語は、シグナル配列と交換可能に使用される。したがって、いくつかの実施形態は、融合タンパク質をコードする核酸配列／核酸構築物も、リーダー配列を含み得る。リーダー配列は、タンパク質の一部として作製され、タンパク質が分泌されると切断される。関連する種（例えば、イヌ、ウマ、ネコ、ウシ）の内因性ｐ７５リーダー、異なる種（例えば、ヒト、イヌ、ウマ、ネコ、ウシ又はマウスＩｇＧリーダー）の内因性ｐ７５リーダー、又は当技術分野で既知の別のリーダー配列、例えば、Ｃａｍｐａｔｈリーダー配列（ＵＳ８，３６２，２０８Ｂ２を参照されたい）、又は人工配列などの、天然免疫グロブリン生殖細胞系リーダー配列を含む、任意の好適なリーダー配列を使用してもよい。そのようなリーダー配列は、タンパク質発現の増強を助けることができる。

【００６２】

別の態様では、本発明は、コンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質若しくはその一部分、例えば、ＥＣＤをコードする核酸、又は上記のベクター、プラスミド、ベクター、転写、発現カセット若しくは構築物を含む、宿主細胞に関する。

【００６３】
本発明で使用する発現ベクターは、市販のベクターなどの出発ベクターから構築され得る。ベクターが構築され、核酸分子がベクターの適切な部位に挿入された後、完成したベクターは、増幅及び／又はポリペプチド発現のために好適な宿主細胞に挿入され得る。
【００６４】
「ベクター」という用語は、宿主細胞において目的の１つ以上の遺伝子又は配列を送達することができ、いくつかの態様では、発現することができる構築物を意味する。ベクターの例としては、限定されないが、ウイルスベクター、裸のＤＮＡ又はＲＮＡ発現ベクター、プラスミド、コスミド又はファージベクター、カチオン性縮合剤に関連するＤＮＡ又はＲＮＡ発現ベクター、リポソームに封入されたＤＮＡ又はＲＮＡ発現ベクター、並びにプロデューサー細胞などの真核細胞が挙げられる。
【００６５】
本発明はまた、上記の１つ以上の核酸分子プラスミド、ベクター、転写又は発現カセットを含む、単離された組換え宿主細胞に関する。発現ベクターの選択された宿主細胞への形質転換は、トランスフェクション、感染、リン酸カルシウム共沈殿、電気穿孔、マイクロインジェクション、リポフェクション、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介トランスフェクション、又は他の既知の技術を含む既知の方法によって達成され得る。選択される方法は、部分的には、使用される宿主細胞のタイプの関数である。
【００６６】
宿主細胞は、真核又は原核細胞、例えば、細菌、ウイルス、植物、真菌、哺乳動物、又は他の好適な宿主細胞であり得る。一実施形態では、細胞は、大腸菌細胞である。別の実施形態では、細胞は、酵母細胞である。別の実施形態では、細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ＨｅＬａ細胞、又は当業者に明らかであろう他の細胞である。発現用の宿主として利用可能な哺乳動物細胞株は、当技術分野で周知であり、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）から入手可能な不死化細胞株を含むが、これらに限定されず、当技術分野で既知の発現システムで使用される任意の細胞株を使用して、本発明の組換えポリペプチドを作製することができる。
【００６７】
一般に、宿主細胞は、タンパク質をコードするＤＮＡを含む組換え発現ベクターで形質転換される。用いられ得る宿主細胞の中には、原核生物、酵母又は高等真核細胞がある。原核生物には、グラム陰性又はグラム陽性生物、例えば、大腸菌又は桿菌が含まれる。高等真核細胞には、昆虫細胞及び哺乳動物起源の樹立細胞株が含まれる。好適な哺乳動物宿主細胞株の例としては、ＣＯＳ－７細胞、Ｌ細胞、ＣＩ２７細胞、３Ｔ３細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、又はそれらの誘導体、及び血清遊離培地中で増殖する関連細胞株、ＨｅＬａ細胞、ＢＨＫ細胞株、ＣＶＩＩＥＢＮＡ細胞株、２９３、２９３ＥＢＮＡ又はＭＳＲ　２９３などのヒト胎児腎臓細胞、ヒト表皮Ａ４３１細胞、ヒトＣｏｌｏ２０５細胞、他の形質転換霊長類細胞株、正常二倍体細胞、一次組織のインビトロ培養に由来する細胞株、一次外植物、ＨＬ－６０、Ｕ９３７、ＨａＫ又はＪｕｒｋａｔ細胞が挙げられる。任意選択的に、例えば、ＨｅｐＧ２／３Ｂ、ＫＢ、ＮＩＨ　３Ｔ３又はＳ４９などの哺乳動物細胞株は、様々なシグナル伝達又はレポーターアッセイでポリペプチドを使用することが望ましい場合に、ポリペプチドの発現のために使用することができる。
【００６８】
他の好適な宿主細胞としては、バキュロウイルスなどの発現系を用いた昆虫細胞、植物細胞、トランスジェニック植物及びトランスジェニック動物、ウイルス及び核酸ベクターによるものが挙げられる。
【００６９】
あるいは、真菌細胞株及び酵母などの下等真核生物、又はバクテリアなどの原核生物中でポリペプチドを産生することが可能である。好適な酵母としては、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ、Ｓ．ｐｏｍｂｅ、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ株、Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒ

ｉｓ、Ｃａｎｄｉｄａ、又は異種ポリペプチドを発現することができる任意の酵母株が挙げられる。好適な細菌株としては、大腸菌、枯草菌、Ｓ．ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ、又は異種ポリペプチドを発現することができる任意の細菌株が挙げられる。タンパク質が酵母又は細菌中で作製される場合、機能的生成物を得るために、例えば、適切な部位のリン酸化又はグリコシル化によって、その中で産生される生成物を改変することが望ましい場合がある。そのような共有結合は、既知の化学的又は酵素的方法を使用して達成することができる。

【００７０】

宿主細胞は、適切な条件下で培養すると、タンパク質を発現させるために使用することができ、タンパク質は、その後、培養培地から収集することができる（宿主細胞が培地中に分泌する場合）か、又は宿主細胞から直接収集することができる（分泌されない場合）。適切な宿主細胞の選択は、所望の発現レベル、活性に望ましい又は必要なポリペプチド改変（グリコシル化又はリン酸化など）、及び生物学的に活性な分子への折り畳みの容易さなどの様々な因子に依存する。

【００７１】

別の態様では、本発明はまた、別の部分、例えば、以下により詳細に記載される半減期延長部分を有する融合タンパク質としての、上記の単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分の使用に関する。したがって、ｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分は、半減期延長部分に共有結合又はカップリングして提供され得る。あるいは、それは、リポソームに組み込まれて提供されてもよい。本発明は更に、治療における使用のための、単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分に関する。更に、疼痛関連疾患の治療に使用するための単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分が提供される。そのような疾患は、以下により詳細に記載される。

【００７２】

いくつかの実施形態では、その薬物動態（ＰＫ）特性を改善するために、ｐ７５ＮＴＲタンパク質の半減期が延長される。

【００７３】

融合タンパク質

したがって、別の態様では、本発明は、単離されたコンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分、例えば、上述の細胞外ドメイン及び別の部分を含む、融合タンパク質に関する。

【００７４】

例えば、この別の部分は、半減期延長部分であり得る。したがって、ｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分は、半減期延長部分にカップリングされている。上述のように、ｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分は、イヌ、ネコ、又はウマ由来であり得る。したがって、融合タンパク質に使用されるｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分は、配列番号１、３、５、７、３４、３６若しくは３８から選択される配列、又はその一部分若しくはバリアントを含むか、又はそれからなり得る。イヌｐ７５ＮＴＲタンパク質又は一部分の一実施形態では、ストーク領域（例えば、配列番号９）が除去される。

【００７５】

半減期延長部分は従前に記載されている。例えば、半減期延長部分は、以下の非限定的なリストから選択され得る：コンパニオンアニマル免疫グロブリンＦｃドメイン、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ＰＥＧ誘導体、単純脂質、脂質ジカルボン酸、追加の部分を有する脂質、コンパニオンアニマル血清アルブミン結合因子、例えば、小分子結合因子若しくはコンパニオンアニマル血清アルブミンを結合する抗体／抗体断片、コンパニオンアニマル血清アルブミン、又は連鎖球菌タンパク質Ｇのアルブミン結合ドメイン（ＡＢＤ）。脂質の例としては、グルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ－１）、類似体ＧＬＰ－１リラグルチド、及びセマグルチド又はコレステロールが挙げられる。有利には、免疫グロブリンＦｃドメインを使用することは、タンパク質の精製を容易にする。特に、プロテインＡ

へのＦｃ結合は、精製手順で使用され得る。免疫グロブリンＦｃドメインの存在はまた、融合タンパク質の全体的な折り畳みを安定化し、その半減期を延長することができる。

【００７６】

半減期延長部分が、コンパニオンアニマルＦｃドメイン、コンパニオンアニマル血清アルブミン結合因子、又はコンパニオンアニマル血清アルブミンである一実施形態では、ｐ７５ＮＴＲタンパク質又は一部分及び半減期延長部分は、同じコンパニオンアニマルに由来する／特異的である。例えば、一実施形態では、半減期延長部分は、対応するコンパニオンアニマルのコンパニオンアニマルＦｃドメインである。例えば、ｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分、例えば、細胞外ドメインがイヌ由来である場合、Ｆｃドメインは、イヌ由来のＦｃドメインである。ｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分、例えば、細胞外ドメインがネコ由来である場合、Ｆｃドメインはネコ由来のＦｃドメインである。ｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分、例えば、細胞外ドメインがウマ由来である場合、Ｆｃドメインはウマ由来のＦｃドメインである。ｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分、例えば、細胞外ドメインがウシ由来である場合、Ｆｃドメインはウシ由来のＦｃドメインである。

【００７７】

しかしながら、コンパニオンアニマルｐ７５タンパク質間の高い配列類似性を考えると、別の実施形態では、半減期延長部分が、コンパニオンアニマルＦｃドメイン、コンパニオンアニマル血清アルブミン結合因子、又はコンパニオンアニマル血清アルブミンである場合、ｐ７５ＮＴＲタンパク質又は部分及び半減期延長部分は、同じコンパニオンアニマルに由来しない／特異的ではない。例えば、一実施形態では、半減期延長部分は、対応するコンパニオンアニマルのコンパニオンアニマルＦｃドメインであるが、ｐ７５タンパク質又はその一部分は、異なるコンパニオンアニマルのものである。例えば、イヌの治療のために、Ｆｃドメインがイヌ由来のＦｃドメインである場合、ｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分、例えば、細胞外ドメインは、異なる動物、例えば、ネコ、ウマ又はウシに由来し得る。例えば、ネコの治療のために、Ｆｃドメインがネコ由来のＦｃドメインである場合、ｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分、例えば、細胞外ドメインは、異なる動物、例えば、イヌ、ウシ、又はウマに由来し得る。例えば、ネコの治療のために、Ｆｃドメインがウマ由来のＦｃドメインである場合、ｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分、例えば、細胞外ドメインは、異なる動物、例えば、ネコ、ウシ、イヌに由来し得る。更に別の実施形態では、コンパニオンアニマルＦｃに融合したヒトｐ７５又はその一部分を使用することができる。

【００７８】

コンパニオンアニマル血清アルブミン結合因子、例えば、抗体又はその断片は、イヌ由来又はイヌ化されたもの、ネコ由来又はネコ化されたもの、ウマ由来又はウマ化されたものであってもよい。コンパニオンアニマル血清アルブミン結合因子は、イヌ、ネコ、又はウマ血清アルブミンに結合し得る。

【００７９】

一実施形態では、半減期延長部分は、野生型又はバリアントＦｃドメインである。バリアントという用語は、上で定義される通りである。例えば、Ｆｃドメインバリアントは、野生型Ｆｃドメインと比較して、改変された半減期を有し得る。一実施形態では、Ｆｃドメインは、イヌＦｃドメイン、すなわち、野生型ドメイン又はそのバリアントである。バリアントＦｃドメインは、例えば、ＷＯ２０２０／１４２６２５に記載されている。

【００８０】

本明細書で使用される場合、「Ｆｃ」又は「Ｆｃ領域」又は「Ｆｃドメイン」は、第１の定常領域免疫グロブリンドメイン（ＣＨ１）を除く抗体の定常領域、及び場合によってはヒンジの一部を含むポリペプチドを意味する。一実施形態では、Ｆｃドメインは、定常領域免疫グロブリンドメインＣＨ２、ＣＨ３、及びＣＨ１とＣＨ２との間のヒンジ領域、又はヒンジ領域の一部を含む。

【００８１】

抗体のタンパク質分解消化は、Ｆｖ（断片可変）、Ｆａｂ（断片抗原結合）、及びＦｃ（断片結晶化）と称される異なる断片を放出する。Ｆｃ断片は、ジスルフィドによって一緒に保持される両方のＨ鎖のカルボキシ末端部分を含む。Ｆｃ断片の定常ドメインは、抗体のエフェクター機能を媒介することに関与する。

【００８２】

イヌでは、Ａ、Ｂ、Ｃ、及びＤと称される４つのＩｇＧ重鎖が存在する。これらの重鎖は、ＩｇＧ－Ａ、ＩｇＧ－Ｂ、ＩｇＧ－Ｃ、及びＩｇＧ－Ｄと称される、イヌＩｇＧの４つの異なるサブクラスを表す。これらの４つの重鎖のＤＮＡ及びアミノ酸配列は、Ｔａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（Ｖｅｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｐａｔｈｏｌ．８０：２５９－２７０（２００１））によって最初に特定された。これらの重鎖についての例示的なアミノ酸及びＤＮＡ配列はまた、ＧｅｎＢａｎｋデータベースからも入手可能である（ＩｇＧＡ：受託番号ＡＡＬ３５３０１．１、ＩｇＧＢ：受託番号ＡＡＬ３５３０２．１、ＩｇＧＣ：受託番号ＡＡＬ３５３０３．１、ＩｇＧＤ：受託番号ＡＡＬ３５３０４．１）。本発明者によって並びに本発明の態様及び実施形態に従って使用されるＩｇＧ－Ａ、ＩｇＧ－Ｂ、ＩｇＧ－Ｃ及びＩｇＧ－Ｄのアミノ酸配列を、配列番号１５、１６、１７、１８として提供する）。

【００８３】

ヒトにおいて、Ｆｃは、ＩｇＡ、ＩｇＤ、及びＩｇＧの最後の２つの定常領域免疫グロブリンドメイン、ＩｇＥ及びＩｇＭの最後の３つの定常領域免疫グロブリンドメイン、並びにこれらのドメインに対する可動性ヒンジＮ末端を指す。ＩｇＡ及びＩｇＭの場合、Ｆｃは、Ｊ鎖を含み得る。ＩｇＧの場合は、Ｆｃドメインは、免疫グロブリンドメインＣＨ２及びＣＨ３、並びにＣＨ１とＣＨ２との間の下部ヒンジ領域を含む。Ｆｃ領域の境界は異なり得るが、ヒトＩｇＧ重鎖Ｆｃ領域は、通常、そのカルボキシ末端に残基Ｃ２２６又はＰ２３０を含むと定義され、番号付けはＫａｂａｔにおけるようなＥＵインデックスに従う。

【００８４】

本明細書で使用される場合、Ｆｃは、本明細書に記載されるように、単独でのＦｃ領域、又はＦｃ融合（「融合構成物」若しくは「融合構築物」）との関連でのこの領域を指し得る。Ｆｃドメインは、Ｆｃ領域の全部又は一部を含み、すなわち、Ｎ又はＣ末端配列は、機能に影響を与えない限り、野生型又はバリアントＦｃドメインから除去され得る。

【００８５】

簡潔に述べると、ＩｇＧ機能は、一般に、ＩｇのＦｃ領域と、Ｆｃγ受容体（ＦｃγＲ）又は別の結合分子との間の相互作用を介して、時にはエフェクター細胞上で達成される。これは、抗体がそれらの可変（Ｖ）領域を通して結合される標的細胞を殺傷するようにエフェクター細胞を誘発することができる。また、可溶性抗原に対する抗体はｃγＲに対する標的となる免疫複合体を形成することができ、この免疫複合体の取り込み（オプソニン化）、又はエフェクター細胞の誘発及びサイトカインの放出を生じさせる。

【００８６】

本明細書で使用される場合、「Ｆｃガンマ受容体」、「ＦｃγＲ」、又は「ＦｃガンマＲ」とは、ＩｇＧ抗体Ｆｃ領域を結合し、かつＦｃγＲ遺伝子によってコードされるタンパク質ファミリーの任意のメンバーを意味する。

【００８７】

ヒトでは、ＦｃγＲの３つのクラスが特徴付けられているが、複数の受容体形態の発生によって、状況は更に複雑になっている。３つのクラスは次の通りである。

（ｉ）アイソフォームＦｃγＲＩａ、ＦｃγＲＩｂ、及びＦｃγＲＩｃを含むＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）は、高い親和性でモノマーＩｇＧを結合し、マクロファージ、単球、並びに場合によっては好中球及び好酸球上で発現される；

（ｉｉ）ＦｃγＲＩＩ（ＣＤ３２）は、複合体化ＩｇＧを中～低親和性で結合し、広く発現される。これらの受容体は、２つの重要なタイプ、ＦｃγＲＩＩａ及びＦｃγＲＩＩｂに分類することができる。受容体の「ａ」形態は、殺傷に関与する多くの細胞（例えば、

マクロファージ、単球、好中球）上に見られ、殺傷プロセスを活性化させることができるようであり、２つの代替対立遺伝子として生じる。「ｂ」形態は、阻害プロセスに役割を果たすようであり、Ｂ細胞、マクロファージ、並びに肥満細胞及び好酸球上に見られる。Ｂ細胞上では、「ｂ」形態は、更なる免疫グロブリン産生、及び、例えば、ＩｇＥクラスへのアイソタイプ切り替えを抑制するように機能するようである。マクロファージ上では、ｂ形態は、ＦｃγＲＩＩａを介して媒介されるような貪食を阻害するように作用する。好酸球及び肥満細胞上では、ｂ形態は、ＩｇＥがその別個の受容体に結合することにより、これらの細胞の活性化を抑制するのに役立ち得る。

（ｉｉｉ）ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）は、中～低親和性でＩｇＧを結合し、２つのタイプとして存在する。ＦｃγＲＩＩＩａは、ＮＫ細胞、マクロファージ、好酸球、並びにいくつかの単球及びＴ細胞上に見られ、ＡＤＣＣを媒介する。ＦｃγＲＩＩＩｂは、好中球上で高度に発現される。両方のタイプは、異なるアロタイプ形態を有する。

【００８８】

イヌＦｃ受容体は、Ｂｅｒｇｅｒｏｎ ｅｔ ａｌ Ｌ．Ｍ．Ｂｅｒｇｅｒｏｎ ｅｔ ａｌ．；Ｖｅｔｅｒｉｎａｒｙ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｐａｔｈｏｌｏｇｙ １５７（２０１４）３１－４１に記載されている。イヌはＲＩ、ＲＩＩｂ、ＲＩＩＩを持っているが、ＲＩＩａは持っていない。

【００８９】

ＦｃγＲへの結合だけでなく、ＩｇＧ抗体は補体を活性化させることができ、これはまた、細胞溶解、オプソニン化、又はサイトカイン放出及び炎症をもたらすことができる。Ｆｃ領域はまた、ＩｇＧの新生児への輸送（いわゆる「ＦｃＲｎ」を介して）、増加した半減期（ＦｃＲｎ型受容体を介してもたらされるとも考えられる）、及び自己凝集などの特性を媒介する。Ｆｃ領域はまた、プロテインＡ及びプロテインＧとの相互作用を担っている（この相互作用はＦｃＲｎの結合に類似しているように見える）。

【００９０】

本明細書で使用される「エフェクター機能」とは、抗体Ｆｃ領域とＦｃ受容体又はリガンドとの相互作用から生じる生化学的事象を意味する。エフェクター機能には、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）、抗体依存性細胞媒介性貪食性（ＡＤＣＰ）、及び補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）が含まれるが、これらに限定されない。

【００９１】

一実施形態では、コンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分、例えば、細胞外ドメイン及び他の部分は、リンカー部分と連結されているか、あるいは別の方法でコンジュゲートされるか、結合されるか、又は共有結合若しくは非共有結合されている。好適なリンカーは、当業者に既知である。例えば、リンカーは、グリシン及び／又はアラニン及び／又はスレオニン及び／又はセリンリッチリンカーなどのペプチドリンカー、例えば、$(G_4S)_n$などのグリシン－セリンリンカーであり、式中、ｎは１～４である。

【００９２】

別の実施形態では、リンカーは、切断可能であり得る。

【００９３】

一実施形態では、コンパニオンアニマルｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分は、イヌｐ７５ＮＴＲ ＥＣＤ又はその一部分を含むか、又はそれからなる。一実施形態では、ＥＣＤは、配列番号７又はそのバリアントからなる（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ ｏｆ ｃｏｎｓｉｓｔｓ ｏｆ）。

【００９４】

したがって、一実施形態では、本発明は、イヌＦｃドメインに連結されたイヌｐ７５ＮＴＲ ＥＣＤを含む、融合タンパク質に関する。一実施形態では、ＥＣＤは、配列番号７又はそのバリアントを含む、又はそれらからなる。

【００９５】

一実施形態では、本発明の融合タンパク質は、好ましくは、約ｌｐＭ～約１００ｎＭの

結合親和性（Ｋｄ）で、ＮＧＦ、ＢＤＮＦ、ＮＴ３、又はＮＴ４／５のうちのいずれか１つ以上に結合する。いくつかの好ましい実施形態では、結合親和性（Ｋｄ）は、本明細書に記載されるようなＮＧＦ、ＢＤＮＦ、ＮＴ３、又はＮＴ４／５についてのインビトロ結合アッセイで測定される場合に、約５ｐＭから、１０ｐＭ、２０ｐＭ、４０ｐＭ、５０ｐＭ、１００ｐＭ、０．２ｎＭ、０．５ｎＭ、ｌｎＭ、１．５ｎＭ、２ｎＭ、２．５ｎＭ、３ｎＭ、３．５ｎＭ、４ｎＭ、４．５ｎＭ、５ｎＭ、５．５ｎＭ、６ｎＭ、６．５ｎＭ、７ｎＭ、７．５ｎＭ、８ｎＭ、８．５ｎＭ、９ｎＭ、９．５ｎＭ、１０ｎＭ、１５ｎＭ、２０ｎＭ、２５ｎＭ、３０ｎＭ、３５ｎＭ、４０ｎＭ、４５ｎＭ、５０ｎＭ、又は１００ｎＭのうちのいずれかまでである。ナノモル以下の範囲が好ましい。

【００９６】

一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号１１若しくは１３又はそのバリアントを含むか、又はそれらからなる。これらの融合タンパク質は、図１に示すように、イヌＦｃドメインに作動可能に連結されたｐ７５　ＥＣＤを含む。配列番号１１の構築物中のＦｃドメインは、野生型イヌＦｃドメインである。配列番号１３の構築物中のＦｃドメインは、半減期を増加させるように改変されているバリアントイヌＦｃドメインである。このドメインでは、変異ＹＴＥは、ＥＵ番号付けを使用して、野生型Ｆｃドメインの残基Ｙ２５２～Ｔ２５４に導入されている。

【００９７】

別の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号３９を含むか、又は配列番号３９からなる。そのような融合タンパク質は、ネコＦｃドメインに作動可能に連結されたｐ７５　ＥＣＤを含む。配列番号３９の構築物中のＦｃドメインは、野生型ネコＦｃドメインである。

【００９８】

したがって、この変異を含む改変されたコンパニオンアニマルのＦｃドメイン、例えば、イヌ、ネコ又はウマのＦｃドメインは、本発明の融合タンパク質において使用され得る。当業者は、半減期を増加させる任意の他の既知の変異もまた、Ｆｃドメインに導入され得ることを知っているであろう。

【００９９】

本発明によれば、融合タンパク質は、改善された溶解度、安定性、及び／又は改善された血清半減期を含む有利な生物学的特性を示す。改善された溶解性及び安定性は、例えば、実施例４及び９に実証される。これらの実施例は、記載された分子が温度及び化学的ストレスの両方において非常に安定であることを示し、７０℃を超える温度でインキュベートされたときにのみアンフォールディングが示され、Ｔｍ１が６７℃前後で９５℃まで凝集しない。改善された半減期は、例えば、実施例１１及び１２に実証される。改善された半減期は、より少ない頻度の投薬を可能にする（毎日の投与が必要とされる既存の治療と比較して単回投与）。この効果は、強力な鎮痛効果によって実証される。一実施形態では、本発明の融合タンパク質は、約２、４、６、８，１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２，１５４、１５６、１５８、１６０、６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７２、１７４、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１８６、１８８、１９０、１９２、１９４、１９６、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、若しくは２１０時間±１時間の、又は２、４、６、８，１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１　１

０、１　１２、１　１４、１　１６、１　１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２，１５４、１５６、１５８、１６０、６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７２、１７４、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１８６、１８８、１９０、１９２、１９４、１９６、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８、若しくは２１０時間±１時間のうちのいずれか１つを超えるインビボ半減期を有し、更に好ましくは、本発明のｐ７５ＮＴＲ（ＮＢＰ）－Ｆｃ融合タンパク質は、約２４時間又は２４時間を超えるインビボ半減期を有する。

【０１００】

別の実施形態では、本発明の融合タンパク質は、約２、４、６、８，１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２，１５４、１５６、１５８、１６０、６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７２、１７４、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１８６、１８８、１９０、１９２、１９４、１９６、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８若しくは２１０日±１日の、又は２、４、６、８，１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０、１５２，１５４、１５６、１５８、１６０、６２、１６４、１６６、１６８、１７０、１７２、１７４、１７６、１７８、１８０、１８２、１８４、１８６、１８８、１９０、１９２、１９４、１９６、１９８、２００、２０２、２０４、２０６、２０８若しくは２１０日±１日のうちのいずれかを超えるインビトロ半減期を有し、更に、融合タンパク質は、約６日若しくは６日を超えるか、又は１ヶ月を超えるインビトロ半減期を有する。一実施形態では、半減期は１４日である。

【０１０１】

前述の好ましい実施形態によれば、インビボ半減期は、ラット又は対応するコンパニオンアニマル、例えばイヌにおける半減期であり得る。

【０１０２】

本発明の融合タンパク質は、非常に低い用量で動作することができるが、非常に有効である。これは、例えば実施例１１及び１２において実証されており、ラット及びイヌにおけるＰｅｔＭＬ１１９及びＰｅｔＭＬ１２２の投与が既存の治療を上回っている。

【０１０３】

本発明によれば、融合タンパク質は、良好な安全性プロファイルを示す。これは、例えば、動物が正常な体重及び血液学的パラメータを維持し、融合タンパク質の投与後に抗薬物抗体を生成しない、実施例１２に示されている。投与後の正常体重の維持は、例えば、実施例１１にも示される。これは、経時的に体重が減少したデキサメタゾンの投与とは対照的である。

【０１０４】

別の態様では、本発明は、上述の融合タンパク質、例えば、配列番号１１、１３又は３９をコードする融合タンパク質をコードする、単離された核酸に関する。一実施形態では、この核酸は、配列番号１２、１４、又は４０から選択される。

【０１０５】

別の態様では、本発明は、上記の核酸を含む、ベクター、プラスミド、ベクター、転写

、発現カセット又は構築物に関する。
【０１０６】
別の態様では、本発明は、上記の核酸ベクター、プラスミド、ベクター、転写、発現カセット、又は構築物を含む宿主細胞に関する。好適な宿主細胞は、本明細書の別の箇所に記載される。
【０１０７】
別の実施形態では、Ｐ７５ＮＴＲタンパク質、その一部分又は融合タンパク質は、検出可能な標識又は機能的標識で標識される。標識は、フルオロフォア、蛍光体、放射性標識、酵素、化学発光体、核磁気共鳴活性標識、又は光増感剤を含むが、これらに限定されない、シグナルを産生するか、又はシグナルを産生するように誘導することができる任意の分子であり得る。したがって、結合は、蛍光又は発光、放射能、酵素活性、又は光吸光度を検出することによって検出及び／又は測定され得る。
【０１０８】
別の態様では、本発明のｐ７５ＮＴＲタンパク質若しくはその一部分、又は、融合タンパク質を含む、医薬組成物が提供される。本明細書に記載の融合タンパク質又は医薬組成物は、経口、局所、非経口、舌下、直腸、膣、眼、鼻腔内、肺、皮内、硝子体内、腫瘍内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、脳内、経皮、経粘膜、吸入による、又は局所、特に耳、鼻、眼、又は皮膚に対して、又は吸入によるものを含むが、これらに限定されない、任意の便利な経路によって投与され得る。別の実施形態では、送達は、薬物をコードする核酸の送達であり、例えば、本発明の分子をコードする核酸が送達される。
【０１０９】
非経口投与は、例えば、静脈内、筋肉内、動脈内、腹腔内、鼻腔内、直腸、膀胱内、皮内、局所、関節内、又は皮下投与を含む。好ましくは、本組成物は非経口投与される。
【０１１０】
薬学的に許容される担体又はビヒクルは、組成物が、例えば、錠剤又は粉末形態であるように、粒子状であり得る。「担体」という用語は、本発明の薬物抗体コンジュゲートとともに投与される希釈剤、アジュバント又は賦形剤を指す。そのような薬学的担体は、液体、例えば、水及び油であってもよく、石油、動物、植物又は合成由来のもの、例えば、ピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油などを含む。担体は、生理食塩水、アラビアゴム、ゼラチン、デンプンペースト、タルク、ケラチン、コロイド状シリカ、尿素などであり得る。加えて、補助剤、安定化剤、増粘剤、潤滑剤、及び着色剤を使用してもよい。一実施形態では、動物に投与される場合、本発明のポリペプチド又は組成物及び薬学的に許容される担体は、無菌である。水は、本発明の薬物抗体コンジュゲートが静脈内に投与される場合、好ましい担体である。生理食塩水溶液及びデキストロース水溶液及びグリセロール溶液もまた、液体担体として、特に注射用溶液に用いることができる。好適な薬学的担体には、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどの賦形剤も含まれる。所望な場合、本組成物はまた、少量の湿潤剤若しくは乳化剤、又はｐＨ緩衝剤を含有することができる。
【０１１１】
医薬組成物は、液体の形態、例えば、溶液、シロップ、溶液、エマルション又は懸濁液であり得る。液体は、経口投与に、又は注射、注入（例えば、ＩＶ注入）、若しくは皮下による送達に有用であり得る。
【０１１２】
経口投与を意図する場合、組成物は、固体又は液体の形態であり得、半固体、半液体、懸濁液及びゲル形態は、本明細書において固体又は液体のいずれかとして考慮される形態内に含まれる。
【０１１３】
経口投与用の固体組成物として、組成物は、粉末、顆粒、圧縮錠剤、ピル、カプセル、

チューインガム、ウエハーなどの形態で製剤化され得る。そのような固体組成物は、典型的には、１つ以上の不活性希釈剤を含有する。加えて、以下のうちの１つ以上が存在し得る：カルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、微結晶セルロース、又はゼラチンなどの結合剤、デンプン、ラクトース、又はデキストリンなどの賦形剤、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、コーンスターチなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤、コロイド状二酸化ケイ素などの流動促進剤、スクロース又はサッカリンなどの甘味剤、ペパーミント、サリチル酸メチル、又はオレンジ風味などの風味剤、及び着色剤。組成物がカプセルの形態（例えば、ゼラチンカプセル）にある場合、それは、上記のタイプの材料に加えて、ポリエチレングリコール、シクロデキストリン又は脂肪油などの液体担体を含有することができる。

【０１１４】

経口投与を意図する場合、本組成物は、甘味剤、保存剤、染料／着色剤、及び風味増強剤のうちの１つ以上を含み得る。注射による投与のための組成物において、界面活性剤、保存剤、湿潤剤、分散剤、懸濁剤、緩衝剤、安定剤、及び等張剤のうちの１つ以上も含まれ得る。

【０１１５】

組成物は、１以上の投薬単位の形態をとっていてもよい。

【０１１６】

特定の実施形態では、本組成物を、治療を必要としている領域に局所的に、又は静脈内注射若しくは注入によって投与することが望ましい場合がある。

【０１１７】

特定の疾患又は状態の治療に有効／活性である本明細書に記載のポリペプチド、Ｆｃドメイン又は医薬組成物の量は、疾患又は状態の性質に依存し、標準的な臨床技術によって決定することができる。加えて、最適な投薬範囲を特定するのに役立つように、インビトロ又はインビボアッセイを任意選択的に用いてもよい。組成物において用いられる正確な用量はまた、投与経路、及び疾患又は疾患の重篤度に依存し、医師の判断及び各患者の状況に従って決定されるべきである。年齢、体重、性別、食生活、投与時間、排泄速度、宿主の状態、薬物の組み合わせ、反応感受性、及び疾患の重症度などの要因を考慮する必要がある。

【０１１８】

典型的には、この量は、組成物の質量に対して、本発明のポリペプチドの少なくとも約０．０１％である。経口投与を意図する場合、この量は、組成物の約０．１質量％～約８０質量％の範囲で変化させることができる。好ましい経口組成物は、組成物の質量に対して、約４％～約５０％の本発明のポリペプチドを含み得る。

【０１１９】

非経口投薬単位が、約０．０１質量％～約２質量％の本発明のポリペプチドを含有するように、組成物を調製することができる。

【０１２０】

注射による投与のために、本組成物は、およそ典型的には、動物の体重に対して約０．１ｍｇ／ｋｇ～約２５０ｍｇ／ｋｇ、好ましくは、動物の体重に対して０．１ｍｇ／ｋｇ～約２０ｍｇ／ｋｇ、及びより好ましくは、動物の体重に対して約１ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇを含み得る。一実施形態では、本組成物は、約１～３０ｍｇ／ｋｇ、例えば、約５～２５ｍｇ／ｋｇ、約１０～２０ｍｇ／ｋｇ、約１～５ｍｇ／ｋｇ、又は約３ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。投薬スケジュールは、例えば、週に１回から２、３、４週間又はそれ以上に１回まで変化し得る。

【０１２１】

治療は、例えば、月に１回又は２ヶ月に１回であり得る。これは、コンプライアンスを改善し、動物へのストレスを最小限に抑えるため、毎日の投与よりも有利である。

【０１２２】

本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療すること」、又は「治療」は、疾患

又は疾患を阻害又は緩和することを意味する。例えば、治療は、疾患若しくは疾患に関連する症状の発症の延期、及び／又は当該疾患とともに発症するであろう、又は予想されるそのような症状の重症度の低減を含み得る。これらの用語には、既存の症状の改善、追加の症状の予防、及びそのような症状の根底にある原因の改善又は予防が含まれる。したがって、これらの用語は、治療される哺乳動物、例えば、イヌ患者の少なくとも一部に有益な結果が付与されていることを示す。多くの医学的治療は、治療を受ける一部の患者に有効であるが、全ての患者に有効ではない。

【０１２３】

「対象」又は「患者」という用語は、治療、観察、又は実験の対象である動物、好適にはコンパニオンアニマル、具体的にはイヌ又はネコを指す。

【０１２４】

別の態様では、本発明は、疾患の治療又は予防における、本明細書に記載のｐ７５ＮＴＲタンパク質若しくはその一部分、融合タンパク質又は医薬組成物の使用に関する。別の態様では、本開示は、本明細書に列挙される疾患の治療又は予防のための医薬品の製造における、本明細書に記載されるポリペプチド、Ｆｃドメイン又は医薬組成物の使用に関する。本発明は、対象における疾患を治療する方法であって、有効量の、本明細書に記載されるポリペプチド、Ｆｃドメイン又は医薬組成物を含む、前記方法に関する。

【０１２５】

例えば、疾患は、ＮＧＦ関連障害である。

【０１２６】

一実施形態では、ＮＧＦ関連障害は、心血管疾患、アテローム性動脈硬化症、肥満、２型糖尿病、メタボリックシンドローム、疼痛、及び炎症からなる群から選択される。一実施形態では、ＮＧＦ関連障害は、疼痛を含む。一実施形態では、本医薬組成物は疼痛の治療に使用される。一実施形態では、本医薬組成物は疼痛の治療のために使用され、疼痛の種類は、変形性関節症疼痛、関節リウマチ疼痛、手術及び術後疼痛、切開疼痛、全身炎症性疼痛、がん疼痛、外傷による疼痛、神経障害性疼痛、神経痛、糖尿病性神経障害疼痛、リウマチ性疾患に関連する疼痛、筋骨格疾患に関連する疼痛、内臓痛、並びに胃腸痛から選択される。一実施形態では、疼痛は、変形性関節症疼痛を含む。一実施形態では、疼痛は、手術及び術後疼痛を含む。一実施形態では、疼痛は、がん疼痛を含む。

【０１２７】

１つ以上の実施形態では、本発明のｐ７５ＮＴＲタンパク質若しくはその一部分、融合タンパク質又は医薬組成物は、イヌにおける使用のためのものである。１つ以上の実施形態では、本発明のｐ７５ＮＴＲタンパク質若しくはその一部分、融合タンパク質又は医薬組成物は、ネコにおける使用のためのものである。１つ以上の実施形態では、本発明のｐ７５ＮＴＲタンパク質若しくはその一部分、融合タンパク質又は医薬組成物は、ウマにおける使用のためのものである。

【０１２８】

一実施形態では、本発明のｐ７５ＮＴＲタンパク質若しくはその一部分、融合タンパク質又は医薬組成物は、１つ以上の治療剤、例えば、疼痛を治療するための治療剤とともに投与される。

【０１２９】

本明細書に記載のポリペプチド、ｐ７５ＮＴＲタンパク質若しくはその一部分、融合タンパク質、又は医薬組成物は、他の療法又は治療化合物又は療法と同時に、又は異なる時間に、例えば、同時に、別個に、又は逐次的に投与され得る。

【０１３０】

本発明はまた、コンパニオンアニマルにおけるＮＧＦ活性を阻害するためのインビトロ又はインビボ方法であって、本発明のｐ７５ＮＴＲタンパク質若しくはその一部分、融合タンパク質、又は医薬組成物を投与することを含む、前記方法を提供する。

【０１３１】

１つ以上の態様では、本発明は、本発明の融合タンパク質を、融合タンパク質の産生を

もたらす条件下で本発明の宿主細胞を培養し、その後、宿主細胞又は宿主細胞の培養培地から融合タンパク質を単離することにより、本発明の融合タンパク質を産生する方法を提供する。

【０１３２】

別の態様では、本発明は、本発明の本発明のｐ７５ＮＴＲタンパク質若しくはその一部分、融合タンパク質、又は医薬組成物を含む、疾患の治療若しくは予防、診断、予後、又は疾患のモニタリングのためのキットを提供する。そのようなキットは、他の構成要素、包装、及び／又は説明書を含み得る。

【０１３３】

別の態様では、本発明は、凍結乾燥形態で包装されているか、又は水性媒体中に包装されている本発明のｐ７５ＮＴＲタンパク質若しくはその一部分、融合タンパク質、又は医薬組成物を提供する。

【０１３４】

別の態様では、本明細書に記載の本発明のｐ７５ＮＴＲタンパク質又はその一部分、融合タンパク質、又は医薬組成物は、診断試験及びアッセイなどの非治療目的で使用される。したがって、本発明はまた、ＮＧＦ関連障害であることが既知であるか、又はそれを有することが疑われる種、特にイヌ及びネコにおいてＮＧＦを検出するための診断方法において使用するための上記ｐ７５ＮＴＲタンパク質及び融合タンパク質を提供する。ＮＧＦ関連障害であることが既知であるか、又はそれを有することが疑われる生物種、特に、イヌ及びネコにおいてＮＧＦを検出するための方法は、動物からの試料を本発明の標識されたタンパク質に曝露し、前記標識されたタンパク質を検出することを含み得る。試料中のＮＧＦを定量的若しくは定性的に検出するために、又はＮＧＦを発現する細胞の存在を検出するために使用され得る。

【０１３５】

本発明の更なる態様及び実施形態は、以下の実験的例示を含む本開示を考慮すると、当業者には明白であろう。

【０１３６】

別途本明細書で定義されない限り、本開示に関連して使用される科学用語及び技術用語は、当業者に一般的に理解される意味を有するものとする。前述の開示は、本発明の範囲内に包含される主題の一般的な説明を提供し、本発明を作製及び使用する方法、並びにその最良のモードを含むが、一方、以下の実施例は、当業者が本発明を実施し、その完全な書面による説明を更に提供できるようにするために提供される。しかしながら、当業者であれば、これらの実施例の詳細が本発明を限定するものとして読まれるべきではないことを理解するであろう。本発明の範囲は、本開示に添付された特許請求の範囲及びその等価物から理解されるべきである。本発明の様々な更なる態様及び実施形態は、本開示を考慮して、当業者には明らかであろう。

【０１３７】

本明細書において言及される全ての文書は、遺伝子受託番号に対する任意の参照及び特許刊行物に対する参照を含む参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。

【０１３８】

「及び／又は」は、本明細書で使用される場合、他方を伴うか若しくは伴わない２つの特定の特徴又は構成成分の各々の具体的な開示としてみなされるべきである。例えば、「Ａ及び／又はＢ」は、各々が本明細書で個別に記載されるのと同様に、（ｉ）Ａ、（ｉｉ）Ｂ、及び（ｉｉｉ）Ａ及びＢの各々の特定の開示とみなされるべきである。文脈が別途指示しない限り、上記の特徴の説明及び定義は、本発明の任意の特定の態様又は実施形態に限定されず、記載される全ての態様及び実施形態に等しく適用される。

【０１３９】

本発明は、非限定的な実施例によって更に説明される。

【実施例】

【０１４０】

方法：
１．タンパク質構築物及びＣＨＯトランスフェクション／発現（図１）
タンパク質産生のために、予測されるＯ－グリコシル化リッチストーク領域、並びにα－及びγ－セクレターゼ部位を欠くイヌｐ７５の細胞外ドメインに融合された選択されたイヌＩｇＧ定常領域（ヒンジとＣ末端との間）を含む、キメラＦｃ融合タンパク質をコードするＤＮＡ構築物を生成した。
【０１４１】
ＰｅｔＭＬ１１９（配列番号１１）及びＰｅｔＭＬ１２２（配列番号１３）のアミノ酸配列を図１に示す。イヌ、ネコ、ウシ及びウマのｐ７５配列部分のアラインメントを図２に示す。
【０１４２】
イヌＩｇＧ－Ｂ　Ｆｃドメイン及びｐ７５細胞外ドメイン（ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ－Ｊ９ＰＡＭ０からの残基３１～１９４）の両方をコドン最適化し、ＧｅｎｅＡｒｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）によって合成した。両方の遺伝子を、Ｑ５高忠実度ＤＮＡポリメラーゼを使用して（重複領域を含む特異的プライマーを使用して、アッセンブリを可能にする）ＰＣＲ増幅し、ＮＥＢｕｉｌｄｅｒ　ＨＩＦＩ　ＤＮＡ　Ａｓｓｅｍｂｌｙ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用して、哺乳動物発現ベクターＰｅｔＭＬ１１９（Ｆｃ－Ｂｗｔ）及びＰｅｔＭＬ１２２（ＥＵ番号付けを使用した変異残基Ｙ２５２－Ｔ２５４－Ｅ２５６を有するＦｃ－Ｂ－ＹＴＥ）にアッセンブルした。発現ベクターでは、融合タンパク質鎖及び抗生物質耐性遺伝子発現単位にＤＮＡトランスポゾンｐｉｇｇｙＢａｃ末端反転反復がフランキングしており、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポザーゼの存在下で宿主細胞への安定的組み込みが媒介される。両方の発現ベクターはまた、安定的組み込みのための選択を容易にするために、ｐｉｇｇｙＢａｃ末端反復内に位置するピューロマイシン耐性カセットを含有する。安定した発現細胞株を作製するために、ＰｅｔＭＬ１１９又はＰｅｔＭｌ１２２を、ＰｉｇｇｙＢａｃトランスポザーゼとともにＣＨＯ細胞などの好適な哺乳動物細胞株にトランスフェクトし、続いて１０～３０μｇ／ｍｌでのピューロマイシン選択を少なくとも８～１０日間行った。融合タンパク質産生のために、１×１０^{6}／ｍＬの選択されたＣＨＯ細胞を８００ｍＬの培養培地（Ｆ１７＋４ｍＭのｌ－Ｇｌｎ＋０．３％のＰ１８８＋１：５００ＡＣＡ）に播種し、１３０ｒｐｍで振盪しながら３２℃、８％CO_2でインキュベーションする。２％ＨｙＣｌｏｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｂｏｏｓｔ　７ａサプリメント＋０．２％ＨｙＣｌｏｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｂｏｏｓｔ　７ｂサプリメント、２ｍＭのグルコースを過剰産生の４日目から培地に添加する。培養上清を１０日目に収集し、プロテインＡチップを使用する表面プラズモン共鳴（Ｂｉａｃｏｒｅ　８Ｋ、Ｃｙｔｉｖａ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用してタンパク質濃度を決定する。典型的には、ＰｅｔＭＬ１１９／１２２は、産生の１０日目に発現のピークを示し、約７０ｍｇ／Ｌに達した。
【０１４３】
２．ＰｅｔＭＬ１１９～１２２の精製
説明されるように少なくとも７日間培養した、ＰｅｔＭＬ１１９及びＰｅｔＭＬ１２２の安定的トランスフェクトクローン由来の細胞懸濁液を、Ｓａｒｔｏｃｌｅａｒ　Ｄｙｎａｍｉｃｓ（登録商標）Ｌａｂ　Ｖ（ＳＤＬＶ－０５００－２０Ｃ－Ｅ）で１０分間インキュベートした後、０．２２ｕｍフィルターを使用して濾過した。清澄化した上清を、ＰＢＳで事前平衡化された、Ｍａｂｓｅｌｅｃｔ　ｓｕｒｅ　ＬＸプレパック２０ｍＬカラム（１７５４７４０２）にロードした。カラムを４０ｍＬのＰＢＳ（２ＣＶ）で洗浄し、次いで、０．１ＭのグリシンｐＨ２．７の勾配（２ＣＶ中０～１００％）を使用して融合タンパク質を溶出した。融合タンパク質を含有する画分を一緒にプールし、１００ｍＭＴＲＩＳ　ｐＨ８（最終濃度）で中和した。
【０１４４】
中和された融合タンパク質プール画分を５ｍＬまで濃縮し、第２の工程精製としてＰＢＳ事前平衡化ＨｉＬｏａｄ　１６／６００　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００ｐｇ（２８９８９

３３５）にロードした。（以前に分析されたタンパク質標準の保持時間に基づいて）モノマー画分をプールし、タンパク質濃度を、ＮａｎｏＤｒｏｐ（商標）Ｏｎｅ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（商標））を使用して評価した。

【０１４５】

上記のプロトコルに従って、約３０ｍｇ／Ｌの精製生成物を得た。

【０１４６】

ＰｅｔＭＬ１１９は、２段階精製（標準的なプロトコル及び緩衝液を使用して、許容可能なエンドトキシン及びＨＣＰ）後に３４ｍｇ／Ｌの最終回収率を示した。

【０１４７】

ＰｅｔＭＬ１２２は、２段階精製（標準的なプロトコル及び緩衝液を使用して、許容可能なエンドトキシン及びＨＣＰ）後に２８ｍｇ／Ｌの最終回収率を示した。

【０１４８】

３．ＨＰＬＣ分析クロマトグラフィー（図３）

精製材料の純度を、オリゴマー化分析のためのサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）、及び電荷バリアント分析のためのカチオン交換クロマトグラフィー（ＳＣＸ）の両方を使用して評価した。

【０１４９】

ＨＰＬＣ－ＳＥＣクロマトグラフィー（カラム：ＢｉｏＲｅｓｏｌｖｅ　ＳＥＣ　ｍＡｂ　２００Ａ、２．５ｕｍカラム　ＷＡＴＥＲＳ）を、定組成の０．５７５ｍＬ／分の流速を有する移動相としてＰＢＳを使用して、ＷＡＴＥＲＳ製のＡＣＱＵＩＴＹ　Ｈ－ｃｌａｓｓ　Ｂｉｏを使用して実行した。

【０１５０】

ＨＰＬＣ－ＳＣＸクロマトグラフィー（カラム：ＢｉｏＲｅｓｏｌｖｅ　ＳＣＸ　ｍＡｂカラム、３μｍ、４．６ｍｍ×１００ｍｍ）を、ＭＥＳ　ｐＨ５を移動相として塩勾配と共に使用してＷＡＴＥＲＳ製のＡＣＱＵＩＴＹ　Ｈ－ｃｌａｓｓ　Ｂｉｏを使用して実行し、０．９ｍＬ／ｍｉｎの流速で電荷バリアントを分離するために使用した。

【０１５１】

１０ｕＬの各試料を、上記のプロトコルを使用して、Ｈ－ＳＥＣ／Ｈ－ＳＣＸの両方に注入した。各分子についてモノマー種及び面積（タンパク質濃度を示す）のパーセンテージを決定した。

【０１５２】

ＰｅｔＭＬ１１９／１２２は、いずれもＨＳＥＣによる非常に高い純度（９９％を超える）を示し、ＨＳＣＸによる電荷バリアント（おそらくは、異なる糖化形態に対応する）はほとんど観察されなかった。

【０１５３】

４．ストレス試験（図４）

凍結融解試験：

ＰＢＳ中５ｍｇ／ｍＬのＰｅｔＭＬ１１９のアリコート５０ｕＬを調製し、密封ＰＣＲチューブ中で４℃（分子当たり１アリコート）又は－８０℃（分子当たり３アリコート）のいずれかで保管した。－８０℃のアリコートを、室温にて５分で融解し、１個のアリコートを残して－８０℃に戻して保管した（１回の凍結融解）。これを更に２回繰り返し（２回及び３回の凍結融解サイクル）、次いで、上記と同じ方法を使用して、１０ｕＬの各試料（４℃対照を含む）をＨ－ＳＥＣに注入した。各分子／凍結融解サイクルについてモノマー種及び面積（タンパク質濃度を示す）のパーセンテージを決定し、参照操作（４℃で保管した試料）と比較した。

【０１５４】

ＰｅｔＭＬ１１９は、凍結融解に対して良好な耐性を示し、３サイクルではわずかなタンパク質損失しか示さなかった。

【０１５５】

熱及び化学的ストレス：

ＰＢＳ又はＰＢＳ＋１００ｍＭ　ＤＴＴ中５ｍｇ／ｍＬのＰｅｔＭＬ１１９のアリコート５０ｕＬを調製し、異なる温度（２５℃、３７℃、６０℃、７０℃及び９５℃）で３０分間インキュベートした。

【０１５６】

各条件の４０ｕＬを、１０ｕＬのＮｕＰＡＧＥ（商標）ＬＤＳ試料緩衝液（ＮＰ０００７）で希釈した。１０ｕＬをＮｕＰＡＧＥ（商標）１０％、Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ、１．０ｍｍ、Ｍｉｎｉ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｇｅｌ、１２ウェル（ＮＰ０３０２ＢＯＸ）にロードし、１２０Ｖで４５分間実行した。ゲルをＩｎｓｔａｎｔＢｌｕｅ（登録商標）Ｃｏｏｍａｓｓｉｅ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｔａｉｎ（ＩＳＢ１Ｌ）（ａｂ１１９２１１）で１０分間染色し、ｄｄH_2O中で１時間留置した。次いで、ＳＤＳ－ＰＡＧＥを、標準的なトランスルミネーター装置を使用して獲得した。

【０１５７】

結果は、ＰｅｔＭＬ１１９が、温度及び化学的ストレスの両方において非常に安定しており、７０℃を超える温度でインキュベートされた場合にのみ、アンフォールディングを示すことを明らかにした。

【０１５８】

５．プロテインＡ結合親和性検証（図５）

ＰＢＳ中の精製融合タンパク質（ＰｅｔＭＬ１１９及びＰｅｔＭＬ１２２）を、遠心濃縮器（Ｓａｒｔｏｒｉｏｕｓ－ＶＳ０２Ｈ２２）を使用して５ｍｇ／ｍＬに濃縮した。タンパク質濃度を、ＮａｎｏＤｒｏｐ（商標）Ｏｎｅ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（商標））を用いて２８０ｎｍのＵＶ吸光度を使用して評価した。

【０１５９】

融合タンパク質のプロテインＡへの結合親和性を、Ｂｉａｃｏｒｅ　８Ｋ（Ｃｙｔｉｖａ）を使用して評価した。

【０１６０】

手短に言えば、Ｓｅｎｓｏｒ　Ｃｈｉｐ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ（Ｃｙｔｉｖａ）をＢｉａｃｏｒｅ　８Ｋにドッキングし、室温で３０分間平衡化し、次いで、泳動用緩衝液（１０ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４、１５０ｍＭのＮａＣｌ、３ｍＭのＥＤＴＡ、及び０．００５％のＴｗｅｅｎ２０）をＳＰＲチップ表面に適用した。

【０１６１】

ＰｅｔＭＬ１１９／１２２を１ｕＭから４ｎＭに希釈する融合タンパク質希釈液（１：３希釈で６濃度）を泳動用緩衝液中で調製し、単一サイクル動態法（Ｂｉａｃｏｒｅ　Ａｓｓａｙ　Ｈａｎｄｂｏｏｋ、Ｃｙｔｉｖａ）を使用して動態を評価した。動態及び／又は親和性定量化は、標準分析方法に従ってＢｉａｃｏｒｅ　Ｉｎｓｉｇｈｔを使用して実行されている。

【０１６２】

結果は、ＰｅｔＭＬ１２２に対するプロテインＡの結合が、導入されたＹＴＥ変異によってわずかに影響され、ＰｅｔＭＬ１１９と比較してより速い解離が観察されることを示している。これによりプロテインＡ精製後の収量が低下するがタンパク質の品質は同等である。

【０１６３】

６．ＦｃＲｎ結合親和性検証（図６）

ＰＢＳ中の精製融合タンパク質（ＰｅｔＭＬ１１９及びＰｅｔＭＬ１２２）を、遠心濃縮器（Ｓａｒｔｏｒｉｏｕｓ－ＶＳ０２Ｈ２２）を使用して５ｍｇ／ｍＬに濃縮した。タンパク質濃度を、ＮａｎｏＤｒｏｐ（商標）Ｏｎｅ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（商標））を用いて２８０ｎｍのＵＶ吸光度を使用して評価した。

【０１６４】

Ｂｉａｃｏｒｅ　８Ｋ（Ｃｙｔｉｖａ）を使用して、融合タンパク質の胎児性Ｆｃ受容体への結合親和性を評価した。

【０１６５】

手短に言えば、ＣＭ５　Ｓｅｎｓｏｒ　Ｃｈｉｐ（Ｃｙｔｉｖａ）をＢｉａｃｏｒｅ８Ｋにドッキングし、室温で３０分間平衡化し、次いで、泳動用緩衝液（１０ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ６、１５０ｍＭのＮａＣｌ、３ｍＭのＥＤＴＡ、及び０．００５％のＴｗｅｅｎ２０）をＳＰＲチップ表面に適用した。

【０１６６】

イヌ及びマウスＦｃＲｎ－Ｂ２Ｍ組換えタンパク質（Ｉｍｍｕｎｉｔｒａｃｋ、ＩＴＦ１２－ＩＴＦ０８）を４ｎＭ（ストックから１：２０００希釈）でｐＨ４．５の１０ｍＭの酢酸緩衝液に希釈し、標準的なアミンカップリング反応を使用して固定化した。

【０１６７】

融合タンパク質希釈液を泳動用緩衝液中で３ｕＭから３７ｎＭ（１：３希釈で５濃度）に調製し、多サイクル動態法（１２０秒の会合－３００秒の解離）を使用して動態を評価した。動態及び／又は親和性定量化は、標準分析方法に従ってＢｉａｃｏｒｅ　Ｉｎｓｉｇｈｔを使用して実行されている。

【０１６８】

ＰｅｔＭＬ１２２についてＦｃＲｎへの結合親和性に１０倍の増加が見られ、トリプル変異体ＹＴＥが、イヌ及びマウス胎児性受容体の両方への結合に対して正の効果を有したことが確認されている。特に、解離速度の増加が観察された。

【０１６９】

７．ヒト及びラットの神経成長因子（ｈ－ｒＮＧＦ）結合親和性の決定（図７）

ＰＢＳ中の精製融合タンパク質（ＰｅｔＭＬ１１９）を、遠心濃縮器（Ｓａｒｔｏｒｉｏｕｓ－ＶＳ０２Ｈ２２）を使用して５ｍｇ／ｍＬに濃縮した。タンパク質濃度を、ＮａｎｏＤｒｏｐ（商標）Ｏｎｅ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（商標））を用いて２８０ｎｍの紫外線吸光度を使用して評価した。

【０１７０】

Ｂｉａｃｏｒｅ　８Ｋ（Ｃｙｔｉｖａ）を使用して、ヒト及びラットＮＧＦへの融合タンパク質の結合親和性を評価した。

【０１７１】

手短に言えば、プロテインＡセンサーチップ（Ｃｙｔｉｖａ）をＢｉａｃｏｒｅ　８Ｋにドッキングし、室温で３０分間平衡化し、次いで、泳動用緩衝液（１０ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４、１５０ｍＭのＮａＣｌ、３ｍＭのＥＤＴＡ、及び０．００５％のＴｗｅｅｎ２０）をＳＰＲチップ表面に適用した。

【０１７２】

ＰｅｔＭＬ１１９を、６ｎＭの濃度で泳動用緩衝液に希釈した。これらは、捕捉ステップとして１０ｕＬ／分で９０秒の会合を使用して固定化され、続いて泳動用緩衝液を注入して、結合していない生成物を除去した。

【０１７３】

ヒト及びラットＮＧＦ（Ｂｉｏ－Ｔｅｃｈｎｅ　Ｌｔｄ－５５６－ＮＧ／ＣＦ／２５６－ＧＦ－１００／ＣＦ）を、４．６８ｎＭまで１：２の更なる希釈で、１００ｎＭの泳動用緩衝液中で希釈した。捕捉ステップ法（３０秒間の会合－１２０秒間の解離）、続いて再生ステップ（０．１Ｍグリシン、ｐＨ２．２、接触時間６０秒、ＦＲ　３０ｕＬ／分）を用いて、多サイクル動態を使用して動態を評価した。動態定量化は、標準的な分析方法に従ってＢｉａｃｏｒｅ　Ｉｎｓｉｇｈｔを使用して実行した。

【０１７４】

結果は、ＰｅｔＭＬ１１９を有するヒトＮＧＦとラットＮＧＦの両方についてナノモル以下のＫＤを示した。

【０１７５】

８．インタクト質量分析

ＰＢＳ中の精製融合タンパク質（ＰｅｔＭＬ１１９及びＰｅｔＭＬ１２２）を、遠心濃縮器（Ｓａｒｔｏｒｉｏｕｓ－ＶＳ０２Ｈ２２）を使用して１ｍｇ／ｍＬに濃縮した。タンパク質濃度を、ＮａｎｏＤｒｏｐ（商標）Ｏｎｅ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉ

ｃ（商標））を用いて２８０ｎｍのＵＶ吸光度を使用して評価した。
【０１７６】
ＬＣ－ＭＳ分析は、ＢｉｏＲｅｓｏｌｖｅ ＲＰ ｍＡｂ Ｐｏｌｙｐｈｅｎｙｌ Ｃｏｌｕｍｎ、４５０Å、２．７μｍ、２．１×５０ｍｍ及びＷＡＴＥＲＳ製のＡＣＱＵＩＴＹ ＵＰＬＣ（登録商標）Ｉ－Ｃｌａｓｓ Ｐｌｕｓを使用してＢｉｏＡｃｃｏｒｄ上で実行した。
【０１７７】
手短に言えば、各融合タンパク質の３ｐｍｏｌ（ＬＣ－ＭＳグレードＨ２Ｏで希釈）をＲＰカラムに注入し、ＭＳによって溶出液ピークを分析した。インタクト質量分析は、Ｈ－ＳＣＸによって観察されたものと一致して、異なる程度のグリコシル化に対応する複数種の存在を示した。
【０１７８】
インタクトな分子は、分子種の混合物であるように見える。観察された質量は、９６１５８～９７８３６Ｄａである。基本種の質量（９６１５８Ｄａ）は、分子中で予想されるグリコシル化部位の総数と一致する、Ｆｃ融合物アミノ酸２０～２４１＋４グリカンの二量体と一致する。他の種は、グリカンの追加の装飾と一致する。
【０１７９】
９．アンフォールディング及びオリゴマー化の決定（図４）
ＰＢＳ中の精製融合タンパク質（ＰｅｔＭＬ１１９）を、遠心濃縮器（Ｓａｒｔｏｒｉｏｕｓ－ＶＳ０２Ｈ２２）を使用して３ｍｇ／ｍＬに濃縮した。タンパク質濃度を、ＮａｎｏＤｒｏｐ（商標）Ｏｎｅ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（商標））を用いて２８０ｎｍの紫外線吸光度を使用して評価した。
【０１８０】
Ｔｍ及びＴａｇｇ分析は、標準プロトコルを使用して、Ｕｎｃｈａｉｎｅｄ ｌａｂｓ製のＵｎＣｌｅ上で実行した。
【０１８１】
簡潔に述べると、１０ｕＬの融合タンパク質を使用して、温度上昇中（２５℃から９５℃まで）のアンフォールディング及び凝集事象を決定した。以前の結果から予想されるように、ＰｅｔＭＬ１１９は、９５℃までに凝集を示さず、Ｔｍ１は約６７℃であった。
【０１８２】
１０．インビトロＮＧＦ阻害アッセイ（図８）
我々のｐ７５融合タンパク質の生物学的活性を評価するために、ＮＧＦ依存性（細胞株ＴＦ－１細胞株）を使用した。細胞は、長期的な増殖のためには、インターロイキン３（ＩＬ－３）又は顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）に完全に依存している。細胞は、インターロイキン５（ＩＬ－５）に応答しない。ＴＦ－１細胞は、インターロイキン１（ＩＬ－１）、インターロイキン４（ＩＬ－４）、インターロイキン６（ＩＬ－６）、インターロイキン９（ＩＬ－９）、インターロイキン１１（ＩＬ－１１）、インターロイキン１３（ＩＬ－１３）、幹細胞因子（ＳＣＦ）、白血病抑制因子（ＬＩＦ）及び神経成長因子（ＮＧＦ）などの様々な他のリンホカイン及びサイトカインに応答する。
【０１８３】
本融合タンパク質による優れたＮＧＦの隔離化により、対照と比較して増殖が遅くなる。
【０１８４】
ＴＦ－１細胞株は、ＡＴＣＣ（ＣＲＬ－２００３）から購入し、完全ＲＰＭＩ（１０％のＦＢＳ＋２ｍＭ Ｌ－Ｇｌｎ＋１０ｎｇ／ｍＬのｈＮＧＦ）を使用する標準的な無菌方法を使用して培養中で維持した。
【０１８５】
２００万個のＴＦ－１細胞を、１ｍＬのＲＰＭＩ中の２．５ｕＭのＣＦＳＥ細胞トレース（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ－Ｃ３４５５４）で、暗所で３０分間のみ標識した。次いで、

細胞を完全ＲＰＭＩ培地中で２回洗浄し、再びカウントし、２４ウェルプレート中に１００００細胞／ｍＬ（ウェル当たり総体積１ｍＬ）で播種した。

【０１８６】

ＰｅｔＭＬ１１９／１２２又は対照（ベジンベトマブ－抗ＮＧＦ　ＩｇＧ対照、無関係の融合タンパク質、及びＮＧＦを含まないＲＰＭＩを陰性対照として、ＷＨＯ　Ｄｒｕｇ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ，Ｖｏｌ．３２，Ｎｏ．４，２０１８－ｐｇ５６８）の希釈液を、３ｕＭ濃度から９１．２５ｎＭまで１００ｕＬのＲＰＭＩ培地中で希釈した。１００ｕＬのタンパク質希釈液を各ウェルに添加した。簡潔に述べると、重鎖及び軽鎖の両方について公開されているベジンベトマブのアミノ酸配列を使用して、（ＣＨＯ発現のための）コドン最適化ｃＤＮＡを生成した。ＨＣ及びＬＣ　ｃＤＮＡの両方を、標準のｐｅｇｇｙ－ｂａｃプラスミドを用いてインフレームでクローニングした。次いで、ＣＨＯは、上記のように安定的にトランスフェクトされた。

【０１８７】

プレートを３日後に分析した。簡潔に述べると、１ｍＬの細胞懸濁液を、５分間、３００ｇで室温にて遠心分離し、ＦＡＣＳ緩衝液（ＰＢＳ＋３％のＦＢＳ＋３ｍＭのＥＤＴＡ）で２回洗浄し、最終的に１００ｕＬのＦＡＣＳ緩衝液中に再懸濁した。以下のパラメータ（ＦＳＣ：２０；ＳＳＣ：５０；ＦＩＴＣ：１；閾値：１３１３１３１）を使用して、ＣｙｔｏＦＬＥＸフローサイトメーターを使用して細胞を取得した。細胞をＦＩＴＣ蛍光に基づいてゲーティングし（より多くの蛍光で、より少ない増殖）、増殖阻害の割合を、ＮＧＦなしでＲＰＭＩ中で培養された１００％阻害ＴＦ－１細胞及び完全なＲＰＭＩ培地で培養された０％阻害細胞を考慮して計算した。グラフパッドを使用して、ＩＣ５０値を計算した。

【０１８８】

ＰｅｔＭＬ１１９／１２２とベジンベトマブの両方が、用量依存的にＴＦ－１増殖を阻害することができた。

【表１】

表１

	PetML119	PetML122	ベジンベトマブ(BedinvetmAb)
IC50(nM)	15.25	5.91	1.645

【０１８９】

１１．ラットにおけるＭＩＡ誘発ＯＡ（有効性及びｐＫ）－図９～１２）

ＰｅｔＭＬ１１９／１２２の有効性及び半減期を、ＯＡのラットモデルを使用して分析した。詳細なプロトコルを以下に示す。モデルを図９に示す。

【０１９０】

関節炎の誘発

変形性関節症は、イソフルラン麻酔下で与えられたラットの右後肢膝関節に、３ｍｇのヨード酢酸ナトリウム（ＭＩＡ）（生理食塩水２５μＬ中）を関節内（I.A.）注射することによって化学的に誘発された。麻酔下では、両眼に眼科用軟膏を塗布した。ＭＩＡのI.A.注射の日を０日目としてカウントした。

【０１９１】

治療群への割り当て

ベースライン動的体重負荷（ＤＷＢ）を、全てのラットについて測定した。体重（ＢＷ）も同時に測定した。ラットを麻酔し、ＭＩＡを脛骨にほぼ垂直な膝腱の中央を介して右膝関節に注射した（関節内（I.A.））。ＭＩＡのI.A注射の用量レベルは、げっ歯類における以前の文献報告に基づいて選択された（Ｂｏｖｅ　ｅｔ　ａｌ．：　Ｗｅｉｇｈｔ　ｂｅａｒｉｎｇ　ａｓ　ａ　ｍｅａｓｕｒｅ　ｏｆ　ｄｉｓｅａｓｅ　ｐｒｏｇｒｅｓｓｉｏｎ　ａｎｄ　ｅｆｆｉｃａｃｙ　ｏｆ　ａｎｔｉ－ｉｎｆｌａｍｍａｔｏｒｙ　ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ　ｉｎ　ａ　ｍｏｄｅｌ　ｏｆ　ｍｏｎｏｓｏｄｉｕｍ　ｉｏｄｏａｃｅ

ｔａｔｅ－ｉｎｄｕｃｅｄ　ｏｓｔｅｏａｒｔｈｒｉｔｉｓ．Ｏｓｔｅｏａｒｔｈｒｉｔｉｓ　Ｃａｒｔｉｌａｇｅ．２００３　Ｎｏｖ；１１（１１）：８２１－８３０）。ＭＩＡ注射した肢（右）と健康な肢（左）との間で有意な体重負荷差を示す動物を研究に割り当てた。ベースラインＤＷＢ及びＢＷの両方に基づいて無作為化を行った（２つの変数の無作為化）。

【０１９２】

動的体重負荷（ＤＷＢ）の評価

動的体重負荷は、製造業者のマニュアルに従って、ＢｉｏＳｅｂ（登録商標）自動ＤＷＢシステムを使用して評価した。各ラットに対して２分間の記録を行った。動的体重負荷データの分析は、ＢｉｏＳｅｂ（登録商標）ソフトウェアを使用してオフラインで行った。システムは、各手足と尾部が負担する質量を自動的に計算した。ＤＷＢの直前の各ラットについて、試験の各時間について、体重を測定した。ＤＷＢ測定は、研究設計のスケジュールに従って、異なる時点で行われた。走行した総距離は、ＤＷＢデータ分析中にも記録された。

【０１９３】

試験品の投与

群１～２のラットは、ビヒクルの静脈内（ＩＶ）注射を受け、群３～７のラットは、以下の表に示されるように、３日目に１回、所定の用量で試験品を用いたＩＶ注射を受けた。以下の表に示されるように、群８のラットを、３日目～２１日目から１日１回、デキサメタゾンを強制経口投与した。

【０１９４】

ＰＥＴＭＬ１１９／１２２を用いたヨード酢酸モノナトリウム（ＭＩＡ）誘発ＯＡラット研究

研究デザイン：

【表２】

表２

*Gr.	群処理	TI用量レベル	TI経路、体積	TI投与スケジュール	DWB試験	N
1	ナイーブ/ビヒクルPBS	0	IV、5mL/kg	3日目 QD	1日目(ベースライン)、3、6、14、21日目	10
2	3mg MIA/ビヒクルPBS	0	IV、5mL/kg	3日目 QD	1日目(ベースライン)、3、6、14、21日目	10
3	3mg MIA/試料1(PetML119)、低用量	0.5mg/kg	IV、5mL/kg	3日目 QD	1日目(ベースライン)、3、6、14、21日目	10
4	3mg MIA/試料1(PetML119)、中用量	1.5mg/kg	IV、5mL/kg	3日目 QD	1日目(ベースライン)、3、6、14、21日目	10
5	3mg MIA/試料1(PetML119)、高用量	5mg/kg	IV、5mL/kg	3日目 QD	1日目(ベースライン)、3、6、14、21日目	10
6	3mg MIA/試料2(PetML122)	5mg/kg	IV、5mL/kg	3日目 QD	1日目(ベースライン)、3、6、14、21日目	10
7	3mg MIA/試料3(ベジンベトマブ)	5mg/kg	IV、5mL/kg	3日目 QD	1日目(ベースライン)、3、6、14、21日目	10
8	3mg MIA/デキサメタゾン	1~7日目から1mg/kg、及び8~21日目から0.3mg/kg	PO、10ml/kg	3~21日目 QD	1日目(ベースライン)、3、6、14、21日目	10

＊群２～８の動物及び予備群は、ＭＩＡ（３ｍｇ／２５μＬ生理食塩水）を関節内（ＩＡ）に単回注射し、ＭＩＡ注射の日を０日目（右膝関節）とした。
ＩＶ：静脈内（尾静脈）；ＰＯ：胃管経口投与；ＱＤ－１日１回

【０１９５】

研究中、任意の臨床徴候について処理された動物を観察した。ＤＷＢを３、６、１４及び２１日目に分析した。関節直径は、３日目、６日目、１４日目、２１日目に右膝関節（内側）のキャリパーを使用して測定した。

【０１９６】

簡潔に述べると、ＰｅｔＭＬ１１９（異なる用量で）及び１２２（単回投与）の両方とも、抗ＮＧＦベンチマーク（ベジンベトマブ）を上回る良好な鎮痛効果を示した（図１０）。また、それらは、ＮＳＡＩＤの副作用を示さない一方で、デキサメタゾンの毎日の投与と同様の活性を示した（体重減少－図１１）。

【０１９７】

１群当たり５匹のラットからのＰＫ血を、代替日に標準的な手順を使用して採取した。

【０１９８】

血清ｐｋ分析（図１２）

本融合タンパク質の血清レベルを定量化するためのサンドイッチＥＬＩＳＡは以下のように設定された。

・ＰＢＳ＋０．１Ｍ重炭酸ナトリウムで希釈した２ｕｇ／ｍＬの捕捉抗体（マウス抗イヌｐ７５　Ａｂ－－＞ＭＡＢ３６７－ＳＰ（Ｎｏｖｕｓ　Ｂｉｏ））３０ｕＬを、半区域ＥＬＩＳＡプレート（マイクロプレート、９６ウェル、ＰＳ、半区域、クリア、品番：６７５０６１）上で、４℃で一晩固定化した。
・プレートを２００ｕＬのブロッキング溶液（ＰＢＳ＋５％ＤＮＦＭ＋０．２％Ｔｗｅｅｎ２０）で２回洗浄し、全てのウェルにわたって１５０ｕＬのブロッキング溶液で３時間室温にてブロッキングを実行した。
・ラット研究の異なる時点／群からの血清を、ブロッキング溶液（２ｕＬ血清＋１９８ｕＬブロッキング溶液）中で１００倍希釈し、３０ｕＬを関連するウェルに添加した。融合タンパク質をラット血清中に１００ｕｇ／ｍＬから１ｎｇ／ｍＬまで１：５の希釈で希釈するＰｅｔＭＬ１１９／１２２からの標準を調製した。次いで、標準物質をブロッキング溶液で１００倍に希釈し、３０ｕＬを関連するウェルに添加した。
・血清を、４５０ｒｐｍで振盪しながら室温で１時間インキュベートした。
・プレートを２００ｕＬのブロッキング溶液で２回洗浄し、検出抗体（ＳＡ５－１０３０９（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ））をブロッキング溶液中で１：４００００に希釈し、３０ｕＬを各ウェルに加え、４５０ｒｐｍで振盪しながら室温で３０分間放置した。
・プレートを２００ｕＬのブロッキング溶液で２回洗浄し、ＨＲＰコンジュゲート抗体（Ａ１６０３５（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ））をブロッキング溶液中で１：１００００に希釈し、３０ｕＬを各ウェルに加え、４５０ｒｐｍで振盪しながら室温で３０分間放置した。
・プレートを２００ｕＬのブロッキング溶液で２回洗浄し、次に２００ｕＬのＰＢＳ＋０．２％Ｔｗｅｅｎ２０で２回洗浄し、最後に５０ｕＬのＴＭＢ（ＴＭＢ　Ｃｈｒｏｍｏｇｅｎ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（ＥＬＩＳＡの場合）－－＞００２０２３）を各ウェルに加えた。１０分後、標準曲線が最初の２つの点で飽和を示したとき、５０ｕＬの１Ｍ硫酸の添加で反応を停止した。
・６５０ｎｍ及び４５０ｎｍでエンドポイント吸光度を使用して、ＣＬＡＲＩＯｓｔａｒ　Ｐｌｕｓ（ＢＭＧ　ＬＡＢＴＥＣＨ）で全てのウェルを読み取った。値をグラフパッドにインポートし、これらの半減期を推定するために一相減衰フィッティングを適用した。

【０１９９】

異なる用量からのＰｅｔＭＬ１１９は、同様の半減期（約７０時間）を示したが、ＰｅｔＭＬ１２２は、半減期延長（約１０．５日）を示した（図１２を参照）。

【０２００】

１２．イヌにおけるＯＡ誘発後のＰｅｔＭＬ１１９及びＰｅｔＭＬ１２２の薬物動態及び薬力学的研究

ＯＡの誘発後のイヌにおける１．５ｍｇ／ｋｇの単回静脈内投与後に、ＰｅｔＭＬ１１９及びＰｅｔＭＬ１２２の安全性プロファイル、薬物動態及び薬力学的パラメータを評価した（尿酸塩結晶モデル）。研究は、Ｔｏｕｔｉａｎ　ｅｔ　ａｌ，Ｊ．ｖｅｔ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒａｐ．２４，４３－５５，２００１のプロトコルと同様に実施した。

【０２０１】

この研究は、２つの群、４つの期間、４つの処理、及び３つのシーケンスに従って実行した。１０匹のイヌを使用した。

【０２０２】

４つの処理を試験した：

Ａ．陽性対照（メロキシカム）経口投与。
Ｂ．陰性対照（ビヒクル）静脈内注入。
Ｃ．ＰｅｔＭＬ１１９（１．５ｍｇ／ｋｇ）静脈内注入。
Ｄ．ＰｅｔＭＬ１２２（１．５ｍｇ／ｋｇ）静脈内注入

【表３】

表３

群No.	第1期間:	第2期間:	第3期間:	第4期間:
1	A	B	C	/
2	B	A	D	/

【０２０３】

可逆的尿酸結晶滑膜炎モデルを使用して、実験的な急性滑膜炎を誘発した。尿酸ナトリウム結晶懸濁液を、１０ｍｇ／ｍＬの濃度で調製した。プロポフォールの関節内注射を介して全身麻酔を誘発した。各期間に代替の後膝関節を使用した。

【０２０４】

ビヒクル及び試験品（ＰｅｔＭＬ１１９／ＰｅｔＭＬ１２２）の処理投与（静脈内送達による）を、急性滑膜炎誘発の３日前（３日目）に行った。メロキシカム処理投与は、急性滑膜炎誘発の直前（Ｔ－０．５時間）に行った。処理投与は、最大の誘発跛行時（すなわち、急性滑膜炎誘発後２時間～３時間）に最大の処理効果を得るように設計した。

【表４】

表４

期間	研究日	事象
第1期間:	-4日目から-1日目 2022年1月13日 ~16日	-有効性評価。誘発前(視覚的跛行スコア及びピーク垂直力の測定) -ビヒクル投与(滑膜炎誘発の3日前)群2 --一晩断食(少なくとも12時間)
	0日目 2022年1月17日	動物の体重計 -メロキシカム投与(滑膜炎誘発の30分前)群1 -滑膜炎誘発(T0) 有効性評価:尿酸塩結晶誘発後T1.5時間、T2.75時間 -食料配給(T2.75時間評価後) 有効性評価:尿酸塩結晶誘発後T4時間、T5.25時間、T6.5時間
第2期間:	-4日目から-1日目 2022年1月27日 ~30日	-有効性評価。誘発前(視覚的跛行スコア及びピーク垂直力の測定) -ビヒクル投与(滑膜炎誘発の3日前)群1 --一晩断食(少なくとも12時間)
	0日目 2022年1月31日	-動物秤量 -メロキシカム投与(滑膜炎誘発の30分前)群。 -滑膜炎誘発(T0) 有効性評価:尿酸塩結晶誘発後T1.5時間、T2.75時間 -食料配給(T2.75h評価後) 有効性評価:尿酸塩結晶誘発後T4時間、T5.25時間、T6.5時間

第3期間:	-4日目 2022年2月10日	-試験品投与前の血液生化学及び血漿バイオマーカーT-24時間の採血 -導入前の有効性評価(視覚的跛行スコア及びピーク垂直力の測定)
	-3日目 2022年2月11日	-採血前 -試験品投与(滑膜炎誘発の3日前)全群 --一晩断食(少なくとも12時間)
	-2日目 2022年2月12日	-試験品投与後の採血T24時間。
	-1日目 2022年2月13日	-試験品投与後の採血T48時間。
	0日目 2022年2月14日	-試験品投与後の採血T72時間。 -動物秤量 -滑膜炎誘発(T0) 有効性評価:尿酸塩結晶誘発後T1.5時間、T2.75時間 -食料配給(T2.75h評価後) 有効性評価:尿酸塩結晶誘発後T4時間、T5.25時間、T6.5時間
	4日目 2022年2月18日	-試験品投与後の採血T168時間。
	11日目 2022年2月25日	-試験品投与後の採血T336時間。 -試験品後の血液生化学T336時間の採血 投与
	18日目 2022年3月4日	試験品投与後の採血T504時間。
第4期間:	-1日目 2022年3月10日	-有効性評価導入前(視覚的跛行スコア及びピーク垂直力) --一晩断食(少なくとも12時間)
	0日目 2022年3月11日	試験品投与後の採血T672時間。 動物の体重計 滑膜炎誘発(T0) 有効性評価:尿酸塩結晶誘発後T1.5時間、T2.75時間 食料配給(T2.75時間評価後) 有効性評価:尿酸塩結晶誘発後T4時間、T5.25時間、T6.5時間
動物フォローアップ	2022年3月28日	試験品投与後の採血T1080時間(45日目)
	2022年4月12日	試験品投与後の採血T1440時間(60日目)

【０２０５】

安全性

各動物を少なくとも１日１回観察したが、異常な所見は報告されなかった。表４に示される時点で、血液学的パラメータを収集し、動物を秤量した。代替部位で頸静脈又は頭静脈から血液試料を採取した。

【０２０６】

本融合タンパク質の処理後にインビボで生成された血清中の潜在的な抗薬物抗体（ＡＤＡ）を同定するためのサンドイッチＥＬＩＳＡを以下のように設定した。

・ＰＢＳ＋０．１Ｍ重炭酸ナトリウムで希釈した２ｕｇ／ｍＬのＰｅｔＭＬ１１９又はＰ

ｅｔＭＬ１２２（２つのプレート）のいずれか３０ｕＬを、半区域ＥＬＩＳＡプレート（マイクロプレート、９６ウェル、ＰＳ、半区域、クリア、品番：６７５０６１）上で、４℃で一晩固定化した。
・プレートを２００ｕＬのブロッキング溶液（ＰＢＳ＋５％ＤＮＦＭ＋０．２％Ｔｗｅｅｎ２０）で２回洗浄し、ブロッキングを全てのウェルにわたって１５０ｕＬのブロッキング溶液で３時間室温にて実行した。
・ラット／イヌ研究の異なる時点／群からの血清を、ブロッキング溶液（２ｕＬ血清＋１９８ｕＬブロッキング溶液）中で１００倍希釈し、３０ｕＬを関連するウェルに添加した。標準規格抗ＰｅｔＭＬ１１９／１２２Ａｂ（１ｎｇ／ｍＬからのＭＡＢ３６７）を、２０ｕＬのラット／イヌ血清＋Ａｂ中で調製し、次いで、２分の１希釈で希釈した。次いで、標準物質をブロッキング溶液で１００倍に希釈し、３０ｕＬを関連するウェルに添加した。
・血清を、４５０ｒｐｍで振盪しながら室温で１時間インキュベートした。
・プレートを２００ｕＬのブロッキング溶液で２回洗浄し、検出抗体（ＳＡ５－１０３０９（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ））をブロッキング溶液中で１：２００００に希釈し、３０ｕＬを各ウェルに加え、４５０ｒｐｍで振盪しながら室温で３０分間放置した。
・プレートを２００ｕＬのブロッキング溶液で２回洗浄し、ＨＲＰコンジュゲート抗体（Ａ１６０３５（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ））をブロッキング溶液中で１：１００００に希釈し、３０ｕＬを各ウェルに加え、４５０ｒｐｍで振盪しながら室温で３０分間放置した。
・プレートを２００ｕＬのブロッキング溶液で２回洗浄し、次に２００ｕＬのＰＢＳ＋０．２％Ｔｗｅｅｎ２０で２回洗浄し、最後に５０ｕＬのＴＭＢ（ＴＭＢ　Ｃｈｒｏｍｏｇｅｎ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（ＥＬＩＳＡの場合）－－＞００２０２３）を各ウェルに加えた。１０分後、標準曲線が最初の２つの点で飽和を示したとき、反応を、５０ｕＬの１Ｍ硫酸の添加を停止した。
・６５０ｎｍ及び４５０ｎｍでエンドポイント吸光度を使用して、ＣＬＡＲＩＯｓｔａｒ　Ｐｌｕｓ（ＢＭＧ　ＬＡＢＴＥＣＨ）で全てのウェルを読み取った。値をグラフパッドにインポートし、これらの半減期を推定するために一相減衰フィッティングを適用した。

【０２０７】

結果

ＰｅｔＭＬ１１９／ＰｅｔＭＬ１２２投与後、体重（図１３ａ）及び血液学的パラメータは変化しなかった。

【０２０８】

ＡＤＡ分析（図１３ｂ）について、ＰｅｔＭＬ１１９／ＰｅｔＭＬ１２２で処理した動物由来の両方の血清は、投与前対照と同等の基底シグナルを示し、これは、実験時間枠中に抗薬物抗体が生成されなかったことを示した。

【０２０９】

有効性

試験試料の抗炎症及び鎮痛効果を評価するために、２つのパラメータを調査した：視覚的跛行スコア（ＶＬＳ、スコアリングシステムを使用して決定）、及びフォースプレートで測定される、後肢の地面に加えられた垂直力（ＶＦ、ニュートンで表される）。フォースプレートは、デジタルアナログアクイジションカードと信号処理ソフトウェアを装備したコンピュータに接続されていた。フォースプレート（８つのスケールで作られた）は、イヌが一定かつ同様の速度でリード上を歩くように訓練された、幅５０ｃｍ、長さ約５ｍの経路に挿入した。最大治療効果及び最大誘発跛行に基づいて、有効性評価を、誘発前及び誘発後１．５時間、２．７５時間、４時間、５．２５時間、及び６．５時間（１時点当たり±１０分）実施した。

【０２１０】

跛行比率

肢をフォースプレートに配置したときに、ＶＦ値が得られた。イヌは、後肢の平均力を

計算するために、後肢の３つの解釈可能な値を得るために、フォースプレートの経路を少なくとも５回通過した。治療後に加えられる力と、同じ後肢の投与前（基準力）に加えられる力との比率を「跛行比」と呼んだ。このパラメータは、炎症がない場合に加えられる力に関連して、誘発された肢によって加えられる力を説明する。歩行期に体重負荷を伴わない重度の跛行が観察された場合、垂直方向の力は測定されず、跛行比はゼロとした。

【０２１１】

視覚的跛行スコア

以下に詳述する半定量的尺度に従って、イヌを、立っている間及び歩いている間（スコアを付ける前の約１分間）の跛行についてスコア付けした。

【表５】

表５

立位状態での観察	スコア
全体重負荷(地面上の全てのデジタルパッドに触れる)	0
部分的な体重負荷(地面上のデジタルパッドの一部だけに触れる)	1
つま先で触れても体重負荷はかからない	2

【表６】

表６

歩行状態での観察	スコア
全体重負荷､跛行なし	0
部分的な体重負荷を伴うわずかな跛行: 跛行はほとんど知覚できない	1
部分的な体重負荷を伴う中程度の跛行:動物は手足をわずかに地面に置く	2
体重負荷を伴わない重度の跛行:動物は肢を使用するが､体重を肢に乗せない､及び/又は肢を地面に置くことを避ける	3

【０２１２】

複合的な跛行視覚スコアは、立位段階及び歩行段階のスコアの合計とした。

【０２１３】

結果

処理後、ＰｅｔＭＬ１１９及びＰｅｔＭＬ１２２の両方とも、急性疼痛に対するゴールドスタンダードであるメロキシカムに対する改善された有効性を示す（図１４）。更に、ＰｅｔＭＬ１１９及びＰｅｔＭＬ１２２は、疼痛緩和を延長するために単回用量しか必要としないという追加の利点を有する。対照的に、メロキシカム又は他の既存の治療は、コンプライアンスを低下させ、動物へのストレスを増加させる毎日の投与を必要とする。

【０２１４】

血清ｐｋ分析

以下の目標時点で、期間３の前及び期間中に血液試料を収集した：

投与後Ｔ２４時間、Ｔ４８時間、Ｔ７２時間、（導入前期間３）及びＴ１６８時間、Ｔ３３６時間、Ｔ５０４時間（導入前期間４）及びＴ６７２時間における静脈内試験品投与後。投与後４５日目及び６０日目に追加の血液試料を収集した。

【０２１５】

ｐＫ値を測定するためのサンドイッチＥＬＩＳＡは、上記実施例１１に記載される通りである。

【０２１６】

結果

ＰｅｔＭＬ１２２は、ＰｅｔＭＬ１１９の半減期（約４日）と比較して、延長された半減期（約１９日）を示した。図１５を参照されたい。

【０２１７】

配列

配列番号１：イヌｐ７５ＮＴＲタンパク質

KEACPTGLYTHSGECCKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTE
CVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDRQNTVCEE
CPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEEIPGRWITRSTPSEDSDST
APSTEEPELPPDQEIIASTMADVVTTVMGSSQPVVTRGTADNLIPVYCSILAAVVVGLVA
YIAFKRWNSCKQNKQGANSRPVNQTPPPEGEKLHSDSGISVDSQSLHDQQPHTQTAAGQA
LKGDGGLYSSLPPAKREEVEKLLNGSAGDTWRHLAGELGYQPEHIDSFTHEACPARALLA
SWAAQDSATLDALLAALRRIQRADIVESLCSESTATSPV

ＥＣＤに下線が引かれている

【０２１８】

配列番号２：イヌｐ７５ＮＴＲ核酸配列

ATGGACGGGCCGCGCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTCCTGGGGGGTGTCCCTTGGAGGTGCC
AAGGAGGCATGTCCCACTGGCCTGTACACCCACAGCGGCGAGTGCTGCAAAGCCTGCAATCTGG
GTGAGGGGGTGGCCCAGCCTTGCGGAGCCAACCAGACCGTGTGTGAGCCCTGCCTGGACAGCG
TGACCTTCTCGGACGTGGTGAGCGCCACCGAGCCGTGCAAGCCGTGCACCGAGTGCGTGGGGC
TGCAGAGCATGTCGGCGCCGTGCGTGGAGGCGGACGACGCCGTGTGCCGCTGCGCCTACGGC
TACTACCAGGACGAGACGACGGGCCGCTGCGAGGCGTGCCGCGTGTGCGAGGCGGGCTCGGG
GCTCGTGTTCTCGTGCCAGGACAGGCAGAACACCGTGTGCGAGGAGTGTCCCGACGGCACGTA
CTCCGACGAGGCCAACCACGTGGACCCGTGCCTGCCCTGCACCGTGTGCGAGGACACCGAGCG
CCAGCTGCGCGAGTGCACGCGCTGGGCCGACGCCGAGTGCGAGGAGATCCCTGGCCGTTGGA
TTACCCGGTCCACACCCTCAGAGGACTCGGACAGCACCGCCCCCAGCACAGAGGAGCCAGAGC
TACCTCCAGATCAAGAAATCATAGCCAGCACCATGGCAGATGTGGTGACCACAGTGATGGGCAG
CTCTCAGCCTGTAGTGACCCGAGGAACCGCTGACAACCTCATCCCTGTCTACTGCTCCATCCTGG
CCGCCGTGGTTGTGGGCTTAGTGGCCTACATTGCCTTCAAGAGGTGGAACAGCTGCAAGCAGAA
CAAGCAAGGAGCCAACAGCCGGCCCGTGAACCAGACGCCTCCGCCGGAGGGAGAAAAGCTCCA
CAGTGACAGTGGCATCTCTGTGGACAGCCAGAGCCTGCATGACCAGCAGCCCCACACACAGACG
GCCGCAGGCCAGGCCCTCAAGGGGGATGGAGGTCTCTACAGCAGCCTGCCACCAGCCAAGCGG
GAGGAGGTGGAGAAGCTGCTCAATGGCTCTGCGGGGGACACCTGGCGGCACCTGGCAGGTGA
GCTGGGCTACCAGCCTGAGCACATAGACTCCTTCACCCACGAGGCCTGCCCAGCCCGAGCCCT
GCTTGCCAGCTGGGCCGCCCAGGACAGCGCGACGCTCGACGCCCTCCTGGCTGCTCTGCGCCG
CATCCAGCGAGCCGACATCGTGGAGAGCCTGTGTAGCGAGTCCACGGCCACGTCTCCAGTGTG
A

リーダー配列には下線が引かれている

【０２１９】

配列番号３：ネコｐ７５ＮＴＲタンパク質

KEACPTGLFTHSGECCKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTE
CVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDRQNTVCEE
CPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEEIPGRWITRSTPSEGSDST
APSTEEPEVPPEQDLIASTVADVVTTVMGSSQPVVTRGTADNLIPVYCSILAAVVVGLVA
YIAFKRWNSCKQDKQGANSRPVNQTPPPEGEKLHSDSGISVDSQSLHDQQSHTQTAAGQA
LKGDGGLYSSLPSAKREEVEKLLNGSAGDTWRHLAGELGYQPEHIDSFTREACPARALLA
SWAAQDSATLDALLAALRRIQRADIVESLCSESTATSPV

ＥＣＤに下線が引かれている

【０２２０】

配列番号４：ネコｐ７５ＮＴＲ核酸配列

ATGGACGGGCCGCGCCCGCTGCTGCTGCTGTTGCCGCTGCTCCTGGGGGTGTCCCTTGGAGGT
GCCAAGGAGGCATGTCCCACGGGCCTGTTCACCCACAGCGGCGAGTGCTGTAAAGCCTGCAAC
CTGGGAGAGGGCGTAGCCCAGCCTTGCGGAGCCAACCAGACCGTGTGTGAGCCCTGCCTGGAC
AGCGTGACCTTCTCGGACGTGGTGAGCGCCACGGAGCCGTGCAAGCCGTGCACCGAGTGCGTG
GGCCTGCAGAGCATGTCGGCGCCGTGCGTGGAGGCCGACGACGCCGTGTGTCGCTGCGCCTA
CGGCTACTACCAGGACGAGACGACGGGCCGCTGCGAGGCGTGCCGCGTGTGCGAGGCGGGCT
CCGGCCTGGTGTTCTCGTGCCAGGACCGGCAGAATACCGTGTGCGAGGAGTGTCCCGACGGCA
CGTACTCGGACGAGGCCAACCACGTGGACCCGTGCCTGCCCTGCACCGTGTGCGAGGACACCG
AGCGCCAGCTGCGCGAGTGCACGCGCTGGGCCGACGCCGAGTGCGAGGAGATCCCTGGCCGT
TGGATTACTCGGTCTACACCTTCGGAGGGCTCGGACAGCACCGCCCCCAGCACGGAGGAGCCA
GAGGTACCTCCAGAGCAAGACCTCATAGCCAGCACGGTGGCAGATGTGGTGACCACAGTGATGG
GCAGCTCTCAGCCCGTAGTGACCCGAGGCACCGCCGACAACCTCATCCCTGTCTATTGTTCCAT
CCTGGCCGCTGTGGTTGTGGGCCTGGTGGCCTACATTGCCTTCAAGAGGTGGAACAGCTGCAAA
CAGGACAAGCAAGGCGCCAACAGCCGGCCCGTGAACCAGACGCCCCCGCCCGAGGGAGAAAA
GCTCCACAGTGACAGTGGCATCTCTGTGGACAGCCAGAGCCTGCATGACCAGCAGTCCCACACG
CAGACGGCCGCCGGCCAGGCCCTCAAGGGGGACGGAGGTCTCTACAGCAGCCTGCCGTCAGC
CAAGCGGGAGGAGGTAGAGAAACTGCTCAACGGCTCTGCGGGGGACACGTGGCGGCACCTGG
CGGGCGAGCTGGGCTACCAGCCTGAGCACATAGACTCCTTCACCCGCGAGGCCTGCCCAGCCC
GGGCCCTGCTCGCCAGCTGGGCCGCCCAGGACAGCGCGACGCTCGACGCCCTCCTGGCCGCC
CTGCGCCGCATCCAGCGGGCCGACATCGTCGAGAGCCTGTGCAGCGAGTCCACGGCCACGTCC
CCGGTGTGA

リーダー配列には下線が引かれている

【０２２１】

配列番号５：ウマｐ７５ＮＴＲタンパク質

KEVCPTDLYTHSGECCKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTE
CVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACQVCEAGSGLVFSCQDKQNTVCEE
CPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEEIPSRWITRATPPEGSDST
APSTQEPEGPPEKDLVASTVADVVTTVMGSSQPVVTRGTTDNLIPVYCSILAAVVVGLVA
YIAFKRWNSCKQNKQGANSRPVNQTPPPEGEKLHSDSGISVDSQSLHDQQPHTQTAAGQA
LKGDGGLYSSLPLAKREEVEKLLNGSAGDTWRHLAGLVGQGLLRLELVSVFQGPAHGGML
PPATPSLQAPVWLGPEGCSEKWDQRGNAARRAGLRVWPMEGLSQV

ＥＣＤに下線が引かれている

【０２２２】

配列番号６：ウマｐ７５ＮＴＲ核酸配列

ATGAGGGCAGGTGCCGCCGACTGCGCCATGGACGGACCGCGCCTTCTGCTGCTGCTTCTGCTC
TTGGGGGTGTGCCTGCTGGGAGGTGCCAAGGAGGTGTGCCCCACAGACCTGTACACCCACAGC

GGCGAGTGCTGCAAAGCCTGCAACCTGGGCGAGGGTGTGGCCCAGCCTTGCGGAGCCAACCAG
ACTGTGTGTGAACCCTGCCTGGACAGCGTGACGTTCTCGGACGTGGTGAGCGCCACAGAGCCAT
GTAAGCCGTGCACCGAGTGCGTGGGCCTGCAGAGCATGTCGGCGCCATGCGTGGAGGCCGAC
GACGCGGTGTGCCGCTGCGCCTATGGCTACTACCAGGACGAGACGACGGGCCGCTGCGAGGC
GTGCCAGGTGTGCGAGGCGGGCTCGGGCCTCGTGTTCTCGTGCCAGGACAAGCAGAACACCGT
GTGCGAGGAATGCCCCGACGGCACGTACTCCGACGAGGCCAACCACGTGGACCCGTGCCTGCC
CTGCACCGTGTGCGAGGACACCGAGCGCCAGCTGCGAGAGTGCACGCGCTGGGCCGACGCCG
AGTGCGAGGAGATCCCCAGCCGTTGGATTACACGGGCCACGCCGCCGGAGGGCTCAGACAGCA
CTGCCCCCAGCACCCAGGAGCCCGAGGGACCTCCAGAGAAAGACCTTGTAGCCAGCACGGTGG
CGGATGTGGTGACCACAGTGATGGGCAGCTCTCAGCCCGTGGTGACCCGAGGCACCACGGACA
ACCTCATCCCCGTCTATTGCTCCATCCTGGCCGCTGTGGTTGTGGGCCTTGTGGCCTACATCGC
CTTCAAGAGGTGGAACAGCTGCAAGCAGAACAAGCAAGGAGCCAACAGCCGACCCGTGAACCA
GACACCACCACCCGAGGGAGAAAAACTCCACAGCGACAGCGGCATCTCTGTGGACAGCCAGAG
CCTGCATGACCAGCAGCCTCACACACAGACAGCCGCAGGCCAGGCCCTCAAGGGAGATGGAGG
CCTCTACAGCAGCCTGCCACTGGCCAAGAGGGAAGAGGTGGAGAAGCTACTCAATGGCTCCGCA
GGGGACACCTGGCGGCACCTGGCGGGTGAGCTGGGCTACCAGCCCGAGCACATAGACTCCTTC
ACCCACGAGGCCTGCCCCGTCCGCGCCCTGCTTGCCAGCTGGGCCGCCCAGGACAGTGCGACA
TTCGATGCCCTCCTGACCGCCCTGCGCCGCATCCAGCGAGCCGACATTGTCGAGAGCCTGTGCA
GCGAGTCCACCGCCACATCCCCGGTGTGA

リーダー配列には下線が引かれている

【０２２３】

配列番号７：イヌｐ７５ＮＴＲタンパク質ＥＣＤ

KEACPTGLYTHSGECCKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQS
MSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDRQNTVCEECPDGTYSDEAN
HVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEEIPGRWITRSTPSEDSDSTAPSTEEPELPPDQEIIAST
MADVVTTVM**GSSQPVVTRGTADN**

ｗｔ　ＥＣＤ領域は、ストーク領域（下線）、並びにストーク領域のアルファ及びガンマセクレターゼ切断３’（太字）を含む。

【０２２４】
配列番号８：イヌｐ７５ＮＴＲ　ＥＣＤ核酸配列
ＡＡＧＧＡＧＧＣＡＴＧＴＣＣＣＡＣＴＧＧＣＣＴＧＴＡＣＡＣＣＣＡＣＡＧＣＧＧＣＧ
ＡＧＴＧＣＴＧＣＡＡＡＧＣＣＴＧＣＡＡＴＣＴＧＧＧＴＧＡＧＧＧＧＧＴＧＧＣＣＣＡ
ＧＣＣＴＴＧＣＧＧＡＧＣＣＡＡＣＣＡＧＡＣＣＧＴＧＴＧＴＧＡＧＣＣＣＴＧＣＣＴＧ
ＧＡＣＡＧＣＧＴＧＡＣＣＴＴＣＴＣＧＧＡＣＧＴＧＧＴＧＡＧＣＧＣＣＡＣＣＧＡＧＣ
ＣＧＴＧＣＡＡＧＣＣＧＴＧＣＡＣＣＧＡＧＴＧＣＧＴＧＧＧＧＣＴＧＣＡＧＡＧＣＡＴ
ＧＴＣＧＧＣＧＣＣＧＴＧＣＧＴＧＧＡＧＧＣＧＧＡＣＧＡＣＧＣＣＧＴＧＴＧＣＣＧＣ
ＴＧＣＧＣＣＴＡＣＧＧＣＴＡＣＴＡＣＣＡＧＧＡＣＧＡＧＡＣＧＡＣＧＧＧＣＣＧＣＴ
ＧＣＧＡＧＧＣＧＴＧＣＣＧＣＧＴＧＴＧＣＧＡＧＧＣＧＧＧＣＴＣＧＧＧＧＣＴＣＧＴ
ＧＴＴＣＴＣＧＴＧＣＣＡＧＧＡＣＡＧＧＣＡＧＡＡＣＡＣＣＧＴＧＴＧＣＧＡＧＧＡＧ
ＴＧＴＣＣＣＧＡＣＧＧＣＡＣＧＴＡＣＴＣＣＧＡＣＧＡＧＧＣＣＡＡＣＣＡＣＧＴＧＧ
ＡＣＣＣＧＴＧＣＣＴＧＣＣＣＴＧＣＡＣＣＧＴＧＴＧＣＧＡＧＧＡＣＡＣＣＧＡＧＣＧ
ＣＣＡＧＣＴＧＣＧＣＧＡＧＴＧＣＡＣＧＣＧＣＴＧＧＧＣＣＧＡＣＧＣＣＧＡＧＴＧＣ
ＧＡＧＧＡＧＡＴＣＣＣＴＧＧＣＣＧＴＴＧＧＡＴＴＡＣＣＣＧＧＴＣＣＡＣＡＣＣＣＴ
ＣＡＧＡＧＧＡＣＴＣＧＧＡＣＡＧＣＡＣＣＧＣＣＣＣＣＡＧＣＡＣＡＧＡＧＧＡＧＣＣ
ＡＧＡＧＣＴＡＣＣＴＣＣＡＧＡＴＣＡＡＧＡＡＡＴＣＡＴＡＧＣＣＡＧＣＡＣＣＡＴＧ
ＧＣＡＧＡＴＧＴＧＧＴＧＡＣＣＡＣＡＧＴＧＡＴＧＧＧＣＡＧＣＴＣＴＣＡＧＣＣＴＧ
ＴＡＧＴＧＡＣＣＣＧＡＧＧＡＡＣＣＧＣＴＧＡＣＡＡＣ
【０２２５】
配列番号９：ｐ７５ＮＴＲストーク領域タンパク質のイヌＥＣＤ
ＷＩＴＲＳＴＰＳＥＤＳＤＳＴＡＰＳＴＥＥＰＥＬＰＰＤＱＥＩＩＡＳＴＭＡＤＶＶＴＴ
ＶＭ
配列番号１０：ｐ７５ＮＴＲストーク領域核酸配列のイヌＥＣＤ
ＴＧＧＡＴＴＡＣＣＣＧＧＴＣＣＡＣＡＣＣＣＴＣＡＧＡＧＧＡＣＴＣＧＧＡＣＡＧＣＡ
ＣＣＧＣＣＣＣＣＡＧＣＡＣＡＧＡＧＧＡＧＣＣＡＧＡＧＣＴＡＣＣＴＣＣＡＧＡＴＣＡ
ＡＧＡＡＡＴＣＡＴＡＧＣＣＡＧＣＡＣＣＡＴＧＧＣＡＧＡＴＧＴＧＧＴＧＡＣＣＡＣＡ
ＧＴＧＡＴＧ
【０２２６】
配列番号１１：イヌｐ７５ＮＴＲ　ＥＣＤ－イヌＩｇＧＢ　ｗｔ　Ｆｃタンパク質融合物

*MEWSWVFLFFLSVTTGVHS*KEACPTGLYTHSGECCKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSD
VVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQD
RQNTVCEECPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEEIP**GGGG**RENGRVPRP
PDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQP
REEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELS
KNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFIC
AVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK

イタリック体下線　シグナルペプチド
イタリック体　イヌｐ７５－ＥＣＤ
リンカー　太字ＧＧＧＧ
下線　イヌＦｃ－Ｂ　ｗｔ
【０２２７】
配列番号１２：イヌｐ７５ＮＴＲ　ＥＣＤ－イヌＩｇＧＢ　ｗｔ　Ｆｃ核酸配列

ATGGAATGGTCCTGGGTGTTCCTGTTCTTCCTGTCCGTGACCACCGGCGTGCACTCCAAAGAGG
CTTGTCCTACCGGCCTGTACACCCACTCTGGCGAGTGTTGCAAGGCCTGTAATCTCGGCGAAGG
CGTGGCACAACCTTGTGGCGCTAATCAGACAGTGTGCGAGCCTTGCCTGGACTCCGTGACCTTC
TCTGATGTGGTGTCTGCCACCGAGCCATGCAAGCCTTGTACCGAGTGTGTGGGCCTGCAGTCCA
TGTCTGCCCCTTGTGTGGAAGCCGACGACGCCGTGTGTAGATGTGCCTACGGCTACTACCAGGA
CGAGACAACCGGAAGATGCGAGGCCTGCAGAGTGTGTGAAGCTGGCTCTGGACTGGTGTTCTCC

TGCCAAGACAGACAGAACACCGTGTGCGAGGAATGCCCTGACGGCACCTACTCTGATGAGGCCA
ATCACGTGGACCCCTGCCTGCCTTGTACTGTGTGCGAAGATACCGAGCGGCAGCTGCGCGAGTG
TACCAGATGGGCTGATGCCGAGTGCGAAGAGATCCCTGGAGGTGGCGGACGCGAGAATGGCAG
AGTGCCTAGACCTCCTGACTGCCCTAAGTGCCCTGCTCCTGAAATGCTCGGCGGACCCTCCGTG
TTCATCTTCCCACCTAAGCCTAAGGACACCCTGCTGATCGCTCGGACCCCTGAAGTGACATGCGT
GGTGGTGGATCTGGACCCCGAGGATCCTGAGGTGCAGATCAGTTGGTTCGTGGACGGCAAGCA
GATGCAGACCGCTAAGACCCAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACGGCACCTACAGAGTGGTGTCT
GTGCTGCCTATCGGCCACCAGGATTGGCTGAAGGGCAAGCAGTTTACCTGCAAAGTGAACAACA
AGGCCCTGCCTTCTCCAATCGAGCGGACCATCTCTAAGGCCAGAGGCCAGGCTCATCAGCCTTC
CGTGTATGTCCTGCCACCTAGCCGCGAGGAACTGTCCAAGAACACCGTGTCTCTGACCTGCCTG
ATCAAGGACTTCTTCCCTCCTGACATCGACGTGGAATGGCAGTCCAACGGCCAGCAAGAGCCCG
AGTCTAAGTACCGGACAACCCCTCCACAGCTGGACGAGGACGGCTCCTACTTCCTGTACTCCAA
GCTGTCCGTGGACAAGTCTCGGTGGCAGAGAGGCGACACCTTCATCTGTGCTGTGATGCACGAG
GCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCACTCCCCTGGCAAGTGA

リーダー配列には下線が引かれている

【０２２８】

配列番号１３：イヌｐ７５ＮＴＲ　ＥＣＤ－イヌＦｃ　ＹＴＥタンパク質融合物

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSKEACPTGLYTHSGECCKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCL
DSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVC
EAGSGLVFSCQDRQNTVCEECPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAE
*CEEIP*GGGGRENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDL
DPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNK
ALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNGQQE
PESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK

イタリック体下線　　シグナルペプチド
イタリック体　　イヌｐ７５－ＥＣＤ
リンカー　太字ＧＧＧＧ
下線　　イヌＦｃ－Ｂ－ＹＴＥ

【０２２９】

配列番号１４：イヌｐ７５ＮＴＲ　ＥＣＤ－Ｆｃ　ＹＴＥ核酸配列

ATGGAATGGTCCTGGGTGTTCCTGTTCTTCCTGTCCGTGACCACCGGCGTGCACTCCAAAGAGG
CTTGTCCTACCGGCCTGTACACCCACTCTGGCGAGTGTTGCAAGGCCTGTAATCTCGGCGAAGG
CGTGGCACAACCTTGTGGCGCTAATCAGACAGTGTGCGAGCCTTGCCTGGACTCCGTGACCTTC
TCTGATGTGGTGTCTGCCACCGAGCCATGCAAGCCTTGTACCGAGTGTGTGGGCCTGCAGTCCA

TGTCTGCCCCTTGTGTGGAAGCCGACGACGCCGTGTGTAGATGTGCCTACGGCTACTACCAGGA
CGAGACAACCGGAAGATGCGAGGCCTGCAGAGTGTGTGAAGCTGGCTCTGGACTGGTGTTCTCC
TGCCAAGACAGACAGAACACCGTGTGCGAGGAATGCCCTGACGGCACCTACTCTGATGAGGCCA
ATCACGTGGACCCCTGCCTGCCTTGTACTGTGTGCGAAGATACCGAGCGGCAGCTGCGCGAGTG
TACCAGATGGGCTGATGCCGAGTGCGAAGAGATCCCTGGAGGTGGCGGACGCGAGAATGGCAG
AGTGCCTAGACCTCCTGACTGCCCTAAGTGCCCTGCTCCTGAAATGCTCGGCGGACCCTCCGTG
TTCATCTTCCCACCTAAGCCTAAGGACACCCTGTATATCACTCGGGAACCTGAAGTGACATGCGT
GGTGGTGGATCTGGACCCCGAGGATCCTGAGGTGCAGATCAGTTGGTTCGTGGACGGCAAGCA
GATGCAGACCGCTAAGACCCAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACGGCACCTACAGAGTGGTGTCT
GTGCTGCCTATCGGCCACCAGGATTGGCTGAAGGGCAAGCAGTTTACCTGCAAAGTGAACAACA
AGGCCCTGCCTTCTCCAATCGAGCGGACCATCTCTAAGGCCAGAGGCCAGGCTCATCAGCCTTC
CGTGTATGTCCTGCCACCTAGCCGCGAGGAACTGTCCAAGAACACCGTGTCTCTGACCTGCCTG
ATCAAGGACTTCTTCCCTCCTGACATCGACGTGGAATGGCAGTCCAACGGCCAGCAAGAGCCCG
AGTCTAAGTACCGGACAACCCCTCCACAGCTGGACGAGGACGGCTCCTACTTCCTGTACTCCAA
GCTGTCCGTGGACAAGTCTCGGTGGCAGAGAGGCGACACCTTCATCTGTGCTGTGATGCACGAG
GCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCACTCCCCTGGCAAGTGA

リーダー配列には下線が引かれている

【０２３０】

配列番号１５　ＩｇＧ－Ａ

ＭＥＦＶＬＧＷＶＦＬＶＡＩＬＱＧＶＱＧＥＶＱＬＶＥＳＧＧＤＬＶＫＰＡＧＳＬＲＬＳ
ＣＶＡＳＧＦＴＦＳＮＮＡＭＮＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＱＷＶＡＧＩＮＳＧＧＳＴＡＳＡＤ
ＡＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＡＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＴＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＫＶＩＧＮ
ＷＩＡＴＳＤＬＤＹＷＧＱＧＴＬＶＩＶＳＳＡＳＴＴＡＰＳＶＦＰＬＡＰＳＣＧＳＴＳＧ
ＳＴＶＡＬＡＣＬＶＳＧＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＳＬＴＳＧＶＨＴＦＰＳＶＬＱＳＳ
ＧＬＹＳＬＳＳＭＶＴＶＰＳＳＲＷＰＳＥＴＦＴＣＮＶＶＨＰＡＳＮＴＫＶＤＫＰＶＦＮ
ＥＣＲＣＴＤＴＰＰＣＰＶＰＥＰＬＧＧＰＳＶＬＩＦＰＰＫＰＫＤＩＬＲＩＴＲＴＰＥＶ
ＴＣＶＶＬＤＬＧＲＥＤＰＥＶＱＩＳＷＦＶＤＧＫＥＶＨＴＡＫＴＱＳＲＥＱＱＦＮＧＴ
ＹＲＶＶＳＶＬＰＩＥＨＱＤＷＬＴＧＫＥＦＫＣＲＶＮＨＩＤＬＰＳＰＩＥＲＴＩＳＫＡ
ＲＧＲＡＨＫＰＳＶＹＶＬＰＰＳＰＫＥＬＳＳＳＤＴＶＳＩＴＣＬＩＫＤＦＹＰＰＤＩＤ
ＶＥＷＱＳＮＧＱＱＥＰＥＲＫＨＲＭＴＰＰＱＬＤＥＤＧＳＹＦＬＹＳＫＬＳＶＤＫＳＲ
ＷＱＱＧＤＰＦＴＣＡＶＭＨＥＴＬＱＮＨＹＴＤＬＳＬＳＨＳＰＧＫ

【０２３１】

配列番号１６　ＩｇＧ－Ｂ

ＭＥＦＶＬＧＷＶＦＬＶＡＩＬＱＧＶＱＧＥＶＱＬＶＥＳＧＧＤＬＶＫＰＡＧＳＬＲＬＳ
ＣＶＡＳＧＦＴＦＳＮＮＡＭＮＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＱＷＶＡＧＩＮＳＧＧＳＴＡＳＡＤ
ＡＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＡＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＴＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＫＶＩＧＮ
ＷＩＡＴＳＤＬＤＹＷＧＱＧＴＬＶＩＶＳＳＡＳＴＴＡＰＳＶＦＰＬＡＰＳＣＧＳＴＳＧ
ＳＴＶＡＬＡＣＬＶＳＧＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＳＬＴＳＧＶＨＴＦＰＳＶＬＱＳＳ

GLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPASKTKVDKPVPK
RENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDTLLIA
RTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREE
QFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIER
TISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFFP
PDIDVEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSV
DKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK

【０２３２】

配列番号１７　ＩｇＧ－Ｃ

MEFVLGWVFLVAILQGVQGEVQLVESGGDLVKPAGSLRLS
CVASGFTFSNNAMNWVRQAPGKGLQWVAGINSGGSTASAD
AVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLTAEDTAVYYCAKVIGN
WIATSDLDYWGQGTLVIVSSASTTAPSVFPLAPSCGSQSG
STVALACLVSGYIPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSILQSS
GLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPATNTKVDKPVVK
ECECKCNCNNCPCPGCGLLGGPSVFIFPPKPKDILVTART
PTVTCVVVDLDPENPEVQISWFVDSKQVQTANTQPREEQS
NGTYRVVSVLPIGHQDWLSGKQFKCKVNNKALPSPIEEII
SKTPGQAHQPNVYVLPPSRDEMSKNTVTLTCLVKDFFPPE
IDVEWQSNGQQEPESKYRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDK
SRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK

【０２３３】

配列番号１８　ＩｇＧ－Ｄ

MEFVLGWVFLVAILQGVQGEVQLVESGGDLVKPAGSLRLS
CVASGFTFSNNAMNWVRQAPGKGLQWVAGINSGGSTASAD
AVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLTAEDTAVYYCAKVIGN
WIATSDLDYWGQGTLVIVSSASSTAPSVFPLAPSCGSTSG
STVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLKSS
GLYSLSSMVTVPSSRLPSETFTCNVVHPATNTKVDKPVPK
ESTCKCISPCPVPESLGGPSVFIFPPKPKDILRITRTPEV
TCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHTAKTQPREQQFNST
YRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIGLPSPIERTISKA
RGQAHQPGVYVLPPSPKELSSSDTVTLTCLIKDFFPPEID
VEWQSNGQPEPESKYHTTAPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSR
WQQGDPFTCAVMHEALQNHYTDLSLSHSPGK

【０２３４】

配列番号１９

ＤＯＧＡ定常領域

FNECRCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILRITRTP
EVTCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHTAKTQSREQQFN
GTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIDLPSPIERTIS
KARGRAHKPSVYVLPPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPD
IDVEWQSNGQQEPERKHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDK
SRWQQGDPFTCAVMHETLQNHYTDLSLSHSPGK

配列番号２０

ＤＯＧＢ定常領域

RENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDTLLIA
RTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREE
QFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIER
TISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFFP

PDIDVEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSV
DKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK
【０２３５】
配列番号２１
ＤＯＧＢ－ＹＴＥ定常領域
RENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDTLYIT
REPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREE
QFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIER
TISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFFP
PDIDVEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSV
DKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK
配列番号２２
ＤＯＧＣ定常領域
ECECKCNCNNCPCPGCGLLGGPSVFIFPPKPKDILVTART
PTVTCVVVDLDPENPEVQISWFVDSKQVQTANTQPREEQS
NGTYRVVSVLPIGHQDWLSGKQFKCKVNNKALPSPIEEII
SKTPGQAHQPNVYVLPPSRDEMSKNTVTLTCLVKDFFPPE
IDVEWQSNGQQEPESKYRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDK
SRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK
【０２３６】
配列番号２３
ＤＯＧＤ定常領域
ESTCKCISPCPVPESLGGPSVFIFPPKPKDILRITRTPEV
TCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHTAKTQPREQQFNST
YRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIGLPSPIERTISKA
RGQAHQPGVYVLPPSPKELSSSDTVTLTCLIKDFFPPEID
VEWQSNGQPEPESKYHTTAPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSR
WQQGDPFTCAVMHEALQNHYTDLSLSHSPGK
配列番号２４
ＣＡＴ＿ＩＧＧ１Ｖ１定常領域
TDHPPGPKPCDCPKCPPPEMLGGPSIFIFPPKPKDTLSIS
RTPEVTCLVVDLGPDDSDVQITWFVDNTQVYTAKTSPREE
QFNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSPIER
TISKAKGQPHEPQVYVLPPAQEELSRNKVSVTCLIKSFHP
PDIAVEWEITGQPEPENNYRTTPPQLDSDGTYFVYSKLSV
DRSHWQRGNTYTCSVSHEALHSHHTQKSLTQSPGK
【０２３７】
配列番号２５
ＣＡＴ＿ＩＧＧ１Ｖ２定常領域
TDHPPGPKPCDCPKCPPPEMLGGPSIFIFPPKPKDTLSIS
RTPEVTCLVVDLGPDDSDVQITWFVDNTQVYTAKTSPREE
QFNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSPIER
TISKAKGQPHEPQVYVLPPAQEELSRNKVSVTCLIKSFHP
PDIAVEWEITGQPEPENNYRTTPPQLDSDGTYFVYSKLSV
DRSHWQRGNTYTCSVSHEALHSHHTQKSLTQSPGK
配列番号２６
ＣＡＴ＿ＩＧＧ２定常領域
KTASTIESKTGEGPKCPVPEIPGAPSVFIFPPKPKDTLSI
SRTPEVTCLVVDLGPDDSNVQITWFVDNTEMHTAKTRPRE
EQFNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSAME

RTISKAKGQPHEPQVYVLPPTQEELSENKVSVTCLIKGFH
PPDIAVEWEITGQPEPENNYQTTPPQLDSDGTYFLYSRLS
VDRSHWQRGNTYTCSVSHEALHSHHTQKSLTQSPGK
【０２３８】
配列番号２７
ＨＯＲＳＥ＿ＩＧＨＧ１定常領域
VIKECNGGCPAECLQVGPSVFIFPPKPKDVLMISRTPTVT
CVVVDVGHDFPDVQFNWYVDGVETHTATTEPKQEQFNSTY
RVVSVLPIQHKDWLSGKEFKCKVNNKALPAPVERTISKPT
GQPREPQVYVLAPHRDELSKNKVSVTCLVKDFYPTDIDIE
WKSNGQPEPETKYSTTPAQLDSDGSYFLYSKLTVETNRWQ
QGTTFTCAVMHEALHNHYTEKSVSKSPGK
配列番号２８
ＨＯＲＳＥ＿ＩＧＨＧ２定常領域
CVLSAEGVIPIPSVPKPQCPPYTHSKFLGGPSVFIFPPNP
KDALMISRTPVVTCVVVNLSDQYPDVQFSWYVDNTEVHSA
ITKQREAQFNSTYRVVSVLPIQHQDWLSGKEFKCSVTNVG
VPQPISRAISRGKGPSRVPQVYVLPPHPDELAKSKVSVTC
LVKDFYPPDISVEWQSNRWPELEGKYSTTPAQLDGDGSYF
LYSKLSLETSRWQQVESFTCAVMHEALHNHFTKTDISESL
GK
【０２３９】
配列番号２９
ＨＯＲＳＥ＿ＩＧＨＧ３
TTPPCPCECPKCPAPELLGGPSVFIFPPKPKDVLMITRTP
EVTCLVVDVSHDSSDVLFTWYVDGTEVKTAKTMPNEEQNN
STYRVVSVLRIQHQDWLNGKKFKCKVNNQALPAPVERTIS
KATGQTRVPQVYVLAPHPDELSKNKVSVTCLVKDFLPTDI
TVEWQSNEHPEPEGKYRTTEAQKDSDGSYFLYSKLTVETD
RWQQGTTFTCVVMHEALHNHVMQKNVSHSPGK
配列番号３０
ＨＯＲＳＥ＿ＩＧＨＧ４定常領域
VIKECNGGCPAECLQVGPSVFIFPPKPKDVLMISRTPTVT
CVVVDVGHDFPDVQFNWYVDGVETHTATTEPKQEQFNSTY
RVVSVLPIQHKDWLSGKEFKCKVNNKALPAPVERTISKPT
GQPREPQVYVLAPHRDELSKNKVSVTCLVKDFYPTDIDIE
WKSNGQPEPETKYSTTPAQLDSDGSYFLYSKLTVETNRWQ
QGTTFTCAVMHEALHNHYTEKSVSKSPGK
【０２４０】
配列番号３１
ＨＯＲＳＥ＿ＩＧＨＧ５定常領域
VVKGSPCPKCPAPELPGGPSVFIFPPKPKDVLKISRKPEV
TCVVVDLGHDDPDVQFTWFVDGVETHTATTEPKEEQFNST
YRVVSVLPIQHQDWLSGKEFKCSVTNKALPAPVERTTSKA
KGQLRVPQVYVLAPHPDELAKNTVSVTCLVKDFYPPEIDV
EWQSNEHPEPEGKYSTTPAQLNSDGSYFLYSKLSVETSRW
KQGESFTCGVMHEAVENHYTQKNVSHSPGK
配列番号３２
＞ＨＯＲＳＥ＿ＩＧＨＧ６定常領域
KEPCCCPKCPGRPSVFIFPPNPKDTLMISRTPEVTCVVVD

ＶＳＱＥＮＰＤＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＡＨＴＡＴＴＫＡＫＥＫＱＤＮＳＴＹＲＶＶＳＶ
ＬＰＩＱＨＱＤＷＲＲＧＫＥＦＫＣＫＶＮＮＲＡＬＰＡＰＶＥＲＴＩＴＫＡＫＧＥＬＱＤ
ＰＫＶＹＩＬＡＰＨＲＥＥＶＴＫＮＴＶＳＶＴＣＬＶＫＤＦＹＰＰＤＩＮＶＥＷＱＳＮＥ
ＥＰＥＰＥＶＫＹＳＴＴＰＡＱＬＤＧＤＧＳＹＦＬＹＳＫＬＴＶＥＴＤＲＷＥＱＧＥＳＦ
ＴＣＶＶＭＨＥＡＩＲＨＴＹＲＱＫＳＩＴＮＦＰＧＫ

【０２４１】

配列番号３３

ＨＯＲＳＥ＿ＩＧＨＧ７定常領域

ＶＩＫＥＣＧＧＣＰＴＣＰＥＣＬＳＶＧＰＳＶＦＩＦＰＰＫＰＫＤＶＬＭＩＳＲＴＰＴＶ
ＴＣＶＶＶＤＶＧＨＤＦＰＤＶＱＦＮＷＹＶＤＧＶＥＴＨＴＡＴＴＥＰＫＱＥＱＮＮＳＴ
ＹＲＶＶＳＩＬＡＩＱＨＫＤＷＬＳＧＫＥＦＫＣＫＶＮＮＱＡＬＰＡＰＶＱＫＴＩＳＫＰ
ＴＧＱＰＲＥＰＱＶＹＶＬＡＰＨＲＤＥＬＳＫＮＫＶＳＶＴＣＬＶＫＤＦＹＰＴＤＩＤＩ
ＥＷＫＳＮＧＱＰＥＰＥＴＫＹＳＴＴＰＡＱＬＤＳＤＧＳＹＦＬＹＳＫＬＴＶＥＴＮＲＷ
ＱＱＧＴＴＦＴＣＡＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＥＫＳＶＳＫＳＰＧＫ

【０２４２】

配列番号３４

融合構築物で使用されるイヌＥＣＤの一部分（ストークなし、並びにストーク領域のアルファ及びガンマセクレターゼ切断３’なし）

ＫＥＡＣＰＴＧＬＹＴＨＳＧＥＣＣＫＡＣＮＬＧＥＧＶＡＱＰＣＧＡＮＱＴＶＣＥＰＣＬ
ＤＳＶＴＦＳＤＶＶＳＡＴＥＰＣＫＰＣＴＥＣＶＧＬＱＳＭＳＡＰＣＶＥＡＤＤＡＶＣＲ
ＣＡＹＧＹＹＱＤＥＴＴＧＲＣＥＡＣＲＶＣＥＡＧＳＧＬＶＦＳＣＱＤＲＱＮＴＶＣＥＥ
ＣＰＤＧＴＹＳＤＥＡＮＨＶＤＰＣＬＰＣＴＶＣＥＤＴＥＲＱＬＲＥＣＴＲＷＡＤＡＥＣ
ＥＥＩＰＫＥＡＣＰＴＧＬＹＴＨＳＧＥＣＣＫＡＣＮＬＧＥＧＶＡＱＰＣＧＡＮＱＴＶＣ
ＥＰＣＬＤＳＶＴＦＳＤＶＶＳＡＴＥＰＣＫＰＣＴＥＣＶＧＬＱＳＭＳＡＰＣＶＥＡＤＤ
ＡＶＣＲＣＡＹＧＹＹＱＤＥＴＴＧＲＣＥＡＣＲＶＣＥＡＧＳＧＬＶＦＳＣＱＤＲＱＮＴ
ＶＣＥＥＣＰＤＧＴＹＳＤＥＡＮＨＶＤＰＣＬＰＣＴＶＣＥＤＴＥＲＱＬＲＥＣＴＲＷＡ
ＤＡＥＣＥＥＩＰ

配列番号３５融合構築物で使用されるイヌｐ７５ＮＴＲ　ＥＣＤ核酸配列（ストークなし、並びにストーク領域のアルファ及びガンマセクレターゼ切断３’なし）

ＡＡＧＧＡＧＧＣＡＴＧＴＣＣＣＡＣＴＧＧＣＣＴＧＴＡＣＡＣＣＣＡＣＡＧＣＧＧＣＧ
ＡＧＴＧＣＴＧＣＡＡＡＧＣＣＴＧＣＡＡＴＣＴＧＧＧＴＧＡＧＧＧＧＧＴＧＧＣＣＣＡ
ＧＣＣＴＴＧＣＧＧＡＧＣＣＡＡＣＣＡＧＡＣＣＧＴＧＴＧＴＧＡＧＣＣＣＴＧＣＣＴＧ
ＧＡＣＡＧＣＧＴＧＡＣＣＴＴＣＴＣＧＧＡＣＧＴＧＧＴＧＡＧＣＧＣＣＡＣＣＧＡＧＣ
ＣＧＴＧＣＡＡＧＣＣＧＴＧＣＡＣＣＧＡＧＴＧＣＧＴＧＧＧＧＣＴＧＣＡＧＡＧＣＡＴ
ＧＴＣＧＧＣＧＣＣＧＴＧＣＧＴＧＧＡＧＧＣＧＧＡＣＧＡＣＧＣＣＧＴＧＴＧＣＣＧＣ
ＴＧＣＧＣＣＴＡＣＧＧＣＴＡＣＴＡＣＣＡＧＧＡＣＧＡＧＡＣＧＡＣＧＧＧＣＣＧＣＴ
ＧＣＧＡＧＧＣＧＴＧＣＣＧＣＧＴＧＴＧＣＧＡＧＧＣＧＧＧＣＴＣＧＧＧＧＣＴＣＧＴ
ＧＴＴＣＴＣＧＴＧＣＣＡＧＧＡＣＡＧＧＣＡＧＡＡＣＡＣＣＧＴＧＴＧＣＧＡＧＧＡＧ
ＴＧＴＣＣＣＧＡＣＧＧＣＡＣＧＴＡＣＴＣＣＧＡＣＧＡＧＧＣＣＡＡＣＣＡＣＧＴＧＧ
ＡＣＣＣＧＴＧＣＣＴＧＣＣＣＴＧＣＡＣＣＧＴＧＴＧＣＧＡＧＧＡＣＡＣＣＧＡＧＣＧ
ＣＣＡＧＣＴＧＣＧＣＧＡＧＴＧＣＡＣＧＣＧＣＴＧＧＧＣＣＧＡＣＧＣＣＧＡＧＴＧＣ
ＧＡＧＧＡＧＡＴＣＣＣＴＧＧＣＣＧＴ

【０２４３】

配列番号３６：ウシｐ７５ＮＴＲタンパク質

KEACLTGLYTHSGECCKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQS
MSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDKQNTVCEECPDGTYSDEAN
HVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEEIPGRWITRATPPEGSDSTDPSTQEPEVPPEQDLVTS

TVSDVVTTVMGSSQPVVTRGTADNLIPVYCSILAAVVVGLVAYIAFKRWNSCKQNKQGANSRPVNQT
PPPEGEKLHSDSGISVDSQSLHDQQPHTQTAAGQALKGDGGLYSSLPLAKREEVEKLLNGSAGDTW
RHLAGELGYQPEHIDSFTHEACPARALLASWAAQDSATLDTLLAALRRIQRADLVESLCSESTATSPV

ＥＣＤに下線が引かれている

【０２４４】

配列番号３７：ウシｐ７５　ＮＴＲ核酸

ＡＴＧＧＧＴＣＡＧＧＴＧＣＣＧＣＣＧＧＣＣＧＣＧＣＣＡＴＧＧＡＣＧＧＧＣＣＧＣ
ＧＣＣＴＧＣＴＧＣＴＧＣＴＧＣＴＧＣＴＧＣＴＧＣＴＣＣＴＧＧＧＧＧＴＧＴＣＣＣＴ
ＴＧＧＡＧＧＴＧＣＣＡＡＧＧＡＡＧＣＡＴＧＣＣＴＣＡＣＧＧＧＣＣＴＧＴＡＣＡＣＣ
ＣＡＣＡＧＣＧＧＡＧＡＧＴＧＣＴＧＣＡＡＡＧＣＣＴＧＣＡＡＣＣＴＧＧＧＣＧＡＧＧ
ＧＴＧＴＧＧＣＣＣＡＧＣＣＴＴＧＴＧＧＡＧＣＣＡＡＣＣＡＧＡＣＣＧＴＧＴＧＴＧＡ
ＡＣＣＣＴＧＣＣＴＧＧＡＣＡＧＣＧＴＧＡＣＣＴＴＣＴＣＧＧＡＣＧＴＧＧＴＧＡＧＣ
ＧＣＣＡＣＧＧＡＧＣＣＧＴＧＴＡＡＧＣＣＧＴＧＣＡＣＧＧＡＧＴＧＣＧＴＧＧＧＡＣ
ＴＧＣＡＧＡＧＣＡＴＧＴＣＧＧＣＧＣＣＣＴＧＣＧＴＧＧＡＧＧＣＣＧＡＣＧＡＣＧＣ
ＣＧＴＧＴＧＣＣＧＣＴＧＣＧＣＣＴＡＣＧＧＣＴＡＴＴＡＣＣＡＧＧＡＣＧＡＧＡＣＧ
ＡＣＣＧＧＣＣＧＣＴＧＣＧＡＧＧＣＧＴＧＣＣＧＣＧＴＧＴＧＣＧＡＧＧＣＧＧＧＣＴ
ＣＧＧＧＧＣＴＣＧＴＧＴＴＣＴＣＧＴＧＣＣＡＧＧＡＣＡＡＧＣＡＧＡＡＣＡＣＣＧＴ
ＣＴＧＣＧＡＧＧＡＧＴＧＣＣＣＣＧＡＣＧＧＣＡＣＧＴＡＣＴＣＣＧＡＣＧＡＧＧＣＣ
ＡＡＣＣＡＣＧＴＧＧＡＣＣＣＣＴＧＣＣＴＧＣＣＣＴＧＣＡＣＧＧＴＧＴＧＣＧＡＧＧ
ＡＣＡＣＧＧＡＧＣＧＣＣＡＧＣＴＧＣＧＣＧＡＧＴＧＣＡＣＧＣＧＣＴＧＧＧＣＣＧＡ
ＣＧＣＣＧＡＧＴＧＣＧＡＧＧＡＧＡＴＣＣＣＴＧＧＡＣＧＴＴＧＧＡＴＴＡＣＡＣＧＧ
ＧＣＣＡＣＧＣＣＣＣＣＴＧＡＧＧＧＣＴＣＣＧＡＣＡＧＣＡＣＡＧＡＣＣＣＣＡＧＣＡ
ＣＣＣＡＧＧＡＧＣＣＣＧＡＧＧＴＡＣＣＴＣＣＡＧＡＧＣＡＡＧＡＴＣＴＧＧＴＡＡＣ
ＣＡＧＣＡＣＴＧＴＧＴＣＡＧＡＴＧＴＧＧＴＧＡＣＣＡＣＧＧＴＧＡＴＧＧＧＣＡＧＣ
ＴＣＣＣＡＧＣＣＴＧＴＧＧＴＧＡＣＣＣＧＡＧＧＴＡＣＣＧＣＣＧＡＣＡＡＣＣＴＣＡ
ＴＣＣＣＴＧＴＣＴＡＴＴＧＣＴＣＣＡＴＣＣＴＧＧＣＴＧＣＴＧＴＧＧＴＴＧＴＧＧＧ
ＣＣＴＴＧＴＧＧＣＣＴＡＣＡＴＣＧＣＣＴＴＣＡＡＧＡＧＧＴＧＧＡＡＣＡＧＣＴＧＣ
ＡＡＧＣＡＧＡＡＣＡＡＧＣＡＡＧＧＡＧＣＣＡＡＣＡＧＣＣＧＡＣＣＴＧＴＧＡＡＣＣ
ＡＧＡＣＡＣＣＣＣＣＡＣＣＡＧＡＧＧＧＧＧＡＡＡＡＧＣＴＡＣＡＣＡＧＣＧＡＴＡＧ
ＣＧＧＣＡＴＣＴＣＴＧＴＧＧＡＣＡＧＣＣＡＧＡＧＣＣＴＧＣＡＴＧＡＣＣＡＧＣＡＧ
ＣＣＣＣＡＣＡＣＧＣＡＧＡＣＴＧＣＣＧＣＡＧＧＣＣＡＧＧＣＣＣＴＣＡＡＧＧＧＴＧ
ＡＴＧＧＡＧＧＣＣＴＣＴＡＣＡＧＣＡＧＣＣＴＧＣＣＧＣＴＧＧＣＣＡＡＧＣＧＧＧＡ
ＧＧＡＧＧＴＧＧＡＧＡＡＧＣＴＧＣＴＣＡＡＣＧＧＣＴＣＴＧＣＧＧＧＧＧＡＣＡＣＣ
ＴＧＧＣＧＧＣＡＴＣＴＧＧＣＡＧＧＣＧＡＧＴＴＧＧＧＴＴＡＣＣＡＧＣＣＴＧＡＧＣ
ＡＣＡＴＡＧＡＣＴＣＣＴＴＣＡＣＣＣＡＣＧＡＧＧＣＣＴＧＣＣＣＡＧＣＣＣＧＣＧＣ
ＣＣＴＧＣＴＧＧＣＣＡＧＣＴＧＧＧＣＴＧＣＣＣＡＧＧＡＣＡＧＣＧＣＣＡＣＧＣＴＣ
ＧＡＣＡＣＣＣＴＣＣＴＴＧＣＧＧＣＣＣＴＧＣＧＣＣＧＣＡＴＣＣＡＧＣＧＣＧＣＣＧ
ＡＣＡＴＣＧＴＧＧＡＧＡＧＣＣＴＧＴＧＣＡＧＣＧＡＧＴＣＣＡＣＧＧＣＣＡＣＧＴＣ
ＣＣＣＣＧＴＧＴＧＡ

【０２４５】

配列番号３８：ネコｐ７５ＮＴＲタンパク質ＥＣＤ

ＫＥＡＣＰＴＧＬＦＴＨＳＧＥＣＣＫＡＣＮＬＧＥＧＶＡＱＰＣＧＡＮＱＴＶＣＥＰＣＬ
ＤＳＶＴＦＳＤＶＶＳＡＴＥＰＣＫＰＣＴＥＣＶＧＬＱＳＭＳＡＰＣＶＥＡＤＤＡＶＣＲ
ＣＡＹＧＹＹＱＤＥＴＴＧＲＣＥＡＣＲＶＣＥＡＧＳＧＬＶＦＳＣＱＤＲＱＮＴＶＣＥＥ
ＣＰＤＧＴＹＳＤＥＡＮＨＶＤＰＣＬＰＣＴＶＣＥＤＴＥＲＱＬＲＥＣＴＲＷＡＤＡＥＣ
ＥＥＩＰＧＲＷＩＴＲＳＴＰＳＥＧＳＤＳＴ
ＡＰＳＴＥＥＰＥＶＰＰＥＱＤＬＩＡＳＴＶＡＤＶＶＴＴＶＭＧＳＳＱＰＶＶＴＲＧＴＡ
ＤＮ

【０２４６】

配列番号３９：ネコｐ７５ＮＴＲ　ＥＣＤ－ネコＩｇＧ１　ｗｔ　Ｆｃタンパク質融合物

*MDGPRPLLLLLPLLLGVSLGGA*KEACPTGLFTHSGECCKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTF
SDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSC
QDRQNTVCEECPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEEIPGR**GGGG**VPKTA

STIESKTCDCPKCPVPEIPGAPSVFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLGPDDSNVQITWFVDNTEMHT
AKTRPREEQFNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSAMERTISKAKGQPHEPQVYVLPPT
QEELSENKVSVTCLIKGFHPPDIAVEWEITGQPEPENNYQTTPPQLDSDGTYFLYSRLSVDRSHWQR
GNTYTCSVSHEALHSHHTQKSLTQSPGK

イタリック体下線　シグナルペプチド

イタリック体　ネコｐ７５－ＥＣＤ

リンカー　太字ＧＧＧＧ

下線　　ネコＦｃ－ＩｇＧ１

【０２４７】

配列番号４０：ネコｐ７５ＮＴＲ　ＥＣＤ－ネコＩｇＧ１　ｗｔ　Ｆｃ核酸配列

ATGGATGGACCTAGACCTCTGCTGCTGCTCCTGCCTCTGCTGTTGGGAGTTTCTCTCGGCGGAG
CCAAAGAGGCTTGTCCTACCGGCCTGTTTACCCACTCTGGCGAGTGTTGCAAGGCCTGTAATCTC
GGCGAAGGCGTGGCACAACCTTGTGGCGCTAATCAGACAGTGTGCGAGCCTTGCCTGGACTCC
GTGACCTTCTCTGATGTGGTGTCTGCCACCGAGCCATGCAAGCCTTGTACCGAGTGTGTGGGCC
TGCAGTCCATGTCTGCCCCTTGTGTGGAAGCCGACGACGCCGTGTGTAGATGTGCCTACGGCTA
CTACCAGGACGAGACAACCGGAAGATGCGAGGCCTGCAGAGTGTGTGAAGCTGGCTCTGGACT
GGTGTTCTCCTGCCAAGACAGACAGAACACCGTGTGCGAGGAATGCCCTGACGGCACCTACTCT
GATGAGGCCAATCACGTGGACCCCTGCCTGCCTTGTACTGTGTGCGAAGATACCGAGCGGCAGC
TGCGCGAGTGTACCAGATGGGCTGATGCCGAGTGCGAAGAGATCCCTGGAAGAGGCGGAGGCG
GAGTGCCTAAGACCGCTTCTACCATCGAGTCCAAGACCTGCGACTGCCCTAAGTGCCCTGTGCC
TGAAATTCCTGGCGCTCCCTCCGTGTTCATCTTCCCACCTAAGCCTAAGGACACCCTGTCCATCT
CTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCCTGGTGGTTGATCTGGGCCCTGACGACTCCAACGTGCAGAT
CACTTGGTTTGTGGACAACACCGAGATGCACACCGCCAAGACCAGACCTAGAGAGGAACAGTTC
AACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGCCCATCCTGCACCAGGATTGGCTGAAGGGCAAAG
AATTCAAGTGCAAAGTGAACTCCAAGAGCCTGCCTTCCGCCATGGAACGGACCATCTCTAAGGCT
AAGGGCCAGCCTCATGAGCCCCAGGTGTACGTTCTGCCTCCTACACAAGAGGAACTGTCCGAGA
ACAAAGTGTCCGTGACATGCCTGATCAAGGGCTTTCACCCTCCTGATATCGCCGTGGAATGGGA
GATCACCGGACAGCCTGAGCCTGAGAACAACTACCAGACCACACCTCCTCAGCTGGACAGCGAC
GGAACCTACTTCCTGTACTCCCGGCTGTCCGTGGACAGATCCCATTGGCAGAGAGGCAACACCT
ACACCTGTTCCGTGTCTCACGAGGCCCTGCACTCTCATCACACCCAGAAGTCCCTGACACAGTCC
CCTGGCAAG

【０２４８】

配列番号４１：ネコＩｇＧ３

ＬＰＰＣＫＣＰＫＣＰＶＰＥＩＰＧＧＰＳＶＦＩＦＰＰＫＰＫＤＴＬＳＩＳＲＴＰＥＶＴ
ＣＬＶＶＤＬＧＰＤＤＳＮＶＱＩＴＷＦＶＤＮＴＥＭＨＴＡＫＴＲＰＲＥＥＱＦＮＳＴＹ
ＲＶＶＳＶＬＰＩＶＨＱＤＷＬＴＧＫＥＦＫＣＫＶＮＳＫＡＬＰＳＡＩＥＲＴＩＳＫＡＫ
ＧＱＰＨＥＰＱＶＹＶＬＰＰＡＱＥＥＬＳＥＮＫＶＣＶＴＣＬＩＫＧＦＹＰＰＤＩＡＶＥ
ＷＥＩＴＧＱＰＥＰＥＮＮＹＲＴＴＰＰＱＬＤＳＤＧＴＹＦＶＹＳＲＬＳＭＤＲＳＲＷＱ
ＳＧＮＴＹＴＣＳＶＳＨＥＡＬＨＳＨＨＴＱＫＳＬＴＱＳＰＧＫ

＊　＊　＊

【０２４９】

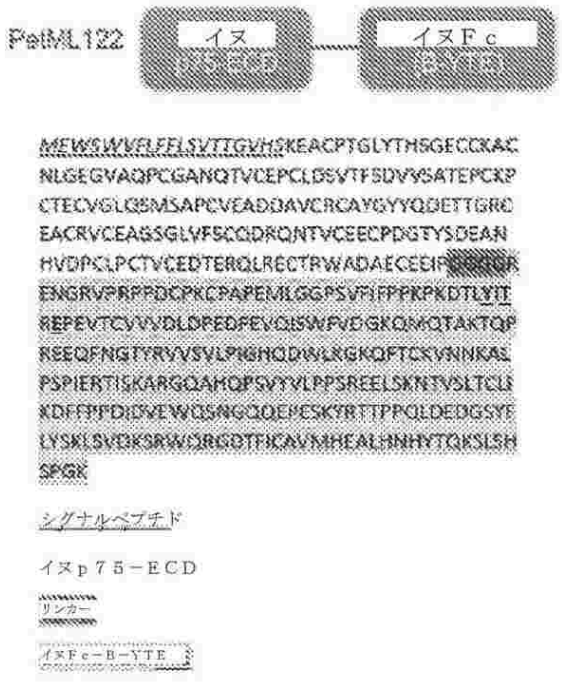
上述のように、本発明の好ましい実施形態を詳細に説明したが、本発明の精神又は範囲から逸脱することなく、その多くの明白な変形が可能であるため、上記各パラグラフによって明確にされる本発明は、上記の説明に記載される特定の詳細に限定されるものではないことを理解されたい。

【図面】

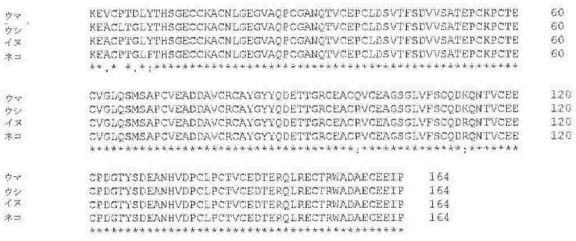
【図１ａ】



【図１ｂ】



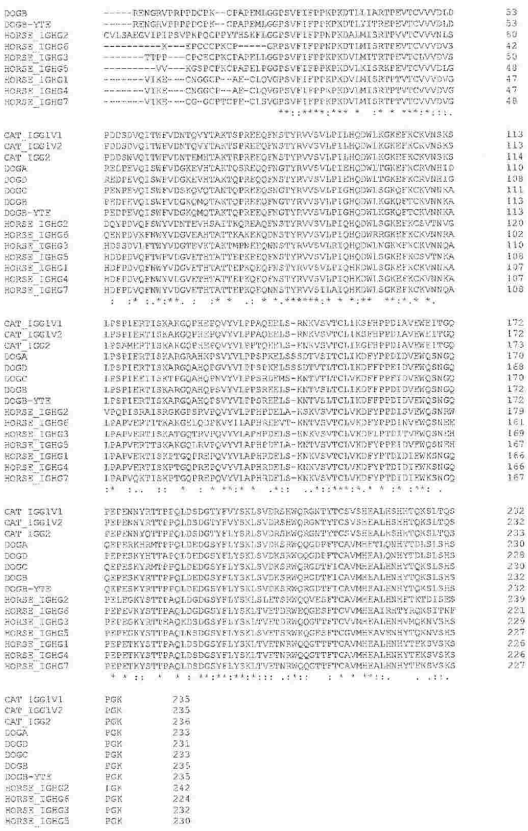
【図２ａ】



【図２ｂ－１】



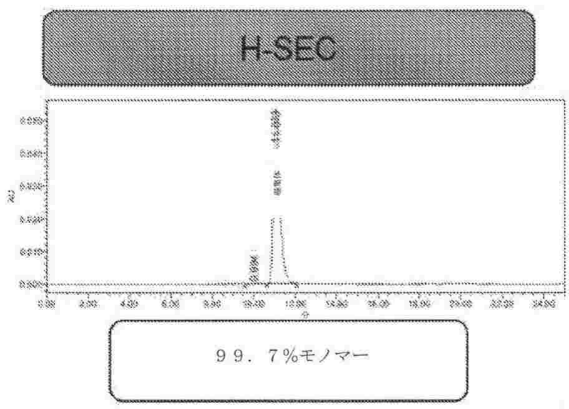
【図２ｂ－２】



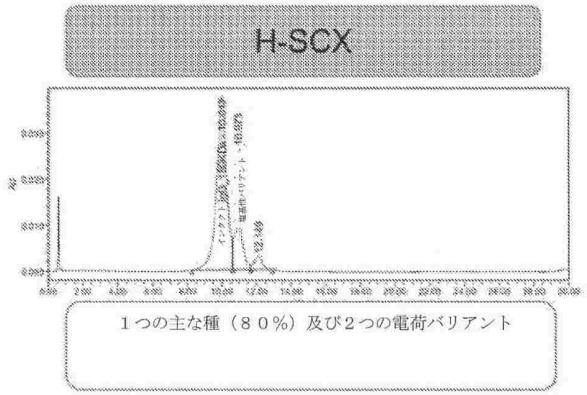
【図２ｂ－３】



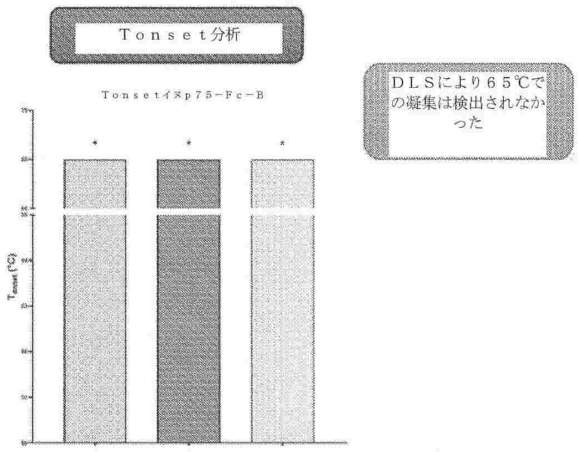
【図３ａ】



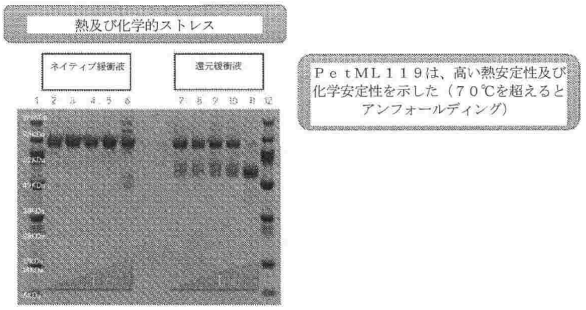
【図３ｂ】



【図４ａ】



【図４ｂ】



【図４ｃ】

凝結及び解凍ストレス

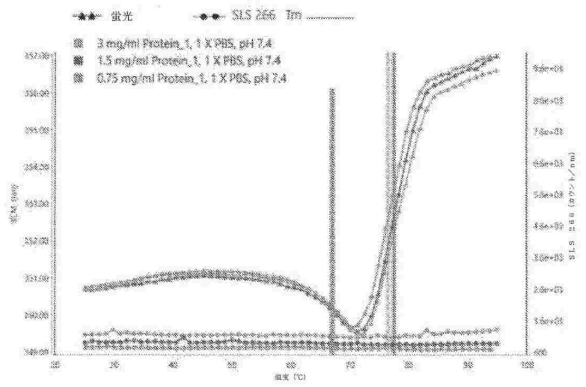
試料	%純度	区域	ＦＴ後のΔ濃度
PetML119	99.39	333981	0
PetML119 1FT	99.39	322675	-3.38522
PetML119 2FT	99.42	311886	-6.61565

ＰｅｔＭＬ１１９は、２ＦＴ後に良好な安定性を示し、わずかなタンパク質損失（約５%）のみでオリゴマー化の変化を示さなかった。

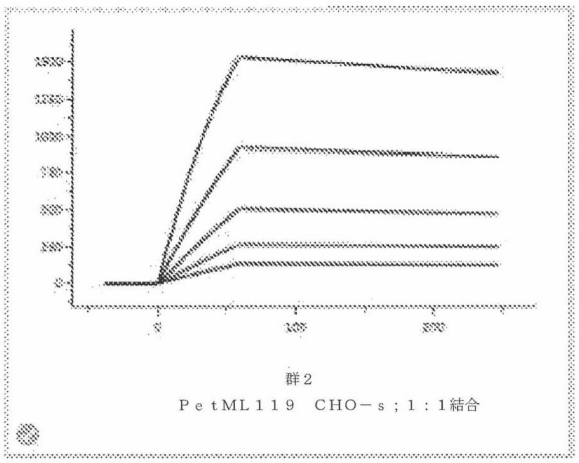
【図４ｄ】

#	試料名	試料MW	試料濃度	緩衝液の種類	pH	T_{m1} (°C)	%CV	T_{m2} (°C)	%CV
1	Protein_1*	92 kDa	3 mg/ml	PBS	7.4	**67.4**	0.24	**77.4**	0.25
2	Protein_1*	92 kDa	1.5 mg/ml	PBS	7.4	**67.1**	0.31	**77**	0.71
3	Protein_1*	92 kDa	0.75 mg/ml	PBS	7.4	**66.9**	0.06	**76.6**	0.22

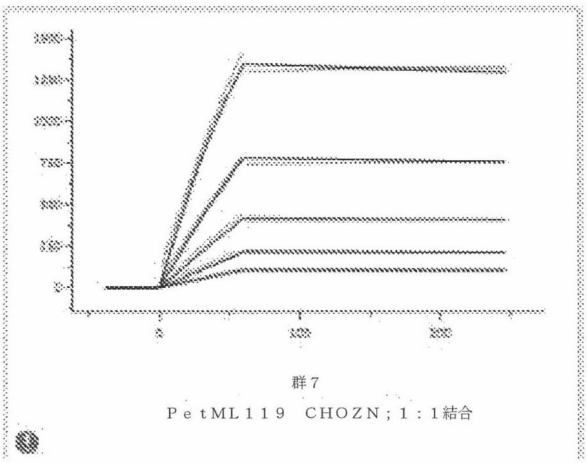
【図４ｅ】



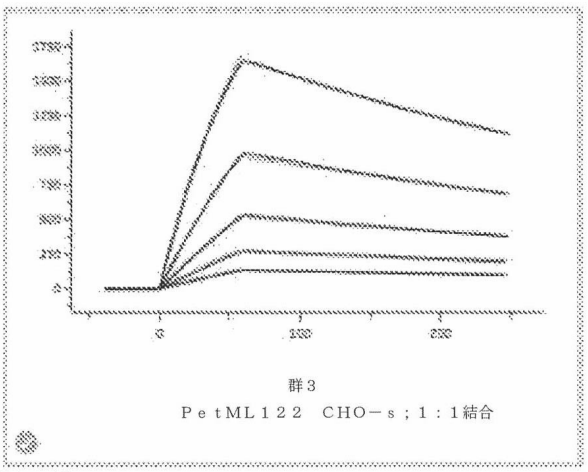
【図５ａ】



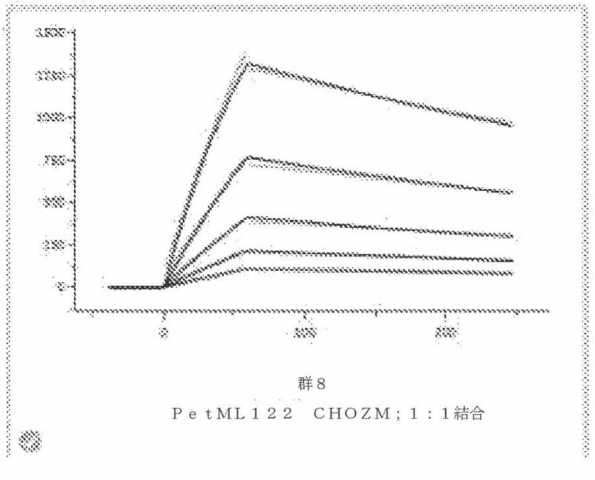
【図５ｂ】



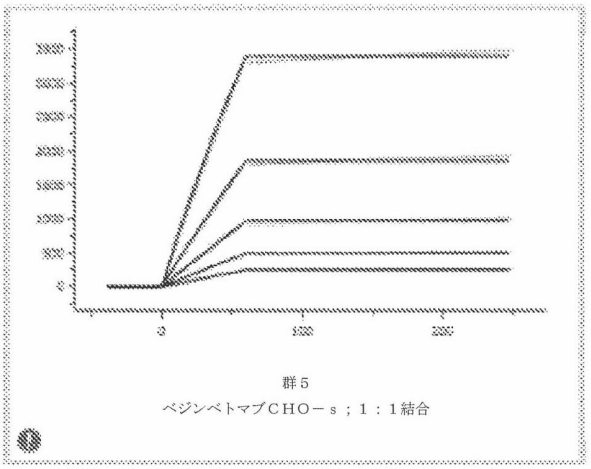
【図５ｃ】



【図５ｄ】



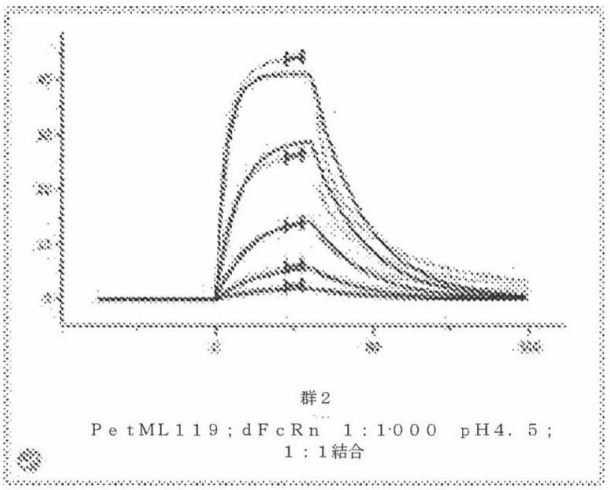
【図５ｅ】



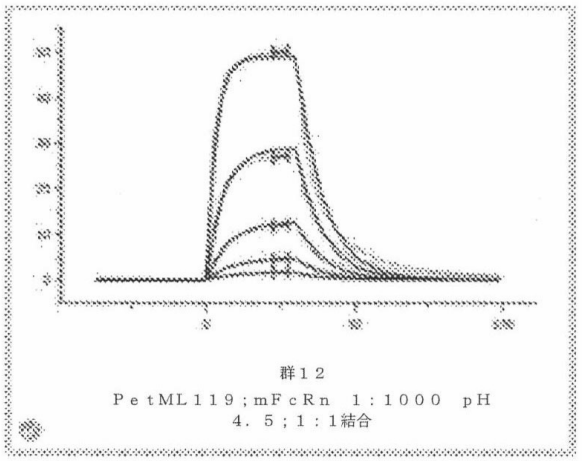
【図５ｆ】

試料	動態親和性ＫＤ（ｎＭ）
ベジンベトマブ：　ＰｒｏｔＡ	0.01
PetML119 (CHO-s) : ProtA	2.8
PetML119 (CHOZN) : ProtA	1.3
PetML122 (CHO-s) : ProtA	10.6
PetML122 (CHOZN) : ProtA	15

【図６ａ】



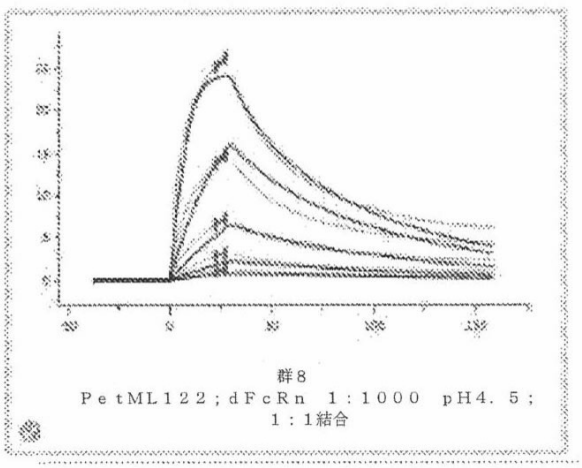
【図６ｂ】



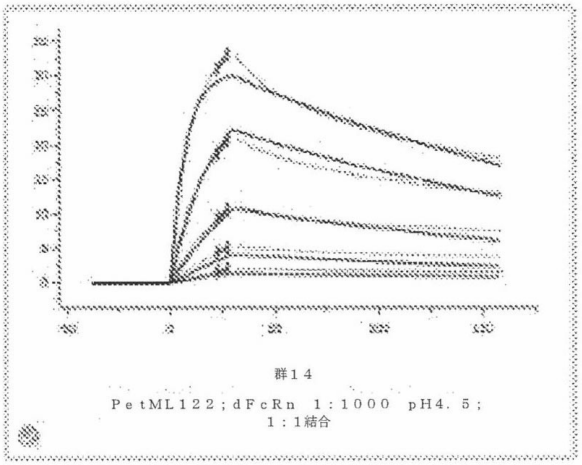
【図６ｃ】

試料	定常状態親和性ＫＤ（μＭ）
ＰｅｔＭＬ１１９：イヌＦｃＲｎ	6
ＰｅｔＭＬ１１９：マウスＦｃＲｎ	2

【図６ｄ】



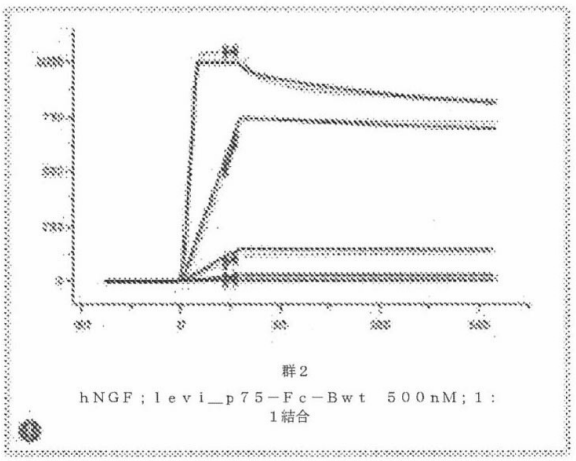
【図６ｅ】



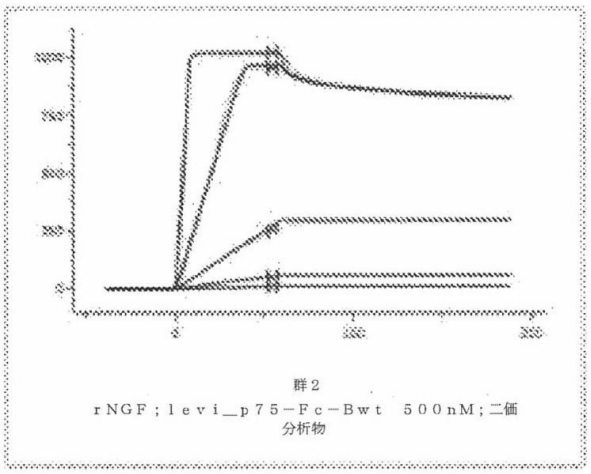
【図６ｆ】

試料	定常状態親和性KD（μM）
PetML 122：イヌFcRn	0.4
PetML 122：マウスFcRn	0.09

【図７ａ】



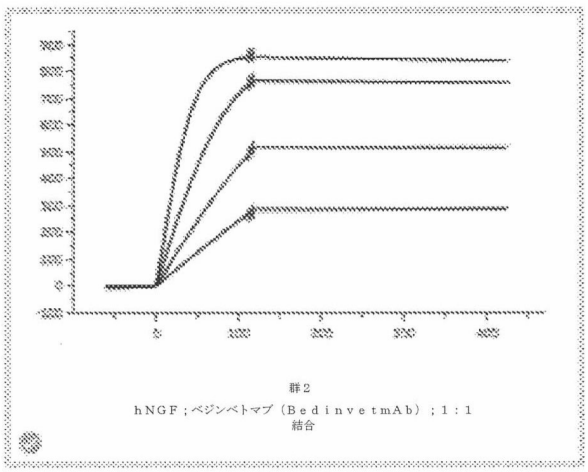
【図７ｂ】



【図７ｃ】

試料	動態親和性KD（nM）
PetML119：ヒトNGF	0.12
PetML119：ラットNGF	0.12

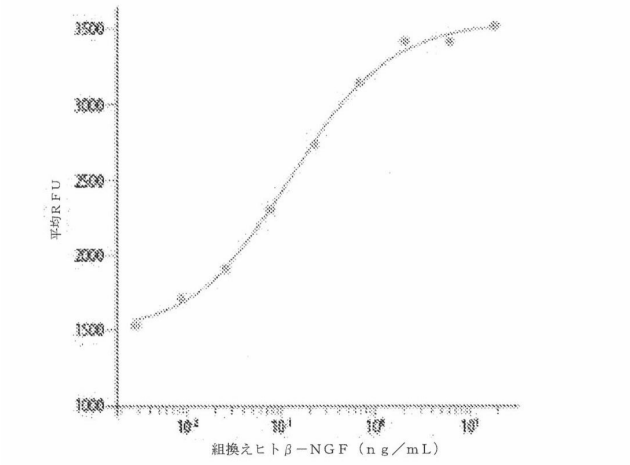
【図７ｄ】



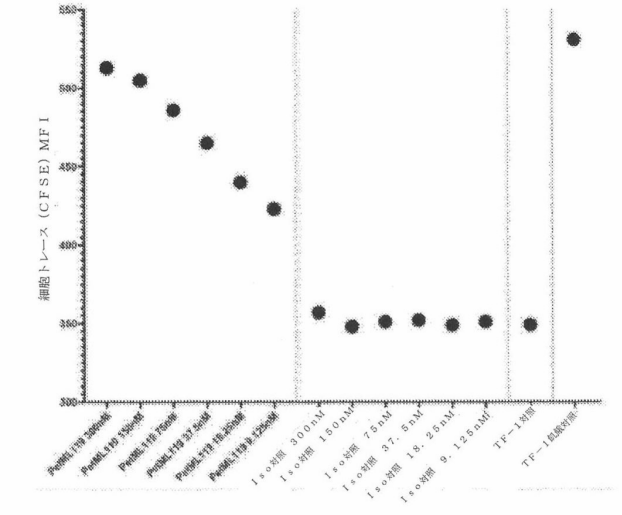
【図７ｅ】

試料	動態親和性ＫＤ（ｎＭ）
ベジンベトマブ：ヒトNGF	0.073

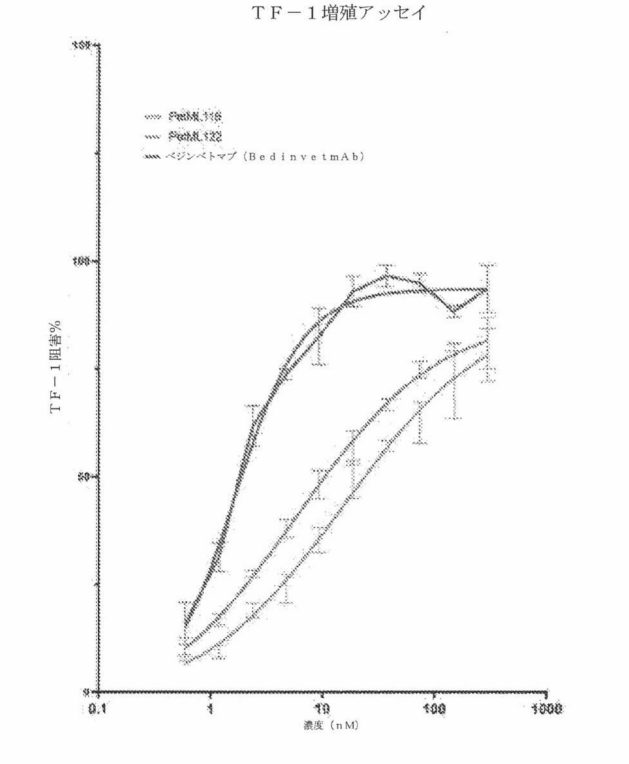
【図８ａ】



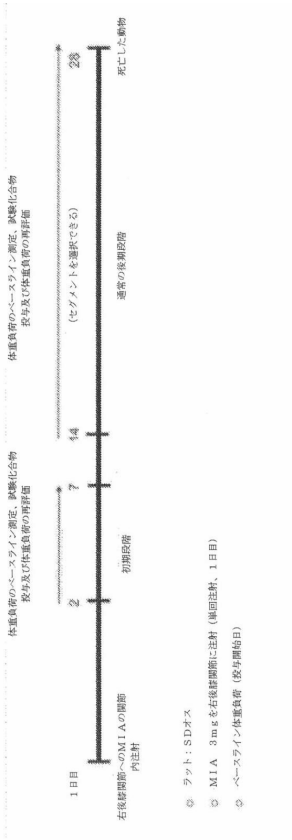
【図８ｂ】



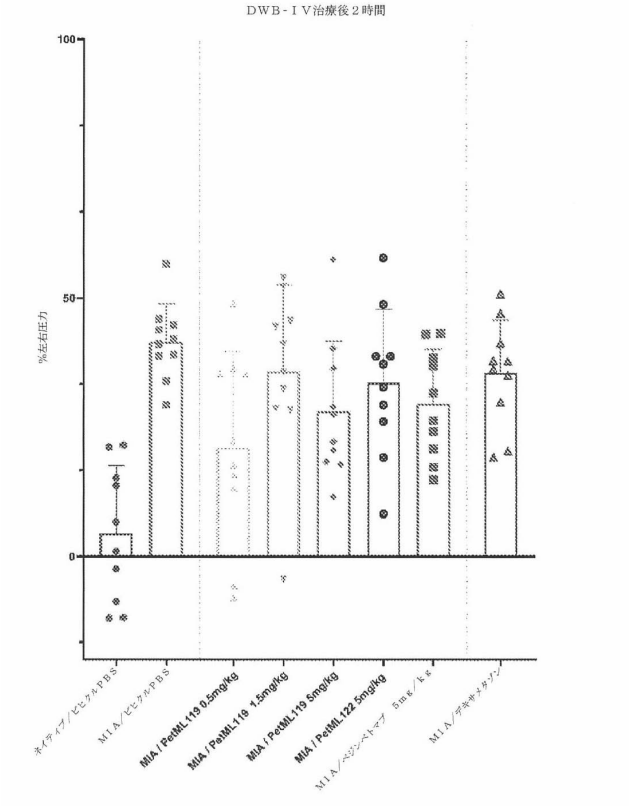
【図８ｃ】



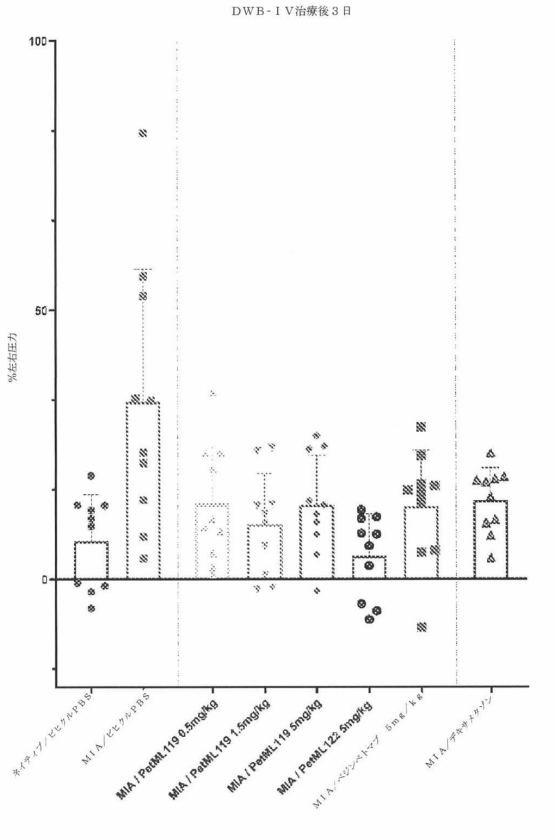
【図９】



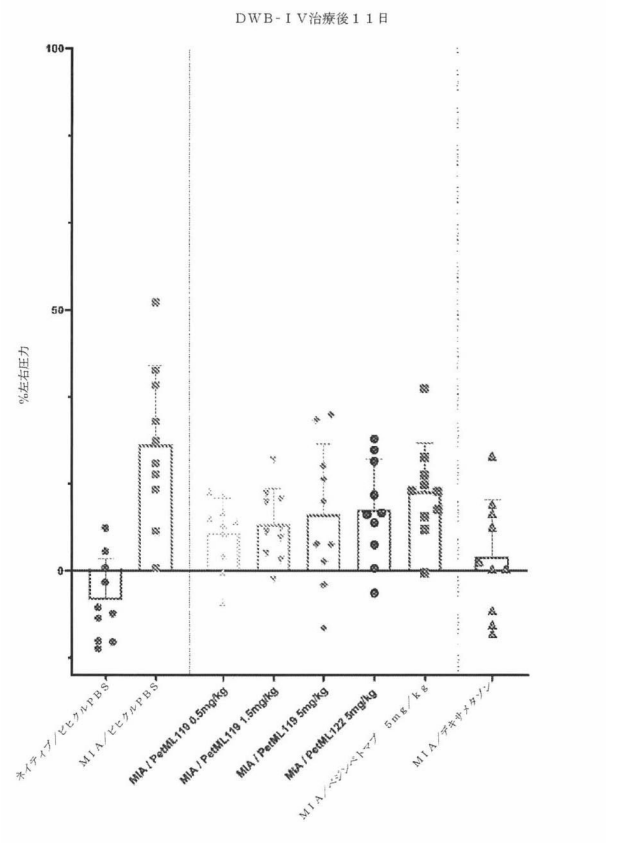
【図１０ａ】



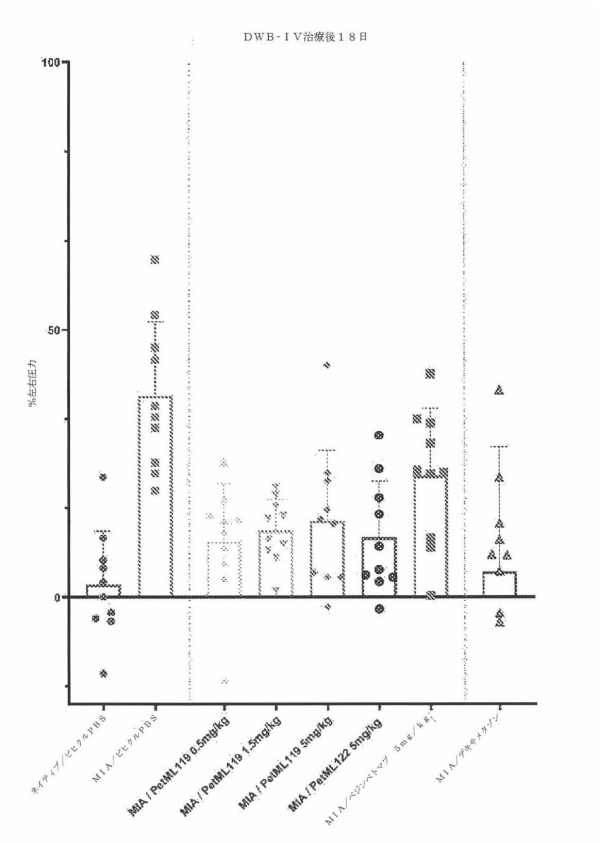
【図１０ｂ】



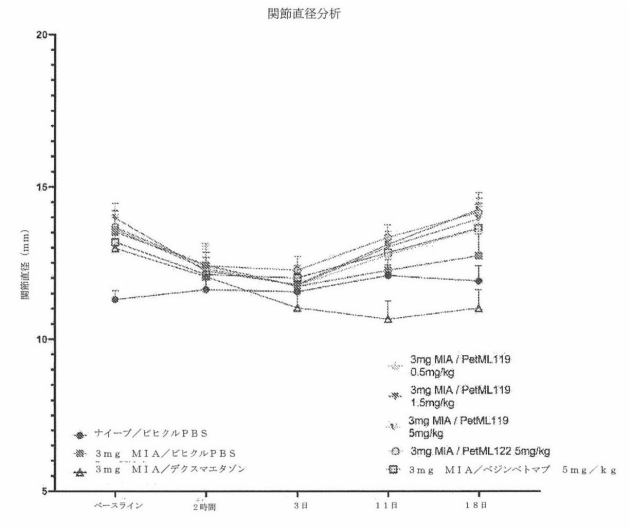
【図１０ｃ】



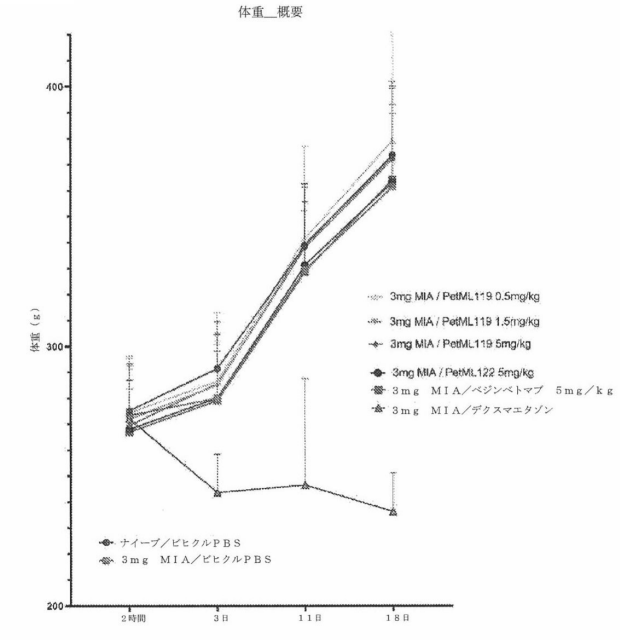
【図１０ｄ】



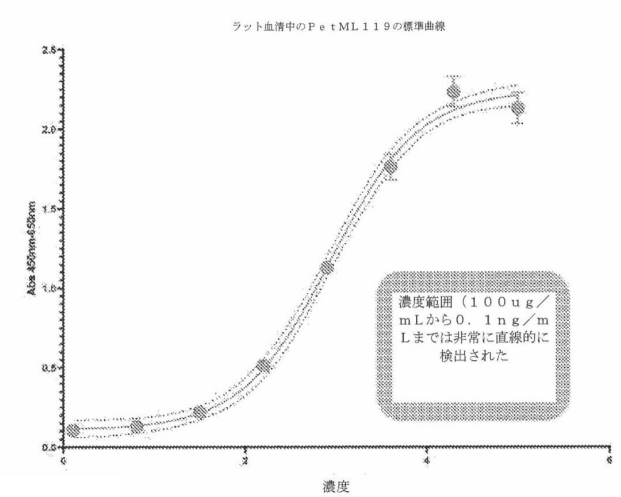
【図１１ａ】



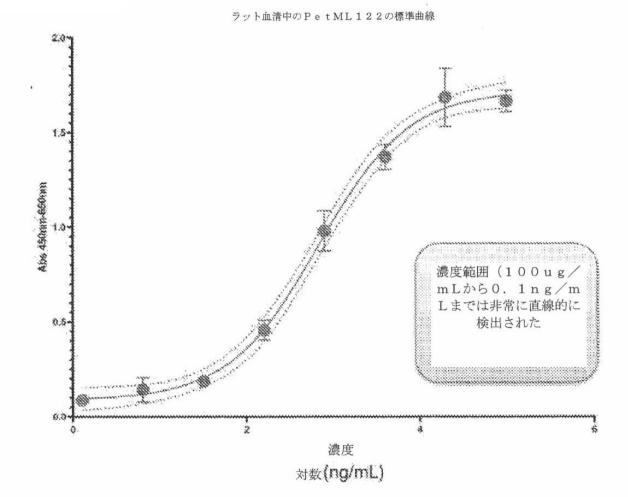
【図１１ｂ】



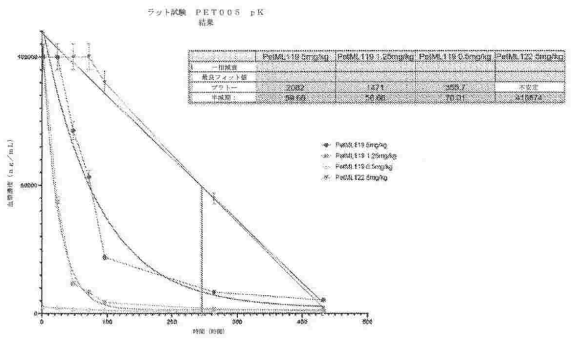
【図１２ａ】



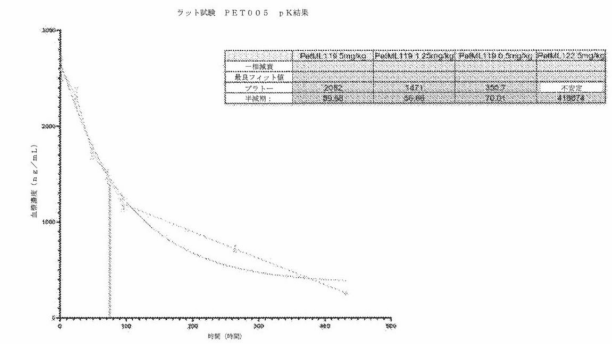
【図１２ｂ】



【図１２ｃ－ｄ】



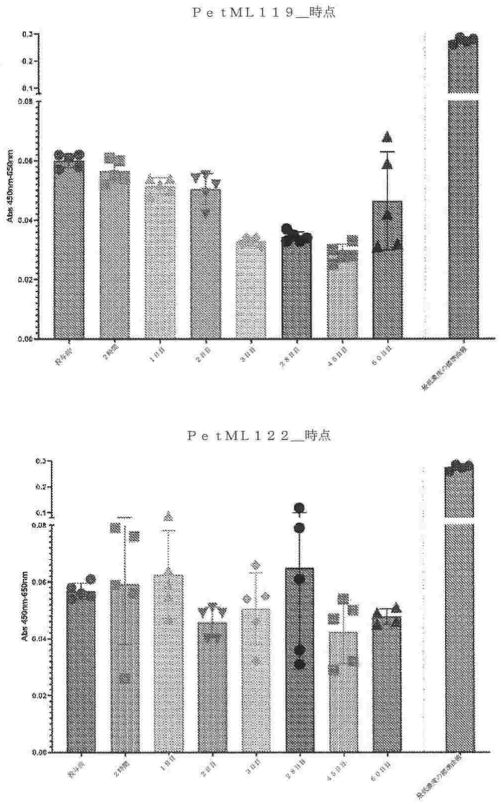
【図１２ｅ－ｆ】



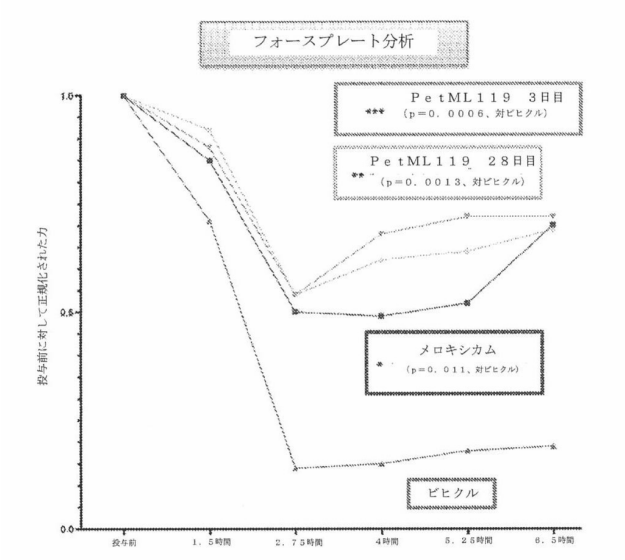
【図１３ａ】

動物ID 作業番号	注文番号	体重（kg） 2022年1月14日	2022年1月17日	2022年1月28日	2022年1月31日	2022年2月11日	2022年2月14日	2022年3月11日
469045	1	-	10.657	11.066	10.731	10.918	10.824	10.909
008438	2	-	11.044	11.423	10.950	11.261	11.069	10.647
008373	3	-	10.498	10.748	10.379	10.485	10.471	10.605
008423	4	-	10.660	11.015	10.597	10.692	10.832	10.834
430040	5	-	10.111	10.659	9.985	10.029	10.118	9.882
430031	6	11.178	10.851	-	10.760	10.740	10.781	10.685
430022	7	10.361	10.099	-	10.080	10.337	10.180	10.163
839431	8	11.035	10.914	-	10.708	10.584	10.558	10.703
840259	9	10.745	10.767	-	10.797	10.634	10.732	10.746
839425	10	10.324	9.947	-	10.121	10.136	10.219	10.169
合計	平均値	NA	10.555	NA	10.511	10.582	10.578	10.534
	SD	NA	0.386	NA	0.344	0.363	0.323	0.340
群1	平均値	NA	10.594	10.982	10.528	10.677	10.663	10.575
	SD	NA	0.337	0.301	0.368	0.463	0.372	0.408
群2	平均値	10.729	10.516	NA	10.493	10.486	10.494	10.493
	SD	0.386	0.456	NA	0.360	0.245	0.282	0.300

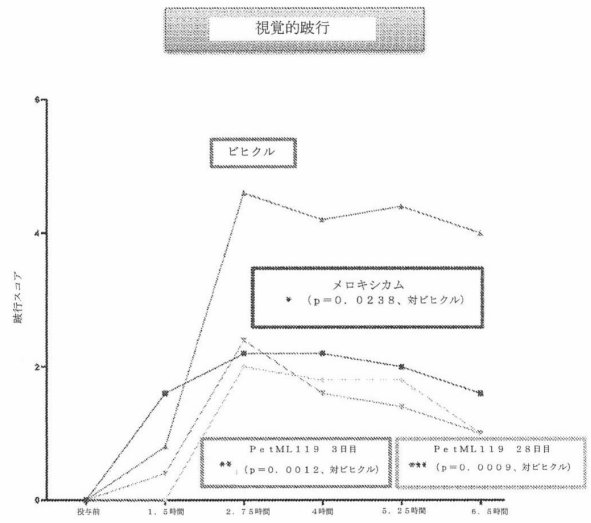
【図１３ｂ】



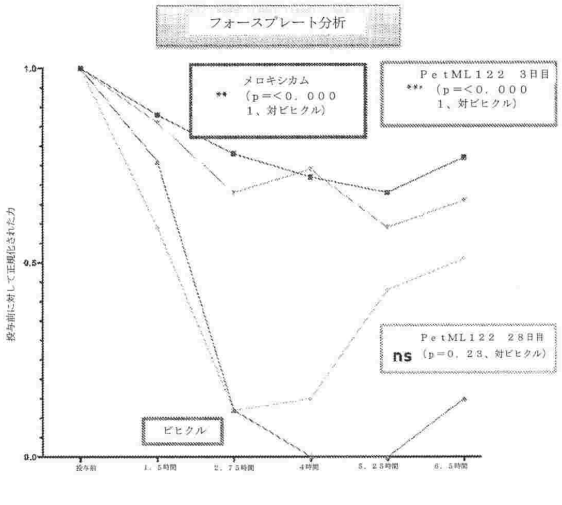
【図１４ａ】



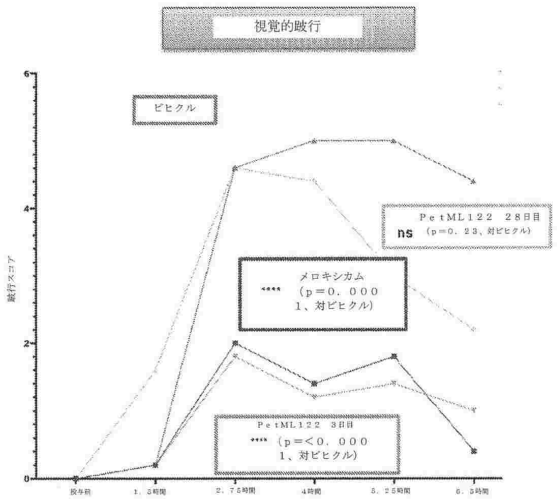
【図１４ｂ】



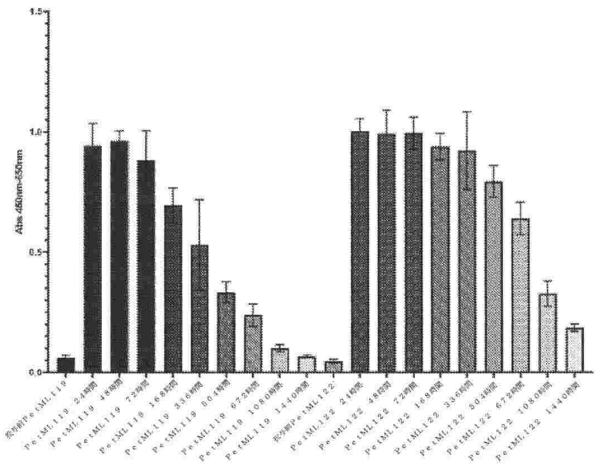
【図１４ｃ】



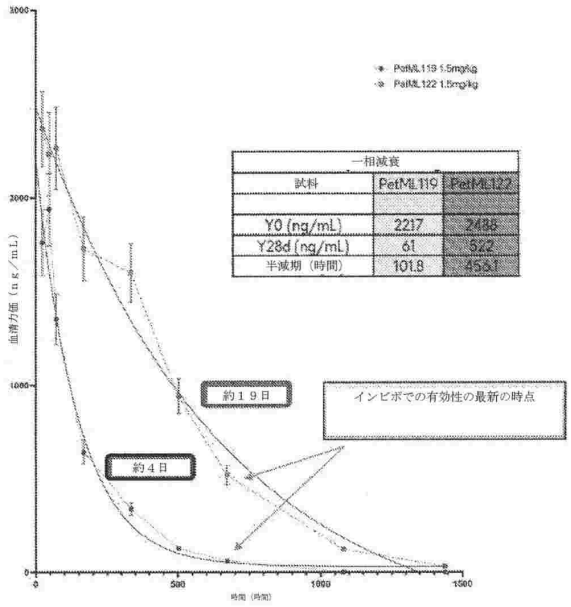
【図１４ｄ】



【図１５ａ】



【図１５ｂ】



【配列表】
20245429580000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2022/052692

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/705 C12N15/62 A61P25/04
ADD.

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)
C07K A61P

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/146841 A1 (LEVICEPT LTD [GB]) 22 September 2016 (2016-09-22) the whole document	1-4,7, 10, 13-19, 21,22, 25,26, 28-40
A	& DATABASE UniProt [Online] 21 March 2012 (2012-03-21), "SubName: Full=Nerve growth factor receptor {ECO:0000313|EMBL:JAA38273.1, ECO:0000313|Ensembl:ENSPTRP00000015928.5}; ", retrieved from EBI accession no. UNIPROT:H2QDD4 Database accession no. H2QDD4 sequence ----- -/--	1

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] 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
"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
4 January 2023	20/01/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Wiame, Ilse

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2022/052692

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/191289 A1 (KINDRED BIOSCIENCES INC [US]) 24 September 2020 (2020-09-24) the whole document -----	1-19, 21-24, 26,27, 29-40
X	WO 2015/040398 A1 (LEVICEPT LTD [GB]) 26 March 2015 (2015-03-26) the whole document -----	1-4,7, 10, 13-22, 26,29-40

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2022/052692

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. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.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

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2022/052692

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2016146841 A1	22-09-2016	US 2018170995 A1	21-06-2018
		WO 2016146841 A1	22-09-2016
WO 2020191289 A1	24-09-2020	AU 2020240120 A1	30-09-2021
		CA 3133104 A1	24-09-2020
		CN 113840831 A	24-12-2021
		EP 3941933 A1	26-01-2022
		JP 2022525754 A	19-05-2022
		KR 20220066002 A	23-05-2022
		US 2022169740 A1	02-06-2022
		WO 2020191289 A1	24-09-2020
WO 2015040398 A1	26-03-2015	AU 2014322842 A1	07-04-2016
		BR 112016006113 A2	26-09-2017
		CA 2924410 A1	26-03-2015
		CN 105873943 A	17-08-2016
		CY 1121347 T1	29-05-2020
		DK 3046934 T3	08-04-2019
		EA 201690469 A1	30-12-2016
		EP 3046934 A1	27-07-2016
		ES 2714694 T3	29-05-2019
		HR P20190434 T1	19-04-2019
		HU E043273 T2	28-08-2019
		JP 6681834 B2	15-04-2020
		JP 2016531590 A	13-10-2016
		JP 2020062011 A	23-04-2020
		JP 2022068253 A	09-05-2022
		KR 20160058872 A	25-05-2016
		LT 3046934 T	25-03-2019
		NZ 718044 A	31-07-2020
		PL 3046934 T3	31-05-2019
		PT 3046934 T	25-03-2019
		SG 11201602068Q A	28-04-2016
		SI 3046934 T1	30-04-2019
		TR 201903490 T4	21-03-2019
		US 2016222082 A1	04-08-2016
		US 2018273603 A1	27-09-2018
		US 2021238256 A1	05-08-2021
		WO 2015040398 A1	26-03-2015

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

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	*1/21 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21		
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		
Ｃ０７Ｋ	*19/00 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	19/00		
Ｃ１２Ｎ	*15/62 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/62	Ｚ	
Ｃ０７Ｋ	*14/765 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/765		
Ｃ１２Ｎ	*15/13 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/13		
Ａ６１Ｋ	*47/65 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/65		
Ａ６１Ｋ	*47/64 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/64		
Ａ６１Ｋ	*38/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/02		
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５	
Ａ６１Ｐ	*25/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00		
Ａ６１Ｐ	*9/10 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/10		
Ａ６１Ｐ	*3/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/04		
Ａ６１Ｐ	*3/10 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10		
Ａ６１Ｐ	*25/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/04		
Ａ６１Ｐ	*3/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/00		
Ａ６１Ｐ	*29/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00		
Ａ６１Ｐ	*19/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/02		
Ａ６１Ｋ	*45/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	
		Ａ６１Ｋ	45/00		

,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 100123766
弁理士 松田 七重
(74)代理人 100111501
弁理士 滝澤 敏雄
(72)発明者 リ メン エイミー
イギリス シービー２２ ３エフエイチ ケンブリッジシャー ケンブリッジ バブラハム バブラハム リサーチ キャンパス ザ グレン ベルジェ ビルディング ビルディング ９４０ ペットメディックス リミテッド内
(72)発明者 バルデッリ マルコ
イギリス シービー２２ ３エフエイチ ケンブリッジシャー ケンブリッジ バブラハム バブラハム リサーチ キャンパス ザ グレン ベルジェ ビルディング ビルディング ９４０ ペットメディックス リミテッド内

Ｆターム（参考） 4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90Y AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
4C076 AA94 CC01 CC04 CC11 CC21 CC41 EE41M EE59 FF31 FF70
4C084 AA02 BA41 NA12 NA14 ZA08 ZA45 ZA66 ZA70 ZA96 ZB11 ZB15 ZB26 ZC01 ZC35 ZC61 ZC75
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA75 EA20 EA50 FA74