

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-14286

(P2017-14286A)

(43) 公開日 平成29年1月19日(2017.1.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D 4 C 0 8 5
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N 4 H 0 4 5
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 25/06 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 76 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-206106 (P2016-206106)	(71) 出願人	500203709
(22) 出願日	平成28年10月20日 (2016.10.20)		アムジェン インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2014-121152 (P2014-121152) の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3
原出願日	平成22年10月8日 (2010.10.8)		2 0, サウザンド オークス, ワン
(31) 優先権主張番号	12/576, 522	(71) 出願人	513142091
(32) 優先日	平成21年10月9日 (2009.10.9)		メダレックス エル.エル.シー.
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O
			8 5 4 0 プリンストン ルート 2 0 6
			アンド プロヴィンス ライン ロード
		(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 選択的 N G F 経路インヒビターとしてのヒト抗 N G F 中和抗体

(57) 【要約】

【課題】 選択的 N G F 経路インヒビターとしてのヒト抗 N G F 中和抗体の提供。

【解決手段】 本発明は、ヒト神経成長因子 (N G F) と相互作用または結合し、これにより N G F の機能を中和する抗体を提供する。本発明はまた、前記抗体の薬学的組成物および N G F 機能を中和する方法、特に薬学的有効量の抗 N G F 抗体を投与することによって N G F 関連障害 (例えば、慢性疼痛) を処置する方法も提供する。抗 N G F 抗体を用いてサンプル中の N G F の量を検出する方法も提供される。本発明によって、本発明のモノクローナル抗体を産生する、最も好ましくは細胞培養培地に分泌する細胞も提供される。本発明の抗体は、疼痛の処置および管理での使用に加えて、神経障害性および炎症性の疼痛関連応答の処置にも有用である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

本願明細書に記載された発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2009年10月9日に出願された米国特許出願番号(U. S. S. N.) 12/576, 522への優先権を主張し、U. S. S. N. 12/576, 522は2008年11月25日に
出願された米国特許出願番号(U. S. S. N.) 12/277, 919の一部継続出願であり、U. S. S. N. 12/277, 919は2004年7
月15日に
出願された米国特許出願番号(U. S. S. N.) 10/891, 658の
継続出願であり、2003年7月15日に
出願された米国仮出願番号60/487, 431
への優先権の利益を主張する。本出願はまた、2007年6月22日に
出願された米国特
許出願番号11/767, 326に関連し、米国特許出願番号11/767, 326はU
. S. S. N. 10/891, 658の分割出願である。これらの全出願の開示は、参考
として本明細書に援用される。

10

【0002】

配列表は、電子形式のみで本出願と共に出願し、参考として本明細書に援用される。配
列表のテキストファイル「02-1240-F-CIP. SeqList.txt」は、
2008年11月25日に作成しており、そのサイズは79, 116バイトである。

20

【0003】

(発明の分野)

本発明は、神経成長因子(NGF)に結合するヒトモノクローナル抗体に関する。疼痛
および疼痛関連障害を処置するための組成物および方法も説明する。

【背景技術】

【0004】

(発明の背景)

米国では、毎日、2百万人を超える人々が、慢性疼痛によって能力が損なわれている(Jesse
llおよびKelly, 1991、「Pain and Analgesia」、PRINCIPLES OF NEURAL SCIENCE、第3版、(Kand
el、Schwartz、およびJesse
ll編)、Elsevier、New York)。残念なことに、現在の疼痛の処置は、ある程度しか有効ではなく、多くのこれら
の処置自体が、衰弱または危険な副作用をもたらす。例えば、非ステロイド性抗炎症薬(「NSAID」)
、例えば、アスピリン、イブプロフェン、およびインドメタシンは、炎症性疼痛に対して中程度に有効であるが、腎毒性でもあり、大量投与は、胃腸刺激、潰瘍
、出血、および精神錯乱をもたらす傾向にある。オピオイドで処置された患者も、多くの
場合、錯乱を経験し、長期のオピオイドの使用は、耐性および依存に関連する。局所麻酔
薬、例えば、リドカインおよびメキシレチンは、疼痛を阻害すると同時に、通常の感覚
を喪失させる。

30

【0005】

疼痛とは、環境から受け取り、神経系によって伝達され、解釈されるシグナルに基づい
た知覚である(概観については、非特許文献1を参照されたい)。有害な刺激、例えば、
熱および接触により、皮膚の専門の感覚受容器が、中枢神経系(「CNS」)にシグナル
を送る。このプロセスは、痛覚と呼ばれ、このプロセスを媒介する末梢感覚ニューロンが
、侵害受容器である。侵害受容器(複数可)からのシグナルの強度ならびにCNSによる
そのシグナルの抽出(abstract ion)および加工(elaborat ion)
次第で、ヒトは、有害な刺激を疼痛として感じる場合も、感じない場合もある。疼痛の知
覚が、刺激の強度に対して適切に較正されている場合、疼痛は、目的とする保護機能を果
たす。しかしながら、一定の種類の組織損傷は、ヒトの疼痛の閾値が低下したために相対
的に無害の刺激が強い疼痛として知覚される痛覚過敏または痛覚亢進(pronoc ic

40

50

e p t i o n)として知られる現象を引き起こす。炎症および神経損傷は共に、痛覚過敏を引き起こし得る。炎症状態、例えば、日焼け、変形性関節症、大腸炎、心臓炎、皮膚炎、筋炎、神経炎、および膠原血管病（関節リウマチおよび狼瘡を含む）などを患っているヒトは、しばしば、疼痛の感覚が強くなる。同様に、外傷、外科手術、切断術、膿瘍、カウザルギー、膠原血管病、脱髄疾患、三叉神経痛、がん、慢性アルコール中毒、脳卒中、視床痛症候群、糖尿病、ヘルペス感染、後天性免疫不全症候群（「A I D S」）、毒素、および化学療法は、過度の疼痛をもたらす神経傷害を引き起こす。

【0006】

侵害受容器が正常の状態および痛覚過敏の状態外部シグナルを伝達する機序が、良く理解されるようになったため、痛覚過敏に参与するプロセスを標的にして、疼痛閾値の低下を阻害し、これにより経験する疼痛の程度を小さくすることができる。

10

【0007】

神経栄養因子は、生理学および病理学的な疼痛の伝達に重要な役割を果たしていることが分かっている。神経成長因子（N G F）は、特に重要であると思われる（概観については、非特許文献2；および非特許文献3を参照されたい）。N G Fの局所投与および全身投与は共に、痛覚過敏および異痛を引き起こすことが分かっている（非特許文献4）。ヒトにおけるN G Fの静脈注射は、全身筋肉痛をもたらし、局所投与は、全身性の影響に加えて、注入部位の痛覚過敏および異痛を引き起こす（非特許文献5）。疼痛が顕著な特色である状態への内因性N G Fの関与についての相当数の証拠も存在する。例えば、N G Fは、末梢神経傷害後の少なくとも2ヵ月間後根神経節（D R G）シュワン細胞において上方制御され、N G Fレベルの上昇が、様々な関節炎モデルの動物の関節で報告された（例えば、非特許文献6）。ヒトでは、N G Fレベルは、リウマチ様関節炎または他の種類の関節炎の患者の滑液で上昇する（例えば、非特許文献7）。さらに、N G F機能の拮抗作用が、神経障害性疼痛および慢性炎症疼痛のモデルにおける痛覚過敏および異痛を防止することが実証されている。例えば、神経障害性疼痛（例えば、神経幹または脊髄神経の結紮）の動物モデルでは、N G Fに対する中和抗体の全身注射が、異痛および痛覚過敏の両方を防止する（非特許文献8；および非特許文献9）。当技術分野で公知の抗N G F抗体の例には、例えば、特許文献1、国際公開第01／64247号、同第02／096458号、および同第2004／032870号；米国特許第5、844、092号、同第5、877、016号、および同第6、153、189号；H o n g o ら、2000、H y b r i d o m a、19：215－227；H o n g o ら、1993、C e l l . M o l . B i o l . 13：559－568；ならびにG e n B a n k アクセッション番号U39608、U39609、L17078、またはL17077が含まれる。

20

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】国際公開第01／78698号

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】M i l l a n、P r o g . N e u r o b i o l . 1999、57：1－164

40

【非特許文献2】M c M a h o n、P h i l . T r a n s . R . S o c . L o n d .、1996、351：431－40

【非特許文献3】A p f e l、T h e C l i n i c a l J o u r n a l o f P a i n、2000、16：S7－S11

【非特許文献4】L e w i n ら、E u r . J . N e u r o s c i . 1994、6：1903－1912

【非特許文献5】A p f e l ら、N e u r o l o g y、1998、51：695－702

【非特許文献6】A l o e ら、G r o w t h F a c t o r s、1993、9：149－155

50

【非特許文献7】A l o e ら、A r t h r i t i s a n d R h e u m a t i s m、1992、35：351－355

【非特許文献8】R a m e r ら、E u r . J . N e u r o s c i . 1999、11：837－846

【非特許文献9】R o ら、P a i n、1999、79：265－274

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

明らかに、特に疼痛の小分子メディエーターまたは悪化因子（e x a c e r b a t o r）、例えば、N G F を標的とすることによる、新規で安全かつ効果的な疼痛の処置への要望が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0011】

（発明の概要）

本発明は、疼痛管理に治療上有用である新規なヒトモノクローナル抗体を提供する。具体的には、本発明は、神経成長因子（N G F）に結合するモノクローナル抗体を提供する。好ましくは、このモノクローナル抗体は、ヒトモノクローナル抗体であり、N G F の生物学的活性を中和し、N G F 媒介性疼痛応答の影響を緩和するのに有用である。また、本発明によって、本発明のモノクローナル抗体を産生する、最も好ましくは細胞培養培地に分泌する細胞も提供される。本発明の抗体は、疼痛の処置および管理での使用に加えて、

【0012】

本発明は、抗体 F c 領域の配列ならびに配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、および配列番号 79～130 として同定された 1 つ以上の配列を含む融合タンパク質をさらに提供する。このような分子は、例えば、参考として組み入れられる、国際特許出願公開第 00 / 24782 号に記載されているような方法を用いて調製することができる。このような分子は、例えば、哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞）または細菌細胞（例えば、大腸菌細胞）で発現させることができる。

【0013】

一定の態様では、本発明は、重鎖および軽鎖を含む抗体、好ましくはモノクローナル抗体、最も好ましくはヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体であって、この重鎖が、配列番号 2、配列番号 4、もしくは配列番号 6 に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含み、この重鎖の可変領域が、配列番号 10 に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含む、抗体を提供する。好ましくは、重鎖は、配列番号 4 に示されているアミノ酸配列を含む。

【0014】

一定の態様では、本発明は、重鎖および軽鎖を含む抗体、好ましくはヒト抗体、より好ましくはモノクローナル抗体、最も好ましくはヒトモノクローナル抗体であって、この重鎖が、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、I g A、および I g E 重鎖定常領域からなる群より選択される重鎖定常領域またはその任意の対立遺伝子改変体（参考として本明細書に組み入れられる、K a b a t ら、1991、S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t、第 5 版、U . S . D e p a r t m e n t o f H e a l t h a n d H u m a n S e r v i c e s、N I H 公表番号：91－3242 で議論されている）を含み、重鎖の可変領域が、配列番号 10 に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含む、抗体を提供する。好ましくは、本発明の抗体は、配列番号 4 に示されている I g G 2 重鎖定常領域のアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含む

。

【0015】

一定の態様では、本発明は、重鎖および軽鎖を含む抗体、好ましくヒト抗体、より好ましくはモノクローナル抗体、最も好ましくはヒトモノクローナル抗体であって、この軽鎖が、配列番号8に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含み、この軽鎖の可変領域が、配列番号12に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含む、抗体を提供する。

【0016】

一定の態様では、本発明の抗体は、重鎖および軽鎖を含み、この重鎖の可変領域は、配列番号10に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含む。他の態様では、軽鎖可変領域は、配列番号12に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含む。さらなる態様では、重鎖は、配列番号14、配列番号18、もしくは配列番号20のいずれかに示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含む。なおさらなる態様では、軽鎖は、配列番号16、配列番号20、もしくは配列番号24のいずれかに示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含む。

【0017】

本発明はまた、NGFに特異的に結合する抗体であって、その重鎖が、配列番号10に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含む可変領域を有し、その軽鎖が、配列番号12に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含む可変領域を有する、抗体を提供する。

【0018】

本発明は、NGFに特異的に結合する単離されたヒト抗体であって：

(a) 配列番号79に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含む重鎖可変領域を有する重鎖、および配列番号80に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含む軽鎖可変領域を有する軽鎖；

(b) 配列番号81に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含む重鎖可変領域を有する重鎖、および配列番号82に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含む軽鎖可変領域を有する軽鎖；

(c) 配列番号83に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含む重鎖可変領域を有する重鎖、および配列番号84に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含む軽鎖可変領域を有する軽鎖；あるいは

(d) 配列番号86に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含む重鎖可変領域を有する重鎖、および配列番号87に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含む軽鎖可変領域を有する軽鎖を含む、ヒト抗体をさらに提供する。

【0019】

一定の態様では、本発明は、重鎖および軽鎖を含む抗体であって、この重鎖が、重鎖可変領域を含み、この重鎖可変領域が、配列番号10に示されているアミノ酸配列に対して少なくとも75%、好ましくは80%、より好ましくは少なくとも85%、さらに好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、9

10

20

30

40

50

8 %、最も好ましくは約 99 %の同一性を有する配列を含み、この軽鎖が、軽鎖可変領域を含み、この軽鎖可変領域が、配列番号 12 に示されているアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、より好ましくは少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、最も好ましくは約 99 %の同一性を有する配列を含み、この抗体が、NGF に特異的に結合する、抗体も提供する。

【0020】

本発明はまた、NGF に特異的に結合する抗体であって、その重鎖が、配列番号 14 に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含み、その軽鎖が、配列番号 16 に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含む、抗体を提供する。

10

【0021】

一定の態様では、本発明は、重鎖および軽鎖を含む抗体であって、この重鎖が、重鎖可変領域を含み、この重鎖可変領域が、配列番号 14、配列番号 18、または配列番号 22 のいずれかに示されているアミノ酸配列に対して少なくとも 75 %、好ましくは 80 %、より好ましくは少なくとも 85 %、さらに好ましくは少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、最も好ましくは約 99 %の同一性を有する配列を含み、この軽鎖が、軽鎖可変領域を含み、この軽鎖可変領域が、配列番号 16 に示されているアミノ酸配列に対して少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、より好ましくは少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、最も好ましくは約 99 %の同一性を有するアミノ酸配列を含み、この抗体が、NGF に特異的に結合する、抗体を提供する。

20

【0022】

本発明はまた、単鎖抗体、単鎖 Fv 抗体、F(ab) 抗体、F(ab)' 抗体、および (F(ab)')₂ 抗体も提供する。

【0023】

特定の態様では、本発明は、配列番号 16 に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含む軽鎖を提供する。

【0024】

加えて、本発明は、配列番号 14、配列番号 18、もしくは配列番号 22 のいずれかに示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含む重鎖も提供する。

30

【0025】

本発明はまた、NGF に特異的に結合する単離されたヒト抗体であって：(a) ヒト重鎖フレームワーク領域、ヒト重鎖 CDR1 領域、ヒト重鎖 CDR2 領域、およびヒト重鎖 CDR3 領域；ならびに (b) ヒト軽鎖フレームワーク領域、ヒト軽鎖 CDR1 領域、ヒト軽鎖 CDR2 領域、およびヒト軽鎖 CDR3 領域を含む、抗体にも関する。特定の態様では、ヒト重鎖 CDR1 領域は、配列番号 22 に示されている 4D4 と表されるモノクローナル抗体 (mAb) の重鎖 CDR1 領域とすることができ、ヒト軽鎖 CDR1 領域は、配列番号 24 に示されている mAb 4D4 の軽鎖 CDR1 領域とすることができる。他の態様では、ヒト重鎖 CDR2 領域は、配列番号 18 に示されている mAb 4D4 の重鎖 CDR2 領域とすることができ、ヒト軽鎖 CDR2 領域は、配列番号 20 に示されている mAb 4D4 の軽鎖 CDR2 領域とすることができる。なお他の態様では、ヒト重鎖 CDR3 領域は、配列番号 14 に示されている mAb 4D4 の重鎖 CDR3 領域であり、ヒト軽鎖 CDR3 領域は、配列番号 16 に示されている mAb 4D4 の軽鎖 CDR3 領域である。

40

【0026】

本発明はまた、重鎖および軽鎖を含む、神経成長因子に特異的に結合する単離されたヒト抗体であって、この重鎖が、配列番号 10、配列番号 79、配列番号 81、配列番号 8

50

3、配列番号85、もしくは配列番号87に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含む重鎖可変領域を含む、ヒト抗体も提供する。

【0027】

本発明は、重鎖および軽鎖を含む、NGFに特異的に結合する単離されたヒト抗体であって、この軽鎖が、配列番号12、配列番号80、配列番号82、配列番号84、配列番号86、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、もしくは配列番号131に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含む軽鎖可変領域を含む、ヒト抗体をさらに提供する。

10

【0028】

本発明の抗体は、NGFポリペプチドに関連した*in vitro*活性および／または*in vivo*活性の少なくとも1つを中和する能力によって特徴付けられる。好ましくは、本発明は、NGFポリペプチドに対して高親和性結合を有する単離された抗ヒトNGFヒト抗体であって、ヒトNGFポリペプチドに結合し、KinExAで決定された約 50×10^{-12} M以下の解離定数 (K_D) でヒトNGFポリペプチドから解離するか、または*in vitro*中和アッセイにおいて約 1×10^{-8} M以下の IC_{50} でNGF誘導性生存を阻害する、抗ヒトNGFヒト抗体を提供する。

【0029】

好ましい実施形態では、本発明は、以下の特徴を有する単離された抗ヒトNGFヒト抗体を提供する：

20

(a) *in vitro*中和アッセイにおいて約 1×10^{-9} M以下の IC_{50} でNGF誘導性生存を阻害する；

(b) 配列番号14のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を有する；および

(c) 配列番号16のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を有する。

【0030】

本発明はまた、高い親和性でNGFに特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントであって、前記抗体またはフラグメントが、約 1×10^{-9} 以下の K_D でヒトNGFポリペプチドから解離し、標準的な*in vitro*アッセイにおいて約 1×10^{-8} M以下の IC_{50} でヒトNGF生物活性を中和し、重鎖可変領域を含み、この重鎖可変領域が：

30

(a) 以下の式のアミノ酸配列を含むCDR1領域：

$a^1 a^2 a^3 a^4 a^5$

(式中： a^1 は、極性親水性アミノ酸残基であり； a^2 は、芳香族アミノ酸残基であり； a^3 は、脂肪族、極性疎水性、芳香族アミノ酸残基であり； a^4 は、中性疎水性または脂肪族アミノ酸残基であり；および a^5 は、脂肪族または極性親水性アミノ酸残基である)；

(b) 以下の式のアミノ酸配列を含むCDR2領域：

$b^1 b^2 b^3 b^4 b^5 b^6 b^7 b^8 b^9 b^{10} b^{11} b^{12} b^{13} b^{14} b^{15} b^{16} b^{17}$

40

(式中： b^1 は、脂肪族、極性疎水性、または芳香族アミノ酸残基であり； b^2 は、脂肪族疎水性アミノ酸残基であり； b^3 は、極性親水性または芳香族アミノ酸残基であり； b^4 は、極性親水性、疎水性、または芳香族アミノ酸残基であり； $b^5 \sim b^9$ は独立して、極性親水性または脂肪族アミノ酸残基であり； b^{10} は、極性親水性、芳香族、または脂肪族アミノ酸残基であり； b^{11} は、芳香族または疎水性アミノ酸残基であり； b^{12} は、脂肪族疎水性または極性親水性アミノ酸残基であり； b^{13} は、脂肪族、疎水性、または極性親水性アミノ酸残基であり； b^{14} および b^{16} は独立して、極性親水性アミノ酸残基であり； b^{15} は、脂肪族または芳香族疎水性アミノ酸残基であり；および b^{17} は、脂肪族酸性アミノ酸残基である)；および

(c) 以下の式のアミノ酸配列を含むCDR3領域：

50

$c^1 c^2 c^3 c^4 c^5 c^6 c^7 c^8 c^9 c^{10} c^{11} c^{12} c^{13} c^{14} c^{15} c^{16} c^{17}$

(式中： c^1 は、存在しないか、または脂肪族アミノ酸残基であり； c^2 は、存在しないか、または極性親水性もしくは芳香族疎水性アミノ酸残基であり； c^3 および c^4 はそれぞれ、存在しないか、または極性親水性、芳香族疎水性、もしくは脂肪族アミノ酸残基であり； c^5 は、存在しないか、または極性親水性、脂肪族、もしくは芳香族アミノ酸残基であり； c^6 は、存在しないか、または極性親水性もしくは脂肪族アミノ酸残基であり； c^7 は、極性親水性または脂肪族アミノ酸残基であり； c^8 は、極性親水性、疎水性、または芳香族アミノ酸残基であり； c^9 は、極性親水性、脂肪族、または芳香族疎水性アミノ酸残基であり； c^{10} は、極性親水性、芳香族疎水性、または脂肪族疎水性アミノ酸残基であり； $c^{11} \sim c^{13}$ は独立して、極性親水性または芳香族疎水性アミノ酸残基であり； c^{14} は、脂肪族または芳香族疎水性アミノ酸残基であり； c^{15} は、極性親水性または中性疎水性アミノ酸残基であり； c^{16} は、存在しないか、または極性親水性アミノ酸残基であり；および c^{17} は、芳香族疎水性または脂肪族疎水性アミノ酸残基である)を含む、ヒト抗体またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを提供する。

10

【0031】

一態様では、 a^1 は、極性親水性アミノ酸残基であり； a^2 は、芳香族疎水性アミノ酸残基であり； a^3 は、脂肪族疎水性アミノ酸残基であり； a^4 は、中性疎水性であり； a^5 は、極性親水性アミノ酸残基であり； b^1 は、脂肪族または芳香族アミノ酸残基であり； b^2 は、Ileであり； b^3 は、極性親水性アミノ酸残基であり； b^4 は、極性親水性または芳香族アミノ酸残基であり； $b^5 \sim b^9$ は独立して、極性親水性または脂肪族アミノ酸残基であり； b^{10} は、脂肪族アミノ酸残基であり； b^{11} は、Tyrであり； b^{12} は、脂肪族疎水性アミノ酸残基であり； b^{13} は、脂肪族または極性親水性アミノ酸残基であり； b^{14} および b^{16} はそれぞれ、極性親水性アミノ酸残基であり； b^{15} は、脂肪族疎水性アミノ酸残基であり； b^{17} は、脂肪族酸性アミノ酸残基であり； c^1 は、存在しないか、または脂肪族アミノ酸残基であり； c^2 は、存在しないか、または極性親水性もしくは芳香族疎水性アミノ酸残基であり； c^3 および c^4 は独立して、存在しないか、または極性親水性、芳香族疎水性、もしくは脂肪族アミノ酸残基であり； c^5 は、存在しないか、または極性親水性アミノ酸残基であり； c^6 は、存在しないか、または極性親水性もしくは脂肪族アミノ酸残基であり； c^7 は、極性親水性または脂肪族アミノ酸残基であり； c^8 は、極性親水性、疎水性、または芳香族アミノ酸残基であり； c^9 は、極性親水性、脂肪族、または芳香族疎水性アミノ酸残基であり； c^{10} は、極性親水性、芳香族疎水性、または脂肪族疎水性アミノ酸残基であり； $c^{11} \sim c^{13}$ は独立して、極性親水性または芳香族疎水性アミノ酸残基であり； c^{14} は、脂肪族または芳香族疎水性アミノ酸残基であり； c^{15} は、極性親水性または中性疎水性アミノ酸残基であり； c^{16} は、存在しないか、または極性親水性アミノ酸残基であり；および c^{17} は、芳香族疎水性または脂肪族疎水性アミノ酸残基である。

20

30

【0032】

特定の態様では、 a^1 は、Ser、Asp、またはThrであり； a^2 は、Tyrであり； a^3 は、Ala、Ser、Trp、またはGlyであり； a^4 は、MetまたはIleであり； a^5 は、His、Gly、またはAsnであり； b^1 は、Tyr、Gly、Ile、またはAspであり； b^2 は、Ileであり； b^3 は、Ser、Thr、Tyr、またはAsnであり； b^4 は、Trp、Arg、またはProであり； b^5 は、Ser、Asn、またはGlyであり； b^6 は、Ser、Arg、Asp、またはGlyであり； b^7 は、Ser、His、またはGlyであり； b^8 は、Ser、Ile、Asp、またはThrであり； b^9 は、Leu、Ile、またはThrであり； b^{10} は、Gly、Lys、またはPheであり； b^{11} は、Tyrであり； b^{12} は、AlaまたはSerであり； b^{13} は、Asp、Gly、またはProであり； b^{14} は、Serであり； b^{15} は、ValまたはPheであり； b^{16} は、LysまたはGlnであり； b^{17} はGl

40

50

yであり；c¹は、存在しないか、または脂肪族アミノ酸残基であり；c²は、存在しないか、またはTyrであり；c³およびc⁴は独立して、存在しないか、Tyr、Asn、Val、またはGluであり；c⁵は、存在しないか、Ser、Gly、またはTrpであり；c⁶は、存在しないか、Ser、Gly、Glu、またはLeuであり；c⁷は、Gly、Arg、またはAspであり；c⁸は、Trp、Pro、Ser、またはThrであり；c⁹は、His、Gly、またはTyrであり；c¹⁰は、Val、Tyr、またはArgであり；c¹¹～c¹³は独立して、Ser、Phe、Tyr、Asp、またはAsnであり；c¹⁴は、Phe、Val、またはGlyであり；c¹⁵は、MetまたはAspであり；c¹⁶は、存在しないか、Asp、またはAsnであり；およびc¹⁷は、TyrまたはValである。

10

【0033】

別の特定の態様では、a¹は、SerまたはAspであり；a²は、Tyrであり；a³は、AlaまたはSerであり；a⁴は、MetまたはIleであり；a⁵は、HisまたはAsnであり；b¹は、TyrまたはGlyであり；b²は、Ileであり；b³は、Ser、Thr、Tyr、またはAsnであり；b⁴は、Trp、Arg、またはProであり；b⁵は、SerまたはAsnであり；b⁶は、SerまたはArgであり；b⁷は、HisまたはGlyであり；b⁸は、IleまたはThrであり；b⁹は、Leu、Ile、またはThrであり；b¹⁰は、GlyまたはPheであり；b¹¹は、Tyrであり；b¹²は、AlaまたはSerであり；b¹³は、AspまたはGlyであり；b¹⁴は、Serであり；b¹⁵は、ValまたはPheであり；b¹⁶は、LysまたはGlnであり；b¹⁷は、Glyであり；c¹は、存在しないか、またはGlyであり；c²は、存在しないか、またはTyrであり；c³およびc⁴は独立して、存在しないか、Tyr、Gly、またはValであり；c⁵は、存在しないか、またはSerであり；c⁶は、SerまたはGlyであり；c⁷は、GlyまたはArgであり；c⁸は、TrpまたはProであり；c⁹は、His、Gly、またはTyrであり；c¹⁰は、ValまたはTyrであり；c¹¹～c¹³は独立して、Ser、Tyr、Phe、またはAspであり；c¹⁴は、PheまたはValであり；c¹⁵は、MetまたはAspであり；c¹⁶は、存在しないか、またはAspであり；およびc¹⁷は、TyrまたはValである。

20

【0034】

他の特定の態様では、

(a) 重鎖CDR1は、配列番号22に示されているアミノ酸配列を有し、重鎖CDR2は、配列番号18に示されているアミノ酸配列を有し、および重鎖CDR3は、配列番号14に示されているアミノ酸配列を有する、

(b) 重鎖CDR1は、配列番号92に示されているアミノ酸配列を有し、重鎖CDR2は、配列番号93に示されているアミノ酸配列を有し、および重鎖CDR3は、配列番号94に示されているアミノ酸配列を有する、

(c) 重鎖CDR1は、配列番号98に示されているアミノ酸配列を有し、重鎖CDR2は、配列番号99に示されているアミノ酸配列を有し、および重鎖CDR3は、配列番号100に示されているアミノ酸配列を有する、

40

(d) 重鎖CDR1は、配列番号104に示されているアミノ酸配列を有し、重鎖CDR2は、配列番号105に示されているアミノ酸配列を有し、および重鎖CDR3は、配列番号106に示されているアミノ酸配列を有する、

(e) 重鎖CDR1は、配列番号110に示されているアミノ酸配列を有し、重鎖CDR2は、配列番号111に示されているアミノ酸配列を有し、および重鎖CDR3は、配列番号112に示されているアミノ酸配列を有する、および

(f) 重鎖CDR1は、配列番号116に示されているアミノ酸配列を有し、重鎖CDR2は、配列番号117に示されているアミノ酸配列を有し、および重鎖CDR3は、配列番号118に示されているアミノ酸配列を有する。

【0035】

50

本発明はまた、NGFに特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントであって、この抗体またはフラグメントが、軽鎖可変領域を含み、この軽鎖可変領域が：

(a) 以下の式のアミノ酸配列を含むCDR1領域：

$$a^1 a^2 a^3 a^4 a^5 a^6 a^7 a^8 a^9 a^{10} a^{11} a^{12}$$

(式中： a^1 は、極性親水性アミノ酸残基であり； a^2 、 a^{11} 、および a^{12} は独立して、脂肪族または疎水性アミノ酸残基であり； a^3 、 a^5 、 a^7 、および a^8 は独立して、脂肪族、極性親水性、または疎水性アミノ酸残基であり； a^4 は、極性親水性アミノ酸残基であり； a^6 は、脂肪族または疎水性アミノ酸残基であり； a^9 は、存在しないか、または脂肪族もしくは極性親水性アミノ酸残基であり； a^{10} は、脂肪族、芳香族、または疎水性アミノ酸残基である)；

10

(b) 以下の式のアミノ酸配列を含むCDR2領域：

$$b^1 b^2 b^3 b^4 b^5 b^6 b^7$$

(式中： b^1 は、脂肪族、極性疎水性、または疎水性アミノ酸残基であり； b^2 は、脂肪族または疎水性アミノ酸残基であり； b^3 および b^4 は独立して、極性親水性、脂肪族、または疎水性アミノ酸残基であり； b^5 は、極性親水性または脂肪族疎水性アミノ酸残基であり； b^6 は、極性親水性または脂肪族疎水性アミノ酸残基であり； b^7 は、極性親水性アミノ酸残基である)；および

(c) 以下の式のアミノ酸配列を含むCDR3領域：

$$c^1 c^2 c^3 c^4 c^5 c^6 c^7 c^8 c^9 c^{10} c^{11} c^{12} c^{13} c^{14} c^{15} c^{16} c^{17}$$

20

(式中： c^1 および c^2 は独立して、極性親水性アミノ酸残基であり； c^3 は、極性親水性、脂肪族、または疎水性アミノ酸残基であり； c^4 、 c^5 、および c^6 は独立して、脂肪族、極性親水性、または疎水性アミノ酸残基であり； c^7 は、存在しないか、または極性親水性もしくは脂肪族疎水性アミノ酸残基であり； c^8 は、極性親水性または疎水性アミノ酸残基であり； c^9 は、極性親水性アミノ酸残基である)

を含み、前記抗体またはフラグメントが、約 1×10^{-9} 以下の K_D でヒトNGFポリペプチドから解離し、標準的なin vitroアッセイにおいて約 1×10^{-8} M以下の IC_{50} でヒトNGF生物活性を中和する、ヒト抗体またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントも提供する。

30

【0036】

一態様では、 a^1 、 a^3 、 a^4 、 a^7 、および a^8 は独立して、極性親水性アミノ酸残基であり； a^2 、 a^6 、 a^{11} 、および a^{12} は独立して、脂肪族疎水性アミノ酸残基であり； a^5 は、極性親水性または脂肪族アミノ酸残基であり； a^9 は、存在しないか、または脂肪族もしくは極性親水性アミノ酸残基であり； a^{10} は、脂肪族または芳香族アミノ酸残基であり； b^1 は、脂肪族、極性疎水性、または疎水性アミノ酸残基であり； b^2 は、脂肪族疎水性アミノ酸残基であり； b^3 、 b^4 、および b^7 は独立して、極性親水性アミノ酸残基であり； b^5 および b^6 は独立して、極性親水性または脂肪族疎水性アミノ酸残基であり； c^1 および c^2 は独立して、極性親水性アミノ酸残基であり； c^3 は、極性親水性、脂肪族、または疎水性アミノ酸残基であり； c^4 、 c^5 、および c^6 は独立して、脂肪族、極性親水性、または疎水性アミノ酸残基であり； c^7 は、存在しないか、または脂肪族疎水性アミノ酸残基であり； c^8 は、疎水性アミノ酸残基であり； c^9 は、極性親水性アミノ酸残基である。

40

【0037】

特定の態様では、 a^1 、 a^3 、 a^4 、および a^7 はそれぞれ、Arg、Ser、Gln、およびSerであり； a^2 は、Alaであり； a^5 は、GlyまたはSerであり； a^8 は、SerまたはIleであり； a^9 は、存在しないか、Ser、またはGlyであり； a^{10} は、Ala、Tyr、TrpまたはPheであり； b^1 は、Asp、Gly、Ala、またはValであり； b^2 および b^3 はそれぞれ、AlaおよびSerであり； b^4 は、SerまたはAsnであり； b^5 は、LeuまたはArgであり； b^6 は、Glu

50

、Ala、またはGlnであり；b⁷は、SerまたはThrであり；c¹およびc²は、Glnであり；c³は、Phe、Tyr、Arg、またはAlaであり；c⁴は、Asn、Gly、またはSerであり；c⁵は、SerまたはAsnであり；c⁶は、Tyr、Ser、Trp、またはPheであり；c⁷は、存在しないか、Pro、またはHisであり；c⁸は、Leu、Trp、Tyr、またはArgであり；およびc⁹は、Thrである。

【0038】

別の特定の態様では、a¹、a²、a³、a⁴、およびa⁷はそれぞれ、Arg、Ala、Ser、Gln、およびSerであり；a⁵は、GlyまたはSerであり；a⁸は、SerまたはIleであり；a⁹は、存在しないか、Ser、またはGlyであり；a¹⁰は、AlaまたはTyrであり；b¹は、AspまたはGlyであり；b²およびb³はそれぞれ、AlaおよびSerであり；b⁴は、SerまたはAsnであり；b⁵は、LeuまたはArgであり；b⁶は、Glu、Ala、またはGlnであり；b⁷は、SerまたはThrであり；c¹およびc²は、Glnであり；c³は、Phe、Tyr、Arg、またはAlaであり；c⁴は、Asn、Gly、またはSerであり；c⁵は、SerまたはAsnであり；c⁶は、Tyr、Ser、Trp、またはPheであり；c⁷は、存在しないか、Pro、またはHisであり；c⁸は、Leu、Trp、Tyr、またはArgであり；およびc⁹は、Thrである。

【0039】

別の特定の態様では、

(a) 軽鎖CDR1は、配列番号24に示されているアミノ酸配列を有し、軽鎖CDR2は、配列番号20に示されているアミノ酸配列を有し、および軽鎖CDR3は、配列番号16に示されているアミノ酸配列を有する、

(b) 軽鎖CDR1は、配列番号95に示されているアミノ酸配列を有し、軽鎖CDR2は、配列番号96に示されているアミノ酸配列を有し、および軽鎖CDR3は、配列番号97に示されているアミノ酸配列を有する、

(c) 軽鎖CDR1は、配列番号101に示されているアミノ酸配列を有し、軽鎖CDR2は、配列番号102に示されているアミノ酸配列を有し、および軽鎖CDR3は、配列番号103に示されているアミノ酸配列を有する、

(d) 軽鎖CDR1は、配列番号107に示されているアミノ酸配列を有し、軽鎖CDR2は、配列番号108に示されているアミノ酸配列を有し、および軽鎖CDR3は、配列番号109に示されているアミノ酸配列を有する、

(e) 軽鎖CDR1は、配列番号113に示されているアミノ酸配列を有し、軽鎖CDR2は、配列番号114に示されているアミノ酸配列を有し、および軽鎖CDR3は、配列番号115に示されているアミノ酸配列を有する、

(f) 軽鎖CDR1は、配列番号119に示されているアミノ酸配列を有し、軽鎖CDR2は、配列番号120に示されているアミノ酸配列を有し、および軽鎖CDR3は、配列番号121に示されているアミノ酸配列を有する、

(g) 軽鎖CDR1は、配列番号122に示されているアミノ酸配列を有し、軽鎖CDR2は、配列番号123に示されているアミノ酸配列を有し、および軽鎖CDR3は、配列番号124に示されているアミノ酸配列を有する、

(h) 軽鎖CDR1は、配列番号125に示されているアミノ酸配列を有し、軽鎖CDR2は、配列番号126に示されているアミノ酸配列を有し、および軽鎖CDR3は、配列番号127に示されているアミノ酸配列を有する、

(i) 軽鎖CDR1は、配列番号128に示されているアミノ酸配列を有し、軽鎖CDR2は、配列番号129に示されているアミノ酸配列を有し、および軽鎖CDR3は、配列番号130に示されているアミノ酸配列を有する、および

(j) 軽鎖CDR1は、配列番号132に示されているアミノ酸配列を有し、軽鎖CDR2は、配列番号133に示されているアミノ酸配列を有し、および軽鎖CDR3は、配列番号134に示されているアミノ酸配列を有する。

【0040】

また、新規な抗ヒトNGFヒト抗体をコードするポリヌクレオチド配列、抗ヒトNGFヒト抗体をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクター、抗ヒトNGFヒト抗体をコードするポリヌクレオチドが組み込まれたベクターで形質転換された宿主細胞、抗ヒトNGFヒト抗体を含む処方物、ならびにこれらの作製および使用方法も本発明の一部である。

【0041】

本発明はまた、生物学的サンプル中のNGFのレベルを検出するための方法であって、このサンプルを本発明の抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる工程を含む方法も提供する。本発明の抗NGF抗体は、NGFの検出および定量のために、任意の公知のアッセイ方法、例えば、競合結合アッセイ、直接および間接的なサンドイッチアッセイ、免疫沈降アッセイ、および酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）で 사용할 ことができる（Sola、1987、Monoclonal Antibodies：A Manual of Techniques、147～158頁、CRC Press、Inc.を参照されたい）。この抗体は、利用されるアッセイ方法に適切である親和性でNGFに結合することができる。

【0042】

加えて、本発明は、NGFの産生の上昇またはNGFに対する感受性の上昇に関連した疾患を処置するための方法であって、本発明の少なくとも1つの抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントを含む薬学的有効量の薬学的組成物を、それを必要とする個体に投与する工程を含む、方法を提供する。

【0043】

一定の実施形態では、本発明は、神経成長因子（NGF）の発現の上昇またはNGFに対する感受性の上昇によって引き起こされる状態を処置する方法であって、患者に薬学的有効量のNGF抗体を、経口的に、静脈内、腹腔内、脳内（実質内）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内、病巣内、もしくは皮下経路による注射によって、持続放出システムによってまたは移植デバイスによって、投与する工程を含み、この状態は、急性疼痛、歯痛、外傷による疼痛、術後疼痛（surgical pain）、切断もしくは膿瘍による疼痛、カウザルギー、脱髄疾患、三叉神経痛、がん、慢性アルコール中毒、脳卒中、視床痛症候群、糖尿病、後天性免疫不全症候群（「AIDS」）、毒素、化学療法、一般的な頭痛、片頭痛、群発性頭痛、混合血管症候群（mixed-vascular syndrome）もしくは非血管症候群（non-vascular syndrome）、緊張性頭痛、一般的な炎症、関節炎、リウマチ病、狼瘡、変形性関節症、線維筋痛症、炎症性腸障害、過敏性腸症候群、炎症性眼障害、炎症性もしくは不安定膀胱障害、乾癬、炎症性成分による皮膚病訴、日焼け、心臓炎、皮膚炎、筋炎、神経炎、膠原血管病、慢性炎症状態、炎症性疼痛ならびにこれに関連した痛覚過敏および異痛、神経障害疼痛ならびにこれに関連した痛覚過敏および異痛、糖尿病性神経障害疼痛、カウザルギー、交感神経によって維持される疼痛（sympathetically maintained pain）、求心路遮断症候群、喘息、上皮組織の損傷もしくは機能不全、単純ヘルペス、呼吸領域、尿生殖器領域、胃腸領域、もしくは血管領域における内臓運動の不調、創傷、熱傷、アレルギー性皮膚反応、そう痒（pruritis）、白斑、一般的な胃腸障害、大腸炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、血管運動神経性鼻炎もしくはアレルギー性鼻炎、または気管支障害、月経困難、消化不良、胃食道逆流、膵炎、または内臓痛である、方法に関する。

【0044】

一定の実施形態では、本方法は、薬学的有効量のNGF抗体を含み、変形性関節症膝疼痛の処置または防止に有用である。一定の実施形態では、NGF抗体の薬学的有効量は、皮下注射当たり約3mg～約30mgである。一定の実施形態では、投与は、複数回の皮下注射を含む。ある実施形態では、投与は、単回皮下注射を含む。一定の実施形態では、本発明の組成物および方法は、配列番号44を含む軽鎖を含むNGF抗体を含む。一定の

実施形態では、NGF抗体は、配列番号40を含む重鎖を含む。さらなる実施形態では、NGF抗体は、配列番号44を含む軽鎖および配列番号40を含む重鎖を含む。

【0045】

したがって、本発明の上記説明によると、様々な態様では、本発明は、配列番号44を含む軽鎖および配列番号40を含む重鎖を含むNGF抗体を含む方法および組成物であって、この抗体の重鎖と軽鎖がフレキシブルリンカーによって連結されて単鎖抗体を形成している、方法および組成物に関する。この態様の一部の実施形態では、NGF抗体は、単鎖Fv抗体、Fab'抗体、(Fab')₂抗体、完全ヒト抗体、および／またはヒト化抗体を含む。この態様の一部の実施形態では、NGF抗体は、NGFのシグナル伝達を阻害する。

10

【0046】

この態様の一定の実施形態では、NGF抗体は、約 1×10^{-9} 以下、約 1×10^{-10} 以下、または約 1×10^{-11} 以下のK_DでヒトNGFポリペプチドから解離する。この態様の一定の実施形態では、NGF抗体は、標準的なin vitroアッセイにおいて約 1×10^{-8} 以下、約 1×10^{-9} 以下、または約 0.2×10^{-9} 以下のIC₅₀でヒトNGF生物活性を中和する。一定の実施形態では、NGF抗体は、上述のK_D値（複数可）でヒトNGFポリペプチドから解離し、標準的なin vitroアッセイにおいて上述のIC₅₀値でヒトNGF生物活性を中和する。

【0047】

本発明の特有の好ましい実施形態は、以下の一定の好ましい実施形態のさらに詳細な説明および特許請求の範囲から明らかになる。

20

したがって、本発明は、以下の項目を提供する：

（項目1） 神経成長因子（NGF）の発現の上昇またはNGFに対する感受性の上昇によって引き起こされる状態を処置する方法であって、該方法は、患者に薬学的有効量のNGF抗体を、経口的に、静脈内経路、腹腔内経路、脳内（実質内）経路、脳室内経路、筋肉内経路、眼内経路、動脈内経路、門脈内経路、病巣内経路、もしくは皮下経路による注射によって、持続放出システムによって、または移植デバイスによって、投与する工程を含む、方法。

（項目2） 上記注射が、皮下注射である、項目1に記載の方法。

（項目3） 上記NGF抗体の上記薬学的有効量が、皮下注射あたり約3mg～約30mgである、項目2に記載の方法。

30

（項目4） 上記皮下注射が、複数回の皮下注射を含む、項目2に記載の方法。

（項目5） 上記状態が、急性疼痛、歯痛、外傷による疼痛、術後疼痛、切断もしくは膿瘍による疼痛、カウザルギー、脱髄疾患、三叉神経痛、がん、慢性アルコール中毒、脳卒中、視床痛症候群、糖尿病、後天性免疫不全症候群（「AIDS」）、毒素、化学療法、一般的な頭痛、片頭痛、群発性頭痛、混合血管症候群もしくは非血管症候群、緊張性頭痛、一般的な炎症、関節炎、リウマチ病、狼瘡、変形性関節症、線維筋痛症、炎症性腸障害、過敏性腸症候群、炎症性眼障害、炎症性もしくは不安定膀胱障害、乾癬、炎症性成分による皮膚病訴、日焼け、心臓炎、皮膚炎、筋炎、神経炎、膠原血管病、慢性炎症状態、炎症性疼痛ならびにこれに関連した痛覚過敏および異痛、神経障害疼痛ならびにこれに関連した痛覚過敏および異痛、糖尿病性神経障害疼痛、交感神経によって維持される疼痛、求心路遮断症候群、喘息、上皮組織の損傷もしくは機能不全、単純ヘルペス、呼吸領域、尿生殖器領域、胃腸領域、もしくは血管領域における臓器運動の不調、創傷、熱傷、アレルギー性皮膚反応、そう痒、白斑、一般的な胃腸障害、大腸炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、血管運動神経性鼻炎もしくはアレルギー性鼻炎、または気管支障害、月経困難、消化不良、胃食道逆流、膵炎、または臓器痛である、項目1に記載の方法。

40

（項目6） 上記変形性関節症が、変形性関節症膝疼痛である、項目5に記載の方法。

（項目7） 上記注射が、皮下注射である、項目6に記載の方法。

（項目8） 上記NGF抗体の上記薬学的有効量が、皮下注射あたり約3mg～約30mgである、項目7に記載の方法。

50

(項目 9) 薬学的に許容され得るキャリアおよび単離された抗体を含む薬学的組成物を投与する工程を含み、該抗体が、配列番号 44 を含む軽鎖および配列番号 40 を含む重鎖を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 10) 上記抗体の上記重鎖および上記軽鎖が、フレキシブルリンカーによって結合されて単鎖抗体を形成している、項目 9 に記載の方法。

(項目 11) 上記 NGF 抗体が、Fab' 抗体である、項目 1 に記載の方法。

(項目 12) 上記 NGF 抗体が、(Fab')₂ 抗体である、項目 1 に記載の方法。

(項目 13) 上記 NGF 抗体が、完全ヒト抗体である、項目 1 に記載の方法。

(項目 14) 上記 NGF 抗体が、ヒト化されている、項目 1 に記載の方法。

(項目 15) 上記 NGF 抗体が、NGF シグナル伝達を阻害する、項目 1 に記載の方法

10

(項目 16) 上記 NGF 抗体が、配列番号 44 を含む軽鎖および配列番号 40 を含む重鎖を含み、該抗体の該重鎖および該軽鎖が、フレキシブルリンカーによって結合されて単鎖抗体を形成している、項目 1 に記載の方法。

(項目 17) 上記 NGF 抗体が、単鎖 Fv 抗体である、項目 16 に記載の方法。

(項目 18) 上記 NGF 抗体が、Fab' 抗体である、項目 16 に記載の方法。

(項目 19) 上記 NGF 抗体が、(Fab')₂ 抗体である、項目 16 に記載の方法。

(項目 20) 上記 NGF 抗体が、完全ヒト抗体である、項目 16 に記載の方法。

(項目 21) 上記 NGF 抗体が、ヒト化されている、項目 16 に記載の方法。

(項目 22) 上記 NGF 抗体が、NGF シグナル伝達を阻害する、項目 16 に記載の方法。

20

(項目 23) 上記 NGF 抗体が、約 1×10^{-9} 以下の K_D でヒト NGF ポリペプチドから解離し、標準的な *in vitro* アッセイにおいて約 1×10^{-8} 以下の IC_{50} でヒト NGF 生物活性を中和する、項目 16 に記載の方法。

(項目 24) 上記 NGF 抗体が、約 1×10^{-10} 以下の K_D でヒト NGF ポリペプチドから解離し、標準的な *in vitro* アッセイにおいて約 1×10^{-9} 以下の IC_{50} でヒト NGF 生物活性を中和する、項目 16 に記載の方法。

(項目 25) 上記 NGF 抗体が、約 1×10^{-11} 以下の K_D でヒト NGF ポリペプチドから解離し、標準的な *in vitro* アッセイにおいて約 0.2×10^{-9} 以下の IC_{50} でヒト NGF 生物活性を中和する、項目 16 に記載の方法。

30

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図 1a】図 1 は、ハイブリドーマ馴化培地から精製された 4D4 モノクローナル抗体による、DRG ニューロンベースの中和バイオアッセイにおける NGF 活性の中和を実証するグラフを示している。

【図 1b】図 1 は、ハイブリドーマ馴化培地から精製された 4D4 モノクローナル抗体による、DRG ニューロンベースの中和バイオアッセイにおける NGF 活性の中和を実証するグラフを示している。

【図 2】図 2 は、ヒト NGF 活性によって刺激された VR1 の発現、およびハイブリドーマ馴化培地から精製された抗 NGF モノクローナル抗体 (4D4) による、DRG ニューロンベースの中和バイオアッセイにおける NGF 活性の中和を実証するグラフを示している。

40

【図 3】図 3 は、ローラーボトル培養 (R) またはスピナーフラスコ (S) のいずれかで増殖した細胞において、IgG1 または IgG2 のいずれかとして発現された場合の、一過性発現組換え抗 NGF 4D4 モノクローナル抗体による、DRG ニューロンベースの中和バイオアッセイにおける NGF 活性の中和を実証するグラフを示している。

【図 4】図 4 は、ニューロトロフィンの配列のアラインメントを示している。この配列の上の番号および二次構造エレメントは、成熟ヒト NGF に関連している。保存された残基には星でマークが付けられており、低い配列相同性の領域には影が付けられている。NGF ヒトは、配列番号 135 であり；NGF マウスは配列番号 136 であり；BDNF は配

50

列番号137であり；NT3は配列番号138である。

【図5】図5は、14D10（配列番号98）、6H9（配列番号104）、7H2（配列番号110）、4G6（配列番号116）、14D11（配列番号92）、および4D4（配列番号22）の抗体についての抗NGF CDR1重鎖のアラインメントおよび同一性パーセントを示している。

【図6】図6は、14D10（配列番号99）、6H9（配列番号105）、7H2（配列番号111）、4G6（配列番号117）、14D11（配列番号93）および4D4（配列番号18）の抗体についての抗NGF CDR2重鎖のアラインメントおよび同一性パーセントを示している。

【図7】図7は、14D10（配列番号100）、6H9（配列番号106）、7H2（配列番号112）、4G6（配列番号118）、14D11（配列番号94）、および4D4（配列番号14）の抗体についての抗NGF CDR3重鎖のアラインメントおよび同一性パーセントを示している。

【図8】図8は、14D10（配列番号95）、6H9（配列番号107）、7H2（配列番号113）、4G6a（配列番号119）、4G6b（配列番号122）、4G6c（配列番号125）、4G6d（配列番号128）、4G6e（配列番号132）、14D11（配列番号95）、および4D4（配列番号24）の抗体についての抗NGF CDR1軽鎖のアラインメントおよび同一性パーセントを示している（4G6aは、様々な図では20031028340として示されている；4G6bは、様々な図では20031028351として示されている；4G6cは、様々な図では20031071526として示されている；4G6dは、様々な図では20031028344として示されている；4G6eは、様々な図では20031000528として示されている）。

【図9】図9は、14D10（配列番号96）、6H9（配列番号108）、7H2（配列番号114）、4G6a（配列番号120）、4G6b（配列番号123）、4G6c（配列番号126）、4G6d（配列番号129）、4G6e（配列番号133）、14D11（配列番号96）、および4D4（配列番号20）の抗体についての抗NGF CDR2軽鎖のアラインメントおよび同一性パーセントを示している（4G6aは、様々な図では20031028340として示されている；4G6bは、様々な図では20031028351として示されている；4G6cは、様々な図では20031071526として示されている；4G6dは、様々な図では20031028344として示されている；4G6eは、様々な図では20031000528として示されている）。

【図10】図10は、14D10（配列番号97）、6H9（配列番号109）、7H2（配列番号115）、4G6a（配列番号121）、4G6b（配列番号124）、4G6c（配列番号127）、4G6d（配列番号130）、4G6e（配列番号134）、14D11（配列番号97）、および4D4（配列番号16）の抗体についての抗NGF CDR3軽鎖のアラインメントおよび同一性パーセントを示している（4G6aは、様々な図では20031028340として示されている；4G6bは、様々な図では20031028351として示されている；4G6cは、様々な図では20031071526として示されている；4G6dは、様々な図では20031028344として示されている；4G6eは、様々な図では20031000528として示されている）。

【図11】図11は、14D10（配列番号82）、6H9（配列番号84）、7H2（配列番号86）、4G6a（配列番号88）、4G6b（配列番号89）、4G6c（配列番号90）、4G6d（配列番号91）、4G6e（配列番号131）、14D11（配列番号80）、および4D4（配列番号12）の抗体についての抗NGF軽鎖のアラインメントおよび同一性パーセントを示している（4G6aは、様々な図では20031028340として示されている；4G6bは、様々な図では20031028351として示されている；4G6cは、様々な図では20031071526として示されている；4G6dは、様々な図では20031028344として示されている；4G6eは、様々な図では20031000528として示されている）。

【図12】図12は、4D4（配列番号10）、4G6（配列番号87）、14D10（

10

20

30

40

50

配列番号 81)、14D11 (配列番号 79)、7H2 (配列番号 85)、および 6H9 (配列番号 83) の抗体についての抗 NGF の重鎖のアラインメントおよび同一性パーセントを示している。

【発明を実施するための形態】

【0049】

(特定の好ましい実施形態の詳細な説明)

本明細書に使用される節の見出しは、単にまとめることを目的とするだけであり、記載される主題を限定すると解釈されるべきではない。本出願に引用される全ての参考文献は、あらゆる目的に対して参考として本明細書に明確に組み入れられるものとする。

【0050】

(定義)

従来の技術を、組換え DNA、オリゴヌクレオチド合成、ならびに組織の培養および形質転換 (例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション) に用いることができる。酵素反応および精製技術は、製造業者の仕様書にしたがって、または当技術分野で一般に達成されるように、または本明細書に記載されるように行うことができる。前述の技術および手順は一般に、当技術分野で周知の方法にしたがって、本明細書で引用され議論されている様々な一般的な参考文献およびさらに詳細な参考文献に記載されているように行うことができる。例えば、あらゆる目的に対して参考として本明細書に組み入れられる、Sambrookら、2001、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor, N. Y. を参照されたい。特段の記載がない限り、本明細書に記載される分析化学、合成有機化学、ならびに医学および薬学の化学と関連して利用される命名法、ならびにその実験室手順および技術は、当技術分野で周知であり、一般的に使用されている。同様に、従来の技術は、化学合成、化学分析、薬学的調製、処方、および送達、ならびに患者の処置に用いることができる。

【0051】

本開示にしたがって利用される場合、以下の用語は、特段の記載がない限り、以下の意味を有すると理解されるべきである: 本発明の抗体に関する語句「生物学的特性」、「生物学的特徴」、および用語「活性」は、本明細書で交換可能に使用され、これらには、限定されるものではないが、エピトープ親和性および特異性 (例えば、ヒト NGF に結合する抗ヒト NGF ヒト抗体)、標的のポリペプチドの活性 (例えば、NGF 活性) をアンタゴナイズする能力、この抗体の *in vivo* 安定性、ならびにこの抗体の免疫原性特性が含まれる。当技術分野で認められている抗体の他の同定可能な生物学的特性または特徴には、例えば、交差反応性 (すなわち、一般的には、標的にされるポリペプチドの非ヒトホモログとの交差反応性、または他のタンパク質もしくは組織との交差反応性)、および哺乳動物細胞においてタンパク質の高い発現レベルを保つ能力が含まれる。前述の特性または特徴は、当技術分野で認められている技術を用いて観察または測定することができ、これらの技術には、限定されるものではないが、ELISA、競合的 ELISA、表面プラズモン共鳴分析、*in vitro* および *in vivo* 中和アッセイ (例えば、実施例 2)、およびヒト、霊長類、または必要に応じて任意の他の供給源を含む様々な供給源由来の組織切片を用いた免疫組織化学が含まれる。抗ヒト NGF ヒト抗体の特定の活性および生物学的特性は、以下の実施例にさらに詳細に記載される。

【0052】

本明細書で使用される用語「単離されたポリヌクレオチド」は、ゲノム、cDNA、または合成起源のポリヌクレオチド、またはこれらのある組み合わせを意味するものであり、その起源によっては、単離されたポリヌクレオチドは、(1) ポリヌクレオチド (その単離されたポリヌクレオチドは、天然では、そのポリヌクレオチド中に見られる) の全てまたは一部に結合していない、(2) 天然では連結されないポリヌクレオチドに連結されている、または (3) より大きい配列の一部としては、天然に発生しない。

【0053】

本明細書で使用される用語「単離されたタンパク質」は、対象のタンパク質が、（１）通常は共に見出される他のタンパク質の少なくとも一部を含まない、（２）同じ供給源由来、例えば同種由来の他のタンパク質を本質的に含まない、（３）異種由来の細胞によって発現される、（４）天然では会合している、ポリヌクレオチド、脂質、炭水化物もしくは他の物質の少なくとも約５０％から分離されている、（５）この「単離されたタンパク質」が天然では会合しているタンパク質の一部と、（共有結合性相互作用によっても、または非共有結合性相互作用によっても）会合していない、（６）天然には会合していないポリペプチドと作動可能に会合している（共有結合性相互作用または非共有結合性相互作用によっても）、または（７）天然では発生しないことを意味する。このような単離されたタンパク質は、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、もしくは合成起源の他のRNA、またはこれらの任意の組み合わせによってコードすることができる。好ましくは、この単離されたタンパク質は、その用途（治療、診断、予防、研究などの用途）を妨げ得る、天然の環境で見られるタンパク質、ポリペプチド、または他の混入物を実質的に含まない。

10

【0054】

「単離された」抗体とは、同定されて、その天然の環境の成分から分離され、かつ／または収集されたものである。その天然の環境の混入物成分は、抗体の診断または治療での使用を妨げる物質であり、これには、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性溶質または非タンパク質性溶質が含まれ得る。好ましい実施形態では、抗体は、（１）Lowry法によって決定される、抗体の９５重量％を超えるまで、最も好ましくは９９重量％を超えるまで、（２）スピニング・カップ・シークエネーターの使用によって、N末端アミノ酸配列もしくは内部のアミノ酸配列の少なくとも１５の残基を得るのに十分な程度まで、または（３）クマーシーブルー、もしくは好ましくは銀染色を用いて、還元条件下もしくは非還元条件下でSDS-PAGEによって均一になるまで、精製される。抗体の天然環境の少なくとも１つの成分が存在しないため、単離された抗体には、組換え細胞内のinsitu抗体が含まれる。

20

【0055】

用語「ポリペプチド」または「タンパク質」は、天然のタンパク質、すなわち天然に存在する細胞、特に非組換え細胞によって、または遺伝子操作された細胞もしくは組換え細胞によって産生されるタンパク質の配列を有する分子を意味し、この天然のタンパク質のアミノ酸配列を有する分子、またはこの天然の配列の１つ以上のアミノ酸が欠失した、付加された、かつ／もしくは置換された分子を含む。用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、特に、抗NGF抗体または抗NGF抗体の１つ以上のアミノ酸が欠失した、付加された、かつ／もしくは置換された配列を含む。

30

【0056】

用語「ポリペプチドフラグメント」は、アミノ末端、カルボキシ末端、および／または内部が欠失したポリペプチドを指す。一定の実施形態では、フラグメントは、少なくとも５～約５００アミノ酸長である。一定の実施形態では、フラグメントは、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも８、少なくとも１０、少なくとも１４、少なくとも２０、少なくとも５０、少なくとも７０、少なくとも１００、少なくとも１１０、少なくとも１５０、少なくとも２００、少なくとも２５０、少なくとも３００、少なくとも３５０、少なくとも４００、または少なくとも４５０アミノ酸長であることを理解されたい。特に有用なポリペプチドフラグメントには、結合ドメインを含む機能的なドメインが含まれる。抗NGF抗体の場合、有用なフラグメントには、限定されるものではないが、CDR領域、重鎖または軽鎖の可変ドメイン、抗体鎖の一部、または２つのCDRを含むその可変領域のみなどが含まれる。

40

【0057】

用語「特異的結合物質」は、標的に特異的に結合する天然または非天然の分子を指す。特異的結合物質の例には、限定されるものではないが、タンパク質、ペプチド、核酸、炭水化物および脂質が含まれる。一定の実施形態では、特異的結合物質は抗体である。

50

【0058】

用語「NGFに対する特異的な結合物質」は、NGFの任意の部分に特異的に結合する特異的な結合物質を指す。一定の実施形態では、NGFに対する特異的な結合物質は、NGFに特異的に結合する抗体である。

【0059】

本明細書で使用される用語「免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメント」は、免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の少なくともCDRを含むポリペプチドフラグメントを指す。本発明の免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントは、抗原に結合することができる。好ましい実施形態では、この抗原は、レセプターに特異的に結合するリガンドである。これらの実施形態では、本発明の免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントの結合は、そのレセプターへのリガンドの結合を防止し、リガンドのこのレセプターへの結合から生じる生物学的応答を遮る。好ましくは、本発明の免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントは、NGFに特異的に結合する。最も好ましくは、このフラグメントは、ヒトNGFに特異的に結合する。

【0060】

本明細書で使用され、物体に対して用いられる用語「天然に存在する」は、その物体が天然で見られ得るという事実を指す。例えば、天然の供給源から単離することができ、かつ人間によって意図的に改変されていない、生物（ウイルスを含む）中に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列が、天然に存在する。

【0061】

用語「作動可能に連結された」は、この用語が用いられる成分が、適切な条件下で固有の機能を果たすことができる関係にあることを意味する。例えば、タンパク質コード配列に「作動可能に連結された」制御配列は、制御配列の転写活性に適合する条件下でこのタンパク質コード配列の発現が達成されるように、このタンパク質コード配列に連結されている。

【0062】

本明細書で使用される用語「制御配列」は、制御配列が連結されるコード配列の発現、プロセッシング、または細胞内局在化を可能にするポリヌクレオチド配列を指す。このような制御配列の性質は、宿主生物によって異なり得る。特定の実施形態では、原核生物の制御配列には、プロモーター、リボソーム結合部位、および転写終結配列が含まれ得る。他の特定の実施形態では、真核生物の転写制御には、転写因子の1つまたは複数の認識部位を含むプロモーター、転写エンハンサー配列、転写終結配列、およびポリアデニル化配列が含まれ得る。一定の実施形態では、「制御配列」には、リーダー配列および／または融合パートナー配列が含まれ得る。

【0063】

本明細書で使用される用語「ポリヌクレオチド」は、少なくとも10ヌクレオチド長の一本鎖または二本鎖の核酸ポリマーを意味する。一定の実施形態では、ポリヌクレオチドを含むヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、またはいずれかの型のヌクレオチドの改変型であり得る。前記改変型には、塩基改変型、例えば、プロモウリジン、リボース改変型、例えば、アラビノシドおよび2', 3'-ジデオキシリボース、ならびにヌクレオチド間連結改変型、例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート（phosphoroanilothioate）、ホスホラニラデート（phoshoraniilate）、およびホスホラミデートが含まれる。用語「ポリヌクレオチド」は、特に、DNAの一本鎖型および二本鎖型を含む。

【0064】

本明細書で言及する用語「オリゴヌクレオチド」は、天然に存在するオリゴヌクレオチド連結および／または天然に存在しないオリゴヌクレオチド連結によって互いに連結された、天然に存在するヌクレオチドおよび改変されたヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、200ヌクレオチド以下の長さを有し、一般的には一本鎖であるメンバーを含む

ポリヌクレオチドのサブセットである。一定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、10～60ヌクレオチド長である。一定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、12、13、14、15、16、17、18、19、または20～40ヌクレオチド長である。オリゴヌクレオチドは、例えば、遺伝的変異体の構築に使用する場合、一本鎖でも二本鎖でも良い。本発明のオリゴヌクレオチドは、タンパク質コード配列に関してセンスオリゴヌクレオチドでもアンチセンスオリゴヌクレオチドでも良い。

【0065】

用語「天然に存在するヌクレオチド」は、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含む。用語「改変されたヌクレオチド」は、修飾または置換された糖基などを有するヌクレオチドを含む。用語「オリゴヌクレオチド連結」は、オリゴヌクレオチド連結、例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホラニラデート、ホスホロアミデートなどを含む。例えば、あらゆる目的に対して、開示が参考として本明細書に組み入れられる、LaPlancherら、1986、Nuc l. Acids Res.、14:9081; Stecら、1984、J. Am. Chem. Soc.、106:6077; Steinら、1988、Nuc l. Acids Res. 16:3209; Zonら、1991、Anti-Cancer Drug Design、6:539; Zonら、1991、OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH、pp. 87-108 (F. Eckstein編)、Oxford University Press、Oxford England; Stecら、米国特許第5,151,510号; UhlmannおよびPeyman、1990、Chemical Reviews 90:543を参照されたい。オリゴヌクレオチドは、そのオリゴヌクレオチドまたはそのハイブリダイゼーションの検出を可能にする検出可能な標識を含み得る。

【0066】

用語「ベクター」は、連結された別の核酸を輸送できる核酸分子を含む。ベクターの1つのタイプに「プラスミド」があり、プラスミドは、追加のDNAセグメントを連結することができる環状の二本鎖DNAループを指す。別のタイプのベクターに、ウイルスベクターがあり、このウイルスベクターでは、追加のDNAセグメントをそのウイルスゲノムに連結することができる。一定のベクターは、それらが導入された宿主細胞で自律的に複製することができる（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソード哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソード哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入に際し、その宿主細胞のゲノムに組み込まれ得、これによりその宿主ゲノムとともに複製される。さらに、一定のベクターは、作動可能に連結された遺伝子の発現を指示することができる。このようなベクターは、本明細書では、「組換え発現ベクター」（または単純に「発現ベクター」）と呼ばれる。一般に、組換えDNA技術に有用な発現ベクターは、プラスミドの形態である場合が多い。本明細書では、「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドが最も一般的に用いられるベクターの形態であるため、交換可能に使用することができる。しかしながら、本発明は、等価な機能を果たす、このような他の形態の発現ベクター、例えば、ウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス）を含むものとする。

【0067】

語句「組換え宿主細胞」（または単純に「宿主細胞」）は、組換え発現ベクターが導入された細胞を含む。このような用語は、特定の対象の細胞だけでなく、このような細胞の子孫も指すことを意図することを当業者には理解できよう。一定の改変が、変異または環境的影響のいずれかによって次世代で起こり得るため、このような子孫は、実際には、親細胞と同一ではない可能性があるが、それでも、本明細書に使用される用語「宿主細胞」の範囲内には含まれる。細菌、酵母、バキュロウイルス、および哺乳動物発現系（ならびにファージディスプレイ発現系）を含め、多種多様な宿主発現系を用いて、本発明の抗体を発現させることができる。適切な細菌発現ベクターの例は、pUC19である。抗体を

組換え的に発現させるためには、宿主細胞を、その抗体の免疫グロブリン軽鎖および重鎖をコードするDNAフラグメントを有する1つ以上の組換え発現ベクターでトランスフェクトして、その軽鎖および重鎖が、宿主細胞中で発現される、好ましくは宿主細胞が培養されている培地中に分泌されるようにし、この培地から、抗体を収集することができる。標準的な組換えDNA方法論を使用して、抗体の重鎖および軽鎖の遺伝子を得て、これらの遺伝子を組換え発現ベクター中に組み込み、次いでこのベクターを宿主細胞、例えば、Sambrookら、2001、MOLECULAR CLONING、A LABORATORY MANUAL、Cold Spring Harbor Laboratories、Ausubel, F. M. ら編、Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates、(1989)およびBossらに付与された米国特許第4,816,397号に記載されているような宿主細胞に導入する。

10

【0068】

用語「宿主細胞」は、核酸配列で形質転換された細胞、または核酸配列で形質転換することができる細胞であって、後に目的の選択された遺伝子を発現する細胞を指すために使用される。この用語には、親細胞の子孫が含まれ、この子孫は、この選択された遺伝子が存在する限り、形態学的または遺伝子構成においてもととの親と同一であっても同一でなくとも良い。

【0069】

用語「形質導入」は、一般にはファージによる、遺伝子のある細菌から別の細菌への移動を指すために使用される。「形質導入」はまた、レトロウイルスによる真核生物細胞の配列の獲得および移動も指す。

20

【0070】

用語「トランスフェクション」は、細胞による外来または外因性DNAの取り込みを指すために使用され、細胞は、外因性DNAが細胞膜の内部に導入されると、「トランスフェクトされた」ことになる。多数のトランスフェクション技術が、当技術分野で周知であり、本明細書に開示されている。例えば、Grahamら、1973、Virology 52:456; Sambrookら、2001、MOLECULAR CLONING、A LABORATORY MANUAL、Cold Spring Harbor Laboratories; Davisら、1986、BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY、Elsevier; およびChuら、1981、Gene 13:197を参照されたい。このような技術を使用して、1つ以上の外因性DNA部分を適切な宿主細胞に導入することができる。

30

【0071】

本明細書で使用される用語「形質転換」は、細胞の遺伝子的特徴における変化を指し、細胞は、新たなDNAを含むように改変されると形質転換されたことになる。例えば、細胞は、その天然の状態から遺伝子的に改変されると形質転換されたことになる。トランスフェクションまたは形質導入の後、この形質転換DNAは、細胞の染色体への物理的な組み込みによって細胞のDNAと組み換えられても良いし、または複製されることなくエピソードエレメントとして一時的に維持されても良いし、またはプラスミドとして独立して複製しても良い。細胞は、細胞分裂でDNAが複製されると安定的に形質転換されたと見なされる。

40

【0072】

生物学的物質、例えば核酸分子、ポリペプチド、宿主細胞などに関して使用される場合の用語「天然に存在する」または「天然の」は、天然で見出され、人間によって操作されていない物質を指す。同様に、本明細書で使用される「天然に存在しない」または「非天然の」は、天然で見出されない物質、または人間によって構造的に改変もしくは合成された物質を指す。

【0073】

用語「抗原」は、選択的な結合物質、例えば抗体によって結合され得、さらに動物に使

50

用してその抗原のエピトープに結合できる抗体を産生することができる分子または分子の一部を指す。抗原は、1つ以上のエピトープを有しても良い。

【0074】

用語「同一性」は、当技術分野で公知であるように、2つ以上のポリペプチド分子の配列間の関係、または2つ以上の核酸分子の配列間の関係であって、これらの配列を比較することによって決定される関係を指す。当技術分野では、「同一性」はまた、場合によっては、2つ以上のヌクレオチド配列のストリング間または2つ以上のアミノ酸配列のストリング間の一致によって決定される、核酸分子間またはポリペプチド間の配列関連性の程度を意味する。「同一性」は、特定の数学的モデルまたはコンピュータプログラム（すなわち、「アルゴリズム」）によって行われるギャップアラインメント（存在する場合）を用いて2つ以上の配列のうちの小さい方の配列間の同一の一致のパーセントを測定する。

10

【0075】

用語「類似性」は、関連性の概念に関連して当技術分野で使用されるが、「同一性」とは対照的に、「類似性」は、同一の一致および保存的置換の一致の両方を含む関連性の尺度を指す。2つのポリペプチド配列が、例えば、20個のうちの10個が同一のアミノ酸を有し、残りが全て非保存的置換であるとする、同一性パーセントおよび類似性パーセントは、両方とも50%となる。同じ例で、さらに5つの位置で保存的置換があるとする、同一性パーセントは、50%のままであるが、類似性パーセントは75%（20のうちの15）となる。したがって、保存的置換が存在する場合は、2つのポリペプチド間の類似性パーセントは、これらの2つのポリペプチド間の同一性パーセントよりも高い。

20

【0076】

関連する核酸およびポリペプチドの同一性および類似性は、公知の方法によって容易に計算することができる。このような方法には、限定されるものではないが、COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY、(Lesk, A. M. 編)、1988、Oxford University Press、New York; BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS、(Smith, D. W. 編)、1993、Academic Press、New York; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA、Part 1、(Griffin, A. M. および Griffin, H. G. 編)、1994、Humana Press、New Jersey; von Heinje, G.、SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY、1987、Academic Press; SEQUENCE ANALYSIS PRIMER、(Gribskov, M. および Devereux, J. 編)、1991、M. Stockton Press、New York; Carilloら、1988、SIAM J. Applied Math.、48:1073;ならびにDurbinら、1998、BIOLOGICAL SEQUENCE ANALYSIS、Cambridge University Pressに記載されている方法が含まれる。

30

【0077】

同一性を決定する好ましい方法は、検査される配列間で最大の一致が得られるように設計される。同一性を決定する方法は、公的に利用可能なコンピュータプログラムに記載されている。2つの配列間の同一性を決定する好ましいコンピュータプログラム法には、限定されるものではないが、GAP (Devereuxら、1984、Nuc l. Acid . Res.、12:387; Genetics Computer Group、University of Wisconsin、Madison, WI)、BLASTP、BLASTN、およびFASTA (Altschulら、1990、J. Mol. Bio l.、215:403-410)を含むGCGプログラムパッケージが含まれる。BLASTXプログラムは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) および他の供給源 (BLAST Manual、Altschulら、NCB/NLM/NIH Bethesda、MD 20894; Altschulら、1990 (前出)) から公的に入手可能である。周知のSm

40

50

with Waterman アルゴリズムも、同一性の決定に用いることができる。

【0078】

2つのアミノ酸配列を整列させるための一定のアラインメントスキームでは、2つの配列の短い領域のみの一致しか得ることができず、この短い整列された領域は、たとえ2つの完全長配列間に有意な関係が存在しなくても、極めて高い配列同一性を有し得る。したがって、一定の実施形態では、選択されたアラインメント法（GAPプログラム）によって、標的ポリペプチドの少なくとも50個の連続したアミノ酸にまたがるアラインメントが得られる。

【0079】

例えば、コンピュータアルゴリズムGAP（Genetics Computer Group、University of Wisconsin、Madison、WI）を用いて、配列同一性パーセントを決定すべき2つのポリペプチドを、これらの各アミノ酸の最適な一致のために整列させる（アルゴリズムによって決定される「一致したスパン」）。一定の実施形態では、ギャップ・オープニング・ペナルティー（これは、平均ダイアゴナル（diagonal）を3倍して計算される；「平均ダイアゴナル」は、使用される比較マトリックスのダイアゴナルの平均であり；「ダイアゴナル」は、特定の比較マトリックスによってそれぞれの完全なアミノ酸の一致に対して割り当てられるスコアまたは数値である）と、ギャップ伸長ペナルティー（通常は、ギャップ・オープニング・ペナルティーの10分の1）と、比較マトリックス、例えば、PAM250またはBLOSUM 62を、このアルゴリズムと共に使用する。一定の実施形態では、標準的な比較マトリックス（PAM 250比較マトリックスについては、Dayhoffら、1978、Atlas of Protein Sequence and Structure、5：345-352を参照されたい；BLOSUM 62比較マトリックスについてはHenikoffら、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89：10915-10919を参照されたい）も、アルゴリズムによって使用される。

【0080】

一定の実施形態では、ポリペプチド配列の比較についてのパラメーターには以下が含まれる：

アルゴリズム：Needlemanら、1970、J. Mol. Biol. 48：443-453；

比較マトリックス：Henikoffら、1992、前出によるBLOSUM 62；

ギャップペナルティー：12

ギャップ長ペナルティー：4

類似性の閾値：0

GAPプログラムは、上記のパラメーターを用いると有効であろう。一定の実施形態では、前述のパラメーターは、GAPアルゴリズムを用いたポリペプチドの比較（エンドギャップについてのペナルティーを含まない）用のデフォルトパラメーターである。

【0081】

用語「相同性」は、タンパク質の配列間または核酸の配列間の類似性の程度を指す。相同性の情報は、一定のタンパク種または核酸種の遺伝的関連性を理解するのに有用である。相同性は、配列の整列および比較によって決定することができる。典型的には、アミノ酸の相同性を決定する際には、タンパク質配列を、公知のタンパク質配列のデータベースと比較する。相同な配列は、配列のいずれかの位置で共通の機能的同一性を共有する。高度の類似性または同一性は、通常は相同性を示唆するが、低度の類似性または同一性は、必ずしも相同性の欠如を示すものではない。

【0082】

いくつかの手法を用いて、ある配列のアミノ酸を別の配列のアミノ酸と比較して相同性を決定することができる。一般に、この手法は、以下の2つに分類される：（1）物理的特徴、例えば、極性、荷電およびファン・デル・ワールス容積を比較して、類似性マトリックスを作成する；ならびに（2）公知の相同なタンパク質からの多くのタンパク質配列

の観察に基づいて、任意の他のアミノ酸によって配列中のアミノ酸の考えられる置換を比較して、Point Accepted Mutation Matrix (PAM) を作成する。

【0083】

同一性のパーセンテージはまた、デフォルトパラメーター（例えば、GAPペナルティ-5、GAPオープニングペナルティ-15、GAP伸長ペナルティ-6.6）を用いて、ベクターNTIスイート9.0.0ソフトウェアパッケージのモジュールとして、プログラムニードル（EMBOSSパッケージ）もしくはストレッチャー（EMBOSSパッケージ）またはプログラム整列Xを使用することによって計算することもできる。

【0084】

本明細書では、20個の従来のアミノ酸およびその省略形は、従来の使用法にしたがう。あらゆる目的に対して参考として本明細書に組み入れられる、IMMUNOLOGY-A SYNTHESIS、第2版（E. S. GolubおよびD. R. Gren編）、Sinauer Associates: Sunderland, MA、1991を参照されたい。20個の従来のアミノ酸の立体異性体（例えば、Dアミノ酸）；非天然のアミノ酸、例えば、 α -、 α -二置換アミノ酸、N-アルキルアミノ酸、乳酸、および他の従来とは異なるアミノ酸もまた、本発明のポリペプチドの適切な成分であり得る。従来とは異なるアミノ酸の例には、以下が含まれる：4-ヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタメート、 ϵ -N, N, N-トリメチルリジン、 ϵ -N-アセチルリジン、O-ホスホセリン、N-アセチルセリン、N-ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリジン、 σ -N-メチルアルギニン、ならびに他の同様のアミノ酸およびイミノ酸（例えば、4-ヒドロキシプロリン）。本明細書で使用されるポリペプチドの表記において、標準的な使用法および慣習にしたがって、左側の方向がアミノ末端方向であり、右側の方向がカルボキシ末端方向である。

【0085】

天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいたクラスに分けることができる：

- (1) 疎水性：Nor、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Phe、Trp、Tyr、Pro；
- (2) 極性親水性；Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Lys、Ser、Thr；
- (3) 脂肪族：Ala、Gly、Ile、Leu、Val、Pro；
- (4) 脂肪族疎水性：Ala、Ile、Leu、Val、Pro；
- (5) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (6) 酸性：Asp、Glu；
- (7) 塩基性：His、Lys、Arg；
- (8) 鎖の向きに影響を与える残基：Gly、Pro；
- (9) 芳香族：His、Trp、Tyr、Phe；および
- (10) 芳香族疎水性：Phe、Trp、Tyr。

【0086】

保存的アミノ酸置換には、これらのクラスのあるクラスのメンバーと同じクラスの別のメンバーとの交換が含まれ得る。保存的アミノ酸置換には、天然には存在しないアミノ酸残基が含まれ得、このようなアミノ酸残基は、典型的には、生物系における合成ではなく、化学的なペプチド合成によって組み込まれる。このようなアミノ酸残基には、ペプチド模倣物およびアミノ酸部分の他の反転型 (reversed) または逆位型 (inverted) が含まれる。

【0087】

非保存的置換には、これらのクラスのあるクラスのメンバーと別のクラスのメンバーとの交換が含まれ得る。このような置換残基は、非ヒト抗体と相同であるヒト抗体の領域に導入しても良いし、または分子の非相同領域に導入しても良い。

【0088】

このような変化の形成では、一定の実施形態によると、アミノ酸の疎水性親水性指標 (hydrophobic index) を考慮することができる。各アミノ酸には、その疎水性および荷電の特徴に基づいて疎水性親水性指標が割り当てられている。この疎水性親水性指標は、イソロイシン (+4.5) ; バリン (+4.2) ; ロイシン (+3.8) ; フェニルアラニン (+2.8) ; システイン/シスチン (+2.5) ; メチオニン (+1.9) ; アラニン (+1.8) ; グリシン (-0.4) ; トレオニン (-0.7) ; セリン (-0.8) ; トリプトファン (-0.9) ; チロシン (-1.3) ; プロリン (-1.6) ; ヒスチジン (-3.2) ; グルタミン酸 (-3.5) ; グルタミン (-3.5) ; アスパラギン酸 (-3.5) ; アスパラギン (-3.5) ; リジン (-3.9) ; およびアルギニン (-4.5) である。

10

【0089】

タンパク質に対する相互作用的な生物学的機能の付与におけるアミノ酸の疎水性親水性指標の重要性は、当技術分野で理解されている (例えば、Kyteら、1982、J. Mol. Biol. 157:105-132を参照されたい)。一定のアミノ酸は、類似の疎水性親水性指標またはスコアを有する他のアミノ酸によって置換することができ、置換されても類似の生物学的活性を維持することは公知である。疎水性親水性指標に基づいた変化の形成では、一定の実施形態では、疎水性親水性指標が±2の範囲内であるアミノ酸の置換が含まれる。一定の実施形態では、疎水性親水性指標が±1の範囲内であるアミノ酸の置換が含まれ、一定の実施形態では、疎水性親水性指標が±0.5の範囲内である置換が含まれる。

20

【0090】

特に、同様のアミノ酸の置換によって作製される生物学的に機能的なタンパク質またはペプチドが、本明細書に開示されているように免疫学的な実施形態で使用されることが意図される場合、同様のアミノ酸の置換を親水性に基づいて効果的に行うことができることも当技術分野で理解されている。一定の実施形態では、あるタンパク質の最大の局所平均親水性 (その隣接するアミノ酸の親水性によって支配される) は、このタンパク質の免疫原性および抗原性、すなわちそのタンパク質の生物学的特性に相関する。

【0091】

以下の親水性値が、これらのアミノ酸残基に割り当てられている: アルギニン (+3.0) ; リジン (+3.0) ; アスパラギン酸 (+3.0±1) ; グルタミン酸 (+3.0±1) ; セリン (+0.3) ; アスパラギン (+0.2) ; グルタミン (+0.2) ; グリシン (0) ; トレオニン (-0.4) ; プロリン (-0.5±1) ; アラニン (-0.5) ; ヒスチジン (-0.5) ; システイン (-1.0) ; メチオニン (-1.3) ; バリン (-1.5) ; ロイシン (-1.8) ; イソロイシン (-1.8) ; チロシン (-2.3) ; フェニルアラニン (-2.5) 、およびトリプトファン (-3.4) 。同様の親水性値に基づいた変化の形成では、一定の実施形態では、親水性値が±2の範囲内であるアミノ酸の置換が含まれ、一定の実施形態では、親水性値が±1の範囲内であるアミノ酸の置換が含まれ、一定の実施形態では、親水性値が±0.5の範囲内であるアミノ酸の置換が含まれる。また、親水性に基づいて一次アミノ酸配列からエピトープを同定することもできる。これらの領域はまた、「エピトープコア領域」とも呼ばれる。

30

40

【0092】

例示的なアミノ酸置換を表1に示す。

【0093】

【表 1】

表1

アミノ酸置換

もとの残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 ジアミノ酪酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

当業者は、周知の技術を用いて本明細書に記載のポリペプチドの適切な改変体を決定することができる。一定の実施形態では、当業者は、活性にとって重要であるとは思われない領域を標的とすることによって活性を損なわずに変化させることができる分子の適切な領域を同定することができる。他の実施形態では、当業者は、同様のポリペプチド間で保存されている分子の残基および部分を同定することができる。さらなる実施形態では、生物学的活性または構造にとって重要であり得る領域でさえも、生物学的活性を損なうことなく、またはポリペプチド構造に有害な影響を及ぼすこともなく、保存的アミノ酸置換に供することができる。

【0094】

加えて、当業者は、活性または構造にとって重要な類似のポリペプチドにおける残基を同定する構造-機能の研究を検討することができる。このような比較を考慮して、当業者は、類似したタンパク質の活性または構造にとって重要なアミノ酸残基に相当する、あるタンパク質のアミノ酸残基の重要性を推測することができる。当業者は、このように推測された重要なアミノ酸残基に対して、化学的に類似したアミノ酸置換を選択することができる。

【0095】

当業者はまた、三次元構造およびアミノ酸配列を、類似したポリペプチドにおけるその構造に関して分析することができる。このような情報を考慮して、当業者は、抗体のアミノ酸残基のアラインメントをその三次元構造に対して推測することができる。一定の実施形態では、当業者は、タンパク質の表面に存在すると推定されるアミノ酸残基は、他の分子との重要な相互作用に関与し得るため、このような残基に対して大幅な変化を形成しないように選択することができる。さらに、当業者は、それぞれの望ましいアミノ酸残基に単一のアミノ酸置換を含む試験改変体を作製することができる。次いで、この改変体を、当業者に公知の活性アッセイを用いてスクリーニングすることができる。このような改変体を用いて、適切な改変体についての情報を集めることができる。例えば、特定のアミノ酸残基に対する変化が、活性の消失、望ましくない減少、または不適切な活性をもたらす

ことが発見された場合は、このような変化を有する改変体を回避することができる。言い換えれば、このようなルーチンの実験から収集された情報に基づいて、当業者は、さらなる置換が、単独で、または他の変異と共に、回避されるべきアミノ酸を容易に決定することができる。

【0096】

多数の科学出版物が、二次構造の予測に力を注いでいる。Moult、1996、Curr. Op. in Biotech. 7: 422-427; Chouら、1974、Biochemistry 13: 222-245; Chouら、1974、Biochemistry 113: 211-222; Chouら、1978、Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 47: 45-148; Chouら、1979、Ann. Rev. Biochem. 47: 251-276; および Chouら、1979、Biophys. J. 26: 367-384を参照されたい。さらに、コンピュータプログラムが、現在、二次構造の予測の支援に利用可能である。二次構造を予測する1つの方法は、相同性モデリングに基づいている。例えば、30%よりも高い配列同一性または40%よりも高い配列類似性を有する2つのポリペプチドまたはタンパク質は、類似の構造的トポロジーを有する場合が多い。タンパク質構造データベース(PDB)の近年の発達により、ポリペプチドの構造またはタンパク質の構造内での可能な折り畳み回数を含め、二次構造の予測可能性が向上した。Holmら、1999、Nucl. Acid. Res. 27: 244-247を参照されたい。所定のポリペプチドまたはタンパク質には限られた数の折り畳みが存在すること、ならびに構造の臨界数(critical number)が判明すれば、構造の予測が大幅に正確になること、が示唆されている(Brennerら、1997、Curr. Op. Struct. Biol. 7: 369-376)。

【0097】

二次構造を予測するさらなる方法には、「スレッディング(threading)」(Jones、1997、Curr. Opin. Struct. Biol. 7: 377-87; Sipplら、1996、Structure 4: 15-19)、「プロフィール分析」(Bowieら、1991、Science 253: 164-170; Gribskovら、1990、Meth. Enzym. 183: 146-159; Gribskovら、1987、Proc. Nat. Acad. Sci. 84: 4355-4358)、および「進化的連結(evolutionary linkage)」(Holm、1999、前出; および Brenner、1997、前出を参照されたい)が含まれる。

【0098】

一定の実施形態では、抗体改変体には、グリコシル化部位の数および/または種類が、親ポリペプチドのアミノ酸配列と比較して変更されているグリコシル化改変体が含まれる。一定の実施形態では、タンパク質改変体は、天然タンパク質よりも多いかまたは少ない数のN連結グリコシル化部位を含む。N連結グリコシル化部位は、配列: Asn-X-SerまたはAsn-X-Thrによって特徴付けられ、このXとしたアミノ酸残基は、プロリン以外のあらゆるアミノ酸残基とすることができる。この配列を形成するためのアミノ酸残基の置換により、N連結炭水化物鎖の付加のための潜在的な新たな部位が得られる。あるいは、この配列を除去する置換により、既存のN連結炭水化物鎖を除去する。また、1つ以上のN連結グリコシル化部位(典型的には天然に存在する部位)が除去され、1つ以上の新たなN連結部位が形成される、N連結炭水化物鎖の再配置も提供される。さらなる好ましい抗体改変体には、親アミノ酸配列と比較して、1つ以上のシステイン残基が欠失したか、または別のアミノ酸(例えば、セリン)で置換されたシステイン改変体が含まれる。システイン改変体は、不溶性封入体の単離の後などに、生物学的に活性なコンフォメーションに抗体を再び折り畳まなければならない場合に有用であろう。システイン改変体は、一般に、天然タンパク質よりも少ないシステイン残基を有し、典型的には、不對システインによる相互作用を最小化するために偶数のシステイン残基を有する。

【0099】

さらなる実施形態では、抗体改変体には、改変Fcフラグメントまたは改変重鎖定常領域を含む抗体が含まれ得る。「結晶化するフラグメント」を表すFcフラグメント、または重鎖定常領域は、変異によって改変されて抗体に変更された結合特徴を付与することができる。例えば、全てが参考として本明細書に組み入れられる、BurtonおよびWof、1992、Advances in Immunology 51:1-84; RavetchおよびBolland、2001、Annu. Rev. Immunol. 19:275-90; Shieldsら、2001、Journal of Biol. Chem 276:6591-6604; TellemanおよびJungmans、2000、Immunology 100:245-251; Medesanら、1998、Eur. J. Immunol. 28:2092-2100を参照されたい。このような変異は、置換、付加、欠失またはそれらの任意の組み合わせを含み得、典型的には、本明細書に記載の方法および当技術分野で公知の方法（例えば、参考として本明細書に組み入れられる、Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第3版、2001、Cold Spring Harbor, N. Y. ならびにBergerおよびKimmel、METHODS IN ENZYMOLOGY、第152巻、Guide to Molecular Cloning Techniques、1987、Academic Press, Inc.、San Diego, CAを参照されたい）にしたがって1つ以上の変異原性オリゴヌクレオチド（複数可）を用いた部位特異的変異誘発によって形成される。

10

【0100】

20

一定の実施形態によると、アミノ酸置換は：（1）タンパク質分解に対する感受性を低減する、（2）酸化に対する感受性を低減する、（3）タンパク質複合体を形成するために結合親和性を変更する、（4）結合親和性を変更する、および／または（5）このようなポリペプチドに他の物理化学的特性または機能的特性を付与するかまたはこれらの特性を変更する、アミノ酸置換である。一定の実施形態によると、単一または複数のアミノ酸置換（一定の実施形態では、保存的アミノ酸置換）は、天然に存在する配列（一定の実施形態では、分子間接触を形成するドメイン（複数可）外のポリペプチドの一部）で行うことができる。好ましい実施形態では、保存的アミノ酸置換は、典型的には、親配列の構造的特徴を実質的に変化させない（例えば、置換アミノ酸は、親配列に存在するヘリックスを破壊する傾向も、親配列を特徴付ける他のタイプの二次構造を破壊する傾向も有すべきではない）。当技術分野で認識されているポリペプチドの二次構造および三次構造の例は、それぞれが参考として本明細書に組み入れられる、PROTEINS, STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES (Creighton編、1984、W. H. Freeman and Company、New York); INTRODUCTION TO PROTEIN STRUCTURE (C. BrandenおよびJ. Tooze編)、1991、Garland Publishing、New York、N. Y. ; ならびにThorntonら、1991、Nature 354:105に記載されている。

30

【0101】

ペプチドアナログは、鑄型ペプチドの特性と類似の特性を有する非ペプチド薬として製薬産業で一般的に使用されている。これらのタイプの非ペプチド化合物は、「ペプチド模倣物 (peptide mimetics)」または「ペプチド模倣物 (peptide mimetics)」と呼ばれている。あらゆる目的に対して参考として本明細書に組み入れられる、Fauchere、1986、Adv. Drug Res. 15:29; VeberおよびFreidinger、1985、TINS p. 392; ならびにEvansら、1987、J. Med. Chem. 30:1229を参照されたい。このような化合物は、多くの場合、コンピュータ分子モデリングの支援によって開発される。治療上有用なペプチドに構造的に類似したペプチド模倣物を用いて、同様の治療効果または予防効果を得ることができる。一般に、ペプチド模倣物は、パラダイムポリペプチド（すなわち、生化学的な特性または薬理学的な活性を有するポリペプチド）、例えばヒト抗体に構

40

50

造的に類似しているが、当技術分野で周知の方法によって、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ （シスおよびトランス）、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 、および $-\text{CH}_2\text{SO}-$ から選択される結合により任意選択で置換される1つ以上のペプチド結合を有する。コンセンサス配列の1つ以上のアミノ酸の、同じタイプのDアミノ酸での系統的置換（例えば、L-リジンの代わりに、D-リジン）を一定の実施形態で用いて、より安定したペプチドを作製することができる。加えて、コンセンサス配列または実質的に同一のコンセンサス配列の変更形態を含む拘束ペプチド（*constrained peptide*）は、当技術分野で公知の方法（あらゆる目的に対して参考として本明細書に組み入れられる、RizooおよびGierasch、1992、Ann. Rev. Biochem. 61:387）；例えば、ペプチドを環化する分子内ジスルフィド架橋を形成し得る内部システイン残基を付加することによって作製することができる。

10

【0102】

「抗体」または「抗体ペプチド（複数可）」は、インタクトな抗体、または特定の結合についてそのインタクトな抗体と競合するその結合フラグメントを指す。一定の実施形態では、結合フラグメントは、組換えDNA技術によって作製される。さらなる実施形態では、結合フラグメントは、インタクトな抗体の酵素的切断または化学的切断によって作製される。結合フラグメントには、限定されるものではないが、 $\text{F}(\text{ab})$ 、 $\text{F}(\text{ab}')$ 、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 、 Fv 、および単鎖抗体が含まれる。

【0103】

用語「重鎖」は、NGFに対する特異性を付与するのに十分な可変領域配列を有する任意の免疫グロブリンポリペプチドを含む。用語「軽鎖」は、NGFに対する特異性を付与するのに十分な可変領域配列を有する任意の免疫グロブリンポリペプチドを含む。完全長重鎖は、可変領域ドメイン、 V_H ならびに3つの定常領域ドメイン、 $\text{C}_\text{H}1$ 、 $\text{C}_\text{H}2$ および $\text{C}_\text{H}3$ を含む。この V_H ドメインは、ポリペプチドのアミノ末端にあり、 $\text{C}_\text{H}3$ ドメインは、カルボキシ末端にある。本明細書で使用される用語「重鎖」は、完全長重鎖およびそのフラグメントを包含する。完全長軽鎖は、可変領域ドメイン V_L 、および定常領域ドメイン C_L を含む。重鎖と同様に、軽鎖の可変領域ドメインは、ポリペプチドのアミノ末端にある。本明細書で使用される用語「軽鎖」は、完全長軽鎖およびそのフラグメントを含む。 $\text{F}(\text{ab})$ フラグメントは、1つの軽鎖ならびに1つの重鎖の $\text{C}_\text{H}1$ および可変領域を含む。 $\text{F}(\text{ab})$ 分子の重鎖は、別の重鎖分子とジスルフィド結合を形成できない。 $\text{F}(\text{ab}')$ フラグメントは、1つの軽鎖および1つの重鎖を含み、この重鎖は、 $\text{C}_\text{H}1$ ドメインと $\text{C}_\text{H}2$ ドメインとの間にさらに定常領域を含むため、鎖間ジスルフィド結合を2つの重鎖間で形成して $\text{F}(\text{ab}')_2$ 分子を形成することができる。 Fv 領域は、重鎖および軽鎖の両方に由来の可変領域を含むが、定常領域は含まない。単鎖抗体は、 Fv 分子であり、重鎖可変領域と軽鎖可変領域とがフレキシブルリンカーによって結合されて単一ポリペプチド鎖を形成し、この単一ポリペプチド鎖が抗原結合領域を形成している。単鎖抗体は、国際特許出願公開第88/01649号ならびに米国特許第4,946,778号および同第5,260,203号に詳細に説明されている。

20

30

【0104】

特定の実施形態では、「多特異的」抗体または「多機能性」抗体以外の二価抗体は、同一の抗原特異性を有する結合部位を含むと考えられている。

40

【0105】

本発明にしたがった抗体結合および抗体特異性の評価では、抗体は、過剰な抗体がレセプターに結合するリガンドの量を少なくとも約20%、40%、60%、80%、85%、またはそれ以上（とりわけ、*in vitro*競合結合アッセイを用いて測定した場合）低下させた場合、リガンドのレセプターへの付着を実質的に阻害する。

【0106】

「中和抗体」は、この中和抗体が結合する標的抗原のエフェクター機能を阻止するか、または実質的に低下させることができる抗体分子を意味する。したがって、「中和」抗N

50

G F 抗体は、エフェクター機能、例えば、N G F のレセプター結合および／または細胞応答の誘発を阻止するか、または実質的に低下させることができる。「実質的に低下させる」は、標的抗原（例えば、ヒト N G F）のエフェクター機能の少なくとも約 60 %、好ましくは少なくとも約 70 %、より好ましくは少なくとも約 75 %、なおさらに好ましくは少なくとも約 80 %、なおより好ましくは少なくとも約 85 %、最も好ましくは少なくとも約 90 % の低下を意味するものとする。

【0107】

用語「エピトープ」は、免疫グロブリンまたは T 細胞レセプターに特異的に結合することができる任意の決定基、好ましくはポリペプチド決定基を含む。一定の実施形態では、エピトープ決定基は、分子の化学的に活性なグループ（grouping）、例えば、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル基、またはスルホニル基を含み、一定の実施形態では、特定の三次元構造の特徴および／または特定の荷電の特徴を有し得る。エピトープは、抗体によって結合される抗原の領域である。一定の実施形態では、抗体は、タンパク質および／または高分子の複合混合物中でその標的抗原を優先的に認識する場合、抗原に特異的に結合すると言われている。好ましい実施形態では、抗体は、平衡解離定数が 10^{-8} M 以下である場合、より好ましくは平衡解離定数が 10^{-9} M 以下である場合、最も好ましくは平衡解離定数が 10^{-10} M 以下である場合に、抗原に特異的に結合すると言われている。

10

【0108】

2 つの抗体が同一かまたは立体的に重複するエピトープを認識した場合、ある抗体は、参照抗体と「本質的に同じエピトープ」に結合する。2 つの抗体が同一かまたは立体的に重複するエピトープに結合するか否かを決定するために最も広く使用されている迅速な方法は、標識抗原または標識抗体のいずれかをを用いて様々な形式で構成することができる競合アッセイである。通常は、抗原が支持層上に固定され、未標識抗体が標識抗体の結合を阻止する能力が、放射性標識または酵素標識を用いて測定される。

20

【0109】

本明細書で使用される用語「物質」は、化合物、化合物の混合物、生物学的高分子、または生物学的物質から作製された抽出物を意味する。

【0110】

本明細書で使用される用語「標識」または「標識された」は、例えば、放射線標識されたアミノ酸の組み込みによる検出マーカーの組み込み、または標識されたアビジン（例えば、検出マーカー、例えば、光学法または比色定量法によって検出することができる蛍光マーカー、化学発光マーカー、または酵素活性を含むのが好ましいストレプトアビジン）によって検出することができるビオチン部分のポリペプチドへの付着を指す。一定の実施形態では、この標識は、治療的であり得る。ポリペプチドおよび糖タンパク質を標識する様々な方法は、当技術分野で公知であり、本明細書に開示された方法で有利に使用することができる。ポリペプチド用の標識の例には、限定されるものではないが、放射性同位体または放射性核種（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I ）、蛍光標識（例えば、フルオレセインイソチオシアネートすなわち FITC、ローダミン、またはランタニド蛍光体）、酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 β ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光標識、ハプテン標識、例えば、ビオチニル基、および二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、またはエピトープタグ）が含まれる。一定の実施形態では、標識は、様々な長さのスペーサーアーム（例えば、 $(\text{CH}_2)_n$ 、この n は約 20 未満）によって取り付けられて潜在的な立体障害を低減する。

30

40

【0111】

本明細書で使用される用語「生物学的サンプル」は、限定されるものではないが、生物（living thing）または死んだ生物（formerly living thing）由来の任意の量の材料を含む。このような生物には、限定されるものではない

50

が、ヒト、マウス、サル、ラット、ウサギ、および他の動物が含まれる。このような材料には、限定されるものではないが、血液、血清、尿、細胞、器官、組織、骨、骨髄、リンパ節、および皮膚が含まれる。

【0112】

本明細書で使用される用語「薬学的物質または薬物」は、患者に適切に投与されると、望ましい治療効果を誘導し得る化合物または組成物を指す。本発明の抗体の1つまたは複数を含む薬学的組成物に関しての表現「薬学的有効量」は、本発明によると、外部刺激に対する感受性閾値の低下を、考慮される患者で無効にすることができ、健常な被験体で観察される閾値に相当するレベルまでこの感受性閾値を回復させる前記薬学的組成物の量を意味すると理解される。

10

【0113】

「障害」とは、本発明による処置から恩恵を受け得るあらゆる状態のことである。「障害」および「状態」は、本明細書では交換可能に使用され、哺乳動物を問題の障害に罹患させやすくする病理的状态を含め、慢性および急性のNGF媒介性障害またはNGF媒介性疾患を含む。

【0114】

用語「NGF媒介性疾患」および「NGF媒介性状態」は、NGFのレベルの上昇またはNGFに対する感受性の上昇に関連したあらゆる医学的状态または障害を含み、このような医学的状态または障害には、限定されるものではないが、急性疼痛、歯痛、外傷による疼痛、術後疼痛、切断もしくは膿瘍による疼痛、カウザルギー、脱髄疾患、三叉神経痛、がん、慢性アルコール中毒、脳卒中、視床痛症候群、糖尿病、後天性免疫不全症候群（「AIDS」）、毒素、化学療法、一般的な頭痛、片頭痛、群発性頭痛、混合血管症候群もしくは非血管症候群、緊張性頭痛、一般的な炎症、関節炎、リウマチ病、狼瘡、変形性関節症、炎症性腸障害、過敏性腸症候群、炎症性眼障害、炎症性もしくは不安定膀胱障害、乾癬、炎症性成分による皮膚病訴、日焼け、心臓炎、皮膚炎、筋炎、神経炎、膠原血管病、慢性炎症状態、炎症性疼痛ならびにこれに関連した痛覚過敏および異痛、神経障害疼痛ならびにこれに関連した痛覚過敏および異痛、糖尿病性神経障害性疼痛、カウザルギー、交感神経によって維持される疼痛、求心路遮断症候群、喘息、上皮組織の損傷もしくは機能不全、単純ヘルペス、呼吸領域、尿生殖器領域、胃腸領域、もしくは血管領域における内臓運動の不調、創傷、熱傷、アレルギー性皮膚反応、そう痒、白斑、一般的な胃腸障害、大腸炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、血管運動神経性鼻炎もしくはアレルギー性鼻炎、または気管支障害、月経困難症、消化不良、胃食道逆流、腭炎、および内臓痛が含まれる。

20

30

【0115】

本明細書で使用される用語「有効量」および「治療有効量」は、ビヒクル組成物または薬学的組成物（1つ以上の抗ヒトNGFヒト抗体を含む）に関して使用される場合、望ましい結果（すなわち、本発明のビヒクルまたは抗ヒトNGFヒト抗体での治療では、望ましい効果は、例えば、炎症および／または疼痛の望ましい軽減である）を得るのに十分な量または用量、またはNGFの1つ以上の生物学的活性のレベルの観察可能な低下を支持するのに十分な量または用量を指す。より具体的には、治療有効量とは、物質を用いて *in vivo* で処置される被験体において、問題の状態、例えば、炎症または疼痛に関連した臨床的に定義される病理学的プロセスの1つ以上を一定期間にわたって阻害するのに十分な抗ヒトNGFヒト抗体（複数可）の量のことである。本発明では、抗NGF抗体の「有効量」は、任意の医学的疼痛状態に関連した疼痛の知覚を防止、停止、制御、または軽減することができる。本発明の方法では、用語「制御」およびその文法上の変更形態を、望ましくない事象、例えば、疼痛の防止、部分的もしくは完全な阻害、軽減、遅延、または減退を指すために使用する。有効量は、選択される特定のビヒクルまたは抗NGFヒト抗体（複数可）によって異なり得、かつ処置されるべき被験体に関連した様々な因子および状態、ならびに障害の重篤度によっても異なる。例えば、ビヒクルまたは抗ヒトNGFヒト抗体（複数可）が *in vivo* で投与される場合、因子、例えば、患者の年齢、体重、および健康状態、ならびに前臨床動物研究で得られた用量応答曲線および毒性デー

40

50

タが考慮すべきものに含まれる。この物質が、*in vitro*で細胞と接触する場合は、当業者は、取り込み、半減期、用量、毒性などのパラメーターを評価するために、様々な前臨床インビトロ研究をデザインすることもできる。所定の物質の有効量または治療有効量の決定は、十分に当業者の能力の範囲内である。

【0116】

本明細書で使用される用語「神経成長因子」および「NGF」は、配列番号30に示されている、組換えヒトNGF1-120を含む、全ての哺乳動物種の天然配列NGFと定義される。

【0117】

本明細書で使用される「実質的に純粋な」または「実質的に精製された」は、主な種として存在している化合物または種（すなわち、モル基準で、上記化合物または種が、この組成物中のあらゆる他の個々の種よりも多く存在すること）を意味する。一定の実施形態では、実質的に精製された画分は、この種が存在する全ての高分子種の少なくとも約50パーセント（モル基準で）を構成する、組成物である。一定の実施形態では、実質的に純粋な組成物では、その組成物中に存在する全ての高分子種の約80%、85%、90%、95%、または99%よりも多くを構成する。一定の実施形態では、この種は、本質的に均一まで精製され（混入種は、従来の検出法ではこの組成物中で検出することができない）、この組成物は、本質的に単一の高分子種からなる。

【0118】

用語「患者」は、ヒトおよび動物の被験体を含む。

【0119】

「処置」または「処置する」は、治療的処置および予防または防止手段の両方を指す。処置を必要とする被験体には、既に障害を有する被験体の他、障害を有する傾向にある被験体、または障害が防止されるべき被験体が含まれる。

【0120】

文脈で必要ない限り、単数形の用語は、複数形を包含し、複数形の用語は、単数形を包含する。

【0121】

本発明の一定の実施形態によると、NGFに対する抗体は、限定されるものではないが、上述のものを含め、神経障害性および炎症性の疼痛、ならびにNGF媒介性疾患を処置するために使用することができる。

【0122】

本発明の一態様では、ヒトNGFに対して惹起され、かつヒトNGFへの結合に対する生物学および免疫学的特異性を有する完全ヒトモノクローナル抗体が提供される。別の態様では、本発明は、重鎖および軽鎖免疫グロブリン分子のアミノ酸配列、特にその可変領域に相当する配列をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。本発明のこの態様の特定の実施形態は、本発明によって提供される重鎖および軽鎖の相補性決定領域（CDR）、特にCDR1～CDR3に相当する配列である。なお別の態様では、本発明は、免疫グロブリン分子および抗体、好ましくは本発明のモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ細胞および細胞系を提供する。本発明はまた、生物学および免疫学的に精製された抗体の調製物、好ましくはヒトNGFに対して惹起されて、ヒトNGFへの結合について生物学および免疫学的特異性を有するモノクローナル抗体の調製物を提供する。

【0123】

酵母人工染色体（YAC）においてメガベースサイズのヒト遺伝子座をクローン化および再構築して、マウス生殖系列にそれらを導入する能力により、非常に大きい、すなわち大まかにマッピングされた遺伝子座の機能的成分を解明し、ヒト疾患の有用なモデルを製作する、有利な手法がもたらされる。さらに、マウス遺伝子座のヒト等価物での置換へのこのような技術の利用により、発生中のヒト遺伝子産物の発現および調節、他の系とのこれらの情報伝達、ならびに疾患誘導および進行におけるそれらの関与に対するユニークな

洞察が得られる。

【0124】

このような戦略の重要な実際の適用は、マウス体液性免疫系の「ヒト化」である。内因性 I g 遺伝子が不活化されているマウスへのヒト免疫グロブリン (I g) 遺伝子座の導入により、抗体のプログラムされた発現およびアッセブリの基礎となる機構、ならびに B 細胞発生におけるその役割を研究する機会が得られる。さらに、このような戦略により、完全ヒトモノクローナル抗体 (M A b) の供給源が提供される。

【0125】

用語「ヒト抗体」は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に実質的に相当する可変領域および定常領域を有する抗体を含む。一定の実施形態では、ヒト抗体は、限定されるものではないが、げっ歯類、例えば、マウスおよびラット、ならびにウサギ目の動物、例えば、ウサギを含む非ヒト哺乳動物で産生される。一定の実施形態では、ヒト抗体は、ハイブリドーマ細胞で産生される。一定の実施形態では、ヒト抗体は、組換え的に産生される。

【0126】

抗体についての用語「組換え体」は、組換え手段によって調製、発現、作製、または単離される抗体を含む。代表的な例には、宿主細胞にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを用いて発現される抗体、組換え体から単離された抗体、コンビナトリアルヒト抗体ライブラリー、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックである動物（例えば、マウス）から単離された抗体（例えば、Taylor, L. D. ら、Nuc l. A c c i d s. R e s. 20: 6287-6295、(1992) を参照されたい）；または他の DNA 配列へのヒト免疫グロブリン遺伝子配列のスプライシングを含む任意の方法によって、調製、発現、作製、または単離された抗体が含まれる。このような組換えヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する。

【0127】

ヒト抗体は、ヒトの治療での使用において、非ヒト抗体およびキメラ抗体よりも優れた少なくとも3つの利点を有する：

(1) 抗体のエフェクター部分がヒトであるため、ヒト抗体は、ヒト免疫系の他の部分と良好に相互作用し得る（例えば、補体依存性細胞毒性 (C D C) または抗体依存性細胞毒性 (A D C C) によって標的細胞をより効率的に破壊する）；

(2) ヒト免疫系は、ヒト抗体を外来物として認識しないはずであり、したがってこのような注入された抗体に対する抗体応答は、完全に外来性の非ヒト抗体または部分的に外来性のキメラ抗体に対してよりも少ないはずである；

(3) 注入された非ヒト抗体は、ヒトの循環での半減期がヒト抗体の半減期よりもかなり短いことが報告されている。注入されたヒト抗体は、天然に存在するヒト抗体と本質的に同一の半減期を有し、より少ない用量を低い頻度で与えることが可能となる。

【0128】

したがって、完全ヒト抗体は、マウスまたはマウス由来 M A b に固有の免疫原性およびアレルギー性の応答を最小限にし、これにより投与される抗体の効力および安全性を高めることが期待されている。したがって、本発明の完全ヒト抗体は、抗体の反復投与を必要とする、慢性および再発性の疼痛の処置に使用することができる。したがって、本発明の抗 N G F 抗体の1つの特定の利点は、この抗体が完全ヒト抗体であり、ヒト抗マウス抗体または他の前述の非ヒト種由来の不完全ヒト抗体に一般に関連する有害反応を最小限にしながら、患者に非急性的に投与できるということである。

【0129】

当業者であれば、ヒト I g 遺伝子座の大きいフラグメントを用いてマウス抗体を産生しないマウス株を操作することができ、このようなマウスは、マウス抗体の非存在下でヒト抗体を産生する。大きいヒト I g フラグメントは、大きな可変遺伝子多様性、ならびに抗体の産生および発現の適切な調節を保存し得る。抗体の多様化および選択ならびにヒトタンパク質に対する免疫学的寛容の欠如についてのマウス細胞機構を利用することにより、これらのマウス株で再現されるヒト抗体レパートリーが、ヒト抗原を含む目的の任意の抗

原に対して高い親和性抗体をもたらす。ハイブリドーマ技術を用いて、望ましい特異性を有する抗原特異的ヒトMAbを作製して選択することができる。

【0130】

内因性免疫グロブリンを産生せず、免疫化に際してヒト抗体の完全レパートリーを産生することができるトランスジェニック動物（例えば、マウス）を利用することができる。このような生殖系列変異マウスにおけるヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイの移動により、抗原チャレンジに際してヒト抗体が産生される（例えば、Jakobovitsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551-2555 (1993); Jakobovitsら、Nature, 362:255-258、(1993); Bruggemannら、Year in Immun., 7:33 (1993); Nature 148:1547-1553 (1994)、Nature Biotechnology 14:826 (1996); Gross, J. A. ら、Nature, 404:995-999 (2000); ならびに米国特許第5, 877, 397号、同第5, 874, 299号、同第5, 814, 318号、同第5, 789, 650号、同第5, 770, 429号、同第5, 661, 016号、同第5, 633, 425号、同第5, 625, 126号、同第5, 569, 825号、および同第5, 545, 806号（あらゆる目的に対して、それぞれが参考として、その全容が本明細書に組み入れられる）を参照されたい）。ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーで作製することもできる（HoogenboomおよびWinter、J. Mol. Biol., 227:381 (1992); Marksら、J. Mol. Biol. 222:581 (1991)）。ColeらおよびBoernerらの技術も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用可能である（Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) および Boernerら、J. Immunol., 147 (1):86-95 (1991)）。

【0131】

組換えヒト抗体はまた、in vitro変異誘発（または、ヒトIg配列についてトランスジェニックである動物を用いる場合は、in vivo体細胞変異）に供され得るため、組換え抗体のVHおよびVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列のVHおよびVL配列に関連するアミノ酸配列に由来するが、in vivoのヒト抗体の生殖系列レパートリー内に天然では存在しない場合がある配列である。

【0132】

一定の実施形態では、当業者であれば、ヒト可変領域（複数可）と共に、ヒト以外の種に由来する定常領域をこのようなマウスに使用してキメラ抗体を作製することができる。

【0133】

（天然に存在する抗体構造）

天然に存在する抗体構造単位は、典型的には、四量体を含む。それぞれのこのような四量体は、典型的には、ポリペプチド鎖の2つの同一の対から構成され、それぞれの対は、1つの完全長「軽」鎖（典型的には、約25kDaの分子量を有する）および1つの完全長「重」鎖（典型的には、約50～70kDaの分子量を有する）を有する。典型的には、それぞれの軽鎖および重鎖のアミノ末端部分は、典型的に抗原認識に関与する約100～110以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、典型的には、エフェクター機能に関与する定常領域を規定する。ヒト軽鎖は、典型的には、κ軽鎖およびλ軽鎖に分類される。重鎖は、典型的には、μ、δ、γ、α、またはεに分類され、それぞれIgM、IgD、IgG、IgA、およびIgEとして抗体のアイソタイプを規定する。IgGは、限定されるものではないが、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4を含め、いくつかのサブクラスを有する。IgMは、限定されるものではないが、IgM1およびIgM2を含むサブクラスを有する。IgAは、同様に、限定されるものではないが、IgA1およびIgAを含むサブクラスに分けられる。完全長軽鎖および完全長重鎖において、典型的には、可変領域および定常領域は、約12以上のアミノ酸の「J」領域によって連結され、この重鎖はまた、約10以上のアミノ酸の「D」領域を含む

。例えば、FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY、Ch. 7、第2版（Paul, W. 編）、1989、Raven Press、N. Y.（あらゆる目的に対して参考として全容が本明細書に組み入れられる）を参照されたい。それぞれの軽鎖／重鎖対の可変領域は、典型的には、抗原結合部位を形成する。

【0134】

可変領域は、典型的には、相補性決定領域またはCDRとも呼ばれる3つの超可変領域に連結された比較的保存されたフレームワーク領域（FR）という、同じ一般構造を示す。各対の2つの鎖のCDRは、典型的には、フレームワーク領域によって整列させられ、これが特定のエピトープへの結合を可能にし得る。N末端からC末端において、軽鎖可変領域および重鎖可変領域の両方が、典型的には、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4を含む。各ドメインに対するアミノ酸の割り当ては、典型的には、Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest（1987および1991、National Institutes of Health、Bethesda, Md）またはChothiaおよびLesk、1987、J. Mol. Biol. 196:901-917；Chothiaら、1989、Nature 342:878-883の定義にしたがっている。

【0135】

（二重特異性抗体または二機能性抗体）

二重特異性抗体または二機能性抗体は、典型的には、2つの異なる重鎖／軽鎖対および2つの異なる結合部位を有する人工ハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、限定されるものではないが、ハイブリドーマの融合またはF（ab'）フラグメントの連結を含む様々な方法によって作製することができる。例えば、SongsivilaiおよびLachmann、1990、Clin. Exp. Immunol. 79:315-321；Kostelnyら、1992、J. Immunol. 148:1547-1553を参照されたい。

【0136】

（抗体の調製）

本発明は、ヒトNGFに結合する抗体を提供する。これらの抗体は、完全長NGFまたはそのフラグメントを用いた免疫化によって作製することができる。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であっても良く、かつ／または組換え抗体であっても良い。好ましい実施形態では、本発明の抗体は、例えば、ヒト抗体を産生し得るトランスジェニック動物の免疫化によって調製されるヒト抗体である（例えば、国際特許出願公開第93／12227号を参照されたい）。

【0137】

本発明の抗NGF抗体の軽鎖および重鎖の可変領域の相補性決定領域（CDR）を、同じ種または別の種由来のフレームワーク領域（FR）に移植することができる。一定の実施形態では、抗NGF抗体の軽鎖および重鎖の可変領域のCDRを、コンセンサスヒトFRに移植することができる。コンセンサスヒトFRを作製するために、いくつかのヒト重鎖または軽鎖アミノ酸配列由来のFRを整列させて、コンセンサスアミノ酸配列を同定することができる。抗NGF抗体の重鎖または軽鎖のFRは、異なる重鎖または軽鎖由来のFRで置換することができる。抗NGF抗体の重鎖および軽鎖のFRにおけるまれなアミノ酸は、典型的には、置換されないが、残りのFRアミノ酸は置換することができる。まれなアミノ酸とは、通常はFRでは見出されない、ある位置にある特定のアミノ酸である。本発明の抗NGF抗体由来の移植された可変領域は、抗NGF抗体の定常領域とは異なる定常領域と共に使用することができる。あるいは、移植された可変領域は、単鎖Fv抗体の一部である。CDR移植は、あらゆる目的に対して参考として本明細書に組み入れられる、米国特許第6,180,370号、同第5,693,762号、同第5,693,761号、同第5,585,089号、および同第5,530,101号などに記載されている。

【0138】

本発明の抗体は、好ましくは、マウスの抗体産生細胞に挿入されたヒト抗体産生遺伝子座の実質的な部分を有し、かつ内因性マウス抗体を産生しないようにさらに操作されたトランスジェニックマウスを用いて調製される。このようなマウスは、ヒト免疫グロブリン分子および抗体を産生することができ、かつマウス免疫グロブリン分子および抗体を産生しないか、またはこれらを実質的に少ない量で産生する。この結果を達成するために利用される技術は、本明細書に開示された特許、出願、および参考文献に開示されている。好ましい実施形態では、当業者は、あらゆる目的に対して参考として本明細書に組み入れられる、国際特許出願公開第 98/24893 号に開示されている方法を利用することができる。また、あらゆる目的に対して参考として本明細書に組み入れられる、Mendez ら、1997、Nature Genetics 15:146-156 も参照されたい。

10

【0139】

本発明のモノクローナル抗体 (mAb) は、従来のモノクローナル抗体方法論、例えば、Kohler および Milstein の標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技術 (1975、Nature 256:495) を含む、様々な技術によって作製することができる。体細胞ハイブリダイゼーション手順が好ましいが、原理上は、モノクローナル抗体を作製する他の技術、例えば、Bリンパ球のウイルスまたは腫瘍形成性形質転換を利用することもできる。

【0140】

ハイブリドーマの調製に好ましい動物系は、マウスである。マウスにおけるハイブリドーマの産生は、十分に確立されており、免疫化プロトコル、および融合のための免疫化脾細胞の単離技術は、当技術分野で周知である。融合パートナー (例えば、マウス骨髄腫細胞) および融合手順も、公知である。

20

【0141】

好ましい実施形態では、NGF に対するヒトモノクローナル抗体は、マウス系ではなくヒト免疫系の一部を有するトランスジェニックマウスを用いて作製することができる。これらのトランスジェニックマウスは、本明細書では「HuMab」マウスと呼ばれ、内因性 μ および κ 鎖遺伝子座を不活化する標的化変異と共に、再配列されていないヒト重鎖 (μ および γ) および κ 軽鎖の免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座を含む (Lonberg ら、1994、Nature 368:856-859)。したがって、マウスは、マウス IgM または κ の発現の低下を示し、免疫化にตอบสนองして、導入されたヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子に、クラススイッチおよび体細胞変異が起きて、高親和性ヒト IgG κ モノクローナル抗体が作製される (Lonberg ら、前出; Lonberg および Huszar、1995、Intern. Rev. Immunol. 13:65-93; Harding および Lonberg、1995、Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546)。HuMab マウスの調製は、全体として参考としてその全容が本明細書に組み入れられる、Taylor ら、1992、Nucleic Acids Res. 20:6287-6295; Chen ら、1993、International Immunology 5:647-656; Tualillon ら、1994、J. Immunol. 152:2912-2920; Lonberg ら、1994、Nature 368:856-859; Lonberg、1994、Handbook of Exp. Pharmacology 113:49-101; Taylor ら、1994、International Immunology 6:579-591; Lonberg および Huszar、1995、Intern. Rev. Immunol. 13:65-93; Harding および Lonberg、1995、Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546; Fishwild ら、1996、Nature Biotechnology 14:845-851 に詳細に記載されている。さらに、全体として参考としてその全容が本明細書に組み入れられる、全てが Lonberg および Kay による米国特許第 5,545,806 号; 同第 5,569,825 号; 同第 5,625,126 号; 同第 5,633,425 号; 同第 5

30

40

50

、789、650号；同第5、877、397号；同第5、661、016号；同第5、814、318号；同第5、874、299号；および同第5、770、429号、ならびにSuraniらによる米国特許第5、545、807号；1993年6月24日公開の国際特許出願公開第93/1227号；1992年12月23日公開の国際特許出願公開第92/22646号；および1992年3月19日公開の国際特許出願公開第92/03918号を参照されたい。あるいは、以下の実施例に記載されたHC07、HC012、およびKMトランスジェニックマウス株を使用してヒト抗NGF抗体を作製することができる。

【0142】

本発明は、生物活性ヒトNGFポリペプチドに特異的であって、これを中和するヒトモノクローナル抗体を提供する。また、NGFポリペプチドに高度に特異的であり、このNGFポリペプチドに結合するとこれを中和する、抗体の重鎖および軽鎖アミノ酸配列も提供する。この高い特異性により、抗ヒトNGFヒト抗体および同様の特異性を有するヒトモノクローナル抗体は、NGF関連性疾患の有効な免疫療法となり得る。

【0143】

一態様では、本発明は、本明細書で提供される4D4抗体と同じエピトープまたは本質的に同じエピトープに結合する単離されたヒト抗体を提供する。

【0144】

一態様では、本発明は、配列番号10、12、14、16、18、20、22、24、および79～130に示されているアミノ酸配列の少なくとも1つを含む単離されたヒト抗体であって、高い親和性でNGFポリペプチドエピトープに結合し、かつNGFポリペプチド活性をアンタゴナイズする能力を有する、抗体を提供する。好ましくは、これらの抗体は、本明細書で提供される4D4抗体と同じエピトープまたは本質的に同じエピトープに結合する。

【0145】

好ましい実施形態では、単離されたヒト抗体は、 1×10^{-9} M以下の解離定数 (K_D) でNGFポリペプチドに結合し、*in vitro* 中和アッセイにおいて 1×10^{-7} M以下の IC_{50} でNGF誘導性生存を阻害する。より好ましい実施形態では、単離されたヒト抗体は、 1×10^{-10} M以下の解離定数 (K_D) でNGFポリペプチドに結合し、*in vitro* 中和アッセイにおいて 1×10^{-8} M以下の IC_{50} でNGF誘導性生存を阻害する。なおさらに好ましい実施形態では、単離された抗NGFヒト抗体は、 1×10^{-11} M以下の解離定数 (K_D) でヒトNGFポリペプチドに結合し、*in vitro* アッセイにおいて 1×10^{-9} M以下の IC_{50} でNGF誘導性生存を阻害する。前述の結合および中和の基準を満たす抗ヒトNGFヒト抗体の例が、本明細書に提供される。

【0146】

本発明の最も好ましい抗ヒトNGFヒト抗体は、本明細書では4D4と呼ばれ、それぞれ配列番号12および配列番号10に示されているVLポリペプチド配列およびVHポリペプチド配列を有する。4D4のVLおよびVHをコードするポリヌクレオチド配列はそれぞれ、配列番号11および配列番号9に示されている。本発明の抗ヒトNGFヒト抗体の特性は、実施例に詳細に開示されている。特に顕著な特性は、NGFポリペプチドに対する高い親和性、および本明細書で実証されるNGFポリペプチド活性をアンタゴナイズする高い能力である。

【0147】

抗ヒトNGFヒト抗体の解離定数 (K_D) は、実施例9に一般的に記載されるような表面プラズモン共鳴によって決定することができる。一般に、表面プラズモン共鳴分析は、BIAcoreシステム (Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ) を用いる表面プラズモン共鳴 (SPR) によって、リガンド (バイオセンサーマトリックス上に固定された組換えNGFポリペプチド) と分析物 (溶液中の抗体) との間のリアルタイムの結合相互作用を測定する。表面プラズモン分析はまた、分析物 (バ

10

20

30

40

50

イオセンサーマトリックス上の抗体)を固定して、リガンド(溶液中の組換え体V)を提示することによっても行うことができる。抗ヒトNGFヒト抗体の解離定数(K_D)は、KinExA方法論を用いて決定することもできる。本発明の一定の実施形態では、この抗体は、約 $10^{-8} \text{ M} \sim 10^{-12} \text{ M}$ の K_D でNGFに結合する。本明細書で使用される用語「 K_D 」は、特定の抗体-抗原相互作用の解離定数を指すものとする。本発明のために、 K_D を、実施例9に示されているように決定した。

【0148】

好ましい実施形態では、本発明の抗体は、IgG1アイソタイプ、IgG2アイソタイプ、IgG3アイソタイプ、またはIgG4アイソタイプである。好ましくは、この抗体は、IgG3アイソタイプである。さらに好ましくは、この抗体は、IgG1アイソタイプである。最も好ましくは、この抗体は、IgG2アイソタイプである。他の実施形態では、本発明の抗体は、IgMアイソタイプ、IgAアイソタイプ、IgEアイソタイプ、またはIgDアイソタイプである。本発明の好ましい実施形態では、この抗体は、ヒト κ 軽鎖およびヒトIgG1重鎖、ヒトIgG2重鎖、ヒトIgG3重鎖、またはヒトIgG4重鎖を含む。IgG1重鎖定常領域またはIgG2重鎖定常領域を含む本発明の抗体の発現が、以下の実施例に記載されている。特定の実施形態では、この抗体の可変領域は、IgG1アイソタイプ、IgG2アイソタイプ、IgG3アイソタイプ、またはIgG4アイソタイプの定常領域以外の定常領域に結合する。一定の実施形態では、本発明の抗体は、哺乳動物細胞における発現のためにクローン化されている。

【0149】

一定の実施形態では、抗NGF抗体の重鎖および軽鎖に対する保存的改変(およびコーディングヌクレオチドに対する対応した改変)は、本明細書に開示されている抗NGF抗体の機能的および化学的特徴と類似の特徴を有する抗NGF抗体を作製する。対照的に、抗NGF抗体の機能的および/または化学的特徴における実質的な改変は、(a)置換の領域における分子骨格の構造、例えば、シートもしくはらせんコンフォメーション、(b)標的部位における分子の電荷もしくは疎水性、または(c)側鎖のバルク、の維持に対する影響が有意に異なる重鎖および軽鎖のアミノ酸配列における置換を選択することによって達成することができる。

【0150】

例えば、「保存的アミノ酸置換」は、置換位置でのアミノ酸残基の極性または荷電に対する影響が殆どまたは全く存在しないような、非天然残基による天然アミノ酸残基の置換を含み得る。さらに、ポリペプチド中の任意の天然残基も、「アラニンスキャニング変異誘発」に関して既に記載されているように、アラニンで置換することができる。

【0151】

望ましいアミノ酸置換(保存的または非保存的にかかわらず)は、このような置換が望まれる時点で当業者によって決定することができる。一定の実施形態では、アミノ酸置換を用いて、抗NGF抗体の重要な残基を同定するか、または本明細書に記載される抗NGF抗体の親和性を上昇もしくは低下させることができる。

【0152】

周知のとおり、アミノ酸配列における小さな変化、例えば、1個、2~3個、またはさらには数個のアミノ酸の欠失、付加、または置換は、実質的に同一の特性を有する、元のタンパク質の対立遺伝子型をもたらし得る。したがって、本明細書に詳細に記載される抗体に加えて、他の「実質的に相同な」抗体を、当業者に周知の様々な組換えDNA技術を利用して容易にデザインおよび製造することができる。一般に、遺伝子の改変は、様々な周知の技術、例えば、部位特異的変異誘発によって容易に達成することができる。したがって、本発明は、本明細書に開示される抗NGFヒト抗体に実質的に類似した特徴を有する「改変体」または「変異体」の抗NGFヒト抗体を企図する(例えば、参考として本明細書に組み入れられる、国際公開第00/56772号を参照されたい)。したがって、抗NGFヒト抗体に関する用語「改変体」または「変異体」は、あらゆる結合分子(分子X)を意味し、ここで、(i)重鎖の超可変領域CDR1、CDR2、およびCDR3また

は軽鎖の超可変領域CDR1、CDR2、およびCDR3は、全体としてみた場合に、配列番号14、18、および22、または配列番号16、20、および24のそれぞれに示されている超可変領域に対して、少なくとも80%相同、好ましくは少なくとも90%相同、より好ましくは少なくとも95%相同であり、(ii) 改変体または変異体は、分子Xのフレームワーク領域と同一のフレームワーク領域を有する参照抗NGFヒト抗体と同じ程度までヒトNGFの活性を阻害することができる。

【0153】

通常、抗NGFヒト抗体改変体は、重鎖および／または軽鎖CDRを有し、この重鎖および／または軽鎖CDRは、全体としてみた場合に、配列番号14、18、および22、ならびに／または配列番号16、20、および24のそれぞれに示されているアミノ酸配列に対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、好ましくは少なくとも約85%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約90%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約91%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約92%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約93%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約94%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約95%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約96%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約97%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約98%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有する。

【0154】

さらに好ましくは、抗NGFヒト抗体改変体は、軽鎖可変領域および／または重鎖可変領域を有し、この軽鎖可変領域は、全体としてみた場合に、配列番号12、80、82、84、86、88、89、90、もしくは91に示されているアミノ酸配列に対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約81%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約82%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約83%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約84%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約85%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約86%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約87%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約88%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約89%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約90%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約91%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約92%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約93%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約94%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約95%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約96%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約97%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約98%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有しており、この重鎖可変領域は、全体としてみた場合に、配列番号10、81、83、85、もしくは87に示されているアミノ酸配列に対して、少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性、好ましくは少なくとも約75%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約80%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約81%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約82%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約83%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約84%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約85%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約86%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約87%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約88%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約89%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約90%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約91%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約92%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約93%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約94%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約95%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約96%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約97%の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約98%の配列同一性、な

10

20

30

40

50

おさらに好ましくは少なくとも約 99 % のアミノ酸配列同一性を有する。

【0155】

ポリヌクレオチドに関する「改変体」は、本発明のポリヌクレオチド配列と少なくとも約 75 % の核酸配列同一性を有する核酸分子を指すものとする。通常は、ポリヌクレオチド改変体は、本明細書に開示される新規な核酸配列と少なくとも約 75 % の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約 80 % の核酸配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約 81 % の配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約 82 % の核酸配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約 83 % の核酸配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約 84 % の核酸配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約 85 % の核酸配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約 86 % の核酸配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約 87 % の核酸配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約 88 % の核酸配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約 89 % の核酸配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約 90 % の核酸配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約 91 % の核酸配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約 92 % の核酸配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約 93 % の核酸配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約 94 % の核酸配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約 95 % の核酸配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約 96 % の核酸配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約 97 % の核酸配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約 98 % の核酸配列同一性、なおさらに好ましくは少なくとも約 99 % の核酸配列同一性を有する。

10

20

【0156】

特定の実施形態では、本発明は、本発明の抗体に対して一定の割合の同一性を有する抗体、または本明細書の実施例 10 および図 5 ~ 図 10 に示されるように、本発明の重鎖可変領域、軽鎖可変領域、CDR1、CDR2、もしくは CDR3 領域に対して一定の割合の同一性を有する重鎖可変領域、軽鎖可変領域、CDR1、CDR2、もしくは CDR3 領域を含む抗体を提供する。

【0157】

一定の実施形態では、本発明は、神経成長因子に特異的に結合し、かつ重鎖および軽鎖を含む単離されたヒト抗体を提供し、この重鎖は、配列番号 10 に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも 70 %、または 75 % 同一であるアミノ酸配列；配列番号 81 に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも 70 %、80 %、85 %、または 95 % 相同であるアミノ酸配列；配列番号 83 に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも 70 %、80 %、85 %、または 95 % 同一であるアミノ酸配列；配列番号 85 に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも 75 %、80 %、または 85 % 同一であるアミノ酸配列；配列番号 87 に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも 70 %、75 %、または 80 % 同一であるアミノ酸配列；配列番号 79 に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも 56 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

30

40

【0158】

一定の実施形態では、本発明は、神経成長因子に特異的に結合し、かつ重鎖および軽鎖を含む単離されたヒト抗体を提供し、この軽鎖は、配列番号 12 に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも 70 %、75 %、80 %、または 90 % 同一であるアミノ酸配列；配列番号 80 に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも 70 %、85 %、ま

50

たは90%同一であるアミノ酸配列；配列番号88に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%、74%、90%、または94%同一であるアミノ酸配列；配列番号89に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%、80%、85%、または87%同一であるアミノ酸配列；配列番号90に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%、85%、90%、または94%同一であるアミノ酸配列；配列番号91に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%、85%、90%、95%、または99%同一であるアミノ酸配列；配列番号82に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%、80%、90%、95%、または96%同一であるアミノ酸配列；配列番号84に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%、85%、90%、95%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列；あるいは配列番号86に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%、85%、90%、95%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

10

【0159】

20

一定の他の実施形態では、本発明は、神経成長因子に特異的に結合し、かつヒト重鎖CDR1を含む単離されたヒト抗体を提供し、この重鎖CDR1は、配列番号98、配列番号105、配列番号110、もしくは配列番号22に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも40%または60%同一であるアミノ酸配列である。

【0160】

他の実施形態では、本発明は、神経成長因子に特異的に結合し、かつヒト重鎖CDR2を含む単離されたヒト抗体を提供し、この重鎖CDR2は、配列番号99に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%、82%、または94%同一であるアミノ酸配列；配列番号106に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%または76%同一であるアミノ酸配列；配列番号18に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも59%同一であるアミノ酸配列；配列番号117に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%同一であるアミノ酸配列；あるいは配列番号111に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%、75%、または80%同一であるアミノ酸配列である。

30

40

【0161】

なお他の実施形態では、本発明は、神経成長因子に特異的に結合し、かつヒト軽鎖CDR1を含む単離されたヒト抗体を提供し、このCDR1は、配列番号101に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%または80%同一であるアミノ酸配列；配列番号95に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%、75%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列；配列番号119に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも75%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列；配列番号122

50

に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも75%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列；配列番号125に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも80%同一であるアミノ酸配列；配列番号24に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも75%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列；配列番号107に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%または80%同一であるアミノ酸配列；あるいは配列番号113に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%または80%同一であるアミノ酸配列である。

【0162】

さらなる実施形態では、本発明は、神経成長因子に特異的に結合し、かつヒト軽鎖CDR2を含む単離されたヒト抗体を提供し、このCDR2は、配列番号102に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%または85%同一であるアミノ酸配列；配列番号96に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%同一であるアミノ酸配列；配列番号120に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%同一であるアミノ酸配列；配列番号123に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%同一であるアミノ酸配列；配列番号126に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%または85%同一であるアミノ酸配列；配列番号129に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%または85%同一であるアミノ酸配列；配列番号20に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%同一であるアミノ酸配列；配列番号108に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%または85%同一であるアミノ酸配列；配列番号133に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%同一であるアミノ酸配列；あるいは配列番号114に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%または85%同一であるアミノ酸配列である。

【0163】

他の実施形態では、本発明は、神経成長因子に特異的に結合し、かつヒト軽鎖CDR3を含む単離されたヒト抗体を提供し、このCDR3は、配列番号103に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%または85%同一であるアミノ酸配列；配列番号97に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%または85%同一であるアミノ酸配列；配列番号121に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%または78%同一であるアミノ酸配列；配列番号127に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%または78%同一であるアミノ酸配列；配列番号130に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロ

ブリンフラグメントに対して少なくとも70%または78%同一であるアミノ酸配列；配列番号16に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%または78%同一であるアミノ酸配列；配列番号109に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも70%または85%同一であるアミノ酸配列；配列番号134に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも78%同一であるアミノ酸配列；あるいは配列番号115に示されているアミノ酸配列またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントに対して少なくとも85%同一であるアミノ酸配列である。

10

【0164】

4D4抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の配列はそれぞれ、配列番号10および12に示されている。しかしながら、多くの潜在的なCDR接触残基は、他のアミノ酸による置換を受けやすいが、なお抗体の抗原に対する実質的な親和性の維持を可能にしている。同様に、重鎖および軽鎖におけるCDRと接触していない多くのフレームワーク残基は、ヒト抗体の親和性または非免疫原性を有意に喪失することなく、ヒトコンセンサスアミノ酸による、他のヒト抗体の対応する位置のアミノ酸での置換、または他のマウス抗体のアミノ酸での置換を有し得る。様々な代替のアミノ酸の選択を用いて、親和性、特異性、非免疫原性、製造の容易さ、および他の望ましい特性の様々な組み合わせを有する、開示された抗NGF抗体およびそのフラグメントの型を作製することができる。

20

【0165】

代替の実施形態では、本発明の抗体は、ハイブリドーマ細胞株以外の細胞株で発現させることができる。これらの実施形態では、特定の抗体をコードする配列を適切な哺乳動物宿主細胞の形質転換に使用することができる。これらの実施形態によると、米国特許第4,399,216号、同第4,912,040号、同第4,740,461号、および同第4,959,455号（それぞれが、あらゆる目的に対して参考としてそれらの全容が本明細書に組み入れられる）に例示されているように、例えば、ポリヌクレオチドをウイルス（またはウイルスベクター）にパッケージングしてウイルス（またはベクター）により宿主細胞に形質導入する方法、または当技術分野で公知のトランスフェクション手順による方法を含む、宿主細胞にポリヌクレオチドを導入するあらゆる公知の方法を用いて形質転換を達成することができる。一般に、用いられる形質転換手順は、形質転換される宿主によって決まるだろう。哺乳動物細胞に異種ポリヌクレオチドを導入する方法は、当技術分野で周知であり、この方法には、限定されるものではないが、デキストラン媒介性トランスフェクション、リン酸カルシウム沈降、ポリブレン媒介性トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リポソームにおけるポリヌクレオチド（複数可）の被包、および核へのDNAの直接マイクロインジェクションが含まれる。

30

【0166】

本発明のNGF抗体の重鎖定常領域、重鎖可変領域、軽鎖定常領域、または軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする核酸分子を、標準的な連結技術を用いて適切な発現ベクター中に挿入する。好ましい実施形態では、抗NGF抗体の重鎖または軽鎖定常領域を、適切な可変領域のC末端に付加して、発現ベクターに連結する。このベクターは、典型的には、使用される特定の宿主細胞において機能的であるように選択される（すなわち、このベクターは、遺伝子の増幅および／または遺伝子の発現が起こり得るように、宿主細胞の機構に適合している）。発現ベクターの概観については、METH. ENZ. 185 (Goeddel、編) 1990、Academic Pressを参照されたい。

40

【0167】

典型的には、任意の宿主細胞に使用される発現ベクターは、プラスミドの維持のため、ならびに外因性ヌクレオチド配列のクローン化および発現のための配列を含む。このような配列は、一定の実施形態では、まとめて「フランクング配列 (flanking sequence)」と呼ばれ、典型的には、次のヌクレオチド配列の1つ以上を含む：プロ

50

モーター、1つ以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終結配列、ドナーおよびアクセプタースプライス部位を含む完全イントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるべきポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、および選択マーカーエレメント。これらの各配列は、以下に説明する。

【0168】

任意選択で、ベクターは、「タグ」コード配列、すなわち、抗NGF抗体ポリペプチドコード配列の5'末端または3'末端に位置するオリゴヌクレオチド分子を含んでも良い；このオリゴヌクレオチド配列は、ポリHis（例えば、hexaHis）、または別の「タグ」、例えば、FLAG、HA（インフルエンザウイルス血球凝集素）、またはmyc（これらには、市販の抗体が存在する）をコードする。このタグは、典型的には、ポリペプチドの発現に際してポリペプチドに融合され、宿主細胞からのNGF抗体のアフィニティー精製または検出の手段として機能し得る。アフィニティー精製は、例えば、アフィニティーマトリックスとしてタグに対する抗体を用いるカラムクロマトグラフィーによって達成することができる。任意選択で、続いて、タグを、様々な手段、例えば、切断用の一定のペプチダーゼの使用によって、精製された抗NGF抗体ポリペプチドから除去することができる。

10

【0169】

フランキング配列は、相同（すなわち、宿主細胞と同じ種および／または株由来）、異種（すなわち、宿主細胞種または株以外の種由来）、ハイブリッド（すなわち、2つ以上の供給源由来のフランキング配列の組み合わせ）、合成、または天然であっても良い。したがって、フランキング配列の供給源は、このフランキング配列が宿主細胞の機構で機能的であり、かつこの宿主細胞の機構によって活性化され得るのであれば、任意の原核生物もしくは真核生物、任意の脊椎生物もしくは無脊椎生物、または任意の植物であっても良い。

20

【0170】

本発明のベクターで有用なフランキング配列は、当技術分野で周知の任意のいくつかの方法によって得ることができる。典型的には、本明細書で有用なフランキング配列は、マッピングによって、および／または制限エンドヌクレアーゼ消化によって既に同定されているため、適切な制限エンドヌクレアーゼを用いて適切な組織供給源から単離することができる。場合によっては、フランキング配列の全ヌクレオチド配列が公知であり得る。ここでは、フランキング配列は、核酸の合成またはクローン化のために本明細書に記載される方法を用いて合成することができる。

30

【0171】

フランキング配列の全てまたは一部のみが公知であるか否かにかかわらず、フランキング配列は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて、ならびに／または適切なプローブ、例えば、同種もしくは別種由来のオリゴヌクレオチドおよび／もしくはフランキング配列フラグメントを用いてゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって、得ることができる。フランキング配列が公知でない場合、フランキング配列を含むDNAのフラグメントは、例えば、コード配列またはさらに別の遺伝子（複数可）を含み得るDNAの大きい断片から単離することができる。単離は、制限エンドヌクレアーゼ消化によって適切なDNAフラグメントを形成し、次いでアガロースゲル精製、Qiagen（登録商標）カラムクロマトグラフィー（Chattsworth, CA）、または当業者に公知の他の方法を用いて単離して達成することができる。この目的を達成するための適切な酵素の選択は、当業者は容易に分かるであろう。

40

【0172】

複製起点は、典型的には、市販の原核生物発現ベクターの一部であり、この複製起点は、宿主細胞におけるベクターの増幅に役立つ。最適なベクターが複製起点部位を含んでいない場合、既知の配列に基づいて化学的に合成して、ベクターに連結することができる。例えば、プラスミドpBR322（New England Biolabs, Beve

50

ry, MA) 由来の複製起点は、殆どのグラム陰性細菌に適切であり、様々なウイルス起点 (例えば、SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、またはパピローマウイルス、例えば、HPVまたはBPV) は、哺乳動物細胞におけるクロニングベクターに有用である。一般に、複製起点の成分は、哺乳動物発現ベクターには必要ではない (例えば、SV40 起点は、多くの場合、単にウイルス初期プロモーターも含むという理由で使用される)。

【0173】

転写終結配列は、典型的には、ポリペプチドコード領域の3'側末端に位置し、転写を終結させる役割を果たす。通常、原核生物細胞における転写終結配列は、ポリT配列が続くG-Cリッチフラグメントである。この配列は、ライブラリーから容易にクローン化され、またはさらにベクターの一部として市販されているが、核酸合成法、例えば、本明細書に記載の方法を用いて容易に合成しても良い。

10

【0174】

選択マーカー遺伝子は、選択培養培地で増殖させられる宿主細胞の生存および増殖に必要なタンパク質をコードする。典型的な選択マーカー遺伝子は、(a) 原核生物宿主細胞に対して、抗生物質または他の毒素、例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、もしくはカナマイシンに対する耐性を付与する；(b) 細胞の栄養要求性欠損を相補する；あるいは(c) 複合培地または既定培地から得ることができない重要な栄養物を供給する、タンパク質をコードする。好ましい選択マーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、およびテトラサイクリン耐性遺伝子である。有利なことに、ネオマイシン耐性遺伝子はまた、原核生物および真核生物宿主細胞の両方で選択に用いることができる。

20

【0175】

他の選択遺伝子を用いて、発現される遺伝子を増幅することができる。増幅とは、増殖または細胞の生存に重要であるタンパク質の産生に必要な遺伝子が、組換え細胞の後続世代の染色体内で縦列に反復されるプロセスである。哺乳動物細胞の適切な選択マーカーの例には、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子およびプロモーターのないチミジンキナーゼ遺伝子が含まれる。哺乳動物細胞形質転換体を、ベクターに存在する選択遺伝子によって形質転換体のみが独自に適合して生存する選択圧力下に置く。選択圧力は、培地中の選択物質の濃度が連続的に上昇する条件下で形質転換細胞を培養することによって課し、これにより、選択遺伝子の増幅、および別の遺伝子、例えば、NGFポリペプチドに結合する抗体をコードするDNAの増幅の両方がもたらされる。結果として、多量のポリペプチド、例えば、抗NGF抗体が、増幅されたDNAから合成される。

30

【0176】

リボソーム結合部位は、通常は、mRNAの翻訳開始に必要であり、Shine-Dalgarno配列 (原核生物) またはKozak配列 (真核生物) によって特徴付けられる。このエレメントは、典型的には、プロモーターの3'側および発現されるべきポリペプチドのコード配列の5'側に位置する。

【0177】

場合によって、例えば、真核生物の宿主細胞発現系においてグリコシル化が望ましい場合は、様々なプレ配列またはプロ配列を操作してグリコシル化または収率を改善することができる。例えば、特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を変更しても良いし、またはプロ配列 (これも、グリコシル化に影響を与え得る) を付加しても良い。最終タンパク質産物は、-1位 (成熟タンパク質の第一アミノ酸に対して) に、発現に付随する1つ以上の追加のアミノ酸を有し得、これは、完全に取り除かれなくても良い。例えば、最終タンパク質産物は、アミノ末端に結合されたペプチダーゼ切断部位に見られる1つまたは2つのアミノ酸残基を有しても良い。あるいは、酵素が成熟ポリペプチド内のこのような領域において切断する場合、いくつかの酵素切断部位の使用により、望ましいポリペプチドの僅かに切断された形態となり得る。

40

【0178】

50

本発明の発現ベクターおよびクローニングベクターは、典型的には、宿主生物によって認識され、抗NGF抗体をコードする分子に作動可能に連結されたプロモーターを含む。プロモーターは、構造遺伝子の開始コドン（一般に、約100～1000bp内）に対して上流（すなわち、5'側）に位置する非転写配列であり、構造遺伝子の転写を制御する。プロモーターは、慣習的に次の2つのクラスの内の1つに分類される：誘導性プロモーターおよび構成的プロモーター。誘導性プロモーターは、培養条件における何らかの変化、例えば、栄養物の有無または温度の変化に応答して、それらの制御下のDNAからの上昇したレベルの転写を開始する。他方、構成的プロモーターは、作動可能に連結されている遺伝子を均一に転写する。すなわち遺伝子発現に対する制御が殆どまたは全くない。様々な潜在的な宿主細胞によって認識される多数のプロモーターが周知である。適切なプロモーターは、制限酵素消化によって供給源のDNAからプロモーターを除去して、望ましいプロモーター配列をベクターに挿入することによって、本発明の抗NGF抗体を含む重鎖または軽鎖をコードするDNAに作動可能に連結される。

【0179】

酵母宿主に使用するのに適切なプロモーターも、当技術分野で周知である。酵母エンハンサーは、酵母プロモーターと共に有利に用いられる。哺乳動物宿主細胞に使用するのに適切なプロモーターは、周知であり、このようなプロモーターには、限定されるものではないが、ウイルス、例えば、ポリオマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス2）、ウシバビローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、および最も好ましいシミアンウイルス40（SV40）のゲノムから得られたプロモーターが含まれる。他の適切な哺乳動物プロモーターには、異種哺乳動物プロモーター、例えば、熱ショックプロモーターおよびアクチンプロモーターが含まれる。

【0180】

対象となり得るさらなるプロモーターには、限定されるものではないが：SV40初期プロモーター（BernoisおよびChambon、1981、Nature 290：304-10）；CMVプロモーター（Thomsenら、1984、Proc. Natl. Acad. USA 81：659-663）；ラウス肉腫ウイルスの3'長末端反復に含まれるプロモーター（Yamamotoら、1980、Cell 22：787-97）；ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（Wagnerら、1981、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78：1444-45）；メタロチオネイン（metallothionein）遺伝子由来のプロモーターおよび調節配列（Brinsterら、1982、Nature 296：39-42）；ならびに原核生物プロモーター、例えば、 β ラクタマーゼプロモーター（Villa-Kamaroffら、1978、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75：3727-31）；またはtacプロモーター（DeBoerら、1983、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80：21-25）が含まれる。同様に、対象となるものは、組織特異性を示し、かつトランスジェニック動物で利用されている次の動物転写制御領域である：膵臓腺房細胞で活性であるエラスターゼI遺伝子制御領域（Swiftら、1984、Cell 38：639-46；Ornitzら、1986、Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50：399-409（1986）；MacDonald、1987、Hepatology 7：425-515）；膵臓 β 細胞で活性なインスリン遺伝子制御領域（Hanahan、1985、Nature 315：115-22）；リンパ系細胞で活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域（Grosschedlら、1984、Cell 38：647-58；Adamesら、1985、Nature 318：533-38；Alexanderら、1987、Mol. Cell. Biol. 7：1436-44）；精巢細胞、乳房細胞、リンパ系細胞、および肥満細胞で活性なマウス哺乳動物腫瘍ウイルス制御領域（Lederら、1986、Cell 45：485-95）；肝臓で活性なアルブミン遺伝子制御領域（Pinkertら、1987、Genes and Devel. 1：268-76）；

肝臓で活性な α フェトプロテイン遺伝子制御領域 (Krumlaufら、1985、Mol. Cell. Biol.、5:1639-48; Hammerら、1987、Science 235:53-58); 肝臓で活性な $\alpha 1$ -抗トリプシン遺伝子制御領域 (Kelleyら、1987、Genes and Devel. 1:161-71); 骨髄性細胞で活性な β グロビン遺伝子制御領域 (Mogramら、1985、Nature 315:338-40; Kolliasら、1986、Cell 46:89-94); 脳におけるオリゴデンドロサイト細胞で活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域 (Readheadら、1987、Cell 48:703-12); 骨格筋で活性なミオシン軽鎖2遺伝子制御領域 (Sani、1985、Nature 314:283-86); ならびに視床下部で活性な生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子制御領域 (Masouら、1986、Science 234:1372-78)。

【0181】

高等真核生物による本発明の抗NGF抗体を含む軽鎖または重鎖をコードするDNAの転写を上昇させるために、エンハンサー配列をベクターに挿入することができる。エンハンサーは、プロモーターに対して転写を上昇させるように働く、通常は約10~300bp長のDNAのシス作用エレメントである。エンハンサーは、向きおよび位置に比較的依存せず、転写単位の5'および3'の両方の位置に見られる。哺乳動物遺伝子から得ることができるいくつかのエンハンサー配列は公知である (例えば、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α フェトプロテイン、およびインスリン)。しかしながら、典型的には、ウイルス由来のエンハンサーが使用される。当技術分野で公知のSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーは、真核生物プロモーターの活性化のための例示的な増強エレメントである。エンハンサーは、ベクター内でコード配列の5'または3'のいずれかに位置し得るが、典型的には、プロモーターの5'部位に位置する。

【0182】

本発明の発現ベクターは、市販のベクターなどの開始ベクターから構築することができる。このようなベクターは、望ましいフランキンク配列の全てを含んでも含まなくても良い。本明細書に記載されるフランキンク配列の1つ以上があらかじめベクターに存在しない場合は、そのフランキンク配列を個々に入手してベクターに連結することができる。各フランキンク配列を得るために用いた方法は、当業者に周知である。

【0183】

ベクターが構築され、軽鎖、重鎖、または抗NGF抗体を含む軽鎖および重鎖をコードする核酸分子がこのベクターの適切な部位に挿入されたら、この完全なベクターを、増幅および/またはポリペプチド発現のために適切な宿主細胞に挿入することができる。抗NGF抗体用の発現ベクターによる選択された宿主細胞の形質転換は、トランスフェクション、感染、リン酸カルシウム共沈殿、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、DEAEデキストラン媒介性トランスフェクション、または他の公知の技術を含む周知の方法によって達成することができる。選択される方法は、場合によっては、用いられる宿主細胞の型による。これらの方法および他の適切な方法は、当業者に周知であり、例えば、Sambrookら、前出に記載されている。

【0184】

宿主細胞は、適切な条件下で培養されると、抗NGF抗体を合成し、次いでこの抗体を培養培地から (宿主細胞が培地中にこの抗体を分泌する場合) またはこの抗体を産生している宿主細胞から直接 (この抗体が分泌されない場合) 収集することができる。適切な宿主細胞の選択は、様々な因子、例えば、望ましい発現レベル、活性のために望ましいかまたは必要なポリペプチド修飾 (例えば、グリコシル化またはリン酸化) および生物学的に活性な分子への折り畳みの容易さによって決まる。

【0185】

発現用の宿主として利用可能な哺乳動物細胞系は、当技術分野で周知であり、これには、限定されるものではないが、American Type Culture Coll

ection (ATCC) から入手可能な不死化細胞系が含まれ、この不死化細胞系には、限定されるものではないが、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、HeLa 細胞、仔ハムスター腎臓 (BHK) 細胞、サル腎細胞 (COS)、ヒト肝細胞がん細胞 (例えば、Hep G2)、および多数の他の細胞系が含まれる。一定の実施形態では、どの細胞系が高い発現レベルを有し、かつ NGF 結合特性を有する抗体を構成的に産生するかを決定することにより、細胞系を選択することができる。別の実施形態では、それ自体の抗体を産生しないが、異種の抗体を産生して分泌する能力を有する B 細胞系統由来の細胞系を選択することができる。

【0186】

本発明の抗体は、生物学的サンプル中の NGF の検出、および NGF タンパク質を産生する細胞または組織の同定に有用である。NGF に特異的に結合する本発明の抗体は、NGF 媒介性疾患の処置に有用であり得る。このような抗体は、NGF を検出するための結合アッセイ、および NGF が NGF レセプターとの複合体を形成することを阻害するために使用することができる。NGF に結合して、他の結合化合物との相互作用を阻止するような抗体は、NGF 媒介性疾患の調節において治療に使用することができる。好ましい実施形態では、NGF に対する抗体は、そのレセプターに対する NGF 結合を阻止ことができ、これにより NGF 誘導性シグナル伝達カスケードの破壊がもたらされ得る。

【0187】

本発明はまた、本明細書に開示される任意の 1 つの障害または状態などの、患者において NGF の発現の上昇または NGF に対する感受性の上昇によって引き起こされる疼痛性の障害または状態の処置のための医薬の製造における本発明の 1 つ以上の抗体の使用にも関する。

【0188】

好ましい実施形態では、本発明は、薬学的に許容され得る希釈剤、キャリア、可溶化剤、乳化剤、防腐剤、および／またはアジュバントと共に、治療有効量の 1 つまたは複数の本発明の抗体を含む薬学的組成物を提供する。好ましくは、許容され得る処方物の材料は、使用される用量および濃度では、レシピエントに対して非毒性である。好ましい実施形態では、治療有効量の抗 NGF 抗体を含む薬学的組成物が提供される。

【0189】

一定の実施形態では、許容され得る処方物の材料は、好ましくは、使用される用量および濃度では、レシピエントに対して非毒性である。

【0190】

一定の実施形態では、本薬学的組成物は、例えば、pH、容量オスモル濃度、粘度、清澄度、色調、等張性、臭気、無菌性、安定性、溶解もしくは放出の速度、組成物の吸着もしくは浸透を改変する、維持する、または保つための処方物の材料を含み得る。このような実施形態では、適切な処方物の材料には、限定されるものではないが、アミノ酸 (例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジン)；抗菌剤；抗酸化剤 (例えば、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、または亜硫酸水素ナトリウム)；緩衝剤 (例えば、ホウ酸塩、炭酸水素塩、Tris-HCl、クエン酸塩、リン酸塩、または他の有機酸)；増量剤 (bulk ing agent) (例えば、マンニトールまたはグリシン)；キレート剤 (例えば、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA))；錯化剤 (例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、 β -シクロデキストリン、またはヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン)；充填剤；単糖類；二糖類；ならびに他の炭水化物 (例えば、グルコース、マンノース、またはデキストリン)；タンパク質 (例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン)；着色剤、矯味矯臭薬、および希釈剤；乳化剤；親水性ポリマー (例えば、ポリビニルピロリドン)；低分子量ポリペプチド；塩形成対イオン (例えば、ナトリウム)；防腐剤 (例えば、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸、または過酸化水素)；溶媒 (例えば、グリセリン、プロピレングリコール、またはポリエチレングリコール)；糖アルコール (例えば、マ

10

20

30

40

50

ンニトールまたはソルビトール) ; 懸濁化剤 ; 界面活性剤または湿潤剤 (例えば、プルロニック、PEG、ソルビタンエステル、ポリソルベート、例えば、ポリソルベート20、ポリソルベート80、トリトン、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサポール (tyloxapol)) ; 安定性増強剤 (例えば、スクロースまたはソルビトール) ; 張度増強剤 (例えば、アルカリ金属ハロゲン化物、好ましくは、塩化ナトリウムまたは塩化カリウム、マンニトールソルビトール) ; 送達ビヒクル ; 希釈剤 ; 賦形剤、および/または薬学的アジュバントが含まれる。REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES、第18版、(A. R. Gennaro編)、1990、Mack Publishing Companyを参照されたい。

【0191】

10

一定の実施形態では、最適な薬学的組成物は、例えば、意図する投与経路、送達形態、および望ましい用量に応じて当業者によって決定される。例えば、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES、前出を参照されたい。一定の実施形態では、このような組成物は、本発明の抗体の物理的状态、安定性、in vivoでの放出速度、およびin vivoでのクリアランス速度に影響を与え得る。

【0192】

一定の実施形態では、薬学的組成物における主なビヒクルまたはキャリアは、本質的には、水性であっても非水性であっても良い。例えば、適切なビヒクルまたはキャリアは、注射用の水、生理学的食塩水、または人工脳脊髄液であり得、場合によっては、非経口投与用の組成物中で一般的な他の材料を補充しても良い。中性緩衝生理食塩水、または血清アルブミンと混合された生理食塩水は、さらなる例示的なビヒクルである。好ましい実施形態では、本発明の薬学的組成物は、約pH7.0~8.5のTris緩衝液、または約pH4.0~5.5の酢酸緩衝液を含み、ソルビトール、スクロース、Tween-20、および/またはこれらの適切な代用物をさらに含んでも良い。本発明の一定の実施形態では、抗NGF抗体組成物は、望ましい程度の純度を有する選択された組成物を、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態の任意選択の処方物質 (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES、前出) と混合することによって貯蔵用に調製することができる。さらに、一定の実施形態では、抗NGF抗体産物は、適切な賦形剤、例えば、スクロースを用いて凍結乾燥物として処方しても良い。

20

【0193】

30

本発明の薬学的組成物は、非経口送達用に選択することができる。あるいは、この組成物は、吸入用、または経口のような消化管を通る送達用に選択することができる。このような薬学的に許容され得る組成物の調製は、当技術分野の技術の範囲内である。

【0194】

処方物成分は、好ましくは、投与部位に対して許容され得る濃度で存在する。一定の実施形態では、緩衝剤を用いて、この組成物を生理学的なpH、または僅かに低いpH、典型的には約5~約8のpH範囲内に維持する。

【0195】

非経口的投与が企図される場合、本発明で使用される治療組成物は、薬学的に許容され得るビヒクル中に望ましい抗NGF抗体を含む、発熱物質を含まない非経口的に許容可能な水溶液の形態で提供することができる。非経口注射用に特に適切なビヒクルは、滅菌蒸留水であり、抗NGF抗体は、滅菌等張液として処方されて適切に保存される。一定の実施形態では、この調製物は、産物の制御放出または持続放出を提供し得る注射用マイクロスフェア、生分解性粒子、ポリマー化合物 (例えば、ポリ酪酸またはポリグリコール酸)、ビーズ、またはリポソームなどの作用物質を伴った望ましい分子の処方物を含み得る (これは、蓄積注射によって送達され得る)。一定の実施形態では、循環中での持続期間を促進する効果を有するヒアルロン酸も使用することができる。一定の実施形態では、移植薬物送達デバイスを用いて、望ましい抗体分子を導入することができる。

40

【0196】

本発明の薬学的組成物は、吸入用に処方することができる。これらの実施形態では、抗

50

NGF抗体は、吸入可能な乾燥粉末として有利に処方される。好ましい実施形態では、抗NGF抗体吸入溶液も、エアロゾル送達用の推進剤とともに処方することができる。一定の実施形態では、溶液は噴霧することができる。したがって、肺投与および処方方法は、参考として本明細書に組み入れられる、化学的に修飾されたタンパク質の肺送達が記載された国際特許出願PCT/US94/001875にさらに記載されている。

【0197】

処方物を経口投与できることも意図される。この様式で投与される抗NGF抗体は、固体投薬形態、例えば、錠剤およびカプセルの調合に習慣的に用いられるキャリアと共に、またはそれなしで処方することができる。一定の実施形態では、カプセルは、バイオアベイラビリティが最大であり、かつ前全身分解（pre-systemic degradation）が最小であるときに、胃腸管のある部位でこの処方物の活性部位を放出するようにデザインすることができる。抗NGF抗体の吸収を促進するためにさらなる作用物質を含んで良い。希釈剤、矯味矯臭薬、低融点ワックス、植物油、潤滑剤、懸濁化剤、錠剤崩壊剤、および結合剤も使用することができる。

【0198】

本発明の薬学的組成物は、好ましくは、1または複数の抗NGF抗体の有効量が、錠剤の製造に適切な非毒性賦形剤との混合物中に含まれるように提供される。滅菌水、または別の適切なビヒクルに錠剤を溶解することにより、単位用量形態で溶液を調製することができる。適切な賦形剤には、限定されるものではないが、不活性希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムもしくは重炭酸ナトリウム、ラクトース、もしくはリン酸カルシウム；または結合剤、例えばデンプン、ゼラチン、もしくはアカシア；または潤滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、もしくはタルクが含まれる。

【0199】

さらなる薬学的組成物は、当業者には明らかであり、このような薬学的組成物には、持続送達または制御送達処方物中に抗NGF抗体を含む処方物が含まれる。様々な他の持続送達または制御送達手段、例えば、リボソームキャリア、生分解性微粒子もしくは多孔質ビーズ、および蓄積注射剤を処方する技術も当業者には公知である。例えば、参考として本明細書に組み入れられる、薬学的組成物の送達用の多孔質ポリマー微粒子の制御放出が記載された国際特許出願PCT/US93/00829を参照されたい。持続放出調製物は、成形製品の形態の半透過性ポリマーマトリックス、例えばフィルムまたはマイクロカプセルを含み得る。持続放出マトリックスには、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（それぞれ参考として本明細書に組み入れられる、米国特許第3,773,919号および欧州特許出願公開第058481号に開示されている）、Lグルタミン酸とγエチル-Lグルタミン酸とのコポリマー（Sidmanら、1983、Biopolymers 22:547-556）、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）（Langerら、1981、J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277およびLanger、1982、Chem. Tech. 12:98-105）、エチレン酢酸ビニル（Langerら、前出）、またはポリ-D（-）-3-ヒドロキシ酪酸（欧州特許出願公開第133,988号）が含まれ得る。持続放出組成物はまた、当技術分野で公知の任意のいくつかの方法によって調製することができるリボソームも含み得る。例えば、Eppsteinら、1985、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692；欧州特許出願公開第036,676号；同第088,046号および同第143,949号（参考として本明細書に組み入れられる）を参照されたい。

【0200】

in vivo投与に使用される薬学的組成物は、典型的には、滅菌調製物として提供される。滅菌は、滅菌濾過膜を通る濾過によって達成することができる。組成物が凍結乾燥される場合、この方法を用いる滅菌は、凍結乾燥および再構成の前または後のいずれかに行うことができる。非経口投与用の組成物は、凍結乾燥形態で、または溶液中に保存することができる。非経口組成物は、一般に、無菌アクセスポートを有する容器、例えば、

静脈溶液バッグ、または皮下注射針によって穿刺可能な栓を備えたバイアルに入れられる。

【0201】

薬学的組成物が処方されたら、この薬学的組成物を、溶液、懸濁物、ゲル、エマルジョン、固体、または脱水もしくは凍結乾燥された粉末として滅菌バイアル内に保存することができる。このような処方物は、すぐに使える形態、または投与の前に再構成される形態（例えば、凍結乾燥）のいずれかで保存することができる。

【0202】

本発明はまた、単一用量投与単位を作製するためのキットも提供する。本発明のキットはそれぞれ、乾燥タンパク質を有する第1の容器および水性処方物を有する第2の容器の両方を備え得る。本発明の一定の実施形態では、単一および複数チャンバを備えた充填済みシリンジ（例えば、液体シリンジおよびリオシリンジ（*lyosyringe*））を含むキットが提供される。

10

【0203】

治療に使用される抗NGF抗体含有薬学的組成物の有効量は、例えば、治療の事情および目的によって決まる。当業者であれば、処置に適切な用量のレベルは、ある程度は、送達される分子、抗NGF抗体が使用される適応症、投与経路、ならびに患者の大きさ（体重、体表面、または器官のサイズ）および／または状態（年齢および全身の健康状態）によって異なることを理解できよう。一定の実施形態では、最適の治療効果を得るために、臨床医は、用量を漸増（*titerr*）し、投与経路を変更することができる。典型的な用量は、上述の因子によって、約 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $30 \text{mg}/\text{kg}$ 以上の範囲であり得る。好ましい実施形態では、用量は、 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $30 \text{mg}/\text{kg}$ ；より好ましくは $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $30 \text{mg}/\text{kg}$ ；またはさらに好ましくは $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $30 \text{mg}/\text{kg}$ の範囲であり得る。

20

【0204】

一定の実施形態では、組成物は、皮下注射によって投与することができる。上記のように、投与量は、臨床医が決定することができるが、一定の実施形態では、皮下注射によって投与される組成物中のNGF抗体の薬学的有効量は、約 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $30 \text{mg}/\text{kg}$ である。一定の実施形態では、NGF抗体の薬学的有効量は、皮下注射に付き約 3mg ～約 30mg である。一定の実施形態では、投与は、複数回の皮下注射を含む。なお他の実施形態では、投与は、単回皮下注射を含む。

30

【0205】

投与頻度は、使用される処方物中の特定の抗NGF抗体の薬物動態パラメーターによって決まる。典型的には、臨床医は、望ましい効果を達成する用量が得られるまで組成物を投与する。したがって、この組成物は、単回投与として、もしくはある時間にわたる2回以上の投与（同じ量の望ましい分子を含んでも含まなくても良い）として、または移植デバイスもしくはカテーテルを介した連続注入として、投与しても良い。適切な用量のさらなる微調整は、当業者によって日常的に行われ、これは、当業者によって日常的に行われる作業の範囲内である。適切な用量は、適切な用量応答データを使用して確定することができる。一定の実施形態では、本発明の抗体は、長期間にわたって患者に投与することができる。本発明の抗体の慢性投与により、非ヒト動物においてヒト抗原に対して惹起される抗体、例えば、非ヒト種で産生される不完全ヒト抗体に一般に関連する有害な免疫応答またはアレルギー応答が最小限になる。

40

【0206】

薬学的組成物の投与経路は、既知の方法に合致し、例えば、経口的、静脈内、腹腔内、脳内（実質内）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内、もしくは病巣内経路による注射；持続放出システムまたは移植デバイスによる。一定の実施形態では、組成物は、ボーラス注射によって投与するか、もしくは注入によって連続的に投与するか、または移植デバイスによって投与することができる。

【0207】

50

この組成物はまた、望ましい分子が吸着されたかまたは被包された膜、スポンジまたは別の適切な材料の移植によって局所投与することもできる。移植デバイスが使用される一定の実施形態では、移植デバイスは、任意の適切な組織または器官に移植することができ、望ましい分子の送達は、拡散、時限式放出ポラス、または連続的投与によって行うことができる。

【0208】

一定の実施形態では、本発明は、神経成長因子（NGF）の発現の上昇またはNGFに対する感受性の上昇によって引き起こされる状態を処置する方法であって、患者に薬学的有効量のNGF抗体を、経口的に、静脈内、腹腔内、脳内（実質内）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内、病巣内、もしくは皮下経路による注射によって、持続放出システムによってまたは移植デバイスによって、投与する工程を含み、この状態は、急性疼痛、歯痛、外傷による疼痛、術後疼痛、切断もしくは膿瘍による疼痛、カウザルギー、脱髄疾患、三叉神経痛、がん、慢性アルコール中毒、脳卒中、視床痛症候群、糖尿病、後天性免疫不全症候群（「AIDS」）、毒素、化学療法、一般的な頭痛、片頭痛、群発性頭痛、混合血管症候群もしくは非血管症候群、緊張性頭痛、一般的な炎症、関節炎、リウマチ病、狼瘡、変形性関節症、線維筋痛症、炎症性腸障害、過敏性腸症候群、炎症性眼障害、炎症性もしくは不安定膀胱障害、乾癬、炎症性成分による皮膚病訴、日焼け、心臓炎、皮膚炎、筋炎、神経炎、膠原血管病、慢性炎症状態、炎症性疼痛ならびにこれに関連した痛覚過敏および異痛、神経障害疼痛ならびにこれに関連した痛覚過敏および異痛、糖尿病性神経障害疼痛、カウザルギー、交感神経によって維持される疼痛、求心路遮断症候群、喘息、上皮組織の損傷もしくは機能不全、単純ヘルペス、呼吸領域、尿生殖器領域、胃腸領域、もしくは血管領域における臓器運動の不調、創傷、熱傷、アレルギー性皮膚反応、そう痒、白斑、一般的な胃腸障害、大腸炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、血管運動神経性鼻炎もしくはアレルギー性鼻炎、または気管支障害、月経困難、消化不良、胃食道逆流、肺炎、または臓器痛である、方法に関する。

【0209】

一定の実施形態では、本方法は、薬学的有効量のNGF抗体を含み、変形性関節症膝疼痛の処置または防止に有用である。一定の実施形態では、NGF抗体の薬学的有効量は、皮下注射当たり約3mg～約30mgである。一定の実施形態では、投与は、複数回の皮下注射を含む。ある実施形態では、投与は、単回皮下注射を含む。一定の実施形態では、本発明の組成物および方法は、配列番号44を含む軽鎖を有するNGF抗体を含む。一定の実施形態では、NGF抗体は、配列番号40を含む重鎖を含む。さらなる実施形態では、NGF抗体は、配列番号44を含む軽鎖および配列番号40を含む重鎖を含む。

【0210】

したがって、本発明の上記説明によると、様々な態様では、本発明は、配列番号44を含む軽鎖および配列番号40を含む重鎖を含むNGF抗体を含む方法および組成物であって、この抗体の重鎖および軽鎖がフレキシブルリンカーによって連結されて単鎖抗体を形成している、方法および組成物に関する。この態様の一部の実施形態では、NGF抗体は、単鎖Fv抗体、Fab'抗体、(Fab')₂抗体、完全ヒト抗体、および／またはヒト化抗体を含む。この態様の一部の実施形態では、NGF抗体は、NGFのシグナル伝達を阻害する。

【0211】

この態様の一定の実施形態では、NGF抗体は、約 1×10^{-9} 以下、約 1×10^{-10} 以下、または約 1×10^{-11} 以下の K_D でヒトNGFポリペプチドから解離する。この態様の一定の実施形態では、NGF抗体は、標準的なin vitroアッセイにおいて約 1×10^{-8} 以下、約 1×10^{-9} 以下、または約 0.2×10^{-9} 以下の IC_{50} でヒトNGF生物活性を中和する。一定の実施形態では、NGF抗体は、上述の K_D 値（複数可）でヒトNGFポリペプチドから解離し、標準的なin vitroアッセイにおいて上述の IC_{50} 値でヒトNGF生物活性を中和する。

【0212】

本発明による抗NGF抗体の薬学的組成物を *ex vivo* で使用することも望ましいであろう。このような場合、患者から取り出された細胞、組織、または器官を抗NGF抗体の薬学的組成物に曝露し、次いでその細胞、組織、および／または器官を患者に移植して戻す。

【0213】

具体的には、抗NGF抗体は、本明細書に記載される方法などの方法を用いてポリペプチドを発現して分泌するように遺伝子操作された一定の細胞を移植することによって送達することができる。一定の実施形態では、このような細胞は、動物細胞でもヒト細胞でも良く、自家、異種、またはゼノジニック (*xenogeneic*) であっても良い。一定の実施形態では、細胞は不死化することができる。他の実施形態では、免疫学的応答の可能性を低下させるために、細胞を被包して、周囲組織の浸潤を回避することができる。さらなる実施形態では、被包材料は、典型的には、タンパク質産物（複数可）の放出は可能にするが、患者の免疫系によるかまたは周囲組織からの他の有害な因子による細胞の破壊を防止する生体適合性の半透性ポリマーのエンクロージャー (*enclosure*) または膜である。

【実施例】

【0214】

行った実験および得られた結果を含む以下の実施例は、単なる例示目的のために示すものであり、本発明を限定すると解釈するべきではない。

【0215】

（実施例1）

（大腸菌細胞からのヒトNGFタンパク質の生産）

（rHu-NGF（1～120）のクローン化）

ヒトNGFをコードするヌクレオチド配列を、配列番号27および配列番号28に示されている配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーならびに標準的なPCR技術を用いてcDNAから増幅した。5'プライマーは、成熟配列のコドン1（セリン）の直前にNdeI制限部位およびメチオニン開始コドン进行形成する。3'プライマーは、終止コドンの直後にBamHI制限部位进行形成する。得られたPCR産物を、ゲル精製し、制限エンドヌクレアーゼNdeIおよびBamHIで消化し、次いで、同様にNdeIおよびBamHIで消化されたベクターpCFM1656に連結した。連結されたDNAで、大腸菌株657のコンピテント宿主細胞进行形質転換した。組換えタンパク質産物を产生する能力、および正確なヌクレオチド配列（すなわち、配列番号29）进行有するプラスミド进行保有する能力について、クローンをスクリーニングした。組換えヒトNGF1～120のアミノ酸配列は、配列番号30に示されている。

【0216】

発現ベクターpCFM1656（ATCC#69576）を、米国特許第4,710,473号に記載されている発現ベクター系から得た。pCFM1656プラスミドは、（a）T4ポリメラーゼ酵素での末端の充填、これに続く平滑末端ライゲーションによって2つの内因性NdeI制限部位进行破壊し；（b）合成P_Lプロモーターを含む唯一のClaI制限部位とAatII制限部位との間のDNA配列を、P_Lプロモーターを含むpCFM636（米国特許第4,710,473号）から得た同様のフラグメントで置換し、次いで（c）唯一のClaI制限部位とKpnI制限部位との間の小さいDNA配列を、配列番号31および配列番号32に示されているヌクレオチド配列进行有する2つのプロンプのアニーリングから得たオリゴヌクレオチドで置換することによって、記載されたpCFM836プラスミド（米国特許第4,710,473号）から得ることができる。

【0217】

大腸菌K12宿主株（Amgen株657）は、大腸菌Genetic Stock Center、Yale University、New Haven, CT（CGSC株6159）から得た大腸菌W1485（K12株）の誘導体である。

【0218】

(rHu-NGF (1~120) の発現)

NGF発現構築物(上記のような)を含む大腸菌細胞を、流加様式で富栄養培地で発酵させた。細胞を、600nmでのODが4.9になるまで30℃で増殖させ、次いで42℃に温度を変更することによって誘導した。細胞を、誘導の4時間後に遠心分離によって収集した。最終ODは、7.5であった。発現収率は、約0.15g/Lであることが決定された。

【0219】

(rHu-NGF (1~120) のリフォールディングおよび精製)

細胞ペーストを、Microfluidizerで溶解させ、10,000×gで30分間遠心分離し、ペレットを1%のデオキシコール酸で洗浄し、上記のように遠心分離し、次いで得られたペレットを冷水で洗浄して再び遠心分離した。得られたペレット(WIB-洗浄された封入体)を、変性剤(8MグアニジンHCl、50mM Tris pH 8.5 (10mM DTT含有))で再懸濁し、室温で1時間可溶化し、10,000×gで30分間遠心分離し、その上清を注意深くデカントし、次いで4℃のレドックス対を含む水性緩衝液で25倍に希釈して5日間置いた。次いで、得られたリフォールディング物を、pH3.0にまでpH調整し(titrate)、0.45μMのフィルターに通して濾過した。このリフォールディング物を、標準的なNaCl勾配を用いるSp-Septharose高速カラムで精製した。続いて、陽イオン交換カラムからのプールを濃縮し、アリコートをして-80℃で凍結させた。このタンパク質の純度を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)によって評価し、クマーシーブルー染色によって分析した。精製されたタンパク質は、この方法によると、主バンドが90%を超えていた。

【0220】

(実施例2)

(神経成長因子(NGF)に対するヒトモノクローナル抗体の生産)

(トランスジェニックHuMa bおよびKMマウス)

NGFに対する完全ヒトモノクローナル抗体を、それぞれがヒト抗体遺伝子を発現する、トランスジェニックマウスのHC o 7株、HC o 12株、HC o 7+HC o 12株、およびKM株を用いて調製した。これらのマウス株のそれぞれでは、内因性マウスκ軽鎖遺伝子は、Chenら(1993、EMBO J. 12:811-820)に記載されているようにホモ接合性に破壊されており、内因性マウス重鎖遺伝子は、国際特許出願公開第01/09187号(参考として組み入れられる)の実施例1に記載されているようにホモ接合性に破壊されていた。これらの各マウス株は、Fishwildら(1996、Nature Biotechnology 14:845-851)に記載されているようにヒトκ軽鎖導入遺伝子KC o 5を有する。HC o 7株は、米国特許第5,545,806号、同第5,625,825号、および同第5,545,807号(参考として組み入れられる)に記載されているようにHC o 7ヒト重鎖導入遺伝子を有する。HC o 12株は、国際特許出願公開第01/09187号(参考として組み入れられる)の実施例2に記載されているようにHC o 12ヒト重鎖導入遺伝子を有する。HC o 7+HC o 12株は、HC o 7およびHC o 12の両方の重鎖導入遺伝子を有し、それぞれの導入遺伝子に対して半接合性である。KMマウスは、Tomizukaら(1997、Nature Genet. 16, 133-143および2000、Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 722-727)に記載されているようにSC20重鎖導入遺伝子を含む。この導入遺伝子は、マウス染色体には組み込まれないが、代わりに独立した染色体フラグメントとして増殖させられる。このフラグメントは、約15MBのヒト第14染色体を含む。これは、全てのVH、D、およびJH遺伝子セグメントならびに全ての重鎖定常領域アイソタイプを含むヒト重鎖遺伝子座全体を含む。全てのこれらの株は、本明細書ではHuMa bマウスと呼ばれる。

【0221】

(HuMa b免疫化)

NGFに対する完全ヒトモノクローナル抗体を作製するために、HuMa bマウスを、抗原として大腸菌細胞由来の精製組換えNGFを用いて免疫化した（実施例1）。HuMa bマウスの一般的な免疫化スキームは、Lonbergらに記載されている（それぞれの教示が参考として本明細書に組み入れられる、1994、Nature 368:856-859; Fishwildら、前出、および国際特許出願公開第98/24884号）。マウスは、抗原の最初の注入に際し、6～16週齢であった。NGF抗原の精製組換え調製物（25～100 μg）を用いて、HuMa bマウスを腹腔内（IP）または皮下（SC）で免疫化した。

【0222】

HuMa bトランスジェニックマウスの免疫化は、完全フロイントアジュバント中の抗原、2回の注射、次いで不完全フロイントアジュバント中の抗原を用いた2～4週間のIP免疫化（最大で合計9回の免疫化）を用いて行った。数ダースのマウスをそれぞれの抗原に対して免疫化した。HC o 7株、HC o 12株、HC o 7+HC o 12株、およびKM株の合計118匹のマウスをNGF抗原で免疫化した。免疫応答を、眼窩後からの採血によってモニタリングした。

【0223】

ヒトNGFに結合する抗体を産生するHuMa bマウスを選択するために、免疫化マウス由来の血清を、Fishwildら、前出、によって記載されているようにELISAによって試験した。簡単に述べると、マイクロタイタープレートを、1～2 μg/mLの大腸菌由来の精製組換えNGF（実施例1）を含むPBSで、50 μL/ウェルで、4℃で一晩インキュベートしてコーティングし、次いで5%ニワトリ血清を含むPBS/Tween（0.05%）で、1ウェルにつき200 μLでブロッキングした。NGF免疫化マウス由来の血漿希釈物を、各ウェルに添加して、周囲温度で1～2時間インキュベートした。プレートをPBS/Tweenで洗浄し、次いで西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）に結合体化したヤギ抗ヒトIgG Fc特異的ポリクローナル試薬とともに室温で1時間インキュベートした。プレートをPBS/Tweenで洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）に結合体化したヤギ抗ヒトIgG Fc特異的ポリクローナル試薬とともに室温で1時間インキュベートした。洗浄後、プレートを、ABTS基質（Sigma Chemical Co.、St. Louis、MO、カタログ番号A-1888、0.22 mg/mL）を用いて発色（develop）させ、415～495 nmの波長で光学密度（OD）を決定することによって分光光度法で分析した。抗NGFヒト免疫グロブリンの十分な力価を有するマウスを用いて、下記のようにモノクローナル抗体を作製した。

【0224】

（NGFに対するヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製）

モノクローナル抗体産生用のマウスを調製し、屠殺の2日前に抗原で静脈内に追加免疫を行い、その後に脾臓を取り出した。HuMa bマウスからマウス脾細胞を単離して、標準的なプロトコルを用いてPEGでマウス骨髓腫細胞系に融合した。典型的には、各抗原に対して10～20の融合を行った。

【0225】

簡単に述べると、免疫化マウス由来の脾臓リンパ球の単細胞懸濁物を、50%PEG（Sigma）を用いてP3X63-Ag8.653非分泌マウス骨髓腫細胞（ATCC、アクセッション番号CRL1580）の総数の4分の1に融合させた。細胞を、平底マイクロタイタープレートの1ウェルにつき約 1×10^5 でプレーティングし、続いて10%ウシ胎仔血清、10%P388D1-（ATCC、アクセッション番号CRL TIB-63）馴化培地、3～5%origen（IGEN）を含むDMEM（Mediatech、カタログ番号CRL10013、高グルコース、L-グルタミン、およびビルビン酸ナトリウムを含む）、ならびに5 mM HEPES、0.055 mM 2-メルカプトエタノール、50 mg/mLゲンタマイシン、および1×HAT（Sigma、カタログ番号CRL P-7185）を含む選択培地で約2週間インキュベートした。1～2週間後

、細胞を、H A TをH Tで置換した培地で培養した。

【0226】

得られたハイブリドーマを、抗原特異的抗体の産生についてスクリーニングした。個々のウェルを、ヒト抗NGFモノクローナルIgG抗体についてELISA（上記）によってスクリーニングした。広範囲にわたるハイブリドーマの増殖が起きたら、通常は10～14日後に、培地をモニタリングした。抗体を分泌するハイブリドーマを再プレーティング（replate）し、再びスクリーニングし、依然としてヒトIgGに対して陽性である場合は、抗NGFモノクローナル抗体を、限界希釈法によって少なくとも2回サブクロン化した。次いで、安定なサブクロンをin vitroで培養して、特徴づけのために組織培養培地で少量の抗体を産生させた。

10

【0227】

（NGFに結合するヒトモノクローナル抗体の選択）

上記のようなELISAアッセイを用いて、NGF免疫原で陽性反応性を示すハイブリドーマをスクリーニングした。NGFに対して高い結合活性で結合するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマをサブクロン化してさらに特徴付けた。液体窒素中に保存する5～10のバイアルの細胞バンクを作るために、親細胞の反応性を維持している（ELISAによって決定）各ハイブリドーマ由来の1つのクローンを選択した。

【0228】

アイソタイプ特異的ELISAを行って、本明細書に開示されるように作製したモノクローナル抗体のアイソタイプを決定した。これらの実験では、マイクロタイタープレートウェルを、1μg/mLのマウス抗ヒトκ軽鎖を含むPBS溶液で、1ウェルにつき50μLでコーティングし、4℃で一晩インキュベートした。5%ニワトリ血清でブロッキングした後、プレートを、各試験したモノクローナル抗体の上清および精製されたアイソタイプコントロールと反応させた。プレートを、周囲温度で1～2時間インキュベートした。次いで、ウェルを、様々なヒトIgG特異的西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体化ヤギ抗ヒトポリクローナル抗血清と反応させ、プレートを発色させ、そして上記のように分析した。

20

【0229】

ELISAによって検出される、NGFに対する有意な結合性を示したハイブリドーマ上清から精製したモノクローナル抗体を、下記のような様々なバイオアッセイを用いて生物学的活性についてさらに試験した。

30

【0230】

（実施例3）

（強力なNGF中和活性を有する抗NGF抗体の選択およびクローン化）

NGF活性のインヒビターとして（すなわち、NGF「中和」）、実施例2で最初に同定された抗体の有効性を、それぞれの改変されたペプチドが、パニロイドレセプター-1（VR1）発現のNGF誘導を阻止する能力を測定することによって評価した。

【0231】

（後根神経節ニューロン培養）

時期を見て妊娠させた、終末麻酔したSprague-Dawleyラット（Charles River, Wilmington, MA）の子宮から外科的に取り出した、胎齢19日（E19）のラットの全ての脊髄分節から、無菌条件下で後根神経節（DRG）を1つずつ切り離した。5%熱不活化ウマ血清（GibcoBRL, Grand Island, NY）を含む氷冷L-15培地（GibcoBRL）にDRGを集め、任意の疎性結合組織および血管を取り除いた。pH7.4の、Ca²⁺およびMg²⁺を含まないダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（DPBS）（GibcoBRL）で、DRGを2回リンスした。次いで、DRGを、パパイン解離系（Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ）を用いて単一細胞懸濁物へと解離させた。簡単に述べると、DRGを、アール平衡塩溶液（EBSS）において20U/mLのパパインを含む消化溶液中、37℃で50分間インキュベートした。1:1のMEM/

40

50

Ham's F12、1 mg/mL オボムコイドインヒビター、および 1 mg/mL オボアルブミン、および 0.005 % デオキシリボヌクレアーゼ I (DNase) からなる解離培地中で、先端熱加工 (fire-polished) パスツールピペットを用いたすりつぶしによって細胞を解離させた。

【0232】

解離した細胞を、5 分間、 $200 \times g$ でペレット化し、1 mg/mL のオボムコイドインヒビター、1 mg/mL のオボアルブミン、および 0.005 % DNase を含む EBS で再懸濁した。細胞懸濁物を、10 mg/mL のオボムコイドインヒビター、10 mg/mL のオボアルブミンを含む勾配溶液で、 $200 \times g$ で 6 分間遠心分離して細胞デブリを除去し、次いで $88 \mu m$ のナイロンメッシュ (Fisher Scientific、Pittsburgh, PA) に通して濾過して全ての凝集塊を除去した。血球計数器を用いて細胞数を決定し、細胞を、完全培地中、 10×10^3 細胞/ウェルで、ポリオルニチン $100 \mu g/mL$ (Sigma、St. Louis, MO) およびマウスラミニン $1 \mu g/mL$ (Gibco BRL) でコーティングした 96 ウェルプレートに入れた。この完全培地は、1:1 の最小必須培地 (MEM) および Ham's F12、ペニシリン ($100 U/mL$)、ストレプトマイシン ($100 \mu g/mL$)、および 10 % 熱不活化ウマ血清 (Gibco BRL) から構成された。この培養物を、 $37^\circ C$ 、5 % CO_2 、および 100 % の湿度で維持した。非ニューロン細胞の増殖を制御するために、5-フルオロ-2'-デオキシウリジン ($75 \mu M$) およびウリジン ($180 \mu M$) を培地に含めた。

【0233】

(NGF および抗 NGF を用いた処置)

プレATINGの2時間後に、細胞を、組換えヒト β -NGF (Amgen) または組換えラット β -NGF (R&D Systems、Minneapolis, MN) で、 $10 ng/mL$ の濃度 ($0.38 nM$) で処理した。連続希釈した抗 NGF 抗体 (R&D Systems) を含む陽性コントロールを、それぞれの培養プレートに適用した。試験抗体を、3.16 倍の連続希釈法を用いて 10 個の濃度で添加した。全てのサンプルを、培養物に添加する前に完全培地で希釈した。インキュベーション時間は、VR1 発現の測定の前の 40 時間とした。

【0234】

(DRG ニューロンにおける VR1 発現の測定)

培養物を、4 % パラホルムアルデヒドを含むハンクス平衡塩溶液で 15 分間固定し、Superblock (Pierce、Rockford, IL) でブロッキングし、0.25 % Nonidet P-40 (Sigma) を含む Tris-HCl (Sigma) 緩衝生理食塩水 (TBS) を用いて室温で 1 時間、透過処理した。培養物を、0.1 % Tween 20 (Sigma) を含む TBS で 1 回リンスし、ウサギ抗 VR1 IgG と共に室温で 1 時間半インキュベートし、続いて Eu 標識した抗ウサギ二次抗体 (Wallac Oy、Turku, Finland) と共に室温で 1 時間インキュベーションした。それぞれの抗体のインキュベーション後に、TBS で洗浄した (ゆっくり振盪しながら 3×5 分)。増強溶液 ($150 \mu L$ /ウェル、Wallac Oy) を培養物に添加した。次いで、蛍光シグナルを、時間分解蛍光光度計 (Wallac Oy) で測定した。改変ペプチドで処理したサンプル中の VR1 発現を、 $0 \sim 1000 ng/mL$ の NGF 漸増標準曲線と比較することによって決定した。DRG ニューロンにおける VR1 発現に対する NGF 効果の阻害パーセント (最大可能阻害と比較) を、NGF 処理されていないコントロールと比較することによって決定した。結果を表 2 および表 5 に示す。

【0235】

細胞系に、#110 ~ #129 のラベルを付けた。細胞系 #119、#124、および #125 由来の抗体は、非常に強力な NGF 中和活性を実証した (図 1)。#124 細胞系は、4D4 と呼ばれる親細胞系であった。#119 および #125 細胞系は、4D4 親のサブクローンであった。ハイブリドーマ #124 (4D4) を含むもとのバイオ

ルからさらなるサンプルを増殖させて、# 1 6 7 (4 D 4) のラベルを付けた。

【 0 2 3 6 】

ハイブリドーマ # 1 6 7 (4 D 4) によって産生された抗体を、前のサンプルと同じ D R G ニューロンベースの N G F 中和アッセイに供した。抗体 # 1 6 7 (4 D 4) は、 IC_{50} が 0 . 5 0 n M の強力な抗 N G F 活性を実証し (図 2) 、これは、サンプル # 1 1 9 、# 1 2 4 、および # 1 2 5 の活性に一致する。4 つのサンプルの活性を表 2 に示す。

【 0 2 3 7 】

【表 2】

表2

0. 38nM hNGFを用いたDRG細胞における抗hNGF活性	
コード #	IC50
119 (124由来)	< 1.2 nM
124 (親)	< 0.57 nM
125 (124由来)	< 0.3 nM
167 (124と同じサンプルに由来)*	0.50 nM

(N 末端配列決定および質量分析)

精製した抗 N G F ハイブリドーマ抗体サンプルを、タンパク質の配列決定および L C / M S 分析のために調製した。容積が 1 5 m L 未満になるまで A m i c o n c e n t r i p r e p - 3 0 を用いて培地を濃縮することにより、抗体を馴化培地から精製した。r P r o A (P h a r m a c i a) レジンのバッチを、P B S で 4 回洗浄し、最後の洗浄の後に P B S で 5 0 % スラリーを形成した。適切な量の r P r o A レジン (レジン 1 μ L あたり約 5 μ g の抗体であるが、少なくとも 5 0 μ L のレジンを使用する) を、抗体サンプルに添加し、4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。A b - レジン混合物を遠心分離し、未結合の画分を収集した。0 . 5 m L P B S を添加して 0 . 4 5 μ m S p i n - X (C o S t a r) 管に移した後、サンプルを 1 0 0 0 0 r p m で 3 分間遠心分離した。次に、レジンを 0 . 5 m L P B S で少なくとも 3 回洗浄し、次いで 0 . 1 M グリシン (p H 2 . 7) をレジンの 1 . 5 倍量で添加し、室温で 1 0 分間インキュベートし、続いて 1 0 0 0 0 r p m で 3 分間さらに遠心分離し、上清を収集した。この溶出工程をさらに 2 回繰り返し、次いで合わせた上清を、1 / 2 5 倍量の 1 . 0 M t r i s (p H 9 . 2) で中和した。

【 0 2 3 8 】

新たな S p i n - X 管 (0 . 2 μ m) を用いた最終濾過工程の後、標準としてヒト I g G を用いる標準 B r a d f o r d アッセイを用いて、または大きいサンプルには代替として 2 8 0 の吸光度を用いて、抗体を定量化した。またゲルを、2 μ g の各サンプルと共に 2 μ g のヒト I g G 1 , k (S i g m a) を用いて泳動させた。質量分析のために、4 μ g のサンプルを脱グリコシル化し、還元し、F i n i n g a n L C Q 質量分析にオンライン接続された H P L C (H P 1 0 9 0) にロードした。軽鎖を、逆相 H P L C によって重鎖から分離した。また軽鎖および重鎖を、N 末端タンパク質配列決定分析のために収集した。

【 0 2 3 9 】

抗 N G F # 1 6 7 (4 D 4) 抗体のサンプルの軽鎖および重鎖の両方の N 末端配列が、抗 N G F # 1 1 9 (4 D 4) 抗体のサンプルの両方の N 末端配列に一致した。加えて、抗体の測定質量により、# 1 6 7 および # 1 1 9 ハイブリドーマ由来の単離された抗体が同じであることが示された。抗 N G F # 1 6 7 の軽鎖の測定デコンボリューション (d e c o n v o l u t e d) 質量 (2 3 0 9 6) は、抗 N G F A b # 1 1 9 の軽鎖の測定質量 (2 3 0 9 6) に一致した。

【 0 2 4 0 】

10

20

30

40

50

(抗NGF抗体の重鎖および軽鎖のクローン化)

最も強力なNGF結合モノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ、4D4、D7を供給源として使用して、TRIzol (登録商標) 試薬 (Invitrogen) を用いて全RNAを単離した。第1鎖cDNAを、伸長アダプター (5'-GGC CGG ATA GGC CTC CAN NNN NNT-3') (配列番号33) と共にランダムプライマーを用いて合成し、次いで5'RACE (cDNA末端の迅速増幅) 調製アッセイ (preparative assay) を、GeneRacerTM Kit (Invitrogen) を用いて製造業者の取扱説明書にしたがって行った。完全な軽鎖をコードするcDNAを調製するために、順方向プライマーを、GeneRacerTM ネスト化プライマーとし、逆方向プライマーを、5'-GGG GTC AGG CTG GAA CTG AGG-3' (配列番号34) とした。重鎖可変領域をコードするcDNAを調製するために、順方向プライマーを、GeneRacerTM ネスト化プライマーとし、逆方向プライマーを、5'-TGA GGA CGC TGA CCA CAC G-3' (配列番号35) とした。RACE産物を、pCR4-TOPO (Invitrogen) にクローン化して、その配列を決定した。コンセンサス配列を用いて、完全長の抗体鎖PCR増幅用のプライマーをデザインした。

【0241】

抗NGF 4D4、D7κ軽鎖をコードするcDNAを調製するために、5'PCRプライマーは、シグナル配列のアミノ末端、XbaI制限酵素部位、および最適化Kozak配列 (5'-CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GG A CAT GAG GGT GCC CGC TCA GCT CCT GGG-3'; 配列番号36) をコードした。3'プライマーは、カルボキシル末端および終止コドン、ならびにSalI制限部位 (5'-CTT GTC GAC TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT C-3'; 配列番号37) をコードした。得られたPCR産物のフラグメントを精製し、XbaIおよびSalIを用いて消化し、次いでゲル単離し、哺乳動物発現ベクターpDSRα20に連結した (あらゆる目的に対して参考として本明細書に組み入れられる国際特許出願公開第90/14363号を参照されたい。pDSRα20は、部位特異的変異誘発によってpDSRa19のヌクレオチド2563を「グアノシン」から「アデノシン」に変更することによって作製した)。

【0242】

抗NGF 4D4、D7重鎖をコードするcDNAを調製するために、5'PCRプライマーは、シグナル配列のアミノ末端、XbaI制限酵素部位、および最適化Kozak配列 (5'-CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GG A GTT GGG GCT GTG CTG GGT TTT CCT TGT T-3'; 配列番号38) をコードした。3'プライマーは、カルボキシル末端および終止コドン、ならびにSalI制限部位 (5'-GCA TGT CGA CTC ATT TAC CCG GAG ACA GGG AGA G-3'; 配列番号39) をコードした。得られた産物を精製し、XbaIおよびSalIを用いて消化し、ゲル単離し、pDSRα20ベクターに連結した。

【0243】

抗NGF Ab 4D4クローンの軽鎖のDNA配列のヌクレオチド配列を予測されるアミノ酸に翻訳して、そのアミノ酸の分子量を合算することによって決定した計算質量 (23099) は、質量分析によって決定された測定質量に一致した。抗NGF Ab #167の重鎖の測定されたデコンボリューション質量 (49479) は、機器によるずれの範囲内で、抗NGF Ab #119の重鎖の測定質量 (49484) に一致し、さらに抗NGF Ab 4D4クローンの重鎖のDNA配列の理論質量 (49484) に一致した (表3)。

【0244】

N末端のタンパク質配列およびLC/MSのデータにより、ハイブリドーマ#119がハイブリドーマ#167と同じ抗体を発現したことが確認された。加えて、配列に基づい

10

20

30

40

50

た抗体の計算質量により、この観察結果がさらに確認された。

【0245】

【表3】

表3—質量分析結果のまとめ

抗 NGF Ab	Ab #167 の測定質量	Ab #119 の測定質量	Ab 4D4のDNA配列から得た理論質量
軽鎖	23096	23096	23099
重鎖	49479	49484	49484

10

(実施例4)

(チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞における抗NGF抗体の発現)

4D4抗NGF mAbの安定な発現を、リン酸カルシウム法を用いた、4D4—重鎖／pDSRα19 IgG2または4D4重鎖／pDSRα19 IgG1およびNGF—κ／pDSRα19プラスミドの、ジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損 (DHFR⁻) 無血清適応チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞への共トランスフェクションによって達成した。トランスフェクト細胞を、透析血清を含むがヒポキサンチン—チミジンを含まない培地で選択して、DHFR酵素を発現する細胞の増殖を確認した。トランスフェクトクローンを、アッセイ、例えば、ELISAでスクリーニングして、馴化培地中における4D4抗NGF mAbの発現を検出した。発現が最大のクローンに対して、DHFR増幅のためにメトトレキセート (MTX) の濃度を上昇させた。馴化培地中における4D4抗NGF mAbのさらに高い発現を検出するために、MTX増幅クローンを、アッセイ、例えば、ELISAでスクリーニングした。発現が最大のクローンを、サブクローン化に供して均一な集団を得て、細胞バンクを作製した。

20

【0246】

本発明の組換え抗NGF抗体を、抗NGFモノクローナル抗体用の上記のプロトコルと同じプロトコルを用いて、DHFR欠損チャイニーズハムスター卵巣細胞において作製することができる。本発明の各抗NGF抗体の完全な重鎖または軽鎖をコードするDNA配列を、発現ベクターにクローン化する。CHO細胞を、適切な抗NGF抗体の完全な重鎖を発現できる発現ベクターおよび完全な軽鎖を発現できる発現ベクターを用いて共トランスフェクトする。例えば、抗NGF抗体を作製するために、配列番号40に示されているアミノ酸配列を含む完全な重鎖を発現できるベクターおよび配列番号44に示されているアミノ酸配列を含む完全な軽鎖を発現できるベクターを用いて細胞を共トランスフェクトする。表4は、様々なIgGの重鎖定常領域を有する4D4抗体についての完全な重鎖および完全な軽鎖のまとめである。

30

【0247】

【表 4】

表4

抗体	重鎖可変領域 + 重鎖定常領域	完全な重鎖
4D4(IgG2)	配列番号 10 + 配列番号 4	配列番号 40
4D4(IgG1)	配列番号 10 + 配列番号 2	配列番号 41
4D4(IgG4)	配列番号 10 + 配列番号 6	配列番号 42
4D4(IgG3)	配列番号 10 + 配列番号 26	配列番号 43
抗体	軽鎖可変領域 + 軽鎖定常領域	完全な軽鎖
4D4	配列番号 12 + 配列番号 8	配列番号 44

10

(実施例 5)

(抗 NGF 4D4 抗体の活性の特徴付け)

スピナー (S) またはローラー (R) の条件下で増殖した細胞で作製された、一過性発現抗 NGF 4D4 抗体を、上記 (実施例 3) のように行われる DRG ニューロンベースの NGF 中和バイオアッセイにおいて、NGF を中和する能力を確認するために試験した。

20

【0248】

NGF 抗体は、無血清懸濁適応 293T 細胞で一過性に発現された。500 mL または 1 L の培養物のいずれかとしてトランスフェクションを行った。手短に述べると、細胞接種物 (5.0×10^5 細胞/mL × 培養容積) を 2, 500 RPM、4℃ で 10 分間遠心分離して馴化培地を除去した。細胞を、無血清 DMEM で再懸濁し、再び 2, 500 RPM、4℃ で 10 分間遠心分離した。洗浄液を吸引した後、細胞を、1 L または 3 L のスピナーフラスコ培養における増殖培地 [DMEM/F12 (3:1) + 1 × インスリントランスフェリン-セレンウム補充物 + 1 × Pen Strep Glut + 2 mM レーグルタミン + 20 mM HEPES + 0.01% プルロニック F68] で再懸濁した。スピナーフラスコ培養物を、37℃ および 5% CO₂ に維持される加湿インキュベーターに入れられた磁気攪拌プレート上で 125 RPM で維持した。プラスミド DNA を、50 mL コニカルチューブ内でトランスフェクション試薬と複合体化させた。DNA-トランスフェクション試薬複合体を、無血清 DMEM 中、5% 最終培養容積において調製した。培養物 1 mL 当たり 1 μg のプラスミド DNA を、まず無血清 DMEM に添加し、続いて培養物 1 mL 当たり 1 μL の X-Treme Gene RO-1539 を添加した。この複合物を、室温で約 30 分間インキュベートし、次いでスピナーフラスコの細胞に添加した。トランスフェクション/発現を 7 日間行った後、この馴化培地を、4,000 RPM、4℃ の 60 分間の遠心分離によって収集した。

30

【0249】

ローラーボトルの一過性トランスフェクションのために、本発明者らは、5% FBS + 1 × 非必須アミノ酸 + 1 × Pen Strep Glut + 1 × ピルビン酸ナトリウムを補充した DMEM で増殖させて維持した 293T 接着細胞を使用した。約 $4 \sim 5 \times 10^7$ 個の 293T 細胞を、850 cm² のローラーボトル中に一晩置いた (seed)。次いで、あらかじめ置いておいた細胞を、FuGene 6 トランスフェクション試薬を用いて翌日トランスフェクトした。DNA-トランスフェクション試薬混合物を、約 6.75 mL の無血清 DMEM で調製した。675 μL の FuGene 6 トランスフェクション試薬を、まず添加し、続いて 112.5 μg のプラスミド DNA を添加した。この複合体を、室温で 30 分間インキュベートした。次いで全混合物をローラーボトルに添加した。このローラーボトルに、5% CO₂ ガス混合物を供給し、しっかりとキャップを締め、0.35 RPM で回転するローラーラック上に置き、37℃ のインキュベーターに入れた。トランスフェクションを 24 時間行った後、培地を、100 mL DMEM + 1 × インスリン

40

50

ートランスフェリンーセレニウム補充物+1×Pen Strep Glu+1×非必須アミノ酸+1×ピルビン酸ナトリウムで交換した。典型的には、2つの100mLの48時間後の回収物を各ローラボトルから得た。この回収した無血清馴化培地を一緒にプールして、4,000RPM、4℃で30分間遠心分離した。

【0250】

4D4.IgG1および4D4.IgG2は共に、ヒトNGFに対して約0.14nM～約0.2nMのIC₅₀値を有する強力な活性を示した(図2)。活性アッセイの結果は表5にまとめる。これらの抗体は、ラットNGFに対してほとんど活性を示さなかった(図3)。この結果は、上記のハイブリドーマから直接試験した抗体の活性に類似している。

【0251】

【表5】

表5

Ab	IC ₅₀ @ hNGF (nM)	IC ₅₀ @ rNGF (nM)
4D4.IgG1.R	0.1488	> 34 nM
4D4.IgG1.S	0.1587	> 45 nM
4D4.IgG2.R	0.2047	> 59 nM
4D4.IgG2.S	0.2063	> 37 nM

hNGF = ヒト NGF、rNGF = ラット NGF、R = ローラー培養、
S = スピナー培養

(実施例6)

(抗NGF抗体の生産)

抗NGF抗体を、CHO細胞のクローン系での発現によって生産する。それぞれの産生を行うために、1つのバイアル由来の細胞を無血清細胞培養培地で解凍する。この細胞を、まずTフラスコで増殖させ、続いてスピナーフラスコで増殖させ、次いで2000Lバイオリアクターまで規模が拡大するステンレススチールリアクターで増殖させる。生産は、流加培養法を用いて2000Lバイオリアクターで行い、ここでは細胞の増殖および培養物の生存度を維持するために濃縮された培地成分を含む栄養供給物を加える。生産は約2週間続き、この間、抗NGF抗体が上記細胞によって構成的に産生され、細胞培養培地に分泌される。

【0252】

生産リアクターは、設定したpH、温度、および溶存酸素レベルにおいて制御する：pHは、二酸化炭素ガスおよび炭酸ナトリウムの添加によって制御する；溶存酸素は、空気、窒素、および酸素のガスフローによって制御する。

【0253】

生産の最後に、細胞ブロスディスクスタック遠心分離して、培養上清を細胞から分離する。この濃縮物を、デプスフィルター、続いて0.2μmのフィルターに通してさらに浄化する。次いで、浄化した馴化培地を、接線流限外濾過によって濃縮する。馴化培地を15～30倍に濃縮する。次いで、得られた濃縮馴化培地を、精製によって処理するか、または後日精製するために凍結する。

【0254】

(実施例7)

(他のニューロトロフィンとの交差反応性)

4D4抗体を、ヒトNT3についてのDRGニューロン生存アッセイおよびヒトBDNFについての培養DAニューロンにおけるDA取り込みのアッセイを含む様々なバイオアッセイにおいて、ヒトNT3またはヒトBDNFに対するその交差反応性について試験した。

【0255】

10

20

30

40

50

(NT 3、抗NT 3、および抗NGF抗体を用いたDRG培養物の処理)

プレATINGの2時間後、DRG細胞(実施例3で上記された単離手順)を、100 ng/mL (3.8 nM)の組み換えhNT-3で処理した。連続希釈した抗hNT 3抗体(R&D)を陽性コントロールとして用いた。未知の物質(抗NGF Abサンプル)を、10ポイントの3.16倍連続希釈の様々な濃度で添加した。全てのサンプルを完全培地で希釈してから培養物に添加した。

【0256】

(DRGニューロンにおけるMAP2発現の測定)

培養物を、4%パラホルムアルデヒドを含むハンクス平衡塩溶液を用いて15分間固定し、Superblock(Pierce)で1時間ブロッキングし、0.25% Nonidet P-40(Sigma)を含むTris-HCl(Sigma)緩衝生理食塩水(TBS)を用いて室温(RT)で1時間、透過処理した。培養物を、0.1% Tween 20(Sigma)を含むTBSで1回リンスし、マウス抗MAP2 IgG(Chemicon、Temecula, CA)と共に室温で1.5時間インキュベートし、続いてEu標識した抗マウス二次抗体(Wallac Oy、Turku, Finland)と共に室温で1時間インキュベーションした。それぞれの抗体のインキュベーション後に、TBSで洗浄した(おだやかに振盪しながら3×5分)。増強溶液(150 mL/ウェル、Wallac Oy)を培養物に添加し、次いで蛍光シグナルを、時間分解蛍光度計(Wallac Oy)で測定した。

【0257】

(胚性中脳培養物)

胎齢19日(E19)のSprague-Dawleyラット(Jackson Labs)を使用した。ドーパミン作動性ニューロンが豊富な腹側中脳組織を取り出して、Ca⁺⁺およびMg⁺⁺を含まない冷ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(DPBS)、pH 7.4(Gibco)に移した。組織フラグメントは、パパイン解離系(Worthington Biochemical Corp.、Freehold, NJ)を用いて単一細胞懸濁物へと解離させた。簡単に述べると、組織フラグメントを、アール平衡塩溶液(EBSS)において20単位/mLのパパインを含む消化溶液中、37℃で50分間インキュベートした。1:1のMEM/Ham's F12、1 mg/mLオボムコイドインヒビター、および1 mg/mLオボアルブミン、および0.005%デオキシリボヌクレアーゼI(DNase)からなる解離培地で、先端熱加工パストールピペットを用いたすりつぶしによって細胞を解離させた。解離した細胞を、5分間、200×gでペレット化し、1 mg/mLのオボムコイドインヒビター、1 mg/mLのオボアルブミン、および0.005% DNaseを含むEBSSで再懸濁した。細胞懸濁物を、10 mg/mLのオボムコイドインヒビター、10 mg/mLのオボアルブミンを含む勾配溶液で、200×gで6分間遠心分離して細胞デブリを除去し; 25 μg Nitexナイロンメッシュ(Tetko, Inc.)に通して濾過して凝集塊を除去した。解離した細胞を、100,000/cm²の密度で組織培養プレートにプレATINGした。このプレートは、既に記載したように、ポリオルニチン100 μg/mL(Sigma)およびマウスラミニン1 μg/mL(Gibco BRL)で事前にコーティングした(Louis JCら、J. Pharmacol. Exp. Ther. 1992; 262:1274-1283)。この培養培地は、1:1の最小必須培地(MEM)/Ham's F12、12%ウマ血清(Gibco)、100 μg/mLのトランスフェリン、および2.5 μg/mLのインスリン(Sigma)から構成された。この培養物を、37℃、5% CO₂、および100%の湿度で6日間維持した。

【0258】

(BDNFおよび抗BDNFまたは抗NGFを用いた中脳培養物の処理)

プレATINGの2時間後に、10 ng/mLのBDNFを細胞に添加し、続いて連続濃度の抗NGF Abサンプルを添加した。抗BDNF抗体(Amgenで生成)を陽性コントロールとして用いた。

【0259】

(中脳ニューロンにおけるDA取り込み)

ドーパミン取り込みアッセイを、既に記載されているように行った (Friedman, L. および Mytilineou, C., Neuroscience Letters 1987; 79: 65-72)。6日目に、培養物を、5.6 mM グルコース、1.3 mM EDTA、および 0.5 mM パルギリン、モノアミンオキシダーゼインヒビターを含む予め温めたクレブスーリンゲルリン酸緩衝液 (pH 7.4) で1回洗浄した。この培養物を、50 nM [^3H] DA (NEN) を含む取り込み緩衝液中、37℃で60分間インキュベートした。取り込み緩衝液を除去して取り込みを停止させ、培養物をクレブスーリンゲルリン酸緩衝液で3回洗浄した。細胞を液体シンチレーションカクテル、opti phase supermix (Wallac) を添加することによって溶解させ、[^3H] DA を培養物に直接放出させた。次いで、この細胞溶解物を、micro beta-plus 液体シンチレーションカウンター (Wallac, Inc.) で放射活性についてカウントした。0.5 mM GBR12909、高親和性のDA取り込み部位の特異的なインヒビター (Heikkila RE および Mazino L, European Journal of Pharmacology 1984; 103: 241-8) を取り込み緩衝液に添加することによって低親和性のDA取り込みを評価して、この値を総取り込み量から減じて高親和性DA取り込み値を得た。

【0260】

【表6】

表6

抗体	IC ₅₀ @ hNT-3 (nM)	IC ₅₀ @ hBDNF (nM)
4D4 (IgG2)	> 13.75	> 13.75

(実施例8)

(抗NGF抗体のエピトープの同定)

(限定タンパク質分解によるエピトープマッピング)

5 マイクログラム (μg) のNGFを、4D4 (11 μg) と共に0.1 M Tris 緩衝液、pH 7.5中、4℃で30分間インキュベートした。次いで、この複合体をプロテアーゼ (サブチリシン) 1 μg を用いて37℃で1時間および2時間消化した。HPLC ペプチドマップを、4D4抗体によって保護されたペプチドを探すために互いに比較した。NGFの限定タンパク質分解により、いくつかの大きなペプチドがNGFから最初に放出されたことが示された。特に興味深いペプチドS18.3、S18.5およびS34.4が産生され、タンパク質分解から抗体で保護された。他のピークは、有意に形成または保護されなかった。2つの実験での保護されたペプチド (1時間および2時間の消化) を表7に示す。

【0261】

【表 7】

表7

			% 保護	
			1 時間の消化	2 時間の消化
S16.1	QAA (96-98)	C 末端	--	57
S18.3	FFETK (53-57) (配列番号 45)	ループ領域	40	45
S18.5	SSSHPIFHR (1-9) (配列番号 46) (HWNSY)* (配列番号 47)	N 末端	40	50
S34.4	NSVEKQYFFETK (46-57) (配列番号 48)	ループ領域	69	38

保護のパーセンテージは、ペプチドのピーク高から計算した。S18.5は、2つのペプチドを含んでいたが、1つのペプチド（SSSHPIFHR；配列番号46）のみが、4D4抗体で保護された。なぜなら他方のペプチドのピーク（HWNSY；配列番号47）は、280nmの吸光度で検出されたように、4D4抗体の添加によって変化しなかったためである。ペプチドS18.3は、S34.4のC末端部分であり、両方とも同じループ領域由来である。N末端および中心ループ領域も、潜在的なエピトープであった。

【0262】

（消化されたペプチドのMicroconによる分離）

サブチリシンで消化された材料（それぞれ3μg）を、活性な4D4抗体および不活性なモノクローナル抗体（#162）（8μg）と共に、0.1M Tris緩衝液、pH 7.5中、4℃で30分間インキュベートした。結合／非結合のペプチドを、Microcon 10（Millipore Corp.、Bedford, Mass）によって分離し、抗体に結合したペプチドを探すために両方の画分（結合および非結合）をHPLCによって分析した。4D4抗体および#162で処理し、Microcon分離した後、非結合画分のHPLC比較によって同定された2つの低下ピークを回収し、抗体結合ペプチドを示した。4D4結合ペプチドは：

S1（4.4）-----SRKAVRR（113～119）（配列番号49）、C末端；および

S2（28.3）-----EVMVL（35～39）（配列番号50）、ループ領域であった。

【0263】

代替的に、NGFサンプルを、Lys-C（K）を用いて24時間消化した。システイン残基を変性剤を用いずに還元してカルボキシメチル化した。サンプルを、モノクローナル抗体4D4およびAMG162と共にインキュベートし、続いてMicrocon 100で分離した。結合画分および非結合画分を、逆相HPLCによって分析した。2つのペプチドのみが、以下に示されているように抗体結合Kペプチドとして同定された。配列分析によって決定したペプチドの計算質量とそのペプチドの質量分析は一致していた。以下に示されているように、これらのペプチドを、N末端およびC末端領域にマッピングした。

K1（37.6）-----SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDK（配列番号51）

計算質量＝2821；観察質量＝2828.2；N末端

K2（39.5）-----QAARFIRIDTACVCLSRK（配列番号52）

計算質量＝2452；観察質量＝2459.5；C末端。

【 0 2 6 4 】

前のエピトープマッピング実験により、N末端領域（1～9）、内部領域（46～57）、およびC末端（96～98）領域を含む少なくとも3つの領域が、4D4抗体の潜在的なエピトープであることが示された。加えて、AspN消化により、――SSHP I F H R G E F S V C――（配列番号53）からなるペプチドフラグメントが4D4抗体によって保護されることが明らかになった一方、トリプシン消化により、――SSHP I F H R――（配列番号54）からなるペプチドフラグメントが4D4抗体によって保護されないことが示された。したがって、N末端では、G E F S V C（配列番号55）の配列が、4D4抗体への結合に最も重要である。

【 0 2 6 5 】

抗NGF抗体4D4. IgG1のエピトープをさらに明確に定義するために、全ヒト成熟NGF（hNGF）配列に基づく標準的な技術を用いて、合計23個のペプチドを合成的に作製した（表8）。このペプチドは、10アミノ酸まで重複している15アミノ酸長であり、C末端のシステインテイルがマトリックスへの結合を可能にしている。上記のヒト抗hNGF Ab 4D4. IgG1を、マッピング実験に使用した。

【 0 2 6 6 】

【表8－1】

表8

ペプチド #	配列	配列番号
33582-27-01	SSSHPIFHRGEFSVC (1-15)	56
33582-27-02	IFHRGEFSVADSVSVC (6-20)	57
33582-27-03	EFSVADSVSVWVGDKC (11-25)	58
33582-27-04	DSVSVWVGDKTTATDC (16-30)	59
33582-27-05	WVGDKTTATDIKGKEC (21-35)	60
33582-27-06	TTATDIKGKEVMVLGC (26-40)	61
33582-27-07	IKGKEVMVLGEVNIN (31-45)	62
33582-27-08	VMVLGEVNINNSVFKC (36-50)	63
33582-27-09	EVNINNSVFKQYFFEC (41-55)	64
33582-27-10	NSVFKQYFFETKARDC (46-60)	65
33582-27-11	QYFFETKARDPNPVDC (51-65)	66
33582-27-12	TKARDPNPVDSGARDC (56-70)	67
33582-27-13	PNPVDSGARDIDSKHC (61-75)	68
33582-27-14	SGARDIDSKHWNSYC (66-80)	69
33582-27-15	IDSKHWNSYATTTHTC (71-85)	70
33582-27-16	WNSYATTTHTFVKALC (76-90)	71

【 0 2 6 7 】

【表 8 - 2】

ペプチド #	配列	配列番号
33582-27-17	TTTHTFVKALTMDGKC (81-95)	72
33582-27-18	FVKALTMDGKQAAWRC (86-100)	73
33582-27-19	TMDGKQAAWRFIRIDC (91-105)	74
33582-27-20	QAAWRFIRIDTAAVC (96-110)	75
33582-27-21	FIRIDTAAVAVLSRKC (101-115)	76
33582-27-22	TAAVAVLSRKAVRRAC (106-120)	77
33582-27-23	CAAVAVLSRKAVRRA (107-120)	78

10

ヒトNGFペプチドフラグメントを、5% DMSOおよび1mM EDTAを含むPBS、pH 6.23で希釈した。最終ペプチド濃度は、同じモル濃度に標準化した(55 μM (約100 μg/mL))。ペプチドを、Reacti-Bind Maleimide 活性化96ウェルマイクロタイタープレート(Pierce、カタログ番号15150)において、1ウェルにつき100 μLで、室温で2時間インキュベートし、次いで4℃で一晩攪拌した。ヒトNGF(100 μg/mL)を陽性コントロールとして用いた。このプレートを、洗浄緩衝液(KPL)で洗浄し、0.2%脱脂粉乳(PBS-EDTA緩衝液に含まれている、pH 6.23)を用いて室温で2時間ブロッキングし、次いで5% BSAを用いてさらに1時間ブロッキングした。次いで、プレートを、様々な濃度(0、3、10、30 μg/mL)のヒト抗NGF抗体と共にインキュベートし、続いてヤギ抗hFcaAb-HRP(KPL)と共に2時間インキュベートした。シグナルをTMB基質で発色させて、停止溶液(KPL)の添加後に450 nmで読み取った。

20

【0268】

23個のヒトNGFペプチドにわたって、4D4結合を示す少なくとも4つの主なピークが観察された。これらのピークは、以下のペプチドに一致した：ペプチド#1(配列番号56)、SSSHPIFHRGEFSVC(1~15)；ペプチド#10(配列番号65)、NSVFKQYFFETKARD(46~60)；ペプチド#16~17(配列番号71~配列番号72)、WNSYATTTHTFVKAL---(76~95)；およびペプチド#18~21(配列番号73~配列番号76)、TTTHT---LSRKC(100~115)。

30

【0269】

4D4の4つの結合ピークを、Weismannら(1999、Nature 401:184-8)に記載されているように、NGFにおけるN末端、C末端、内部ドメインならびに、ループL2およびL4にマッピングした。これらの結果を表9にまとめる。

【0270】

【表 9】

表9

40

hNGF エピトープ	N末端	L2	内部	L4	内部	C末端
ペプチド #	ペプチド #1 (配列番号 56), SSSHPI---, 1-15	ペプチド #10 (配列番号 65), NSVFKQ---, 46-60	ペプチド #16 (配列番号 71), WNSYA---, 76-90	ペプチド #17 (配列番号 72), TMDGKQ---, 81-95	ペプチド #19 (配列番号 74), TMDGK---, 91-105	ペプチド #20-21 (配列番号 75 - 配列番号 76), QAAWR---, 96-115
Ab 結合シグナル	+++	+	++	++	+++	++

W i e s m a n n らは、t r k A レセプターに結合したhNGFの結晶構造を解明し、

50

これによりN末端（残基2～9）がレセプター結合に重要であることを示した（Wiesmannら、1999、Nature 401:184-8）。また、NGFにおけるこのセグメントの残基は、trkBレセプターまたはtrkCレセプターよりもtrkAレセプターへの特異性にとって重要である。抗体4D4は、恐らく、ヒトNGFと他のニューロトロフィンとの間のN末端の相違のために、マウス／ラットNGF、ならびにBDNFおよびNT-3よりもヒトNGFに対して選択的である。

【0271】

抗体4D4は、ループL2およびL4のそれぞれに相当するペプチド#10（配列番号65）（NSVFKE--、46～60）およびペプチド#17（配列番号72）（TTHTFVKALTM DGKC、81～95）に結合し、ループL2およびL4は、ニューロトロフィンにおける平均の配列多様性よりも高い配列多様性を有する7つの別個の領域の内の2つを表す。これらの7つの領域のNGFとBDNFとの間のスワッピング実験により、L2およびL4が、NGFの生物学的活性にとって重要であることが示された。さらに、ループL2およびL4における5つのNT3残基のNGFの残基での置換により、NT3活性を維持したままNGF様活性が導入された。したがって、L2およびL4は、抗体4D4がBDNFまたはNT-3ではなくNGFに選択的に結合するための領域である可能性が高い。

【0272】

抗体4D4はまた、NGF結晶構造の内部ドメインに一致するペプチド#16（配列番号71）（WNSYATTTHTTFVKAL、76～90）に結合する。この領域は、ヒトNGFとマウスNGFとの間で100%相同であるが、他のニューロトロフィンとは異なっている。4D4は、ヒトNGFに対する活性と比較すると、ラット／マウスNGFに対してかなり弱い活性を示した。したがって、NGFのこの部分への結合は、種特異性にとっては重要ではない可能性が高いが、ニューロトロフィンの中での選択性にとっては重要である。

【0273】

抗体4D4はまた、NGFを他のニューロトロフィン（BDNFおよびNT3）から区別するヒトNGFの領域の1つである、NGFのC末端領域（ペプチド#19～21（配列番号74～配列番号76）TMDGK---LSRKC、91～115）に結合する。この領域への結合は、なぜ4D4が他のニューロトロフィンに対して活性ではないのかの説明に役立つ。さらに、ヒトNGFとマウスNGFの間ではC末端に1つのアミノ酸の相違があり、このことは、この1つのアミノ酸は、種の相違が観察されるN末端と同様に、4D4がラット／マウスNGFよりもヒトNGFに対して選択性であることの理由の1つであり得ることを示唆している。

【0274】

最後に、4D4はまた、trkBまたはtrkCではなくtrkAへの優先的なNGF結合にとって重要な領域である、ヒトNGFのペプチド#10（配列番号65）（---KARDC、50～60）によって記載される内部ドメインとも相互作用し、これは、ヒトNGFに対するその選択的中和活性をさらに説明している。

【0275】

（実施例9）

（KinExAによるモノクローナル抗体の親和性測定）

Ab 4D4（38859～80）のhuNGF（29714～91）に対する結合を、KinExAで試験した。簡単に述べると、Reacti-Gel 6×（Pierce）をhuNGFでプレコーティングして、BSAでブロッキングした。10pMおよび30pMのAb 4D4サンプルを、様々な濃度のhuNGF（Amgen）と共に室温で8時間インキュベートしてから、huNGFがコーティングされたビーズに通した。ビーズが結合した抗体の量を、蛍光（Cy5）標識ヤギ抗ヒトIgG抗体（Jackson Immuno Research）によって定量化した。結合シグナルは、平衡状態での遊離抗体の濃度に比例していた。解離平衡定数（ K_D ）を、双対曲線一部位均一結合（

10

20

30

40

50

dual-curve one-site homogeneous binding) モデル (KinExTM ソフトウェア) を用いて競合曲線の非線形回帰から得た。K_D は、Ab 4D4 の hNGF に対する結合について約 4 pM であった。

【0276】

(実施例 10)

(さらなる抗 NGF 抗体の同定)

上記の実施例 2 および 3 に記載されたように作製され同定されたさらなる抗 NGF 抗体 (14D10、6G9、7H2、14F11、および 4G6 と命名) をさらなる研究のために選択した。簡単に述べると、馴化培地を結合活性について試験した。培地から抗体を精製して配列決定した。予測質量を、馴化培地の抗体の質量分析データと比較した。抗体をクローン化した。クローンの内の 2 つが、CHO 細胞で発現され、上記のように活性について試験した。この結果を表 10 に示す。

【0277】

【表 10】

表10

クローン	IC50 @ hNGF (nM)	IC50 @ rNGF (nM)	注記	分子 クローン	IC50 @ hNGF (nM)	IC50 @ rNGF (nM)
7H2	3.294	1.748	クローン化	7H2-rFc	0.963	0.792
6H9	3.172	1.699	クローン化	6H9-rFc	13.93	0.653
14D10	0.3918	> 13	クローン化			
14D11	0.2803	> 20	クローン化			
4G6	0.414	> 10	クローン化			

次いで、これらの抗体の軽鎖および重鎖の可変領域の配列を、4D4 抗体の配列と比較し、さらに互いに比較した (図 5 および 図 6)。これらの比較から同定された重鎖可変領域の相同性パーセントを表 11 に示す。軽鎖可変領域の相同性パーセントを表 12 に示す。さらに、様々な抗体の CDR 領域の相同性パーセントを図 5 ~ 図 10 に示す。

【0278】

【表 11】

表 11

	4D4 VH	14D10 VH	6H9 VH	7H2 VH	14D11 VH	4G6 VH
4D4 VH	100%	70.9%	70.1%	75.6%	47.2%	73.4%
14D10 VH		100%	95.3%	85%	54.3%	81.1%
6H9 VH			100%	86.6%	54.3%	81.1%
7H2 VH				100%	51.2%	79.8%
14D11 VH					100%	56.8%
4G6 VH						100%

【0279】

10

20

30

40

【表 1 2 - 1】

表 12

	V4D4 VK	14D11 LC	4G6a LC	4G6b LC	4G6c LC	14D10 LC	6H9 LC	4G6d LC	7H2 LC	4G6e
V4D4 VK	100%	89%	91%	72%	74%	69%	71%	71%	70%	73%
14D11 LC		100%	94%	68%	71%	67%	68%	68%	68%	70%
4G6a LC			100%	69%	74%	68%	70%	70%	69%	71%
4G6b LC				100%	87%	83%	86%	86%	86%	96%
4G6c					100%	91%	94%	94%	94%	91%

10

【 0 2 8 0】

【表 1 2 - 2】

LC										
14D10 LC						100%	91%	94%	94%	86%
6H9 LC							100%	99%	98%	89%
4G6d LC								100%	99%	89%
7H2 LC									100%	
4G6c										100%

20

(実施例 1 1)

30

(ヒトにおける皮下 N G F 抗体の安全性および耐容性)

この試験の目的は、変形性関節症 (O A) 膝疼痛の被験体において、神経成長因子に対する抗体 (N G F 抗体) の複数回の皮下 (S C) 投与の安全性および耐容性を評価し、かつ O A 膝疼痛の被験体に対して N G F 抗体の複数回 S C 投与を施した後、N G F 抗体の血清薬物動態 (P K) を調査することにあった。複数回 S C 投与の臨床上的利点を、Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index [WOMAC^{T M} 3. 1] によって評価した。

【 0 2 8 1】

第 1 相、逐次無作為、二重盲検プラセボ対照、複数回投与、用量漸増試験を O A 膝疼痛の被験体に対して行った。この試験は、被験体の 4 つのコホートを含み、各コホートに 8 人の被験体が含まれるようにデザインした (n = 3 2)。N G F 抗体の 3 つの用量レベル (3 m g、1 0 m g、2 0 m g) を使用した。この試験に使用した N G F 抗体は、本明細書に記載された手順と同様に作製された完全ヒトモノクローナル抗体とした。

40

【 0 2 8 2】

有効性データのばらつきが大きく、この試験は、有効性の尺度の統計的有意性を評価できるものではないが、疼痛関連処置の効果は明らかであろう。平均 WOMAC 総合スコア、平均 WOMAC 下位区分スコア、患者による疾患の平均全体評価、および医師による疾患の平均全体評価は、投与期間にわたって効果が維持された処置群において、最初の投与後の最初の時点において、改善の一般的な傾向を示した。これらの傾向は、プラセボ群では明確ではなかった。N G F 抗体の最終投与の後、処置効果は、経時的にベースラインに

50

近づく傾向にあった。

【0283】

OA膝疼痛の被験体への単回または複数回SC投与を施した後、NGF抗体曝露は、3mg～20mgの用量範囲において、ほぼ用量に比例して上昇するようであった。平均 T_{max} は、7.5～11.5日の範囲であった。処置に関連した有害事象(AE)が、処置群の10人の被験体(56%)およびプラセボ群の2人の被験体(33%)で報告された。いずれの被験体も、AEのために初期に試験を中止することはしなかった。しかしながら、グレード2の神経感覚AEのために、プロトコルに明記された停止規則が適用されたため、コホートの5人の被験体(2人がプラセボ群、3人が処置群)は、治験製品の第4および最終の投与を受けなかった。神経感覚AEは、用量依存性のようであった。

10

【0284】

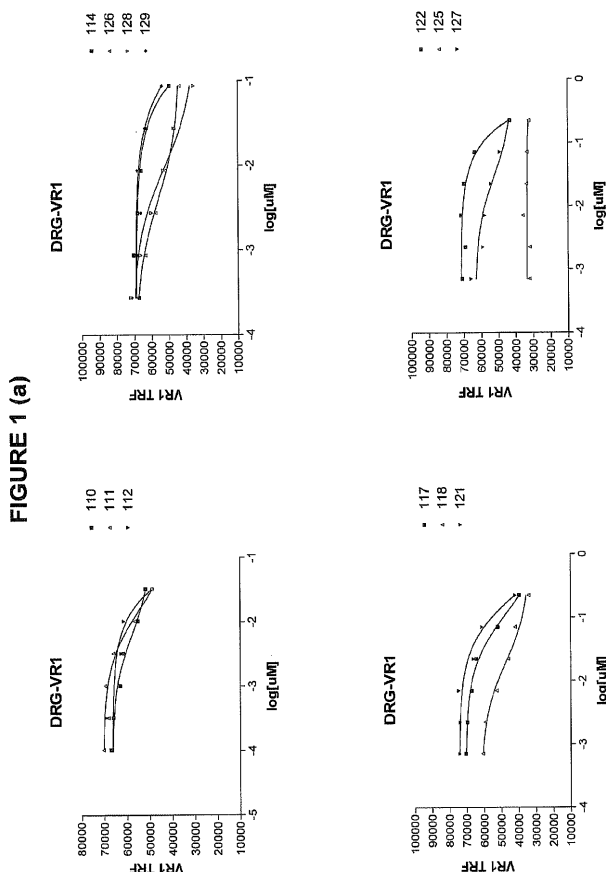
年齢が36歳～63歳までの男性および女性のOA被験体では、複数回SC投与は、処置で発生し、恐らく用量依存性の神経感覚事象(重症度が軽度または中程度)を除き(これは、20mgの抗体が投与された6人の被験体の内の4人で報告された)、この試験で投与された用量では十分に耐容であるようであった。NGF抗体曝露は、3mg～20mgの用量範囲において、用量にほぼ比例して上昇するようであった。最終相の半減期($t_{1/2, z}$)は、20.3～26.4日の範囲であった。

【0285】

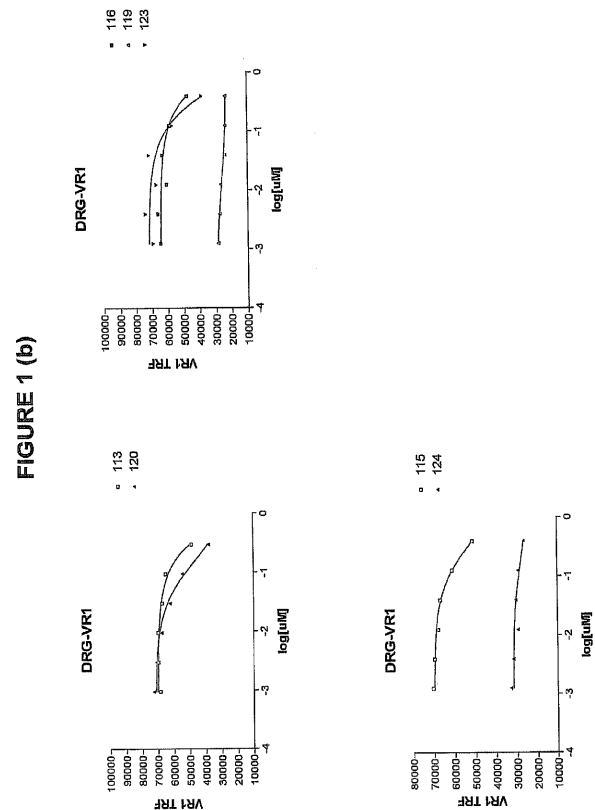
前述の開示は本発明の特定の実施形態を強調していること、それらの実施形態に等価な全ての改変形態または代替形態も、添付の特許請求の範囲で規定される本発明の精神および範囲内であることを理解されたい。

20

【図1a】



【図1b】



【配列表】

2017014286000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/06
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	13/10	(2006.01)	A 6 1 P	21/00
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02
A 6 1 P	17/04	(2006.01)	A 6 1 P	13/10
A 6 1 P	31/20	(2006.01)	A 6 1 P	17/02
A 6 1 P	11/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/04
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	31/20
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	11/02
A 6 1 P	15/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08
A 6 1 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 P	1/04
C 0 7 K	16/22	(2006.01)	A 6 1 P	15/08
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	A 6 1 P	1/18
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 0 7 K	16/22
			C 0 7 K	16/46
			C 1 2 N	15/00
				1 0 1
				Z N A
				A

(72)発明者 ケネス ディー. ワイルド ジュニア
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 3 0 6 5, シミ バレー, ミアンダー ドライブ 1 6
0 4

(72)発明者 ジェイムズ ジェイ. エス. トリーノー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3 6 1, シェアウッド, アッパー レイク ロード
4 5 4

(72)発明者 ハイチュン ホアン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 3 8, フレモント, クレストウッド ストリート
4 3 2 9

(72)発明者 ヘザー イノウエ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 0 9, カールスバッド, リモナイト コート 6 7
3 3

(72)発明者 タイ ジェイ. チャン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3 2 0, サウザンド オークス, ヴィア カミノ 5
0 7 7

(72)発明者 フランク マーティン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3 2 0, ニューベリー パーク, ファーンヒル コー
ト 8 6 5

F ターム(参考) 4C085 AA13 AA14 BB07 BB43 CC02 CC23 DD62 DD63 DD88 EE01
GG01
4H045 AA11 AA30 BA41 DA76 EA20 FA74

【外国語明細書】
2017014286000001.pdf