

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7671699号  
(P7671699)

(45)発行日 令和7年5月2日(2025.5.2)

(24)登録日 令和7年4月23日(2025.4.23)

(51)国際特許分類	F I	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	Z N A
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
請求項の数 15 (全50頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2021-569941(P2021-569941)	(73)特許権者	515014990
(86)(22)出願日	令和2年5月28日(2020.5.28)		サンシャイン・レイク・ファーマ・カン
(65)公表番号	特表2022-533855(P2022-533855 A)		パニー・リミテッド
(43)公表日	令和4年7月26日(2022.7.26)		SUNSHINE LAKE PHARM
(86)国際出願番号	PCT/CN2020/092766		A C O . , L T D .
(87)国際公開番号	WO2020/238998		中華人民共和国、5 2 3 0 0 0 カント
(87)国際公開日	令和2年12月3日(2020.12.3)		ン、ドン Guan、ソンシャン・レイク、
審査請求日	令和5年3月3日(2023.3.3)		ノーザン・インダストリアル・エリア(
(31)優先権主張番号	201910464016.0		番地なし)
(32)優先日	令和1年5月30日(2019.5.30)		Northern Industrial
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		Area, Songshan Lake
		(74)代理人	, Dongguan, Guangdong
			g 5 2 3 0 0 0 , China
			100108453
			弁理士 村山 靖彦
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗TrkA抗体及びその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

TrkAを特異的に認識することが可能な抗体又はその抗原結合断片であって、前記抗体が、下記:

配列番号4、配列番号5及び配列番号6に示される重鎖可変領域CDR1、CDR2、CDR3配列、及び

配列番号31、配列番号32及び配列番号33に示される軽鎖可変領域CDR1、CDR2、CDR3配列

のCDR配列をそれぞれ含む、抗体又はその抗原結合断片。

【請求項2】

前記抗体が、配列番号56に示されるアミノ酸配列の重鎖可変領域を有する、請求項1に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項3】

前記抗体が、配列番号65に示されるアミノ酸配列の軽鎖可変領域を有する、請求項1に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項4】

前記抗体の重鎖定常領域が、ヒトIgG4に由来し、

前記抗体のFc領域が、野生型と比較して、S10P、F16A、L17A、R191K突然変異及び229K欠失突然変異を有する、請求項1に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項5】

前記抗体の前記定常領域の完全長配列が、配列番号74に示される、請求項4に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項6】

前記抗体の軽鎖が定常領域を有し、前記定常領域の完全長配列が、配列番号75に示される、請求項1に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項7】

前記抗体が、配列番号77に示されるアミノ酸配列の重鎖及び配列番号86に示されるアミノ酸配列の軽鎖を有する、請求項1に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項8】

前記抗体が、単鎖抗体断片、多量体抗体、CDRグラフト抗体、又は小分子抗体である、請求項1に記載の抗体又はその抗原結合断片。

10

【請求項9】

前記抗体が、単鎖抗体断片であり、前記抗体が、配列番号96又は97に示されるアミノ酸配列を有する、請求項8に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項10】

請求項1から9のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片をコードし、DNAであり、

配列番号113に示されるヌクレオチド配列、又は配列番号122に示されるヌクレオチド配列、又は配列番号132又は133に示されるヌクレオチド配列を有する、核酸分子。

【請求項11】

請求項1から9のいずれか一項に記載の抗体、又は請求項10に記載の核酸分子を含む、医薬組成物。

20

【請求項12】

請求項1から9のいずれか一項に記載の抗体を含む、TrkAを検出するためのキット。

【請求項13】

疼痛、癌、炎症又は炎症性疾患、神経変性疾患、シェーグレン症候群、子宮内膜症、糖尿病性末梢神経障害、前立腺炎、骨盤痛症候群、骨リモデリングの調節における平衡失調に関連した疾患及び結合組織成長因子の異常シグナル伝達によって引き起こされる疾患の処置又は防止のための医薬の調製における使用のための、請求項1から9のいずれか一項に記載の抗体、請求項10に記載の核酸分子、又は請求項11に記載の医薬組成物。

30

【請求項14】

前記医薬が、神経障害性疼痛、炎症性疼痛、癌関連疼痛、骨折関連疼痛、手術関連疼痛、炎症性肺疾患、間質性膀胱炎、疼痛性膀胱症候群、炎症性腸疾患、炎症性皮膚疾患、レイノー症候群、特発性肺線維症、癍痕(肥大、ケロイド型及び他の形態)、硬化症、心内膜心筋線維症、心房線維症、骨髄線維症、進行性塊状線維症(肺)、腎性全身性線維症、強皮症、全身性硬化症、関節線維症、眼性線維症、非小細胞肺癌、乳頭様甲状腺癌、多形性神経膠芽腫、結腸直腸癌、黒色腫、胆管癌若しくは肉腫、急性骨髄性白血病、大細胞型神経内分泌癌、神経芽細胞腫、前立腺癌、膀胱癌、黒色腫、頭頸部扁平上皮癌又は胃癌を処置又は防止するのに使用される、請求項13に記載の抗体、核酸分子、又は医薬組成物。

【請求項15】

TrkAを検出するか、又はTrkA関連疾患を診断するためのキットの調製における使用のための、請求項1から9のいずれか一項に記載の抗体、又は請求項10に記載の核酸分子。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願に対する相互参照

本出願は、2019年5月30日に中国国家知識産権局に出願された中国特許出願第201910464016.0号の優先権及び利益を主張し、これは、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【0002】

50

本発明は、バイオテクノロジーの分野に関する。具体的には、本発明は、抗TrkA抗体及びその使用に関する。より具体的には、本発明は、TrkAを特異的に認識することが可能な、抗体又はその抗原結合断片、核酸分子、発現ベクター、組換え細胞、医薬組成物、薬学的使用、TrkAを検出するためのキット、及びマウスB細胞に関する。

【背景技術】

【0003】

目下、軽度～中等度の疼痛には、臨床的に、非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)等の非オピオイド鎮痛薬が主に使用され、中等度～重度の疼痛には、オピオイド鎮痛薬が主に使用される。しかしながら、NSAIDは、「キャップド効果(capped effect)」を有し、オピオイドは、非腫瘍慢性疼痛の30%未満を効果的に軽減することができるに過ぎず、癌疼痛を伴う患者の20%が、オピオイド耐性を有する。更に、NSAIDには、特に長期の投薬中に、消化器系及び循環器系の安全性のリスクが潜んでいる。オピオイド鎮痛薬に関して、長年にわたる薬物改善実験は、その中毒性及び多くの他の副作用を効果的に低減させることに失敗しており、患者は、新たな、より安全でより有効な薬物に期待を寄せている。

10

【0004】

神経成長因子(NGF)は、疼痛の病態生理学的プロセスに関与する。神経成長因子(NGF)は主に、高親和性チロシナーゼ(tyrosine-nase)(TrkA)受容体に結合することによって、NGF/TrkAシグナル伝達経路を活性化して、炎症性メディエーターの放出、イオンチャネルの開口に影響を及ぼし、神経線維の成長を促進して、それにより、疼痛の発生、伝導及び感作に関わっている。NGF-TrkAシグナル伝達経路の阻止が、疼痛及び痛覚過敏を効果的に軽減することができ、NGF-TrkAシグナル伝達経路が、新たな鎮痛薬の開発の有効な標的であることが、研究で示されている。NGF-TrkA標的鎮痛薬に関して、現在開発中の薬物は、主に2つのカテゴリーに分けられる:大分子抗-NGFモノクローナル抗体及び小分子TrkAキナーゼ阻害剤。TrkA受容体は、NGFの唯一の受容体であるだけでなく、NGFはまた、低親和性受容体P75を有し、NGF及びP75の組合せは、神経系の機能及び損傷修復にとって重要である。大分子抗-NGFモノクローナル抗体は、新たなタイプの鎮痛薬として、大きな安全性リスクを有する。現在の臨床データから、最も一般的な毒作用及び副作用として、骨組織壊死(可能性あり)、感覚異常等が挙げられる。しかしながら、小分子TrkAキナーゼ阻害剤を用いた場合には、より多くの問題が見られる。まず、小分子薬は概して、短い半減期、頻回投与、及び乏しい患者コンプライアンスを有する。次に、小分子TrkAキナーゼ阻害剤は、受容体チロシンキナーゼ阻害剤であり、身体中に多くの受容体チロシンキナーゼが存在する。したがって、特定の標的に対する薬物の特異性及び選択性を、保証するのが困難であり、多くの有害反応並びに大きな毒作用及び副作用が見られる。

20

30

【0005】

したがって、NGF-TrkA標的を標的とする鎮痛薬は依然として、科学研究者によって途切れることなく開発及び改善される必要がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本出願は、下記の論点及び事実の本発明者等の発見に基づく:NGF-TrkAシグナル伝達経路は、新たな鎮痛薬の開発にとって有効な標的である。TrkAモノクローナル抗体が、TrkA受容体を選択的に標的とする場合、TrkAモノクローナル抗体は、NGFによってTrkAシグナル伝達経路の活性化を阻止して、疼痛シグナルの伝達を効果的に阻害することができるだけでなく、NGF受容体の阻害によって引き起こされる多くの神経毒性、並びにNGFによって引き起こされる骨及び関節壊死を過剰中和する(over-neutralize)ための抗-NGF抗体の使用等の予測不可能な毒作用及び副作用を引き起こさない。しかしながら、TrkA分子は、受容体膜タンパク質であるため、抗TrkAモノクローナル抗体の阻止をスクリーニングすることは困難である。更に、TrkA受容体抗体の阻止を設計することは、抗体媒介性免疫応答に起因して安全性リスクを有する。したがって、TrkAに対するモノクローナル抗体を設計及び開発することは困難である。

40

50

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

しかしながら、本出願の発明者等は、長時間作用性の鎮痛効果を伴う新たなタイプの抗TrkAモノクローナル抗体をスクリーニングすることに成功した。同時に、本発明者等は、特定のFcサブタイプを選択することと、それらを修飾することとによって、免疫毒性のリスクを効果的に回避してきた。具体的には、本研究では、NGF及びTrkAの結合を阻止する一連の高親和性抗TrkAモノクローナル抗体を、ハイブリドーマ技術によってスクリーニングした。マウス抗TrkAモノクローナル抗体の定常領域は、ヒト化されて、マウス抗TrkAモノクローナル抗体の可変領域は、保持された。一連の抗TrkAキメラモノクローナル抗体が獲得された。本発明者等は、本出願で獲得されるこれらのキメラ抗体候補物が、TrkA受容体に特異的に標的結合して、NGF及びTrkAの結合を阻止して、疼痛を効果的に阻害することができるだけでなく、低い免疫毒性、及び抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)をほぼ有さないという特徴を有することを発見した。

10

## 【0008】

本発明の第1の態様では、本発明は、TrkAを特異的に認識することが可能な抗体又はその抗原結合断片を提供する。本発明の実施形態によれば、抗体は、下記:重鎖可変領域CDR配列:配列番号1～配列番号27、軽鎖可変領域CDR配列:配列番号28～配列番号54の少なくとも1つから選択されるCDR配列又はそれと少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列を含有する。

VYSFTAYT(配列番号1)

20

INPHNGGT(配列番号2)

AISRYGSSSFYFDV(配列番号3)

GYAFTNYW(配列番号4)

FYPRTGNT(配列番号5)

ARAGTGFDY(配列番号6)

GYRFSSYW(配列番号7)

ILPGRGII(配列番号8)

ARTDPPYFGV(配列番号9)

GYTFSTYW(配列番号10)

NLPGRHIT(配列番号11)

30

ARGRGTYYFDY(配列番号12)

GYSFTGYT(配列番号13)

INPYNGGT(配列番号14)

AFSYYGSRGFYFDY(配列番号15)

GYSFTGYT(配列番号16)

INPYNGGT(配列番号17)

ASSSYRNDGNWYFDV(配列番号18)

GYSITGYT(配列番号19)

VNPYNGGT(配列番号20)

AISRYGSESWYFDV(配列番号21)

40

GYTFNIYW(配列番号22)

ILPGSGNT(配列番号23)

ARTDGRGYFDY(配列番号24)

GYTFSSYW(配列番号25)

FLPRSGKT(配列番号26)

ARTDPPYFGV(配列番号27)

SSISY(配列番号28)

ATS(配列番号29)

QQWSSNPPT(配列番号30)

ENVGGY(配列番号31)

50

GAS(配列番号32)  
 GQNYIYPFT(配列番号33)  
 TGAVTISNY(配列番号34)  
 GTN(配列番号35)  
 VLWYSNHVV(配列番号36)  
 QSLLHSNGITY(配列番号37)  
 QMS(配列番号38)  
 AQNLEFPFT(配列番号39)  
 SSVSY(配列番号40)  
 LTS(配列番号41)  
 QQWSSNPPT(配列番号42)  
 SSVSY(配列番号43)  
 DTS(配列番号44)  
 QQWSSNPPT(配列番号45)  
 SSVSY(配列番号46)  
 ATS(配列番号47)  
 QQWSSNPPT(配列番号48)  
 KSVSSAYSYS(配列番号49)  
 LAS(配列番号50)  
 QHSRELPFT(配列番号51)  
 SNISY(配列番号52)  
 DTS(配列番号53)  
 QQWSSVPLT(配列番号54)

10

## 【0009】

本発明の実施形態による上記抗体は、TrkA受容体に特異的に標的結合して、NGF及びTrkAの結合を阻止することができる。

## 【0010】

本発明の実施形態によれば、抗体又はその抗原結合断片は、下記の更なる技術的特色の少なくとも1つを更に包含し得る:本発明の実施形態によれば、抗体は、

配列番号1、配列番号2及び配列番号3に示されるような重鎖可変領域CDR1、CDR2、CDR3配列、若しくはそれぞれ、配列番号1、配列番号2及び配列番号3と少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列、又は

30

配列番号4、配列番号5及び配列番号6に示されるような重鎖可変領域CDR1、CDR2、CDR3配列、若しくはそれぞれ、配列番号4、配列番号5及び配列番号6と少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列、又は

配列番号7、配列番号8及び配列番号9に示されるような重鎖可変領域CDR1、CDR2、CDR3配列、若しくはそれぞれ、配列番号7、配列番号8及び配列番号9と少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列、又は

配列番号10、配列番号11及び配列番号12に示されるような重鎖可変領域CDR1、CDR2、CDR3配列、若しくはそれぞれ、配列番号10、配列番号11及び配列番号12と少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列、又は

40

配列番号13、配列番号14及び配列番号15に示されるような重鎖可変領域CDR1、CDR2、CDR3配列、若しくはそれぞれ、配列番号13、配列番号14及び配列番号15と少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列、又は

配列番号16、配列番号17及び配列番号18に示されるような重鎖可変領域CDR1、CDR2、CDR3配列、若しくはそれぞれ、配列番号16、配列番号17及び配列番号18と少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列、又は

配列番号19、配列番号20及び配列番号21に示されるような重鎖可変領域CDR1、CDR2、CDR3配列、若しくはそれぞれ、配列番号19、配列番号20及び配列番号21と少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列、又は

50

配列番号22、配列番号23及び配列番号24に示されるような重鎖可変領域CDR1、CDR2、CDR3配列、若しくはそれぞれ、配列番号22、配列番号23及び配列番号24と少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列、又は

配列番号25、配列番号26及び配列番号27に示されるような重鎖可変領域CDR1、CDR2、CDR3配列、若しくはそれぞれ、配列番号25、配列番号26及び配列番号27と少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列を包含する。

【0011】

本発明の実施形態によれば、抗体は、

配列番号28、配列番号29及び配列番号30に示されるような軽鎖可変領域CDR1、CDR2、CDR3配列、若しくはそれぞれ、配列番号28、配列番号29及び配列番号30と少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列、又は

配列番号31、配列番号32及び配列番号33に示されるような軽鎖可変領域CDR1、CDR2、CDR3配列、若しくはそれぞれ、配列番号31、配列番号32及び配列番号33と少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列、又は

配列番号34、配列番号35及び配列番号36に示されるような軽鎖可変領域CDR1、CDR2、CDR3配列、若しくはそれぞれ、配列番号34、配列番号35及び配列番号36と少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列、又は

配列番号37、配列番号38及び配列番号39に示されるような軽鎖可変領域CDR1、CDR2、CDR3配列、若しくはそれぞれ、配列番号37、配列番号38及び配列番号39と少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列、又は

配列番号40、配列番号41及び配列番号42に示されるような軽鎖可変領域CDR1、CDR2、CDR3配列、若しくはそれぞれ、配列番号40、配列番号41及び配列番号42と少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列、又は

配列番号43、配列番号44及び配列番号45に示されるような軽鎖可変領域CDR1、CDR2、CDR3配列、若しくはそれぞれ、配列番号43、配列番号44及び配列番号45と少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列、又は

配列番号46、配列番号47及び配列番号48に示されるような軽鎖可変領域CDR1、CDR2、CDR3配列、若しくはそれぞれ、配列番号46、配列番号47及び配列番号48と少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列、又は

配列番号49、配列番号50及び配列番号51に示されるような軽鎖可変領域CDR1、CDR2、CDR3配列、若しくはそれぞれ、配列番号49、配列番号50及び配列番号51と少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列、又は

配列番号52、配列番号53及び配列番号54に示されるような軽鎖可変領域CDR1、CDR2、CDR3配列、若しくはそれぞれ、配列番号52、配列番号53及び配列番号54と少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列を包含する。

【0012】

本発明の実施形態によれば、抗体又はその抗原結合断片は、TrkAの細胞外領域を特異的に認識する。

【0013】

本発明の実施形態によれば、抗体は、重鎖フレームワーク領域配列及び軽鎖フレームワーク領域配列の少なくとも1つを含有し、重鎖フレームワーク領域配列及び軽鎖フレームワーク領域配列の少なくとも1つの少なくとも一部が、マウス抗体、ヒト抗体、霊長類抗体、又はそれらの突然変異体の少なくとも1つに由来する。

【0014】

本発明の実施形態によれば、抗体は、配列番号55～配列番号63のいずれか1つに示されるアミノ酸配列の重鎖可変領域を有する。

EVLLQQSGPELVKPGASMKISCKASVYSFTAYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPHNGG  
TRYNQKFKGKATLTLDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVVYCAISRYGSSSFYFDVWGAGTTV

10

20

30

40

50

AVSS(配列番号55)

QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGWMKQRPBGHGLEWIGDFYPRGTGNTFYNNENFKGKVTLTADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYLCARAGTGFYDWGQGTTLTVSS(配列番号56)

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKTTGYRFSSYWIEWVKQRPBGHGLEWLGEILPGRGII NYNENFRGKATFTADTSSNTAYVQLSSLTSEDSAVYFCARTDPPYFGVWGAGTTVTVSS(配列番号57)

QVQLQQSGAELMKPGASMKISCKATGYTFSTYWIEWVKQRPBGHGLEWIGENLPGRHITNYNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGRGTYFDYWGQGTPLTVSS(配列番号58)

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWKQSHGKNLEWIGLINPYNGG TNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCAFSYYGSRGFYFDYWGQGTTLTVSS(配列番号59)

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWKQSHGKNLEWIGLINPYNGG TRYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCASSYRNDGNWYFDVWGAGTTVTVSS(配列番号60)

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSITGYTMNWKQSHGKNLEWIGLVNPYNGG TSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLKSEDSAVYYCAISRYGSESWYFDVWGAGTTVTVSS(配列番号61)

QVHLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFNIYWIDWVKQRPBGHGLEWIGEILPBGSGNT HYNENFKGKATMTADTSSNTAYMQLTSLTSEDSAVYYCARTDGRGYFDYWGQGTTLTVSS(配列番号62)

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPBGHGLEWLGEFLPRSGKTYNEEFRGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARTDPPYFGVWGAGTMVAVSS(配列番号63)

【0015】

本発明の実施形態によれば、抗体は、配列番号64～配列番号72のいずれか1つに示されるアミノ酸配列の軽鎖可変領域を有する。

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSISYMHYQQKPGSSPKPWISATSNLASGVPA RFSGSGSGTSYSLTISGVEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGTNLEIK(配列番号64)

SIVMTQSPKSMMSVGERVTLCKASENVGGYVSWYQQKPDQSPKLLIYGASSRHTGVPDRFTGSGSETDFTLTISSVQAEDLAAYHCGQNYIYPFTFGGGTKLEIK(配列番号65)

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTISNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRPPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCVLWYSNHWWVFGGGTKLTVL(配列番号66)

DIVMTQAAFSTPVTLGTSASISCRSSQSLLSHNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLEFPFTFGSGTKLEIK(配列番号67)

QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSATSSVSYIYWYQQKPRSSPKPWIYLTSNLASGVPA RFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIK(配列番号68)

DIVMTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTSKSLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMETEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIK(配列番号69)

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRATSSVSYMYWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIK(配列番号70)

DIVLTQSPASLVVSLGQRATISCRTSKSVSSAYSYMHYQQKPGQPPKVLIIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEDAATYYCQHSRELPFTFGSGTKLEIK(配列番号71)

QIVLTQSPPIMSASPGEKVTMTCSASSNISYMHYQQKSGTSPKRWIYDTSKSLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSVPLTFGAGTKLEIK(配列番号72)

【0016】

本発明の実施形態によれば、抗体は、重鎖定常領域及び軽鎖定常領域の少なくとも1つを含有し、重鎖定常領域及び軽鎖定常領域の少なくとも1つの少なくとも一部が、マウス抗体、ヒト抗体、霊長類抗体、又はそれらの突然変異体の少なくとも1つに由来する。

## 【 0 0 1 7 】

本発明の実施形態によれば、抗体の軽鎖定常領域及び重鎖定常領域はともに、ヒトIgG抗体又はその突然変異体に由来する。したがって、抗体の免疫原性は、効果的に低減され得る。

## 【 0 0 1 8 】

本発明の実施形態によれば、抗体の軽鎖定常領域及び重鎖定常領域はともに、ヒトIgG4に由来する。

## 【 0 0 1 9 】

本発明の実施形態によれば、抗体のFc領域は、ヒトIgG4野生型Fcと比較して、S10P、F16A、L17A、R191K突然変異及び229K欠失突然変異を有する。ここで、上記アミノ酸位置の位置決めは、配列番号73に示されるヒトIgG4野生型Fc配列のアミノ酸配列に基づいている。例えば、S10Pは、配列番号75に示されるアミノ酸配列の10位にあるSの、Pへの突然変異、等を指す。本発明者等は、抗体のFc領域が上記突然変異及び欠失を有した後、抗体の安全性及び安定性が著しく改善され得、身体中の抗体の半減期もまた、著しく延びていることを見出した。

ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG(配列番号73)

## 【 0 0 2 0 】

本発明の実施形態によれば、抗体の定常領域の完全長配列は、配列番号74又は配列番号75に示される。

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG(配列番号74)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号75)

## 【 0 0 2 1 】

ここで、上記配列番号74に示される抗体の定常領域の完全長配列は、IgG4重鎖定常領域及びFc領域を包含する。ここで、IgG4重鎖定常領域の配列は、ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVであり、Fc領域の配列は、ESKYGPPCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGである。上記配列番号75に示される抗体の定常領域の完全長配列は、IgG4軽鎖定常領域である。

## 【 0 0 2 2 】

本発明の実施形態によれば、抗体は、配列番号76～配列番号84のいずれか1つに示されるアミノ酸配列の重鎖及び配列番号85～配列番号93のいずれか1つに示されるアミノ酸配列の軽鎖を有する。

EVLLQQSGPELVKPGASMKISCKASVYSFTAYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPHNGGTRYNQKFKGKATLTLDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVVYCAISRYGSSSFYFDVWGAGTTAVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF

NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE  
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR  
WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG(配列番号76)

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSISYMHYQQKPGSSPKPWISATSNLASGVPA  
RFSGSGSGTSYSLTISGVEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGTNLEIKRTVAAPSVFIFPPS  
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL  
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号85)

QVQLQQSGAELVLRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGWMKQRPGHGLEWIGDFYPRTGN  
TFYNENFKGKVTLTADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYLCARAGTGFDDYWGQGTTLTVSS  
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
GLYSLSSVVTVPSSSLGTCTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSV  
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT  
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ  
EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG(配列番号77)

10

SIVMTQSPKSMMSVGERVTLSCKASENVGGYVSWYQQKPDQSPKLLIYGASSRHTGV  
PDRFTGSGSETDFTLTISSVQAEDLAAYHCGQNYIYPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT  
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号86)

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKTTGYRFSSYWIEWVKQRPGHGLEWLGEILPGRGII  
NYNENFRGKATFTADTSSNTAYVQLSSLTSEDSAVYFCARTDPPYFGVWGAGTTVTVSSA  
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL  
YSLSSVVTVPSSSLGTCTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFL  
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR  
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEG  
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG(配列番号78)

20

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTISNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRPP  
GVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCVLWYSNHWFVGGGTKLTVLRTVAAPSVF  
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS  
STLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号87)

30

QVQLQQSGAELMKPGASMKISCKATGYTFSTYWIEWVKQRPGHGLEWIGENLPGRHI  
TNYNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGRGTYFDYWGQGTPLTV  
SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS  
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTCTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPS  
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS  
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM  
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG(配列番号79)

DIVMTQAAFSTPVTLGTSASISCRSSQSLLSHNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNL  
ASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLEFPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSV  
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS  
SSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号88)

40

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSTGYTMNWKQSHGKNLEWIGLINPYNGG  
TNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCAFSYYGSRGFYFDYWGQGTTL  
TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTCTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGG  
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF  
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE  
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR

50

WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG(配列番号80)

QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSATSSVSYIYWYQQKPRSSPKPWYLTSNLASGVPA  
RFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS  
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT  
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号89)

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGG  
TRYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCASSYRNDGNWYFDVWGAGT  
TVTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAA  
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  
QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD  
KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG(配列番号81)

10

DIVMTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGSVP  
ARFSGSGSGTSYSLTISSMETEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLELKRTVAAPSVFIFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT  
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号90)

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSITGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLVNPNYNGG  
TSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLKSSEDSAVYYCAISRYGSESWYFDVWGAGTTV  
TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGG  
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF  
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE  
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR  
WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG(配列番号82)

20

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRATSSVSYMYWYQQKPGSSPKPWYATSNLASGVPA  
ARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEKKRTVAAPSVFIFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT  
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号91)

QVHLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFNIYWIDWVKQRPGHGLEWIGEILPGSGNT  
HYNENFKGKATMTADTSSNTAYMQLTSLTSEDSAVYYCARTDGRGYFDYWGQTTTLTV  
SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS  
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPS  
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS  
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM  
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG(配列番号83)

30

DIVLTQSPASLVVSLGQRATISCRTSKSVSSAYSIMHWYQQKPGQPPKVLIIYLASNLE  
SGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEDAATYYCQHSRELPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFI  
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLS  
TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号92)

40

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWLGEFLPRSGKT  
NYNEEFRGKATFTADTSSNTAYMQLSLSLTSEDSAVYYCARTDPPYFGVWGAGTMVAVSS  
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSV  
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT  
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ  
EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG(配列番号84)

QIVLTQSPPIMSASPGEKVTMTCSASSNISYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGSVP

50

ARFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSVPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT  
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号93)

【0023】

ここで、本出願において、上記配列番号76及び配列番号85で構成される抗体は、20C8  
キメラ抗体と称され、上記配列番号77及び配列番号86で構成される抗体は、23E12キメ  
ラ抗体と称され、上記配列番号78及び配列番号87で構成される抗体は、27H3キメラ抗体  
と称され、上記配列番号79及び配列番号88で構成される抗体は、21E5キメラ抗体と称さ  
れ、上記配列番号80及び配列番号89で構成される抗体は、2A5キメラ抗体と称され、上  
記配列番号81及び配列番号90で構成される抗体は、4H4キメラ抗体と称され、上記配列  
番号82及び配列番号91で構成される抗体は、22D12キメラ抗体と称され、上記配列番号  
83及び配列番号92で構成される抗体は、1B9キメラ抗体と称され、上記配列番号84及び  
配列番号93で構成される抗体は、15D4キメラ抗体と称される。

10

【0024】

本発明の実施形態によれば、抗体は、単鎖抗体断片、多量体抗体、CDRグラフト抗体、  
又は小分子抗体である。

【0025】

本発明の実施形態によれば、抗体は、単鎖抗体断片であり、抗体が、配列番号94～配列  
番号111に示されるアミノ酸配列を有する。

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSISYMHYQQKPGSSPKPWISATSNLASGVPA  
RFSGSGSGTSSYSLTISGVEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGTNLEIKGGGGSGGGGSGGGG  
SEVLLQQSGPELVKPGASMKISCKASVYSFTAYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPHNGGT  
RYNQKFKGKATLTLDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYYCAISRYGSSSFYFDVWGAGTTVA  
VSS(配列番号94)

20

EVLLQQSGPELVKPGASMKISCKASVYSFTAYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPHNGG  
TRYNQKFKGKATLTLDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYYCAISRYGSSSFYFDVWGAGTTV  
AVSSGGGGSGGGGSGGGGSSQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSISYMHYQQKPGS  
SPKPWISATSNLASGVPARFSGSGSGTSSYSLTISGVEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGT  
NLEIK(配列番号95)

SIVMTQSPKSMMSVGERVTLSCASENVGGYVSWYQQKPDQSPKLLIYGASSRHTGV  
PDRFTGSGSETDFTLTISSVQAEDLAAYHCGQNYIYPFTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGG  
GGSQVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGWMKQRPGHGLEWIGDFYPR  
GNTFYNENFKGKVTTLADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYLCARAGTGFYWGQGTTLTV  
SS(配列番号96)

30

QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGWMKQRPGHGLEWIGDFYPR  
TFYENENFKGKVTTLADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYLCARAGTGFYWGQGTTLTVSS  
GGGGSGGGGSGGGGSSIVMTQSPKSMMSVGERVTLSCASENVGGYVSWYQQKPDQSP  
KLLIYGASSRHTGV  
PDRFTGSGSETDFTLTISSVQAEDLAAYHCGQNYIYPFTFGGGTKLEI  
K(配列番号97)

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTISNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRPP  
GVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCVLWYSNHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGG  
SGGGGSQVQLQQSGAELMKPGASVKISCKTTGYRFSSYWIEWVKQRPGHGLEWLGEILP  
GRGIINYNENFRGKATFTADTSSNTAYVQLSSLTSEDSAVYFCARTDPPYFGVWGAGTTV  
TVSS(配列番号98)

40

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKTTGYRFSSYWIEWVKQRPGHGLEWLGEILPGRGII  
NYNENFRGKATFTADTSSNTAYVQLSSLTSEDSAVYFCARTDPPYFGVWGAGTTVTVSSG  
GGGGSGGGGSGGGGSSQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTISNYANWVQEKPDHLF  
TGLIGGTNNRPPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCVLWYSNHWVFGGGTKL  
TVL(配列番号99)

DIVMTQAAFSTPVTLGTSASISCRSSQSLLSHNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNL

50

ASGVPPDRFSSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLEFPFTFGSGTKLEIKGGGGSGGG  
GSGGGGSQVQLQQSGAELMKPGASMKISCKATGYTFSTYWIEWVKQRPGHGLEWIGENL  
PGRHITNYNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGRGTYFFDYWGQG  
TPLTVSS(配列番号100)

QVQLQQSGAELMKPGASMKISCKATGYTFSTYWIEWVKQRPGHGLEWIGENL PGRHI  
TNYNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGRGTYFFDYWGQGTPLTV  
SSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQAAFSTPVTLGTSASISCRSSQSLLHSNGITYLYWYLQK  
PGQSPQLLIYQMSNLAGVPDRFSSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLEFPFTFGS  
GTKLEIK(配列番号101)

QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSATSSVSYIYWYQQKPRSSPKPWIYLTSNLASGVPA  
RFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGG  
SEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGT  
NYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCAFSYYGSRGFYFDYWGQGTTLT  
VSS(配列番号102)

10

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGG  
TNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCAFSYYGSRGFYFDYWGQGTTL  
TVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSATSSVSYIYWYQQKPRS  
SPKPWIYLTSNLASGVPARFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGT  
KLEIK(配列番号103)

DIVMTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPA  
ARFSGSGSGTSSYSLTISSMETEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGG  
GGSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNG  
GTRYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCASSYRNDGNWYFDVWGAG  
TTVTVSS(配列番号104)

20

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGG  
TRYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCASSYRNDGNWYFDVWGAGT  
TVTSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSVSYMHYQQK  
SGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSSYSLTISSMETEDAATYYCQQWSSNPPTFGG  
GTKLEIK(配列番号105)

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRATSSVSYMYWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPA  
ARFSGSGSGTSSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGG  
GGSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSITGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLVNPYNG  
GTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLKSEDSAVYYCAISRYGSESWYFDVWGAGTT  
VTVSS(配列番号106)

30

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSITGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLVNPYNGG  
TSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLKSEDSAVYYCAISRYGSESWYFDVWGAGTTV  
TVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRATSSVSYMYWYQQKPGS  
SPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGT  
KLEIK(配列番号107)

DIVLTQSPASLVVSLGQRATISCRTSKSVSSAYSIMHWYQQKPGQPPKVLIIYLASNLE  
SGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPFTFGSGTKLEIKGGGGSGGGG  
SGGGGSQVHLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFNIYWIDWVKQRPGHGLEWIGEILP  
GSGNTHYNENFKGKATMTADTSSNTAYMQLTSLTSEDSAVYYCARTDGRGYFDYWGQG  
TTTLTVSS(配列番号108)

40

QVHLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFNIYWIDWVKQRPGHGLEWIGEILP GSGNT  
HYNENFKGKATMTADTSSNTAYMQLTSLTSEDSAVYYCARTDGRGYFDYWGQGTTLTV  
SSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLVVSLGQRATISCRTSKSVSSAYSIMHWYQQK  
PGQPPKVLIIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPFTFGS  
GTKLEIK(配列番号109)

QIVLTQSPPIMSASPGEKVTMTCSASSNISIMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPA

50

ARFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSVPLTFGAGTKLEIKGGGGSGGGGSGGG  
 GSQVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWLGEFLPRSGK  
 TNYNEEFRGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARTDPPYFGVWGAGTMVAVS  
 S(配列番号110)

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWLGEFLPRSGKT  
 NYNEEFRGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARTDPPYFGVWGAGTMVAVSS  
 GGGGSGGGGSGGGGSIQVLTQSPPIIMASPGKVTMTCSASSNISYMHYQQKSGTSPKR  
 WIYDTSKLAGVPARFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSVPLTFGAGTKLEIK  
 (配列番号111)

【0026】

ここで、本出願において、上記配列番号94又は配列番号95に示されるアミノ酸配列の抗体は、20C8単鎖抗体断片と称され、上記配列番号96又は配列番号97に示されるアミノ酸配列の抗体は、23E12単鎖抗体断片と称され、上記配列番号98又は配列番号99に示されるアミノ酸配列の抗体は、27H3単鎖抗体断片と称され、上記配列番号100又は配列番号101に示されるアミノ酸配列の抗体は、21E5単鎖抗体断片と称され、上記配列番号102又は配列番号103に示されるアミノ酸配列の抗体は、2A5単鎖抗体断片と称され、上記配列番号104又は配列番号105に示されるアミノ酸配列の抗体は、4H4単鎖抗体断片と称され、上記配列番号106又は配列番号107に示されるアミノ酸配列の抗体は、22D12単鎖抗体断片と称され、上記配列番号108又は配列番号109に示されるアミノ酸配列の抗体は、1B9単鎖抗体断片と称され、上記配列番号110又は配列番号111に示されるアミノ酸配列の抗体は、15D4単鎖抗体断片と称される。それらの中でも、配列番号94、配列番号96、配列番号98、配列番号100、配列番号102、配列番号104、配列番号106、配列番号108、配列番号110に示されるアミノ酸配列の抗体は、N末端からC末端へのVL-Link-VH(VLは、軽鎖可変領域を表し、VHは、重鎖可変領域を表し、Linkは、VLとVHを結合させる連結鎖を表す)として表すことができ、配列番号95、配列番号97、配列番号99、配列番号101、配列番号103、配列番号105、配列番号107、配列番号109、配列番号111に示されるアミノ酸配列の抗体は、N末端からC末端へのVH-Link-VL(VLは、軽鎖可変領域を表し、VHは、重鎖可変領域を表し、Linkは、VLとVHを結合させる連結鎖を表す)として表すことができる。

【0027】

本発明の実施形態によれば、小分子抗体は、Fab抗体、Fv抗体、単ドメイン抗体、及び最小認識単位の少なくとも1つを包含する。

【0028】

本発明の第2の態様では、本発明は、核酸分子を提供する。本発明の実施形態によれば、核酸分子は、上述の抗体又はその抗原結合断片をコードする。本発明の実施形態による核酸分子によってコードされる抗体又は抗原結合断片は、TrkA受容体に特異的に標的結合して、NGF及びTrkAの結合を阻止することができ、低い免疫原性及び低いADCCの利点を有する。

【0029】

本発明の実施形態によれば、核酸分子は、下記の更なる技術的特色の少なくとも1つを更に包含し得る:本発明の実施形態によれば、核酸分子は、DNAである。

【0030】

本発明の実施形態によれば、核酸分子は、配列番号112～配列番号120のいずれか1つに示されるようなヌクレオチド配列、又は配列番号121～配列番号129のいずれか1つに示されるようなヌクレオチド配列、又は配列番号130～配列番号147のいずれか1つに示されるようなヌクレオチド配列を有する。

GAAGTGCTGCTGCAGCAGAGCGGACCAGAGCTGGTCAAGCCCGGCGCCTCCATGAAG  
 ATCAGCTGTAAGGCCTCCGTGTACAGCTTCACAGCCTACACAATGAACTGGGTGAAGCA  
 GAGCCACGGCAAGAATCTGGAGTGGATCGGACTGATCAACCCACACAATGGCGGCACTA  
 GGTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTCTGGATAAGTCCAGCAGCACT

10

20

30

40

50

GCCTACATGGATCTGCTGTCTCTGACAAGCGAGGACAGCGCCGTCTACTATTGCGCCAT  
 CTCTAGGTACGGCAGCAGCAGCTTCTACTTCGATGTGTGGGGCGCCGGCACAACAGTGG  
 CTGTGAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCTGGCTCCTTGTAGCCGG  
 TCCACCTCCGAGTCCACAGCTGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAAC  
 CGTTACCGTGAGCTGGAATAGCGGGCGCTTTAACCTCCGGAGTGCACACCTTCCCCGCTG  
 TGCTCCAGTCCCTCCGGTTTATACTCTTTATCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCAGCC  
 TCGGCACCAAGACCTACACTTGTAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC  
 AAGAGGGTGGAGTCCAAGTACGGACCTCCTTGTCCCCCTTGCCCCGCCCCGAGGCCGC  
 TGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTCTTCCCCCCAAACCCAAGGACACTTTAATGATCTCCC  
 GGACCCCCGAAGTGACTTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAAGAAGACCCCGAGGTGCAG  
 TTTAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGGGAGGA  
 ACAGTTCAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTCACCGTGCTGCATCAAGATTGGC  
 TGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGAGCAACAAGGGACTGCCAGCTCCATCGAG  
 AAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCTCAAGTTTATACACTGCCCCC  
 CAGCCAAGAAGAGATGACCAAGAACCAAGTTTCTTTAACTTGTTTAGTGAAGGGCTTCT  
 ACCCTAGCGACATCGCTGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCCCGAAAACAATTATAAG  
 ACCACCCCCCGTGTGGACTCCGATGGTTCTTTTTTTTTTATACTCCAAGCTGACAGTG  
 GACAAGTCTCGTTGGCAAGAAGGCAACGTGTTCTTGTAGCGTGATGCACGAGGCTTT  
 ACACAACCACTACACCAGAAGTCTTTATCTGTCTTTAGGCTGATGAGAATTC(配列  
 番号112)

10

20

CAAGTGCAGCTCCAGCAGAGCGGAGCTGAGCTGGTGAAGACCCGGCACTAGCGTGAAG  
 ATCAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACGCCTTCACTAATTACTGGCTGGGCTGGATGAAGCA  
 GAGACCCGGCCATGGACTGGAGTGGATCGGCGACTTCTACCCAAGGACTGGCAACACTT  
 TCTACAACGAGAACTTTAAGGGCAAGGTGACTCTGACTGCCGATAAGTCCAGCAACACT  
 GCCTACATGCAGCTGTCTCTCTGACTAGCGAAGATAGCGCCGTGTATCTGTGTGCTAG  
 GGCTGGCACTGGCTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACAACACTGACAGTGAGCAGCGCCA  
 GCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCTGGCTCCTTGTAGCCGGTCCACCTCCGAGTCC  
 ACAGCTGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAACCCGTTACCGTGAGCTG  
 GAATAGCGGCGCTTTAACCTCCGGAGTGCACACCTTCCCCGCTGTGCTCCAGTCCCTCG  
 GTTTATACTCTTTATCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCCTCCAGCCTCGGCACCAAGACCT  
 ACACTTGTAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGGGTGGAGTCC  
 AAGTACGGACCTCCTTGTCCCCCTTGCCCCGCCCCGAGGCCGCTGGCGGACCCTCCGT  
 GTTCTCTTCCCCCCAAACCCAAGGACACTTTAATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGA  
 CTTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAAGAAGACCCCGAGGTGCAGTTTAACTGGTACGTG  
 GATGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGGGAGGAACAGTTCAACTCCAC  
 CTACCGGGTGGTGTCCGTGCTCACCGTGCTGCATCAAGATTGGCTGAACGGCAAGGAGT  
 ACAAGTGAAGGTGAGCAACAAGGGACTGCCAGCTCCATCGAGAAGACCATCAGCAAG  
 GCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCTCAAGTTTATACACTGCCCCCCAGCCAAGAAGAGAT  
 GACCAAGAACCAAGTTTCTTTAACTTGTTTAGTGAAGGGCTTCTACCCTAGCGACATCG  
 CTGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCCCGAAAACAATTATAAGACCACCCCCCGTG  
 CTGGACTCCGATGGTTCTTTTTTTTTTATACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCTCGTTG  
 GCAAGAAGGCAACGTGTTCTTGTAGCGTGATGCACGAGGCTTTACACAACCACTACA  
 CCCAGAAGTCTTTATCTGTCTTTAGGCTGATGAGAATTC(配列番号113)

30

40

CAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCGCTGAGCTGATGAAGCCGGCGCTTCCGTCAAG  
 ATCAGCTGCAAGACTACTGGCTATAGGTTTACGAGCTACTGGATCGAGTGGGTGAAGCA  
 GAGACCCGGCCACGGACTGGAATGGCTGGGCGAAATCCTCCCCGGAAGGGGCATCATCA  
 ACTACAATGAGAACTTTAGGGGCAAGGCCACATTCACAGCCGACACAAGCAGCAACACT  
 GCCTACGTGCAGCTGAGCTCTCTGACTTCCGAGGACAGCGCCGTGTACTTCTGCGCCAG  
 AACAGACCCTCCTTATTTCCGGCGTGTGGGGCGCCGGAACACTACTGTGACTGTGTCCAGCG  
 CCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCTGGCTCCTTGTAGCCGGTCCACCTCCGAG

50

TCCACAGCTGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAACCCGTTACCGTGAG  
 CTGGAATAGCGGCGCTTTAACCTCCGGAGTGCACACCTTCCCCGCTGTGCTCCAGTCCT  
 CCGGTTTATACTCTTTATCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCAGCCTCGGCACCAAG  
 ACCTACACTTGTAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGGGTGGA  
 GTCCAAGTACGGACCTCCTTGTCCCCCTTGCCCCGCCCCCGAGGCCGCTGGCGGACCCT  
 CCGTGTTCCTCTTCCCCCCAAACCCAAGGACACTTTAATGATCTCCCGGACCCCGAA  
 GTGACTTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAAGAAGACCCCGAGGTGCAGTTTAACTGGTA  
 CGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGGGAGGAACAGTTCAACT  
 CCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTCACCGTGTGCATCAAGATTGGCTGAACGGCAAG  
 GAGTACAAGTGAAGGTGAGCAACAAGGGACTGCCAGCTCCATCGAGAAGACCATCAG  
 CAAGGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCTCAAGTTTATACACTGCCCCCCAGCCAAGAAG  
 AGATGACCAAGAACCAAGTTTCTTTAACTTGTTTAGTGAAGGGCTTCTACCCTAGCGAC  
 ATCGCTGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCCGAAAACAATTATAAGACCACCCCCC  
 CGTGTGGACTCCGATGGTTCTTTTTTTTTATACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCTC  
 GTTGGCAAGAAGGCAACGTGTTCTTGTAGCGTGATGCACGAGGCTTTACACAACCAC  
 TACACCCAGAAGTCTTTATCTCTGTCTTTAGGCTGATGAGAATTC(配列番号114)

10

CAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGAGCCGAGCTGATGAAGCCCGGCGCCTCCATGAAG  
 ATCAGCTGCAAGGCCACTGGCTACACATTCAGCACATACTGGATCGAGTGGGTCAAGCA  
 GAGACCCGGCCACGGACTGGAGTGGATCGGAGAGAATCTGCCCGGAAGGCACATCACTA  
 ACTACAACGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACTTTCACAGCCGACACTAGCAGCAACACT  
 GCCTACATGCAGCTCAGCTCTCTGACAAGCGAAGATAGCGCCGTGTACTACTGTGCTAG  
 GGAAGGGGCACTTACTACTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACTCCACTGACTGTGTCCA  
 GCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCTGGCTCCTTGTAGCCGGTCCACCTCC  
 GAGTCCACAGCTGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAACCCGTTACCGT  
 GAGCTGGAATAGCGGCGCTTTAACCTCCGGAGTGCACACCTTCCCCGCTGTGCTCCAGT  
 CCTCCGTTTATACTCTTTATCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCAGCCTCGGCACCA  
 AGACCTACACTTGTAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGGGTG  
 GAGTCCAAGTACGGACCTCCTTGTCCCCCTTGCCCCGCCCCCGAGGCCGCTGGCGGACC  
 CTCCGTGTTCTCTTCCCCCCAAACCCAAGGACACTTTAATGATCTCCCGGACCCCGG  
 AAGTGACTTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAAGAAGACCCCGAGGTGCAGTTTAACTGG  
 TACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGGGAGGAACAGTTCAA  
 CTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTCACCGTGTGCATCAAGATTGGCTGAACGGCA  
 AGGAGTACAAGTGAAGGTGAGCAACAAGGGACTGCCAGCTCCATCGAGAAGACCATC  
 AGCAAGGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCTCAAGTTTATACACTGCCCCCCAGCCAAGA  
 AGAGATGACCAAGAACCAAGTTTCTTTAACTTGTTTAGTGAAGGGCTTCTACCCTAGCG  
 ACATCGCTGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCCGAAAACAATTATAAGACCACCCCC  
 CCCGTGCTGGACTCCGATGGTTCTTTTTTTTTATACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTC  
 TCGTTGGCAAGAAGGCAACGTGTTCTTGTAGCGTGATGCACGAGGCTTTACACAACC  
 ACTACACCCAGAAGTCTTTATCTCTGTCTTTAGGCTGATGAGAATTC(配列番号115)

20

30

GAGGTGCAGCTCCAACAGAGCGGACCAGAGCTGGTGAAACCCGGCGCCAGCATGAAG  
 ATCAGCTGTAAGGCCTCCGGCTACAGCTTCACTGGCTACACTATGAACTGGGTGAAGCA  
 GTCCCACGGCAAGAATCTGGAGTGGATCGGACTGATCAACCCATACAACGGCGGCACAA  
 ACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACTCTGACAGTCGATAAGAGCTCCAGCACT  
 GCCTACATGGAGCTGCTGAGCCTCACTAGCGAGGACAGCGCTGTGTACTACTGTGCCTT  
 CTCTACTACGGCTCTAGGGGCTTCTACTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACAACACTGA  
 CAGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCTGGCTCCTTGTAGCCGG  
 TCCACCTCCGAGTCCACAGCTGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAACCC  
 CGTTACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTTTAACCTCCGGAGTGCACACCTTCCCCGCTG  
 TGCTCCAGTCTCCGGTTTATACTCTTTATCCTCCGTGGTGGTGCCTTCCTCCAGCC  
 TCGGCACCAAGACCTACACTTGTAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC

40

50

AAGAGGGTGGAGTCCAAGTACGGACCTCCTTGTCCCCCTTGCCCCGCCCCGAGGCCGC  
 TGGCGGACCCTCCGTGTTCTTCCCCCCAAACCCAAGGACACTTTAATGATCTCCC  
 GGACCCCCGAAGTGACTTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAAGAAGACCCCGAGGTGCAG  
 TTTAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGGGAGGA  
 ACAGTTCAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTCACCGTGCTGCATCAAGATTGGC  
 TGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGGACTGCCAGCTCCATCGAG  
 AAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCTCAAGTTTATACACTGCCCCC  
 CAGCCAAGAAGAGATGACCAAGAACCAAGTTTCTTTAACTTGTTTAGTGAAGGGCTTCT  
 ACCCTAGCGACATCGCTGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCCCGAAAACAATTATAAG  
 ACCACCCCCCGTGTGGACTCCGATGGTTCTTTTTTTTTTATACTCCAAGCTGACAGTG  
 GACAAGTCTCGTTGGCAAGAAGGCAACGTGTTCTTGTAGCGTGATGCACGAGGCTTT  
 ACACAACCCTACACCCAGAAGTCTTTATCTCTGTCTTTAGGCTGATGAGAATTC(配列  
 番号116)

10

GAAGTGCAGCTGCAACAGAGCGGCCAGAGCTCGTGAAGCCCGGCGCCAGCATGAAG  
 ATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACAGCTTCACTGGCTACACAATGAACTGGGTCAAGCA  
 GAGCCACGGAAAAAATCTGGAGTGGATCGGACTGATCAACCCTTACAACGGCGGCACAA  
 GGTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACTCTCACTGTGGATAAGAGCAGCAGCACT  
 GCCTACATGGAGCTGCTGTCTCTGACAAGCGAGGATAGCGCCGTGTACTACTGCGCCAG  
 CTCTCTATAGGAACGACGGCAACTGGTACTTCGATGTGTGGGGCGCCGGCACTACTG  
 TGACAGTGAGCTCCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCTCTGGCTCCTTGTAGC  
 CGGTCCACCTCCGAGTCCACAGCTGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGA  
 ACCCGTTACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTTTAACCTCCGGAGTGACACACCTTCCCCG  
 CTGTGCTCCAGTCCCTCCGGTTTATACTCTTTATCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCTCCA  
 GCCTCGGCACCAAGACCTACACTTGTAACTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG  
 GACAAGAGGGTGGAGTCCAAGTACGGACCTCCTTGTCCCCCTTGCCCCGCCCCGAGGC  
 CGCTGGCGGACCCTCCGTGTTCTTCCCCCCAAACCCAAGGACACTTTAATGATCT  
 CCCGGACCCCCGAAGTGACTTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAAGAAGACCCCGAGGTG  
 CAGTTTAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGGGA  
 GGAACAGTTCAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTCACCGTGCTGCATCAAGATT  
 GGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGGACTGCCAGCTCCATC  
 GAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCTCAAGTTTATACACTGCC  
 CCCCAGCCAAGAAGAGATGACCAAGAACCAAGTTTCTTTAACTTGTTTAGTGAAGGGCT  
 TCTACCCTAGCGACATCGCTGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCCCGAAAACAATTAT  
 AAGACCACCCCCCGTGTGGACTCCGATGGTTCTTTTTTTTTTATACTCCAAGCTGAC  
 AGTGGACAAGTCTCGTTGGCAAGAAGGCAACGTGTTCTTGTAGCGTGATGCACGAGG  
 CTTTACACAACCCTACACCCAGAAGTCTTTATCTCTGTCTTTAGGCTGATGAGAATTC(  
 配列番号117)

20

30

GAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGACCAGAGCTGGTCAAGCCCGGCGCCAGCATGAAG  
 ATCAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACAGCATCACTGGCTACACTATGAACTGGGTGAAGCA  
 GAGCCACGGCAAGAACCTCGAGTGGATTGGCCTCGTGAACCATAACAACGGCGGCACCTT  
 CCTACAACCAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTCACAGTCGATAAGTCCAGCTCCACA  
 GCCTACATGGAGCTGCTGTCTCTGAAGAGCGAGGATAGCGCTGTCTACTACTGTGCCAT  
 CAGCAGATACGGCAGCGAGAGCTGGTACTTCGACGTGTGGGGCGCCGGCACAACAGTGA  
 CAGTGAGCAGCGCCAGCACAAAGGGCCCCAGCGTGTCCCTCTGGCTCCTTGTAGCCGG  
 TCCACCTCCGAGTCCACAGCTGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAACC  
 CGTTACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTTTAACCTCCGGAGTGACACACCTTCCCCGCTG  
 TGCTCCAGTCCCTCCGGTTTATACTCTTTATCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCTCCAGCC  
 TCGGCACCAAGACCTACACTTGTAACTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC  
 AAGAGGGTGGAGTCCAAGTACGGACCTCCTTGTCCCCCTTGCCCCGCCCCGAGGCCGC  
 TGGCGGACCCTCCGTGTTCTTCCCCCCAAACCCAAGGACACTTTAATGATCTCCC

40

50

GGACCCCCGAAGTGACTTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAAGAAGACCCCGAGGTGCAG  
 TTTAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGGGAGGA  
 ACAGTTCAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTCACCGTGCTGCATCAAGATTGGC  
 TGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGGACTGCCAGCTCCATCGAG  
 AAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCTCAAGTTTATACACTGCCCCC  
 CAGCCAAGAAGAGATGACCAAGAACCAAGTTTCTTTAACTTGTTTAGTGAAGGGCTTCT  
 ACCCTAGCGACATCGCTGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCCGAAAACAATTATAAG  
 ACCACCCCCCGTGTGGACTCCGATGGTTCTTTTTTTTTATACTCCAAGCTGACAGTG  
 GACAAGTCTCGTTGGCAAGAAGGCAACGTGTTCTTTGTAGCGTGATGCACGAGGCTTT  
 ACACAACCACTACACCAGAAGTCTTTATCTCTGTCTTTAGGCTGATGAGAATTC(配列  
 番号118)

10

CAAGTGCATCTGCAGCAGAGCGGCGCTGAGCTGATGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAG  
 ATTAGCTGCAAGGCCACTGGCTACACATTCAACATCTACTGGATCGACTGGGTGAAGCA  
 GAGGCCCGGCCACGGACTGGAATGGATCGGCGAAATTCTGCCCGGCAGCGGCAACACTC  
 ACTACAACGAGAACTTCAAGGGCAAGGCCACAATGACAGCCGACACAAGCTCCAACACT  
 GCTTACATGCAGCTGACTTCTCTGACTAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTATTGCGCTAG  
 GACAGACGGAAGGGGCTACTTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACTACACTCACAGTGAGCA  
 GCGCCAGCACTAAGGGCCCCAGCGTGTCCCTCTGGCTCCTTGTAGCCGGTCCACCTCC  
 GAGTCCACAGCTGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAACCCGTTACCGT  
 GAGCTGGAATAGCGGCGCTTTAACCTCCGGAGTGCACACCTTCCCGCTGTGCTCCAGT  
 CCTCCGTTTATACTCTTTATCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCCTCCAGCCTCGGCACCA  
 AGACCTACACTTGTAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGGGTG  
 GAGTCCAAGTACGGACCTCCTTGTCCCCCTTGCCCCGCCCCGAGGCCGCTGGCGGACC  
 CTCCGTGTTCTTCTTCCCCCCAAACCCAAAGGACACTTTAATGATCTCCCGGACCCCCG  
 AAGTGACTTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAAGAAGACCCCGAGGTGCAGTTTAACTGG  
 TACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGGGAGGAACAGTTCAA  
 CTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTCACCGTGCTGCATCAAGATTGGCTGAACGGCA  
 AGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGGACTGCCAGCTCCATCGAGAAGACCATC  
 AGCAAGGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCTCAAGTTTATACACTGCCCCCCAGCCAAGA  
 AGAGATGACCAAGAACCAAGTTTCTTTAACTTGTTTAGTGAAGGGCTTCTACCCTAGCG  
 ACATCGCTGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCCGAAAACAATTATAAGACCACCCCC  
 CCGTGCTGGACTCCGATGGTTCTTTTTTTTTATACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTC  
 TCGTTGGCAAGAAGGCAACGTGTTCTTTGTAGCGTGATGCACGAGGCTTTACACAACC  
 ACTACACCCAGAAGTCTTTATCTCTGTCTTTAGGCTGATGAGAATTC(配列番号119)

20

30

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGCGCTGAGCTCATGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAG  
 ATCAGCTGCAAGGCCACTGGCTACACATTGAGCAGCTACTGGATCGAGTGGGTGAAGCA  
 GAGACCCGGCCACGGACTGGAATGGCTGGGAGAGTTTCTGCCTAGAAGCGGCAAGACAA  
 ACTACAACGAGGAGTTTAGGGGCAAGGCTACATTCAGTCCGACACATCCAGCAACACT  
 GCCTACATGCAGCTGAGCAGCCTCACAAGCGAGGATTCGGCCGTCTACTACTGTGCTAG  
 GACTGATCCTCCTTACTTCGGAGTGTGGGGCGCTGGCACAATGGTGGCTGTGAGCAGCG  
 CCTCCACTAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCTGGCTCCTTGTAGCCGGTCCACCTCCGAG  
 TCCACAGCTGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAACCCGTTACCGTGAG  
 CTGGAATAGCGGCGCTTTAACCTCCGGAGTGCACACCTTCCCGCTGTGCTCCAGTCCT  
 CCGGTTTATACTCTTTATCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCCTCCAGCCTCGGCACCAAG  
 ACCTACACTTGTAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGGGTGA  
 GTCCAAGTACGGACCTCCTTGTCCCCCTTGCCCCGCCCCGAGGCCGCTGGCGGACCCT  
 CCGTGTTCTTCTTCCCCCCAAACCCAAAGGACACTTTAATGATCTCCCGGACCCCCGAA  
 GTGACTTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAAGAAGACCCCGAGGTGCAGTTTAACTGGTA  
 CGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGGGAGGAACAGTTCAACT  
 CCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTCACCGTGCTGCATCAAGATTGGCTGAACGGCAAG

40

50

GAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGGACTGCCAGCTCCATCGAGAAGACCATCAG  
 CAAGGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCTCAAGTTTATACACTGCCCCAGCCAAGAAG  
 AGATGACCAAGAACCAAGTTTCTTTAACTTGTTTAGTGAAGGGCTTCTACCCTAGCGAC  
 ATCGCTGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCCGAAAACAATTATAAGACCACCCCCC  
 CGTGCTGGACTCCGATGGTTCTTTTTTTTTTATACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCTC  
 GTTGGCAAGAAGGCAACGTGTTCTTGTAGCGTGATGCACGAGGCTTTACACAACCAC  
 TACACCCAGAAGTCTTTATCTCTGTCTTTAGGCTGATGAGAATTC(配列番号120)

CAGATCGTGCTGAGCCAGAGCCCAGCTATTCTGTCCGCCAGCCCCGGCGAGAAGGTG  
 ACTATGACTTGTAGGGCCAGCTCCAGCATCAGCTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCC  
 CGGCTCCTCCCCAAAGCCTTGGATCAGCGCCACTAGCAATCTGGCCAGCGGCGTGCCAG  
 CCAGATTCAGCGGAAGCGGCAGCGGCACTAGCTACTCTCTGACTATCTCCGGCGTGGAA  
 GCTGAGGATGCCGCCACTTACTACTGCCAGCAGTGGTCCAGCAACCCTCCTACTTTTCGG  
 CGGCGGCACAAATCTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCTGCCCCCTCCGTGTTTCATCTTCC  
 CCCCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTAGCGTGGTGTGTTTACTGAACAAC  
 TTCTACCCTCGTGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCTTTACAGTCCGGCAA  
 CTCCCAAGAATCCGTGACCGAGCAAGATTCCAAGGACTCCACCTACTCTTTATCCTCCA  
 CTTTAACTTTATCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTTGTGAGGTGACC  
 CATCAAGGTTTATCCTCCCCCGTGACCAAGTCCTTCAATCGTGGCGAGTGCTGATGAGA  
 ATTC(配列番号121)

10

AGCATCGTCATGACACAAAGCCCTAAGAGCATGAGCATGAGCGTGGGCGAGAGAGTG  
 ACTCTGAGCTGTAAGGCCAGCGAGAATGTGGGCGGCTACGTGAGCTGGTATCAGCAGAA  
 GCCAGATCAGAGCCCAAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCAGCAGACACACTGGCGTGC  
 CAGATAGGTTCACTGGCAGCGGCTCCGAGACAGACTTCACTCTGACTATCAGCAGCGTC  
 CAAGCCGAAGATCTGGCCGCCTATCACTGCGGCCAGAACTACATCTACCCATTCACATT  
 CGGCGGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCTGCCCCCTCCGTGTTTCATCT  
 TCCCCCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTAGCGTGGTGTGTTTACTGAAC  
 AACTTCTACCCTCGTGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCTTTACAGTCCGG  
 CAACTCCCAAGAATCCGTGACCGAGCAAGATTCCAAGGACTCCACCTACTCTTTATCCT  
 CCACTTTAACTTTATCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTTGTGAGGTG  
 ACCCATCAAGGTTTATCCTCCCCCGTGACCAAGTCCTTCAATCGTGGCGAGTGCTGATG  
 AGAATTC(配列番号122)

20

30

CAAGCCGTCGTGACACAAGAGTCCGCTCTGACAACTTCCCCGGCGAGACTGTGACAC  
 TGACTTGTAGGAGCAGCACTGGCGCCGTGACTATCAGCAACTACGCCAACTGGGTCCAA  
 GAGAAGCCAGATCATCTGTTCACTGGACTGATCGGCGGCACAAATAATAGGCCTCCCGG  
 CGTGCCAGCCAGATTTAGCGGCTCTCTGATTGGCGATAAGGCTGCTCTGACAATCACTG  
 GCGCCAGACTGAGGACGAGGCCATCTACTTCTGCGTCCTCTGGTACAGCAACCACTGG  
 GTGTTCCGGCGGCGGCACTAAGCTGACTGTGCTGCGGACCGTGGCTGCCCCCTCCGTGTT  
 CATCTTCCCCCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTAGCGTGGTGTGTTTAC  
 TGAACAACCTTCTACCCTCGTGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCTTTACAG  
 TCCGGCAACTCCCAAGAATCCGTGACCGAGCAAGATTCCAAGGACTCCACCTACTCTTT  
 ATCCTCCACTTTAACTTTATCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTTGTG  
 AGGTGACCCATCAAGGTTTATCCTCCCCCGTGACCAAGTCCTTCAATCGTGGCGAGTGC  
 TGATGAGAATTC(配列番号123)

40

GATATCGTCATGACTCAAGCCGCTTCCAGCACTCCAGTCACTCTCGGCACAAGCGCCA  
 GCATCAGCTGTAGGTCCAGCCAGTCTCTGCTGCACAGCAACGGCATCACTTATCTGTAC  
 TGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAAAGCCACAGCTGCTGATCTACCAGATGAGCAATCT  
 GGCCAGCGGCGTGCCAGATAGATTACGACGAGCGGAAGCGGAACAGACTTCACACTGA  
 GGATCTCTAGGGTGGAAAGCCGAAGATGTGGGCGTCTATTACTGCGCCAGAACCTCGAG  
 TTCCCTTTTACATTCGGCAGCGGCACTAAGCTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCTGCCCC  
 CTCCGTGTTTCATCTTCCCCCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTAGCGTGG

50

TGTGTTTACTGAACAACCTTCTACCCTCGTGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC  
 GCTTTACAGTCCGGCAACTCCCAAGAATCCGTGACCGAGCAAGATTCCAAGGACTCCAC  
 CTA CTCTTTATCCTCCACTTTAACTTTATCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGT  
 ACGCTTGTGAGGTGACCCATCAAGGTTTATCCTCCCCCGTGACCAAGTCCTTCAATCGT  
 GGCGAGTGCTGATGAGAATTC(配列番号124)

CAGATCGTGCTGACACAGAGCCCAGCTCTGATGAGCGCCAGCCCCGGCGAGAAGGTC  
 ACAATGACTTGCAGCGCCACATCCAGCGTGAGCTACATCTACTGGTACCAGCAGAAGCC  
 TAGGAGCAGCCCTAAGCCTTGGATCTACCTCACAAGCAATCTGGCCAGCGGAGTGCCAG  
 CTAGGTTTCAGCGGAAGCGGCAGCGGCACAAGCTACTCTCTGACAATCTCCAGCATGGAA  
 GCCGAAGATGCCGCCACTTACTACTGCCAGCAGTGGAGCAGCAATCCACCTACATTCCGG  
 AGGCGGCACTAAGCTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCTGCCCCCTCCGTGTTTCATCTTCC  
 CCCCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTAGCGTGGTGTGTTTACTGAACAAC  
 TTCTACCCTCGTGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCTTTACAGTCCGGCAA  
 CTCCCAAGAATCCGTGACCGAGCAAGATTCCAAGGACTCCACCTACTCTTTATCCTCCA  
 CTTTAACTTTATCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTTGTGAGGTGACC  
 CATCAAGGTTTATCCTCCCCCGTGACCAAGTCCTTCAATCGTGCGGAGTGCTGATGAGA  
 ATTC(配列番号125)

10

GATATCGTGATGACTCAGTCCCCAGCCATCATGTCCGCCAGCCCCGGCGAGAAGGTGA  
 CTATGACTTGCTCCGCCAGCAGCAGCGTGAGCTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGAGC  
 GGCACATCCCAAAGAGGTGGATCTACGACACAAGCAAGCTGGCCAGCGGCGTGCCAGC  
 CAGATTCAGCGGCTCCGGCAGCGGAACAAGCTACTCTCTGACTATCAGCAGCATGGAGA  
 CAGAGGACGCTGCCACTTACTACTGCCAGCAGTGGAGCAGCAATCCTCCAACTTTCGGC  
 GGAGGCACTAAGCTGGAGCTGAAGCGGACCGTGGCTGCCCCCTCCGTGTTTCATCTTCCC  
 CCCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTAGCGTGGTGTGTTTACTGAACAAC  
 TCTACCCTCGTGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCTTTACAGTCCGGCAAC  
 TCCCAAGAATCCGTGACCGAGCAAGATTCCAAGGACTCCACCTACTCTTTATCCTCCAC  
 TTTAACTTTATCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTTGTGAGGTGACCC  
 ATCAAGGTTTATCCTCCCCCGTGACCAAGTCCTTCAATCGTGCGGAGTGCTGATGAGAA  
 TTC(配列番号126)

20

CAGATTGTGCTGTCCCAGTCCCCAGCCATTCTGAGCGCCAGCCCCGGCGAGAAGGTGA  
 CTATGACTTGTAGGGCCACAAGCAGCGTGAGCTACATGTACTGGTACCAGCAGAAGCCC  
 GGCAGCAGCCCTAAGCCTTGGATCTACGCCACAAGCAATCTGGCCAGCGGCGTCCCAGC  
 TAGATTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACTAGCTATTCTCTGACTATCTCTAGGGTTCGAGG  
 CCGAAGATGCCGCCACATACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAATCCTCCAACATTTCGGC  
 GGCGGA ACTAAGCTGGAGAAGAAGAGGACAGTGGCTGCCCCCTCCGTGTTTCATCTTCCC  
 TCCAAGCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACTGCTAGCGTGGTGTGTTTACTGAACAAC  
 TCTACCCTCGTGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCTTTACAGTCCGGCAAC  
 TCCCAAGAATCCGTGACCGAGCAAGATTCCAAGGACTCCACCTACTCTTTATCCTCCAC  
 TTTAACTTTATCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTTGTGAGGTGACCC  
 ATCAAGGTTTATCCTCCCCCGTGACCAAGTCCTTCAATCGTGCGGAGTGCTGATGAGAA  
 TTC(配列番号127)

30

GATATCGTGCTGACTCAGAGCCCAGCCTCTCTGGTGGTGTCTCTGGGACAGAGGGCCA  
 CAATCAGCTGTAGGACTTCCAAGAGCGTGAGCAGCTCCGCCCTACAGCTACATGCACTGG  
 TACCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGGTGCTGATCTATCTGGCCAGCAATCTGGA  
 GAGCGGCGTCCCAGCTAGATTACGCGGCTCCGGAAGCGGCACTGACTTCACTCTGAACA  
 TCCACCCAGTGGAAGAGGAGGATGCCGCCACATACTACTGCCAGCACTCTAGGGAGCTG  
 CCTTTACATTTGGCAGCGGAACTAAGCTGGAGATCAAGAGGACTGTCGCCGCCCTTAG  
 CGTGTTCATCTTCCCTCCAAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACTGCTAGCGTGGTGT  
 GTTTACTGAACAACCTTCTACCCTCGTGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCT  
 TTACAGTCCGGCAACTCCCAAGAATCCGTGACCGAGCAAGATTCCAAGGACTCCACCTA

40

50

CTCTTTATCCTCCACTTTAACTTTATCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACG  
CTTGTGAGGTGACCCATCAAGGTTTATCCTCCCCGTGACCAAGTCCTTCAATCGTGGC  
GAGTGCTGATGAGAATTC(配列番号128)

CAAATTGTTCTCACACAGAGCCCTCCTATCATGAGCGCCAGCCCCGGCGAGAAGGTGA  
CTATGACTTGTTCGGCCAGCAGCAACATCAGCTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCC  
GGCACAAGCCCAAAGAGGTGGATCTACGACACAAGCAAGCTGGCCAGCGGCGTGCCAGC  
CAGATTTAGCGGCTCCGGAAGCGGCACTAGCTACTCTCTGACAATCAGCAGCATGGAAG  
CCGAGGACGCCGCTACATACTACTGCCAGCAGTGGAGCTCCGTCCCCTGACTTTTCGGC  
GCTGGCACTAAGCTGGAGATCAAGAGGACTGTGGCCGCCCTTCCGTGTTTCATCTTCCC  
TCCTAGCGACGAACAGCTCAAGAGCGGCACTGCTAGCGTGGTGTGTTTACTGAACA  
TCTACCCTCGTGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCTTTACAGTCCGGCAAC  
TCCAAGAATCCGTGACCGAGCAAGATTCCAAGGACTCCACCTACTCTTTATCCTCCAC  
TTTAACTTTATCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCTTGTGAGGTGACCC  
ATCAAGGTTTATCCTCCCCGTGACCAAGTCCTTCAATCGTGGCGAGTGCTGATGAGAA  
TTC(配列番号129)

10

CAGATCGTGCTGAGCCAGAGCCAGCTATTCTGTCCGCCAGCCCCGGCGAGAAGGTG  
ACTATGACTTGTAGGGCCAGCTCCAGCATCAGCTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCC  
CGGCTCCTCCCCAAAGCCTTGGATCAGCGCCACTAGCAATCTGGCCAGCGGCGTGCCAG  
CCAGATTCAGCGGAAGCGGCAAGCGGCACTAGCTACTCTCTGACTATCTCCGGCGTGAA  
GCTGAGGATGCCGCCACTTACTACTGCCAGCAGTGGTCCAGCAACCCTCCTACTTTTCGG  
CGGCGGCACAAATCTGGAGATCAAGGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTG  
GCGGCGGATCTGAAGTGCTGCTGCAGCAGAGCGGACCAGAGCTGGTCAAGCCCCGGCGCC  
TCCATGAAGATCAGCTGTAAGGCCTCCGTGTACAGCTTCACAGCCTACACAATGAAGT  
GGTGAAGCAGAGCCACGGCAAGAATCTGGAGTGGATCGGACTGATCAACCCACACAATG  
GCGGCACTAGGTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTCTGGATAAGTCC  
AGCAGCACTGCCTACATGGATCTGCTGTCTCTGACAAGCGAGGACAGCGCCGTCTACTA  
TTGCGCCATCTCTAGGTACGGCAGCAGCAGCTTCTACTTCGATGTGTGGGGCGCCGGCA  
CAACAGTGGCTGTGAGCAGC(配列番号130)

20

GAAGTGCTGCTGCAGCAGAGCGGACCAGAGCTGGTCAAGCCCCGGCGCCTCCATGAAG  
ATCAGCTGTAAGGCCTCCGTGTACAGCTTCACAGCCTACACAATGAAGTGGGTGAAGCA  
GAGCCACGGCAAGAATCTGGAGTGGATCGGACTGATCAACCCACACAATGGCGGCACTA  
GGTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTCTGGATAAGTCCAGCAGCACT  
GCCTACATGGATCTGCTGTCTCTGACAAGCGAGGACAGCGCCGTCTACTATTGCGCCAT  
CTCTAGGTACGGCAGCAGCAGCTTCTACTTCGATGTGTGGGGCGCCGGCACAACAGTGG  
CTGTGAGCAGCGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTCAG  
ATCGTGCTGAGCCAGAGCCCAGCTATTCTGTCCGCCAGCCCCGGCGAGAAGGTGACTAT  
GACTTGTAGGGCCAGCTCCAGCATCAGCTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCCCGGCT  
CCTCCCCAAAGCCTTGGATCAGCGCCACTAGCAATCTGGCCAGCGGCGTGCCAGCCAGA  
TTCAGCGGAAGCGGCAGCGGCACTAGCTACTCTCTGACTATCTCCGGCGTGGAAGCTGA  
GGATGCCGCCACTTACTACTGCCAGCAGTGGTCCAGCAACCCTCCTACTTTTCGGCGGCG  
GCACAAATCTGGAGATCAAG(配列番号131)

30

40

AGCATCGTCATGACACAAAGCCCTAAGAGCATGAGCATGAGCGTGGGCGAGAGAGTG  
ACTCTGAGCTGTAAGGCCAGCGAGAATGTGGGCGGCTACGTGAGCTGGTATCAGCAGAA  
GCCAGATCAGAGCCCAAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCAGCAGACACACTGGCGTGC  
CAGATAGGTTCACTGGCAGCGGCTCCGAGACAGACTTCACTCTGACTATCAGCAGCGTC  
CAAGCCGAAGATCTGGCCGCCTATCACTGCGGCCAGAACTACATCTACCCATTACATT  
CGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAGGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGG  
GTGGCGGCGGATCTCAAGTGCAGCTCCAGCAGAGCGGAGCTGAGCTGGTGGAGACCCGGC  
ACTAGCGTGAAGATCAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACGCCTTCACTAATTACTGGCTGGG  
CTGGATGAAGCAGAGACCCGGCCATGGACTGGAGTGGATCGGCGACTTCTACCCAAGGA

50

CTGGCAACACTTTCTACAACGAGAAGCTTTAAGGGCAAGGTGACTCTGACTGCCGATAAG  
 TCCAGCAACACTGCCTACATGCAGCTGTCCTCTCTGACTAGCGAAGATAGCGCCGTGTA  
 TCTGTGTGCTAGGGCTGGCACTGGCTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACAACACTGACAG  
 TGAGCAGC(配列番号132)

CAAGTGCAGCTCCAGCAGAGCGGAGCTGAGCTGGTGGAGACCCGGCACTAGCGTGAAG  
 ATCAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACGCCTTCACTAATTACTGGCTGGGCTGGATGAAGCA  
 GAGACCCGGCCATGGACTGGAGTGGATCGGCGACTTCTACCCAAGGACTGGCAACACTT  
 TCTACAACGAGAAGCTTTAAGGGCAAGGTGACTCTGACTGCCGATAAGTCCAGCAACACT  
 GCCTACATGCAGCTGTCCTCTCTGACTAGCGAAGATAGCGCCGTGTATCTGTGTGCTAG  
 GGCTGGCACTGGCTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACAACACTGACAGTGAGCAGCGGTG  
 GCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTTGGCGGCGGATCTAGCATCGTCATGACACAA  
 AGCCCTAAGAGCATGAGCATGAGCGTGGGCGAGAGAGTGACTCTGAGCTGTAAGGCCAG  
 CGAGAATGTGGGCGGCTACGTGAGCTGGTATCAGCAGAAGCCAGATCAGAGCCCAAAGC  
 TGCTGATCTACGGCGCCAGCAGCAGACACACTGGCGTGCCAGATAGGTTCACTGGCAGC  
 GGCTCCGAGACAGACTTCACTCTGACTATCAGCAGCGTCCAAGCCGAAGATCTGGCCGC  
 CTATCACTGCGGCCAGAAGTACATCTACCCATTACATTCGGCGGCGGCACAAAGCTGG  
 AGATCAAG(配列番号133)

10

CAAGCCGTCGTGACACAAGAGTCCGCTCTGACAACCTCCCCGGCGAGACTGTGACAC  
 TGACTTGTAGGAGCAGCACTGGCGCCGTGACTATCAGCAACTACGCCAACTGGGTCCAA  
 GAGAAGCCAGATCATCTGTTCACTGGACTGATCGGCGGCACAAATAATAGGCCTCCCGG  
 CGTGCCAGCCAGATTTAGCGGCTCTCTGATTGGCGATAAGGCTGCTCTGACAATCACTG  
 GCGCCCAGACTGAGGACGAGGCCATCTACTTCTGCGTCCTCTGGTACAGCAACCACTGG  
 GTGTTCCGGCGGCGGCACTAAGCTGACTGTGCTGGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGG  
 GTCGGGTGGCGGCGGATCTCAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCGCTGAGCTGATGAAGC  
 CCGGCGCTTCCGTCAAGATCAGCTGCAAGACTACTGGCTATAGGTTCAAGCAGCTACTGG  
 ATCGAGTGGGTGAAGCAGAGACCCGGCCACGGACTGGAATGGCTGGGCGAAATCCTCCC  
 CGGAAGGGGCATCATCAACTACAATGAGAAGCTTTAGGGGCAAGGCCACATTCACAGCCG  
 ACACAAGCAGCAACACTGCCTACGTGCAGCTGAGCTCTCTGACTTCCGAGGACAGCGCC  
 GTGTACTTCTGCGCCAGAACAGACCCCTCCTTATTTTCGGCGTGTGGGGCGCCGGAAGTAC  
 TGTGACTGTGTCCAGC(配列番号134)

20

30

CAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCGCTGAGCTGATGAAGCCGGCGCTTCCGTCAAG  
 ATCAGCTGCAAGACTACTGGCTATAGGTTCAAGCAGCTACTGGATCGAGTGGGTGAAGCA  
 GAGACCCGGCCACGGACTGGAATGGCTGGGCGAAATCCTCCCCGGAAGGGGCATCATCA  
 ACTACAATGAGAAGCTTTAGGGGCAAGGCCACATTCACAGCCGACACAAGCAGCAACACT  
 GCCTACGTGCAGCTGAGCTCTCTGACTTCCGAGGACAGCGCCGTGTACTTCTGCGCCAG  
 AACAGACCCTCCTTATTTTCGGCGTGTGGGGCGCCGGAAGTACTGTGACTGTGTCCAGCG  
 GTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTTGGCGGCGGATCTCAAGCCGTGCTGACA  
 CAAGAGTCCGCTCTGACAACCTCCCCGGCGAGACTGTGACACTGACTTGTAGGAGCAG  
 CACTGGCGCCGTGACTATCAGCAACTACGCCAACTGGGTCCAAGAGAAGCCAGATCATC  
 TGTTCACTGGACTGATCGGCGGCACAAATAATAGGCCTCCCGCGTGCCAGCCAGATTT  
 AGCGGCTCTCTGATTGGCGATAAGGCTGCTCTGACAATCACTGGCGCCCAGACTGAGGA  
 CGAGGCCATCTACTTCTGCGTCCTCTGGTACAGCAACCACTGGGTGTTTCGGCGGCGGCA  
 CTAAGCTGACTGTGCTG(配列番号135)

40

GATATCGTCATGACTCAAGCCGCCTTCAAGCACTCCAGTCACTCTCGGCACAAGCGCCA  
 GCATCAGCTGTAGGTCCAGCCAGTCTCTGCTGCACAGCAACGGCATCACTTATCTGTAC  
 TGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAAAGCCACAGCTGCTGATCTACCAGATGAGCAATCT  
 GGCCAGCGGCGTGCCAGATAGATTCAAGCAGCAGCGGAAGCGGAACAGACTTCAACTGA  
 GGATCTCTAGGGTGGAAAGCCGAAGATGTGGGCGTCTATTAAGTGCAGCCAGAACCTCGAG  
 TTCCCTTTTACATTCGGCAGCGGCACTAAGCTGGAGATCAAGGGTGGCGGTGGCTCGGG  
 CGGTGGTGGGTGGGTTGGCGGCGGATCTCAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGAGCCGAGC

50

TGATGAAGCCCGGCGCCTCCATGAAGATCAGCTGCAAGGCCACTGGCTACACATTCAGC  
 ACATACTGGATCGAGTGGGTCAAGCAGAGACCCGGCCACGGACTGGAGTGGATCGGAGA  
 GAATCTGCCCGGAAGGCACATCACTAACTACAACGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACTT  
 TCACAGCCGACACTAGCAGCAAACTGCCTACATGCAGCTCAGCTCTCTGACAAGCGAA  
 GATAGCGCCGTGTACTACTGTGCTAGGGGAAGGGGCACTTACTACTTCGATTACTGGGG  
 CCAAGGCCACTCCACTGACTGTGTCCAGC(配列番号136)

CAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGAGCCGAGCTGATGAAGCCCGGCGCCTCCATGAAG  
 ATCAGCTGCAAGGCCACTGGCTACACATTCAGCACATACTGGATCGAGTGGGTCAAGCA  
 GAGACCCGGCCACGGACTGGAGTGGATCGGAGAGAATCTGCCCGGAAGGCACATCACTA  
 ACTACAACGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACTTTCACAGCCGACACTAGCAGCAAACT  
 GCCTACATGCAGCTCAGCTCTCTGACAAGCGAAGATAGCGCCGTGTACTACTGTGCTAG  
 GGGAAAGGGGCACTTACTACTTCGATTACTGGGGCCAAGGCCACTCCACTGACTGTGTCCA  
 GCGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTGATATCGTCATG  
 ACTCAAGCCGCCTTCAGCACTCCAGTCACTCTCGGCACAAGCGCCAGCATCAGCTGTAG  
 GTCCAGCCAGTCTCTGCTGCACAGCAACGGCATCACTTATCTGTACTGGTATCTGCAGA  
 AGCCCGGCCAAAGCCCACAGCTGCTGATCTACCAGATGAGCAATCTGGCCAGCGGCGTG  
 CCAGATAGATTCAGCAGCAGCGGAAGCGGAACAGACTTCACACTGAGGATCTCTAGGGT  
 GGAAGCCGAAGATGTGGGCGTCTATTACTGCGCCCAGAACCTCGAGTTCCTTTTACAT  
 TCGGCAGCGGCACTAAGCTGGAGATCAAG(配列番号137)

10

CAGATCGTGCTGACACAGAGCCCAGCTCTGATGAGCGCCAGCCCCGGCGAGAAGGTC  
 ACAATGACTTGCAGCGCCACATCCAGCGTGAGCTACATCTACTGGTACCAGCAGAAGCC  
 TAGGAGCAGCCCTAAGCCTTGGATCTACCTCACAAGCAATCTGGCCAGCGGAGTGCCAG  
 CTAGGTTTCCAGCGGAAGCGGCAGCGGCACAAGCTACTCTCTGACAATCTCCAGCATGGAA  
 GCCGAAGATGCCGCCACTTACTACTGCCAGCAGTGGAGCAGCAATCCACCTACATTCGG  
 AGGCGGCACTAAGCTGGAGATCAAGGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGGT  
 GCGGCGGATCTGAGGTGCAGCTCCAACAGAGCGGACCAGAGCTGGTGAAACCCGGCGCC  
 AGCATGAAGATCAGCTGTAAGGCCTCCGGCTACAGCTTCACTGGCTACACTATGAACTG  
 GGTGAAGCAGTCCCACGGCAAGAATCTGGAGTGGATCGGACTGATCAACCCATACAACG  
 GCGGCACAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACTCTGACAGTGCATAAGAGC  
 TCCAGCACTGCCTACATGGAGCTGCTGAGCCTCACTAGCGAGGACAGCGCTGTGTACTA  
 CTGTGCCTTCTCCTACTACGGCTCTAGGGGCTTCTACTTCGATTACTGGGGCCAAGGCA  
 CAACACTGACAGTGTCCAGC(配列番号138)

20

30

GAGGTGCAGCTCCAACAGAGCGGACCAGAGCTGGTGAAACCCGGCGCCAGCATGAAG  
 ATCAGCTGTAAGGCCTCCGGCTACAGCTTCACTGGCTACACTATGAACTGGGTGAAGCA  
 GTCCCACGGCAAGAATCTGGAGTGGATCGGACTGATCAACCCATACAACGGCGGCACAA  
 ACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACTCTGACAGTCGATAAGAGCTCCAGCACT  
 GCCTACATGGAGCTGCTGAGCCTCACTAGCGAGGACAGCGCTGTGTACTACTGTGCCTT  
 CTCTACTACGGCTCTAGGGGCTTCTACTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACAACACTGA  
 CAGTGTCCAGCGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTCAG  
 ATCGTGCTGACACAGAGCCCAGCTCTGATGAGCGCCAGCCCCGGCGAGAAGGTCACAAT  
 GACTTGCAGCGCCACATCCAGCGTGAGCTACATCTACTGGTACCAGCAGAAGCCTAGGA  
 GCAGCCCTAAGCCTTGGATCTACCTCACAAGCAATCTGGCCAGCGGAGTGCCAGCTAGG  
 TTCAGCGGAAGCGGCAGCGGCACAAGCTACTCTCTGACAATCTCCAGCATGGAAGCCGA  
 AGATGCCGCCACTTACTACTGCCAGCAGTGGAGCAGCAATCCACCTACATTCGGAGGCG  
 GCACTAAGCTGGAGATCAAG(配列番号139)

40

GATATCGTGATGACTCAGTCCCCAGCCATCATGTCCGCCAGCCCCGGCGAGAAGGTGA  
 CTATGACTTGCTCCGCCAGCAGCAGCGTGAGCTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGAGC  
 GGCACATCCCAAAGAGGTGGATCTACGACACAAGCAAGCTGGCCAGCGGCGTGCCAGC  
 CAGATTCAGCGGCTCCGGCAGCGGAACAAGCTACTCTCTGACTATCAGCAGCATGGAGA  
 CAGAGGACGCTGCCACTTACTACTGCCAGCAGTGGAGCAGCAATCCTCCAACCTTTCGGC

50

GGAGGCACTAAGCTGGAGCTGAAGGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGG  
 CGGCGGATCTGAAGTGCAGCTGCAACAGAGCGGCCAGAGCTCGTGAAGCCCGGCGCCA  
 GCATGAAGATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACAGCTTCACTGGCTACACAATGAACTGG  
 GTCAAGCAGAGCCACGGAAAAAATCTGGAGTGGATCGGACTGATCAACCCTTACAACGG  
 CGGCACAAGGTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACTTCACTGTGGATAAGAGCA  
 GCAGCACTGCCTACATGGAGCTGCTGTCTCTGACAAGCGAGGATAGCGCCGTGTACTAC  
 TGCGCCAGCTCCTCCTATAGGAACGACGGCAACTGGTACTTCGATGTGTGGGGCGCCGG  
 CACTACTGTGACAGTGAGCTCC(配列番号140)

GAAGTGCAGCTGCAACAGAGCGGCCAGAGCTCGTGAAGCCCGGCGCCAGCATGAAG  
 ATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACAGCTTCACTGGCTACACAATGAACTGGGTCAAGCA  
 GAGCCACGGAAAAAATCTGGAGTGGATCGGACTGATCAACCCTTACAACGGCGGCACAA  
 GGTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACTTCACTGTGGATAAGAGCAGCAGCACT  
 GCCTACATGGAGCTGCTGTCTCTGACAAGCGAGGATAGCGCCGTGTACTACTGCGCCAG  
 CTCTCCTATAGGAACGACGGCAACTGGTACTTCGATGTGTGGGGCGCCGGCACTACTG  
 TGACAGTGAGCTCCGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGCGGATCT  
 GATATCGTGATGACTCAGTCCCCAGCCATCATGTCCGCCAGCCCCGGCGAGAAGGTGAC  
 TATGACTTGCTCCGCCAGCAGCAGCGTGAGCTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGAGCG  
 GCACATCCCCAAAGAGGTGGATCTACGACACAAGCAAGCTGGCCAGCGGCGTGCCAGCC  
 AGATTCAGCGGCTCCGGCAGCGGAACAAGCTACTCTCTGACTATCAGCAGCATGGAGAC  
 AGAGGACGCTGCCACTTACTACTGCCAGCAGTGGAGCAGCAATCCTCCAACCTTTCGGCG  
 GAGGCACTAAGCTGGAGCTGAAG(配列番号141)

10

20

CAGATTGTGCTGTCCCAGTCCCCAGCCATTCTGAGCGCCAGCCCCGGCGAGAAGGTGA  
 CTATGACTTGTAGGGCCACAAGCAGCGTGAGCTACATGTAAGTGGTACCAGCAGAAGCCC  
 GGCAGCAGCCCTAAGCCTTGGATCTACGCCACAAGCAATCTGGCCAGCGGCGTCCCAGC  
 TAGATTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACTAGCTATTCTCTGACTATCTCTAGGGTTCGAGG  
 CCGAAGATGCCGCCACATACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAATCCTCCAACATTCGGC  
 GCGGGAAGCTAAGCTGGAGAAGAAGGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGG  
 CGGCGGATCTGAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGACCAGAGCTGGTCAAGCCCGGCGCCA  
 GCATGAAGATCAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACAGCATCACTGGCTACACTATGAACTGG  
 GTGAAGCAGAGCCACGGCAAGAACCTCGAGTGGATTGGCCTCGTGAACCCATAACAACGG  
 CGGCACTTCTACAACCAGAAGTTCAAAGGGCAAGGCCACACTCACAGTCGATAAGTCCA  
 GCTCCACAGCCTACATGGAGCTGCTGTCTCTGAAGAGCGAGGATAGCGCTGTCTACTAC  
 TGTGCCATCAGCAGATACGGCAGCGAGAGCTGGTACTTCGACGTGTGGGGCGCCGGCAC  
 AACAGTGACAGTGAGCAGC(配列番号142)

30

GAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGACCAGAGCTGGTCAAGCCCGGCGCCAGCATGAAG  
 ATCAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACAGCATCACTGGCTACACTATGAACTGGGTGAAGCA  
 GAGCCACGGCAAGAACCTCGAGTGGATTGGCCTCGTGAACCCATAACAACGGCGGCACTT  
 CCTACAACCAGAAGTTCAAAGGGCAAGGCCACACTCACAGTCGATAAGTCCAGCTCCACA  
 GCCTACATGGAGCTGCTGTCTCTGAAGAGCGAGGATAGCGCTGTCTACTACTGTGCCAT  
 CAGCAGATACGGCAGCGAGAGCTGGTACTTCGACGTGTGGGGCGCCGGCACAACAGTGA  
 CAGTGAGCAGCGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTCAG  
 ATTGTGCTGTCCCAGTCCCCAGCCATTCTGAGCGCCAGCCCCGGCGAGAAGGTGACTAT  
 GACTTGTAGGGCCACAAGCAGCGTGAGCTACATGTAAGTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCA  
 GCAGCCCTAAGCCTTGGATCTACGCCACAAGCAATCTGGCCAGCGGCGTCCCAGCTAGA  
 TTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACTAGCTATTCTCTGACTATCTCTAGGGTCGAGGCCGA  
 AGATGCCGCCACATACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAATCCTCCAACATTCGGCGGCG  
 GAACTAAGCTGGAGAAGAAG(配列番号143)

40

GATATCGTGCTGACTCAGAGCCAGCCTCTCTGGTGGTGTCTCTGGGACAGAGGGCCA  
 CAATCAGCTGTAGGACTTCCAAGAGCGTGAGCAGCTCCGCCTACAGCTACATGCACTGG  
 TACCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGGTGCTGATCTATCTGGCCAGCAATCTGGA

50

GAGCGGCGTCCCAGCTAGATTGAGCGGCTCCGGAAGCGGCACTGACTTCACTCTGAACA  
 TCCACCCAGTGGAAAGAGGAGGATGCCGCCACATACTACTGCCAGCACTCTAGGGAGCTG  
 CCTTTCACATTTGGCAGCGGAACTAAGCTGGAGATCAAGGGTGGCGGTGGCTCGGGCGG  
 TGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTCAAGTGCATCTGCAGCAGAGCGGCGCTGAGCTGA  
 TGAAGCCCCGGCGCCAGCGTGAAGATTAGCTGCAAGGCCACTGGCTACACATTCAACATC  
 TACTGGATCGACTGGGTGAAGCAGAGGCCCGGCCACGGACTGGAATGGATCGGCGAAAT  
 TCTGCCCGGCAGCGGCAACACTCACTACAACGAGAACTTCAAGGGCAAGGCCACAATGA  
 CAGCCGACACAAGCTCCAACACTGCTTACATGCAGCTGACTTCTCTGACTAGCGAGGAC  
 AGCGCCGTGTACTATTGCGCTAGGACAGACGGAAGGGGCTACTTCGATTACTGGGGCCA  
 AGGCACTACACTCACAGTGAGCAGC(配列番号144)

10

CAAGTGCATCTGCAGCAGAGCGGCGCTGAGCTGATGAAGCCCCGGCGCCAGCGTGAAG  
 ATTAGCTGCAAGGCCACTGGCTACACATTCAACATCTACTGGATCGACTGGGTGAAGCA  
 GAGGCCCGGCCACGGACTGGAATGGATCGGCGAAATTCTGCCCGGCAGCGGCAACACTC  
 ACTACAACGAGAACTTCAAGGGCAAGGCCACAATGACAGCCGACACAAGCTCCAACACT  
 GCTTACATGCAGCTGACTTCTCTGACTAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTATTGCGCTAG  
 GACAGACGGAAGGGGCTACTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACTACACTCACAGTGAGCA  
 GCGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTGATATCGTGCTG  
 ACTCAGAGCCCAGCCTCTCTGGTGGTGTCTCTGGGACAGAGGGCCACAATCAGCTGTAG  
 GACTTCCAAGAGCGTGAGCAGCTCCGCCTACAGCTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGC  
 CCGGCCAGCCTCCTAAGGTGCTGATCTATCTGGCCAGCAATCTGGAGAGCGGCGTCCCA  
 GCTAGATTCAGCGGCTCCGGAAGCGGCACTGACTTCACTCTGAACATCCACCCAGTGGA  
 AGAGGAGGATGCCGCCACATACTACTGCCAGCACTCTAGGGAGCTGCCTTTCACATTTG  
 GCAGCGGAACTAAGCTGGAGATCAAG(配列番号145)

20

CAAATTGTTCTCACACAGAGCCCTCCTATCATGAGCGCCAGCCCCGGCGAGAAGGTGA  
 CTATGACTTGTTCGCCAGCAGCAACATCAGCTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCC  
 GGCACAAGCCCCAAAGAGGTGGATCTACGACACAAGCAAGCTGGCCAGCGGCGTGCCAGC  
 CAGATTTAGCGGCTCCGGAAGCGGCACTAGCTACTCTCTGACAATCAGCAGCATGGAAG  
 CCGAGGACGCCGCTACATACTACTGCCAGCAGTGGAGCTCCGTCCCCTGACTTTCGGC  
 GCTGGCACTAAGCTGGAGATCAAGGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGG  
 CGGCGGATCTCAGGTTAGCTGCAGCAGTCCGGCGCTGAGCTCATGAAGCCCCGGCGCCA  
 GCGTGAAGATCAGCTGCAAGGCCACTGGCTACACATTCAGCAGCTACTGGATCGAGTGG  
 GTGAAGCAGAGACCCGGCCACGGACTGGAATGGCTGGGAGAGTTTCTGCCTAGAAGCGG  
 CAAGACAACTACAACGAGGAGTTTAGGGGCAAGGCTACATTCAGTCCGACACATCCA  
 GCAACACTGCCTACATGCAGCTGAGCAGCCTCACAAGCGAGGATTCGCGCGTCTACTAC  
 TGTGCTAGGACTGATCCTCCTTACTTCGGAGTGTGGGGCGCTGGCACAATGGTGGCTGT  
 GAGCAGC(配列番号146)

30

CAGGTTGAGCTGCAGCAGTCCGGCGCTGAGCTCATGAAGCCCCGGCGCCAGCGTGAAG  
 ATCAGCTGCAAGGCCACTGGCTACACATTCAGCAGCTACTGGATCGAGTGGGTGAAGCA  
 GAGACCCGGCCACGGACTGGAATGGCTGGGAGAGTTTCTGCCTAGAAGCGGCAAGACAA  
 ACTACAACGAGGAGTTTAGGGGCAAGGCTACATTCAGTCCGACACATCCAGCAACACT  
 GCCTACATGCAGCTGAGCAGCCTCACAAGCGAGGATTCGCGCGTCTACTACTGTGCTAG  
 GACTGATCCTCCTTACTTCGGAGTGTGGGGCGCTGGCACAATGGTGGCTGTGAGCAGCG  
 GTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTCAAATTGTTCTCACA  
 CAGAGCCCTCCTATCATGAGCGCCAGCCCCGGCGAGAAGGTGACTATGACTTGTTCGGC  
 CAGCAGCAACATCAGCTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCCGGCACAAGCCCAAAGA  
 GGTGGATCTACGACACAAGCAAGCTGGCCAGCGGCGTGCCAGCCAGATTTAGCGGCTCC  
 GGAAGCGGCACTAGCTACTCTCTGACAATCAGCAGCATGGAAGCCGAGGACGCCGCTAC  
 ATACTACTGCCAGCAGTGGAGCTCCGTCCCCTGACTTTCGGCGCTGGCACTAAGCTGG  
 AGATCAAG(配列番号147)

40

【 0 0 3 1 】

50

ここで、本出願において、上記配列番号112及び配列番号121に示されるヌクレオチド配列は、それぞれ、20C8キメラ抗体の重鎖及び軽鎖をコードし、上記配列番号113及び配列番号122に示されるヌクレオチド配列は、それぞれ、23E12キメラ抗体の重鎖及び軽鎖をコードし、上記配列番号114及び配列番号123に示されるヌクレオチド配列は、それぞれ、27H3キメラ抗体の重鎖及び軽鎖をコードし、上記配列番号115及び配列番号124に示されるヌクレオチド配列は、それぞれ、21E5キメラ抗体の重鎖及び軽鎖をコードし、上記配列番号116及び配列番号125に示されるヌクレオチド配列は、それぞれ、2A5キメラ抗体の重鎖及び軽鎖をコードし、上記配列番号117及び配列番号126に示されるヌクレオチド配列は、それぞれ、4H4キメラ抗体の重鎖及び軽鎖をコードし、上記配列番号118及び配列番号127に示されるヌクレオチド配列は、それぞれ、22D12キメラ抗体の重鎖及び軽鎖をコードし、上記配列番号119及び配列番号128に示されるヌクレオチド配列は、それぞれ、1B9キメラ抗体の重鎖及び軽鎖をコードし、上記配列番号120及び配列番号129に示されるヌクレオチド配列は、それぞれ、15D4キメラ抗体の重鎖及び軽鎖をコードする。配列番号130、配列番号132、配列番号134、配列番号136、配列番号138、配列番号140、配列番号142、配列番号144、及び配列番号146に示されるヌクレオチド配列は、それぞれ、配列番号94、配列番号96、配列番号98、配列番号100、配列番号102、配列番号104、配列番号106、配列番号108、及び配列番号110に示されるヌクレオチド配列の単鎖抗体断片をコードし、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、及び配列番号147に示されるヌクレオチド配列は、それぞれ、配列番号95、配列番号97、配列番号99、配列番号101、配列番号103、配列番号105、配列番号107、配列番号109、及び配列番号111に示されるヌクレオチド配列の単鎖抗体断片をコードする。

10

20

**【0032】**

本発明の第3の態様によれば、本発明は、発現ベクターを提供する。本発明の実施形態によれば、発現ベクターは、上述の核酸分子を保有する。本発明の実施形態による発現ベクターが、適切なレシピエント細胞に導入された後、本発明の実施形態による発現ベクターは、制御系の媒介下で、TrkAを特異的に認識する上述の抗体又は抗原結合断片の発現を効果的に実現させることができ、それにより、抗体又は抗原結合断片が、*in vitro*で大量に獲得されることを実現させる。

**【0033】**

本発明の実施形態によれば、発現ベクターは、下記の更なる技術的特色の少なくとも一つを更に包含し得る:本発明の実施形態によれば、発現ベクターは、真核生物発現ベクターである。したがって、CHO細胞等のような真核細胞における、上述するようなTrkAを特異的に認識する抗体又はその抗原結合断片の発現が達成される。

30

**【0034】**

本発明の第4の態様では、本発明は、組換え細胞を提供する。本発明の実施形態によれば、組換え細胞は、上述の核酸分子を保有するか、又は上述の抗体若しくはその抗原結合断片を発現する。本発明の実施形態による組換え細胞は、上述するようなTrkAを特異的に認識する抗体又はその抗原結合断片の*in vitro*での発現及び大規模獲得に使用することができる。

40

**【0035】**

本発明の実施形態によれば、上述の組換え細胞は、下記の更なる技術的特色の少なくとも一つを更に包含し得る:本発明の実施形態によれば、組換え細胞は、上述の発現ベクターを、宿主細胞に導入することによって獲得される。

**【0036】**

本発明の実施形態によれば、発現ベクターは、エレクトロトランスダクション(*electrotransduction*)法によって、宿主細胞に導入される。

**【0037】**

本発明の実施形態によれば、組換え細胞は、真核細胞である。

**【0038】**

50

本発明の実施形態によれば、組換え細胞は、哺乳動物細胞である。

【0039】

本発明の第5の態様では、本発明は、医薬組成物を提供する。本発明の実施形態によれば、医薬組成物は、上述の抗体、上述の核酸分子、上述の発現ベクター又は上述の組換え細胞を含有する。本発明の実施形態による医薬組成物に含有される、抗体又は発現された抗体は、TrkA受容体に特異的に標的結合して、NGF及びTrkAの結合を阻止して、疼痛を効果的に阻害することができるだけでなく、低い免疫原性、及び抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)をほぼ有さないという特徴を有する。

【0040】

本発明の第6の態様では、本発明は、疼痛、癌、炎症又は炎症性疾患、神経変性疾患、シェーグレン症候群、子宮内膜症、糖尿病性末梢神経障害、前立腺炎、骨盤痛症候群、骨リモデリングの調節における平衡失調に関連した疾患及び結合組織成長因子の異常シグナル伝達によって引き起こされる疾患の処置又は防止のための医薬の調製における、上述の抗体、上述の核酸分子、上述の発現ベクター又は上述の組換え細胞、及び上述の医薬組成物の使用を提供する。

10

【0041】

本発明の実施形態によれば、上述の使用は、下記の更なる技術的特色の少なくとも1つを更に包含し得る:本発明の実施形態によれば、医薬は、神経障害性疼痛、炎症性疼痛、癌関連疼痛、骨折関連疼痛、手術関連疼痛、炎症性肺疾患、間質性膀胱炎、疼痛性膀胱症候群、炎症性腸疾患、炎症性皮膚疾患、レイノー症候群、特発性肺線維症、瘢痕(肥大、ケロイド型及び他の形態)、硬化症、心内膜心筋線維症、心房線維症、骨髄線維症、進行性塊状線維症(肺)、腎性全身性線維症、強皮症、全身性硬化症、関節線維症、眼性線維症、非小細胞肺癌、乳頭様甲状腺癌、多形性神経膠芽腫、結腸直腸癌、黒色腫、胆管癌若しくは肉腫、急性骨髄性白血病、大細胞型神経内分泌癌、神経芽細胞腫、前立腺癌、膀胱癌、黒色腫、頭頸部扁平上皮癌又は胃癌を処置又は防止するのに使用される。

20

【0042】

本発明の第6の態様では、本発明は、疼痛、癌、炎症又は炎症性疾患、神経変性疾患、シェーグレン症候群、子宮内膜症、糖尿病性末梢神経障害、前立腺炎、骨盤痛症候群、骨リモデリングの調節における平衡失調に関連した疾患及び結合組織成長因子の異常シグナル伝達によって引き起こされる疾患の処置又は防止のための医薬の調製における使用のための、上述の抗体、上述の核酸分子、上述の発現ベクター又は上述の組換え細胞、及び上述の医薬組成物を提供する。

30

【0043】

本発明の実施形態によれば、上述の使用は、下記の更なる技術的特色の少なくとも1つを更に包含し得る:本発明の実施形態によれば、医薬は、神経障害性疼痛、炎症性疼痛、癌関連疼痛、骨折関連疼痛、手術関連疼痛、炎症性肺疾患、間質性膀胱炎、疼痛性膀胱症候群、炎症性腸疾患、炎症性皮膚疾患、レイノー症候群、特発性肺線維症、瘢痕(肥大、ケロイド型及び他の形態)、硬化症、心内膜心筋線維症、心房線維症、骨髄線維症、進行性塊状線維症(肺)、腎性全身性線維症、強皮症、全身性硬化症、関節線維症、眼性線維症、非小細胞肺癌、乳頭様甲状腺癌、多形性神経膠芽腫、結腸直腸癌、黒色腫、胆管癌若しくは肉腫、急性骨髄性白血病、大細胞型神経内分泌癌、神経芽細胞腫、前立腺癌、膀胱癌、黒色腫、頭頸部扁平上皮癌又は胃癌を処置又は防止するのに使用される。

40

【0044】

本発明の第6の態様では、本発明は、対象において、疼痛、癌、炎症又は炎症性疾患、神経変性疾患、シェーグレン症候群、子宮内膜症、糖尿病性末梢神経障害、前立腺炎、骨盤痛症候群、骨リモデリングの調節における平衡失調に関連した疾患及び結合組織成長因子の異常シグナル伝達によって引き起こされる疾患を処置又は防止する方法であって、処置又は防止を必要とする対象に、治療上有効な量の、上述の抗体、上述の核酸分子、上述の発現ベクター又は上述の組換え細胞、及び上述の医薬組成物を投与する工程を含む、方法を提供する。

50

## 【 0 0 4 5 】

本発明の実施形態によれば、上述の方法は、下記の更なる技術的特色の少なくとも1つを更に包含し得る:本発明の実施形態によれば、医薬は、神経障害性疼痛、炎症性疼痛、癌関連疼痛、骨折関連疼痛、手術関連疼痛、炎症性肺疾患、間質性膀胱炎、疼痛性膀胱症候群、炎症性腸疾患、炎症性皮膚疾患、レイノー症候群、特発性肺線維症、癩痕(肥大、ケロイド型及び他の形態)、硬化症、心内膜心筋線維症、心房線維症、骨髄線維症、進行性塊状線維症(肺)、腎性全身性線維症、強皮症、全身性硬化症、関節線維症、眼性線維症、非小細胞肺癌、乳頭様甲状腺癌、多形性神経膠芽腫、結腸直腸癌、黒色腫、胆管癌若しくは肉腫、急性骨髄性白血病、大細胞型神経内分泌癌、神経芽細胞腫、前立腺癌、膵癌、黒色腫、頭頸部扁平上皮癌又は胃癌を処置又は防止するのに使用される。

10

## 【 0 0 4 6 】

本発明の第7の態様では、本発明は、TrkAを検出するためのキットを提供する。本発明の実施形態によれば、キットは、上述される抗体のいずれか1つを包含する。上述されるTrkA抗体は、TrkAを特異的に標的結合することができる。本発明の実施形態によるキットは、TrkAの特異的な検出を実現させることができる。例えば、抗体が、蛍光基と組み合わせられた場合、蛍光検出デバイスを使用して、TrkAの位置特定(localization)又はリアルタイム検出を実現させることができる。

## 【 0 0 4 7 】

本発明の第8の態様では、本発明は、TrkAを検出するか、又はTrkA関連疾患を診断するためのキットの調製における、上述の抗体、上述の核酸分子、上述の発現ベクター、又は上述の組換え細胞の使用を提供する。

20

## 【 0 0 4 8 】

本発明の第8の態様では、本発明は、TrkAを検出するか、又はTrkA関連疾患を診断するためのキットの調製における使用のための、上述の抗体、上述の核酸分子、上述の発現ベクター、又は上述の組換え細胞を提供する。

## 【 0 0 4 9 】

本発明の第8の態様では、本発明は、対象において、TrkAを検出するか、又はTrkA関連疾患を診断する方法であって、検出又は診断を必要とする対象に、治療上有効な量の、上述の抗体、上述の核酸分子、上述の発現ベクター、又は上述の組換え細胞を投与する工程を含む、方法を提供する。

30

## 【 0 0 5 0 】

本発明の第9の態様では、本発明は、マウスB細胞を提供する。本発明の実施形態によれば、B細胞のゲノムは、定常領域をコードする配列を保有し、定常領域配列は、ヒトIgG4の定常領域と比較して、S108P、F114A、L115A、R289K突然変異及び327K欠失突然変異を有する。ヒトIgG4の定常領域は、配列番号148に示されるアミノ酸配列を有する。

ASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNYHTQKSLSLSLGK(配列番号148)

40

## 【 0 0 5 1 】

本発明の実施形態によるマウスB細胞は、マウス抗体を分泌するのに使用され得る。分泌されたマウス抗体の免疫原性は、ヒトにおいて更に低減され、安定性は、著しく改善され、in vivoでの半減期は、著しく延びている。

## 【 0 0 5 2 】

本発明の第10の態様では、本発明は、モノクローナル抗体の調製における上述されるマウスB細胞の使用を提供する。

## 【 0 0 5 3 】

本発明の第10の態様では、本発明は、モノクローナル抗体の調製における使用のための

50

、上述されるマウスB細胞を提供する。

【0054】

本発明の第10の態様では、本発明は、TrkAを検出するか、又はTrkA関連疾患を診断する方法であって、モノクローナル抗体が産生されるように、上述されるマウスB細胞を培養する工程を含む、方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0055】

【図1】本発明の実施形態による、ELISA法によりスクリーニングすることによって獲得された、分子レベルでのNGF及びTrkAの結合を阻止する抗TrkAモノクローナル抗体を産生することが可能な9個のモノクローナルハイブリドーマ細胞株の実験結果の図である。

10

【図2】本発明の実施形態による、フロースクリーニングによって獲得された、細胞レベルでのNGF及びTrkAの結合を阻止する抗TrkAモノクローナル抗体を産生することが可能な9個のモノクローナルハイブリドーマ細胞株の実験結果の図(親%(パーセント))である。

【図3】本発明の実施形態による、ELISA法に従う、各陽性クローン上清によって産生されたモノクローナル抗体の、マウス-TrkA受容体への結合の検出の実験結果の図である。

【図4】本発明の実施形態による、HEK-293T-TrkA細胞モデルを使用した検査抗体の阻止活性の評価の実験結果の図(親%(パーセント))である。

【図5】本発明の実施形態による、NGF-TrkA経路を阻害するin vitroでの薬物(検査薬物)の活性を評価するのに、NIH-3T3-TrkA細胞モデルを使用することができるかどうかを検証するのに使用されるタネズマブの実験結果の図である。

20

【図6】本発明の実施形態による、AlphaLISA法による検査抗体及び陽性抗体MNAC13の作用下でのTrkAタンパク質のチロシンリン酸化レベルの実験結果の図である。

【図7】本発明の実施形態による、フローサイトメトリーによって検査抗体の親和性EC<sub>50</sub>を検出する結果の図である。

【図8 A B】本発明の実施形態による、ELISA法によって、検査抗体の、標的TrkAへの結合の特異性を評価する結果の図である。

【図8 C D】本発明の実施形態による、ELISA法によって、検査抗体の、標的TrkAへの結合の特異性を評価する結果の図である。

【図8 E F】本発明の実施形態による、ELISA法によって、検査抗体の、標的TrkAへの結合の特異性を評価する結果の図である。

30

【図8 G】本発明の実施形態による、ELISA法によって、検査抗体の、標的TrkAへの結合の特異性を評価する結果の図である。

【図9】本発明の実施形態による、ELISA法を提供することによって、検査抗体の、マウス-TrkAタンパク質への結合能力を検出する結果の図である。

【図10】本発明の実施形態による、フローサイトメトリーによって、検査抗体の、マウス-TrkAタンパク質への結合能力を検出する結果の図である。

【図11】本発明の実施形態による、ELISA法を適用することによってマウス-NGF及びマウス-TrkAの結合に対する検査抗体の阻害効果を検出する結果の図である。

【図12】本発明の実施形態による、フローサイトメトリーによってマウス-NGF及びマウス-TrkAの結合に対する検査抗体の阻害効果を検出する結果の図である。

40

【図13】本発明の実施形態による、ELISA法を適用することによってマウス-NGF及びマウス-TrkAの結合に対する検査抗体の阻害効果を検出する結果の図である。

【図14】本発明の実施形態による、ホルマリン疼痛モデルを使用してin vivoで検査抗体の鎮痛活性を評価する結果の図である。

【図15】本発明の実施形態による、フロイントアジュバント誘導性炎症及び疼痛モデルを使用してin vivoで検査抗体の鎮痛活性を評価する結果の図である。

【発明を実施するための形態】

【0056】

本発明の実施形態は、以下で詳述される。実施形態の例は、添付の図面に示され、同じか、又は同様の参照番号は、全体にわたって、同じか、又は同様の要素、或いは同じか、

50

又は同様の機能を有する要素を表す。図面を参照して以下で記載される実施形態は、例示的であり、本発明を説明するものと意図されるが、本発明を限定するものと解釈されるべきではない。

【0057】

本発明について記載する過程で、本明細書中で使用される用語が説明されている。これらの説明は、単に構想を理解する利便性のためのものであり、本発明の保護構想を限定するものとみなされるべきではない。

【0058】

抗体

本明細書中で使用する場合、「抗体」という用語は、特定の抗原に結合することが可能な免疫グロブリン分子である。抗体は、2つのより軽い分子量軽鎖及び2つのより重い分子量重鎖で構成される。重(H)鎖及び軽(L)鎖は、ジスルフィド結合によって連結されて、テトラペプチド鎖分子を形成する。それらの中でも、ペプチド鎖のアミノ末端(N-末端)のアミノ酸配列は、非常に変化しており、これは、可変領域(V領域)と呼ばれる。カルボキシル末端(C末端)は、あまり変化を伴わずに比較的安定であり、これは、定常領域(C領域)と呼ばれる。L鎖及びH鎖のV領域は、それぞれ、VL及びVHと称される。

10

【0059】

可変領域中の幾つかの領域は、アミノ酸組成及び配列順序の、より高度な変化が見られる。それらは、超可変領域(HVR)と呼ばれる。超可変領域は、抗原及び抗体が結合する場所であり、したがって、超可変領域はまた、相補性決定領域(CDR)とも呼ばれる。重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の両方上に、3つのCDRが存在する。

20

【0060】

本発明は、TrkAの細胞外セグメントを利用して、免疫化により非常に特異的で高親和性の抗TrkA Fab(抗原結合断片)抗体断片を獲得する。抗体断片は、TrkA抗原に特異的に結合することができ、したがって、疼痛又は腫瘍等の疾患の標的処置に使用され得る。

【0061】

幾つかの実施形態では、本発明は、TrkAを特異的に認識することが可能な抗体又は抗原結合断片であって、抗体が、下記:重鎖可変領域CDR配列:配列番号1~配列番号27、軽鎖可変領域CDR配列:配列番号28~配列番号54の少なくとも1つから選択されるCDR配列又はそれと少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列を含む、抗体又は抗原結合断片を提供する。他の実施形態では、本発明によって提供される抗体又は抗原結合断片は、上記重鎖及び軽鎖と比較して、保存的アミノ酸置換を有する。「抗原結合断片」は、抗原(ROR2)に特異的に結合する能力を保持する抗体断片を指す。「保存的アミノ酸置換」は、別のアミノ酸に、生物学的に、化学的に、又は構造的に類似している残基による、アミノ酸の置き換えを指す。生物学的類似性は、置換が、TrkA抗体又はTrkA抗原との生物活性を破壊しないことを意味する。構造的類似性は、アラニン、グリシン、又はセリン等の類似した長さのアミノ酸を有する側鎖、又は類似したサイズの側鎖を指す。化学的類似性は、アミノ酸が、同じ電荷を有するか、又はともに親水性であるか、若しくは疎水性であるかを意味する。例えば、疎水性残基イソロイシン、バリン、ロイシン又はメチオニンは、互いに置換される。或いは、極性アミノ酸は、別の極性アミノ酸で置換され、例えば、リジンは、アルギニンで置換され、アスパラギン酸は、グルタミン酸で置換され、アスパラギンは、グルタミンで置換され、スレオニンは、セリンで置換される、等である。

30

40

【0062】

幾つかの実施形態では、本発明は、配列番号55~配列番号63のいずれか1つに示されるアミノ酸配列の重鎖可変領域を有し、配列番号64~配列番号72のいずれか1つに示されるアミノ酸配列の軽鎖可変領域を有する、抗体又は抗原結合断片を提供する。本発明者等は、抗体配列アラインメントデータベース(NCBI、IMGT)により、上述の抗重鎖可変領域配列のCDR領域(配列番号1~配列番号27に示されるような)及び軽鎖可変領域配列のCDR領域(配列番号28~配列番号54等の)を獲得することができる。他の実施形態では、抗体又は抗原結合断片の重鎖可変領域配列は、配列番号55~配列番号63に示されるアミノ酸配列

50

と比較して、保存的アミノ酸置換を有する。幾つかの実施形態では、抗体又は抗原結合断片の軽鎖可変領域配列は、配列番号64～配列番号72のいずれか1つに示されるアミノ酸配列と比較して、保存的アミノ酸置換を有する。当然のことながら、これらの保存的アミノ酸置換は、抗体又は抗原結合断片の生物学的機能を変更しない。幾つかの特定の様式では、これらの保存的アミノ酸置換は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域におけるCDR領域以外のアミノ酸で見られ得る。

【0063】

幾つかの好ましい実施形態では、本発明は、配列番号76～配列番号84のいずれか1つに示されるアミノ酸配列の重鎖を有し、また配列番号85～配列番号93のいずれか1つに示されるアミノ酸配列の軽鎖を有する抗TrkA抗体を提供する。

10

【0064】

幾つかの好ましい実施形態では、本発明は、抗TrkA単鎖断片抗体を提供し、ここで、抗体は、配列番号94～配列番号111に示されるアミノ酸配列を有する。

【0065】

核酸分子、発現ベクター、組換え細胞

これらの抗体を調製又は獲得するプロセスにおいて、これらの抗体を発現する核酸分子を、種々のベクターに結合させて、続いて、種々の細胞で発現して、相当する抗体を獲得することができる。

【0066】

この目的で、本発明はまた、上述される抗体又は抗原結合断片をコードする単離核酸分子を提供する。

20

【0067】

幾つかの実施形態では、単離核酸分子は、配列番号112～配列番号120のいずれか1つに示されるヌクレオチド配列を有するか、又は配列番号121～配列番号129のいずれか1つに示されるヌクレオチド配列を有するか、又は配列番号130～配列番号147のいずれか1つに示されるヌクレオチド配列を有する。

【0068】

幾つかの実施形態では、単離核酸分子は、上記配列番号112～配列番号120に示されるヌクレオチド配列と少なくとも90%同一性を有し、好ましくは、少なくとも95%同一性を有し、より好ましくは、少なくとも98%、99%同一性を有する。少なくとも幾つかの実施形態では、単離ポリヌクレオチドは、配列番号121～配列番号129に示されるヌクレオチド配列と少なくとも90%同一性を有し、好ましくは、少なくとも95%同一性を有し、より好ましくは、少なくとも98%、99%同一性を有する。少なくとも幾つかの実施形態では、単離ポリヌクレオチドは、配列番号130～配列番号147に示されるヌクレオチド配列と少なくとも90%同一性を有し、好ましくは、少なくとも95%同一性を有し、より好ましくは、少なくとも98%、99%同一性を有する。配列番号112～配列番号120又は配列番号121～配列番号129又は配列番号130～配列番号147に示されるヌクレオチド配列に相同的なこれらの配列は、配列番号76～配列番号84又は配列番号85～配列番号93又は配列番号94～配列番号111に類似したアミノ酸を発現することができ、その結果、それらは、TrkA抗原に特異的に結合して、抗体の標的機能を達成することができる。

30

40

【0069】

幾つかの好ましい実施形態では、単離核酸分子は、配列番号112～配列番号120に示される重鎖ヌクレオチド配列及び配列番号121～配列番号129に示される軽鎖ヌクレオチド配列を有する。これらのヌクレオチド配列は、種に関して最適化され、哺乳動物細胞においてより容易に発現している。

【0070】

本発明はまた、上述の単離核酸分子を含む、発現ベクターを提供する。上述の単離ポリペプチドが、ベクターにライゲーションされると、ポリヌクレオチドは、ベクター上の制御要素に、これらの制御要素がポリヌクレオチドの翻訳及び発現を制御することができる限り、直接的又は間接的に結合され得る。当然のことながら、これらの制御要素は、ベク

50

ター自体に直接由来してもよく、又はこれらの制御要素は、外因性であってもよく、即ち、ベクター自体に由来していなくてもよい。当然のことながら、ポリヌクレオチドは、制御要素に作動可能に連結され得る。本明細書中の「作動可能に連結される」は、外因性遺伝子の、ベクターへの結合を指し、その結果、転写制御配列及び翻訳制御配列等の、ベクター中の制御要素は、外因性遺伝子の転写及び翻訳を調節するという、その予想される機能を発揮することができる。当然のことながら、抗体の重鎖及び軽鎖をコードするのに使用されるポリヌクレオチドは、独立して、異なるベクターに挿入することができ、それらは通常、同じベクターに挿入される。一般に使用されるベクターは、例えば、プラスミド、ファージ等であり得る。例えば、Plasmid-Xプラスミド。

#### 【0071】

本発明はまた、発現ベクターを含有する、組換え細胞を提供する。発現ベクターは、哺乳動物細胞に導入させることができ、組換え細胞が、構築及び獲得され、続いて、これらの組換え細胞を使用して、本発明によって提供される抗体又は抗原結合断片を発現することができる。組換え細胞を培養することによって、相当する抗体が獲得され得る。これらの使用可能な哺乳動物細胞は、例えば、CHO細胞等であり得る。

#### 【0072】

医薬組成物、キット及び薬学的使用並びにキットの調製における使用

本発明はまた、上述される抗体又は抗原結合断片と、薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物を提供する。

#### 【0073】

本明細書中で提供される抗TrkA抗体は、対象への投与に適した医薬組成物に組み込まれ得る。概して、これらの医薬組成物は、本明細書中で提供される抗TrkA抗体並びに薬学的に許容可能な担体を含む。「薬学的に許容可能な担体」として、生理学的に適合性である任意の及び全ての溶媒、分散媒質、コーティング、抗細菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び遅延吸収剤等が挙げられ得る。具体例は、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、グルコース、グリセロール、エタノール等のうちの1つ又は複数、及びそれらの組合せであり得る。多くの場合、医薬組成物は、糖、ポリアルコール(マンニトール、ソルビトール等の)、又は塩化ナトリウム等の等張剤を含む。当然のことながら、薬学的に許容可能な担体はまた、抗体の有効期間又は有効性を延ばすために、微量の、湿潤剤又は乳剤、防腐剤又は緩衝剤等の補助物質を含み得る。

#### 【0074】

例えば、本発明の抗体は、非経口投与(例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋内)に適した医薬組成物に組み込まれ得る。これらの医薬組成物は、各種形態で調製され得る。例は、液体溶液(例えば、注射溶液及び注入溶液)、分散又は懸濁剤、錠剤、丸剤、粉末、リポソーム、及び坐剤を含むがこれらに限定されない液体、半固形及び固形投薬形態である。典型的な医薬組成物は、注射溶液又は注入溶液の形態で存在する。抗体は、静脈内注入若しくは注射又は筋内若しくは皮下注射によって投与され得る。

#### 【0075】

当然のことながら、本明細書中の抗TrkA抗体はまた、必要に応じて、キット又は他の診断試薬の一部にさせることができる。本発明の実施形態によれば、本発明はまた、上述のTrkA抗体を含むキットを提供する。本発明によって提供されるキットは、例えば、TrkA抗原及び抗体の特異的な結合特性を使用することを包含する、免疫ブロッティング、免疫沈降等による検出に使用され得る。これらのキットは、下記:アンタゴニスト、抗TrkA抗体又は薬物参照材料、タンパク質精製カラム、免疫グロブリンアフィニティ精製緩衝液、細胞アッセイ希釈液、説明書又は文献等のいずれか1つ又は複数を含み得る。抗TrkA抗体は、in vitro又はin vivoで、各種疾患、又は薬物、毒素若しくは他のタンパク質の存在の検出等の種々のタイプの診断検査に使用され得る。例えば、抗TrkA抗体は、対象の血清又は血液を検出することによって、関連疾患を検査するのに使用され得る。かかる関連疾患として、疼痛、癌、炎症又は炎症性疾患、神経変性疾患、シェーグレン症候群、子宮内膜症、糖尿病性末梢神経障害、前立腺炎、骨盤痛症候群、骨リモデリングの調節における平

10

20

30

40

50

平衡失調に関連した疾患及び結合組織成長因子の異常シグナル伝達によって引き起こされる疾患等のTrkA関連疾患が挙げられ得る。当然のことながら、本明細書中で提供される抗体はまた、上記疾患の放射免疫検出及び放射免疫療法に使用され得る。

【0076】

具体的には、上述の疼痛、炎症又は炎症性疾患、神経変性疾患、シェーグレン症候群、子宮内膜症、糖尿病性末梢神経障害、前立腺炎、骨盤痛症候群、骨リモデリングの調節における平衡失調に関連した疾患及び結合組織成長因子の異常シグナル伝達によって引き起こされる疾患として、神経障害性疼痛、炎症性疼痛、癌関連疼痛、骨折関連疼痛、手術関連疼痛、炎症性肺疾患、間質性膀胱炎、疼痛性膀胱症候群、炎症性腸疾患、炎症性皮膚疾患、レイノー症候群、特発性肺線維症、癩痕(肥大、ケロイド型及び他の形態)、硬化症、心内膜心筋線維症、心房線維症、骨髄線維症、進行性塊状線維症(肺)、腎性全身性線維症、強皮症、全身性硬化症、関節線維症、眼性線維症が挙げられる。

10

【0077】

これらの癌又は腫瘍は、任意の未制御の細胞成長であり得る。具体的には、それは、非小細胞肺癌、乳頭様甲状腺癌、多形性神経膠芽腫、結腸直腸癌、黒色腫、胆管癌若しくは肉腫、急性骨髄性白血病、大細胞型神経内分泌癌、神経芽細胞腫、前立腺癌、膀胱癌、黒色腫、頭頸部扁平上皮癌又は胃癌等であり得る。

【0078】

本発明によって提供される抗TrkA抗体を使用して、上述の疾患を処置する場合、本発明によって提供される抗TrkA抗体は、対象に提供され得る。この目的で、本発明は、上述の疾患を処置する方法であって、本発明によって提供される抗体又はその抗原結合断片を、必要とする対象に投与する工程を含む、方法を提供する。

20

【0079】

本発明の解決法は、実施例を参照して以下で説明される。下記の実施例は、単に本発明を説明するために使用されるに過ぎず、本発明の範囲を限定するとみなされるべきではないことは、当業者に理解されよう。特定の技術又は条件が、実施例で示されていない場合は、当該技術分野における文献若しくは製品説明中に記載されている技術又は条件が実施される。使用される試薬又は機器が、製造業者によって指定されない場合、それらは、市販されている全ての従来製品である。

【実施例1】

30

【0080】

ハイブリドーマ技術による抗TrkAモノクローナル抗体のスクリーニング

ハイブリドーマ技術及びELISA法を使用して、分子レベルでNGF及びTrkAの結合を阻止する抗TrkAモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマ細胞株をスクリーニングした。NCBIデータベースを使用して、哺乳動物真核生物発現系に構築されるTrkAタンパク質の細胞外領域をコードする遺伝子を設計した。TrkAタンパク質の細胞外領域は、抗TrkAモノクローナル抗体のスクリーニングのために発現及び使用された。免疫原TrkAタンパク質の細胞外領域は、Beijing Yiqiao Shenzhen Biotechnology社から得られた。Balb/Cマウスを、腹腔内注射によって3回免疫化した後、免疫化したマウスの血清抗体力価を、ELISA法によって決定して、 $10^5$ に達した。脾臓注射により免疫性をブーストした後、それを、骨髄腫細胞と融合させた。HAT選択培地及びHT選択培地を、選択培地に、また融合ハイブリドーマ細胞株をスクリーニングするのに使用して、ELISA法を使用して、抗TrkA抗体を産生することが可能な陽性ハイブリドーマ細胞株をスクリーニングして、限界希釈法によって、陽性ハイブリドーマ細胞のクローン培養を実施した後、抗TrkAモノクローナル抗体を産生することが可能な安定なハイブリドーマ細胞株を選択した。3回のクローニング培養及び4回のELISA検査後に、総計147個の陽性モノクローナルハイブリドーマ細胞株をスクリーニングした。NGFをピオチン化した。NGFは、TrkAタンパク質の細胞外領域に結合することができ、抗TrkAモノクローナル抗体もまた、TrkAタンパク質の細胞外領域に結合することができた。ELISAによって、NGFの、抗TrkAモノクローナル抗体の作用下でのTrkAタンパク質の細胞外領域への結合を検出するように、また分子レベルでNGF

40

50

及びTrkAの結合を阻止する抗TrkAモノクローナル抗体をスクリーニングするように、競合実験を設計した。図1は、147個の陽性モノクローナルハイブリドーマ細胞株の中で、分子レベルでNGF及びTrkAの結合を阻止する抗TrkAモノクローナル抗体を産生することができる9個のハイブリドーマ細胞株の阻止実験の結果を示し、即ち、分子レベルでNGF及びTrkAの結合を阻止する抗TrkAモノクローナル抗体を産生することが可能な総計9個のモノクローナルハイブリドーマ細胞株が獲得される。実験結果を図1に示す。図1では、OD<sub>450</sub>は、TrkAタンパク質の細胞外領域に結合するNGFシグナルを反映する。読取りがより高いと、TrkAタンパク質の細胞外領域に結合するNGFシグナルはより強く、NGFの、TrkAへの結合を阻止する際に、抗体はあまり有効ではなく、図1に示されるように、陰性クローン群と比較して、9個の陽性クローン群のELISA読取りは、有意に低減され、TrkAタンパク質の細胞外領域に結合するNGFシグナルは、有意に低減され、NGFの、TrkAタンパク質の細胞外領域への結合を阻止する抗TrkAモノクローナル抗体を生成することによって、これらの9個の陽性クローンが、TrkAタンパク質の細胞外領域に結合するNGFシグナル結合を低減し得ることが分かる。

#### 【実施例2】

##### 【0081】

HEK-293T-TrkA細胞モデルによる抗TrkAモノクローナル抗体のスクリーニング

レンチウイルス技術を使用して、HEK-293T-TrkA細胞モデルを構築し、細胞レベルでNGF及びTrkAの結合を阻止する抗TrkAモノクローナル抗体を産生することが可能なハイブリドーマ細胞株を、フローサイトメトリーによってスクリーニングした。NGFをビオチン化して、NGFは、HEK-293T-TrkA細胞上のTrkAタンパク質の細胞外領域に結合することができ、抗TrkAモノクローナル抗体もまた、HEK-293T-TrkA細胞上のTrkAタンパク質の細胞外領域に結合することができた。フローサイトメトリーによって、NGFの、抗TrkAモノクローナル抗体の作用下でのHEK-293T-TrkA細胞上でのTrkAタンパク質の細胞外領域への結合を検出するように、また細胞レベルでNGF及びTrkAの結合を阻止する抗TrkAモノクローナル抗体をスクリーニングするように、競合実験を設計した。細胞レベルでNGF及びTrkAの結合を阻止する抗TrkAモノクローナル抗体を産生することが可能な総計9個のモノクローナルハイブリドーマ細胞株を、スクリーニングにより獲得して、これらは、分子レベルの阻止実験の結果と一致する。実験結果を図2に示す。図2では、親%値は、HEK-293T-TrkA細胞上のTrkAタンパク質の細胞外領域に結合するNGFシグナルを反映する。読取りがより高いと、HEK-293T-TrkA細胞上のTrkAタンパク質の細胞外領域に結合するNGFシグナルはより強く、NGFの、TrkAへの結合を阻止する際に、抗体の効果はより悪く、図2に示されるように、陰性クローン群と比較して、9個の陽性クローン群の親%値は、有意に低減され、TrkAタンパク質の細胞外領域に結合するNGFシグナルは、有意に低減され、NGFの、HEK-293T-TrkA細胞上のTrkAタンパク質の細胞外領域への結合を阻止する抗TrkAモノクローナル抗体を生成することによって、これらの9個の陽性クローンが、HEK-293T-TrkA細胞上のTrkAタンパク質の細胞外領域に結合するNGFシグナルを低減し得ることが分かる。

#### 【実施例3】

##### 【0082】

ELISA法によるモノクローナル抗体を産生する陽性クローンのヒト-マウス交差反応の検出  
各陽性クローンの上清によって産生されたモノクローナル抗体の、マウス-TrkA受容体への結合は、ELISA法によって検出され、モノクローナル抗体を産生する陽性クローンのヒト-マウス交差反応を検出した。結果を図3に示す。図3では、OD<sub>450</sub>値は、抗体の、タンパク質への結合の強度を反映する。読取りがより大きいと、抗体の、タンパク質への結合はより強い。図3に示されるように、23E12、21E5、15D4、及び27H3群のOD<sub>450</sub>値は、およそ3.5であり、これは、陰性対照群とは有意に異なり、20C8、1B9、4H4、3A5、及び22D12群のOD<sub>450</sub>値は、ほぼ0に近く、陰性クローン群と比較して、有意な差は見られなかった。クローン23E12、21E5、15D4、及び27H3は、ヒト-TrkA及びマウス-TrkAの両方に結合するモノクローナル抗体を産生することができ、ヒト-マウス交差反応が

10

20

30

40

50

存在することが分かる。

【実施例 4】

【0083】

ベクターの構築

分子クローニング法を使用して、一連の(20C8、23E12、27H3、21E5、2A5、4H4、1B9、22D12、15D4)キメラ抗体発現ベクターを構築した。キメラ抗体は、CHO発現系で組換え的に発現された。一連の(20C8、23E12、27H3、21E5、2A5、4H4、1B9、22D12、15D4)キメラモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖をコードするヌクレオチド配列は、Jinweizhi Biotechnology社によって化学合成により獲得された。獲得された配列を、二重消化させて、真核生物発現ベクターの同じ消化部位に挿入して、一連の(20C8、23E12、27H3、21E5、2A5、4H4、1B9、22D12、15D4)キメラ抗体発現ベクターを構築した。続いて、一連の検証した正確な発現ベクターを、Invitrogen社のプラスミド抽出キットで抽出して、制限酵素で直鎖状にして、精製して、回収して、-20 で保管した。

10

【実施例 5】

【0084】

一連のキメラ抗体をコードするベクターのトランスフェクション及び細胞における発現

CHO宿主細胞を、CD CHO培地で復活させた(resuscitated)後、細胞密度が、約 $8 \times 10^5$ 個の細胞/mLになったら、細胞をトランスフェクション用に収集した。トランスフェクトした細胞は、約 $1 \times 10^7$ 個の細胞であり、ベクターは、約40  $\mu$ gであった。電気ショック法(Bio-Rad社、Gene pulser Xcell)によって、細胞をトランスフェクトした。電気ショック後に、細胞を、CD CHO培地20mL中で培養した。培養の翌日、細胞を、遠心分離によって収集し、最終濃度50  $\mu$ Mになるように、MSXを有するCD CHO培地20mL中に再懸濁させた。細胞密度が、約 $0.6 \times 10^6$ 個の細胞/mLになったら、獲得された混合クローンを、CD CHO培地を用いて継代培養して(subcultured)、継代細胞密度は、約 $0.2 \times 10^6$ 個の細胞/mLであった。細胞生存率が約90%になったら、細胞培養溶液を収集した。

20

【実施例 6】

【0085】

細胞発酵培地を収集することによるキメラ抗体の精製

一連のキメラ抗体を、翻訳レベルで検査した。プロテインAクロマトグラフィカラムを使用して、収集した細胞培養溶液を精製して、質量分析検出用に、吸収ピークを収集した。質量分析により、分子量約150KDを有する一連のキメラ抗体が検出され、これは、理論上の分子量と一致した。同時に、収集した試料を、還元及び非還元後の10%SDS-PAGE電気泳動によって検出した。還元SDS-PAGE電気泳動スペクトルにより、それぞれ約25KD及び50KDに2つのバンドが示された。非還元SDS-PAGE電気泳動スペクトルにより、約150KDに単一バンドが示された。電気泳動スペクトルのバンドサイズは、理論と一致する。精製した試料を、pH7.4の0.02M PBS緩衝液に対して、4 で一晩透析した。

30

【0086】

下記実施例7～実施例16では、本発明者等は、構築及び精製したキメラ抗体20C8、23E12、27H3、21E5、2A5、4H4、1B9、22D12、15D4を、TrkAとのそれらの親和性、及びTrkAへの結合の活性、及びTrkAタンパク質の細胞外領域へのNGFの阻止に関して評価した。

40

【実施例 7】

【0087】

HEK-293T-TrkA細胞モデルを使用した検査抗体の阻止活性の評価

NGFをビオチン化して、NGFは、HEK-293T-TrkA細胞上のTrkAタンパク質の細胞外領域に結合することができ、抗TrkAモノクローナル抗体もまた、HEK-293T-TrkA細胞上のTrkAタンパク質の細胞外領域に結合することができた。フローサイトメトリーによって、NGFの、種々の濃度(20  $\mu$ g/mL、10  $\mu$ g/mL、5  $\mu$ g/mL、2.5  $\mu$ g/mL、1.25  $\mu$ g/mL、0.625  $\mu$ g/mL、0.313  $\mu$ g/mL、0.156  $\mu$ g/mL、0.078  $\mu$ g/mL、0.039  $\mu$ g/mL、0.019  $\mu$ g/mL)の検査抗体下でのHEK-293T-TrkA細胞上でのTrkAタンパク質の細胞外領域

50

への結合を検出するように、またNGF及びTrkAの結合に対する検査抗体の阻害効果を研究するように、競合実験を設計した。実験結果を図4に示す。図4では、親%値は、HEK-293T-TrkA細胞上のTrkAタンパク質の細胞外領域に結合するNGFシグナルを反映する。読取りがより低いと、HEK-293T-TrkA細胞上のTrkAタンパク質の細胞外領域に結合するNGFシグナルはより弱く、NGFの、TrkAへの結合の阻害に対する抗体の効果はより大きく、図4に示されるように、検査抗体濃度が増加するにつれ、親%値は、それがゼロに近づくまで、徐々に減少し、即ち、TrkAタンパク質の細胞外領域に結合するNGFシグナルは、TrkAタンパク質の細胞外領域に結合するNGFが存在しなくなり、NGFの、TrkAへの結合が全て阻害されるまで、徐々に減少する。或る特定の濃度範囲内で、検査抗体はそれぞれ、細胞レベルでNGFの、TrkAへの結合を用量依存的に阻害し得ることが分かる。

10

## 【実施例8】

## 【0088】

NIH-3T3-TrkA細胞モデルを使用したin vitroでの検査抗体の活性の評価

NGF刺激下で、NIH-3T3-TrkA細胞の膜上のTrkAタンパク質のチロシンリン酸化レベルは、アップレギュレートされ、TrkA下流シグナル伝達経路が活性化された。検査抗体は、NIH-3T3-TrkA細胞膜の表面上のTrkAタンパク質に結合して、NGF刺激を阻害して、TrkAタンパク質のチロシンリン酸化レベルをダウンレギュレートすることができた。検査では、IgG4を陰性対照として使用し(抗体は、NGF及びTrkAに結合しない)、タネズマブ(抗-NGFモノクローナル抗体、軽鎖のアミノ酸配列は配列番号149に示され、重鎖のアミノ酸配列は配列番号150に示される、NGF-TrkA経路を阻害する薬物)及びMNAC13(抗TrkAモノクローナル抗体、軽鎖のアミノ酸配列は配列番号151に示され、重鎖のアミノ酸配列は配列番号152に示される、NGF-TrkA経路を阻害する薬物)を陽性対照として使用した。それらの中で、タネズマブを使用して、NIH-3T3-TrkA細胞モデルが、NGF-TrkA経路を阻害する薬物(検査薬物)のin vitroでの活性を評価するのに使用することができるかどうかを検証した。実験データを図5に示す。AlphaLISA法を使用して、種々の濃度の検査抗体及び陽性抗体MNAC13の作用下で、TrkAタンパク質のチロシンリン酸化のダウンレギュレーションを検出して、in vitroでの検査抗体の活性を測定した。p-TrkAの検査結果を図6に示す。実験結果により、検査抗体及び陽性抗体MNAC13の両方が、NGF-TrkA経路を阻害して、TrkAタンパク質のチロシンリン酸化レベルを用量依存的にダウンレギュレートすることができることが示される。それらの中で、検査抗体23E12、20C8、27H3、21E5、1B9、及び4H4の半阻害濃度IC<sub>50</sub>は、陽性抗体MNAC13の半阻害濃度IC<sub>50</sub>よりも小さい。検査抗体23E12、20C8、27H3、21E5、1B9、及び4H4は、陽性抗体MNAC13よりも、in vitroでより良好な活性を有することが分かる。

20

30

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDVATYYCQQEHTLPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSDKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号149)

QVQLQESGPGGLVQPKSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFYFDYWGQGLTQVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPKNTKVDKTKVERKCCVECPGPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSIVLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番号150)

40

DIVLTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMHYQQKPGQAPKLLIYTTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDVATYYCHQWSSYPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSDKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号151)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTYTMISWARQAPGKGLEWVAYISKGGGST

50

YYPD TVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDSAVYYCARGAMFGNDFPPMDRWGQG  
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEA  
 AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE  
 EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP  
 SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD  
 KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG(配列番号152)

【実施例9】

【0089】

Fortebio法を使用した、検査抗体の、TrkAに対する親和性の評価

10

検査抗体(23E12、20C8、21E5、27H3、1B9、4H4、2A5)試料を、緩衝溶液(PBS  
 緩衝液100ml、BSA 0.1gを添加して、完全に溶解するまで攪拌した後、Tween 20 20 μ  
 Lを添加して、十分に混合する)で、それぞれ4個の濃度勾配(80nM、26.67nM、8.89nM  
 、2.93nM)に希釈した。それらを、試料プレートの各ウェルに添加した。親和性検出系(O  
 CTET RED 96 SYSTEM)により、Ni-NTAセンサ(製造業者:PALL社、品番:18-5101)に  
 結合されたヒスチジンタグを有するTRKA(50 μg/ml、75kDa、HEC LabS社によって提  
 供される)タンパク質後に、各検査抗体とのTRKAタンパク質の結合を自動的に検出した。  
 結果をTable 1(表1)に示す。K<sub>D</sub>値は、抗体と、その抗原との間の平衡解離定数であり、K  
<sub>D</sub>値は、親和性に反比例する。K<sub>D</sub>値は、抗体濃度(特定の実験に必要なとされる抗体の量)に  
 関連している。K<sub>D</sub>値がより低い(濃度がより低い)と、抗体の親和性はより高い。高親和性  
 抗体は概して、低ナノモル範囲(10<sup>-9</sup>)で存在すると考えられる。Table 1(表1)の結果によ  
 り、検査抗体(23E12、20C8、21E5、27H3、1B9、4H4、2A5)のK<sub>D</sub>値は、低ナノモ  
 ル範囲(10<sup>-9</sup>)で存在することが示され、検査抗体が、高い親和性を有することを示してい  
 る。

20

【0090】

【表1】

Table 1:

試料 ID	K <sub>D</sub> (M)	kon(1/Ms)	kon 誤差	kdis(1/s)	kdis 誤差	完全 R <sup>2</sup>
23E12	5.70E-11	1.90E+06	6.33E+04	1.09E-04	7.47E-06	0.944
4H4	1.68E-09	1.39E+05	6.01E+03	2.34E-04	1.55E-05	0.961
20C8	1.15E-10	5.51E+05	2.34E+04	6.33E-05	1.17E-05	0.949
27H3	1.78E-10	1.57E+06	4.53E+04	2.79E-04	7.91E-06	0.929
21E5	1.73E-10	1.01E+06	2.08E+04	1.75E-04	5.60E-06	0.977
1B9	8.99E-10	1.01E+06	6.65E+04	9.04E-04	6.29E-05	0.910
2A5	1.62E-11	2.22E+05	1.42E+04	3.60E-06	1.96E-05	0.944

30

40

【実施例10】

【0091】

フローサイトメトリーによる検査抗体の親和性の評価

50

検査抗体(23E12、20C8、21E5、27H3、1B9、4H4、2A5)試料を、PBS緩衝溶液で、11個の濃度勾配(20 µg/mL、10 µg/mL、5 µg/mL、2.5 µg/mL、1.25 µg/mL、0.625 µg/mL、0.313 µg/mL、0.156 µg/mL、0.078 µg/mL、0.039 µg/mL、0.019 µg/mL)に希釈した。フローサイトメトリーを使用して、様々な濃度勾配の検査抗体の、HEK-293-TrKA細胞の表面上のTrKA受容体への結合を検出して、検査抗体の親和性を細胞レベルで評価した。結果を図7に示す。図7では、EC<sub>50</sub>(半結合濃度)値は、抗体の親和性を反映する。EC<sub>50</sub>値がより小さいと、抗体の親和性はより高い。概して、高親和性抗体のEC<sub>50</sub>値は、1.5 µg/mL未満であると考えられる。図7の結果により、検査抗体23E12、20C8、21E5、27H3、1B9、4H4、及び2A5のEC<sub>50</sub>値は全て、1.5 µg/mL未満であることが示され、検査抗体が、高い親和性を有することを示している。

10

**【実施例 1 1】****【0 0 9 2】**

ELISA法による、検査抗体の、標的TrKAへの結合の特異性の評価

TrKA受容体ファミリーは、TrkA、TrkB、及びTrkCを含む受容体チロシンキナーゼ(RTK)に属し、それらは、高い相同性を有する。TrkAは、NGFに選択的に結合して、NGFにとって機能性受容体である神経成長因子(NGF)の受容体チロシンキナーゼである。高親和性受容体TrkAの他に、NGFはまた、その低親和性受容体p75に結合することができる。検査では、種々の濃度(20 µg/mL、10 µg/mL、5 µg/mL、2.5 µg/mL、1.25 µg/mL、0.625 µg/mL、0.313 µg/mL、0.156 µg/mL、0.078 µg/mL、0.039 µg/mL、0.019 µg/mL)の検査抗体の、それぞれTrKA、TrkB、TrkC、及びp75への結合を、ELISA法によって検出し、標的TrKAに結合する検査抗体の特異性を評価した。結果を図8に示す。図8では、或る特定の抗体濃度で、OD<sub>450</sub>値は、抗体の、タンパク質への結合強度を反映する。読取りがより大きいと、抗体の、タンパク質への結合はより強い。実験結果により、検査した抗体23E12、20C8、27H3、21E5、1B9、4H4、及び2A5は全て、TrKA受容体への良好な結合を有する(検査抗体の濃度は、0 µg/mL ~ 20 µg/mLまで増加して、OD<sub>450</sub>値は、それが安定になるまで、徐々に増加し、それは、約3に近い)が、TrkB、TrkC、P75には結合しなかった(各検査抗体の濃度は、0 µg/mL ~ 20 µg/mLまで増加して、OD<sub>450</sub>値は、ほぼ変化しないままであり、それは、0に近い)ことが示される。検査抗体の、標的TrKAへの結合の特異性が、非常に良好であることが分かる。

20

**【実施例 1 2】****【0 0 9 3】**

ELISA法による、検査抗体の、マウス-TrKAタンパク質への結合能力の検出

検査抗体(23E12、21E5)試料を、PBS緩衝溶液で、11個の濃度勾配(20 µg/mL、10 µg/mL、5 µg/mL、2.5 µg/mL、1.25 µg/mL、0.625 µg/mL、0.313 µg/mL、0.156 µg/mL、0.078 µg/mL、0.039 µg/mL、0.019 µg/mL)に希釈した。検査抗体の、各濃度勾配のマウス-TrKA受容体への結合を、ELISA法によって検出して、したがって、検査抗体の、マウス-TrKAタンパク質への結合能力を検出した。結果を図9に示す。図9では、或る特定の抗体濃度で、OD<sub>450</sub>値は、抗体の、タンパク質への結合強度を反映する。読取りがより大きいと、抗体の、タンパク質への結合はより強い。実験結果により、検査抗体の濃度は、0 µg/mL ~ 20 µg/mLまで増加して、OD<sub>450</sub>値は、それが安定性に近づくまで、徐々に増加し、それは、約3.5に近いことが示される。検査抗体23E12、21E5、及びマウス-TrKAタンパク質は全て、良好な結合能力を有することが分かる。

40

**【実施例 1 3】****【0 0 9 4】**

フローサイトメトリーによる、検査抗体の、マウス-TrKAタンパク質への結合能力の検出

検査抗体23E12試料を、PBS緩衝溶液で、11個の濃度勾配(20 µg/mL、10 µg/mL、5 µg/mL、2.5 µg/mL、1.25 µg/mL、0.625 µg/mL、0.313 µg/mL、0.156 µg/mL、0.078 µg/mL、0.039 µg/mL、0.019 µg/mL)に希釈して、検査抗体の、各濃度勾配のHEK293T-マウス-TrKA細胞の表面上のマウス-TrKA受容体への結合を、フローサイトメトリーによって検出した。抗体の、マウス-TrKAタンパク質への結合能力を検査した。

50

結果を図10に示す。図10では、 $EC_{50}$ (半結合濃度)値は、抗体の結合能を反映する。 $EC_{50}$ 値がより小さいと、抗体の結合能はより強い。実験結果により、検査抗体の濃度は、 $0\ \mu\text{g}/\text{mL} \sim 20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ まで増加して、親%値は、それが安定性に近づくまで、徐々に増加し、 $EC_{50}$ 値= $0.08012\ \mu\text{g}/\text{mL}$ であることが示される。検査抗体23E12は、HEK293T-マウス-TrkA細胞の表面上のマウス-TrkA受容体と良好な結合能力を有することが分かる。

【実施例14】

【0095】

ELISA法による、マウス-NGF及びマウス-TrkAの結合に対する検査抗体の阻害効果の検出

検査では、IgG4を陰性対照として使用し(抗体は、マウス-NGF及びマウス-TrkAに結合しない)、マウス-NGFをビオチン化した。マウス-NGFは、マウス-TrkAタンパク質に結合することができ、抗マウス-TrkAモノクローナル抗体もまた、マウス-TrkAタンパク質に結合することができた。ELISA法によって、種々の濃度( $2.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.25\ \mu\text{g}/\text{mL}$ )の検査抗体(23E12、21E5)下でのマウス-NGF及びマウス-TrkAタンパク質の結合を検出するように、競合実験を設計した。したがって、マウス-NGF及びマウス-TrkAの結合に対する検査抗体の阻害性効果を研究した。実験結果を図11に示す。図11では、 $OD_{450}$ 値は、マウス-TrkAに結合するマウス-NGFシグナルを反映する。読取りがより低いと、マウス-TrkAに結合するマウス-NGFシグナルはより弱く、マウス-NGF及びマウス-TrkAの結合の阻害に対する抗体の効果がより大きく、図11に示されるように、陰性対照群と比較して、マウス-TrkAに結合するマウス-NGFシグナルは、種々の濃度( $2.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.25\ \mu\text{g}/\text{mL}$ )の検査抗体(23E12、21E5)の効果下では有意に低減された。検査抗体23E12及び21E5が、マウス-NGF及びマウス-TrkAの結合を阻害することができることが分かる。

【実施例15】

【0096】

フローサイトメトリーによる、マウス-NGF及びマウス-TrkAの結合に対する検査抗体の阻害効果の検出

マウス-NGFをビオチン化した。マウス-NGFは、HEK293T-マウス-TrkA細胞上のマウス-TrkAタンパク質の細胞外領域に結合することができ、抗マウス-TrkAモノクローナル抗体もまた、HEK293T-マウス-TrkA細胞上のマウス-TrkAタンパク質の細胞外領域に結合することができた。フローサイトメトリーによって、マウス-NGFの、種々の濃度( $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $2.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $1.25\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.625\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.313\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.156\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.078\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.039\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.019\ \mu\text{g}/\text{mL}$ )の検査抗体下でのHEK293T-マウス-TrkA細胞上のマウス-TrkAタンパク質の細胞外領域への結合を検出するように、競合実験を設計し、したがって、マウス-NGF及びマウス-TrkAの結合に対する検査抗体の阻害性効果を研究した。実験結果を図12に示す。図12では、親%値は、HEK293T-マウス-TrkA細胞上のマウス-TrkAタンパク質の細胞外領域に結合するマウス-NGFを反映する。読取りがより低いと、HEK293T-マウス-TrkA細胞上のマウス-TrkAタンパク質の細胞外領域に結合するマウス-NGFシグナルはより弱く、マウス-NGF及びマウス-TrkAの結合の阻害に対する抗体の効果はより大きく、図12に示されるように、検査抗体濃度が増加するにつれ、親%値は、それがゼロに近づくまで、徐々に減少し、即ち、マウス-TrkAタンパク質の細胞外領域に結合するマウス-NGFのシグナルは、マウス-NGFが、マウス-TrkAタンパク質の細胞外領域に結合しなくなり、マウス-NGF及びマウス-TrkAの結合が全て阻害されるまで、徐々に減少する。 $IC_{50}$ = $0.05147\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 。或る特定の濃度範囲内で、検査抗体23E12は、細胞レベルでマウス-NGF及びマウス-TrkAの結合を用量依存的に阻害し得ることが分かる。

【実施例16】

【0097】

ELISA法による、ヒト-NGF及びヒト-TrkAの結合に対する検査抗体の阻害効果の検出

マウス-NGFをビオチン化した。マウス-NGFは、マウス-TrkAタンパク質に結合することができ、抗マウス-TrkAモノクローナル抗体もまた、マウス-TrkAタンパク質に結合することができた。ELISA法によって、種々の濃度( $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $2$

10

20

30

40

50

.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.625  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.313  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.156  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.078  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.039  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.019  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )の検査抗体下でのマウス-NGF及びマウス-TrkAタンパク質の結合を検出するように、競合実験を設計して、したがって、マウス-NGF及びマウス-TrkAの結合に対する検査抗体の阻害性効果を研究した。実験結果を図13に示す。図13では、 $\text{OD}_{450}$ 値は、マウス-TrkAに結合するマウス-NGFシグナルを反映する。読取りがより低いと、マウス-TrkAに結合するマウス-NGFシグナルはより弱く、マウス-NGF及びマウス-TrkAの結合の阻害に対する抗体の効果はより大きく、図13に示されるように、検査抗体の濃度が増加するにつれ、 $\text{OD}_{450}$ 値は、それがゼロに近づくまで、徐々に減少し、即ち、マウス-TrkAタンパク質の細胞外領域に結合するマウス-NGFのシグナルは、マウス-NGFが、マウス-TrkAタンパク質の細胞外領域にほとんど結合しなくなり、マウス-NGF及びマウス-TrkAの結合がほぼ完全に阻害されるまで、徐々に減少する。或る特定の濃度範囲内で、検査抗体23E12、20C8、21E5、27H3、4H4、2A5は、分子レベルでNGF及びTrkAの結合を用量依存的に阻害し得ることが分かる。

10

#### 【実施例17】

#### 【0098】

ホルマリン誘導性疼痛モデルを使用した検査抗体のin vivoでの鎮痛活性の評価

ホルマリン炎症性疼痛モデルは、ホルマリンを注射することによって、一過性の疼痛刺激及び応答ではなく、連続的な疼痛刺激及び応答をもたらす検証済の疼痛モデルである。このモデルは、2つの期の疼痛を生じ、それらは、I期の化学的に刺激された疼痛及びII期の炎症性疼痛である。このモデルによって引き起こされる疼痛応答は、再現性があり、測定可能である。このモデルは、前臨床疼痛研究に関する最良のモデルの1つであり、種々の薬物の鎮痛効果を評価するのに広く使用されている。検査では、6週～8週齢の雄ICRマウスを選択し、モデリング前の体重に従って、6つの群に無作為に分けた:モデル群(生理食塩水の皮下注射)、タネズマブ60  $\mu\text{g}/\text{マウスの用量群}$ 、20C8 60  $\mu\text{g}/\text{マウスの用量群}$ 、21E5 60  $\mu\text{g}/\text{マウスの用量群}$ 、23E12 15  $\mu\text{g}/\text{マウスの用量群}$ 、23E12 60  $\mu\text{g}/\text{マウスの用量群}$ 。各群中にマウス10匹。薬物を皮下投与した。18時間後、2.5%ホルマリン溶液15  $\mu\text{L}$ を、マウスの右後肢の裏側に皮下注射した。マウスが、45分以内に足を持ち上げた回数を観察した。1分～15分は、I期疼痛であり、16分～45分は、II期疼痛である。一般的に言うと、I期疼痛は、急性疼痛を反映し、II期疼痛は、慢性疼痛を反映する。結果を図14に示す(図14のデータは、 $\text{平均値} \pm \text{SEM}$ であり、 $n=10/\text{群}$ 、溶媒モデル群と比較して、\* $p < 0.05$ 、一元分散分析(single factor analysis of variance)+LSD多重比較検定を使用)。図14の足の持ち上げの数は、モデリング後のマウスの疼痛強度を反映する。足の持ち上げの数がより少ないと、疼痛はより弱い。結果により、モデル群と比較して、23E12 60  $\mu\text{g}/\text{マウスの用量群}$ は、マウスのII期疼痛において、足の持ち上げの数を有意に低減させることができ、他の用量群は、モデリング後にマウスの足の持ち上げの数を低減させることはできないことが示される。結論:ホルマリン誘導性疼痛モデルでは、60  $\mu\text{g}/\text{マウスの検査抗体23E12の皮下注射が、慢性疼痛に有効であるのに対して、陽性薬物タネズマブは、鎮痛効果を示さず、ホルマリン誘導性疼痛モデルに感受性がない可能性がある。$

20

30

#### 【実施例18】

#### 【0099】

完全フロイントアジュバント誘導性炎症疼痛モデルを使用した検査抗体のin vivoでの鎮痛活性の評価

完全フロイントアジュバント誘導性炎症疼痛モデルは、マウスの手掌に完全フロイントアジュバントを注射することによって、変形性関節症及び応答に類似した慢性炎症性疼痛刺激をもたらす疼痛モデルである。疼痛は、機械的疼痛検査によって測定される。機械的刺激の強度がより大きいと、動物は、疼痛に対してより耐性である。検査では、8週齢の雄ICRマウスを選択し、モデリング前の疼痛感受性に従って、6つの群に無作為に分けて(15匹/群):対照群(生理食塩水25  $\mu\text{l}$ の注射+マウスの左後肢の足底での生理食塩水の皮下注射)、モデル群(CFA誘導性炎症疼痛25  $\mu\text{l}$ の注射+マウスの左後肢での生理食塩水の皮下注射)、タネズマブ60  $\mu\text{g}/\text{マウスの用量群}$ 、23E12 60  $\mu\text{g}/\text{マウスの用量群}$ 、モデリン

40

50

グの4日後に、薬物を皮下注射して、投与の36時間後に、機械的疼痛検査を実施した。結果を図15に示す(図15のデータは、平均値 $\pm$ SEMであり、 $n=15$ /群、ブランク対照群と比較して、# $p < 0.05$ 、## $p < 0.01$ 、モデル群と比較して、\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 、ノンパラメトリック統計解析+独立したサンプルのt検定を使用)。縦軸は、機械的刺激の強度を表す。マウスの足の引き下げの圧力閾値がより高いと、鎮痛効果はより良好である。結果により、モデル群と比較して、 $60 \mu\text{g}$ /マウスの23E12及び $60 \mu\text{g}$ /マウスのタネズマブの皮下注射は、マウスの足の引き下げの圧力閾値を有意に増加させることができ( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ )、鎮痛効果を示すことが示される。鎮痛効果はともに、同等である。結論： $60 \mu\text{g}$ /マウスの検査抗体23E12の皮下注射は、完全フロイントアジュバント誘導性炎症性疼痛モデルにおいて、鎮痛効果を示す。

10

**【実施例19】****【0100】**

## 検査抗体の毒性検査

この実施例では、本発明者等によって実施されるべき毒性検査を、以下のTable 2(表2)に示す。

**【0101】**

20

30

40

50

【表 2 A】

Table 2:

研究プロジェクト	投与様式	種又は照会システム	主な研究	結果
単回投与の毒性	i.v	SD ラット	標的臓器毒性が発生するかどうかを観察。関連症状、体重、食物摂取、検眼鏡検査、心電図、血液学、臨床生化学、尿、臓器の重さに対する影響を観察;最大耐量 MTD、及び十分な安全係数が提供された。	動物は死亡せず、びまん性炎症性浸潤は、臓器及び組織で観察されたが、標的臓器毒性は、臨床病理学又は組織学的分析に関係なく示されなかった。体重、食物摂取、検眼鏡検査、心電図、血液学、臨床生化学、尿、臓器の重さに対して、著しい影響は見られなかった。肉眼的解剖学では、著しい異常性は見られなかった。
		カニクイザル		
反復投与の毒性	i.v.(1週に1度、4週)	SD ラット	臨床病理学及び組織学を観察して、標的臓器毒性 NOAEL が見られるかどうかを決定;体重、食物摂取、検眼鏡検査、心電図、血液学、臨床生化学、尿、臓器の重さに対する影響を観察;安全性ウィンドウは、免疫原性(ADA(抗薬物抗体)分析法)、免疫毒性研究(評価として、白血球(マクロファージを含む)の血液学的百分率、臨床化学(グロブリン及びアルブミン:グロブリン比)が挙げられる)、臓器質量(胸腺、脾臓、リンパ節)及び組織病理学(リンパ器官及び組織)によって算出された。	動物は死亡せず、びまん性炎症性浸潤は、臓器及び組織で観察されたが、標的臓器毒性は、臨床病理学又は組織学的分析に関係なく示されなかった。ニボルマブに関連した症状は見られず、体重、食物摂取、検眼鏡検査、心電図、血液学、臨床生化学、尿、及び臓器の重さに対して、著しい影響は見られなかった。肉眼的解剖学では、著しい異常性は見られなかった。
		カニクイザル		

10

20

30

40

【 0 1 0 2 】

50

【表 2 B】

一般的な 安全性薬 理学	i.v./単 回用量	中枢神経 系	主な研究焦点は、薬物 の投与量が、治療範囲 内又は治療範囲を超え る場合の生理学的機能 に対する潜在的な望まし くはない有害作用にあ り、即ち、中枢神経 系、心血管系及び呼吸 器系に対する薬物の影 響を観察することにあ る。	薬物は、中枢神経系、心 血管系及び呼吸器系に 対して影響がなかった。	10
		呼吸器系			
		心血管系			
局所薬物 安全性検 査	血管刺 激検査 及び in vitro で の溶血 検査	ウサギ	薬物が、血管及び血液 に対して影響があるか どうかを検査	影響なし	
高感作検 査	モルモ ット全 身活性 アレルギー 検査	モルモ ット	感作が見られるどうか を決定	感作なし	20

## 【 0 1 0 3 】

それらの中で、上記実験プロセス及び実験の結論は下記の通りである：

毒性実験：

単回投与の毒性

SDラット及びカニクイザルを、標的臓器毒性に関して観察した。体重、食物摂取、検眼鏡検査、心電図、血液学、臨床生化学、尿及び臓器の重さに対する影響等の関連症状を観察した。最大耐量MTD及び十分な安全係数が提供された。結果により、動物の死は見られず、びまん性炎症性浸潤は、臓器及び組織で観察されたが、標的臓器毒性は、臨床病理学又は組織学的分析では示されないことが示された。体重、食物摂取、検眼鏡検査、心電図、血液学、臨床生化学、尿及び臓器の重さに対して、著しい影響は見られなかった。肉眼的解剖学では、著しい異常性は見られなかった。

## 【 0 1 0 4 】

反復投与の毒性:SDラット及びカニクイザルに、1週に1度、4週連続して薬物を静脈内に注射した。臨床病理学及び組織学を観察して、標的臓器毒性NOAELが見られるかどうかを決定した。体重、食物摂取、検眼鏡検査、心電図、血液学、臨床生化学、尿及び臓器の重さに対する影響を観察した。安全性ウィンドウは、免疫原性(ADA(抗薬物抗体)分析法)、免疫毒性研究(評価として、白血球(マクロファージを含む)の血液学的百分率(differential count)、臨床化学(グロブリン及びアルブミン:グロブリン比)が挙げられる)、臓器質量(胸腺、脾臓、リンパ節)及び組織病理学(リンパ器官及び組織)によって算出された。結果により、動物は死亡せず、びまん性炎症性浸潤は、臓器及び組織で観察されたが、標的臓器毒性は、臨床病理学又は組織学的分析に関係なく示されないことが示された。ニボルマブに関連した症状は見られず、体重、食物摂取、検眼鏡検査、心電図、血液学、臨床生化学、尿、及び臓器の重さに対して、著しい影響は見られなかった。肉眼的解剖学では、著しい異常性は見られなかった。

10

20

30

40

50

## 【0105】

一般的な安全性薬理学:SDラットに、薬物を単回投与で静脈内に注射した。中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対する薬物の影響を観察した。結果により、薬物は、中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対して影響がないことが示された。

## 【0106】

局所投与安全性検査(血管刺激検査及びin vitroでの溶血検査):ニュージーランドホワイトトラピットに、薬物を静脈内に注射して、薬物が、血管及び血液に対して影響があるかどうかを検査した。結果により、薬物が、血管及び血液に対して影響がないことが示された。

## 【0107】

高感作検査(モルモットにおける全身活性アレルギー検査):モルモットに、薬物を単回投与で静脈内に注射して、薬物が感作を有するかどうかを観察した。結果により、薬物は感作を有さないことが示された。

10

## 【0108】

本明細書全体にわたって、「或る実施形態」、「幾つかの実施形態」、「一実施形態」、「別の実施形態」、「或る実施例」、「具体的な実施例」又は「幾つかの実施例」に関する言及は、その実施形態又は実施例と関連して記載される特定の特色、構造、材料、又は特徴が、本開示の少なくとも1つの実施形態又は実施例において包含されることを意味する。したがって、本明細書全体にわたる様々な場所における「幾つかの実施形態では」、「一実施形態では」、「或る実施形態では」、「別の実施例では」、「或る実施例では」、「具体的な実施例では」又は「幾つかの実施例では」等の語句の出現は、必ずしも本開示の同じ実施形態又は実施例について言及しているわけではない。更に、特定の特色、構造、材料、又は特徴は、1つ若しくは複数の実施形態又は実施例において、任意の適切な様式で組み合わせられてもよい。更に、いかなる矛盾なく、当業者は、種々の実施形態又は実施例と、本明細書中に記載される種々の実施形態又は実施例の特色とを組み合わせてもよい。

20

## 【0109】

説明的な実施形態を図示及び記載してきたが、上記実施形態は、本開示を限定するものと解釈することはできず、変更、代替物、及び修正が、本開示の趣旨、原理及び範囲を逸脱することなく、実施形態において成され得ることが、当業者に理解されよう。

30

40

50

【 図面 】

【 図 1 】

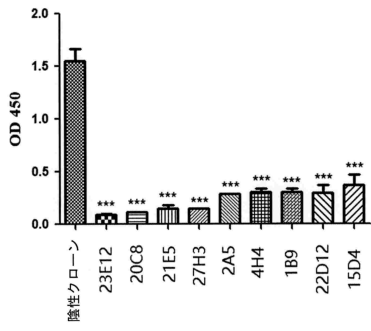


Figure 1

【 図 2 】

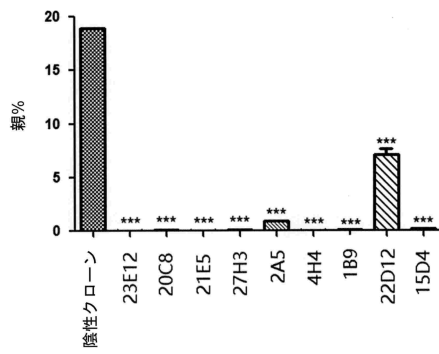


Figure 2

【 図 3 】

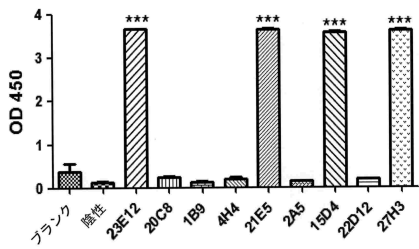
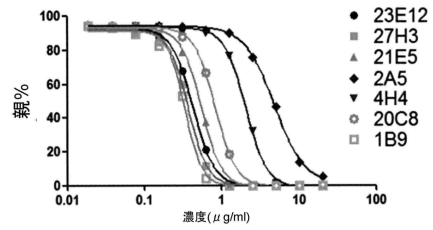


Figure 3

【 図 4 】



McAb	23E12	27H3	21E5	4H4	2A5	20C8	1B9
IC50	0.4258	0.3695	0.5472	2.041	4.800	0.8218	0.3342

Figure 4

10

20

30

40

50

【 図 5 】

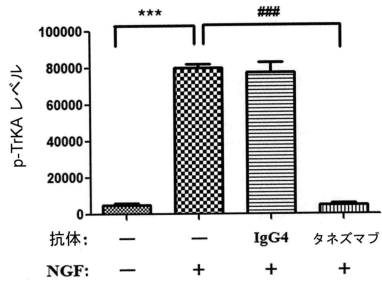
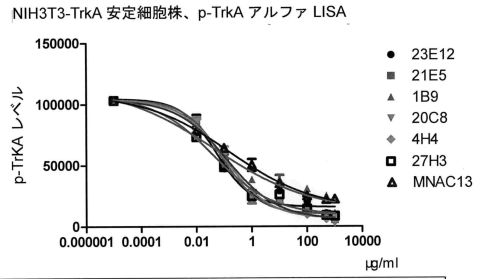


Figure 5

【 図 6 】

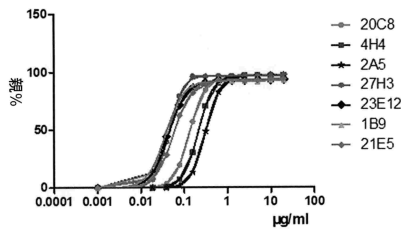


EC50						
23E12	21E5	1B9	20C8	4H4	27H3	MNAC13
0.05372	0.08564	0.04727	0.1099	0.1288	0.04374	0.16

Figure 6

10

【 図 7 】



McAb	20C8	4H4	2A5	27H3	23E12	1B9	21E5
EC50	0.1357	0.2113	0.3116	0.04465	0.04429	0.03724	0.05752

Figure 7

【 図 8 A B 】

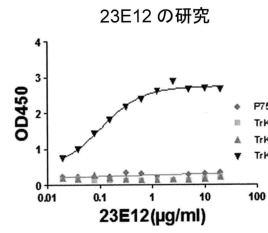


Figure 8A

20

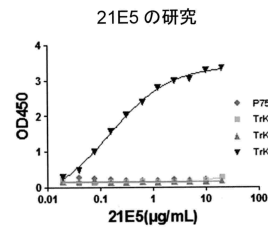


Figure 8B

30

40

50

【 図 8 C D 】

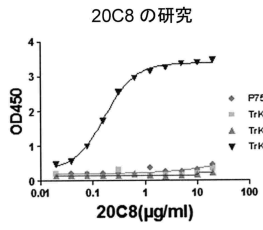


Figure 8C

【 図 8 E F 】

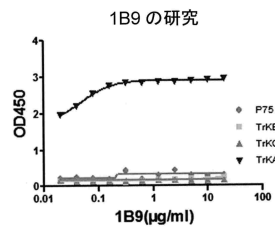


Figure 8E

10

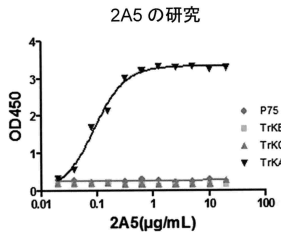


Figure 8D

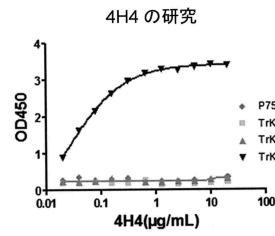


Figure 8F

20

【 図 8 G 】

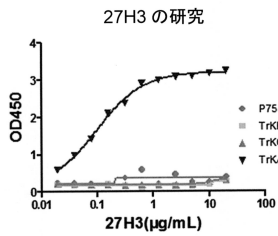
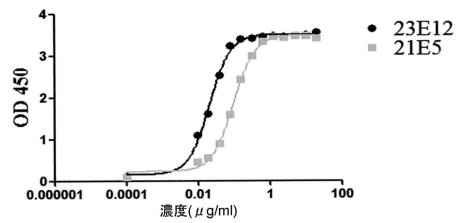


Figure 8G

【 図 9 】



McAb	23E12	21E5
EC50	0.02076	0.09543

Figure 9

30

40

50

【図 1 0】

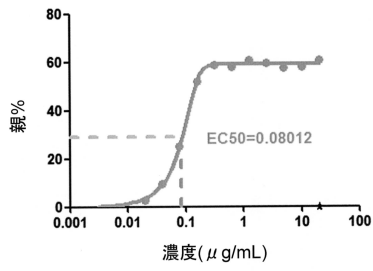


Figure 10

【図 1 1】

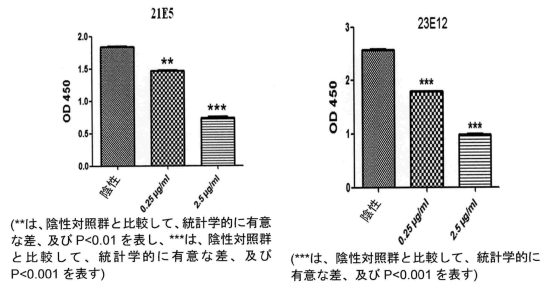


Figure 11

10

【図 1 2】

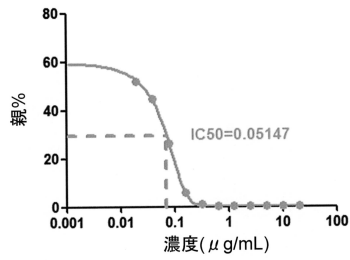


Figure 12

【図 1 3】

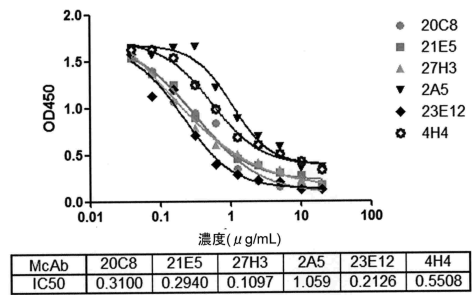


Figure 13

20

【図 1 4】

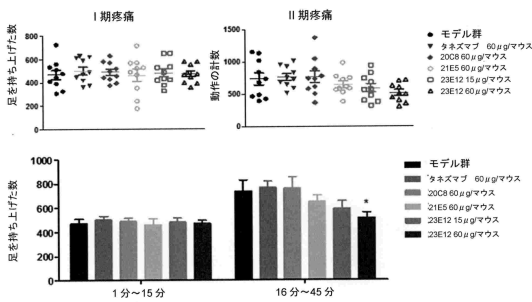


Figure 14

【図 1 5】

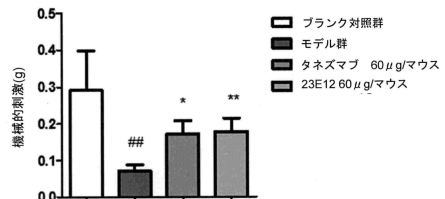


Figure 15

30

40

50

【配列表】

0007671699000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

A 6 1 P 29/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 29/02 (2006.01)  
 A 6 1 P 25/28 (2006.01)  
 A 6 1 P 37/06 (2006.01)  
 A 6 1 P 15/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 25/02 (2006.01)  
 A 6 1 P 13/08 (2006.01)  
 A 6 1 P 19/08 (2006.01)  
 A 6 1 P 19/04 (2006.01)  
 A 6 1 P 11/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 13/10 (2006.01)  
 A 6 1 P 1/04 (2006.01)  
 A 6 1 P 17/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 17/02 (2006.01)  
 A 6 1 P 25/00 (2006.01)  
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)  
 G 0 1 N 33/53 (2006.01)  
 A 6 1 P 13/12 (2006.01)  
 A 6 1 P 9/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 27/02 (2006.01)

## F I

A 6 1 P 29/00  
 A 6 1 P 29/02  
 A 6 1 P 25/28  
 A 6 1 P 37/06  
 A 6 1 P 15/00  
 A 6 1 P 25/02  
 A 6 1 P 13/08  
 A 6 1 P 19/08  
 A 6 1 P 19/04  
 A 6 1 P 11/00  
 A 6 1 P 13/10  
 A 6 1 P 1/04  
 A 6 1 P 17/00  
 A 6 1 P 43/00 1 0 5  
 A 6 1 P 17/02  
 A 6 1 P 25/00  
 A 6 1 K 39/395 M  
 A 6 1 K 39/395 N  
 G 0 1 N 33/53 D  
 A 6 1 P 13/12  
 A 6 1 P 9/00  
 A 6 1 P 27/02

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(74)代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 チャオ・チェン

中華人民共和国・5 2 3 8 7 1・グアンドン・ドングアン・チャン・アン・タウン・シャン・シャ  
・ゼン・アン・ロード・ナンバー・3 6 8・ドンヤングアン・ハイ・テック・パーク

(72)発明者 ジェン・レン

中華人民共和国・5 2 3 8 7 1・グアンドン・ドングアン・チャン・アン・タウン・シャン・シャ  
・ゼン・アン・ロード・ナンバー・3 6 8・ドンヤングアン・ハイ・テック・パーク

(72)発明者 ジュアンディ・ヘ

中華人民共和国・5 2 3 8 7 1・グアンドン・ドングアン・チャン・アン・タウン・シャン・シャ  
・ゼン・アン・ロード・ナンバー・3 6 8・ドンヤングアン・ハイ・テック・パーク

(72)発明者 ジェリアン・ル

中華人民共和国・5 2 3 8 7 1・グアンドン・ドングアン・チャン・アン・タウン・シャン・シャ  
・ゼン・アン・ロード・ナンバー・3 6 8・ドンヤングアン・ハイ・テック・パーク

(72)発明者 シュシャン・リン

中華人民共和国・5 2 3 8 7 1・グアンドン・ドングアン・チャン・アン・タウン・シャン・シャ  
・ゼン・アン・ロード・ナンバー・3 6 8・ドンヤングアン・ハイ・テック・パーク

(72)発明者 ティンティン・ユ

中華人民共和国・5 2 3 8 7 1・グアンドン・ドングアン・チャン・アン・タウン・シャン・シャ  
・ゼン・アン・ロード・ナンバー・3 6 8・ドンヤングアン・ハイ・テック・パーク

(72)発明者 シリン・ウェイ

中華人民共和国・5 2 3 8 7 1・グアンドン・ドングアン・チャン・アン・タウン・シャン・シャ  
・ゼン・アン・ロード・ナンバー・3 6 8・ドンヤングアン・ハイ・テック・パーク

(72)発明者 シュファン・ワン

中華人民共和国・5 2 3 8 7 1・グアンドン・ドングアン・チャン・アン・タウン・シャン・シャ  
・ゼン・アン・ロード・ナンバー・3 6 8・ドンヤングアン・ハイ・テック・パーク

(72)発明者 レ・シュ

- 中華人民共和国・523871・グアンドン・ドングアン・チャン・アン・タウン・シャン・シャ  
・ゼン・アン・ロード・ナンバー・368・ドンヤングアン・ハイ・テック・パーク
- (72)発明者 ジュンジ・ドン
- 中華人民共和国・523871・グアンドン・ドングアン・チャン・アン・タウン・シャン・シャ  
・ゼン・アン・ロード・ナンバー・368・ドンヤングアン・ハイ・テック・パーク
- (72)発明者 シアン・リ
- 中華人民共和国・523871・グアンドン・ドングアン・チャン・アン・タウン・シャン・シャ  
・ゼン・アン・ロード・ナンバー・368・ドンヤングアン・ハイ・テック・パーク
- (72)発明者 クオ・ジャン
- 中華人民共和国・523871・グアンドン・ドングアン・チャン・アン・タウン・シャン・シャ  
・ゼン・アン・ロード・ナンバー・368・ドンヤングアン・ハイ・テック・パーク
- (72)発明者 シュエヤオ・ヤン
- 中華人民共和国・523871・グアンドン・ドングアン・チャン・アン・タウン・シャン・シャ  
・ゼン・アン・ロード・ナンバー・368・ドンヤングアン・ハイ・テック・パーク
- (72)発明者 リンフェン・グオ
- 中華人民共和国・523871・グアンドン・ドングアン・チャン・アン・タウン・シャン・シャ  
・ゼン・アン・ロード・ナンバー・368・ドンヤングアン・ハイ・テック・パーク
- (72)発明者 シャオピン・リ
- 中華人民共和国・523871・グアンドン・ドングアン・チャン・アン・タウン・シャン・シャ  
・ゼン・アン・ロード・ナンバー・368・ドンヤングアン・ハイ・テック・パーク
- (72)発明者 シャオフエン・チェン
- 中華人民共和国・523871・グアンドン・ドングアン・チャン・アン・タウン・シャン・シャ  
・ゼン・アン・ロード・ナンバー・368・ドンヤングアン・ハイ・テック・パーク
- (72)発明者 ウェンジア・リ
- 中華人民共和国・523871・グアンドン・ドングアン・チャン・アン・タウン・シャン・シャ  
・ゼン・アン・ロード・ナンバー・368・ドンヤングアン・ハイ・テック・パーク
- 審査官 齊藤 貴子
- (56)参考文献 特表2015-520182(JP,A)  
米国特許出願公開第2016/0244529(US,A1)  
国際公開第2018/166461(WO,A1)  
特表2003-501103(JP,A)
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)  
C12N  
C07K  
A61P  
A61K  
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)  
UniProt/GeneSeq