

(30) 우선권주장

60/443,522 2003년01월28일 미국(US)

60/510,006 2003년10월08일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 약 2 nM 이하의 K_D 로 NGF에 결합하고;
- (b) 약 100 pM 이하의 IC50을 갖는 마우스 13.5 삼차신경 뉴런의 사람 NGF-의존성 생존을 억제하는데, 여기서 IC50은 약 15 pM 사람 NGF의 존재 하에서 측정되며;
- (c) 약 10 pM 이하의 IC50을 갖는 마우스 E13.5 삼차신경 뉴런의 사람 NGF-의존성 생존을 억제하는데, 여기서 IC50은 약 1.5 pM의 사람 NGF의 존재 하에서 측정되는 것을 특징으로 하는 항-신경 성장 인자(NGF) 항체.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 항체는 인간화 된 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 항체는 친화성 발달된 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 항체는 단일클론 항체인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 항체는 단리된 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 6

(a) SEQ ID NO:9의 위치 9에서 아미노산은 S, L, V, A, 또는 I이고; SEQ ID NO:9의 위치 10에서 아미노산은 N, T 또는 S인, SEQ ID NO:9의 CDR1 영역;

(b) SEQ ID NO:10의 위치 1에서 아미노산은 M, I, G, Q, S, 또는 L이고; SEQ ID NO:10의 위치 13에서 아미노산은 A, 또는 S이며; SEQ ID NO:10의 위치 14에서 아미노산은 L 또는 V인, SEQ ID NO:10의 CDR2 영역; 및

(c) SEQ ID NO:11의 위치 3에서 아미노산은 Y, L, 또는 R이고; SEQ ID NO:11의 위치 4에서 아미노산은 Y 또는 W이며; SEQ ID NO:11의 위치 6에서 아미노산은 G, A, 또는 S이고; SEQ ID NO:11의 위치 7에서 아미노산은 T 또는 S이며; SEQ ID NO:11의 위치 8에서 아미노산은 S, A, 또는 T이고; SEQ ID NO:11의 위치 9에서 아미노산은 Y, R, T, 또는 M이며; SEQ ID NO:11의 위치 10에서 아미노산은 Y 또는 F이고; SEQ ID NO:11의 위치 11에서 아미노산은 F 또는 W이며; SEQ ID NO:11의 위치 12에서 아미노산은 D, N, 또는 G이고; SEQ ID NO:11의 위치 13에서 아미노산은 Y, K, S, R 또는 T인, SEQ ID NO:11의 CDR3 영역

을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체로서,

상기 항체는 NGF에 결합하고,

상기 항체는 SEQ ID NO:9에 나타낸 CDR1 영역, SEQ ID NO:10에 나타낸 CDR2 영역, 및 SEQ ID NO:11에 나타낸 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 SEQ ID NO:12에 나타낸 CDR1 영역, SEQ ID NO:13에 나타낸 CDR2 영역, 및 SEQ ID NO:14에 나타낸 CDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체가 아닌 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 항체는 경쇄 가변 영역을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 8

(a) SEQ ID NO:12의 위치 3에서 아미노산은 S 또는 F이고; SEQ ID NO:12의 위치 5에서 아미노산은 D, S, A, 또

는 Y이며; SEQ ID NO:12의 위치 9에서 아미노산은 H, N, 또는 Q인, SEQ ID NO:12의 CDR1 영역;

(b) SEQ ID NO:13의 위치 2에서 아미노산은 I, T, V 또는 A이고; SEQ ID NO:13의 위치 7에서 아미노산은 S 또는 T인, SEQ ID NO:13의 CDR2 영역; 및

(c) SEQ ID NO:14의 위치 3에서 아미노산은 S 또는 E이고; SEQ ID NO:14의 위치 4에서 아미노산은 K, H, R, 또는 S이며; SEQ ID NO:14의 위치 8에서 아미노산은 Y 또는 R인, SEQ ID NO:14의 CDR3 영역

을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체로서,

상기 항체는 NGF에 결합하고,

상기 항체는 SEQ ID NO:9에 나타낸 CDR1 영역, SEQ ID NO:10에 나타낸 CDR2 영역, 및 SEQ ID NO:11에 나타낸 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 SEQ ID NO:12에 나타낸 CDR1 영역, SEQ ID NO:13에 나타낸 CDR2 영역, 및 SEQ ID NO:14에 나타낸 CDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체가 아닌 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 항체는 중쇄 가변 영역을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 10

(a) 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역:

(i) SEQ ID NO:9의 위치 9에서 아미노산은 S, L, V A, 또는 I 이고; SEQ ID NO:9의 위치 10에서 아미노산은 N, T 또는 S인, SEQ ID NO:9의 CDR1 영역;

(ii) SEQ ID NO:10의 위치 1에서 아미노산은 M, I, G, Q, S, 또는 L이고; SEQ ID NO:10의 위치 13에서 아미노산은 A, 또는 S이며; SEQ ID NO:10의 위치 14에서 아미노산은 L 또는 V인, SEQ ID NO:10의 CDR2 영역; 및

(iii) SEQ ID NO:11의 위치 3에서 아미노산은 Y, L, 또는 R이고; SEQ ID NO:11의 위치 4에서 아미노산은 Y 또는 W이며; SEQ ID NO:11의 위치 6에서 아미노산은 G, A, 또는 S이고; SEQ ID NO:11의 위치 7에서 아미노산은 T 또는 S이며; SEQ ID NO:11의 위치 8에서 아미노산은 S, A, 또는 T이고; SEQ ID NO:11의 위치 9에서 아미노산은 Y, R, T, 또는 M이며; SEQ ID NO:11의 위치 10에서 아미노산은 Y 또는 F이고; SEQ ID NO:11의 위치 11에서 아미노산은 F 또는 W이며; SEQ ID NO:11의 위치 12에서 아미노산은 D, N, 또는 G이고; SEQ ID NO:11의 위치 13에서 아미노산은 Y, K, S, R 또는 T인, SEQ ID NO:11의 CDR3 영역; 및

(b) 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역:

(i) SEQ ID NO:12의 위치 3에서 아미노산은 S 또는 F이고; SEQ ID NO:12의 위치 5에서 아미노산은 D, S, A, 또는 Y이며; SEQ ID NO:12의 위치 9에서 아미노산은 H, N, 또는 Q인, SEQ ID NO:12의 CDR1 영역;

(ii) SEQ ID NO:13의 위치 2에서 아미노산은 I, T, V 또는 A이고; SEQ ID NO:13의 위치 7에서 아미노산은 S 또는 T인, SEQ ID NO:13의 CDR2 영역; 및

(iii) SEQ ID NO:14의 위치 3에서 아미노산은 S 또는 E이고; SEQ ID NO:14의 위치 4에서 아미노산은 K, H, R, 또는 S이며; SEQ ID NO:14의 위치 8에서 아미노산은 Y 또는 R인, SEQ ID NO:14의 CDR3 영역;

을 포함하는 항체로서,

상기 항체는 NGF에 결합하고,

상기 항체는 SEQ ID NO:9에 나타낸 CDR1 영역, SEQ ID NO:10에 나타낸 CDR2 영역, 및 SEQ ID NO:11에 나타낸 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 SEQ ID NO:12에 나타낸 CDR1 영역, SEQ ID NO:13에 나타낸 CDR2 영역, 및 SEQ ID NO:14에 나타낸 CDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체가 아닌 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 11

제 6 항 내지 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 사람 NGF에 결합하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 항체는 또한 설치류 NGF에 결합하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 13

제 6 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 단일클론 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 6 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 인간화 된 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 6 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 약 2 nM 이하의 K_D 로 NGF에 결합하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 16

제 15 항에 있어서, K_D 는 약 100 pM 이하인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 17

(a) SEQ ID NO:3에서 나타낸 CDR1 영역;

(b) SEQ ID NO:4에서 나타낸 CDR2 영역; 및

(c) SEQ ID NO:5에서 나타낸 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하며; NGF에 결합하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 18

제 17 항에 있어서, 항체는 경쇄 가변 영역을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 19

(a) SEQ ID NO:6에 나타낸 CDR1 영역;

(b) SEQ ID NO:7에 나타낸 CDR2 영역; 및

(c) SEQ ID NO:8에 나타낸 CDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하며; NGF에 결합하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 20

제 19 항에 있어서, 항체는 중쇄 가변 영역을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 21

제 19 항에 있어서, 항체는

(a) SEQ ID NO:3에 나타낸 CDR1 영역;

(b) SEQ ID NO:4에 나타낸 CDR 2 영역; 및

(c) SEQ ID NO:5에 나타낸 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 22

제 21 항에 있어서, 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:1에 나타낸 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 23

제 21 항에 있어서, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:2에 나타낸 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 24

제 22 항에 있어서, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:2에 나타난 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 25

제 21 항에 있어서, 중쇄는 SEQ ID NO:16에 나타난 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 26

제 21 항에 있어서, 경쇄는 SEQ ID NO:17에 나타난 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 27

제 25 항에 있어서, 경쇄는 SEQ ID NO:17에 나타난 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 28

제 17, 19, 또는 21 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 인간화 된 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 29

제 17, 19, 또는 21 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 친화성 발달된 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 30

제 17, 19, 또는 21 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 단일클론 항체인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 31

(a) 제 1, 6, 8, 10, 17, 19, 21, 및 27 항 중 어느 한 항의 항체, 및 (b) 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 32

제 1, 6, 8, 10, 17, 19, 21, 및 27 항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 키트.

청구항 33

제 1 항 내지 제 30 항 중 어느 한 항의 항체의 제조 방법으로서, 숙주 세포 내에서 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34

제 31 항에 있어서, 개체 내 류마티스 관절염 통증을 치료하기 위한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 35

제 34 항에 있어서, 통증은 개체에 항-NGF 길항제 항체를 투여한 후 약 24 시간 내에 완화되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 36

제 34 항에 있어서, 통증은 개체에 항-NGF 길항제 항체의 투여 후 약 4 일 내에 완화되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 37

제 34 항에 있어서, 항-NGF 길항제 항체는 사람 NGF에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 38

제 34 항에 있어서, 항-NGF 길항제 항체는 SEQ ID NO:1 및 2에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 항체인 것을

특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 39

제 31 항에 있어서, 개체 내 류마티스 관절염과 관련된 염증성 악액질을 치료하기 위한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 40

제 39 항에 있어서, 항-NGF 길항제 항체는 사람 NGF에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 41

제 39 항에 있어서, 항-NGF 길항제 항체는 SEQ ID NO:1 및 2에 나타낸 아미노산 서열을 포함하는 항체인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 42

제 31 항에 있어서, 개체 내 골관절염 통증을 치료하기 위한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 43

제 42 항에 있어서, 항-NGF 길항제 항체는 사람 NGF에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 44

제 42 항에 있어서, 항-NGF 길항제 항체는 SEQ ID NO:1 및 2에 나타낸 아미노산 서열을 포함하는 항체인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 45

제 34 항, 제 39 항, 또는 제 42 항 중 어느 한 항에 있어서, 개체는 사람인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 46

제 32 항에 있어서, 개체 내 류마티스 관절염 통증을 치료하기 위한 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 47

제 46 항에 있어서, 통증은 개체에 항-NGF 길항제 항체를 투여한 후 약 24 시간 내에 완화되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 48

제 46 항에 있어서, 통증은 개체에 항-NGF 길항제 항체를 투여한 후 약 4일 내에 완화되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 49

제 46 항에 있어서, 항-NGF 길항제 항체는 사람 NGF에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 50

제 32 항에 있어서, 항-NGF 길항제 항체는 SEQ ID NO:1 및 2에 나타낸 아미노산 서열을 포함하는 항체인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 51

제 46 항에 있어서, 개체 내 류마티스 관절염과 관련된 염증성 악액질을 치료하기 위한 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 52

제 51 항에 있어서, 항-NGF 길항제 항체는 사람 NGF에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 53

제 51 항에 있어서, 항-NGF 길항제 항체는 SEQ ID NO:1 및 2에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 항체인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 54

제 32 항에 있어서, 개체 내 골관절염 통증을 치료하기 위한 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 55

제 54 항에 있어서, 항-NGF 길항제 항체는 사람 NGF에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 56

제 54 항에 있어서, 항-NGF 길항제 항체는 SEQ ID NO:1 및 2에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 항체인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 57

제 46 항, 제 51 항, 또는 제 54 항 중 어느 한 항에 있어서, 개체는 사람인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 58

제 1 항 내지 제 30 항 중 어느 한 항의 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리 폴리뉴클레오티드.

청구항 59

제 58 항에 있어서, 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:65에 나타난 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 60

제 58 항에 있어서, 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:66에 나타난 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 61

제 58 항에 있어서, 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:67에 나타난 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 62

제 58 항에 있어서, 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:68에 나타난 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 63

제 58 항에 있어서, 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:66에 나타난 뉴클레오티드 서열 및 SEQ ID NO:68에 나타난 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 64

제 1 항 내지 제 30 항 중 어느 한 항의 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터.

청구항 65

제 1 항 내지 제 30 항 중 어느 한 항의 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포.

명세서

기술분야

- [0001] 관련 출원과의 상호 참조
- [0002] 본 출원은 이들 모두가 본원에 참고로서 전체가 인용되는 2002년 12월 24일자로 출원된 가 특허 출원 미국 출원 번호 제 60/436,905; 2003년 1월 28일자로 출원된 미국 출원 번호 제 60/443,522; 및 2003년 10월 8일자로 출원된 미국 출원 번호 제 60/510,006에 대하여 우선권 이익을 주장한다.
- [0003] 본 발명은 항-NGF 항체(예를 들어 항-NGF 길항제 항체와 같은 것)에 관한 것이다. 본 발명은 또한 외과적 수술 후 통증, 류마티스 관절염 통증, 및 골관절염 통증을 포함하는 통증의 치료 및/또는 예방에 있어서 이러한 항체의 사용에 관한 것이다.
- [0004] 연방정부 후원의 조사 또는 개발에 관한 진술
- [0005] 적용사항 없음.

배경기술

- [0006] 신경 성장 인자(NGF)는 동정된 첫번째 뉴로트로핀이었고, 발달상의 그것의 역할 및 말초와 중추 뉴런 모두의 생존이 잘 특성화되었다. NGF는 말초 교감 및 배아 감각 뉴런 및 기저 전뇌 콜린 뉴런의 발달에 있어서 중요한 생존 및 유지 인자인 것으로 나타났다. 문헌[Smeyne et al., Nature 368: 246-249 (1994) 및 Crowley et al., Cell 76 : 1001-1011 (1994)]. NGF는 감각 뉴런에서 신경펩티드의 발현을 상승-조절하고(Lindsay 및 Harmer, Nature 337: 362-364 (1989)) 그것의 활성화는 두개의 다른 막결합 수용체인 TrkA 수용체 및 p75 공통 뉴로트로핀 수용체(때때로 각각 "고 친화성" 및 "저 친화성" NGF 수용체라 칭함)를 통하여 매개된다. 문헌[Chao et al., Science 232: 518-521 (1986)]. NGF에 대한 개관을 위해, 문헌[Huang et al., Annu. Rev. Neurosci. 24: 677-736 (2001) ; Bibel et al., Genes Dev. 14: 2919-2937 (2000)]을 참조하십시오. trkA 수용체를 포함하는 복합체의 NGF 및 NGF의 결정 구조가 결정됐다. 문헌[Nature 254: 411 (1991); Nature 401: 184-188 (1996)]을 참조하십시오.
- [0007] 신경 성장 인자(NGF)는 동정된 첫번째 뉴로트로핀이었고, 발달상의 그것의 역할 및 말초 및 중추 뉴런 모두의 생존이 잘 특성화되었다. NGF는 말초 교감 및 배아 감각 뉴런 및 기저 전뇌 콜린 뉴런의 발달에 있어서 중요한 생존 및 유지 인자인 것으로 나타났다. Smeyne et al., Nature 368: 246-249 (1994) 및 Crowley et al., Cell 76:1001-1011 (1994). NGF는 감각 뉴런에서 신경펩티드의 발현을 상승 조절하고, 그것의 활성화는 종양 피사 인자 수용체 패밀리의 다른 구성원과 구조적으로 연관된 두개의 다른 막결합 수용체인 TrkA 티로신 키나제 수용체 및 p75 수용체를 통하여 매개된다(Chao et al., Science 232: 518-521 (1986)).
- [0008] 신경계에 있어서 그것의 영향에 더하여, NGF는 신경계외의 과정에 점차 연루되었다. 예를 들어, NGF는 혈관 침투성을 증가시키고(Otten, et al., Eur J Pharmacol. 106:199-201(1984)), T- 및 B-세포 면역 반응을 증가시키며(Otten, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10059-10063(1989)), 림프구 분화 및 비만 세포 증식을 유도하며 비만 세포로부터 가용성 생물학적 신호의 방출을 야기하는 것이 밝혀졌다(Matsuda, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6508-6512 (1988); Pearce, et al., J. Physio. 372: 379-393 (1986); Bischoff, et al., Blood 79: 2662-2669 (1992); Horigome, et al., J. Biol. Chem. 268:14881- 14887 (1993)). 외인성 첨가 NGF가 이러한 영향 모두를 가질 수 있는 것을 나타냈지만, 내인성 NGF가 생체 내 임의의 이들 과정에 있어서 중요한 것을 드물게 나타냈다는 것을 주지하는 것이 중요하다(Torcia, et al., Cell. 85 (3): 345-56 (1996)). 그러므로, 상기 영향이 내인성 NGF의 생활성을 억제할 수도 있는 지가 분명치 않다.
- [0009] NGF는 비만 세포(Leon, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3739-3743 (1994)), B-림프구(Torcia, et al., Cell 85:345-356(1996), 각질 세포(Di Marco, et al.,J. Biol. Chem. 268: 22838-22846)), 민무늬 근육 세포(Ueyama, et al.,J Hypertens. 11:1061-1065 (1993)), 섬유모세포(Lindholm, et al., Eur. J. Neurosci. 2: 795-801(1990)), 기관지 상피 세포(Kassel, et al., Clin. Exp. Allergy 31:1432-40 (2001)), 신장 혈관 사이 세포(Steiner, et al., Am. J; Physiol. 261:F792-798(1991)) 및 골격 근육 대롱 세포(Schwartz, et al., J Photochem. Photobiol. B66:195-200(2002))를 포함하는 다수의 세포 타입에 의해 생산된다. NGF 수용체는 신경

계 외부에서 다양한 세포 타입으로 발견됐다. 예를 들어, TrkA는 인간 단핵세포, T- 및 B-림프구 및 비만 세포에서 발견됐다.

- [0010] 증가된 NGF 수준 간의 관계 및 다양한 염증 상태이 몇몇 동물 모델에서 뿐 아니라 인간 환자에서 관찰되었다. 이들은 루푸스 홍반(Bracci-Laudiero, et al., Neuroreport 4:563-565(1993)), 다발 경화증(Bracci-Laudiero, et al., Neurosci. Lett. 147:9-12(1992)), 건선(Raychaudhuri, et al., Acta Derm. l'enevol. 78:84-86(1998)), 관절염(Falcim, et al., Ann. Rheum. Dis. 55:745-748(1996)), 사이질 방광염(Okragly, et al., J. Urology 161:438-441(1999)) 및 천식(Braun, et al., Eur. JImmunol. 28: 3240-3251(1998))을 포함한다.
- [0011] 일관되게, 말초 조직 내 상승된 수준의 NGF는 통각과민 및 염증과 관련되고 많은 형태의 관절염에서 관찰되었다. 류마티스 관절염에 걸린 환자의 활액은 고 수준의 NGF를 발현하는 반면 염증이 없는 활액에서 NGF는 검출가능하지 않은 것으로 보고되었다(Aloe, et al., Arch. Rheum. 35:351-355(1992)). 유사한 결과가 실험적으로 유도된 류마티스 관절염에 걸린 랫트(rat)에서 나타났다(Aloe, et al., Clin. Exp. Rheumatol. 10:203-204 (1992)). 상승된 수준의 NGF는 비만 세포 수의 증가와 함께 트랜스제닉 마우스(mouse)에서에서 보고되었다(Aloe, et al., Int. J Tissue Reactions-Exp. Clin. Aspects 15:139-143(1993)). PCT 공보 제 WO 02/096458는 염증 상태(예를 들어, 류마티스 관절염)와 같이 다양한 NGF 관련 질환을 치료하는데 있어서 어떤 특성의 항-NGF 항체의 사용을 개시한다. 그것은 인간 종양 괴사 인자- α (TNF- α) 유전자를 함유하는 관절염 트랜스제닉 마우스에 주입된 정제된 항-NGF 항체가 관절염 마우스의 활액 내 히스타민 및 물질 P 수준의 증가 뿐만 아니라, 비만 세포 수의 감소를 야기하였음을 보고하였다(Aloe et al., Rheumatol. Int. 14: 249-252(1995)). 그것은 NGF 항체의 외인성 투여가 관절염 마우스에서 발생하는 TNF- α 의 증가된 수준을 감소시켰음을 나타냈다(Manni et al., Rheumatol. Int. 18: 97-102(1998)).
- [0012] 또한, 증가된 NGF의 발현 및 고 친화성 NGF 수용체(TrkA)가 인간의 골관절염 연골세포에서 관찰되었다(annone et al., Rheumatology 41:1413- 1418(2002)).
- [0013] 설치류 항-NGF 길항제 항체가 보고되었다. 예를 들어, 문헌[Hongo et al, Hybridoma (2000) 19 (3):215-227; Ruberti et Al. (1993) Cell. Molec. Neurobiol. 13(5):559-568]을 참조하십시오.
- [0014] 본원에 개시된 모든 참고문헌, 공보, 및 특허 출원은 그들의 전체가 참고로써 여기에 인용된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0015] 설치류 항체가 치료적으로 인간에서 사용되는 경우, 인간의 항-류마티스 항체 반응이 상당히 많은 수의 치료되는 개체에서 진행된다. 또한, 마우스 항체의 작동자 기능은 인간의 경우에 덜 효과적인 것으로 증명되었다. 따라서, 인간화 된 항-NGF 길항제 항체를 포함하여 항-NGF 길항제 항체가 매우 필요하다.

과제의 해결 수단

- [0016] 발명의 간단한 개요
- [0017] 본원에 개시된 발명은 신경 성장 인자에 대한 항체에 관한 것이다.
- [0018] 다른 양태에서, 본 발명은 인간화 되고 친화성 발달한 항체인 E3이며, 이것은 인간 및 설치류 신경 성장 인자 ("NGF")에 특이적으로 결합한다. E3의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 도 1A(SEQ ID NO:1) 및 1B(SEQ ID NO:2)에서 각각 나타난다. 항체 E3의 CDR 부분(Chothia 및 Kabat CDR을 포함)은 도 1A 및 1B에서 도식적으로 묘사된다. E3 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열, 및 각각의 확장된 CDR을 또한 하기에 나타낸다(하기 "항체 서열" 참조).
- [0019] 다른 양태에서, 본 발명은 항체 E3(호환적으로 본원에서 "E3"라고 칭함)의 단편 또는 영역을 포함하는 항체이다. 한 구체예에서, 단편은 도 1B에서 나타낸 바와 같이 항체 E3의 경쇄이다. 다른 구체예에서, 단편은 도 1A에서 나타낸 바와 같이 항체 E3의 중쇄이다. 또 다른 구체예에서, 단편은 항체 E3의 경쇄 및/또는 중쇄로부터의 하나 이상의 가변 영역을 함유한다. 또 다른 구체예에서, 단편은 도 1A 및 1B에서 나타내는 바와 같이 항체 E3의 경쇄 및/또는 중쇄로부터의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR)을 함유한다.
- [0020] 다른 양태에서, 본 발명은 기탁 번호 ATCC 제 PTA-4893호 또는 ATCC 제 PTA-4894호를 갖는 숙주 세포에 의해 생산되는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 경쇄를 포함하는 항체이다. 다른 양태에서, 본 발명은 기탁 번호

ATCC 제 PTA-4895호를 갖는 숙주 세포에 의해 생산되는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 중쇄를 포함하는 항체이다. 다른 양태에서, 본 발명은 (a)기탁 번호 ATCC 제 PTA-4894호 또는 ATCC 제 PTA-4893호를 갖는 숙주 세포에 의해 생산되는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 경쇄; 및 (b) 기탁번호 ATCC 제 PTA-4895호를 갖는 숙주 세포에 의해 생산되는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 중쇄(본원에서 편의상, 기탁된 숙주 세포에 의해 생산되는 폴리뉴클레오티드는 기탁 번호 ATCC 제 PTA-4894, PTA-4893 및 PTA-4895호를 갖는 것으로 나타낸다)를 포함하는 항체이다. 다른 양태에서, 본 발명은 기탁 번호 ATCC 제 PTA-4894 또는 ATCC 제 PTA-4893호를 갖는 숙주 세포에 의해 생산되는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 경쇄의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체이다. 다른 양태에서, 본 발명은 기탁 번호 ATCC 제 PTA-4895를 갖는 숙주 세포에 의해 생산되는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 중쇄의 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체이다. 다른 양태에서, 본 발명은 (a) 기탁번호 ATCC 제 PTA-4894 또는 ATCC 제 PTA-4893호를 갖는 숙주 세포에 의해 생산되는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 경쇄의 경쇄 가변 영역, 및 (b) 기탁 번호 ATCC 제 PTA-4895를 갖는 숙주 세포에 의해 생산되는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 중쇄의 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체이다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 기탁 번호 ATCC 제 PTA-4894를 갖는 숙주 세포에 의해 생산되는 (a)폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 하나 이상의 CDR; 및/또는 (b) 기탁 번호 ATCC 제 PTA-4895를 갖는 숙주 세포에 의해 생산되는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 중쇄를 포함하는 항체이다.

[0021] 일부 구체예에서, 항체는 인간 중쇄 IgG2a 불변 영역을 포함한다. 일부 구체예에서 항체는 인간 경쇄 10 불변 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 예를 들어, 면역학적으로 비활성인, 예컨대 보체 매개 용해를 유발시키지 않거나, 항체-의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)을 자극하지 않는 불변 영역과 같은 변형된 불변 영역을 포함한다. 다른 구체예에서, 불변 영역은 문헌[Eur. J Immunol. (1999)29: 2613-2624], PCT 출원 제 PCT/GB99/01441호, 및/또는 영국 특허 출원 제 9809951.8호에 설명되는 바와 같이 변형된다. 또 다른 구체예에서, 항체는 돌연변이 A330P331 내지 S330S331(야생형 IgG2a 서열에 관한 아미노산 넘버링)를 포함하는 인간 중쇄 IgG2a 불변 영역을 포함한다. Eur.J Immunol. (1999) 29: 2613-2624.

[0022] 다른 양태에서, 본 발명은 다음 중 임의의 하나 이상을 포함하는 폴리펩티드(항체일 수도 있고 항체가 아닐 수도 있음)를 제공한다: a) 도 1A 및 1B에서 도시한 항체 E3의 하나 이상의 CDR; b) 도 1A에서 도시한 항체 E3의 중쇄로부터의 CDR H3; c) 도 1B에서 도시한 항체 E3의 경쇄로부터의 CDR L3; d) 도 1B에서 도시한 항체 E3의 경쇄로부터의 3개의 CDR; e) 도 1A에서 도시한 항체 E3의 중쇄로부터의 3개의 CDR; 및 f)도 1A 및 1B에서 도시한 항체 E3의 경쇄로부터의 3개의 CDR 및 중쇄로부터의 3개의 CDR. 본 발명은 다음 중 임의의 하나 이상을 포함하는 폴리펩티드(항체일 수도 있고 항체가 아닐 수도 있음)를 제공한다: a) 도 1A 및 1B에서 도시한 항체 E3로부터 유도된 하나 이상(1, 2, 3, 4, 5, 또는 6)의 CDR; b) 도 1A에서 도시한 항체 E3의 중쇄로부터의 CDR H3에서 유도된 CDR; 및/또는 c) 도 1B에서 도시한 항체 E3의 경쇄로부터의 CDR H3에서 유도된 CDR. 일부 구체예에서, CDR은 Kabat CDR, Chothia CDR, 또는 Kabat 및 Chothia CDR의 조합(본원에서 "연장된" 또는 "조합된" CDR이라 칭함)일 수 있다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)는 NGF (예를 들어 인간 NGF와 같은 것)에 결합한다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 본원에서 설명되는 임의의 CDR 배열(조합, 변이 등을 포함)을 포함한다.

[0023] 한 양태에서, 본 발명은 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공하는데, 이것은 SEQ ID NO:9를 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 I34는 S, L, V A, 또는 I이고; N35는 N, T 또는 S로 치환된다. 본원에서 편의상, "치환된" 또는 본 문맥상 또는 아미노산에 관련하여 "(치환)되는"은 주어진 위치에 대한 아미노산의 선정을 나타낸다. 분명히 하여, 치환, 또는 선정은 SEQ ID 또는 도면에서 묘사되는 아미노산일 수 있다.

[0024] 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO:10을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어, 항체와 같은 것)를 제공하는데, 여기서 M50은 M, I, G, Q, S, 또는 L이고;A62는 A, 또는 S이며;L63은 L 또는 V이다.

[0025] 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO:11을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어, 항체와 같은 것)를 제공하는데, 여기서 Y100은 Y, L, 또는 R; Y101은 Y 또는 W; G103은 G, A, 또는 S; T104는 T 또는 S; S105는 S, A, 또는 T; Y106는 Y, R, T, 또는 M; Y107은 Y 또는 F; F108은 F 또는 W; D 109 는 D, N, 또는 G; 그리고 Y110은 Y, K, S, R 또는 T이다.

[0026] 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO:11을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공하는데, 여기서 Y100은 Y, L, 또는 R; wherein Y101은 Y 또는 W; G103는 G, A, 또는 S; T104는 T 또는 S; S 105 는 S, A, 또는 T; Y106는 Y, R, T, 또는 M; Y107는 Y 또는 F; F108는 F 또는 W; D109는 S, A, C, G, D, N, T, 또는 G;그리고 Y110는 임의의 아미노산이다.

- [0027] 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO:11을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공하는데, 여기서 G98는 G, S, A, C, V, N, D, 또는 T; G99는 G, S, A, C, V, N, D, 또는 T; Y100는 Y, L, 또는 R; Y101는 Y 또는 W; G103는 G, A, 또는 S; T104는 T 또는 S; S 105는 S, A, 또는 T; Y106은 Y, R, T, 또는 M; Y107는 Y 또는 F; F108는 F 또는 W; D109는 S, A, C, G, D, N, T, 또는 G; 그리고 Y110은 임의의 아미노산이다.
- [0028] 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO:12를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공하는데, 여기서 S26는 S 또는 F; D28는 D, S, A, 또는 Y; 그리고 H32는 H, N, 또는 Q이다.
- [0029] 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO:13을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공하는데, 여기서 I51은 I, T, V 또는 A ; 그리고 S56은 S 또는 T이다.
- [0030] 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO:14를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공하는데, 여기서 S91은 S 또는 E; K92는 K, H, R, 또는 S; 그리고 Y96는 Y 또는 R이다.
- [0031] 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO:14를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공하는데, 여기서 S91은 S 또는 E; K92는 임의의 아미노산; T93은 임의의 아미노산; 그리고 Y96은 Y 또는 R이다.
- [0032] 한 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO:9에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공하는데, 여기서 I34는 S, L, V A, 또는 I이며, N35는 N, T 또는 S이다.
- [0033] 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO:10에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공하는데, 여기서 M50은 M, I, G, Q, S, 또는 L; A62는 A, 또는 S; 그리고 L63은 L 또는 V이다.
- [0034] 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO:11에서 나타난 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공하는데, 여기서 Y100는 Y, L, 또는 R; Y101는 Y 또는 W; G103는 G, A, 또는 S; T104는 T 또는 S; S105는 S, A, 또는 T; Y106는 Y, R, T, 또는 M; Y107은 Y 또는 F; F108는 F 또는 W; D109는 D, N, 또는 G ; 그리고 Y110은 Y, K, S, R 또는 T이다.
- [0035] 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO:11에서 나타난 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공하는데, 여기서 Y100는 Y, L, 또는 R; Y101은 Y 또는 W; G103은 G, A, 또는 S; T104는 T 또는 S; S105는 S, A, 또는 T; Y106는 Y, R, T, 또는 M; Y107은 Y 또는 F; F108은 F 또는 W; D109는 S, A, C, G, D, N, T, 또는 G; 그리고 Y110은 임의의 아미노산이다.
- [0036] 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO:11에서 나타난 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공하는데, G98은 G, S, A, C, V, N, D, 또는 T; G99는 G, S, A, C, V, N, D, 또는 T; Y100은 Y, L, 또는 R; Y101은 Y 또는 W; G103은 G, A, 또는 S; T104은 T 또는 S; S105은 S, A, 또는 T; Y106은 Y, R, T, 또는 M; Y107은 Y 또는 F; F108은 F 또는 W; D109는 S, A, C, G, D, N, T, 또는 G; 그리고 Y110은 임의의 아미노산이다.
- [0037] 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO:12에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공하는데, 여기서 S26은 S 또는 F; D28은 D, S, A, 또는 Y; 그리고 H32은 H, N, 또는 Q이다.
- [0038] 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO:13에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공하는데, 여기서 I51은 I, T, V 또는 A이고, S56은 S 또는 T이다.
- [0039] 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO:14에서 나타난 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공하는데, 여기서 S91은 S 또는 E; K92는 K, H, R, 또는 S; 그리고 Y96은 Y 또는 R이다.
- [0040] 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO:14에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공하는데, 여기서 S91은 S 또는 E; K92는 임의의 아미노산; T93은 임의의 아미노산; 그리고 Y96은 Y 또는 R이다.
- [0041] 다른 양태에서, 본 발명은 I34는 S, L, V A, 또는 I이고; N35은 N, T 또는 S인 SEQ ID NO:9의 CDR1 영역, M50은 M, I, G, Q, S, 또는 L이고; A62은 A, 또는 S이며;L63은 L 또는 V인 SEQ ID NO:10의 CDR2 영역, 및 Y100는 Y, L, 또는 R이고; Y101는 Y 또는 W이며; G103는 G, A, 또는 S이고; T104는 T 또는 S이며; S105는 S, A, 또는 T이고; Y106은 Y, R, T, 또는 M이며; Y107은 Y 또는 F이고; F108은 F 또는 W이며; D109은 D, N, 또는 G이고; Y110은 Y, K, S, R 또는 T인 SEQ ID NO:11의 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드(예

를 들어, 인간화 된 항체와 같은 항체와 같은 것)를 제공한다. 일부 구체예에서, 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:11의 CDR3 영역을 포함하는데, 여기서 Y100은 Y, L, 또는 R; Y101은 Y 또는 W; G103은 G, A, 또는 S; T104은 T 또는 S; S105은 S, A, 또는 T; Y106은 Y, R, T, 또는 M; Y107은 Y 또는 F; F108은 F 또는 W; D109는 S, A, C, G, D, N, T, 또는 G; Y110은 임의의 아미노산이다. 다른 구체예에서, 경쇄 가변영역은 SEQ ID NO:11의 CDR3 영역을 포함하는데, 여기서 G98은 G, S, A, C, V, N, D, 또는 T; G99은 G, S, A, C, V, N, D, 또는 T; Y100은 Y, L, 또는 R; Y101은 Y 또는 W; G103은 G, A, 또는 S; T104는 T 또는 S; S105은 S, A, 또는 T; Y106은 Y, R, T, 또는 M; Y107은 Y 또는 F; F108은 F 또는 W; D109은 S, A, C, G, D, N, T, 또는 G; 그리고 Y110은 임의의 아미노산이다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)는 항체 경쇄 가변 영역을 더 포함한다.

[0042] 다른 구체예에서, 본 발명은 S26은 S 또는 F이고; D28은 D, S, A, 또는 Y이며; H32는 H, N, 또는 Q인 SEQ ID NO:12의 CDR1 영역, I51은 I, T, V 또는 A이고; S56은 S 또는 T인 SEQ ID NO:13의 CDR2 영역, 및 S91은 S 또는 E이고; K92는 K, H, R, 또는 S이며; Y96은 Y 또는 R인 SEQ ID NO:14의 CDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공한다. 일부 구체예에서, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:14의 CDR3 영역을 포함하는데, 여기서 S91은 S 또는 E; K92는 임의의 아미노산; T93는 임의의 아미노산; Y96은 Y 또는 R이다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)는 항체 중쇄를 더 포함한다.

[0043] 다른 양태에서, 본 발명은 (a) I34는 S, L, V A, 또는 I ; 및 N35는 N, T 또는 S인 SEQ ID NO:9의 CDR1 영역, M50은 M, I, G, Q, S, 또는 L; A62은 A, 또는 S; 및 L63은 L 또는 V인 SEQ ID NO:10의 CDR3 영역, 및 Y100은 Y, L, 또는 R; Y101은 Y 또는 W; G103은 G, A, 또는 S; T104은 T 또는 S; S105은 S, A, 또는 T; Y106은 Y, R, T, 또는 M; Y107은 Y 또는 F; F108은 F 또는 W; D109은 D, N, 또는 G; Y110은 Y, K, S, R 또는 T인 SEQ ID NO:11의 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및(b) S26는 S 또는 F; D28는 D, S, A, 또는 Y; 그리고 H32는 H, N, 또는 Q인 SEQ ID NO:12의 CDR1, I51은 I, T, V 또는 A; 및 S56는 S 또는 T인 SEQ ID NO:13의 CDR2 영역, 및 S91은 S 또는 E; K92는 K, H, R, 또는 S; 및 Y96은 Y 또는 R인 SEQ ID NO:14의 CDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공한다. 일부 구체예에서, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:14의 CDR3 영역을 포함하는데, 여기서 S91은 S 또는 E; K92은 임의의 아미노산; T93은 임의의 아미노산; Y96은 Y 또는 R이다. 일부 구체예에서, 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:11의 CDR3 영역을 포함하는데, 여기서 Y100은 Y, L, 또는 R; Y101은 Y 또는 W; G103은 G, A, 또는 S; T104는 T 또는 S; S105는 S, A, 또는 T; Y106는 Y, R, T, 또는 M; Y107은 Y 또는 F; F108은 F 또는 W; D109은 S, A, C, G, D, N, T, 또는 G; Y110은 임의의 아미노산이다. 다른 구체예에서, 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:11의 CDR3 영역을 포함하는데, 여기서 G98은 G, S, A, C, V, N, D, 또는 T; G99은 G, S, A, C, V, N, D, 또는 T; Y100은 Y, L, 또는 R; Y101은 Y 또는 W; G103은 G, A, 또는 S; T104은 T 또는 S; S105은 S, A, 또는 T; Y106은 Y, R, T, 또는 M; Y107은 Y 또는 F; F108은 F 또는 W; D109은 S, A, C, G, D, N, T, 또는 G; 및 Y110은 임의의 아미노산이다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 항체 경쇄를 더 포함한다.

[0044] 다른 양태에서, 본 발명은 I34는 S, L, V A, 또는 I이고; N35은 N, T 또는 S인 SEQ ID NO:9에서 나타난 아미노산 서열, M50은M, I, G, Q, S, 또는 L이고; A62은 A, 또는 S이며; L63은 L 또는 V인 SEQ ID NO:10에서 나타난 아미노산 서열, 및 Y100은 Y, L, 또는 R이고; Y101는 Y 또는 W이며; G103는 G, A, 또는 S이고; T104는 T 또는 S이며; S105는 S, A, 또는 T이며; Y106는 Y, R, T, 또는 M이며; Y107은 Y 또는 F이고; F108은 F 또는 W이고; D109은 D, N, 또는 G이며; Y110은 Y, K, S, R 또는 T인 SEQ DI NO:11에서 나타난 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 인간화 된 항체를 포함하는 항체와 같은 것)를 제공한다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO:11에서 나타난 아미노산 서열을 포함하는데, 여기서 Y100는 Y, L, 또는 R; Y101은 Y 또는 W; G103는 G, A, 또는 S; T104는 T 또는 S; S105는 S, A, 또는 T; Y106는 Y, R, T, 또는 M; Y107는 Y 또는 F; F108는 F 또는 W; D109는 S, A, C, G, D, N, T, 또는 G; 및 Y110는 임의의 아미노산이다. 다른 구체예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO:11에서 나타난 아미노산 서열을 포함하는데, 여기서 G98 은 G, S, A, C, V, N, D, 또는 T; G99은 G, S, A, C, V, N, D, 또는 T; Y100은 Y, L, 또는 R; Y101은 Y 또는 W; G103은 G, A, 또는 S; T104는 T 또는 S; S105는 S, A, 또는 T; Y106은 Y, R, T, 또는 M; Y107은 Y 또는 F; F108은 F 또는 W; D109는 S, A, C, G, D, N, T, 또는 G; 그리고 Y110은 임의의 아미노산이다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)는 항체 경쇄 가변 영역을 더 포함한다.

[0045] 다른 양태에서, 본 발명은 S26는 S 또는 F; D28는 D, S, A, 또는 Y; 및 H32는 H, N, 또는 Q인 SEQ ID NO:12에 나타난 아미노산 서열, I51은 I, T, V 또는 A이고; S56은 S 또는 T인 SEQ ID NO:13에 나타난 아미노산 서열, 및 S91는 S 또는 E; K92는 K, H, R, 또는 S; 그리고 Y96는 Y 또는 R인 SEQ ID NO:14에 나타난 아미노산 서열을

포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공한다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO:14에 나타난 아미노산 서열을 포함하는데, 여기서 S91은 S 또는 E; K92는 임의의 아미노산; T93은 임의의 아미노산; 그리고 Y96는 Y 또는 R이다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)는 항체 중쇄 가변 영역을 더 포함한다.

[0046] 다른 양태에서, 본 발명은 (a) SEQ ID NO:9에 나타난 아미노산 서열로서, I34는 S, L, V A, 또는 I; N35은 N, T 또는 S이고, SEQ ID NO:10에 나타난 아미노산 서열로서, M50은 M, I, G, Q, S, 또는 L; A62은 A, 또는 S; 및 L63은 L 또는 V이며, 및 SEQ ID NO:11에 나타난 아미노산 서열로서, Y100는 Y, L, 또는 R; Y101는 Y 또는 W; G103은 G, A, 또는 S; T104는 T 또는 S; S105는 S, A, 또는 T; Y106은 Y, R, T, 또는 M; Y107은 Y 또는 F; F108은 F 또는 W; D109은 D, N, 또는 G; 및 Y110은 Y, K, S, R 또는 T; 및 (b) SEQ ID NO:12에 나타난 아미노산 서열로서, S26은 S 또는 F; D28은 D, S, A, 또는 Y; 및 H32는 H, N, 또는 Q, SEQ ID NO:13에 나타난 아미노산 서열로서, I51은 I, T, V 또는 A; 및 S56은 S 또는 T, 및 SEQ ID NO:14에 나타난 아미노산 서열로서, S91은 S 또는 E; K92는 K, H, R, 또는 S; 및 Y96은 Y 또는 R인 것을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공한다. 다른 구체예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO:14에 나타난 아미노산 서열을 포함하는데, 여기서 S91은 S 또는 E; K92은 임의의 아미노산; T93은 임의의 아미노산이며; Y96은 Y 또는 R이다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO:11에 나타난 아미노산 서열을 포함하는데, 여기서 Y100는 Y, L, 또는 R; Y101는 Y 또는 W; G103는 G, A, 또는 S; T104는 T 또는 S; S105는 S, A, 또는 T; Y106는 Y, R, T, 또는 M; Y107은 Y 또는 F; F108은 F 또는 W; D109은 S, A, C, G, D, N, T, 또는 G; Y110은 임의의 아미노산이다. 다른 구체예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO:11에서 나타난 아미노산 서열을 포함하는데, 여기서 G98은 G, S, A, C, V, N, D, 또는 T; G99은 G, S, A, C, V, N, D, 또는 T; Y100은 Y, L, 또는 R; Y101은 Y 또는 W; G103은 G, A, 또는 S; T104은 T 또는 S; S105는 S, A, 또는 T; Y106은 Y, R, T, 또는 M; Y107은 Y 또는 F; F108은 F 또는 W; D109은 S, A, C, G, D, N, T, 또는 G; 그리고 Y110은 임의의 아미노산이다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 항체 경쇄 가변 영역을 더 포함한다.

[0047] 다른 양태에서, 본 발명은 (a) I34는 S, L, V A, 또는 I이고; N35은 N, T 또는 S로 치환되어 있는 SEQ ID NO:9의 CDR1 영역, (b) M50은 I, G, Q, S, 또는 L이고; A62는 A, 또는 S이며; L63는 L 또는 V인 SEQ ID NO:10의 CDR2 영역, 및 (c) Y100는 Y, L, 또는 R이고; Y101는 Y 또는 W이며; G103은 G, A, 또는 S이고; T104는 T 또는 S이며; S105는 S, A, 또는 T이고; Y106는 Y, R, T, 또는 M이며; Y107는 Y 또는 F이고; F108는 F 또는 W이며; D109는 D, N, 또는 G이고; Y110은 Y, K, S, R 또는 T인 SEQ ID NO:11의 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드를 제공하는데, 이때 항체가 NGF에 결합한다.

[0048] 다른 양태에서, 본 발명은 (a) S26는 S 또는 F이고; D28는 D, S, A, 또는 Y이며; H32는 H, N, 또는 Q인 SEQ ID NO:12의 CDR1 영역, (b) I51은 I, T, V 또는 A이고; S56은 S 또는 T인 SEQ ID NO:13의 CDR2 영역, 및 (c) K92은 K, H, R, 또는 S이고; Y96은 Y 또는 R인 SEQ ID NO:14의 CDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공하는데, 이 때 항체가 NGF에 결합한다.

[0049] 다른 양태에서, 본 발명은 (a) (i) I34가 S, L, V A, 또는 I로 치환되고; N35는 N, T 또는 S로 치환되는 SEQ ID NO:9의 CDR1 영역; (ii) M50은 I, G, Q, S, 또는 L이고; A62는 A, 또는 S이며; L63은 L 또는 V인 SEQ ID NO:10의 CDR2 영역; 및 (iii) Y100는 Y, L, 또는 R이고; Y101은 Y 또는 W이며; G103은 G, A, 또는 S이고; T104는 T 또는 S이고; S105는 S, A, 또는 T이며; Y106은 Y, R, T, 또는 M이고; Y107은 Y 또는 F이며; F108은 F 또는 W이고; D109은 D, N, 또는 G이며; Y110은 Y, K, S, R 또는 T인 SEQ ID NO:11의 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 (b) (i) S26은 S 또는 F이고; D28은 D, S, A, 또는 Y이며; H32은 H, N, 또는 Q인 SEQ ID NO:12의 CDR1 영역; (ii) I51은 I, T, V 또는 A이고; S56은 S 또는 T인 SEQ ID NO:13의 CDR2 영역; 및 (iii) S91는 S 또는 E이고; K92는 K, H, R, 또는 S이며; Y96은 Y 또는 R인 SEQ ID NO:14의 CDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공하는데, 이때 항체가 NGF에 결합한다.

[0050] 달리 지적하지 않는다면, 한 위치에서 아미노산의 선정(예를 들어, 치환)은 임의의 다른 위치에서 아미노산의 선택으로부터 독립적으로 선택된다.

[0051] 일부 구체예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어 항체와 같은 것)는 NGF(예를 들어 인간 NGF와 같은 것)에 결합한다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 본원에 설명되는 임의의 CDR 배열(조합, 변이 등을 포함)을 포함한다.

[0052] 본원에서 설명으로부터 명백한 바와 같이, 본원에서 사용되는 가변 영역 넘버링은 순차적인 넘버링이다. 당업계 숙련자는 항체 넘버링 시스템의 넘버가 존재하고(예를 들어 Kabat 및 Chothia 넘버링과 같은 것), 예를 들어 Kabat 넘버링 또는 Chothia 넘버링과 같은 다른 넘버링 시스템으로 순차 넘버링을 전환하는 방법을 쉽게 이해

한다.

- [0053] 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO:46 또는 50으로부터 선택되는 아미노산 서열(예를 들어 CDR3 서열)을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공한다. 또 다른 구체예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 및 8에서 나타낸 아미노산 서열의 하나 이상을 더 포함한다. 또 다른 구체예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 및 15에서 나타낸 아미노산 서열의 하나 이상으로 더 포함한다.
- [0054] 다른 양태에서, 본 발명은 (a) SEQ ID NO: 28 및/또는 29; (b) SEQ ID NO: 30 및/또는 31 ; (c) SEQ ID NO: 32 및/또는 33; (d) SEQ ID NO: 34 및/또는 35; (e) SEQ ID NO: 36 및/또는 37; (f) SEQ ID NO: 38 및/또는 39; 및 (g) SEQ ID NO: 40 및 41로부터 선택되는 아미노산 서열(예를 들어 CDR H1 및/또는 CDR H2 영역과 같은 CDR 영역)을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공한다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 28, 30, 32, 34, 36, 38, 및 40으로부터 선택되는 아미노산 서열(예를 들어 CDR H1 영역)을 포함한다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 29, 31, 33, 35, 37, 39 및 41로부터 선택되는 아미노산 서열(예를 들어 CDR H2 영역)을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO:3, 4, 5, 6, 7, 및 8에서 나타내는 하나 이상의 아미노산 서열을 더 포함한다. 또 다른 구체예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 및 15에서 나타낸 하나 이상의 아미노산 서열을 더 포함한다.
- [0055] 다른 양태에서, 본 발명은 (a) SEQ ID NO: 18 및/또는 19; (b) SEQ ID NO: 20 및/또는 21; 및 (c) SEQ ID NO: 22 및/또는 23으로부터 선택되는 아미노산 서열(예를 들어, CDR1 및/또는 CDR L2 영역)을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공한다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 18, 20, 및 22로부터 선택되는 아미노산 서열(예를 들어, CDR L1 영역)을 포함한다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 19, 21, 및 23으로부터 선택되는 아미노산 서열(예를 들어 CDR L2 영역)을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8에서 나타낸 하나 이상의 아미노산 서열을 더 포함한다. 또 다른 구체예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 및 15에서 나타낸 하나 이상의 아미노산 서열을 더 포함한다.
- [0056] 다른 양태에서, 본 발명은 (a) SEQ ID NO: 51 및/또는 52; (b) SEQ ID NO: 55 및/또는 56; (c) SEQ ID NO: 57 및/또는 58; (c) SEQ ID NO: 59 및/또는 60; (d) SEQ ID NO: 61 및/또는 62; (e) SEQ ID NO: 63 및/또는 64로부터 선택되는 아미노산 서열(예를 들어, CDR L3 및/또는 CDR H3 영역과 같은 CDR 영역)을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공한다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 51, 55, 57, 59, 61, 및 63으로부터 선택되는 아미노산 서열(예를 들어 CDR L3 영역)을 포함한다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 52, 56, 58, 60, 62, 및 64로부터 선택되는 아미노산 서열(예를 들어 CDR H3 영역)을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 폴리펩티드는 하나 이상의 SEQ ID NO: 18, 19, 30 및 31에서 나타낸 아미노산 서열을 더 포함한다. 또 다른 구체예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 및 8에서 나타낸 하나 이상의 아미노산 서열을 더 포함한다. 또 다른 구체예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 및 15에서 나타내는 하나 이상의 아미노산 서열을 더 포함한다.
- [0057] 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 61, 63, 18, 19, 30 및 31에서 나타내는 하나 이상의 아미노산 서열(예를 들어 CDR 영역)을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공한다.
- [0058] 한 양태에서, 본 발명은 고 친화성으로 NGF(예를 들어 인간 NGF)에 결합하는 항-NF 항체(예를 들어 길항제 항체)를 제공한다. 일부 구체예에서, 고 친화성은 (a) 약 2 nM(예를 들어 약 1 nM, 800 pM, 600 pM, 400 pM, 200 pM, 100 pM, 90 pM, 80 pM, 70 pM, 60 pM, 50 pM, 또는 그 이하의 임의의 것) K_o 이하, 및/또는 약 $6 \times 10^{-5} s^{-1}$ 보다 낮은 k_{off} 로 NGF에 결합하고; 및/또는 (b) 약 200 pM, 150 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 20 pM, 10 pM, 또는 그 이하의 임의의 것의 IC50(약 15 pM의 NGF의 존재하에)을 갖는 마우스 E13.5 삼차신경 뉴런의 인간 NGF-의존성 생존을 억제(감소, 및/또는 방해)하며; 및/또는 (c) 약 50 pM, 40 pM, 30 pM, 10 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, 2 pM, 1 pM, 또는 그 이하의 임의의 것의 IC50(약 1.5 pM의 NF의 존재하에)을 갖는 마우스 E13.5의 인간 NGF-의존성 생존을 억제(감소, 및/또는 방해)하고; 및/또는 (d) 약 150 pM, 125 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 30 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, 또는 그 이하의 임의의 것의 IO50(약 15 pM의 NGF의 존재하에)을 갖는 마우스 E13.5 삼차신경 뉴런의 랫트 NGF-의존성 생존을 억제(감소, 및/또는 방해)하며; 및/또는 (e) 약 30 pM, 25 pM, 20 pM, 15 pM, 10 pM, 5 pM, 4 pM, 3 pM, 2 pM, 1 pM, 또는 그 이하의 임의의 것의 IO50(약 1.5 pM의 NGF의 존재하에)을 갖는 마우스 E13.5 삼차신경 뉴런의 랫트 NGF-의존성 생존을 억제(감소, 및/또는 방해)하고; 및/또는 (f) 및/또는 trkA 수용체보다 더 높은 친화성으로 NGF에 결합하는 것이다.
- [0059] 다른 양태에서, 본 발명은 폴리펩티드(예를 들어 항체와 같은 것)를 제공하는데, 상기 폴리펩티드는 (a) 약 2nM

(예를 들어 약 1nM, 800 pM, 600 pM, 400 pM, 200 pM, 100pM, 90 pM, 80 pM, 70 pM, 60 pM, 50 pM, 또는 그 이하 중 임의의 것) 이하의 K_D , 및/또는 약 6×10 보다 낮은 k_{off} 로 NGF(예를 들어 인간 NGF)에 결합하고; 및/또는 (b) 약 200 pM, 150 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 20 pM, 10 pM, 또는 그 이하 중 임의의 것의 IC50(약 15 pM의 NGF의 존재)으로 마우스 E13.5 삼차신경 뉴런의 인간 NGF-의존성 생존을 억제하고; 및/또는 (c) 약 50 pM, 40 pM, 30 pM, 10 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, 2 pM, 1 pM, 또는 그 이하 중 임의의 것의 IC50(약 1.5 pM의 NGF의 존재)으로 마우스 E13.5 삼차신경 뉴런의 NGF-의존성 생존을 억제하며; 및/또는 trkA 수용체보다 더 높은 친화성으로 NGF에 결합한다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 (a) 약 2 nM 이하의 K_D 로 NGF에 결합하고; 및/또는 (b) 약 100 pM 또는 그 이하의 IC50으로 마우스 13.5 삼차신경 뉴런의 인간 NGF-의존성 생존을 억제하는데, 이 때 IC50은 약 15 pM NF의 존재에 있어서 측정되며; 및/또는 (c) 약 10 pM 또는 그 이하의 IC50으로 마우스 E13.5 삼차신경 뉴런의 인간 NF-의존성 생존을 억제하는데, 이 때 IC50은 약 1.5 pM의 NGF의 존재에 있어서 측정되고, IC50은 약 15 pM의 NGF의 존재에 있어서 측정된다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 (a) 약 100 pM 이하의 K_D 로 NGF에 결합하고; 및/또는 약 20 pM 이하의 IC50으로 마우스 E13.5 삼차신경 뉴런의 인간 NGF-의존성 생존을 억제하는데, 이 때 IC50은 약 15 pM NGF의 존재에 있어서 측정되며; 및/또는 (c) 약 2 pM 이하의 IC50으로 마우스 E13.5 삼차신경 뉴런의 인간 NGF-의존성 생존을 억제한다.

[0060] 본원에서 설명으로부터 명백해지는 바와 같이, 특히 본 발명은 마우스 단일클론 항체, 911의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드 구체예를 제외한다. Mab911의 확장된 CDR 서열은 도 1A 및 도 1B, 및 SEQ ID NO: 9-14에서 나타난다.

[0061] 일부 구체예에서, 본 발명은 임의의 상기 폴리펩티드 또는 항체를 제공하는데, 또한 이 때 폴리펩티드(예를 들어 항체)는 단리되어 있다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드(예를 들어 항체)는 실질적으로 정제되어 있다. 또 다른 구체예에서, 폴리펩티드(예를 들어 항체)는 친화성 발달되어 있다. 다른 구체예에서, 항체는 길항제 항체이다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드(예를 들어 항체)는 인간 외곽구조 서열을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 폴리펩티드(예를 들어 항체)는 하나 이상의 비인간 외곽구조 잔여를 포함한다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드(예를 들어 항체)는 2nM 이하의 K_D 로 NGF(예를 들어 인간 NGF)에 결합한다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 하나 이상(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 그 이상)의 인간 아미노산 치환이 비인간 아미노산 서열(예를 들어 외곽 구조 서열과 같은 CDR 서열과 같은 가변 영역 서열)과 관련한다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 부모 폴리펩티드 아미노산 서열(예를 들어, 하나 이상의 SEQ ID NO:9-14 중 임의의 것과 같은 항체 911 아미노산 서열)에 대응하는 적어도 1, 적어도 2, 또는 적어도 3, 4, 5, 6 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체의 결합 친화성은 부모 항체(예를 들어 Mab 911) 친화성에 비하여 변경됐다(일부 구체예에서, 증가됐다). 또 다른 구체예에서, 항체의 결합 친화성은 NGF(예를 들어 인간 NGF)에 대한 trkA 수용체의 결합 친화성 보다 더 낮다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 항체일 수 있다. 일부 구체예에서, 항체는 인간 항체이다. 다른 구체예에서, 항체는 인간화 된 항체이다. 또 다른 구체예에서, 항체는 단일클론 항체이다. 일부 구체예에서, 항체는 친화성 발달된 항체이다.

[0062] 본 발명은 상기 임의의 구체예를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드(단리된 폴리뉴클레오티드 포함)를 제공한다.

[0063] 다른 양태에서, 본 발명은 항체 E3(호환적으로 본원에서 "E3라 칭함)의 단편 또는 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 한 구체예에서, 단편은 도 1B에서 나타내는 바와같이 항체 E3의 경쇄이다. 다른 구체예에서, 단편은 도 1A에서 나타내는 바와 같이 항체 E3의 중쇄이다. 또 다른 구체예에서, 단편은 항체 E3의 경쇄 및/또는 중쇄로부터의 하나 이상의 가변 영역을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 단편은 도 1A 및 1B에서 나타내는 바와 같이 항체 E3의 경쇄 및/또는 중쇄로부터 하나 이상의 상보성 결정 부위(CDR)을 함유한다.

[0064] 다른 양태에서, 본 발명은 항체 E3에 대하여 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드이다. 일부 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 도 2 및 3에서 나타낸 폴리뉴클레오티드 중 하나 또는 모두를 포함한다.

[0065] 다른 양태에서, 본 발명은 기탁 번호 ATCC 제 PTA-4893호 또는 ATCC 제 PTA- 4894호를 갖는 E3 경쇄에 대하여 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드이다. 다른 양태에서, 본 발명은 기탁 번호 ATCC 제 PTA-4895호를 갖는 E3 중쇄에 대하여 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드이다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 (a) 기탁번호 ATCC 제 PTA-4893 또는 PTA-4894호를 갖는 폴리뉴클레오티드에서 코딩되는 가변 영역 및 (b) 기탁번호 ATCC 제 PTA-4895호를

갖는 폴리뉴클레오티드에서 코딩되는 가변 영역을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드이다. 다른 양태에서, 본 발명은 (a) 기탁번호 ATCC 제 PTA-4893 또는 PTA-4894호를 갖는 폴리뉴클레오티드에서 코딩되는 하나 이상의 CDR; 및/또는 (b) 기탁 번호 ATCC 제 PTA-4895를 갖는 폴리뉴클레오티드에서 코딩되는 하나 이상의 CDR을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드이다.

- [0066] 다른 양태에서, 본 발명은 본원에서 설명되는 항체(항체 단편 포함) 또는 폴리펩티드 중 임의의 것을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0067] 다른 양태에서, 본 발명은 본원에서 설명되는 임의의 폴리뉴클레오티드르 포함하는 벡터(발현 및 클로닝 벡터 포함) 및 숙주 세포를 제공한다.
- [0068] 본원에서 설명으로부터 명백해지는 바와 같이, 본 발명은 마우스 단일클론 항체, 911의 폴리뉴클레오티드 서열과 동일한 폴리뉴클레오티드 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드 구체예를 특히 포함한다. Mab911의 확장된 CDR 서열이 도 1A 및 1B, 및 SEQ ID NO:9-14에 나타난다.
- [0069] 다른 양태에서, 본 발명은 E3 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 E3 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포이며, 여기서 E3 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 기탁 번호 ATCC 제 PTA-4893 및/또는 ATCC 제 PTA-4894호를 갖고, E3 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 기탁 번호 ATCC 제 PTA-4895호를 갖는다. 일부 구체예에서, 숙주 세포는 (a) 기탁 번호 ATCC 제 PTA-4893 또는 PTA-4894호를 갖는 폴리뉴클레오티드에서 코딩되는 가변 영역 및/또는 (b) 기탁 번호 ATCC 제 PTA-4895호를 갖는 폴리뉴클레오티드에서 코딩되는 가변 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드이다. 일부 구체예에서, 숙주 세포는 (a) 기탁 번호 ATCC 제 PTA-4893 또는 PTA-4894호를 갖는 폴리뉴클레오티드에서 코딩되는 하나 이상의 CDR; 및/또는 (b) 기탁 번호 ATCC 제 PTA-4895호를 갖는 폴리뉴클레오티드에서 코딩되는 하나 이상의 CDR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드르 포함한다. 일부 구체예에서, 숙주 세포는 포유동물 세포이다.
- [0070] 다른 양태에서, 본 발명은 항체 E3에 의해 결합된 NGF 복합체이다. 다른 양태에서, 상기 복합체가 단리된다. 다른 양태에서, 상기 복합체가 실질적으로 정제된다.
- [0071] 다른 양태에서, 본 발명은 본원에서 설명되는 임의의 항체 또는 폴리펩티드에 의해 결합되는 NGF 복합체이다. 다른 양태에서, 상기 복합체는 단리된다. 다른 양태에서, 상기 복합체는 실질적으로 정제된다.
- [0072] 다른 양태에서, 본 발명은 본원에서 설명되는 임의의 폴리펩티드(예를 들어 항체 E3와 같은 항체를 포함) 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 약학적 조성물로서, 예를 들어 항체 E3 또는 항체 E3의 단편을 포함하는 항체를 포함하는 약학적 조성물, 및 약학적으로 허용가능한 부형제와 같은 것이다.
- [0073] 다른 양태에서, 본 발명은 항체 E3를 코딩하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제조하고; 항체 E3가 생산되도록 하는 조건 하에서 숙주 세포 또는 그들의 자손을 배양하며; 항체 E3를 정제하는 것을 포함하는 항체 E3를 생성하는 방법이다. 일부 구체예에서, 발현 벡터는 도 2 및 3에서 나타난 하나 또는 두개의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0074] 다른 양태에서, 본 발명은 적합한 세포내에서 E3 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 E3 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 단계로서, 이 때 E3 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 기탁 번호 ATCC 제 PTA-4893 및/또는 ATCC 제 PTA-4894를 갖고, E3 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 기탁 번호 ATCC 제 No. PTA-4895를 가지며; 일반적으로 후속하여 항체를 회수 및/또는 단리시키는 단계를 포함하는 항체 E3를 생성하는 방법이다.
- [0075] 다른 양태에서, 본 발명은 적합한 세포내에서 항체(하나의 경쇄 또는 중쇄로서 독립적으로 발현될 수 있거나, 경쇄 및 중쇄 모두가 하나의 벡터로부터 발현될 수도 있음)를 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 발현시킴으로써, 일반적으로 후속하여 관심있는 항체 또는 폴리펩티드를 회수 및/또는 단리시킴으로써 본원에서 설명되는 임의의 폴리펩티드(예를 들어 항체)를 생성하는 방법을 제공한다.
- [0076] 다른 양태에서, 본 발명은 본원에서 설명되는 임의의 폴리펩티드(예를 들어 항체 E3와 같은 항체를 포함)를 이용하여 NGF(예를 들어 인간 NGF) 생물학적 활성에 길항하는 방법이다. 한 구체예에서, 방법은 인간 신경 성장 인자를 본원에서 설명되는 임의의 폴리펩티드(항체 E3 포함)와 접촉시키는 것을 포함하는데, 이로써 NGF 활성(예를 들어 인간 신경 성장 인자 활성)이 길항, 감소, 방해, 또는 억제된다.
- [0077] 다른 양태에서, 본 발명은 본원에서 설명되는 임의의 폴리펩티드(예를 들어 항체 E3와 같은 항체를 포함)를 이용하여 NGF를 검출하는 방법이다. NGF의 존재는 NGF 및 본원에서 설명되는 임의의 폴리펩티드(예를 들어 항체

E3) 사이의 복합체를 검출함으로써 검출된다. 본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "검출"은 대조군의 기준을 갖거나 기준 없이 질적 및/또는 양적 검출(수준을 측정함)을 포함한다.

- [0078] 다른 양태에서, 본 발명은 항체 E3 또는 본원에서 설명되는 임의의 폴리펩티드(항체 포함) 또는 폴리뉴클레오티드 구체예를 포함하는 유효량의 조성물을 투여함으로써 통증을 치료하는 방법이다. 일부 구체예에서, 통증은 외과적 수술 후 통증이다.
- [0079] 다른 양태에서, 본 발명은 개체에 유효량의 항-NGF 길항제 항체를 투여함으로써 개체 내 류마티스 관절염을 예방 또는 치료하는 방법이다. 본 발명에 따라서 항-NGF 길항제 항체는 류마티스 관절염과 관련된 통증을 억제 또는 방해할 수 있음을 나타냈다. 일부 구체예에서, 항-NGF 길항제 항체를 투여한 후 약 24 시간 내에 통증이 완화된다. 일부 구체예에서, 항-NGF 길항제 항체를 투여한 후 약 4일 내에 통증이 완화된다. 일부 구체예에서, 통증은 관찰 전에 완화되거나 개체 내 염증 상태의 개선의 징후 없이 완화된다.
- [0080] 다른 양태에서, 본 발명은 개체 내에서 류마티스 관절염 통증의 빈도를 감소시키고, 류마티스 관절염 통증을 개선시키고, 류마티스 관절염 통증을 억제시키며, 류마티스 관절염 통증을 일시적으로 완화시키며, 및/또는 류마티스 관절염 통증의 발병, 발생, 또는 진행을 연기시키는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 개체에 유효량의 항-NGF 길항제 항체를 투여하는 것을 포함한다.
- [0081] 다른 양태에서, 본 발명은 개체에 유효량의 항-NGF 길항제 항체를 투여함으로써 개체 내 골관절염 통증을 예방 또는 치료하는 방법이다.
- [0082] 다른 양태에서, 본 발명은 유효량의 항-NGF 길항제 항체를 투여하는 것을 포함하는 개체 내 류마티스 관절염과 관련된 염증 악액질(중량 손실)을 치료하는 방법을 제공한다. 다른 양태에서, 본 발명은 개체 내 골관절염 통증의 빈도를 감소시키고, 골관절염 통증을 개선시키며, 골관절염 통증을 억제시키고, 골관절염 통증을 완화하며, 및/또는 골관절염 통증의 발병, 발달, 또는 진행을 연기시키는 방법을 제공한다.
- [0083] 다른 양태에서, 본 발명은 본원에서 설명되는 임의의 하나 이상의 조성물을 포함하는 키트 및 조성물을 제공한다. 일반적으로, 적합하게 포장되고 적절한 설명과 함께 제공되는 이들 키트는 본원에서 설명되는 임의의 방법에 있어서 유용하다.
- [0084] 본 발명은 또한 의약으로서의 사용 및/또는 의약의 제조에 대한 사용의 정황에 있어서 본원에서 설명되는 임의의 사용을 위하여 설명되는 임의의 조성물 및 키트를 제공한다.

발명의 효과

- [0085] 본 발명은 항-NGF 항체(예를 들어 항-NGF 길항제 항체), 및 그것을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관련한다. 본 발명은 또한 외과적 수술 후 통증, 류마티스 관절염 통증, 및 골관절염 통증을 포함하는 통증의 치료 및/또는 예방에 있어서 이러한 항체 및/또는 폴리뉴클레오티드의 사용에 관련한다.

도면의 간단한 설명

- [0086] 도 1A는 E3 항체("6" 및 "5+친화성 발달 H3로 표지됨)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 나타낸다. Chothia CDR 및 Kabat CDR은 밑줄친 본문 및 굵은 이탤릭체로 된 본문에 의해 각각 묘사된다. 도 1A는 또한 다음 중쇄 가변 영역 아미노산 서열의 배열을 나타낸다: (1) 마우스 911 항체의 CDR H1(SEQ ID NO:9), H2(SEQ ID NO:10), 및 H3(SEQ ID NO:11); (2) VH4-59 인간 생식 세포 수용체 서열("VH4-59" 또는 "2"로 표지됨)(SEQ ID NO:69); (3) 마우스 항체 911의 확장된 CDR로 이식된 수용체 서열("CDR 이식된" 또는 "3"으로 표지됨)(SEQ ID NO:70); (4) V71K 치환을 포함하는 CDR 이식된 수용체 서열("3+하나의 외곽구조 돌연변이" 또는 "4"로 표지됨)(SEQ ID NO:71); (5) 친화성 발달된 CDR H1 및 H2를 함유하는 클론("5" 또는 "4+ 친화성 발달 H1, H2"로 표지됨)(SEQ ID NO:72); 및 항체 E3(상기 설명되는 바와 같음)(SEQ ID NO:1).
- 도 1B는 E3 항체("5" 또는 "4+ 친화성 발달 L3로 표지됨)의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 나타낸다. Chothia CDR 및 Kabat CDR은 밑줄친 본문 및 굵은 이탤릭체로 된 본문에 의해 각각 묘사된다. 도 1B는 또한 다음 경쇄 가변 영역 아미노산 서열의 배열을 나타낸다: (1) 마우스 911 항체의 CDR L1 (SEQ ID NO:12), L2(SEQ ID NO:13), 및 L3(SEQ ID NO:14) (2) O8 인간 생식세포 수용체 서열("O8" 또는 "2"로 표지됨)(SEQ ID NO:73); (3) 마우스 항체 911의 확장된 CDR로 이식된 수용체 서열("CDR 이식된" 또는 "3"으로 표지됨)(SEQ ID NO:74); (4) CDR 이식된 수용체 서열("3+ 친화성 발달 L1, L2" 또는 "4"로 표지됨)(SEQ ID NO:75); (5) 친화성 발달된 CDR L1 및 L2를 함유하는 클론("5" 또는 "4+친화성 발달 L3"로 표지됨); 및 항체 E3(상기 설명되는 바와 같음)

음)(SEQ ID NO:2).

도 2는 항체 E3의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO:76)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 나타낸다.

도 3은 항체 E3의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO:77)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 나타낸다.

도 4는 인간 및 랫트 NGF의 농도의 변화와 함께 E13.5 뉴런의 NGF-의존성 생존을 묘사하는 그래프이다. X 축은 NGF 농도(ng/ml)에 해당하고 Y 축은 계산된 뉴런에 해당한다.

도 5는 0.04 ng/ml의 인간 NGF(약 1.5 pM ;위 패널에서 나타냄) 또는 0.4 ng/ml 인간 NGF (약 15 pM;아래 패널에서 나타냄)의 존재하에 각종 Fab의 NGF 차단 효과를 비교하는 그래프이다. Fab E3; 뮤린 911 Fab ; 및 Fab H19-L129 및 Fab 8L2-6D5의 다양한 농도에 있어서 E13.5 마우스 삼차신경 뉴런의 생존이 평가되어 있다. IC50(pM으로)이 각각의 NGF 농도에서 각각의 Fab에 대하여 계산되었고, 표 9에 나타나 있다. Fab E3는 15 pM 인간 NGF의 존재하에 약 21 pM의 IC50, 및 1.5 pM 인간 NF의 존재하에 약 1.2 pM의 IC50을 갖는 인간 NGF-의존성 삼차신경 뉴런 생존을 강력하게 막았다. Fabs 3C 및 H19-L129는 또한 인간 NGF-의존성 삼차신경 뉴런 생존을 강력하게 막았다. 두개의 패널에 있어서, X 축은 항체 농도(nM)에 해당하고 Y 축은 계산된 뉴런에 해당한다. 1.5 pM의 NGF는 IC50 부근이었고, 반면 15 pM은 Ngf의 포화 농도를 나타냈다.

도 6은 0.04 ng/ml의 랫트 NGF(약 1.5 pM; 위 패널에서 나타냄) 또는 0.4 ng/ml 랫트 NGF(약 15 pM;아래 패널에서 나타냄)의 존재하에 각종 Fab의 NGF 차단 효과를 비교하는 그래프이다. Fab E3; 뮤린 Fab 911; 및 Fab H19-L129 및 8L2-6D5의 다양한 농도에 있어서 E13.5 마우스 삼차신경 뉴런의 생존이 상기 설명되는 바와 같이 평가되었다. IC50(pM으로)이 각 NGF 농도에서 각각의 Fab에 대하여 계산되었고, 표 9에 나타나 있다. Fab E3는 15 pM 랫트 NGF의 존재하에서 약 31.6 pM의 IC50, 및 1.5 pM 랫트 NGF의 존재하에서 약 1.3 pM의 IC50으로 랫트 NGF-의존성 삼차신경 뉴런 생존을 강력하게 막았다. Fab 3C 및 H19-L129이 또한 랫트 NGF-의존성 삼차신경 뉴런 생존을 강력하게 막았다. 1.5 pM의 NGF가 IC50 부근이었고, 반면 15 pM은 NGF 포화 농도를 나타냈다. 두개의 패널 모두에서, X 축은 항체 농도(nM)에 해당하고 Y 축은 계산된 뉴런에 해당한다.

도 7은 외과 수술 24 시간 후 평가된 잔존 통증을 묘사하고 0.02 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.6 mg/kg, 또는 1 mg/kg의 항-NGF 항체 E3가 통증을 감소시켰음을 나타내는 그래프이다. "*"는 음성 대조군과 통계적으로 현저한 차이 ($p < 0.5$)를 나타낸다.

도 8은 외과 수술 24 시간 후 평가된 잔존 통증을 묘사하고 외과 수술 2 시간 후에 주입하였을 경우 0.5 mg/kg의 항-NGF 항체 E3가 잔존 통증을 현저하게($p < 0.005$) 감소시켰음을 나타낸다.

도 9는 마우스 항체 911(Fab)의 인간 NGF에 대한 결합 친화성의 BIAcore 분석의 결과를 나타내는 그래프이다. 마우스 항체 911은 3.7nM의 K_D , $8.4 \times 10^{-5} s^{-1}$ 의 k_{off} 및 $2.2 \times 10^4 Ms^{-1}$ 의 k_{on} 으로 NGF에 결합하였다.

도 10은 항체 E3(Fab)("3E Fab"로 나타냄)의 인간 NGF에 대한 결합 친화성의 BIAcore 분석의 결과를 나타내는 그래프이다. E3는 약 0.07 nM (및 약 $6.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 의 k_{on} 및 약 $4.2 \times 10^{-5} s^{-1}$ 의 k_{off} 와 함께)의 K_D 로 인간 NGF에 결합하였다.

도 11은 NGF 및 trkA(검은색 원으로 나타냄) 및 NGF 및 p75 (속이 빈 사각형)사이에서 검출된 % 결합율에 의해 평가되는 바와 같이, 항체 E3가 NGF의 상호작용을 그것의 수용체인 trkA 및 p75를 이용하여 막는 것을 묘사하는 그래프이다. X 축은 항체 3E(Fab)의 농도에 해당하고 Y 축은 NGF 결합(% 최대 RU)에 해당한다. Fab E3의 증가된 농도는 증가된 신호(RU로 측정됨)에 의해 나타내는 바와 같이, p75 및 trkA 모두와 NGF의 상호작용을 막았다. 항체 E3(Fab) 농도가 NGF 농도와 같을 경우, NGF 결합이 관찰되지 않았다(0의 신호로 나타냄).

도 12는 모든 항체 E3 및 Fab E3의 인간 NGF 차단 능력을 묘사하는 그래프이다. 인간 NGF의 존재하에서 및 Fab E3 및 항체 E3의 다양한 농도에서 E13.5 마우스 삼차신경 뉴런의 생존을 평가하였다. X 축은 NGF 결합 부위(nM)에 해당하고 Y 축은 삼차신경(TG) 뉴런의 표준화 된 갯수에 해당한다. 총 항체 및 Fab가 NGF 결합 부위의 수에 대하여 표준화 된 경우(Fab는 하나의 결합 부위를 가지고 모든 항체는 두개의 결합 부위를 가짐) 전체 항체 E3 및 Fab 3E는 삼차신경 뉴런의 NGF-의존성 생존에 대하여 유사한 억제 수준을 보였다.

도 13은 0.4 ng/ml 인간 NGF(포화 조건)가 존재하에서 E13.5 삼차신경 뉴런의 NGF-의존성 생존을 억제하기 위해

항체 E3(속이 찬 삼각형), 항체 911(속이 찬 원형), 및 trkA 수용체 면역부착소(음영을 준 사각형; "trkA-Fc"로 나타냄)의 다양한 농도(20, 4.0, 8.0, 16.0, 032.0, 0064.0, 00128, 및 0.0 nM)의 능력을 묘사하는 그래프이다. X 축은 항체의 농도(nM)에 해당하고 Y 농도는 계산된 뉴런에 해당한다. 이들 결과는 항체 E3가 마우스 단일클론 항-NGF 항체 911 또는 trkA 면역부착소 보다 더 현저하게 NGF를 차단하였음을 나타낸다.

도 14는 항-NGF 길항제 항체 E3("도면에서 3E"로 칭함) 또는 Fab 911이 200 nM 만큼의 높은 항체 농도에서 조차도, NT3, NT4/5 및 MSP에 의해 촉진되는 뉴런의 생존을 억제하지 않았음을 묘사하는 그래프이다. 상기 데이터는 각 실험(포화 NGF 농도에서 성장된 삼차신경 뉴런의 100% 생존)에 있어서 양성 대조군에서 관찰된 생존에 비하여 배양액에서 48 시간 후 평균 % 생존율(평균의 표준 오차, 각 데이터 포인트에 대하여 n=3)을 나타냈다. 다양한 농도(20nM, 2 nM, 또는 0.2 nM)의 E3 Fab(도면에서 "3E"로 칭함) 및 마우스 항체 911 Fab가 뉴로트로핀 무첨가("대조군"이라 칭함), 400 pM NGF("NGF-400pM"이라 칭함), 10 nM NT3("NT3-10nM"라 칭함) 또는 600 pM MSP("MSP-600 pM"이라 칭함)의 존재하에서 사용되었다.

도 15는 항-NGF 길항제 항체 E3(Fab 또는 전체 항체) ("도면에서 3E"라 칭함) 또는 마우스 항체 911(Fab 또는 전체 항체)가 200 nM 만큼의 높은 항체 농도에서 조차도, NT3, NT4/5 및 MSP에 의해 촉진되는 뉴런의 생존을 억제하지 않음을 묘사하는 그래프이다. 다양한 농도(200 nM 및 80 nM)의 E3 Fab 및 전체 항체 및 마우스 항체 911 총 항체 및 Fab가 뉴로트로핀 무첨가("무 인자"라 칭함), 400 pM NGF("NGF-400pM"이라 칭함), 10 nM NT3("NT3-10nM"라 칭함) 또는 600 pM MSP("MSP-600 pM"이라 칭함)의 존재하에서 사용되었다.

도 16은 항-NGF 길항제 항체 E3 또는 Fab E3가 BDNF, NT4/5 또는 LIF에 의해 촉진되는 E17 결절성 뉴런의 생존을 억제하지 않음을 묘사하는 그래프이다. 마우스 항-NGF 길항제 항체 911이 또한 테스트되었고, 유사한 결과가 관찰되었다. 다양한 농도(200 nM 또는 80 nM)의 전체 항체 E3("도면에서 3E"라 칭함), Fab E3, 전체 항체 911, 또는 Fab 911이 뉴로트로핀 무첨가("무 인자"라 칭함), 400 pM BDNF("BDNF-400pM"이라 칭함), 400 pM NT4/5("NT4/5-400pM"이라 칭함, 또는 2.5 nM LIF("LIF-2.5 nM"라 칭함)의 존재하에서 테스트되었다.

도 17은 항-NGF 길항제 항체 E3 또는 Fab E3가 BDNF, NT4/5 또는 LIF에 의해 촉진되는 E17 결절성 뉴런의 생존을 억제하지 않음을 묘사하는 그래프이다. 다양한 농도(200 nM, 20 nM, 2nM)의 Fab E3("도면에서 3E"로 칭함), 또는 Fab 911이 뉴로트로핀 무첨가("대조군"이라 칭함), 400 pM BDNF("BDNF-400pM"이라 칭함), 400 pM NT4/5("NT4/5-400pM"이라 칭함), 또는 2.5 nM LIF("LIP-2.5nM"라 칭함)의 존재하에서 테스트되었다.

도 18은 14일 및 19일에 항-NGF 항체(E3 및 911)의 투여 후 관절염 랫트(류마티스 관절염 모델)에서 통각수용 반응을 나타내는 그래프이다. E3(1 mg/kg, 14일 및 19일에 정맥 내 투여), 911(10 mg/kg, 14일 및 19일에 정맥 내 투여), 또는 indo(인도메타신 3 mg/kg, 10일 이상 경구 투여)가 관절염 마우스에 투여되었다. 발생 강도 값은 평균±s.e.m.으로서 mV로 표현된다.

도 19는 14일 및 19일에 항-NGF 항체의 투여 후 랫트(류마티스 관절염 모델)의 류마티스에 있어서 체중에 대한 항-NGF 항체의 효과를 나타내는 그래프이다. E3 (1mg/kg, 14일 및 19일에 정맥 내 투여), 911(10 mg/kg, 14일 및 19일에 정맥 내 투여), 또는 indo (인도메타신 3 mg/kg, 10일 이상 경구 투여)이 관절염 마우스에 투여되었다. 체중값은 평균±s.e.m.으로서 그래프로 표현된다.

도 20은 14일 및 18일에 상이한 투여량의 항-NGF 항체 E3(0.003 mg/kg, 0.03 mg/kg, 0.3 mg/kg, 및 5 mg/kg)의 투여 후 관절염 랫트(류마티스 관절염 모델)의 통각수용 반응을 나타내는 그래프이다. 발생 강도 값은 평균±s.e.m.으로서 mV로 표현된다.

도 21은 14일 및 18일에 상이한 투여량의 항-NGF 항체 E3(0.03 mg/kg, 0.3 mg/kg, 및 5 mg/kg)의 투여 후 관절염 랫트(류마티스 관절염 모델)에서 14일(14일로 표준화 됨)에 % 증량에 대한 항-NGF 항체 E3의 효과를 나타내는 그래프이다.

도 22는 14일 및 18일에 상이한 투여량의 항-NGF 항체 E3(0.03 mg/kg, 0.3 mg/kg, 및 5 mg/kg)의 투여 후 관절염 랫트(류마티스 관절염 모델)에 있어서 증량 손실에 관한 항-NGF 항체 E3의 효과를 나타내는 그래프이다. 체중값은 0일에 표준화되었다.

도 23은 순차 넘버링, Kabat 넘버링, 및 Chothia 넘버링을 이용하여 번호 매김되는 바와 같이, E3 중쇄 가변 영역 아미노산 서열(도 23 A) 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열(도 23 B)를 묘사한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0087] 발명의 상세한 설명

[0088] 본원에서 개시된 발명은 고 친화성으로 NGF(예를 들어 인간 NGF)에 결합하는 항-NGF 길항제 항체를 제공한다. 본 발명은 NGF에 결합하는 E3로부터 유도된 항체 및 폴리펩티드, 및 이들 항체를 제조 및 이용하는 방법을 더 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 신경 성장 인자("NGF")에 결합하는 인간화 된 항체, E3, 및 이러한 항체를 제조 및 이용하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 NGF에 결합하는 E3 폴리펩티드(항체 포함), 및 E3 항체 및/또는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0089] 본원에서 개시되는 발명은 또한 항-NGF 길항제 항체의 치료적 유효량의 투여에 의해 개체 내 류마티스 관절염 통증을 예방 및/또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0090] 본원에서 개시되는 발명은 또한 항-NGF 길항제 항체의 치료적 유효량의 투여에 의해 개체 내 골관절염 통증을 예방 및/또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0091] 본 발명은 또한 항체의 친화성을 조절하는 방법 및 CDR 영역을 특성화하는 방법을 제공한다.

[0092] 일반적 기술

[0093] 본 발명의 실행은 달리 나타내지 않는다면, 당업계 기술인 전통적인 분자생물학(재조합 기술 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 기술을 이용할 것이다. 이러한 기술은 예를 들어, [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harb 또는 Press; Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait, ed.,1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook(J. E. Cellis, ed. , 1998) Academic Press; Animal Cell Culture(R. I. Freshney, ed. , 1987); Introduction to Cell 및 Tissue Culture (J. P. Mather 및 P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell 및 Tissue Culture : Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, 및 D. G.Newell, eds. , 1993-1998) J. Wiley 및 Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir 및 C. C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors f 또는 Mammalian Cells (J. M. Miller 및 M. P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., eds., 1987); PCR : The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley 및 Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway 및 P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies : a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies : a practical approach (P. Shepherd 및 C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual(E. Harlow 및 D. Lane (Cold Spring Harb 또는 Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti 및 J. D. Capra, eds. , Harwood Academic Publishers,1995); and Cancer : Principles 및 Practice of Oncology (V. T. DeVita et al., eds., J. B. Lippincott Company, 1993)]와 같은 문헌에서 완전하게 설명된다.

[0094] 정의

[0095] "항체"는 면역글로불린 분자의 가변 영역 내에 위치되는 적어도 하나의 항원 인식 부위를 통하여 예를 들어, 탄수화물, 폴리뉴클레오티드, 지질, 폴리펩티드 등과 같은 표적에 특이적 결합을 할 수 있는 면역글로불린 분자이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 상기 용어는 손상되지 않은 폴리클론 또는 모노클론 항체 뿐만 아니라, 그것의 단편(예를 들어 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), 단일 사슬(ScFv), 그것의 돌연변이, 항체 부분을 포함하는 융합 단백질, 및 항원 인식 부위를 포함하는 면역글로불린 분자의 임의의 다른 변형된 구성을 포함한다. 항체는 예를 들어 IgG, IgA, 또는 IgM(또는 그것의 서브-클래스)와 같은 임의의 클래스의 항체를 포함하며, 상기 항체는 어떤 특정한 클래스일 필요가 없다. 면역글로불린의 중쇄의 불변 영역의 항체 아미노산 서열에 따라서, 면역글로불린은 상이한 클래스로 지정될 수 있다. 면역글로불린의 5가지 주요 클래스가 있으며: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM, 이들 중 몇몇은 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2와 같은 서브클래스(동형)로 더 나뉘질 수 있다. 면역글로불린의 상이한 클래스에 대응하는 중쇄 불변 도메인을 각각 알파, 델타, 에프실론, 감마, 및 뮤로 칭한다. 면역글로불린의 상이한 클래스의 서브유닛 구조 및 3차원적 구성은 주지되어 있다.

[0096] "Fv"는 완전한 항원-인식 및-결합 부위를 포함하는 항체 단편이다. 이 중 사슬 Fv 중에 있어서, 이 영역은 밀착, 비-공유결합 연관으로 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 다이머로 구성된다. 단일 사슬 Fv 중에 있어서, 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인은 유연 펩티드 링커에 의해 공유결합으로 연결될 수 있어서 경쇄 및 중쇄는 이 중 사슬 Fv 종의 구조와 동일한 다이머 구조로 연관될 수 있다. 이 구성에 있어서 각 가변 도메인

의 3개의 CDR이 VH-VL 다이머의 표면상에서 항원 결합 특이성을 규정하도록 상호작용한다. 그러나, 단일 가변 도메인(항원에 대하여 특이적인 단지 3 CDR을 포함하는 1/2 또는 하나의 Fv)이 항원을 인식하고 결합하는 능력을 가진다 하더라도, 일반적으로 전체 결합 부위 보다 더 낮은 친화성을 가진다.

[0097] Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제 1 불변 도메인(CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 경첩 영역으로부터 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 몇개의 잔기를 첨가함으로써 Fab 단편과 상이하다.

[0098] "단일클론 항체"는 동종 항체 집단을 나타내는데, 상기 단일클론 항체는 항원의 선택적 결합에 관련되는 아미노산(자연 발생 및 비-자연 발생)으로 구성된다. 단일클론 항체의 집단은 단일 항원 부위에 표적되기 때문에 고도로 특이적이다. 용어 "단일클론 항체"는 손상되지 않은 단일클론 항체 및 온길이의 단일클론 항체 뿐만 아니라, 그것의 단편(예를 들어 Fab, Fab', F (ab')₂, Fv), 단일 사슬(ScFv), 그것의 돌연변이, 항체 부분을 포함하는 융합 단백질, 및 항원에 결합하기 위해 필요한 특이성 및 능력을 갖는 항원 인식 부위를 포함하는 면역글로불린 분자의 임의의 다른 변형된 구성을 포함한다. 제조되는 항체의 공급원 또는 방식에 관하여 한정하고자 하지 않는다(예를 들어, 하이브리도마, 파지 선택, 재조합 발현, 트랜스제닉 동물 등).

[0099] 본원에서 사용되는 바와 같이, "인간 항체"는 인간에 의해 생산되고/생산되거나 당업계 주지이거나 본원에서 개시되는 인간 항체를 제조하는 어떤 기술을 이용하여 제조한 항체의 서열과 대응하는 아미노산 서열을 갖는 항체이다. 인간 항체의 이러한 정의는 적어도 하나의 인간 중쇄 폴리펩티드 또는 적어도 하나의 인간 경쇄 폴리펩티드를 포함하는 항체이다. 이러한 하나의 예는 무린 경쇄 및 인간 중쇄 폴리펩티드를 포함하는 항체이다. 인간 항체는 당업계 공지된 각종 기술을 이용하여 생산될 수 있다. 한 구체예에서, 인간 항체는 파지 라이브러리로부터 선택되는데, 상기 파지 라이브러리는 인간 항체를 발현한다(Vaughan et al., 1996, Nature Biotechnology, 14: 309-314; Sheets et al., 1998, PNAS, (USA) 95: 6157-6162; Hoogenboom 및 Winter, 1991, J : Mol. Biol., 227:381 ; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581). 인간 항체는 또한 내인성 면역글로불린 유전자 가 부분적 또는 완전하게 불활성화 된 트랜스제닉 동물, 예를 들어 마우스 내로 인간 면역글로불린 유전자 좌를 도입함으로써 제조될 수 있다. 이러한 접근법은 미국 특허 제 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 및 5,661,016에 기술된다. 택일적으로, 인간 항체는 표적 항원(이러한 B 림프구는 개체로부터 회수될 수도 있고 또는 시험관에서 면역화 될 수도 있음)에 표적되는 항체를 생산하는 불멸 인간 B 림프구에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Cole et al., Monoclonal Antibodies 및 Cancer Therapy, Alan R. Liss, p.77 (1985);Boerner et al., 1991, J Immunol., 147 (1): 86-95] 및 미국 특허 제 5,750,373을 참조하십시오.

[0100] "키메라 항체"는 중쇄 및 경쇄의 각 아미노산 서열의 한 부분이 특정 종으로부터 유도된 항체의 대응 서열과 동일하거나 특정 클래스에 속하는 반면, 상기 사슬의 잔존 부분은 또 다른 것의 대응 서열과 동일한 항체를 말한다. 전형적으로, 이들 키메라 항체에 있어서, 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은 어떤 포유동물 종으로부터 유도된 항체의 가변 영역을 모방하는 반면, 불변 부분은 또 다른 것으로부터 유도된 항체의 서열과 동일하다. 이러한 키메라 형태에 대한 한가지 분명한 이점은 예를 들어, 가변 영역이 예로써, 인간 세포 제조로부터 유도된 불변 영역의 조합으로 비 인간 숙주 유기체로부터 용이하게 이용가능한 하이브리도마 또는 B 세포를 이용하여 현재 공지된 공급원으로부터 편리하게 유도될 수 있다. 상기 가변 영역은 제조의 용이함이라는 이점을 가지며, 특이성이 그것의 공급원에 의해 영향 받지 않으나, 항체가 주입되는 경우 비-인간 공급원으로부터의 불변 영역 보다도 인간으로부터 면역반응을 덜 유도하는 것 같다. 그러나, 정의는 이러한 특정 실시예에 한정되지 않는다.

[0101] "기능적 Fc 부위"는 본래의 서열 Fc 부위의 적어도 하나의 작동자 기능을 지닌다. 대표 "작동자 기능"은 C1q 결합; 보체 의존성 세포독성(CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC); 식균작용; 세포 표면 수용체의 강하-조절(예를 들어, B 세포 수용체; BCR)등을 포함한다. 이러한 작동자 기능은 일반적으로 결합 도메인(예를 들어, 항체 가변 도메인)과 조합되는 Fc 부위를 필요로하며 이러한 항체 작동자 기능을 평가하기 위한 당업계 공지된 각종 분석법을 이용하여 평가될 수 있다.

[0102] "본래의 서열 Fc 부위"는 천연에서 발견되는 Fc 부위의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. "변이 Fc 부위"는 적어도 하나의 아미노산 변형으로 인하여 본래의 서열 Fc 부위의 아미노산과 상이하지만, 본래의 서열 Fc 부위의 적어도 하나의 작동자 기능을 보유하는 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 변이 Fc 부위는 본래의 서열 Fc 부위 또는 부모 폴리펩티드의 Fc 부위와 비교하여 적어도 하나의 아미노산 치환을 가지는데, 예를 들어 본래의 서열 Fc 부위 또는 부모 폴리펩티드의 Fc 부위에 있어서 약 1 내지 10 아미노산 치환, 및 바람직하게는 약 1 내지 약 5 아미노산 치환을 가진다. 본원에서 변이 Fc 부위는 바람직하게는 본래의 서열 Fc 부

위 및/또는 부모 폴리펩티드의 Fc 부위와 적어도 약 80% 서열 동일성, 및 가장 바람직하게는 그와 적어도 약 90% 서열 동일성, 더 바람직하게는 그와 적어도 약 95% 서열 동일성을 지닐 것이다.

[0103] 본원에서 사용되는 바와 같이 "항체-의존성 세포-매개 세포독성" 및 "ADCC"는 Fc 수용체(FcRs)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포가 표적 세포 상에 결합된 항체를 인지하고 후속하여 표적 세포의 용해를 야기하는 세포-매개 반응을 말한다. 관심있는 분자의 ADCC 활성은 예를 들어 미국 특허 제 5,500,362 또는 5,821,337에서 설명되는 바와 같이, 시험관 내 ADCC 분석법을 사용하여 평가될 수 있다. 이러한 분석법을 위하여 유용한 작동자 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 NK 세포를 포함한다. 택일적으로, 또는 추가적으로, 관심있는 분자의 ADCC 활성은 생체 내, 예를 들어 문헌[Clynes et al., 1998,PNAS (USA), 95: 652-656]에 개시되는 바와 같이 동물 모델 내에서 평가될 수도 있다.

[0104] 본원에서 사용되는 바와 같이, "Fc 수용체" 및 "FcR"은 항체의 Fc 부위에 결합하는 수용체를 설명한다. 바람직한 FcR은 본래의 서열 인간 FcR이다. 더욱이, 바람직한 FcR은 IgG 항체(감마 수용체)에 결합하는 것이며 대립변이체 및 택일적으로 이들 수용체의 스플라이싱 된 형태를 포함하는 Fc γ RI, Fc γ RII, 및 Fc γ RIII 서브클래스의 수용체를 포함한다. Fc γ RII 수용체는 Fc γ RIIA("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB("억제 수용체")를 포함하는데, 이는 상기 수용체의 세포질 도메인에 있어서 주로 상이한 유사한 아미노산 서열을 가진다. FcRs는 문헌 [Ravetch 및 Kinet,1991, Ann. Rev. Immunol., 9: 457-92; Capel et al., 1994, Immunomethods, 4: 25-34; 및 de Haas et al., 1995, J. Lab. Clin. Med., 126:330-41]에서 개관된다. "FcR"는 또한 신생아의 수용체, FcRn을 포함하는데, 이는 모계 IgGs의 태아로 의 이동의 원인이다(Guyer et al., 1976, J : Immunol., 117: 587; 및 Kim et al., 1994, J Immunol., 24: 249).

[0105] "보체 의존성 세포독성" 및 "CDC"는 보체의 존재하에서 표적의 용해를 나타낸다. 보체 활성 경로는 동족 항원으로 복합된 분자(예를 들어 항체)에 보체 시스템의 1차 성분(C1q)이 결합함으로써 개시된다. 보체 활성을 평가하기 위해, CDC 분석법이, 예를 들어 문헌[Gazzano-Santoro et al., J. ImmunoL Methods, 202:163 (1996)]에 개시되는 바와 같이 수행될 수 있다.

[0106] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "E3", "3E", 및 "항체 E3"는 도 1A(SEQ ID NO:1) 및 1B(SEQ ID NO:2)에서 각각 나타낸 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 포함하는 항체에 대하여 나타내는데 호환적으로 사용된다. 항체 E3의 CDR 부분(Chothia 및 Kabat CDR을 포함)이 도 1A 및 1B에서 극명하게 묘사된다. 도 2 및 3은 각각 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 나타내는데, 상기 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 도 1A 및 1B에서 나타낸다. E3의 생성 및 특성화는 실시예에서 설명된다. 상이한 생물학적 기능은 이에 한정되지는 않지만, NGF에 결합하고 NGF 생물학적 활성 및/또는 NGF 신호화에 의해 매개되는 다운스트림 경로를 억제하는 능력; 및 마우스 E13.5 삼차신경 뉴런의 NGF-의존성 생존을 억제하는 능력을 포함하는 E3와 관련된다. 본원에서 논의되는 바와 같이, 본 발명의 항체는 이들 특성의 임의의 하나 이상을 가질 수 있다. 일부 구체예에서, 용어 "E3"는 (a) 기탁 번호 ATCC 제 PTA-4893 또는 ATCC 제 PTA-4894호를 갖는 E3 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 (b) 기탁 번호 ATCC 제 PTA-4895호를 갖는 E3 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 면역글로불린을 나타낸다.

[0107] 본원에서 사용되는 바와 같이, 항체의 "면역특이적" 결합은 항체의 항원 결합 부위와 항체의 항원 결합 부위에 의해 인지되는 특이적 항원 사이에서 발생하는 항원 특이적 결합 상호작용을 나타낸다.

[0108] 항원 또는 폴리펩티드에 "특이적으로 결합", 또는 "우위적으로 결합"(본원에서 호환적으로 사용됨)하는 에피토프는 당업계에서 잘 이해되는 용어이며 이러한 특이적 또는 우위적 결합을 결정하는 방법 또한 당업계 주지되어 있다. 분자는 그것이 대안적인 세포나 기질과 그러한 것 보다 특정 세포나 기질과 더 큰 지속력 및/또는 더 큰 친화성으로 그것이 보다 빈번히, 보다 신속하게 작용하거나 결합한다면 "특이적 결합" 또는 "우위적 결합"을 보이는 것이라 말한다. 항체가 그것이 다른 기질에 결합하는 것 보다 더 큰 친화성, 결합성으로, 보다 용이하게, 및/또는 더 큰 지속력으로 결합한다면, 표적 세포에 "특이적으로 결합한다" 또는 "우위적으로 결합한다". 예를 들어, NGF 에피토프에 특이적으로 또는 우위적으로 결합하는 항체는 그것이 다른 NGF 에피토프나 비-NGF 에피토프에 결합하는 것 보다 더 큰 친화성, 결합성으로, 보다 용이하게, 및/또는 더 큰 지속력으로 이 에피토프에 결합하는 항체이다. 또한 이 정의를 읽으면 예를 들어, 1차 표적에 특이적으로 또는 우위적으로 결합하는 항체(또는 부분 또는 에피토프)는 2차 표적에 특이적으로 또는 우위적으로 결합할 수도 있고 그렇지 않을 수도 있음이 이해된다. 이와 같이, "특이적 결합" 또는 "우위적 결합"은 배제적 결합을 반드시 요구하지는 않는다(그러나 그것이 포함될 수는 있음). 일반적으로, 그러나 필수적이지는 않게, 결합에 대한 언급은 우위적 결합을 의미한다.

[0109] 용어 "폴리펩티드", "올리고펩티드", "펩티드" 및 "단백질" 임의의 길이의 아미노산의 폴리머를 나타내는데 본원에서 호환적으로 사용된다. 상기 폴리머는 선형 또는 분지형일 수 있고, 변형된 아미노산을 포함할 수도 있으며, 비-아미노산에 의해 방해받을 수도 있다. 상기 용어는 또한 자연적으로 또는 예컨대, 이황화 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 표지 구성성분과의 결합과 같은 임의의 다른 조작 또는 변형과 같은 개입에 의해 변형된 아미노산 폴리머를 포함한다. 또한 본 정의에는 예를 들어, 당업계 공지된 다른 변형 뿐만 아니라, 하나 이상의 아미노산(예를 들어, 비천연 아미노산 등을 포함) 유사체를 함유하는 폴리펩티드를 포함된다. 본 발명의 폴리펩티드는 항체를 기재로 하므로, 상기 폴리펩티드는 단일 사슬 또는 연고나 사슬로서 발생할 수 있음이 이해된다.

[0110] 본원에서 호환적으로 사용되는 바와 같이, "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 임의의 길이의 뉴클레오티드의 폴리머를 말하여, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드 또는 염기, 및/또는 그들의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 폴리머라제에 의해 폴리머 내로 통합될 수 있는 어떤 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 예를 들어 메틸화 뉴클레오티드 및 그들의 유사체와 같은 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 만일 존재할 경우, 뉴클레오티드 구조에 대한 변형은 폴리머의 집합 전 또는 후에 나누어질 수 있다. 뉴클레오티드의 서열은 비-뉴클레오티드 구성성분에 의해 방해도리 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 예를 들어 표지 구성성분의 결합에 의함과 같이, 폴리머화 이후에 더 변형될 수 있다. 다른 유형의 변형, 예를 들어, "모자"는 폴리뉴클레오티드의 변형되지 않은 형태 뿐만 아니라, 하나 이상의 천연 발생 뉴클레오티드의 유사체로의 치환, 예를 들어, 비하전된 연결부(예를 들어, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스터, 포스포아미데이트, 마바메이트 등) 및 하전된 연결부(예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)을 갖는 변형, 예를 들어, 단백질(예를 들어, 뉴클레아제, 독신, 항체, 신호 펩티드, ply-L-리신 등)과 같은 부속 부분을 함유하는 변형, 삽입시약(intercalators)(예를 들어, 아크리딘, 프소랄렌 등)을 포함하는 변형, 킬레이트제(예를 들어, 금속, 방사선 금속, 붕소, 산화 금속 등)를 함유하는 변형, 알킬화제를 함유하는 변형, 변형된 연결부(예를 들어, α-아노머 핵산 등)를 포함하는 변형과 같은 상호 뉴클레오티드 변형을 포함한다. 또한, 당 내에 통상 존재하는 임의의 히드록실 기는 예를 들어, 표준 보호기에 의해 보호되거나, 추가적 뉴클레오티드에 대한 추가적 결합을 만들기 위해 활성화된, 포스포네이트 기, 포스페이트 기에 의해 치환되거나, 고형 지지체에 콘쥬게이트될 수 있다. 5' 및 3' 말단 OH는 인산화되거나 1 내지 20 탄소 원자로부터의 아민 또는 유기 모자화 기 부분으로 치환될 수 있다. 또한 그 밖의 히드록실기는 표준 모호기들에 의해 유도체 형성될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 또한 일반적으로 당업계에서 공지되어 있는 예를 들어, 2'-O-메틸-, 2'-O-알킬-, 2'-플루오로- 또는 2'-아지도-리보스, 카르보시클릭 당 유사체, α-아노머 당, 예를 들어 아라비노스, 자일로스 또는 리소오스와 같은 에피머 당, 피라노스 당, 푸라노스 당, 시도헵톨로스, 메틸 리보시드와 같은 무고리 유사체 및 무염기성(abasic) 뉴클레오티드를 포함하는 리보스 또는 데옥시리보스의 유사체 형태를 함유할 수 있다. 하나 이상의 포스포다이에스터 연결부는 대안적인 연결 기에 의해 치환될 수 있다. 이들 대안적인 연결 기는 이에 국한되지 않는, 포스페이트가 P(O)S ("티오에이트"), P(S)S("디티오에이트"), "(O)NR₂("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH₂ ("포르마세탈")에 의해 치환되는데, 각각의 R 또는 R'은 독립적으로 H 또는 에테르(-O-) 연결부, 아릴, 알케닐, 시클로알킬, 시클로알케닐 또는 아랄딜을 선택적으로 함유하는 치환 또는 미치환된 알킬(1-20 C)인 구체예를 포함한다. 폴리뉴클레오티드의 모든 연결부가 동일할 필요는 없다. 선행하는 설명은 RNA 및 DNA를 포함하여 본원에서 언급된 모든 폴리뉴클레오티드에 사용한다.

[0111] 항체의 "가변 영역"은 단독으로 또는 조합의 항체 경쇄 가변 영역 또는 항체 중쇄 가변 영역을 나타낸다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 각각 고도가변 영역으로서도 알려진 3개의 상보성 결정 영역(CDR)에 의해 연결되는 4개의 외곽구조 영역(FR)로 이루어진다. 각 사슬의 CDR은 FR과 근접하여, 그리고 항체의 항원 결합 부위의 형성에 도움이 되는 그 밖의 사슬로부터의 CDR과 함께 보유된다. CDR을 결정하는 적어도 두가지 기술이 있다:(1) 상호-종 서열 변화성을 기초로 한 접근법(즉, Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed. , 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); 및 (2) 항원-항체 복합체의 결정학상 연구를 기초로 한 접근법(Chothia et al. (1989)Nature 342: 877; Al-lazikani et al (1997) JMolec. Biol. 273: 927-948)). 본원에서 사용되는 바와 같이, CDR은 상기 두가지 접근법 중 하나 또는 이들 모두의 조합으로 한정된 CDR을 나타낼 수 있다.

[0112] 항체의 "불변 영역"은 단독 또는 조합으로, 항체 경쇄의 불변 영역 또는 항체 중쇄의 불변 영역을 나타낸다.

[0113] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "신경 성장 인자" 및 "NGF"는 NGF의 생물학적 활성의 적어도 일부를 보유하는 신경 성장 인자 및 그것의 변이체를 나타낸다. 본원에서 사용되는 바와 같이, NGF는 인간, 개, 고양이,

말, 또는 소를 포함하는 모든 포유동물 중의 고유 서열 NGF를 포함한다.

- [0114] "NGF 수용체"는 NGF에 의해 결합되거나 활성화 되는 폴리펩티드를 나타낸다. NGF 수용체는 이에 한정되지는 않으나, 인간, 개, 고양이, 말, 영장류, 또는 소를 포함하는 어떤 포유동물 중의 TrkA 수용체 및 p75 수용체를 포함한다.
- [0115] 본원에서 사용되는 바와 같이, "항-NGF 길항제 항체"(호환적으로 "항-NGF 항체"라고 칭함)는 NGF에 결합할 수 있고 NGF 생물학적 활성 및/또는 NGF 신호화에 의해 매개되는 다운스트림 경로를 억제할 수 있는 항체를 나타낸다. 항-NGF 길항제 항체는 예를 들어 수용체 결합 및/또는 NGF에 대한 세포 반응의 유도과 같은 NGF 신호화에 의해 매개되는 다운스트림 경로들을 포함하는 NGF 생물학적 활성을 막거나, 길항하거나, 억압 또는 감소시키는 (현저하게를 포함) 항체를 포함한다. 본 발명의 목적을 위해, 용어 "항-NGF 길항제 항체"가 모든 이전에 간주된 용어, 제목, 및 기능적 상태 및 특성을 포함하며, 이로써 NGF 자체, NGF 생물학적 활성(이에 한정되지는 않지만 외과적 수술 후 통증의 어떤 양상을 매개하는 능력에 대한 그것의 능력을 포함), 또는 생물학적 활성의 결과가 어떠한 의미있는 정도로 실질적으로 무효화, 감소, 또는 중화된다. 일부 구체예에서, 항-NGF 길항제 항체는 NGF에 결합하고 NGF 이량체화 및/또는 NGF 수용체(예를 들어 p75 및/또는 trkA)에 대한 결합을 막는다. 다른 구체예에서, 항-NGF 항체는 NGF에 결합하고 trkA 수용체 이량체화 및/또는 trkA 자기인산화를 막는다. 항-NGF 길항제 항체의 실시예가 본원에서 제공된다.
- [0116] NGF의 "생물학적 활성"은 일반적으로 NGF 수용체에 결합하고/결합하거나 NGF 수용체 신호 경로를 활성화하는 능력을 나타낸다. 제한 없이, 생물학적 활성은 임의의 하나 이상의 다음을 포함한다: NGF 수용체(예를 들어 p75 및/또는 trkA)에 결합하는 능력; trkA 수용체 이량체화 및/또는 자기인산화를 촉진하는 능력; NGF 수용체 신호 경로를 활성화하는 능력; 세포 분화, 증식, 생존, 성장 및 기타 세포 생리적 변화를 촉진하는 능력으로서, 뉴런 형태학의 변화, 시냅스 형성(synaptogenesis), 시냅스 작용, 신경전달자 및/또는 손상 후 신경펩티드 방출 및 재생을 포함하며(뉴런의 경우, 말초 및 중추 뉴런을 포함); 마우스 E13.5 삼차신경 뉴런의 생존을 촉진하는 능력; 및 외과적 수술 후 통증을 포함하는 통증을 중재하는 능력.
- [0117] 본원에서 사용되는 바와 같이, "실질적으로 순수한"은 적어도 50% 순도(즉, 오염물이 부재함), 더 바람직하게는 적어도 90% 순도, 더 바람직하게는 적어도 95% 순도, 더 바람직하게는 적어도 98% 순도, 더 바람직하게는 적어도 99% 순도인 물질에 대하여 나타낸다.
- [0118] "숙주 세포"는 폴리뉴클레오티드 삽입의 통합을 위하여 벡터에 대한 레시피언트가 존재하거나 가질 수 있는 개별 세포 또는 세포 배양을 포함한다. 숙주 세포는 단일 숙주 세포의 자손을 포함하며, 상기 자손은 자연적, 우연적, 또는 고의적 돌연변이로 인하여 기원 부모 세포와 완전히 동일(형태학상 또는 게놈 DNA 보체)하지는 않을 수 있다. 숙주 세포는 본 발명의 폴리뉴클레오티드(들)로 생체 내에서 감염된 세포를 포함한다.
- [0119] 본원에서 사용되는 바와 같이, "치료"는 이롭거나 소망하던 임상적 결과를 얻기 위한 접근법이다. 본 발명의 목적을 위해, 이롭거나 소망하던 임상적 결과는 이에 국한되지는 않으나 다음을 포함한다: 급성, 만성, 염증성, 신경병증성, 외과 수술 후 통증, 류마티스 관절염 통증, 또는 골관절염 통증을 포함하는 어떤 양태의 통증의 개선 또는 완화. 본 발명의 목적을 위해, 이롭거나 소망하던 임상적 결과는 이에 국한되지는 않으나, 다음 중 하나 이상을 포함한다: 어떤 양태의 통증(예를 들어 통증의 지속시간을 단축하는 바와 같이, 통증 민감도 또는 감각의 감소)을 포함하는 통증과 관련되는 하나 이상의 증상의 심각성을 감소시키는 것을 포함하는 완화.
- [0120] "유효량"의 약물, 화합물, 또는 약학적 조성물은 통증 감각의 완화 또는 감소와 같은 임상적 결과를 포함하는 이롭거나 소망하던 결과를 가져오기에 충분한 양이다. 유효량이 하나 이상의 투여에 있어서 투여될 수 있다. 본 발명의 목적을 위해, 유효량의 약물, 화합물, 또는 약학적 조성물은 외과 수술 후 통증, 류마티스 관절염 통증, 및/또는 골관절염 통증을 포함하는 통증의 강도를 치료, 개선, 감소시키고/감소시키거나 이들 통증을 막기에 충분한 양이다. 일부 구체예에서, "유효량"은 휴지의(휴지기 통증) 또는 기계적으로 감소된 통증(움직임 후 통증을 포함), 또는 두가지 모두로 통증을 감소시킬 수 있으며, 그것은 절개, 절단, 찢어짐 또는 상처 전, 중 또는 후에 및/또는 고통스러운 자극 전, 중 또는 후에 투여될 수 있다. 임상적 문맥에서 이해되는 바와 같이, 유효량의 약물, 화합물, 또는 약학적 조성물은 다른 약물, 화합물, 또는 약학적 조성물과 함께 결합으로 이루어질 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다. 따라서, "유효량"은 하나 이상의 치료제를 투여하는 문맥에서 고려될 수 있고, 하나의 제제는 하나 이상의 다른 제제와의 결합에 있어서 바람직한 결과가 존재하거나 달성된다면, 유효량으로 주어지는 것으로 고려될 수 있다.
- [0121] 고통의 "발병률을 감소시키는 것"은 심각성, 지속기간, 및/또는 빈도(예를 들어, 개체 내에서 외과 수술 후 통

증에 대한 시감을 지연시키거나 증가시키는 것을 포함)를 감소시키는 어떤 것(예를 들어, 마취제를 포함하여 이러한 상태에 대하여 일반적으로 사용되는 다른 약물 및/또는 치료법에 대한 필요성 및/또는 양을 감소시키는 것을 포함할 수 있음)을 의미한다. 당업계 숙련자에 의해 이해되는 바와같이, 개체는 치료에 대한 그들의 반응에 있어서 변할 수 있으며, 이처럼, 예를 들어, "개체 내 류마티스 관절염 통증 또는 골관절염 통증의 발병률을 감소시키는 방법"은 합당한 가능성을 기초로 하여 항-NGF 길항제 항체를 투여하는 것을 나타내는데, 이러한 투여는 특정 개체 내 발병률의 감소를 야기할 수 있다.

[0122] 통증 또는 통증(예를 들어 류마티스 관절염 또는 골관절염 통증)의 하나 이상의 증상을 "개선시키는 것"은 항-NGF 길항제 항체를 투여하지 않는 것과 비교하여 통증의 하나 이상의 감소 또는 개선을 의미한다. "개선시키는 것"은 또한 증상의 지속기간의 단축 또는 감소를 포함한다.

[0123] 통증 또는 통증(예를 들어 류마티스 관절염 또는 골관절염 통증)의 하나 이상의 증상을 "완화하는 것"은 본 발명에 따라서 항-NGF 길항제 항체를 이용하여 개체 또는 개체 집단에 있어서 외과 수술 후 통증의 하나 이상의 바람직하지 않은 임상적 징후의 정도를 감소시키는 것을 의미한다.

[0124] 본원에서 사용되는 바와 같이, 통증의 발달을 "미루는 것"은 예를 들어, 외과적 수술 후 통증, 류마티스 관절염 통증, 또는 골관절염 통증과 같은 통증의 진행을 유예, 지체, 감속, 지체, 안정화, 및/또는 연기하는 것을 의미한다. 이러한 연기는 병의 히스토리 및/또는 치료되는 개체에 따라서, 시간의 길이가 달라질 수 있다. 당업계 숙련자에게 명백한 바와 같이, 충분한 또는 상당한 지연은 요컨대, 개체가 통증을 진행시키지 않는다는 면에서, 방해할 수 있다. 증상의 발달을 "지연하는" 방법은 상기 방법을 이용하지 않는 것과 비교할 때, 주어진 시간 프레임 내에 증상이 발전할 가능성을 감소시키고 및/또는 주어진 시간 프레임 내에 증상의 정도를 감소시키는 방법이다. 이러한 비교는 전형적으로 통계적으로 상당수의 피험체를 이용하는 임상적 연구를 기초로 한다.

[0125] 본원에서 사용되는 바와 같이 "통증"은 급성 및 만성 통증, 및 염증 성분을 갖는 어떤 통증을 포함하는 어떤 병인의 통증을 나타낸다. 통증의 예는 외과적 수술 후 통증, 수술 후 통증(치과 통증 포함), 편두통, 두통 및 삼차신경통, 화상, 상처 또는 신장 결석과 관련한 통증, 외상(외상의 뇌손상 포함)과 관련한 통증, 신경병증 통증, 예를 들어 류마티스 관절염, 골관절염, 강직 척추염, 음성혈청(비-류마티스) 관절염, 비-관절 류마티즘 및 관절주위 질환과 관련한 통증, 및 암("돌발성 통증" 및 말기 암과 관련한 통증을 포함), 말초 신경병증 및 대상포진 후 신경통과 관련한 통증을 포함한다. 염증 성분을 갖는 통증의 예는(상기 설명되는 것의 몇몇에 추가적으로) 류마티즘 통증, 점막염과 관련한 통증, 및 월경통을 포함한다.

[0126] "외과 수술 후 통증"(호환적으로 "절개 후" 또는 "외상성 통증 후"라 칭함)은 예를 들어, 절단, 구멍, 절개, 찢어짐, 또는 상처와 같은 외부적 외상으로부터 개체의 조직으로 발생하거나 기인하는 통증을 나타낸다(침입성 또는 비침입성의 모든 외과적 수술 과정으로부터 발생하는 것을 포함). 본원에서 사용되는 바와 같이, 외과 수술 후 통증은 외부적인 물리적 외상 없이 발생하는(일어나거나 기인하는) 통증을 포함하지 않는다. 일부 구체예에서, 외과 수술 후 통증은 내부 또는 외부적(주변 포함) 통증이며, 상처, 절단, 외상, 찢어짐 또는 절개는 우연히(외상의 상처와 같은 것) 또는 고의적으로(외과 수술적 절개와 같은 것) 발생할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "통증"은 통각 및 통증의 감각을 포함하며, 통증은 통증 점수 및 당업계 주지된 다른 방법을 이용하여 객관적 및 주관적으로 평가될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 외과 수술 후 통증은 무해자극통증(즉, 통상적으로 유해하지 않은 자극에 대하여 증가된 반응) 및 통각과민(즉, 통상적으로 유해하거나 불쾌한 자극에 대하여 증가된 반응)을 포함하는데, 이것은 천연에서 차례로 열적 또는 물리적(촉감)일 수 있다. 일부 구체예에서, 통증은 열적 민감성, 물리적 민감성 및/또는 휴지 통증으로 특성화된다. 일부 구체예에서 외과 수술 후 통증은 물리적으로 감소된 통증 또는 휴지 통증을 포함한다. 다른 구체예에서, 외과 수술 후 통증은 휴지 통증을 포함한다. 통증은 당업계 주지되어 있는 바와 같이 1차 또는 2차 통증일 수 있다.

[0127] "생물학적 샘플"은 개체로부터 얻은 각종 샘플 타입을 포함하며 진단상의 또는 모니터링 분석법에서 사용될 수 있다. 상기 정의는 혈액 및 다른 액체 샘플의 생물학적 기원, 생검 표본과 같은 고체 조직 샘플 또는 그들로부터 유도된 조직 배양 또는 세포, 및 그것의 자손을 포함한다. 상기 정의는 그들을 획득한 후 어떤 방법으로 조각된 샘플을 포함하는데, 예를 들어 시약, 용해화, 또는 단백질이나 폴리뉴클레오티드와 같은 특정 성분의 풍부함을 이용하는 처리, 또는 절단 목적으로 반고형 또는 고형 매트릭스에 끼워 넣는 처리에 의한다. 용어 "생물학적 샘플"은 임상적 샘플을 포함하고, 또한 배양액, 세포 상청액, 세포 용해질, 혈청, 혈장, 생물학적 유체, 및 조직 샘플 내에 세포를 포함한다.

[0128] "개체"는 척추동물, 바람직하게는 포유동물, 더 바람직하게는 인간이다. 포유동물은 이에 한정되지는 않지만, 사육 동물(예를 들어, 소), 변종(sport) 동물, 애완동물(예를 들어, 고양이, 개 및 말), 영장류, 마우스 및 랫

트를 포함한다.

[0129] 본원에서 사용되는 바와 같이, "벡터"는 숙주 세포 내에서 관심있는 하나 이상의 유전자(들) 또는 서열(들)을 전달할 수 있고, 바람직하게는 발현시킬 수 있는 구조를 의미한다. 벡터의 예는 이에 한정되지는 않지만, 바이러스 벡터, 나출된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 플라스미드, 코스미드 또는 파지 벡터, 양이온 응축 제제와 결합된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 리포솜에서 캡슐화 된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 및 생산자(producer) 세포와 같은 특정 진핵세포를 포함한다.

[0130] 본원에서 사용되는 바와 같이, "발현 억제 서열"은 핵산의 전사를 지시하는 핵산 서열을 의미한다. 발현 억제 서열은 구조적 또는 유도성 프로모터와 같은 프로모터, 또는 인핸서일 수 있다. 발현 억제 서열은 전사되기 위해 핵산 서열에 작동적으로 연결된다.

[0131] 본원에서 사용되는 바와 같이, "약학적으로 허용가능한 담체"는 활성 성분과 결합되는 경우, 상기 성분이 생물학적 활성을 보유하도록 허용하고 개체의 면역계과 반응하지 않는 어떤 물질을 포함한다. 예는 이에 한정되지는 않지만, 예를 들어 인산염 완충 식염수 용액, 물, 오일/물 에멀전과 같은 에멀전, 및 각종 유형의 습윤제와 같은 임의의 표준 약학적 담체를 포함한다. 에어로졸 또는 비경구 투여를 위한 바람직한 희석액은 인산염 완충 식염수 또는 규정(0.9%) 식염수이다. 이러한 담체를 포함하는 조성물은 주지된 전통적인 방법에 의해 제형될 수 있다(예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; 및 Remington, The Science 및 Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000] 참조).

[0132] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 " K_{off} "는 항원/항체 복합체로부터 항체의 분리에 대한 오프 속도 상수를 나타내도록 의도된다.

[0133] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 " K_d "는 항체-항원 상호작용의 분리 상수에 대하여 나타내도록 의도된다.

[0134] **항체 E3, E3-유도된 항체, 조성물, 및 그것의 사용 방법**

[0135] **E3 조성물, E3 유도된 조성물, 및 상기 조성물을 제조하는 방법**

[0136] 본 발명은 E3 항체 또는 폴리펩티드를 포함하는 약학적 조성물; 및 E3 항체 또는 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물을 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 조성물은 NGF, 및/또는 NGF에 결합하는 하나 이상의 항체 또는 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 이들 조성물은 당업계 주지되어 있는 완충액을 포함하는 약학적으로 허용가능한 부형제와 같은 적합한 부형제를 더 포함할 수도 있다.

[0137] 본 발명은 또한 단리된 항체, 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드 구체예를 포함한다. 본 발명은 또한 실질적으로 순수한 항체, 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드 구체예를 포함한다.

[0138] 본 발명의 항체 및 폴리펩티드는 다음 특징 중 임의의 것(하나 이상)에 의해 특성화된다: (a) NGF에 결합하는 능력; (b) NGF 신호에 의해 매개되는 NGF 생물학적 활성 및/또는 다운스트림 경로(들)를 감소 및/또는 억제하는 능력; (c) 마우스 E13.5 삼차신경 뉴런의 NGF-의존성 생존을 감소 및/또는 억제하는 능력; (d) NT3, NT4/5, 및/또는 BDNF에 대한 중요한 교차반응의 부재; (e) 통증(외과 수술 후 통증 포함)을 치료 및/또는 예방하는 능력; (f) NGF의 제거를 증가시키는 능력; (g) 예로써, 키나제 수용체 활성화 분석법(KIRA)(미국 특허 제 6,027,927 참조)을 이용하여 검출되는 바와 같이, trkA 수용체의 활성화를 감소 또는 억제하는 능력.

[0139] 높은 친화성 및 낮은 분리 동역학으로 인간 NGF에 결합하는 항체 E3의 결합 특성이 부모 무린 항-NF 단일클론 항체 911과 비교하여, 하기에 요약된다. E3는 부모 마우스 항체 911 보다 약 50배 더 높은 결합 친화성으로 인간 NGF에 결합한다.

항체	K_D	K_{off}	K_{on}
911(Fab)	3.7 nM	$9 \times 10^{-5} s^{-1}$	$2.2 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$
E3(Fab)	0.07 nM	$<4 \times 10^{-5} s^{-1}$	$6 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$

[0140]

[0141] E3 항체 및 관련 항체는 또한 생체 외 분석법(실시예 2 및 3 참조)에 의해 평가되는 바와 같이, 인간 NGF를 길항하기 위한 강한 능력을 나타낸다. 예를 들어, 항체 E3는 15 pM의 인간 NGF의 존재하에서 약 21 pM, 및 1.5 pM

의 인간 NGF의 존재하에서 약 1.2 pM의 IC50에서 마우스 E13 삼차신경 뉴런의 NGF-의존성 생존을 길항한다.

[0142] 따라서, 다른 양태에서, 본 발명의 항체 및 폴리펩티드는 다음에 의해 더 동정되고 특성화된다: (h) 낮은 분리 동역학을 갖는 인간 NGF에 대한 높은 친화성 결합(일부 구체예에서, 약 2 nM 이하의 K_D , 및/또는 약 $6 \times 10^{-5} s^{-1}$ 이하의 k_{off} 를 가짐) 및/또는 (i) 약 100 pM 또는 약 15 pM 이하의 NGF(일부 구체예에서, 인간 NGF)의 IC50 및/또는 약 20 pM 또는 약 1.5 pM 이하의 NGF의 IC50을 갖는 마우스 E13.5 삼차신경 뉴런의 NGF-의존성 생존을 억제(차단)하는 능력.

[0143] 일부 구체예에서, 항체는 인간 NGF에 결합하며, 다른 척추동물 중(일부 구체예에서, 포유 동물)으로부터의 NGF에 두드러지게 결합하지 않는다. 일부 구체예에서, 항체는 다른 척추동물 중(일부 구체예에서, 포유 동물)으로부터의 하나 이상의 NGF 뿐만 아니라 인간 NGF에 결합한다. 또 다른 구체예에서, 항체는 NGF에 결합하며 다른 뉴로트로핀(예를 들어 관련 뉴로트로핀, NT3, NT4/5, 및/또는 BDNF)과 두드러지게 교차반응하지 않는다. 일부 구체예에서, 항체는 적어도 하나의 다른 뉴로트로핀 뿐만 아니라 NGF에 결합한다. 일부 구체예에서, 항체는 말 또는 개와 같은 포유동물 중의 NGF에 결합하지만, 다른 포유동물 중으로부터의 NGF에 두드러지게 결합하지 않는다.

[0144] 일부 구체예에서, 본 발명은 기탁 번호 ATCC 제 PTA-4893 또는 ATCC 제 PTA-4894를 갖는 숙주 세포에 의해 생산되는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 경쇄를 포함하는 항체이다. 다른 양태에서, 본 발명은 기탁 번호 ATCC 제 PTA-4895호를 갖는 숙주 세포에 의해 생산되는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 중쇄를 포함하는 항체이다. 본 발명은 또한 E3 및 등가물의 항체 단편(Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc 등), 단일 사슬(ScFv), 그것의 돌연변이, 항체 부분을 포함하는 융합 단백질, 및 필요한 특이성의 항원(NGF) 인식 부위를 포함하는 임의의 다른 변형된 구조의 E3의 각종 조성물을 포함한다. E3의 항체 및 폴리펩티드 단편(항체일 수도 있고 아닐 수도 있음)을 포함하는 E3의 등가물의 항체, 및 E3의 폴리펩티드 단편을 포함하는 폴리펩티드가 상기 설명되는 어떤(하나 이상) 기준에 의해 동정되고 특성화된다.

[0145] 따라서, 본 발명은 다음 중 어떤 것, 또는 다음 중 어떤 것을 포함하는 조성물(약학적 조성물 포함)을 제공한다: (a) 항체 E3; (b) 항체 E3의 단편 또는 부위; (c) 도 1B에 나타내는 바와 같이 항체 E3의 경쇄; (c) 도 1A에 나타내는 바와 같이 항체 E3의 중쇄; (d) 항체 E3의 경쇄 및/또는 중쇄로부터의 하나 이상의 가변 영역(들); (e) 도 1A 및 1B에서 나타난 항체 E3의 하나 이상의 CDR(1, 2, 3, 4, 5 또는 6 CDR); (f) 도 1A에 나타난 바와 같이 항체 E3의 중쇄로부터의 CDR H3; (g) 도 1B에서 나타난 항체 E3의 경쇄로부터의 CDR L3; (h) 도 1B에서 나타난 항체 E3의 경쇄로부터의 3개의 CDR; (i) 도 1A에서 나타난 항체 E3의 중쇄로부터의 2개의 CDR; (j) 도 1A 및 1B에서 나타난 항체 E3의 경쇄로부터의 3개의 CDR 및 중쇄로부터의 3개의 CDR; 및 (k) (b) 내지 (j) 중 임의의 하나를 포함하는 항체. 본원에서 설명으로부터 명백한 바와 같이, 본 발명은 마우스 단일클론 항체 911의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드 구체예를 특히 배제시킨다. Mab 911의 확장된 CDR 서열은 도 1A 및 1B, 및 SEQ ID NO:9-14에 나타난다.

[0146] 항체 E3의 CDR 부분(Chothia 및 Kabat CDR 포함)은 도 1A 및 1B에서 극명하게 묘사되고, 다음 아미노산 서열로 구성된다: (a) 중쇄 CDR 1("CDR H1") GFSLIGYDLN(SEQ ID NO:3); (b) 중쇄 CDR 2 ("CDR H2") IIVGDTTIDYNSAVKS(SEQ ID NO:4); (c) 중쇄 CDR 3("CDR H3")GGYWYATSYFDY(SEQ ID NO:5); (d) 경쇄 CDR 1 ("CDR L1")RASQISNNLN(SEQ ID NO:6); (e) 경쇄 CDR 2("CDR L2")YTSRFHS(SEQ ID NO:7); 및 (f) 경쇄 CDR 3("CDR L3")QQEHTLPYT(SEQ ID NO:8). CDR 영역의 결정은 당업계의 기술에 속한다. 일부 구체예에서, CDR은 Kabat 및 Chothia CDR(또한 "조합된 CDR" 또는 "연장된 CDR"이라 칭함)의 조합일 수 있다는 것이 이해된다. 일부 구체예에서, CDR은 Kabat CDR을 포함한다. 일부 구체예에서, CDR은 Chothia CDR이다.

[0147] 일부 구체예에서, 본 발명은 E3의 적어도 1개의 CDR, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 CDR에 실질적으로 동일한 적어도 하나의 CDR을 포함하는 항체를 제공한다. (또는, 일부 구체예에서 모든 E3의 6개의 CDR에 동일하거나, 또는 E3로부터 유도됨). 다른 구체예는 E3의 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 CDR과 실질적으로 동일하거나 E3로부터 유도된 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 CDR을 갖는 항체를 포함한다. 이 발명의 목적을 위해, 결합 특이성 및/또는 전반적인 활성(통증을 치료 및/또는 예방하거나 E13.5 마우스 삼차신경 뉴런의 NGF-의존성 생존을 억제하는 것에 관련할 수 있음)은 비록 활성의 정도가 E3에 비교하여 다양할 수 있지만(더 크거나 더 작을 수 있음) 일반적으로 유지된다는 것이 이해된다.

[0148] 본 발명은 또한 다음 중 임의의 것을 갖는 E3의 아미노산 서열(도 1A 및 1B에서 나타냄)을 포함하는 폴리펩티드(항체일 수도 또는 항체가 아닐 수도 있음)를 제공한다: E3에 대한 적어도 5개의 인접 아미노산, 적어도 8개의

인접 아미노산, 적어도 약 10개의 인접 아미노산, 적어도 약 15개의 인접 아미노산, 적어도 약 20개의 인접 아미노산, 적어도 약 25개의 인접 아미노산, 적어도 약 30개의 인접 아미노산 서열로서, 이 때 적어도 3개의 아미노산은 E3의 가변 영역으로부터이며, 마우스 단일클론 항체, 911의 아미노산 서열에 동일한 아미노산 서열로 구성되는 구체에는 특히 배제된다는 것이 이해된다. Mab 911 확장된 CDR 서열은 도 1A 및 1B, 및 SEQ ID NO:9-14에서 나타난다. 한 구체예에서, 가변 영역은 E3의 경쇄로부터 온다. 다른 구체예에서, 가변 영역은 E3의 중쇄로부터 온다. 다른 구체예에서, 5(또는 그 이상)개의 인접 아미노산은 도 1A 및 1B에서 나타난 E3의 상보성 결정 부위(CDR)로부터 온다.

[0149] 다른 구체예에서, 본 발명은 다음 중 임의의 것을 갖는 E3의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다: E3에 대한 적어도 10개의 인접 아미노산, 적어도 약 15개의 인접 아미노산, 적어도 약 20개의 인접 아미노산, 적어도 약 25개의 인접 아미노산, 적어도 약 30개의 인접 아미노산의 서열로서, 이 때 E3 서열은 다음 중 하나 이상의 임의의 것을 포함하는데: CDRH1의 아미노산 잔기 L29, CDRH2의 I50, CDRH3의 W101, 및/또는 CDRH3의 A103; 및/또는 CDRL1의 아미노산 잔기 S28, CDRL1의 N32, CDRL2의 T51, CDRL3의 91E 및/또는 CDRL3의 H92, 마우스 단일클론 항체, 911의 아미노산 서열에 동일한 아미노산 서열로 이루어진 구체에는 특히 배제된다는 것이 이해된다.

[0150] 본 개시를 통하여 명백한 바와 같이, 순차적 아미노산 넘버링 계획은 가변 영역의 아미노산 잔기를 나타내는데 사용된다(즉, 각 가변 영역의 아미노산 서열은 순차적으로 넘버링된다). 당업계 주지되어 있는 바와 같이, Kabat 및/또는 Chothia 넘버링 시스템은 예를 들어 E3 항체 및 E3 변이체(또는 E3 변이체로 존재하는 것으로 추측되는 폴리펩티드)와 같은 2개의 항체 또는 폴리펩티드를 비교하는 경우 유용하다. 순차적 넘버링을 Chothia 및/또는 Kabat 넘버링으로 전환하는 방법, 원한다면, 예를 들어, E3 및 다른 폴리펩티드 간을 비교함에 있어서의 이용이 당업계에서 잘 이해된다. 도 23은 순차적, Chothia 및 Kabat 넘버링을 이용하여 넘버링 된 E3 가변 영역을 묘사한다. 또한, 비교를 용이하게 하게 위해, 일반적으로 외곽구조 잔기가 일반적으로, 그러나 항상 그렇지는 않지만, 대략 동일한 수의 잔기를 가지는 것이 이해된다. 그러나, CDR은 크기가 다양할 수 있다(즉, 하나 이상의 아미노산 잔기의 삽입 및/또는 결실을 갖는 것이 가능하다). E3 항체 및 후보물질 E3 변이체를 비교하는 경우(예를 들어, 정렬된 항체 E3의 서열에 있어서 더 긴 후보물질 서열로부터의 CDR 영역의 경우), 하나는 다음 단계를 따를 수 있다(비록 다른 방법이 당업계 공지이지만). 후보물질 항체 서열은 E3 항체 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로 배열된다. 정렬은 수동으로, 또는 통상 허용되는 컴퓨터 프로그램을 이용하여 컴퓨터로 수행될 수 있다. 정렬은 대부분의 Fab 서열에 공통인 어떤 아미노산 서열 잔기를 이용함으로써 용이해질 수 있다. 예를 들어, 경쇄 및 중쇄 각각은 전형적으로 두개의 시스테인을 가지며, 이것은 종종 보존된 위치에서 발견된다. 후보물질 변이체 항체의 아미노산 서열은 더 길 수도(즉, 삽입된 아미노산 잔기를 가짐) 또는 더 짧을 수도(즉, 결실된 아미노산 잔기를 가짐) 있음이 이해된다. 추가적 잔기 예를 들어, 잔기 34 abc의 삽입을 나타내기 위해 잔기 넘버에 첨가물이 첨가될 수 있다. 예를 들어, 잔기 33 및 35에 대한 E3 서열을 갖는 정렬, 그러나 잔기 35를 갖는 정렬에 그들 사이에 잔기가 없는 후보물질 서열에 관하여, 잔기 35는 잔기에 단순히 할당되지 않는다. 다른 접근에 있어서, CDR의 상이한 길이를 비교하는 경우 비교는 구조적 등가물(예를 들어, 항원-항체 복합체에 있어서 동일한 위치)의 아미노산 사이에서 이루어질 수 있음이 일반적으로 주지되어 있다. 예를 들어, Chothia 넘버링 (Al-Lazikani et al, 상기 인용)은 일반적으로(그러나 모든 경우에 그러하지는 않음), 구조적으로 정확한 위치에 삽입 및 결실을 놓는다. 구조적 등가물은 또한 X-레이 결정학 또는 이중 돌연변이 사이클 분석법을 이용하여 추론되거나 실증될 수 있다(문헌[Pons et al. (1999) Prot. Sci. 8:958-968] 참조).

[0151] NGF(예를 들어 hNGF)에 대한 항-NGF 항체의 결합 친화성은 약 0.10 내지 약 0.80 nM, 약 0.15 내지 약 0.75 nM 및 약 0.18 내지 약 0.72 nM이다. 일부 구체예에서, 결합 친화성은 약 2 pM, 약 5 pM, 약 10 pM, 약 15 pM, 약 20 pM, 약 40 pM, 또는 약 40 pM 이상이다. 한 구체예에서, 결합 친화성은 약 2 pM 내지 22 pM이다. 다른 구체예에서, 결합 친화성은 약 10 nM, 약 5 nM, 약 4 nM, 약 3.5nM, 약 3nM, 약 2.5 nM, 약 2 nM, 약 1.5nM, 약 1nM, 약 900 pM, 약 800 pM, 약 700 pM, 약 600 pM, 약 500 pM, 약 400 pM, about 300 pM, 약 200 pM, 약 150 pM, 약 100 pM, 약 90 pM, 약 80 pM, 약 70 pM, 약 60 pM, 약 50 pM, 약 40 pM, 약 30 pM, 약 10 pM이다. 일부 구체예에서, 결합 친화성은 약 10 nM이다. 다른 구체예에서, 결합 친화성은 약 10 nM 이하이다. 다른 구체예에서, 결합 친화성은 약 0.1nM 또는 약 0.07 nM이다. 다른 구체예에서, 결합 친화성은 약 0.1 nM 이하 또는 약 0.07 nM 이하이다. 다른 구체예에서, 결합 친화성은 약 10nM, 약 5nM, 약 4 nM, 약 3.5nM, 약 3 nM, 약 2.5nM, 약 2 nM, 약 1.5 nM, 약 1 nM, 약 900 pM, 약 800 pM, bout 700 pM, 약 600 pM, 약 500 pM, 약 400 pM, 약 300 pM, 약 200 pM, 약 150 pM, 약 100 pM, 약 90 pM, 약 80 pM, 약 70 pM, 약 60 pM, 약 50 pM, 약 40 pM, 약 30 pM, 임의의 약 2 pM에 대하여 약 10 pM, 약 5 pM, 약 10 pM, 약 15 pM, 약 20 pM, 또는 약 40 pM 중 임의의 것이다. 일부 구체예에서, 결합 친화성은 약 10nM, 약 5nM, 약 4 nM, 약 3.5nM, 약 3nM, 약 2.5

nM, 약 2nM, 약 1.5 nM, 약 1nM, 약 900 pM, 약 800 pM, 약 700 pM, 약 600 pM, 약 500 pM, 약 400 pM, 약 300 pM, 약 200 pM, 약 150 pM, 약 100 pM, 약 90 pM, 약 80 pM, 약 70 pM, 약 60 pM, 약 50 pM, 약 40 pM, 약 30 pM, 약 10 pM 중 임의의 것이다. 또 다른 구체예에서, 결합 친화성은 약 2 pM, 약 5 pM, 약 10 pM, 약 15 pM, 약 20 pM, 약 40 pM, 또는 약 40 pM 이상이다.

[0152] NGF에 대한 항체의 결합 친화성은 당업계 주지의 방법을 이용하여 결정될 수 있다. NGF에 대한 항체의 결합 친화성을 결정하는 한 방법은 실시예에서 설명되는 바와 같이, 항체의 단일 기능의 Fab 단편의 친화성을 측정함에 의한다. 단일 기능Fab 단편을 얻기 위해, 항체(예를 들어, IgG)는 파판인으로 절단도리 수 있거나 재조합으로 발현될 수 있다. 항체의 항-NGF Fab 단편의 친화성은 실시예에서 설명되는 바와 같이, 표면 플라즈몬 공명 (BIAcore3000™ 표면 공명(SPR) 시스템, BIAcore, INC, Piscaway NJ)에 의해 결정될 수 있다. 이러한 프로토콜은 예를 들어, 관련 뉴로트로핀 NT3, NT4/5, 및/또는 BDNF와 같은 다른 뉴로트로핀의 이용 뿐만 아니라, 인간 NGF, 다른 척추동물(일부 구체예에서, 포유동물)(예를 들어, 마우스 NGF, 랫트 NGF, 영장류 NGF)의 NGF를 포함하는 어떤 종의 NGF에 대한 항체의 결합 친화성을 결정함에 있어서 이용상 적합하다.

[0153] 일부 구체예에서, 본 발명의 항체 또는 펩티드는 약 200 pM, 150 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 20 pM, 10 pM, 또는 그 이하 중 임의의 IC50을 갖는(NGF의 약 15 pM의 존재하에서) 마우스 E13.5 삼차신경 뉴런의 인간 NGF-의존성 생존을 억제(감소, 및/또는 차단)할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 항체 또는 펩티드는 약 50 pM, 40 pM, 30 pM, 10 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, 2 pM, 1 pM, 또는 그 이하 중 임의의 IC50을 갖는 (NGF의 약 15 pM의 존재하에서) 마우스 E13.5 삼차신경 뉴런의 인간 NGF-의존성 생존을 억제(감소, 및/또는 차단)할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 항체 또는 펩티드는 약 150 pM, 125 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 30 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, 또는 그 이하 중 임의의 IC50을 갖는 (NGF의 약 15 pM의 존재하에서) 마우스 E13.5 삼차신경 뉴런의 인간 NGF-의존성 생존을 억제(감소, 및/또는 차단)할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 항체 또는 펩티드는 약 30 pM, 25 pM, 20 pM, 15 pM, 10 pM, 5 pM, 4 pM, 3 pM, 2 pM, 1 pM, 또는 그 이하 중 임의의 IC50을 갖는 (NGF의 약 15 pM의 존재하에서) 마우스 E13.5 삼차신경 뉴런의 인간 NGF-의존성 생존을 억제(감소, 및/또는 차단)할 수 있다. 마우스 E13 삼차신경 뉴런의 NGF-의존성 생존의 측정을 위한 방법은 당업계 공지되어 있으며, 예로써, 실시예 2에서 설명되어 있다.

[0154] 본 발명은 또한 임의의 이들 항체 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명의 항체는 당업계에 공지된 방법에 의해 제조될 수 있으며, 그들의 일부가 실시예에서 설명된다. 폴리펩티드는 상기 설명되는 바와 같이 재조합 방법(즉, 단일 또는 융합 폴리펩티드)에 의해 또는 화학적 합성에 의해, 항체의 단백질 가수분해 또는 그 밖의 분해에 의해 생산될 수 있다. 항체의 폴리펩티드, 특히 약 50 아미노산에 이르는 더 짧은 폴리펩티드가 화학적 합성에 의해 편리하게 제조된다. 화학적 합성의 방법은 당업계 공지되어 있으며 시중구매 가능하다. 예를 들어, E3 항체는 고체상 방법을 사용하여 자동화된 폴리펩티드 합성기로 생산될 수 있다. 또한, 미국 특허 제 5,807,715; 4,816,567 ; 및 6,331,415를 참조하시오. 키메라 또는 하이브리드 항체가 또한 교차 연관 제제를 수반하는 것들을 포함하여 합성 단백질 화학의 공지된 방법을 이용하여 시험관 내에서 제조될 수 있다. 예를 들어, 면역독소가 이황화 교환 반응을 이용하거나 티오에테르 결합을 형성함으로써 구조될 수 있다. 이러한 목적을 위해 적합한 시약의 예는 이미노티올레이트 및 메틸-4-메르캅토부티리미데이트를 포함한다.

[0155] 다른 대안에 있어서, 항체는 당업계 주지되어 있는 과정을 이용하여 재조합으로 제조될 수 있다. 한 구체예에서, 항체 E3의 가변 영역 및 경쇄 영역을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드(도 1A 및 1B에서 나타냄)는 숙주 세포(예를 들어, CHO 세포)에서 발현 또는 증식을 위하여 벡터 내로 클로닝된다. 다른 구체예에서, 도 2 및 3에서 나타낸 폴리뉴클레오티드 서열은 발현 또는 증식을 위해 하나 이상의 벡터 내로 클로닝된다. 관심있는 항체를 코딩하는 서열은 숙주 세포의 벡터 내에 유지될 수 있으며 그 후 숙주 세포는 장래의 사용을 위해 팽창 및 냉동될 수 있다. 벡터(발현 벡터 포함) 및 숙주 세포가 본원에서 더 설명된다. 식물이나 우유 내에서 재조합으로 항체를 발현시키는 방법이 개시됐다. 예를 들어, 문헌[Peeters et al. (2001) Vaccine 19: 2756; Lonberg, N. and D. Huszar (1995) Int. Rev. Immunol 13:65 ; and Pollock et al.(1999) J Immunol Methods 231: 147]을 참조하시오. 예로써 인간화 된 단일 사슬 등의 항체의 유도체를 제조하는 방법이 당업계 공지되어 있다.

[0156] 본 발명은 또한 E3와 같은 본 발명의 항체의 단일 사슬 가변 영역 단("scFv")을 1마한다. 단일 사슬 가변 단편은 짧은 연결 펩티드를 사용하여 경쇄 및/또는 중쇄 가변 영역을 연결함으로써 제조된다. 문헌[Bird et al.(1988) Science 242: 423-426]. 연결 펩티드의 예는 (GGGG)3(SEQ ID NO:15)이며, 이것은 한 가변 영역의 카르복시 말단과 나머지 가변 영역의 아미노 말단 사이에서 약 3.5 nm를 연결한다. 다른 서열의 링커가 지정되

고 사용된다(Bird et al.(1988)). 링커는 추가적 기능을 위해 차례로 변형될 수 있는데, 예를 들어 약물의 부착이나 고형 지지체에 대한 부착과 같은 것이다. 단일 사슬 변이체는 재조합으로 또는 합성적으로 생산될 수 있다. scFv의 항성적 생산을 위해, 자동화 된 합성기가 사용될 수 있다. scFv의 재조합 생산을 위해, scFv를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 적합한 플라즈미드가 예를 들어 효모, 식물, 곤충 또는 포유동물 세포와 같은 진핵생물, 또는 예를 들어 E.Coli와 같은 원핵생물인 적합한 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 관심있는 scFv를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 폴리뉴클레오티드의 리게이션과 같은 통상적인 조작에 의해 제조될 수 있다. 결과물 scFv는 당업계 공지된 표준 단백질 정제 기술을 이용하여 분리될 수 있다.

[0157] 예를 들어 디어바디(diabodies)와 같은 단일 사슬 항체의 다른 형태가 또한 포함된다. 디어바디는 2개의 이특이적(bispecific) 항체로서, VH 및 VL 도메인이 단일 폴리펩티드 사슬 상에서 발현되지만, 링커를 사용하는 것은 동일한 사슬 상에서 두개의 도메인 사이의 짝짓기를 허용하기에는 너무 짧으므로, 상기 도메인을 다른 사슬의 상보성 도메인과 강제로 짝짓기시키고 2개의 항원 결합 부위를 생성한다(예를 들어, 문헌[Holliger, P., et al.(1993) Proc. Natl. Acad Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994)Structure 2 : 1121-1123]참조).

[0158] 상기 항체는 적어도 2개의 상이한 항원에 대한 결합 특이성을 갖는 이특이적 항체, 단일클론 항체일 수 있다. 이특이적 항체는 본원에 개시되는 항체를 이용하여 제조될 수 있다. 이특이적 항체를 제조하는 방법은 당업계 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Suresh et al., 1986, Methods in Enzymology 121: 210] 참조). 전통적으로, 이특이적 항체의 재조합 생산은 상이한 특이성을 갖는 2개의 중쇄와 함께, 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 짝의 공동발현을 기초로 하였다(Millstein and Cuello, 1983, Nature 305,537-539).

[0159] 이특이적 항체를 제조하기 위한 하나의 접근법에 따라서, 소망하던 결합 특이성을 갖는 항체 가변 도메인(항체-항원 결합 부위)이 면역글로불린 불변 도메인 서열로 융합된다. 상기 융합은 바람직하게는 경첩부, CH2 및 CH3 영역의 일부를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인을 포함한다. 적어도 하나의 융합에서 존재하는 경쇄 결합을 위해 필요한 자리를 함유하는 1차 중쇄 불변 영역(CH1)을 갖는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합을 코딩하는 DNA 및, 바람직하다면, 면역글로불린 경쇄가 분리 발현 벡터 내로 삽입되고, 적당한 숙주 유기체 내로 공동 형질감염된다. 이것은 구성에 있어서 사용되는 동일하지 않은 비율의 3개의 폴리펩티드 사슬이 최대 수율을 제공하는 경우 일부 구체예에서 3개의 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조절함에 있어서 대단한 유연성을 제공한다. 그러나, 동일한 비율의 적어도 2개의 폴리펩티드 사슬의 발현이 높은 수율을 가져오거나 상기 비율이 특별한 중대성을 갖지 않을 경우, 하나의 발현 벡터에서 2개 또는 모두 3개의 폴리펩티드 사슬에 대한 코딩 서열을 삽입하는 것이 가능하다.

[0160] 한 접근법에 있어서, 이특이적 항체는 한쪽 팔에 1차 결합 특이성을 갖는 하이브리도 면역글로불린 중쇄, 및 다른 쪽 팔에 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 짝(2차 결합 특이성을 제공함)으로 구성되어 있다. 이특이적 분자의 단지 1/2의 면역글로불린 경쇄를 갖는 비대칭 구조는 원하지 않는 면역글로불린 사슬 조합으로부터 원하던 이특이적 화합물의 분리를 용이하게 한다. 이러한 접근법은 1994년 3월 3일자로 공개된 POT 공개번호 제 WO 94/04690에서 설명된다.

[0161] 두개의 공유결합으로 결합된 항체를 포함하는 이중결합 항체도 본 발명의 범주 내이다. 이러한 항체는 원하지 않는 세포에 대한 표적 면역계(미국 특허 제 4,676,980호), 및 HIV 감염의 치료(PCT 출원 공개번호 제 WO 91/00360 및 WO 92/200373; EP03089)에 대하여 이용되었다. 이중결합 항체는 임의의 편리한 교차-연결 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 적합한 교차-연결 제제 및 기술이 당업계에 주지되어 있으며, 미국 특허 제 4,676,980에 개시된다.

[0162] 항체는 예를 들어 당업계에 공지되고, 본원에서 설명되는 바와 같이 인간화 된 항체일 수도 있다.

[0163] 항체는 1999년 11월 18일자로 공개된 PCT 공개번호 제 WO 99/58572에서 설명되는 바와 같이 변형될 수도 있다. 이들 항체는 표적 분자에서 표적되는 결합 도메인에 더하여, 인간 면역 중쇄의 모든 또는 일부의 불변 도메인에 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 작동자 도메인을 포함한다. 이들 항체는 상당한 보체 의존성 용해, 또는 상기 표적의 세포-매개 파괴를 유발하지 않고서 상기 표적 분자를 결합할 수 있다. 바람직하게는, 작동자 도메인이 특이적으로 FcRn 및/또는 FcγRIIb를 결합할 수 있다. 이들은 전형적으로 두개 이상의 인간 면역 중쇄 CH2 도메인으로부터 유도된 키메라 도메인을 기초로 한다. 이러한 방식으로 변형된 항체가 염증 및 전통적인 항체 치료법에 대한 다른 불리한 반응을 피하기 위해, 만성 항체 치료법의 이용상 바람직하다.

[0164] 본 발명은 그들의 특성에 중대하게 영향을 미치지 않는 기능적으로 동등한 항체 및 향상되거나 감소된 활성을

갖는 변이체를 포함하는 항체 E3의 변형을 1마한다. 폴리펩티드의 변형은 당업계에 일상적인 실행이며 실시예에서 더 실증된다. 변형된 폴리펩티드의 예는 아미노산 잔기의 치환(보존적 치환을 포함), 또는 기능적 활성을 심각하게 해롭게 변화시키지 않는 아미노산의 하나 이상의 결실 또는 첨가를 갖는 폴리펩티드, 또는 화학적 유사체의 이용을 포함한다.

[0165] 본원에서 사용되는 바와 같이, 폴리펩티드 "변이체"는 하나 이상의 치환, 결실, 첨가 및/또는 삽입의 면에서 본래의 단백질과 다른 폴리펩티드이어서, 상기 폴리펩티드의 면역반응은 실질적으로 감소되지 않는다. 즉, 항원에 특이적으로 결합하는 변이체의 능력은 본래의 단백질에 비하여, 향상되거나 불변할 수 있고, 또는 본래의 단백질에 비하여 50% 이하, 및 바람직하게는 20% 이하로 감소될 수 있다. 폴리펩티드 변이체는 바람직하게는 동정된 폴리펩티드에 대하여 적어도 약 80%, 더 바람직하게는 적어도 약 90% 및 가장 바람직하게는 적어도 약 95% 동일성(본원에서 설명되는 바와 같이 결정된 것)을 보인다.

[0166] 항체의 아미노산 서열 변이체는 상기 항체 DNA 내로 적절한 뉴클레오티드 변화를 도입함으로써, 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. 이러한 변이체는 예를 들어, 본원에서 설명되는 SEQ ID NO:1 또는 2의 아미노산 서열 내 잔기로부터의 결실, 및/또는 잔기로의 삽입 및/또는 잔기의 치환을 포함한다. 결실, 삽입, 및 치환의 임의의 조합이 최종 구조에 이르기 위해 이루어지되, 단 최종 구조는 원하던 특성을 지닌다. 아미노산 변화는 또한 예를 들어 글리코실화 자리의 수 또는 위치를 변화시키는 것과 같이, 항체의 전사 후 과정을 변경할 수도 있다.

[0167] 돌연변이유발 또는 변형을 위한 바람직한 위치인 항체의 특정 잔기 또는 영역의 동정을 위한 유용한 방법을 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"이라 칭하며, 문헌[Cunningham and Wells, 1989, Science, 244: 1081-1085]에 의해 설명된다. 잔기 또는 표적 잔기의 기를 동정하고(예를 들어, arg, asp, his, lys, 및 glu와 같은 변화된 잔기) 중성 또는 음전하로 하전된 아미노산(가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 치환시켜서 아미노산과 항원의 상호작용에 영향을 준다. 그 후 치환에 대한 기능적 민감성을 보이는 그들 아미노산 위치를 치환의 자리에서, 또는 치환의 자리에 대하여 추가의 또는 다른 변이체를 도입함으로써 정련시킨다. 따라서, 아미노산 서열 변이체를 도입하기 위한 자리를 결정하는 동안에, 돌연변이의 성질 그 자체를 미리 결정할 필요는 없다. 예를 들어, 주어진 자리에서 돌연변이의 수행을 분석하기 위해, 알라 스캐닝 또는 무작위 돌연변이유발이 표적 코돈이나 영역에서 수행되며 발현된 항체 변이체가 소망하는 활성에 대하여 스크리닝 된다. 본원에서 설명되는 바와 같이, 라이브러리 스캐닝 돌연변이유발이 또한 돌연변이유발 또는 변형에 적합한 항체의 위치를 확인하는데 사용될 수 있다.

[0168] 아미노산 서열 삽입은 하나의 또는 다수의 아미노산 잔기의 서열 내 삽입 뿐만 아니라, 길이가 하나의 잔기로부터 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드까지의 범위에 이르는 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 포함하는 항체 또는 에피토프 태그에서 융합된 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입의 변이체는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 효소 또는 폴리펩티드의 항체의 N- 또는 C-말단에 대한 융합을 포함한다.

[0169] 치환 변이체는 제거된 항체 분자 내 적어도 하나의 아미노산 잔기 및 그것의 위치에 삽입된 다른 잔기를 가진다. 치환적 돌연변이유발에 대하여 가장 관심있는 자리는 고도가변 영역을 포함하지만, FR 변경 또한 고려된다. 보존적 치환을 제목 "보존적 치환"으로 표 1에서 나타낸다. 이러한 치환이 생물학적 활성의 변화를 야기한다면, 그 후 표 1에서 "전형적인 치환"이라 명명된, 또는 아미노산 분류에 관하여 하기 더 설명되는 바와 같이, 보다 실질적인 변화가 도입될 수 있으며 생산물이 스크리닝 된다.

[0170] 표 1

아미노산 치환

원래의 잔기	보존적 치환	전형적인 치환
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine
Leu (L)	Ile	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine

[0171]

[0172]

항체의 생물학적 특성의 상당한 변형은 (a) 예를 들어, 시트 또는 나선형 구조로서 치환의 지역에서 폴리펩티드 주(backbone)의 구조, (b) 표적 자리에서 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 크기를 유지시키면서 그들의 효과에 있어서 현저하게 다른 치환기를 선택함으로써 달성된다. 천연 발생 잔기는 공통의 측쇄 특성을 기초로 한 그룹으로 분류된다.

[0173]

(1) 소수성: Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0174]

(2) 중성 소수성: Cys, Ser, Thr;

[0175]

(3) 산성: Asp, Glu;

[0176]

(4) 염기성: Asn, Gln, His, Lys, Arg;

[0177]

(5) 사슬 배향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro;

[0178]

(6) 방향성: Trp, Tyr, Phe.

[0179]

비-보존적 치환은 이들 분류 중 하나의 구성원을 다른 분류로 교환함으로써 이루어진다.

[0180]

항체의 적절한 구조를 유지하는 데에 관련되지 않은 임의의 시스테인 잔기는 또한 일반적으로 세린으로 치환될 수 있어서, 분자의 산화 안정성을 향상시키고 이상 교차-연결을 막는다. 반대로, 시스테인 결합(들)이 항체에 첨가되어 항체의 안정성을 향상시킬 수 있으며, 특히 상기 항체는 Fv 단편과 같은 항체 단편이다.

[0181]

아미노산 변형은 예를 들어 가변 영역과 같은 영역의 재설계를 완수하기 위해 하나 이상의 아미노산을 변화시키거나 변형시키기에 이르기까지 다양할 수 있다. 가변 영역의 변화는 결합 친화성 및/또는 특이성을 변경할 수 있다. 일부 구체예에서, 단지 하나에서 5개의 보존적 아미노산 치환이 CDR 도메인 내에서 이루어진다. 다른 구

체에서, 단지 하나에서 3개의 보존적 아미노산 치환이 CDR3 도메인 내에서 이루어진다. 또 다른 구체에서, CDR 도메인은 CDRH3 및/또는 CDR L3이다.

- [0182] 변형은 또한 예를 들어, 상이한 당을 이용한 글리코실화, 아세틸화, 및 인산화와 같은 다른 전사 후 변형을 갖는 폴리펩티드 뿐만 아니라, 글리코실화 및 비글리코실화 된 폴리펩티드를 포함한다. 항체는 그들의 불변 영역의 보존된 위치에서 글리코실화 된다(Jefferis and Lund, 1997, *Chem.Immunol.*65: 111-128; Wright and Morrison, 1997, *TibTECH* 15: 26-32). 면역글로불린의 올리고당 측쇄는 단백질의 기능(Boyd et al., 1996, *Mol. Immunol.* 32: 1311-1318; Wittwe and Howard, 1990, *Biochem.* 29: 4175-4180) 및 글리코단백질의 부분들 간의 분자 내 상호작용에 영향을 주는데, 이것은 글리코단백질의 구조 및 나타낸 3차원 표면에 영향을 줄 수 있다(Hefferis and Lund, 상기 인용; Wyss and Wagner, 1996, *Current Opin. Biotech.* 7: 409-416). 올리고당은 또한 특이적 인지 구조에 기초한 특정 분자에 대하여 주어진 글리코단백질을 표적하기 위한 역할을 할 수 있다. 항체의 글리코실화는 또한 항체-의존성 세포 독성(ADCC)에 영향을 주는 것으로 보고되었다. 특히, GlcNAc 이등분의 형성을 촉매화하는 글리코실트랜스퍼라제인, β (1,4)-N-아세틸글루코사민일트랜스퍼라제 III(GnTIII)의 테트라시클린-조절된 발현을 갖는 CHO 세포는 향상된 ADCC 활성을 갖는 것으로 보고되었다(Umaña et al., 1999, *Mature Biotech.* 17: 176-180).
- [0183] 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결되어 있다. N-연결은 아스파라긴 잔기의 측쇄에 대한 단수화물 부분의 부착을 나타낸다. 트리펩티드는 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌을 서열화하는데, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이며, 아스파라긴 측쇄에 대한 단수화물 부분의 효소적 부착을 위한 인지 서열이다. 따라서, 폴리펩티드 내 이들 트리펩티드 서열의 존재는 장래의 글리코실화 자리를 생성한다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스, 또는 크실로스 중 하나의 히드록시아미노산, 가장 일반적으로 세린 또는 트레오닌에 대한 부착을 나타내며, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신이 사용될 수도 있다.
- [0184] 항체의 글리코실화 자리의 첨가는 아미노산을 변경함으로써 편리하게 완수되어서 그것은 상기 설명된 트리펩티드 서열 중 하나 이상(N-연결된 글리코실화 자리에 대한)을 함유한다. 변경은 또한 원래의 항체의 서열(O-연결된 글리코실화 자리에 대한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 첨가, 또는 치환에 의해 이루어질 수 있다.
- [0185] 항체의 글리코실화 패턴은 또한 기초를 이루는 뉴클레오티드 서열을 변경하지 않고서 변경될 수 있다. 글리코실화는 대체로 항체를 발현하기 위해 사용되는 숙주 세포에 의존적이다. 재조합 글리코단백질의 발현을 위해 사용되는 세포 유형, 예를 들어, 잠재적 치료술로서, 항체는 거의 본래의 세포가 아니기 때문에, 항체의 글리코실화 패턴의 변화가 기대될 수 있다(예를 들어, 문헌[Hse et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 9062-9070] 참조).
- [0186] 숙주 세포의 선택에 더하여, 항체의 재조합체를 생산하는 동안 글리코실화에 영향을 주는 인자는 성장 방식, 배지 제조물, 배양 밀도, 산소공급, pH, 정제 계획 등을 포함한다. 다양한 방법이 올리고당 생산에 관련된 특정 효소를 도입 또는 이상재발현하는 것을 포함하는 특정 숙주 유기체에서 달성된 글리코실화 패턴을 변경하기 위해 제한되었다(미국 특허 제 5,047,335; 5,510,261 및 5,278,299). 글리코실화, 또는 특정 유형의 글리코실화는 예를 들어 엔도글리코시다제 H(Endo H)를 이용하여, 글리코단백질로부터 효소에 의해 제거될 수 있다. 또한, 재조합 숙주 세포는 특정 유형의 다당류를 처리함에 있어서 불완전하게 유전공학적으로 처리될 수 있다. 이들 및 유사한 기술이 당업계 주지되어 있다.
- [0187] 변형의 다른 방법은 이에 한정되지는 않지만, 효소적 수단, 산화 치환 및 킬레이트화를 포함하는 당업계 공지된 커플링 기술을 이용하는 것을 포함한다. 변형은 예를 들어, 면역분석을 위하여 표지의 부착에 관하여 이용될 수 있다. 변형된 E3 폴리펩티드는 당업계에서 확립된 과정을 이용하여 제조되고 당업계 공지된 표준 분석법을 이용하여 스크리닝될 수 있으며, 그 중 일부가 하기 및 실시예에서 설명된다.
- [0188] 다른 항체 변형은 1999년 11월 18일자로 공개된 PCT 공개번호 제 WO 99/58572에서 나타내는 바와 같이 변형된 항체를 포함한다. 이들 항체는 표적 분자에서 표적되는 결합 도메인에 더하여, 인간 면역글로불린 중쇄의 모든 또는 일부의 불변 도메인에 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 작동자 도메인을 포함한다. 이들 항체는 증대한 보체 의존성 용해, 상기 표적의 세포-매개 파괴를 유발하지 않고 표적 분자에 결합할 수 있다. 일부 구체에서, 작동자 도메인은 FcRn 및/또는 Fc γ RIIb에 특이적으로 결합할 수 있다. 이들은 전형적으로 두개 이상의 인간 면역글로불린 중쇄 CH2 도메인으로부터 유도된 키메라 도메인을 기초로 한다. 이러한 방식으로 변형된 항체는 특히 염증 및 전통적 항체 치료법에 대한 다른 불리한 반응을 피하기 위해, 장기간의 항체 요법의 사용 상 특히 적합하다.

- [0189] 본 발명은 또한 본 발명의 항체(예를 들어 E3) 또는 폴리펩티드로부터의 하나 이상의 단편 또는 영역을 포함하는 융합 단백질을 포함한다. 한 구체예에서, 융합 단백질은 도 1B에서 나타낸 가변 경쇄 영역의 적어도 10개의 인접 아미노산 및/또는 도 1A에서 나타낸 가변 중쇄 영역의 적어도 10개의 아미노산을 포함하는 것으로 제공된다. 다른 구체예에서, 융합 폴리펩티드는 도 1A 및 1B에서 나타낸 바와 같이, E3의 경쇄 가변 영역 및/또는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 다른 구체예에서, 융합 폴리펩티드는 E3의 하나 이상의 CDR(들)을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 융합 폴리펩티드는 항체 E3의 CDR H3 및/또는 CDR L3를 포함한다. 다른 구체예에서, 융합 폴리펩티드는 다음 중 임의의 하나 이상을 포함한다: CDRH1의 아미노산 잔기 L29, CDRH2의 IC50, CDRH3의 W101, 및/또는 CDRH3 A103 ; 및/또는 CDRL1의 아미노산 잔기 S28, CDRL1의 N32, CDRL2의 T51, CDRL3의 91E 및/또는 CDRL3의 H92. 본 발명의 목적을 위하여, E3 융합 단백질은 하나 이상의 E3 항체 및 본래의 분자에 부착되지 않은 다른 아미노산 서열, 예를 들어, 다른 영역으로부터의 이종 서열 또는 동종 서열을 함유한다. 전형적인 이종 서열은 이에 한정되지는 않지만, FLAG 태그 또는 6His 태그와 같은 "태그"를 포함한다.
- [0190] E3 융합 폴리펩티드는 당업계 공지된 방법에 의해, 예를 들어 합성적으로 또는 재조합적으로 생성될 수 있다. 전형적으로, 본 발명의 E3 융합 단백질은 본원에서 설명되는 재조합 방법을 이용하여 그들을 코딩하는 발현 폴리뉴클레오티드를 재조합으로써 제작되는으나, 그들은 예로써, 화학적 합성을 포함하는 당업계 공지된 다른 수단에 의해 제조될 수도 있다.
- [0191] 본 발명은 또한 고품 지지체(예를 들어, 비오틴 또는 아비딘과 같은 것)에 대한 커플링을 용이하게 하는 제제에 결합 된(예를 들어, 연결됨) E3 항체 또는 폴리펩티드를 포함하는 조성물을 제공한다. 단순함을 위하여, 이들 방법이 본원에서 설명되는 NGF 결합 구체예의 어떤 것에도 적용된다는 이해 아래, 일반적으로 E3 항체에 대하여 참고로 할 것이다. 결합은 일반적으로 본원에서 사용되는 바와 같은 이들 구성성분들을 연결하는 것을 말한다. 연결(최소한 투여를 근접한 연관으로 이들 구성성분들을 일반적으로 고정하는 것)은 어떤 수의 방법으로 달성될 수 있다. 예를 들어, 제제 및 항체 사이의 직접 작용은 다른 것과 반응할 수 있는 치환기를 각각 지니는 경우 가능하다. 예를 들어, 하나 위의 아미노산 또는 설프히드릴 기와 같은 핵친화성 기는 예를 들어, 무수물이나 산 할로겐화물과 같은 카르보닐-함유 기, 또는 나머지 위에서 양호한 이탈기(예를 들어, 할로겐화물)를 함유하는 알킬 기와 반응할 수도 있다.
- [0192] 본 발명의 항체 또는 폴리펩티드는 예를 들어, 형광성 분자, 방사성 분자 또는 당업계 공지된 임의의 다른 표지와 같은 표지붙이기 제제(택일적으로 "표지"라고 칭함)에 연결될 수 있다. 라벨은 당업계에 공지되어 있는데, 일반적으로 신호를 (직접 또는 간접적으로) 제공한다. 따라서, 본 발명은 표지된 항체 및 폴리펩티드를 포함한다.
- [0193] 예를 들어, NGF에 결합하고, NGF 생물학적 활성을 감소 또는 억제하며, E13.5 마우스 삼차신경 뉴런의 NGF-유도된 생존을 감소 및/또는 차단하는 본 발명의 항체 및 폴리펩티드의 능력이 당업계 공지된 방법을 이용하여 테스트될 수 있고, 그 일부가 실시예에서 기술된다.
- [0194] 본 발명은 또한 항체 E3를 포함하는 조성물(약학적 조성물 포함) 및 키트를 제공하며, 이러한 개시로 인하여 본원에서 설명되는 임의의 또는 모든 항체 및/또는 폴리펩티드를 명백하게 한다.
- [0195] *폴리뉴클레오티드, 벡터 및 숙주 세포*
- [0196] 본 발명은 또한 본 발명의 항체 및 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드(도 1A 및 1B에서 나타낸 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 폴리펩티드 서열을 포함하는 항체를 포함), 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 숙주 세포를 제공한다.
- [0197] 따라서, 본 발명은 다음 중 임의의 것을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하여, 폴리뉴클레오티드(또는 조성물, 약학적 조성물을 포함)를 제공한다: (a) 항체 E3; (b) 항체 E3의 단편 또는 영역; (c) 도 1B에서 나타낸 바와 같이 항체 E3의 경쇄; (d) 도 1A에서 나타내는 바와 같이 항체 E3의 중쇄; (e) 항체 E3의 경쇄 및/또는 중쇄로부터의 하나 이상의 가변 영역; (f) 도 1A 및 1B에서 나타낸 항체 E3의 하나 이상의 CDR(1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 CDR); (g) 도 1A에 나타낸 항체 E3의 중쇄로부터의 CDR H3; (h) 도 1B에서 나타낸 항체 E3의 경쇄로부터의 CDR L3; (i) 도 1B에서 나타낸 항체 E3의 경쇄로부터의 3개의 CDR; (j) 도 1A에 나타낸 항체 E3의 중쇄로부터의 3개의 CDR; (k) 도 1A 및 1B에서 나타낸 항체 E3의 경쇄로부터의 3개의 CDR 및 중쇄로부터의 3개의 CDR; 또는 (l) (b) 내지 (k)의 어떤 것을 포함하는 항체. 일부 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 도 2 및 3에서 나타낸 폴리뉴클레오티드 중 하나 또는 둘 모두를 포함한다.
- [0198] 다른 양태에서, 본 발명은 기탁 번호 ATCC 제 PTA-4893 또는 ATCC 제 PTA- 4894를 갖는 E3 경쇄를 코딩하는 단

리된 폴리뉴클레오티드이다. 다른 양태에서, 본 발명은 기탁 번호 ATCC 제 PTA-4895를 갖는 E3 중쇄에 대하여 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드이다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 (a) 기탁 번호 ATCC 제 PTA-4894를 갖는 폴리뉴클레오티드에서 코딩되는 가변 영역 및 (b) 기탁번호 ATCC 제 PTA-4895호를 갖는 폴리뉴클레오티드에서 코딩되는 가변 영역을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드이다. 다른 양태에서, 본 발명은 (A) 기탁번호 ATCC 제 PTA-4894호를 갖는 폴리뉴클레오티드에서 코딩되는 하나 이상의 CDR; 및/또는 (b) 기탁 번호 ATCC 제 PTA-4895를 갖는 폴리뉴클레오티드에서 코딩되는 하나 이상의 CDR을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드이다.

[0199] 다른 양태에서, 본 발명은 본원에서 설명되는 항체(항체 단편 포함) 및 폴리펩티드 중 어떤 것을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 폴리뉴클레오티드는 당업계 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0200] 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 임의의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물(예를 들어 약학적 조성물)을 제공한다. 일부 구체예에서, 조성물은 본원에서 설명되는 바와 같이 E3 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 포함한다. 다른 구체예에서, 조성물은 본원에서 설명되는 항체 또는 폴리펩티드 중 임의의 것을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 조성물은 도 2 및 3에서 나타난 하나 또는 두개 모두의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 발현 벡터, 및 폴리뉴클레오티드 조성물의 투여가 본원에서 더 설명된다.

[0201] 다른 양태에서, 본 발명은 본원에서 설명되는 폴리뉴클레오티드 중 어떤 것을 제조하는 방법을 제공한다.

[0202] 임의의 이 서열에 상보적인 폴리뉴클레오티드가 또한 본 발명에 포함된다. 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥(코딩 또는 안티센스) 또는 이중 가닥일 수 있으며, DNA(게놈의 cDNA 또는 합성적인) 또는 RNA 분자일 수 있다. RNA 분자는 인트론을 함유하며 일대일 방식으로 DNA 분자에 대응하는 HnRNA 분자, 및 인트론을 함유하지 않는 mRNA 분자를 포함한다. 추가적 코딩 또는 비-코딩 서열은 필요하지는 않지만, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 내에 존재할 수도 있고, 폴리뉴클레오티드는 필요하지는 않지만, 다른 분자 및/또는 지지체 물질에 연결될 수 있다.

[0203] 폴리뉴클레오티드는 본래의 서열(즉, 항체 또는 항체의 일부를 코딩하는 외인성 서열)을 포함할 수 있거나 이러한 서열의 변이체를 포함할 수도 있다. 폴리뉴클레오티드 변이체는 하나 이상의 치환, 첨가, 결실 및/또는 삽입을 함유하여 코딩된 폴리펩티드의 면역반응은 본래의 면역반응 분자에 비하여 감소되지 않는다. 코딩된 폴리펩티드의 면역반응에 대한 영향은 일반적으로 본원에서 설명되는 바와 같이 평가될 수 있다. 변이체는 바람직하게는 본래의 항체 또는 항체의 일부를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에 대하여 적어도 약 70% 동일성, 더 바람직하게는 적어도 약 80% 동일성 및 가장 바람직하게는 적어도 약 90% 동일성을 나타낸다.

[0204] 2개의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열은 2개의 서열 내 뉴클레오티드 또는 아미노산의 서열이 하기 설명되는 바와 같이 최대 일치치를 위하여 정렬되는 경우 동일하다면, "동일한"이라고 말하여 진다. 2개의 서열간의 비교는 전형적으로 서열 유사성의 국부 영역을 동정하고 비교하기 위한 비교 윈도우를 통하여 서열을 비교함으로써 수행된다. 본원에서 사용되는 바와 같이 "비교 윈도우"는 적어도 약 20 인접 위치, 일반적으로 30 내지 약 75, 40 내지 약 50의 분획을 나타내는데, 서열은 2개의 서열이 선택적으로 정렬된 후 인접 위치의 동일한 번호의 참고 서열과 비교될 수 있다.

[0205] 비교를 위한 선택적 정렬은 디플트 파라미터를 이용하는, 라지진 수트 어브 바이오인포매틱스 소프트웨어의 Megalign 프로그램을 이용하여 수행될 수 있다(DNASTAR, Inc., Madison, WI). 이러한 프로그램은 다음의 참고 문헌에서 설명되는 몇가지 정렬 계획을 구체화한다: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins-Matrices for detecting distant relationships. Dayhoff에 있어서, M.O.(ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D. G. and Sharp, P. M., 1989, CABIOS 5: 151-153; Myers, E. W. 및 Muller W., 1988, CABIOS 4: 11-17; Robinson, E. D., 1971, Comb. Theor. 11: 105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4: 406-425; Sneath, P.H. A. 및 Sokal, R. R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W. J. 및 Lipman, D. J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 726-730.

[0206] 바람직하게는, "% 서열 동일성"은 적어도 20 위치의 비료의 윈도우를 통하여 선택적으로 정렬된 2개의 서열을 비교함으로써 결정되는데, 비교 윈도우에 있어서 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열의 일부는 2개의 서열의 선택적 정렬을 위하여 참고 서열(첨가 또는 결실을 포함하지 않음)과 비교하여, 20 % 이하, 보통 5 내지 15 %, 또는 10 내지 12 %의 첨가 또는 결실(즉, 갭)을 포함할 수도 있다. %는 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가

두가지 모두의 서열에서 발생하여 매칭된 위치의 번호를 얻는 그러한 위치의 번호를 결정함으로써, 매칭된 위치의 번호를 참고 서열(즉, 윈도우 크기)에서 위치의 총 번호를 나눔으로써, 결과를 100으로 곱하여 % 서열 동일성을 얻는 것에 의해 계산된다.

- [0207] 변이체는 또한, 또는 택일적으로, 본래의 유전자, 또는 유전자의 일부 또는 보체에 실질적으로 동일할 수 있다. 이러한 폴리뉴클레오티드 변이체는 본래의 항체(또는 상보성 서열)를 코딩하는 천연 발생 DNA 서열에 대하여 다소 엄격한 조건하에서 혼성화 할 수 있다.
- [0208] 적당한 "다소 엄격한 조건"은 5 X SSC, 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA(pH 8.0)의 용액에서 사전 세척하고; 50°C-65°C, 5 X SSC에서 밤새 혼성화 하며; 후속하여서 각각 0.1 % SDS를 함유하는 2X, 0.5X 및 0.2X SSC를 이용하여 65°C에서 20분 동안 두번 세척하는 것을 포함한다.
- [0209] 본원에서 사용되는 바와 같이, "매우 엄격한 조건" 또는 고도 엄격 조건"은 다음의 것이다: (1) 세척을 위해 낮은 이온 강도 및 높은 온도를 사용하는 것, 예를 들어, 50°C에서 0.015 M 염화나트륨/0.0015 M 시트르산 나트륨/0.1% 황산 도데실 나트륨; (2)45°C에서 변성제를 혼성화 하는 동안 사용하는 것, 예를 들어 0.1% 소 혈청 알부민/0.1% 피콜/0.1% 폴리비닐피롤리돈/750 mM 염화나트륨을 포함하는 pH 6.5의 50mM 인산나트륨 완충액, 75 mM 시트르산 나트륨을 포함하는 50%(v/v) 포름아미드; 또는 (3) 42°C에서 50% 포름아미드, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M 시트르산 나트륨), 50 mM 인산나트륨(pH 6.8), 0.1% 인산나트륨, 5 x 덴하르트트의 용액, 초음파 처리된 연어 정자 DNA(50 pg/ml), 0.1% SDS, 및 10% 텍스트란 설페이트를 사용하고, 42°C에서 0.2 x SSC(염화나트륨/시트르산 나트륨) 및 55°C에서 50% 포름아미드로 세척한 후, 55°C에서 EDTA를 함유하는 0.1 x SSC로 구성되는 고도-엄격 세척을 한다. 당업계 숙련자는 프로브 길이 등과 같은 인자를 적합화하기 위해 필요한 바와 같이, 온도, 이온 강도 등을 조절하는 방법을 인지할 것이다.
- [0210] 당업계 통상의 기술을 가진자라면, 유전 암호의 퇴보의 결과로서, 본원에서 설명되는 바와 같이 폴리펩티드를 코딩하는 다수의 뉴클레오티드 서열이 존재한다는 것을 이해할 것이다. 이들 폴리뉴클레오티드의 일부는 어떤 본래의 유전자의 뉴클레오티드 서열에 대하여 최소한의 동일성을 지닌다. 그럼에도 불구하고, 코돈 사용의 상이함으로 인하여 변화하는 폴리뉴클레오티드가 본 발명에 의해 특히 고려된다. 또한, 본원에서 제공되는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자의 대립유전자는 본 발명의 범주 내이다. 대립유전자는 예를 들어 뉴클레오티드의 결실, 첨가 및/또는 치환과 같은 하나 이상의 돌연변이의 결과로서 변경되는 내인성 유전자이다. 결과의 mRNA 및 단백질은 필요하지는 않더라도, 변경된 구조 또는 기능을 가질 수도 있다. 대립유전자는 표준 기술(예를 들어, 혼성화, 증폭 및/또는 데이터베이스 서열 비교와 같은 것)을 이용하여 동정될 수 있다.
- [0211] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 화학적 합성, 재조합 방법 또는 PCR을 이용하여 얻을 수 있다. 화학적 폴리뉴클레오티드 합성의 방법은 당업계에 주지되어 있으며 본원에서 상세하게 설명될 필요가 없다. 당업계 어떤 기술은 본원에서 제공되는 서열 및 상업적 DNA 합성기를 사용하여 원하던 DNA 서열을 얻을 수 있다.
- [0212] 재조합 방법을 이용하여 폴리뉴클레오티드를 제조하기 위하여, 본원에서 더 논의되는 바와 같이, 소망 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 적합한 벡터 내로 삽입될 수 있으며, 상기 벡터는 차례로 복제 및 증폭을 위하여 적합한 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 당업계 공지된 어떤 방법에 의해 숙주 세포 내로 삽입될 수 있다. 세포는 외인성 폴리뉴클레오티드를 직접 섭취, 엔도시토시스, 형질감염, F-짜짓기 또는 전기천공법을 이용하여 도입함으로써 형질전환된다. 일단 도입되면, 외인성 폴리뉴클레오티드는 비통합 벡터(예를 들어 플라스미드)와 같이 세포 내에서 유지되거나 숙주 세포 계능 내로 통합될 수 있다. 그렇게 증폭된 폴리뉴클레오티드는 당업계 주지된 방법에 의해 숙주 세포로부터 단리될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Sambrook et al. (1989)] 참조하시오.
- [0213] 택일적으로, PCR은 DNA 서열의 재생산을 허용한다. PCR 기술은 당업계에 주지되어 있으며 미국 특허 제 4,683,195, 4,800,159, 4,754,065 및 4,683,202 및 문헌[PCR:The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al. eds., Birkawer Press, Boston (1994)]에 설명되어 있다.
- [0214] RNA는 적합한 벡터 내 단리된 DNA를 이용하여 그것을 적당한 숙주 세포 내로 삽입함으로써 얻을 수 있다. 세포가 복제하고 DNA가 RNA 내로 형질전환되는 경우, RNA는 그 후 RNA는 예를 들어, 상기 문헌[Sambrook et al., (1989)]에 기재되는 바와 같이, 당업계 숙련자에게 주지된 방법을 이용하여 단리될 수 있다.
- [0215] 적합한 클로닝 벡터가 표준 기술에 따라서 구조될 수 있거나, 또는 당업계에서 이용가능한 다수의 클로닝 벡터로부터 선택될 수 있다. 선택되는 클로닝 벡터는 사용되도록 의도되는 숙주 세포에 따라서 변화할 수 있으면서, 동시에 유용한 클로닝 벡터는 일반적으로 자기 복제 능력을 가질 것이며, 특정 제한 엔도뉴클레아제에 대한 단

일 표적을 가질수 있으며, 및/또는 벡터를 함유하는 클론을 선택하는데 사용될 수 있는 마커에 대한 유전자를 함유할 수도 있다. 적합한 예는 플라스미드 및 세균 바이러스를 포함하는데, 예를 들어, pUC18, pUC19, Bluescript (예를 들어, pBSSK+) 및 그것의 유도체, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, 파지 DNA, 및 pSA3 및 pAT28와 같은 서틀 벡터와 같은 것이다. 이들 및 다른 클로닝 벡터는 예를 들어 BioRad, Strategene, 및 Invitrogen과 같은 상업상의 공급자로부터 이용가능하다.

[0216] 발현 벡터는 일반적으로 본 발명에 따르는 폴리뉴클레오티드 함유하는 복제가능한 폴리뉴클레오티드 구조이다. 발현 벡터는 숙주 세포 내에서 염색체 DNA의 에피솜 또는 완전부로서 복제가능 해야만 하는 것이 포함된다. 적합한 발현 벡터는 이에 한정되지는 않지만, 플라스미드, 아테노바이러스, 아테노-연관 바이러스, 레트로바이러스, 코스미드를 포함하는 바이러스 벡터, 및 PCT 공개공부 제 WO 87/04462호에 개시되는 발현 벡터를 포함한다. 벡터 구성성분은 일반적으로 이에 한정되지는 않지만, 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 신호 서열; 복제의 시작점; 하나 이상의 마커 유전자; 적합한전사 억제 요소(예를 들어 프로모터, 인핸서 및 종결자). 발현을 위하여(즉, 번역), 하나 이상의 번역 억제 요소는 또한 통상적으로, 리보솜 결합 자리, 번역 개시 자리, 및 정지 코돈과 같은 것을 필요로 한다.

[0217] 관심있는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 벡터는 전기 천공법, 염화 칼슘, 염화 리비듐, 인산 칼슘, DEAE-텍스트란, 또는 기타 물질을 이용하는 형질감염, 유전자총(microprojectile bombardment); 리포솜 매개 감염법(lipofection); 및 감염 (예를 들어, 벡터는 우두 바이러스와 같은 감염 병원체임)을 포함하는 다수의 적절한 방법의 어떤 것에 의해 숙주 세포로 도입될 수 있다. 도입하는 벡터 또는 폴리뉴클레오티드의 선택은 종종 숙주 세포의 특징에 의존적일 것이다.

[0218] 본 발명은 또한 본원에서 설명되는 폴리뉴클레오티드 중 어떤 것을 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 이중 DNA를 과잉-발현할 수 있는 어떤 숙주 세포는 관심있는 항체, 폴리펩티드 또는 단백질을 코딩하는 유전자를 단리하기 위한 목적에 사용될 수 있다. 포유동물 숙주 세포의 비제한적 예는 이에 한정되지는 않으나, COS, HeLa, 및 CHO 세포를 포함한다. 또한 PCT 공개공부 제 WO 87/04462호를 참조하시오. 적합한 비-포유동물 숙주 세포는 원핵생물(예를 들어, E. coli 또는 B. subtilis) 및 효모(예를 들어, S. cerevisiae, S. pombe; 또는 K. lactis)을 포함한다. 바람직하게는, 숙주 세포는 만일, 존재한다면, 숙주 세포 내에서, 관심있는 대응 내인성 항체 또는 단백질 보다 약 5 배 더 높은, 더 바람직하게는 10 배 더 높은, 더욱 더 바람직하게는 20 배 더 높은 수준에서 cDNA를 발현한다. NGF에 대한 특이적 결합을 위한 숙주 세포는 면역분석법 또는 FACS에 의해 영향받는다. 관심있는 항체 또는 단백질을 과잉발현시키는 세포가 동정될 수 있다.

[0219] *E3 및 E3 유도된 항체를 이용하는 방법*

[0220] NGF에 결합하는 항체 E3는 NGF의 존재 또는 부존재를 동정하거나 검출하는데 사용될 수 있다. 간단함을 위해, 이들 방법이 본원에서 사용되는 NGF 결합 구체예(예를 들어 폴리펩티드)의 어떤 것을 사용한다는 이해하에, 일반적으로 E3 또는 항체를 참고할 것이다. 검출은 일반적으로 NGF에 결합하는 본원에서 설명된 항체와 생물학적 샘플을 접촉시키는 것과 NGF와 NGF에 특이적으로 결합하는 항체(예를 들어, E3) 간의 복합체의 형성을 수반한다. 이러한 복합체의 형성은 생체 외 또는 생체 내일 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "검출"은 대조군에 대한 참고와 함께 또는 참고하지 않고서 정성적 및/또는 정량적 검출(수준 측정하는 것)을 포함한다.

[0221] 다양한 공지된 방법 중 어떤 것이 이에 한정되지는 않지만, 예를 들어 효소-연관 면역흡착제 분석법(ELISA), 방사성면역분석법(RIA)등에 의해 폴리펩티드에 결합하는 항체를 이용하는 면역 분석법; 및 예를 들어 결합 활성 또는 효소적 분석법과 같은 코딩된 폴리펩티드에 대한 기능상의 분석법을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 검출가능하게 표지된다.

[0222] *E3 및 유도체의 진단적 사용*

[0223] 본 발명의 항체 및 폴리펩티드는 검출, 질병의 진단 및 모니터링, 상태, 또는 변화된 또는 이상 NGF 발현(일부 구체예에서, 증가 또는 감소된 NGF 발현(정상 샘플에 비하여), 및/또는 예를 들어 정상적으로 NGF 발현이 부족한 조직 및/또는 세포 내 발현의 존재, 또는 정상적으로 NGF 발현을 지니는 조직 또는 세포 내 NGF 발현의 부재와 같은 부적절한 발현)에 관련된 질병에 있어서 사용될 수 있다. 본 발명의 항체 및 폴리펩티드는 예를 들어, NGF에 대한 변경된 또는 이상 민감성 또는 반응성과 연관된 질병에 있어서, NGF 발현의 검출에 더 유용하다. 일부 구체예에서, NGF 발현이 NGF 발현에 대하여 변경된 또는 이상 민감성 또는 반응성을 특징으로 하는 또는 이와 관련된 질병, 질환(예를 들어, NGF가 성장 및/또는 전이를 촉진하는 암)에 걸린 것으로 의심되는 개체로부터

의 샘플 내에서 검출된다.

- [0224] 따라서, 일부 구체예에서, 본 발명은 변경된 또는 이상 NGF 발현을 갖는 것으로 의심되는 개체의 표본(샘플)을 본 발명의 항체 또는 폴리펩티드와 접촉시키고 NGF의 수준이 대조군 또는 비교 표본의 그것과 다른지 여부를 결정하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 개체는 심장 부정맥, 알츠하이머병, 및/또는 자율 기능장애를 가진다.
- [0225] 일부 구체예에서, 본 발명은 개체의 표본(샘플)을 접촉시키고 NGF 발현의 수준을 결정하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 개체는 NGF 발현에 대하여 변경된 또는 이상 민감성 또는 반응성을 특징으로 하거나 이와 관련된 질병, 질환에 걸린 것으로 의심된다. 일부 구체예에서, 개체는 소세포폐암, 유방암, 췌장암, 전립선암, 난소암종, 간세포 암종, 또는 흑색종을 가진다.
- [0226] 진단적 적용을 위하여, 항체는 전형적으로 이에 한정되지는 않지만 방사성 동위원소, 형광성 표지, 및 각종 효소-기질 표지를 포함하는 검출가능한 부분으로 표지될 것이다. 항체에 대하여 표지를 결합시키는 방법은 당업계 공지되어 있다. 본 발명의 다른 구체예에서, 본 발명의 항체는 표지될 필요가 없으며, 그것의 존재는 본 발명의 항체에 결합하는 표지된 항체를 이용하여 검출될 수 있다.
- [0227] 본 발명의 항체는 당업계 공지된 분석 방법, 예를 들어 경쟁적 결합 분석법, 직접 및 간접 샌드위치 분석법, 면역침강 분석법과 같은 것에서 사용될 수 있다. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).
- [0228] 항체는 예를 들어 세포 내 조영법과 같은 생체 내 진단 분석법에 사용될 수 있다. 일반적으로, 항체는 방사성핵종(예를 들어 ¹¹¹In, ⁹⁹Tc, ¹⁴C, ¹³¹I, ¹²⁵I, 또는 ³H)으로 표지되어서 관심있는 세포 또는 조직이 이유노신티오그래피(immunosciintigraphy)를 이용하여 국부에 집중될 수 있다.
- [0229] 항체는 또한 당업계 주지된 기술에 따라서, 병리학의 염색 시약으로서 사용될 수 있다.
- [0230] *치료상 목적의 E3 및 유도체를 사용하는 방법*
- [0231] 항체 E3는 NGF의 생물학적 활성을 감소 및/또는 차단하는데 유용하다. 이러한 길항제적 활성은 예를 들어, 통증과 같은 내인성 NGF 생산과 관련된 병리학적 상태의 치료에 유용한 것으로 여겨진다. 일반적으로, 이들 구체예에서 유효량이 개체에 투여된다. 따라서, 한 양태에서, 본 발명은 본원에서 개시되는 어떤 폴리펩티드(예를 들어 항체 E3와 같은 항체를 포함)를 이용하는 인간 NGF 생물학적 활성을 길항하는 방법을 제공한다. 한 구체예에서, 본 발명은 본원에서 설명되는 어떤 폴리펩티드(항체 E3 포함)와 신경 성장 인자를 접촉시킴으로써, 인간 신경 성장 인자 활성을 길항하거나, 감소, 차단, 또는 억제하는 것을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 통증이 있는 개체는(예를 들어, 외과적 수술 후 통증 또는 류마티스 관절염 통증) E3를 이용한 치료가 제공된다.
- [0232] 간단함을 위해, 이들 방법이 본원에서 설명되는 E3 변이체 항체 및 폴리펩티드에 사용된다는 이해하에, E3 또는 항체를 참고한다.
- [0233] 각종 E3의 조성물 또는 E3의 단편(예를 들어, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, 등), 예를 들어, 단일 사슬(ScFv), 그것의 변이체, 항체 부분을 포함하는 융합 단백질, 및 필요한 특이성의 항원 NGF 인식 자리를 포함하는 임의의 다른 변형된 구조의 E3와 같은 것이 투여를 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, E3 항체 또는 E3 항체의 각종 조성물이 그대로 투여될 수 있다. 다른 구체예에서, E3 또는 그것의 E3의 각종 조성물(본원에서 설명되는 임의의 조성물 구체예를 포함) 및 약학적으로 허용가능한 부형제가 투여되고, 각종 조성물에서 존재할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 부형제는 당업계 공지되어 있으며, 약리적으로 유효한 물질의 투여를 용이하게 하는 비교적 비활성인 물질이다. 예를 들어, 부형제는 형태 또는 일관성을 제공할 수 있으며, 희석제로서 작용할 수 있다. 적합한 부형제는 이에 한정되지는 않지만, 안정화 제제, 습윤 및 에멀전화 제제, 오스몰농도를 변화시키는 염, 캡슐화 제제, 완충액, 및 피부 침투 증강제를 포함한다. 부형제 및 비경구 및 경구적 약물 전달을 위한 조성물을 상기 문헌[Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000)]에 나타낸다.
- [0234] 일부 구체예에서, 이들 제제는 주사(예를 들어, 복막내, 정맥내, 피하밀, 근육내 등)에 의한 투여에 대하여 제형되며, 다른 투여의 형태도(예를 들어, 구강, 점막, 흡입을 통하여, 설하 등으로) 사용될 수 있다. 따라서, E3 항체 및 그것의 등가물은 바람직하게는 예를 들어, 식염수, 링거액, 텍스트로스 용액 등과 같은 약학적으로 허용가능한 비히클과 혼합된다. 특정 투여 요법, 즉, 투여량, 타이밍 및 반복은 특정 개체 및 그들 개체의 의학적 히스토리에 의존적일 것이다. 일반적으로, 다음 중 어떤 것이 사용될 수 있다: 적어도 약 50 mg/kg 체중; 적어

도 약 10mg/kg 체중; 적어도 약 3mg/kg 체중; 적어도 약 1 mg/kg 체중; 적어도 약 750 μ g/kg 체중; 적어도 약 500 μ g/kg 체중; 적어도 약 250 μ g/kg 체중; 적어도 약 100 μ g/kg 체중; 적어도 약 50 μ g/kg 체중; 적어도 약 10 μ g/kg 체중; 적어도 약 1 μ g/kg 체중, 또는 그 이하의 투여량이 투여된다. 몇일 또는 그 이상의 반복된 투여에 대하여, 상태에 따라서, 치료가 원하던 질병 증상의 억제가 발생할 때 까지 유지도니다. 전형적인 투여 요법은 약 2 mg/kg의 초기 투여 후, 약1 mg/kg의 항-NGF 항체의 일주일 지속 투여에 이어서, 격주로 약 1 mg/kg의 지속 투여량을 투여하는 것을 포함한다. 그러나, 다른 투여 요법은 실행자가 성취하기 원하는 약리학적 붕괴의 패턴에 따라서 유용할 수 있다. 반감기와 같은 경험적인 고려는 일반적으로 투여량의 결정에 도움이 될 것이다. 이러한 치료법의 진행은 전통적 기술 및 분석법에 의해 모니터링된다.

- [0235] 일부 개체에 있어서, 하나 이상의 투여량이 필요할 수 있다. 투여의 빈도는 치료법의 과정에 걸쳐서 결정되고 조절될 수 있다. 예를 들어, 투여의 빈도는 제제가 예방 또는 치료의 목적, 사전 치료, 환자의 임상적 히스토리 및 제제에 대한 반응, 및 주치의의 분별력에 대하여 제제가 투여되는지 여부에 따라서, 치료되는 통증의 유형 및 심각도를 기초로 하여 결정되거나 조절될 수 있다. 전형적으로 임상적 투여량이 원하던 결과를 달성하도록 도달될 때 까지 항-NGF 길항제 항체를 투여할 것이다. 일부 경우에, E3 항체의 서방출성 연속 조성물이 적절할 수 있다. 서방출성을 달성하기 위한 각종 조성물 및 장치는 당업계 공지되어 있다.
- [0236] 일부 구체예에서, E3 항체(또는 폴리펩티드)에 대한 투여량은 하나 이상의 투여를 제공받은 개체 내에서 실험적으로 결정될 수 있다. E3 또는 다른 상당물 항체의 효험을 평가하기 위해, 상기 질병 증상(예를 들어, 통증)의 마커가 모니터링될 수 있다.
- [0237] 본 발명의 방법에 따르는 항체(예를 들어 E3) 또는 폴리펩티드의 투여는 연속적 또는 간헐적이거나, 예를 들어, 레시피언트의 생리학적 상태, 투여의 목적이 치료적 또는 예방적인지의 여부, 및 숙련된 실행자에 공지된 다른 요인들에 있어서 의존적일 수 있다. 항체의 투여는 미리 선택된 시간의 기간에 걸쳐서 본질적으로 연속적일 수 있거나 일련의 간격을 둔 투여일 수 있는데, 예를 들어 통증 발생의 전, 동안, 또는 후, 통증 발생의 전, 동안, 전 및 후, 통증 발생의 동안 및 후, 또는 통증 발생의 전, 동안, 및 후일 수 있다. 투여는 상처, 절개, 외상, 외과적 수술 전, 동안 및/또는 이후일 수 있으며, 어떤 다른 사건이 외과적 수술 후 통증을 발생시키기 쉽다.
- [0238] 다른 조성물은 리포솜과 같은 담체를 포함하지만, 이에 한정되지 않는 당업계 공지된 적합한 전달 형태를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Mahato et al. (1997) Pharm. Res. 14: 853-859]을 참조하십시오. 리포솜의 제조는 시토펙틴(cytofectins), 복합층판(multilamellar) 비히클 및 단일층판(unilamellar) 비히클을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0239] 일부 구체예에서, 하나 이상의 항체 또는 폴리펩티드가 존재할 수 있다. 항체는 단일클론 또는 폴리클론 항체일 수 있다. 이러한 조성물은 적어도 1가지, 적어도 2가지, 적어도 3가지, 적어도 4가지, 적어도 5가지의 상이한 항체를 함유할 수 있다. 항체가 당업계에서 종종 지적되는 바와 같이, 항체의 혼합물은 특히 개체의 집단의 더 넓은 범위를 치료하는데 유용할 수 있다.
- [0240] 본 발명의 항체 또는 폴리펩티드(예를 들어 항체 E3)의 어떤 것을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 원하는 세포 내에서 본 발명의 항체 또는 폴리펩티드(예를 들어 항체 E3)의 어떤 것의 전달 및 발현에 대하여 용이할 수 있다. 발현 벡터가 E3 항체 또는 폴리펩티드의 직접 발현에 사용될 수 있음이 명백하다. 발현 벡터는 예를 들어, 복강내로, 정맥내로, 근육내로, 피하밀로, 경막내로, 심실내로, 경구적으로, 소화관적으로, 비경구적으로, 비강내로, 진피로, 설하로, 또는 흡입에 의함과 같이 당업계 공지된 임의의 방법에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터의 투여는 주사, 경구 투여, 입자 총 또는 삼입된 투여, 및 국소적 투여를 포함하여 국부적 또는 전신적 투여를 포함한다. 당업계 숙련자는 생체 내 외인성 단백질의 발현을 얻기 위해 발현 벡터의 투여에 있어서 친숙하다. 예를 들어, 미국 특허 제 6,436,908; 6,413,942; 및 ,376,471호를 참조하십시오.
- [0241] 또한 명의 항체 또는 폴리펩티드(예를 들어 항체 E3)의 어떤 것을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 치료 조성물의 표적된 전달이 사용될 수 있다. 수용체-매개 DNA 전달 기술이 예를 들어, 문헌[Findeis et al., TrendsBiotechnol. (1993) 11: 202; Chiou et al., Gene Therapeutics : Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J. A. Wolff, ed.) (1994); Wu et al.,J Biol. Chem. (1988) 263: 621; Wu et al.,J Biol. Chem. (1994) 269: 542; Zenke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1990) 87: 3655; Wu et al.,J Biol. Chem. (1991) 266: 338]에서 설명된다. 폴리뉴클레오티드를 함유하는 치료적 조성물이 유전자 치료 프로토콜 내에 국부적 투여를 위해 약 100 ng 내지 약 200 mg의 DNA의 범위로 투여될 수 있다. 약 500 ng 내지 약 50 mg, 약 1 μ g 내지 약 2 mg, 약 5 μ g 내지 약 500 μ g, 및 약 20 μ g 내지 약 100 μ g의 DNA의 농도 범위가 유전자 치료 프로토콜 중에 사용될 수 있다. 본 발명의 치료상의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드는 유전자 전달 비히클을 이용

하여 전달될 수 있다. 유전자 전달 비히클은 비-바이러스성 기원일 수 있다(일반적으로, 문헌[Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1:51; Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5:845; Connelly, Human Gene Therapy (1995)1:185; and Kaplitt, Nature Genetics (1994)6:148]을 참조). 이러한 코딩 서열의 발현은 내인성 포유동물 또는 이중 프로모터를 이용하여 유도될 수 있다. 코딩 서열의 발현은 구조적이거나 조절적일 수 있다.

[0242] 원하는 폴리뉴클레오티드의 전달 및 원하는 세포 내 발현을 위한 바이러스-기재 벡터는 당업계에 주지되어 있다. 전형적인 바이러스-기재 비히클은 이에 한정되지는 않지만, 재조합 레트로바이러스(예를 들어, PCT 공개공보 제 WO 90/07936; WO94/03622 ; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805호; 미국 특허 제 5,219,740; 4,777,127호; 영국 특허 제 2,200,651호 ; 및 유럽 특허 제 0 345 242호를 참조), 알파바이러스-기재 벡터(예를 들어, Sindbis 바이러스 벡터, Semliki 숲 바이러스(ATCC VR-67; ATCC VR-1247), Ross 강 바이러스 (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) 및 베네수알레 말 너염 바이러스(ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), 및 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터(예를 들어, PCT 공개공보 제 WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO95/11984 및 WO 95/00655호 참조)를 포함한다. 문헌[Curriel, Hum. Gene Ther. (1992) 3: 147]에 설명되는 바와 같이 사멸 아데노바이러스에 연결된 DNA의 투여가 또한 사용될 수 있다.

[0243] 또한 비-바이러스성 전달 비히클 및 방법은 이에 한정되지는 않지만, 사멸 아데노바이러스 단독에 연결되거나 연결되지 않은 복합 양이온 응축 DNA(예를 들어, 문헌[Curriel, Hum. Gene Ther. (1992)3: 147] 참조); 리간드-연결된 DNA(예를 들어, 문헌[Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985] 참조); 진핵생물 세포 전달 비히클 세포(예를 들어, 미국 특허 제 5,814,482 ;PCT 공개공보 제 WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; 및 WO 97/42338호 참조) 및 핵전하 중화 또는 세포막과의 융합을 포함하여 사용될 수 있다. 나출된 DNA가 또한 사용될 수 있다. 전형적인 나출 DNA 도입 방법은 PCT 공개공보 제 WO 90/11092호 및 미국 특허 제 5,580, 859호에서 설명된다. 유전자 전달 비히클로서 작용하는 리포솜이 미국 특허 제 5,422,120호; PCT 공개공보 제 WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; 및 유럽 특허 제 0 524 968호에서 개시된다. 추가적 접근법은 문헌[Philip, Mol. Cell Biol.(1994) 14: 2411] 및 [Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:1581]에서 설명된다.

[0244] 본원에서 설명되는 모든 방법과 관련하여, 항-NGF 길항제 항체에 관한 언급은 하나 이상의 제제를 포함하는 조성물을 포함한다. 이들 조성물은 예를 들어, 당업계에 주지되어 있는 완충액을 포함하는 약학적으로 허용가능한 부형제와 같은 적합한 부형제를 더 포함할 수 있다. 본 발명은 다른 전통적인 치료의 방법과 단독으로 또는 이들과의 조합으로 이용될 수 있다.

[0245] **류마티스 관절염 통증을 치료 또는 예방하기 위한 항-NGF 길항제 항체를 이용하는 방법**

[0246] 일부 양태에서, 본 발명은 인간 및 인간이 아닌 포유동물을 포함하는 개체 내에서 류마티스 관절염 통증을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다. 따라서, 한 양태에서, 본 발명은 항-NGF 길항제 항체의 유효량을 투여하는 것을 포함하는 개체 내 류마티스 관절염 통증을 치료하는 방법을 제공한다. 항-NGF 길항제 항체는 당업계에 공지되어 있으며 본원에서 설명된다.

[0247] 다른 양태에서, 본 발명은 개체 내 류마티스 관절염 통증의 빈도를 감소시키고, 발병, 발달 또는 진행을 개선, 억제, 완화, 및/또는 지연시키는 방법을 제공한다. 따라서, 일부 구체예에서, 항-NGF 길항제 항체는 류마티스 관절염에 걸린 개체 내에서 통증의 발달 또는 통증 에피소드 전에 투여된다.

[0248] 다른 양태에서, 본 발명은 항-NGF 길항제 항체의 유효량을 투여하는 것을 포함하는 개체 내 류마티스 관절염과 관련된 염증 약액질(중량 손실)을 치료하는 방법을 제공한다(Roubenoff et al., Arthritis Rheum. 40 (3): 534-9 (1997); Roubenoff et al., J : Clin. Invest. 93 (6): 2379-86 (1994)).

[0249] 류마티스 관절염 통증의 진단 또는 평가는 당업계에 잘 확립되어 있다. 평가는 예를 들어, 각종 통증 스케일을 이용하는 통증의 환자 특성화와 같이 당업계에 공지된 측정법을 기초로 하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Katz et al, Surg Clin North Am. (1999) 79 (2): 231-52; Caraceni et al. J Pain Symptom Manage (2002) 23 (3): 239-55]을 참조하시오. 또한 예를 들어, 류마티즘학의 미국 컬리지(ACR)(Felson, et al., Arthritis and Rheumatism (1993) 36 (6):729-740), 건강 평가 질문지(HAQ) (Fries, et al., (1982) J : Rheumatol. 9: 789-793), 파울러스 규모(Paulus, et al., Arthritis and Rheumatism (1990) 33: 477-484), 및 류마티스 영향 측정 스케일(AIMS) (Meenam, et al., Arthritis and Rheumatology (1982) 25: 1048-1053)과 같이 질병 상태를 치료하는데 통상 사용되는 스케일이 존재한다. 항-NGF 길항제 항체는 어떤 적합한 루트를 통하여 개체에 투여될 수 있다. 상이한 투여 루트의 예가 본원에서 설명된다.

- [0250] 통증 경감은 경감의 시간 경로에 의해 특성화될 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, 통증 경감은 항-NGF 길항제 항체의 투여 후 약 24 시간 내에 관찰된다. 다른 구체예에서, 통증 경감은 항-NGF 길항제 항체의 투여 후 약 36, 48, 60, 72 시간 또는 4일 내에 관찰된다. 또 다른 구체예에서, 통증 경감은 류마티스 관절염과 관련된 염증 상태의 향상의 표시를 관찰하기 전에 관찰된다. 일부 구체예에서, 통증의 빈도 및/또는 강도는 감소되고, 및/또는 질병을 앓고 있는 개체의 수명의 질이 증가된다.
- [0251] 이들 방법을 위하여 항-NGF 항체를 제조하고 이용하는 것은 아래 단락에서 설명된다("항-NGF 길항제 항체"; 항-NGF 길항제 항체의 동정"; "항-NGF 길항제 항체의 투여").
- [0252] **골관절염 통증을 치료 또는 예방하기 위하여 항-NGF 길항제 항체를 이용하는 방법**
- [0253] 일부 양태에서, 본 발명은 인간 및 인간이 아닌 포유동물을 포함하여 개체 내에서 골관절염 통증을 치료 및/또는 예방하는 방법으로서 제공한다. 따라서, 한 양태에서, 본 발명은 유효량의 항-NGF 길항제 항체를 투여하는 것을 포함하는 개체 내에서 골관절염 통증을 치료하는 방법을 제공한다. 항-NGF 길항제 항체는 당업계에 공지되어 있으며 본원에서 설명된다.
- [0254] 다른 양태에서, 본 발명은 개체 내 골관절염 통증의 빈도를 감소시키고, 발병, 발달 또는 진행을 개선, 억제, 완화 및/또는 지연시키는 방법을 제공한다. 따라서, 일부 구체예에서, 항-NGF 길항제 항체는 골관절염에 걸린 개체 내에서 통증의 발달 또는 통증 에피소드 전에 투여된다.
- [0255] 골관절염 통증의 진단 또는 평가는 당업계에 잘 확립되어 있다. 평가를 예를 들어, 각종 통증 스케일을 이용하여 통증의 환자 특성화와 같은 당업계 공지된 측정법을 기초로 하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Katz et al., Surg Clin North Am. (1999) 79 (2): 231-52; Caraceni et al. J Pain Symptom Manage (2002) 23 (3): 239-55]를 참조하십시오. 예를 들어, WOMAC 보행 통증 스케일(통증, 뻣뻣한 및 신체적 기능을 포함) 및 100 mm 비주얼 아나로그 스케일(VAS)이 통증을 평가하고 치료에 대한 반응을 사정하기 위해 사용될 수 있다.
- [0256] 항-NGF 길항제 항체는 어떤 적합한 루트를 통하여 개체에 투여될 수 있다. 상이한 투여 루트의 예가 본원에서 설명된다.
- [0257] 통증 경감은 경감의 시간 경로에 의해 특성화될 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, 통증 경감은 항-NGF 길항제 항체의 투여 후 약 24 시간 내에 관찰된다. 다른 구체예에서, 통증 경감은 항-NGF 길항제 항체의 투여 후 약 36, 48, 60, 72 시간 또는 4일 내에 관찰된다. 일부 구체예에서, 통증의 빈도 및/또는 강도가 감소되고, 및/또는 상기 질병을 앓고 있는 개체의 수명의 질이 증가된다.
- [0258] 이들 방법을 위하여 항-NGF 항체를 제조 및 이용하는 것이 아래 단락에서 설명된다("항-NGF 길항제 항체"; "항-NGF 길항제 항체의 동정"; 항-NGF 길항제 항체의 투여").
- [0259] 항-NGF 길항제 항체
- [0260] 본 발명의 방법(류마티스 관절염 통증 및 골관절염 통증에 관한 것)은 항-NGF 길항제 항체를 사용하는데, 이것은 예를 들어 NGF에 대한 수용체 결합 및/또는 세포 반응의 유도과 같은 NGF 신호화에 의해 매개되는 다운스트림 경로를 포함하는, NGF 생물학적 활성을 차단, 억압 또는 감소(현저하게 포함)시키는 임의의 항체 분자를 나타낸다.
- [0261] 항-NGF 길항제 항체는 다음 특징 중 하나 이상의 어떤 것을 나타내야만 한다: (a) NGF에 결합하고 NGF 생물학적 활성 또는 NGF 신호화 작용에 의해 매개되는 다운스트림 경로를 억제하며; (b) 어떤 양태의 류마티스 관절염 통증 또는 골관절염 통증을 예방, 개선, 또는 치료하고; (c) NGF 수용체 활성화를 차단 또는 감소하며(TrkA 수용체 이량체화 및/또는 자기인산화를 포함); (d) NGF의 제거를 증가시키며; (e) NGF 합성을 억제(감소)시킴. 항-NGF 길항제 항체는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, PCT 공개공보 제 WO 01/78698, WO 01/64247호, 미국 특허 제 5,844, 092, 5, 877, 016, 및 6,153,189호; 문헌[Hongo et al., Hybridoma, 19: 215-227 (2000)];[Cell. Molec. Biol. 13: 559-568 (1993)]; 유전자은행 승인 번호 제 U39608, U39609, L17078, 또는 L17077호를 참조하십시오.
- [0262] 본 발명의 목적을 위하여, 항체는 NGF 및 NGF 신호화 작용에 의해 매개되는 다운스트림 경로를 억제하는 방식으로 NGF와 작용한다. 일부 구체예에서, 항-NGF 길항제 항체는 인간 NGF를 인지한다. 또 다른 구체예에서, 항-NGF 길항제 항체는 인간 NGF에 특이적으로 결합한다. 일부 구체예에서, 항-NGF 길항제 항체는 예를 들어 NT-3, NT4/5, 및/또는 BDNF와 같은 관련된 뉴로트로핀에 현저하게 결합하지 않는다. 또 다른 구체예에서, 항-NGF 항체는 NGF에 결합할 수 있으며 생체 내 그것의 TrkA 및/또는 p75 수용체에 대한 NGF의 결합을 효과적으로 억제하고

/억제하거나 NGF가 그것의 TrkA 및/또는 p75 수용체를 활성화하는 것을 효과적으로 억제할 수 있다. 또 다른 구체에 있어서, 항-NGF 항체는 인간화 되어 있다(예를 들어 본원에서 설명되는 항체 E3). 일부 구체에 있어서, 항-NGF 항체는 인간이다. 일부 구체에 있어서, 항체는 인간 NGF 상 하나 이상의 에피토프를 인지하는 인간 항체이다. 다른 구체에 있어서, 항체는 인간 NGF 상 하나 이상의 에피토프를 인지하는 마우스 또는 랫트 항체이다. 다른 구체에 있어서, 항체는 영장류, 개, 고양이, 말, 및 소로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 NGF 상 하나 이상의 에피토프를 인지한다. 더이상의 추가적 구체에 있어서, 항-NGF 길항제 항체는 MAb 911, MAb 912 및 MAb 938 중 하나 이상의 어떤 것으로부터 선택되는 항체와 동일한 NGF 에피토프 6에 본질적으로 결합한다(참조[Hongo, et al., Hybridoma 19: 215-227 (2000)]). 다른 구체에 있어서, 항체는 Mab 911과 동일한 에피토프에 결합한다. 다른 구체에 있어서, 항체는 면역학적으로 비활성(예를 들어, 보체 매개 용해 또는 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)을 유발하지 않음)인 불변 영역을 포함한다. ADCC 활성은 미국 특허 제 5,500,362호에서 개시되는 방법을 이용하여 평가될 수 있다. 일부 구체에 있어서, 불변 영역은 문헌[Eur. J. Immunol.(1999)29: 2613-2624]; PCT 출원 번호 제 PCT/GB99/01441호 ; 및/또는 영국 특허 출원 제 9809951.8호에서 설명되는 바와 같이 변형된다.

[0263] 일부 구체에 있어서, 항-NGF 길항제 항체는 항체 "E3"라 칭하여 지는 인간화 된 마우스 항-NGF 단일클론 항체이며, 본원에서 설명되는 E3 관련 항체의 어떤 것, 또는 그것의 어떤 단편은, NGF 길항제이다.

[0264] 본 발명에 있어서 유용한 항체는 단일클론 항체, 폴리클론 항체, 항체 단편(예를 들어, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc 등), 키메라 항체, 이특이적 항체, 이중결합 항체, 단일 사슬(ScFv), 그것의 돌연변이, 항체 부분을 포함하는 융합 단백질, 인간화 된 항체, 및 항체의 클리코실화 변이체, 항체의 아미노산 서열 변이체, 및 공유결합으로 변형된 항체를 포함하여, 필요한 특이성의 항원 인식 자리를 포함하는 면역글로불린 분자의 어떤 다른 변형된 구성을 포함할 수 있다. 상기 항체는 무린, 랫트, 인간, 또는 어떤 다른 기원(키메라 또는 인간화 항체를 포함)을 포함할 수 있다.

[0265] 항-NGF 길항제 항체의 NGF(예를 들어 hNGF)에 대한 결합 친화성은 약 0.10 내지 약 0.80nM, 약 0.15 내지 약 0.75nM 및 약 0.18 내지 약 0.72 nM일 수 있다. 한 구체에 있어서, 결합 친화성은 약 2 pM 및 22 pM 사이이다. 일부 구체에 있어서, 결합 친화성은 약 10 nM이다. 다른 구체에 있어서, 결합 친화성은 약 10 nM 이하이다. 다른 구체에 있어서, 결합 친화성은 약 0.1 nM 또는 약 0.07 nM이다. 다른 구체에 있어서, 결합 친화성은 약 0.1 nM 이하 또는 약 0.07 nM 이하이다. 다른 구체에 있어서, 결합 친화성은 약 100nM, 약 50 nM, 약 10nM, 약 1 nM, 약 500 pM, 약 100 pM 중 어떤 것, 또는 약 50 pM 내지 약 2 pM, 약 5 pM, 약 10 pM, 약 15 pM, 약 20 pM, 또는 약 40 pM 중 어떤 것이다. 일부 구체에 있어서, 결합 친화성은 약 100nM, 약 50 nM, 약 10nM, 약 1 nM, 약 500 pM, 약 100 pM, 또는 약 50 pM 중의 어떤 것, 또는 약 50 pM 이하이다. 일부 구체에 있어서, 결합 친화성은 약 100nM, 약 50nM, 약 10 nM, 약 1 nM, 약 500 pM, 약 100 pM, 또는 약 50pM 중의 어떤 것이다. 또 다른 구체에 있어서, 결합 친화성은 약 2 pM, 약 5 pM, 약 10 pM, 약 15 pM, 약 20 pM, 약 40 pM, 또는 약 40 pM 이상이다.

[0266] NGF에 대한 항체의 결합 친화성을 결정하는 한 방법은 항체의 단일기능적 Fab 단편의 결합 친화성을 측정함에 의한다. 단일기능적 Fab 단편을 얻기 위해, 항체(예를 들어, IgG)는 파파인을 이용하여 절단되거나 재조합적으로 발현될 수 있다. 항체의 항-NGF Fab 단편의 친화성은 표면 플라즈몬 공명(BIAcore3000 표면 플라즈몬 공명(SPR) 시스템, BIAcore, INC, Piscaway NJ)에 의해 측정될 수 있다. CM5 칩은 공급자의 지시에 따라서 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디미드 히드록로라이드(EDC) 및 N-히드록시숙신이미드(NHS)를 이용하여 활성화 될 수 있다. 인간 NGF(또는 어떤 다른 NGF)는 10 mM 아세트산 나트륨 pH 4.0에 희석될 수 있고 0.005 mg/mL의 농도에서 활성화 된 칩을 통하여 주입될 수 있다. 각각의 칩 채널을 통과하는 가변성 유동 시간을 이용하여, 항원 밀도의 2가지 범위가 달성될 수 있다: 상세 운동학 연구에 대한 100-200 반응 유닛(RU) 및 스크리닝 분석을 위한 500-600 RU. 상기 칩은 에탄올아민으로 차단될 수 있다. 재생 실험은 Pierce 용출 완충액(Product No. 21004, Pierce Biotechnology, Rockford IL) 및 4M NaCl (2: 1)의 혼합물은 200 이상의 주입에 대하여 칩 상에서 hNGF의 활성을 유지시키는 동안에 결합된 Fab를 효과적으로 제거함을 보였다. HBS-EP 완충액(0.01 M HEPES, pH 7.4, 0.15 NaCl, 3mM EDTA, 0.005% 계면활성제 P29)가 BIAcore 분석법에 대한 러닝 버퍼(running buffer)로서 사용된다. 정제된 Fab 샘플의 일련의 희석액(0.1-10 x 어림된 K_D)이 1분 동안 100 μL/분으로 주입 되고 최대 2시가의 해리 시간이 허용된다. Fab 단백질의 농도는 표준으로서 공지된 농도(아미노산 분석에 의해 결정되는 바와 같이)의 Fab를 이용하여 ELISA 및/또는 SDS-PAGE 전기천공법에 의해 결정된다. 동역학 관련 속도(kon) 및 해리 속도(koff)는 데이터를 BIAevaluation 프로그램을 이용하여 1:1 랭뮤어 결합 모델(Karlsson, R. Roos, H.Fagerstam, L. Petersson, B. (1994)에 적합화시킴으로써 동시에 얻는다. 형형 해리 상수(K_D) 값은 k_{off}/k_{on}으로서 계산된다. 이러한 프로토콜은 인간 NGF, 다른 척추동물(일부 구체에 있어서, 포유동물)(예를 들어,

마우스 NGF, 랫트 NGF, 영장류 NGF와 같은 것)의 NGF를 포함하여 임의의 NGF에 대한 항체의 결합 친화성을 결정하는 용도, 및 예를 들어, 관련 뉴로트로핀 NT3, NT4/5, 및/또는 BDNF와 같은 다른 뉴로트로핀을 포함하는 이용상 적합하다.

[0267] 일부 구체예에서, 항체는 인간 NGF에 결합하며, 다른 척추 동물 종으로부터의 NGF에 현저하게 결합하지 않는다 (일부 구체예에서, 포유동물). 다른 구체예에서, 항체는 다른 척추 동물(일부 구체예에서, 포유동물)로부터의 하나 이상의 NGF 뿐 아니라 인간 NGF에 결합한다. 또 다른 구체예에서, 항체는 NGF에 결합하며 다른 뉴로트로핀 (예를 들어 관련 뉴로트로핀, NT3, NT4/5, 및/또는 BDNF와 같은 것)과 현저하게 상호-작용하지 않는다. 일부 구체예에서, 항체는 적어도 하나의 다른 뉴로트로핀 뿐만 아니라 NGF에 결합한다. 일부 구체예에서, 항체는 예를 들어 말 또는 개와 같은 포유동물 종의 NGF에 결합하지만, 다른 포유동물 종으로부터의 NGF에 현저하게 결합하지 않는다.

[0268] 에피토프는 연속 또는 불연속일 수 있다. 한 구체예에서, 항체는 문헌[Hongo et al., Hybridoma, 19: 215-227(2000)]에서 설명되는 바와 같이 MAb 911, MAb 912, 및 MAb938로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 항체와 동일한 hNGF 에피토프에 본질적으로 결합한다. 다른 구체예에서, 항체는 MAb 911과 동일한 hNGF 에피토프에 본질적으로 결합한다. 또 다른 구체예에서, 항체는 MAb 909와 동일한 에피토프에 본질적으로 결합한다. 상기 인용 문헌[Hongo et al.]. 예를 들어, 에피토프는 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다: hNGF의 가변 영역 1(아미노산 23-35) 내 잔기 K32, K34 및 E35; hNGF의 가변 영역 4(아미노산 81-88) 내 잔기 F79 및 T81; 가변 영역 4 내 잔기 H84 및 K88; hNGF의 가변 영역 5(아미노산 94-98) 및 hNGF의 C-말단(아미노산 111-118) 사이의 잔기 R103; hNGF의 사전-가변 영역 1(아미노산 10-23) 내 잔기 E11; hNGF의 가변 영역2(아미노산 40-49) 및 hNGF의 가변 영역 3(아미노산 59-66) 사이의 Y52; hNGF의 C-말단 내 잔기 L112 및 S113; hNGF의 가변 영역 3 내 잔기 R59 및 R69; 또는 hNGF의 사전-가변 영역 1 내 잔기 V18, V20, 및 G23. 또한, 에피토프는 hNGF의 하나 이상의 가변 영역 1, 가변 영역 3, 가변 영역 4, 가변 영역 5, N-말단 영역, 및/또는 C-말단을 포함할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 항체는 hNGF의 잔기 R103의 용매 접근용이성을 현저하게 감소시킨다. 비록 상기 설명되는 에피토프는 인간 NGF에 관련하더라도, 당업자는 인간 NGF의 구조를 다른 종의 NGF와 정렬하고 이들 에피토프에 적당한 상대물을 동정할 수 있다.

[0269] 한 양태에서, NGF를 억제할 수 있는 항체(예를 들어, 인간, 인간화, 마스, 키메라)는 NGF의 온길이나 또는 부분 서열을 발현하는 면역원을 이용함으로써 제조될 수 있다. 다른 양태에서, NGF를 과잉발현하는 세포를 포함하는 면역원이 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 면역원의 다른 예는 온길이나 NGF 또는 NGF 단백질의 일부를 함유하는 NGF 단백질이다. 항-NGF 길항제 항체는 당업계 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 숙주 동물의 면역화의 루트 및 스케줄은 일반적으로 본원에서 더 설명되는 바와 같이 항체 자극 및 생산에 관한 확립된 전통적 기술을 이용하여 보유되고 있다. 인간 및 마우스 항체의 생산을 위한 일반적 기술은 당업계에 공지되어 있으며 본원에서 설명된다.

[0270] 인간을 포함하는 어떤 포유동물 피험체 또는 그들로부터의 항체 생산 세포는 인간을 포함하는, 포유동물 하이브리도마 셀라인의 생산을 위한 기재로서 작용하도록 조작될 수 있다. 전형적으로, 숙주 동물은 본원에서 설명되는 바와같이 소정량의 면역원이 복막내로, 근육내로, 경구적으로, 피하적으로, 발바닥 내로, 및/또는 진피내로 접종된다.

[0271] 하이브리도마는 문헌[Kohler, B. and Milstein, C. (1975) Nature 256: 495-497]의 일반적 체세포 혼성화 기술을 이용하거나 문헌[Buck, D. W. , et al., In Vitro, 18: 377-381 (1982)]에 의하여 변형된 바와 같이 림프구 및 불멸화 골수종 세포로부터 제조될 수 있다. 이에 한정되지는 않으나 X63-Ag8.653 및 미국 캘리포니아 샌디에고 세포 분포 센터의 Salk 연구소로부터의 것을 포함하는 시중 구매가능한 골수종 라인이 혼성화에 이용될 수 있다. 일반적으로, 상기 기술은 폴리에틸렌 글리콜과 같은 융합유도체(fusogen)를 이용하거나, 당업계 숙련자에게 주지된 전기적 방법에 의하여 골수종 세포 및 림프구 세포를 융합하는 것을 수반한다. 융합 후, 세포는 융합 배지로부터 분리시키고 예를 들어, 히포산틴-아미노피테린-티미딘(HAT) 배지와 같은 선택적 성장 배지에서 성장 시켜서 혼성화되지 않은 부모 세포를 제거한다. 혈청이 보충되거나 혈청이 보충되지 않은 본원에서 설명되는 임의의 배지는 단일클론 항체를 분별하는 하이브리도마를 배양하는데 사용될 수 있다. 세포 융합 기술에 대하여 다른 대안으로서, EBV 불멸 B 세포가 대상 발명의 항-NGF 단일클론 항체를 생산하는데 사용될 수 있다. 원한다면, 하이브리도마는 확장되고 하위 클로닝되며, 상청액은 전통적인 면역분석 과정(예를 들어, 방사성면역분석법, 효소 면역분석법, 또는 형광성 면역분석법)에 의해 항-면역원 활성에 대하여 분석된다.

[0272] 항체의 공급원으로서 사용될 수 있는 하이브리도마는 NGF에 대하여 특이적 오피 단일클론 항체, 또는 그것의 일

부를 생산하는 부모 하이브리도마의 모든 유도체, 자손 세포를 포함한다.

[0273] 이러한 항체를 생산하는 하이브리도마는 공지된 방법을 이용하여 생체 외 또는 생체 내에서 성장될 수 있다. 단일클론 항체는 원한다면, 예를 들어, 황산 암모늄 침전, 겔 전기영동법, 투석, 크로마토그래피, 및 한외여과와 같은 전통적인 면역글로불린 정제 과정에 의해 배양 배지 또는 체액으로부터 단리될 수 있다. 원하지 않던 활성은 만일 존재할 경우, 예를 들어 고체상에 부착된 면역원으로 구성된 흡수제 위에서 제조를 수행하고 면역원이 없는 소망 항체를 용리 또는 방출함으로써 제거될 수 있다. 인간 NGF, 또는 표적 아미노산 서열을 함유하는 단편을 갖는 숙주 동물의 면역은 면역되는 중에 있어서 면역원인 단백질에 결합되는데, 예를 들어, 두가지 기능을 갖거나 유도화 제제를 사용하는 열쇠구멍자조개해모시아닌, 혈청 알부민, 소 감상샘글로불린, 또는 소이빈 트립신 억제제와 같은 것으로서, 예를 들어 말레이미도벤조일 술포숙신이미드 에스테르(시스테인 잔기를 통하여 결합), N-히드록시숙신이미드(리신 잔기를 포함), 글리타타데히드, 숙신 무수물, SOC12, 또는 R1N=C=NR과 같은 것인데, 이 때 R 및 R1은 상이한 알킬 기이며, 항체의 집단(예를 들어, 단일클론 항체)을 생산할 수 있다.

[0274] 원한다면, 관심있는 항-NGF 길항제 항체(단일클론 또는 폴리클론)는 서열화될 수 있고 그 후 폴리뉴클레오티드 서열은 발현 또는 증식을 위하여 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 관심있는 항체를 코딩하는 서열은 숙주 세포 내 벡터에서 유지될 수 있으며 그 후 숙주 세포는 장래의 사용을 위해 팽창되고 냉동될 수 있다. 대안적으로, 폴리뉴클레오티드 서열은 상체를 "인간화"하거나 친화성, 또는 다른 항체의 특성을 향상시키기 위해 유전적 조작에 대하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 불변 영역은 만일 항체가 인간의 임상적 실험 및 치료에 있어서 사용되는 경우 면역 반응을 피하기 위해 보다 유사한 인간 불변 영역으로 처리될 수 있다. NGF에 대한 더 큰 친화성 및 NGF를 억제하는데 있어서 더 큰 효능을 얻기 위해 항체 서열을 유전적으로 조작하는 것이 바람직할 수 있다. 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 변화가 항-NGF 길항제 항체로 제조될 수 있으며 NGF에 대한 그것의 결합 능력이 여전히 유지될 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다.

[0275] 단일클론 항체를 인간화하는 4가지 일반적 단계가 있다. (1) 출발 항체 경 및 중 가변 도메인의 뉴클레오티드 및 예측된 아미노산 서열을 결정하는 단계 (2) 인간화 된 항체를 설계하는 단계, 즉 인간화 과정 동안에 사용하기 위한 항체 외곽구조 영역을 결정하는 단계 (3) 실제상의 인간화 방법론/기술 및 (4) 인간화 항체의 형질감염 및 발현이다. 예를 들어, 미국 특허 제 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692 ; 6,331,415; 5,530,101; 5,693,761; 5,693,762; 5,585,089; 및 6,180,370호를 참조하시오.

[0276] 인간이 아닌 면역글로불린으로부터 유도된 항원-결합 부위를 포함하는 다수의 "인간화 된" 항체 분자가 인간 불변 도메인에 융합된 설치류 또는 변형된 설치류 V 영역 및 그들의 관련 상보성 결정 부위(CDR)를 갖는 키메라 항체를 포함하여 설명됐다. 예를 들어, 문헌[Winter et al. Nature 349: 293-299 (1991), Lobuglio et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 4220-4224 (1989), Shaw et al. JImmunol. 138: 4534-4538 (1987), and Brown et al. Cancer Res. 47: 3577-3583 (1987)]을 참조하시오. 다른 참고문헌은 인간 지지 외곽구조 영역(FR)으로 이식된 후 적절한 인간 항체 불변 도메인과 융합된 설치류 CDR을 설명한다. 예를 들어, 문헌[Riechmann et al. Nature 332: 323-327 (1988), Verhoeyen et al. Science 239: 1534-1536 (1988), and Jones et al. Nature 321: 522-525 (1986)]을 참조하시오. 다른 참고문헌은 제조합적으로 불인 설치류 외곽구조 영역에 의해 지지되는 설치류 CDR을 설명한다. 예를 들어, 유럽 특허 공보 제0519596호를 참조하시오. 이들 "인간화 된" 분자는 인간 레시피언트 내 그들 부분의 치료적 적용의 지속 및 영향력을 제한하는 설치류 항-인간 항체 분자에 대한 원하지 않는 면역학적 반응을 최소화하도록 설계된다. 예를 들어, 항체 불변 영역은 면역학적으로 비활성이도록 처리될 수 있다(예를 들어, 보체 용해를 유발하지 않음). 예를 들어, PCT 공개공보 제 PCT/GB99/01441; 영국 특허 출원 제 9809951.8호를 참조 하시오. 또한 이용될 수 있는 인간화 항체의 다른 방법이 문헌[Daugherty et al., Nucl. Acids Res. 19: 2471-2476 (1991)] 및 미국 특허 제 6,180,377; 6,054,297; 5,997,867; 5,866,692; 6,210,671; 및 6,350,861호; 및 PCT 공개공보 제 W001/27160호에 의해 개시된다.

[0277] 또 다른 대안에서, 완전한 인간 항체는 특이적 인간 면역글로불린 단백질을 발현하도록 처리된 시중 구매가능한 마우스를 이용함으로써 얻을 수 있다. 보다 바람직하거나(예를 들어, 완전한 인간 항체) 또는 보다 강건한 면역 반응을 생산하도록 설계되어 있는 트랜스제닉 동물이 또한 인간화 항체 또는 인간 항체의 생성을 위해 사용될 수 있다. 이러한 기술의 예는 Abgenix, Inc.(Fremont, CA)로부터의 XenomouseTM 및 Medarex, Inc.(Princeton, NJ)로부터의 HuMAb-Mouse[®] 및 TC MouseTM이다.

[0278] 대안으로서, 항체는 제조합적으로 제조될 수 있으며 당업계 공지된 임의의 방법을 이용하여 발현될 수 있다. 다른 대안에서, 항체는 파지 디스플레이 기술에 의해 제조합적으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제

5,565,332; 5,580,717; 5,733,743; 및 6,265,호150; 및 문헌[Winter et al., Annu. Rev. Immunol. 12: 433-455 (1994)]을 참조하시오. 택일적으로 파지 디스플레이 기술(McCafferty et al., Nature 348: 552-553(1990))은 생체 외에서, 비면역된 도너로부터 면역글로불린 가변(V) 도메인 유전자 레파토리로부터 인간 항체 및 항체 단편을 생산하는데 사용될 수 있다. 이러한 기술에 따라서, 항체 V 도메인 유전자는 예를 들어 M13 또는 fd와 같은 필라멘트상 박테리오파지의 주(major) 또는 부(minor) 외피 단백질 유전자내로 프레임에 맞게 클로닝되며, 파지 입자의 표면 상에 기능적 항체 단편으로서 디스플레이 된다. 필라멘트상 입자는 파지 계놈의 단일 가닥 DNA 카피를 함유하기 때문에, 항체의 기능적 특성을 기초로 한 선택으로 상기 특성을 보이는 항체를 코딩하는 유전자도 선택된다. 따라서, 파지는 B 세포의 얼마간의 특성을 모방한다. 파지 디스플레이는 다양한 포맷으로 수행될 수 있는데; 개관을 위해, 예를 들어 문헌[Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3: 564-571 (1993)]을 참조하시오. V-유전자 분획의 몇몇 공급원이 파지 디스플레이를 위해 사용될 수 있다. 문헌[Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991)]은 면역화 된 마우스의 비장로부터 유도된 V 유전자의 소규모 무작위 조합 라이브러리로부터의 항-옥사졸론 항체의 다양한 배열을 단리하였다. 비면역된 인간 도너로부터의 V 유전자의 레파토리가 구성될 수 있으며 항원(자기-항원 포함)의 다양한 배열에 대한 항체는 문헌[Mark et al., J.Mol. Biol. 222: 581-597 (1991), 또는 Griffith et al., EMBO J. 12: 725-734 (1993)]에 의해 설명되는 기술에 따라서 본질적으로 단리될 수 있다. 자연적 면역 반응에서, 항체 유전자는 고비용으로 돌연변이를 축적한다(체세포 과다돌연변이). 도입된 일부 변화는 높은 친화성을 가져올 것이며, 높은 친화성 표면 면역글로불린을 나타내는 B 세포는 우위적으로 복제되며 후속적 항원 공격(challenge) 동안 분화된다. 이러한 자연적 과정은 "사슬 셔플링(shuffling)"과 같이 공지된 기술을 이용함으로써 모방될 수 있다. Marks, et al., *BioTechnol.* 10: 779-783(1992)). 이 방법에서, 파지 디스플레이에 의해 얻은 "초기" 인간 항체의 친화성은 비면역된 도너로부터 얻은 V 도메인 유전자의 천연 발생 변이체(레파토리)의 레파토리를 갖는 중쇄 및 경쇄 V 영역 유전자를 순차적으로 치환함으로써 향상될 수 있다. 이러한 기술은 pM-nM 범위의 친화성을 갖는 항체 및 항체 단편의 생산을 허용한다. 매우 큰 파지 항체 레파토리(또한 "모든 라이브러리의 모체(the mother-of-all libraries)"로 알려짐)를 제조하기 위한 전략은 문헌[Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.* 21: 2265-2266 (1993)]에 의해 설명됐다. 유전자 셔플링은 또한 설치류 항체로부터 인간 항체를 유도하는데 사용될 수 있으며, 여기서 인간 항체는 출발 설치류 항체와 유사한 친화성 및 특이성을 가진다. "에피토프 각인"으로도 불리는 이러한 방법에 따라서, 파지 디스플레이 기술에 의해 얻은 설치류 항체의 중쇄 또는 경쇄 V 도메인 유전자가 인간 V 도메인 유전자의 레파토리로 바뀐 설치류-인간 키메라가 생성된다. 항원에 대한 선택을 통해 기능적 항원 결합 부위, 즉 파트너의 선택을 지배(각인)하는 에피토프를 복구시킬 수 있는 인간 가변체가 단리된다. 이러한 과정이 순차적으로 반복되어 잔여의 설치류 V 도메인을 변화시키는 경우, 인간 항체가 얻어진다 (1993년 4월 1일자로 공개된 PCT 공개공보 제 WO 93/06213호 참조). CDR 이식에 의한 설치류 항체의 전통적인 인간화와는 달리, 상기 기술은 설치류 기원의 외곽구조 또는 CDR 잔기가 없는 완전한 인간 항체를 제공한다.

[0279] 비록 상기 논의가 인간화 항체에 관련하더라도, 논의된 일반적인 원리는 예를 들어, 개, 고양이, 영장류, 말 및 소에 있어서의 사용을 위해 항체를 주문제작하는데 적용가능한 것이 명백하다. 본원에서 설명된 항체를 인간화하는 하나 이상의 양태는 예를 들어, CDR 이식, 외곽구조 돌연변이 및 CDR 돌연변이와 같은 것이 조합될 수 있다.

[0280] 항체는 우선 숙주 세포로부터의 항체와 항체 생산 세포를 단리하고, 상기 유전자 서열을 얻고, 숙주 세포 내에서(예를 들어, CHO 세포) 재조합적으로 항체를 발현하기 위해 상기 유전자 서열을 이용함으로써 재조합적으로 제조될 수 있다. 이용될 수 있는 다른 방법은 식물(예를 들어, 담배) 또는 트랜스제닉 우유에서 항체 서열을 발현시키는 것이다. 식물 또는 우유에서 재조합적으로 항체를 발현시키는 방법이 개시됐다. 예를 들어, 문헌 [Peeters, et al. *Vaccine* 19: 2756 (2001); Lonberg, N. and D. Huszar *Int. Rev. Immunol* 13: 65 (1995); and Pollock, et al., *J Immunol Methods* 231: 147 (1999)]을 참조하시오. 항체의 유도체, 예를 들어 인간화, 단일 사슬 등을 만드는 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0281] 형광 활성화 세포 분류(FACS)와 같은 면역 분석 및 흐름 세포 측정 분류 기술이 또한 NGF에 대하여 특이적인 항체를 단리하는데 이용될 수 있다.

[0282] 항체는 많은 상이한 담체에 결합될 수 있다. 담체는 활성 및/또는 비활성일 수 있다. 주지된 담체의 예는 폴리프로필렌, 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 텍스트란, 나일론, 아밀라제, 유리, 중성 및 변형된 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 아가로스 및 자철광을 포함한다. 담체의 성질은 본 발명의 목적을 위하여 가용성 또는 불용성일 수 있다. 당업자는 항체를 결합하기 위한 다른 적합한 담체를 알거나, 일상적인 실험을 이용하여 이를 확인할 수 있을 것이다. 일부 구체예에서, 담체는 심근을 표적하는 부분을 포함한다.

- [0283] 단일클론 항체를 코딩하는 DNA는 용이하게 단리되며 전통적인 과정(예를 들어, 단일클론 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 이용함으로써)을 이용하여 서열화된다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로 알맞다. 일단 단리되면, DNA는 발현 벡터(예를 들어 PCT 공개공보 제WO 87/04462호에 개시된 바와 같이) 내로 위치될 수 있으며, 그 후 면역글로불린 단백질질을 그 외에 생산하지 않는 E.Coli 세포, 원숭이 COS 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 골수종 세포와 같은 숙주 세포 내로 형질감염되어, 재조합 숙주 세포 내에서 단일클론 항체의 합성을 달성한다. 예를 들어, PCT 공개공보 제 WO 87/04462호를 참조하십시오. DNA는 또한 예를 들어, 동일한 뮤린 서열의 위치에서 사람 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 치환함으로써, Morrison et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 81: 6851 (1984), 또는 면역글로불린 코딩 서열에 비면역글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 모두 또는 일부를 공유결합적으로 결합시킴으로써 변형될 수 있다. 상기 방식에서, "키메라" 또는 "하이브리드" 항체는 본원에서 항-NGF 단일클론 항체의 결합 특이성을 갖도록 제조된다.
- [0284] 항-NGF 길항제 항체는 당업계에 주지된 방법을 이용하여 특성화될 수 있다. 예를 들어, 한 방법은 그것이 결합하는 에피토프를 동정하는 것, 또는 "에피토프 맵핑(mapping)"이다. 예를 들어 문헌[Chapter 11 of Harlow and Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harb 또는 Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999]에 설명된 바와 같이, 항체-항원 복합체의 결정 구조를 용해하는 것, 경쟁 분석법, 유전자 단편 발현 분석법, 및 합성 펩티드를 기재로 한 분석법을 포함하여, 단백질 상 에피토프 위치를 맵핑하고 특성화하는 당업계에 공지된 많은 방법이 있다. 추가적 예에서, 에피토프 맵핑은 항-NGF 길항제 항체가 결합하는 서열을 결정하는데 사용될 수 있다. 에피토프 맵핑은 예를 들어, 펩스캔 시스템(Pepscan Systems)(Edelhartweg 15,8219 PH Lelystad, The Netherlands)과 같은 각종 공급원으로부터 시중 구매가능하다. 에피토프는 선형 에피토프, 즉 아미노산의 단일 신장에 함유된 것, 또는 단일 신장에 필수적으로 함유되지 않는 수 있는 아미노산의 3차원 상호작용에 의해 형성된 구조적 에피토프일 수 있다. 다양한 길이의 펩티드(예를 들어, 적어도 약 4-6 아미노산 길이)는 단리되거나 합성될 수 있으며(예를 들어, 재조합적으로) 항-NGF 길항제 항체와 함께 결합 분석에 대하여 사용될 수 있다. 다른 실시예에서, 항-NGF 길항제 항체가 결합하는 에피토프는 NGF 서열로부터 유도된 중첩 펩티드를 이용하여 항-NGF 길항제 항체에 의한 결합으로 결정함으로써 전체 스크리닝에 있어서 결정될 수 있다. 유전자 단편 발현 분석법에 따르면, NGF를 코딩하는 열린 판독 프레임은 무작위로 또는 특이적 유전적 구조에 의해 단편화되고 NGF의 발현된 단편의 테스트되는 항체와의 반응성이 결정된다. 유전자 단편은 방사성 아미노산의 존재하에, 예를 들어, PCR에 의해 생산된 후 전사되고 시험관 내에서 단백질로 번역된다. 그 후 방사성 표지된 NGF 단편에 대한 항체의 결합은 면역침전 및 겔 전기영동법에 의해 결정된다. 특정한 에피토프는 또한 파지 입자(파지 라이브러리)의 표면 상에 디스플레이 된 무작위 펩티드 서열의 큰 라이브러리를 이용하여 동정될 수 있다. 택일적으로, 펩티드 단편을 중첩하는 한정된 라이브러리가 간단한 결합 분석에 있어서 테스트 항체에 결합하기 위해 테스트될 수 있다. 추가적 실시예에서, 항원 결합 도메인의 돌연변이, 도메인 교환 실험 및 알려진 스캐닝 돌연변이가 에피토프 결합에 있어서 필요하고, 충분하며, 및/또는 필수적인 잔기를 동정하기 위해 수행될 수 있다. 예를 들어, 도메인 교환 실험은 NGF 폴리펩티드의 각종 단편이 인접 연관되었지만, 항원적으로 구별되는 단백질(예를 들어 뉴로트로핀 단백질 과(family)의 다른 구성원과 같은 것)로부터의 서열로 치환된(교환된) 돌연변이 NGF를 이용하여 수행될 수 있다. 돌연변이 NGF에 대한 항체의 결합을 평가함으로써, 항체 결합에 대한 특정 NGF 단편의 중요성이 평가될 수 있다.
- [0285] 항-NGF 길항제 항체를 특성화하는데 이용될 수 있는 또 다른 방법은 항-NGF 길항제 항체가 다른 항체와 동일한 에피토프에 결합하는지 여부를 측정하기 위해, 동일한 항원, 즉 NGF 상 각종 단편에 결합하는 것으로 공지된 다른 항체를 포함하는 경쟁 분석법을 이용하는 것이다. 경쟁 분석법은 당업자에게 주지되어 있다. 본 발명에 대한 경쟁 분석법에서 사용될 수 있는 항체의 예는 문헌[Hongo, et al., Hybridoma 19: 215-227 (2000)]에서 설명되는 바와 같이 Mab 911, 912, 938를 포함한다.
- [0286] 발현 벡터는 항-NGF 길항제 항체의 발현을 지시하는데 사용될 수 있다. 당업자는 생체 내 외인성 단백질의 발현을 달성하기 위해 발현 벡터의 투여에 친숙하다. 예를 들어, 미국 특허 제6,436,908 ; 6,413,942 ; 및 6,376,471호를 참조하십시오. 발현 벡터의 투여는 주사, 경구적 투여, 입자 총 또는 카테터삽입 투여를 포함하는 국부적 또는 전신적 투여, 및 국소적 투여를 포함한다. 다른 구체예에서, 발현 벡터는 교감신경 줄기 또는 신경절로, 또는 심장 동맥, 심방, 심실, 또는 심장막으로 직접 투여된다.
- [0287] 발현 벡터, 또는 서브게노믹(subgenomic) 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 치료 조성물의 표적된 전달이 이용될 수 있다. 수용체-매개 DNA 전달 기술은 예를 들어, 문헌[Findeis et al., Trends Biotechnol. (1993) 11: 202; Chiou et al., Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J. A. Wolff, ed.)

(1994); Wu et al., J. Biol. Chem. (1988) 263: 621; Wu et al., J. Biol. Chem. (1994) 269: 542; Zenke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87: 3655; Wu et al., J. Biol. Chem. (1991) 266:338]에서 설명된다. 폴리뉴클레오티드를 함유하는 치료 조성물은 유전자 치료 프로토콜에 있어서 국부적 투여를 위하여 약 100 ng 내지 약 200 mg의 DNA의 범위로 투여된다. 약 500 ng 내지 약 50 mg, 약 1 μ g 내지 약 2 mg, 약 5 μ g 내지 약 500 μ g, 및 약 20 μ g 내지 약 100 μ g의 DNA가 또한 유전자 치료 프로토콜 중에 사용될 수 있다. 치료상의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드는 유전자 전달 비히클을 이용하여 전달될 수 있다. 유전자 전달 비히클은 바이러스성 또는 비-바이러스성 기원일 수 있다(일반적으로 문헌[Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1:51 ; Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5: 845; Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1: 185; and Kaplitt, Nature Genetics (1994) 6: 148]) 참조). 이러한 코딩 서열의 발현은 내인성 포유동물 또는 이종 프로모터를 이용하여 유도될 수 있다. 코딩 서열의 발현은 구조적이거나 조절될 수 있다.

[0288] 소망 폴리뉴클레오티드의 전달 및 소망 세포 내 발현을 위한 바이러스 기재 벡터는 당업계에 주지되어 있다. 전형적인 바이러스 기재 비히클은 이에 한정되지는 않으나, 제조함 레트로바이러스(예를 들어, PCT 공개공보 제 WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; 미국 특허 제 5,219,740 및 4,777, 127; 영국 특허 제 2,200,651 ; 및 유럽 특허 제 0 345 242를 참조), 알파바이러스 기재 벡터(예를 들어, Sindbis 바이러스 벡터, Semliki 숲 바이러스(ATCC VR-67; ATCC VR-1247), Ross 강 바이러스(ATCC VR-373; ATCC VR- 1246) 및 베네수엘라 말 너염 바이러스(ATCC VR-923 ; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), 및 아데노 연관된 바이러스(AAV) 벡터(예를 들어, , PCT 공개공보 제 WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191 ; WO 94/28938 ; WO 95/11984 및 WO 95/00655호 참조). 문헌[Curriel, Hum. Gene Ther. (1992) 3: 147]에서 설명되는 바와 같이 사멸 아데노바이러스에 연결된 DNA의 투여가 또한 이용될 수 있다.

[0289] 비-바이러스성 전달 비히클 및 방법이 또한 이용될 수 있는데, 이에 한정되지는 않지만, 사멸 아데노바이러스 단독에 연결되거나 또는 연결되지 않은 다중양이온 응축 DNA(예를 들어, 문헌[Curriel, Hum. Gene Ther. (1992) 3: 147] 참조); 리간드 연결된 DNA(예를 들어, 문헌[Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264: 16985] 참조); 진핵생물 세포 전달 비히클 세포(예를 들어 미국 특허 제5,814,482호; PCT 공개공보 제 WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; 및 WO 97/42338호 참조) 및 핵전하 중화 또는 세포막과의 융합을 포함한다. 또한 나출 DNA가 사용될 수 있다. 전형적인 나출 DNA 도입 방법이 PCT 공개공보 제 WO 90/11092 및 미국 특허 제 5,580,859호에서 설명된다. 유전자 전달 비히클로서 작용할 수 있는 리포솜이 미국 특허 제5,422,120호; PCT 공개공보 제 WO 95/13796; WO94/23697; WO91/14445; 및 유럽특허 0524968호에서 설명된다. 추가적 접근법은 문헌[Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14: 2411, and in Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:1581]에서 설명된다.

[0290] 항-NGF 길항제 항체의 동정

[0291] 항-NGF 길항제 항체는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 동정되거나 특징화될 수 있으며, 이로써 NGF 생물학적 활성의 감소, 개선, 또는 중화가 검출 및/또는 측정된다. 예를 들어, 미국 특허 제 5,766,863 및 5,891,650에서 설명된 키나제 수용체 활성(KIRA) 분석법이 항-NGF 제제를 동정하는데 사용될 수 있다. 이들 ELISA-유형 분석법은 수용체 단백질 티로신 키나제의 키나제 도메인(이하 "rPTK"), 예를 들어 TrkA 수용체의 자가인산화를 측정함으로써 키나제 활성의 정성적 또는 정량적 측정, 및 선택된 rPTK, 예를 들어 TrkA의 장래의 길항제에 대한 동정화 및 측정화에 있어서 적합하다. 분석의 첫번째 단계는 키나제 수용체의 키나제 도메인, 예를 들어 TrkA 수용체의 인산화를 수반하는데, 이 때 수용체는 진핵생물 세포의 세포 막 내에 존재한다. 수용체는 내인성 수용체 또는 수용체를 코딩하는 핵산일 수 있으며, 또는 수용체 구조는 세포 내로 형질전환될 수 있다. 전형적으로, 1차 고체상(예를 들어, 1차 분석 플레이트의 웰)은 이러한 세포(일반적으로 포유동물 셀라인)의 실질적으로 균질한 집단으로 코딩되어서 세포가 고체상에 부착한다. 종종, 세포가 부착되면 그로써 1차 고체상에 자연적으로 부착한다. 만일 "수용체 구조"가 사용된다면, 그것은 일반적으로 키나제 수용체 및 플래그(flag) 폴리펩티드의 융합을 포함한다. 플래그 폴리펩티드는 분석의 ELISA 부에서, 포획제, 종종 포획 항체에 의해 인지된다. 그 후 후보물질 항-NGF 길항제 항체와 같은 분석 대상 물질(analyte)을 부착 세포를 갖는 웰에 NGF와 함께 첨가하여, 이러한 티로신 키나제 수용체(예를 들어, TrkA 수용체)가 NGF 및 분석 대상 물질에 노출된다(또는 접촉된다). 상기 분석법은 그것의 리간드 NGF에 의해 TrkA의 활성을 억제하는 항체의 동정을 가능케 한다. NGF 및 분석 대상 물질에 대한 노출 후, 부착 세포가 용해 완충액(여기에 용해화 세제를 포함함) 및 부드러운 교반을 이용하고, 이로써 세포 용해질의 농축 또는 정화의 필요없이, 직접 분석법의 ELISA 부에 복종될 수 있는 세포 용해질을 방출함으로써 용해된다.

[0292] 따라서 제조된 세포 용해질은 분석의 ELISA 단계에 복종되도록 준비된다. ELISA 단계의 1차 단계인 2차 고체상(일반적으로 ELISA 마이크로타이타 플레이트의 웰)는 티로신 키나제 수용체에 또는, 수용체 구성의 경우에 있어

서, 플레그 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 포획제(중중 포획 항체)로 코팅된다. 2차 고체상의 코팅은 포획제가 2차 고체상에 부착하도록 수행된다. 포획제는 일반적으로 본원의 실시예에서 설명되는 바와 같이 단일클론 항체이지만, 폴리클론 항체가 사용될 수도 있다. 그 후 획득한 세포 용해질을 부착 포획제에 노출시키거나, 접촉시켜서 수용체 또는 수용체 구조를 2차 고체상에 부착시킨다(또는 포획시킨다). 그 후 포획된 수용체 또는 수용체 구조를 남겨둔 채, 결합되지 않은 세포 용해질을 제거하기 위해 세척 단계가 수행된다. 그 후 부착성 또는 포획된 수용체 또는 수용체 구조를 티로신 키나제 수용체 내 인산화 된 티로신 잔기를 동정하는 항-포스포티로신 항체에 노출시키거나, 접촉시킨다. 한 구체예에서, 항-포스포티로신 항체는 비-방사성 색 시약의 색 변화를 촉매작용하는 효소에 (직접 또는 간접적으로) 결합된다. 따라서, 수용체의 인산화는 상기 시약의 후속적인 색변화에 의해 측정될 수 있다. 효소는 항-포스포티로신 항체에 직접 결합할 수 있거나, 또는 결합 분자(예를 들어, 비오틴)가 항-포스포티로신 항체에 결합될 수 있으며 후속하여 상기 효소는 결합 분자를 통하여 항-포스포티로신 항체에 결합할 수 있다. 마지막으로, 항-포스포티로신 항체의 포획된 수용체 또는 수용체 구조에 대한 결합은 예를 들어, 색 시약의 색변화에 의해 측정된다.

[0293] 항-NGF 길항제 항체는 또한 NGF를 포함하는 후보물질 제제를 배양하고 하나 이상의 다음 특징 중 어떤 것을 모니터링함으로써 동정될 수 있다: (a) NGF에 결합하고 NGF 생물학적 활성 또는 NGF 신호화 작용에 의해 매개되는 다운스트림 경로를 억제하는 것; (b) NGF 수용체 활성화를 억제, 차단 또는 감소시키는 것(TrkA 이량체화 및/또는 자가인산화 포함); (c) NGF의 제거를 증가시키는 것; (d) 어떤 양태의 류마티스 관절염 통증 또는 골관절염 통증을 치료 또는 예방하는 것; (e) NGF 합성, 생산 또는 방출을 억제(감소)하는 것. 일부 구체예에서, 항-NGF 길항제 항체는 후보물질 제제를 NGF와 함께 배양하고 결합 및/또는 NGF의 생물학적 활성의 수반하는 감소 또는 중화를 모니터링함으로써 동정된다. 결합 분석은 정제된 NGF 폴리펩티드, 또는 NGF 폴리펩티드를 천연 발현하거나, 발현시키기 위해 형질감염되는 세포를 이용하여 수행될 수 있다. 한 구체예에서, 결합 분석은 경쟁적 결합 분석이며, 여기서 NGF 결합에 대하여 공지된 항-NGF 길항제와 경쟁하는 후보물질 항체의 능력이 평가된다. 분석은 ELISA 포맷을 포함하는 각종 포맷으로 수행될 수 있다. 다른 구체예에서, 항-NGF 길항제 항체는 후보물질 제제를 NGF와 배양시키고 결합 및 trkA 수용체 이량체화 및/또는 자가인산화의 수반하는 억제를 모니터링함으로써 동정된다.

[0294] 초기의 동정 이후, 후보물질 항-NGF 길항제 항체의 활성은 더 확증될 수 있고 표적된 생물학적 활성을 테스트하는 것으로 공지된 생물학적 분석에 의해 정련될 수 있다. 택일적으로, 생물학적 분석은 후보물질을 직접 스크리닝 하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, NGF는 반응하는 세포에서 많은 형태학적으로 인지가 가능한 변화를 촉진한다. 이들은 이에 한정되지는 않으나, PC12 세포의 분화를 촉진하고 이들 세포로부터의 신경돌기의 성장을 증가시키며(Greene et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 73 (7): 2424-8, 1976), 반응 감각 및 교감 신경절의 체외이식으로부터 신경돌기 부산물을 촉진하고(Levi-Montalcini, R. and Angeletti, P. Nerve growth factor. Physiol. Rev. 48: 534-569, 1968) 예를 들어 배아 후근 신경절, 삼차신경 신경절, 또는 교감 신경절 뉴런과 같은 NGF 의존성 뉴런의 생존을 촉진하는 것(예를 들어, Chun & Patterson, Dev. Biol. 75:705-711, (1977); Buchman & Davies, Development 118: 989-1001 (1993)을 포함한다. 따라서, NGF 생물학적 활성의 억제를 위한 분석은 예를 들어 후보물질 항-NGF 길항제 항체와 같은 분석 대상 물질을 더한 NGF와 NGF 반응성 세포를 배양시키는 것을 수반한다. 적당한 시간 후에, 세포 반응이 분석될 것이다(세포 분화, 신경돌기 부산물 또는 세포 잔존).

[0295] NGF의 생물학적 활성을 차단하거나 중화하기 위한 후보물질 항-NGF 길항제 항체의 능력은 또한 문헌[Hongo et al., Hybridoma 19: 215-227 (2000)]에 설명되는 바와 같이 배아 랫트 후근 신경절 생존 생물학적 분석에 있어서 NGF 매개된 생존을 억제하는 후보물질 제제의 능력을 모니터링함으로써 평가될 수 있다.

[0296] 항-NGF 길항제 항체의 투여

[0297] 항-NGF 길항제 항체는 어떤 적합한 루트를 통해 개체로(예를 들어 류마티스 관절염 및 골관절염) 투여될 수 있다. 본원에서 설명되는 실시예는 이용가능한 기술을 제한하고자 하지는 않으나 예증하는 것임이 당업자에게 명백해야 한다. 따라서, 일부 구체예에서, 항-NGF 길항제 항체는 예를 들어, 볼러스(bolus) 또는 시간의 기간에 걸쳐서 연속적인 주입에 의한 정맥 내 투여, 근육 내, 복막 내, 대뇌척수 내, 피하, 관절 내, 설하, 운할 내에 의함과 같은 공지된 방법에 따라서 통기술, 경막내, 경구적 또는 국소적 루트를 통하여 개체로 투여된다. 투여는 예를 들어 정맥 내 투여와 같이 전신적일 수 있거나, 국부적일 수 있다. 분사 분무기 및 초음파 분무기를 포함하는 액체 조성물에 대한 상업적으로 이용가능한 분무기가 투여를 위해 사용된다. 액체 조성물은 직접 분무될 수 있고 냉동건조된 분말은 재건 후 분무될 수 있다. 택일적으로, 항-NGF 길항제 항체는 탄화불소 조성물 및 미

터화된 투여량 흡입기를 이용하여 에어로졸화 될 수 있거나, 냉동건조되고 분쇄된 분말로서 흡입될 수 있다.

- [0298] 한 구체예에서, 항-NGF 길항제 항체는 부위-특이적 또는 표적된 국부적 전달 기술을 통하여 투여된다. 부위-특이적이거나 표적된 국부적 전달 기술의 예는 예를 들어, 주입 카테터, 내재 카테터, 또는 침 카테터, 합성 이식, 외부 덮개(adventitial wrap), 단락(shunt) 및 부목(stent) 또는 기타 이식가능한 장치, 부위 특이적 담체, 직접 주입, 또는 직접 적용과 같은 항-NGF 길항제 항체의 다양한 이식가능한 저장소 공급원 또는 국부적 전달 카테터를 포함한다. 예를 들어, PCT 공개공보 제 WO 00/53211호 및 미국 특허 제 5,981,568호를 참조하시오.
- [0299] 항-NGF 길항제 항체의 다양한 조성물이 투여를 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 항-NGF 길항제 항체가 그대로 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 항-NGF 길항제 항체 및 약학적으로 허용가능한 부형제는 다양한 조성물일 수 있다. 약학적으로 허용가능한 부형제는 당업계에 공지되어 있으며, 약리학적으로 유효한 물질의 투여를 용이하게 하는 비교적 비활성 물질이다. 예를 들어, 부형제는 형태나 농도를 제공하거나, 또는 희석액으로서 작용할 수 있다. 적합한 부형제는 이에 한정되지는 않지만 안정화제, 습윤 및 에멀전화제, 다양한 오스몰농도르르위한 염, 캡슐화제, 완충액, 및 피부 침투 증강제를 포함한다. 비경구적 및 경구적 약물 전달을 위한 부형제 및 조성물이 상기 문헌[Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000)]에 있다.
- [0300] 일부 구체예에서, 이들 제제는 주입(예를 들어, 복막내, 정맥내, 피하, 근육내 등)에 의한 투여를 위해 제형된다. 따라서, 이들 제제는 식염수, 링거액, 텍스트로스 용액 등과 같은 약학적으로 허용가능한 비히클과 혼합될 수 있다. 특정 투여량 요법, 즉 투여량, 타이밍 및 반복은 특정 개체 및 개체의 의학적 히스토리에 의존적일 것이다.
- [0301] 항-NGF 항체는 주입(예를 들어, 복막내, 정맥내, 피하, 근육내 등)을 포함하는 어떤 적합한 방법을 이용하여 투여될 수 있다. 항-NGF 항체는 본원에서 설명되는 바와 같이, 흡입을 통하여 투여될 수도 있다. 일반적으로, 항-NGF 항체의 투여를 위해, 초기의 후보물질 투여량은 약 2 mg/kg일 수 있다. 본 발명의 목적을 위해, 전형적인 매일의 투여량은 상기 언급되는 인자들에 따라서, 약 1 μ g/kg 내지 3 μ g/kg 내지 30 μ g/kg 내지 300 μ g/kg 내지 3 mg/kg 중 임의의 것으로부터, 30 mg/kg 내지 100 mg/kg 또는 그 이상에 이르도록 분포할 수 있다. 예를 들어, 항-NGF 항체는 약 1 μ g/kg, 약 10 μ g/kg, 약 20 μ g/kg, 약 50 μ g/kg, 약 100 μ g/kg, 약 200 μ g/kg, 약 500 μ g/kg, 약 1 mg/kg, 또는 약 2 mg/kg으로 투여될 수 있다. 몇일 또는 그 이상에 걸쳐서 반복 투여를 위해, 상태에 따라서, 치료는 원하던 증상의 억압이 발생하거나 충분한 치료 수준이 통증을 감소하도록 달성될 때 까지 유지된다. 전형적인 투여량 요법은 약 2 mg/kg의 초기 투여량을 투여한 후, 항-NGF 항체의 약 1 mg/kg의 투여량을 일주일까지 유지시키거나, 약 1 mg/kg의 투여량을 격주로 유지시키는 것을 포함한다. 그러나, 실행자가 달성하기 원하는 양리학적 봉괴의 패턴에 따라서, 다른 투여량 요법이 유용할 수도 있다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 일주일에 1-4회의 투여량이 고려되나. 이러한 치료 프로그램은 전통적인 기술 및 분석법에 의해 용이하게 모니터링된다. 투여량 요법(사용된 NGF 길항제 포함)은 시간에 걸쳐서 다양할 수 있다.
- [0302] 본 발명의 목적을 위해, 항-NGF 길항제 항체의 적절한 투여량은 사용되는 항-NGF 길항제 항체(또는 그의 조성물), 치료될 통증의 유형 및 심각성, 제제가 예방 목적 또는 치료 목적으로 투여되는지의 여부, 사전 치료, 환자의 임상적 히스토리 및 제제에 대한 반응, 및 주치의의 분별력에 좌우될 것이다. 전형적으로, 임상적은 원하는 결과를 달성하는 투여량에 도달할 때 까지 항-NGF 길항제 항체를투여할 것이다. 투여량 및/또는 빈도는 치료의 과정에 따라서 다양할 수 있다.
- [0303] 반감기와 같은 경험적인 고려는 일반적으로 투여량의 결정에 도움이 될 것이다. 예를 들어, 인간화 항체 또는 완전한 인간 항체와 같이, 인간 면역계과 호환가능한 항체는 항체의 반감기를 연장하고 항체가 숙주 면역계에 의해 공격받는 것을 막는데 이용될 수 있다. 투여의 빈도는 치료의 경로에 따라서 결정되고 조절되며, 일반적으로, 그러나 필수적이지는 않게, 통증의 치료 및/또는 억제 및/또는 개선 및/또는 지연에 기초한다. 택일적으로, 항-NGF 길항제 항체의 서방출성 연속 조성물이 적절할 수도 있다. 서방출성을 달성하기 위한 각종 조성물 및 장치는 당업계에 공지되어 있다.
- [0304] 한 구체예에서, 항-NGF 길항제 항체의 투여량은 항-NGF 길항제 항체의 하나 이상의 투여가 제공되는 개체 내에서 경험적으로 결정될 수도 있다. 개체는 항-NGF 길항제 항체의 증가적 투여량을 제공받는다. 항-NGF 길항제 항체의 효험을 평가하기 위해, 통증의 표시기가 따를 수 있다.
- [0305] 본 발명의 방법에 따르는 항-NGF 길항제 항체의 투여는 예를 들어, 레시피언트의 생리학적 상태, 투여의 목적이

치료인지 또는 예방인지의 여부, 및 숙련된 실행자에 공지된 다른 요인들에 따라서 연속적 또는 간헐적일 수 있다. 항-NGF 길항제 항체의 투여는 미리 선택된 시간의 기간에 걸쳐서 본질적으로 연속적일 수 있거나 일련의 간격을 둔 투여, 예를 들어, 통증 발생의 전, 동안, 또는 후; 전; 동안; 전 및 후; 동안 및 후; 전 및 동안; 또는 통증 발생의 전, 동안, 및 후 일수 있다.

[0306] 일부 구체예에서, 하나 이상의 항-NGF 길항제 항체가 존재할 수 있다. 적어도 하나, 적어도 둘, 적어도 셋, 적어도 넷, 적어도 다섯 각각, 또는 그 이상의 항-NGF 길항제 항체가 존재할 수 있다. 일반적으로, 이들 항-NGF 길항제 항체는 서로 불리한 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 가진다.

[0307] 본 발명에 따라서 이용되는 항-NGF 길항제 항체의 치료 조성물은 원하는 순도를 갖는 항체를 선택적인 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합함으로써(Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000)), 동결건조된 제형 또는 액상 용약의 형태로 저장을 위해 제조된다. 허용가능한 담체, 부형제, 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 레시피언트에게 비독성이며, 인산염, 시트르산염, 및 기타 유기산과 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 염; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제(예를 들어 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토니움 클로라이드; 벤잘코니움 클로라이드, 벤제토니움 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레졸과 같은 것); 저분자량(약 10 잔기 이하) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 폴리머; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신과 같은 아미노산; 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린을 포함하는 당당류, 이당류, 및 기타 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트제; 수크로스, 만니톨, 트리할로스 또는 소르비톨과 같은 당; 나트륨과 같은 염-형성 반대이온; 금속 착체(예를 들어, Zn-단백질 착체); 및/또는 TWEENTM, PLURONICSTM 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비이온성 계면활성제를 포함할 수 있다.

[0308] 항-NGF 길항제 항체를 함유하는 리포솜은 예를 들어 [Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688 (1985) ; Hwang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030 (1980); 및 미국 특허 제 4,485,045 및 4,544,545]에 기재된 바와 같이, 당업계 공지된 방법에 의해 제조된다. 증가된 순환 시간을 갖는 리포솜이 미국 특허 제 5,013,556호에서 개시된다. 특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도된 포스파티딜에탄올아민(PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 이용하는 역상 증발법에 의해 생성될 수 있다. 리포솜은 한정된 구멍 크기의 필터를 통과하여 분출되어서 소망 직경을 갖는 리포솜을 수득한다. 활성 성분은 또한 콜로이드 약물 전달 시스템(예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로캡슐, 마이크로에멀전, 나노-입자 및 나노캡슐) 또는 마크로에멀전 내에서 예를 들어, 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로 캡슐, 예를 들어 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타실레이트) 마이크로캡슐 각각에 포획될 수도 있다. 이러한 기술은 문헌[Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000)]에서 개시된다.

[0309] 서방출성 조성물이 제조될 수 있다. 서방출성 제조의 적합한 예는 매트릭스가 예를 들어, 필름 또는 마이크로캡슐과 같은 모양형성된 품목의 형태인 항체를 함유하는 고체 소수성 폴리머의 반투성 매트릭스를 포함한다. 서방출성 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔(예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 '폴리(비닐알콜)'), 폴리락티드(미국 특허 제 3,773,919호), L-글루탐산 및 7 에틸-L-글루타메이트, 비-분해가능한 에틸렌-비닐 아세테이트의 공중합체, 예를 들어 LUPRON DEPOT TM(락트산-클리콜산 공중합체 및 류프롤라이드 아세테이트로 구성된 주사가 가능한 마이크로캡슐)과 같은 분해가능한 락트산-클리콜산 공중합체, 수크로스 아세테이트 이소부티레이트, 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다.

[0310] 생체 내 투여를 위해 이용되는 조성물은 무균이어야 한다. 이것은 예를 들어, 무균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 이루어진다. 치료적 항-NGF 길항제 항체 조성물은 일반적으로 무균 접근 포트를 구비하는 용기 내에 위치되는데, 이것은 예를 들어, 정맥 내 용액 주머니 또는 바이알로서, 피하용 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 멈춤장치를 구비한다.

[0311] 본 발명에 따르는 조성물은 비경구적 또는 항문 투여, 또는 흡입(inhalation)이나 불어넣기(insufflation)에 의한 투여를 위하여, 예를 들어 정제, 환약, 캡슐, 분말, 알갱이, 용액 또는 현탁액, 또는 좌약과 같은 유닛 투여량 형태일 수 있다.

[0312] 정제와 같은 고체 조성물을 제조하기 위해, 주요 활성 성분을 약학적 담체, 예를 들어, 옥수수 전분, 락토스, 수크로스, 소르비톨, 활성, 스테아르산, 마그네슘 스테아르산염, 인산염 이칼슘 또는 고무질, 및 다른 약학적 희석제, 예를 들어 물과 혼합하여, 본 발명의 화합물의 균질 혼합물을 함유하는 사전 제형 조성물, 또는 그것의

비독성의 약학적으로 허용가능한 염을 형성한다. 이들 사전 제형 조성물을 균질한 것으로 언급할 경우, 그것은 활성 성분이 조성물을 통하여 균등하게 분포되어서 조성물이 정제, 환약 및 캡슐과 같은 동일하게 효험있는 유닛 투여량 형태로 용이하게 세분될 수 있음을 의미한다. 그 후 이 고체 사전 제형 조성물은 본 발명의 활성 성분의 0.1 내지 약 500 mg을 함유하는 상기 설명된 유형의 유닛 투여량 형태로 세분된다. 신규한 조성물의 정제 또는 환약은 연장된 작용의 이점을 제공하는 투여량 형태를 제공하도록 코팅되거나 조제될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 환약은 내부 투여 및 외부 투여 구성성분을 포함할 수 있는데, 전자는 후자 위의 덮개의 형태로 존재한다. 상기 2가지 구성성분은 위에서의 분해를 저지하고 내부 구성성분이 손상되지 않은 채로 샘창자 내로 통과하도록 허락하거나 방출이 지연되도록 작용하는 장의 층에 의해 분리될 수 있다. 다양한 물질이 이러한 장 층 또는 코팅을 위해 이용될 수 있는데, 이러한 물질은 다수의 중합체의 산 및 셀락, 세틸 알콜 및 셀룰로스 아세테이트와 같은 물질들과 중합체 산의 혼합물을 포함한다.

[0313] 적합한 표면-활성제는 특히 폴리옥시에틸렌소르비탄(예를 들어, Tween™ 20, 40, 60, 80 또는 85) 및 다른 소르비탄(예를 들어, Span™ 20, 40, 60, 80 또는 85)과 같은 비이온성 제제를 포함한다. 표면-활성제를 포함하는 조성물은 편리하게는 0.05 내지 5% 표면-활성제를 포함할 것이며, 0.1 내지 2.5%일 수 있다. 다른 성분들이 예를 들어, 만니톨이나 다른 약학적으로 허용가능한 비히클들이 필요하다면 첨가될 수 있다.

[0314] 적합한 에멀전은 Intralipid™, Liposyn™, Infontrol™, Lipofundin™ 및 Lipiphysan™과 같은 시중 구매 가능한 지방질 에멀전을 이용하여 제조될 수 있다. 활성 성분은 미리 혼합된 에멀전 조성물에 용해될 수 있거나 대안적으로 그것은 오일(예를 들어, 소이빈 오일, 홍화 오일, 목화씨 오일, 참깨 오일, 옥수수 오일 또는 아몬드 오일) 및 인지질(예를 들어, 계란 인지질, 소이빈 인지질 또는 소이빈 레시틴)과 물을 혼합하여 형성된 에멀전에 용해될 수 있다. 다른 성분들 예를 들어, 글리세롤 또는 글루코스가 상기 에멀전의 삼투성을 조절하기 위해 첨가될 수 있다. 적합한 에멀전은 전형적으로 최대 20% 오일, 예를 들어 5 내지 20%를 함유할 것이다. 지방질 에멀전은 지방질 방울 0.1 내지 1.0 μ m, 특히 0.1 내지 0.5 μ m를 포함할 수 있으며, pH 5.5 내지 8.0의 범위를 가진다.

[0315] 에멀전 조성물은 신경 성장 인자 항체를 Intralipid™. 또는 그것의 성분(소이빈 오일, 계란 인지질, 글리세롤 및 물)과 혼합함으로써 제조되는 것일 수 있다.

[0316] 흡입 또는 불어넣기를 위한 조성물은 약학적으로 허용가능한 수성 또는 유기 용매 내 용액 및 현탁액, 또는 그것의 혼합물, 및 분말을 포함한다. 액체 또는 고체 조성물은 상기 제시한 바와 같이 적합한 약학적으로 허용가능한 부형제를 함유할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 조성물은 국부적 또는 전신적 효과를 위해 경구적 또는 경비(nasal)적 호흡에 의해 투여될 수 있다. 바람직하게 무균인 약학적으로 허용가능한 용매의 조성물이 기체를 이용하여 분무될 수 있다. 분무된 용액이 분무 장치로부터 직접 호흡될 수 있거나 분무 장치가 얼굴 마스크, 거즈실(tent) 또는 간헐 양압 호흡기에 부착될 수 있다. 용액, 현탁액 또는 분말 조성물이 적절한 방식의 조성물을 전달하는 장치로부터, 바람직하게는 경구적으로 또는 경비적으로 투여될 수 있다.

[0317] 치료 효험은 당업계에 주지된 방법에 의해 평가될 수 있다.

[0318] **본 발명의 항체 및 폴리뉴클레오티드를 포함하는 키트**

[0319] 본 발명은 또한 검출 및/또는 치료의 이용을 위한 항체 또는 폴리펩티드를 포함하는 키트를 제공한다. 따라서, 일부 구체예에서, 키트는 항체 E3를 포함한다. 일부 구체예에서, 키트는 본원에서 설명되는 항체 또는 폴리펩티드의 어떤 것을 포함한다.

[0320] 다른 양태에서, 키트는 예를 들어, 통증(외과적 수술 후 통증, 류마티스 관절염 통증, 및 골관절염 통증을 포함)을 갖는 개체를 치료하는 것을 포함하는 본원에서 설명되는 임의의 방법에 대하여 이용될 수 있다. 본 발명의 키트는 적합한 포장으로 존재하고, 선택적으로 예를 들어 본원에서 설명되는 임의의 방법에 있어서 완충액 및 항체의 사용에 관한 지시와 같은 추가적 성분을 제공할 수 있다. 일부 구체예에서, 키트는 통증을 치료하기 위한 지시를 포함한다. 일부 구체예에서, 키트는 본원에서 설명되는 항-NGF 길항제 항체 및 개체 내 류마티스 관절염 통증을 치료 및/또는 예방하기 위한 지시를 포함한다. 다른 구체예에서, 키트는 본원에서 설명되는 항-NGF 길항제 항체 및 개체 내 골관절염 통증을 치료 및/또는 예방하기 위한 지시를 포함한다. 일부 구체예에서, 항-NGF 길항제 항체는 항체 E3이다.

[0321] 다른 양태에서, 본 발명은 본원에서 설명되는 E3 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 키트를 제공한다. 일부 구체예에서, 키트는 본원에서 설명되는 임의의 방법의 폴리뉴클레오티드의 이용을 위한 지시를 더 포함한다.

[0322] 항체의 친화성을 조절하는 방법 및 CDR을 특징화하는 방법

[0323] 본 발명자들은 항체의 CDR을 특징화하고 및/또는 예를 들어, 항체와 같은 폴리펩티드의 결합 친화성을 변경하는 신규한 방법을 개발하였는 바, "라이브러리 스캐닝 돌연변이유발"이라 칭한다. 일반적으로, 라이브러리 스캐닝 돌연변이유발은 다음과 같이 작용한다. CDR 내의 하나 이상의 아미노산 위치는 인지된 방법의 기술을 이용하여 두개 이상(예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20)의 아미노산으로 치환된다. 이것은 클론의 소규모 라이브러리를 생성하는데(일부 구체예에서, 모든 아미노산 위치에 대한 것이 분석됨), 이들 각각은 두개 이상의 구성원(만일 두개 이상의 아미노산이 모든 위치에서 치환된다면)의 복잡성을 가진다. 일반적으로, 라이브러리는 또한 본래의(치환되지 않은) 아미노산을 포함하는 클론을 포함할 수 있다. 각각의 라이브러리로부터 적은 수의 클론, 예를 들어 약 20-80 클론(라이브러리의 복잡성에 따라서)이 표적 폴리펩티드에 대한 결합 친화성에 관하여 스크리닝 되고, 증가된, 동일한, 감소된 결합을 갖거나 또는 결합이 없는 후보물질이 동정된다. 결합 친화성을 결정하는 방법은 당업계에 주지되어 있다. 일부 구체예에서, 결합 친화성은 BIAcore 표면 플라즈몬 공명 분석을 이용하여 결정되는데, 이것은 약 2배 이상의 결합 친화성의 차이를 검출한다. BIAcore는 특히 출발 항체가 비교적 고친화성으로, 예를 들어 약 10 mM 이하의 K_D 로 결합하는 경우 유용하다. BIAcore 표면 플라즈몬 공명을 이용하는 스크리닝은 본원에서, 실시예에서 설명된다.

[0324] 다른 구체예에서, 결합 친화성은 키넥사 바이오센서(Kinexa Biocensor), 섬광 근접 분석법, ELISA, ORIGEN 면역 분석법(IGEN), 형광 약화(fluorescence quenching), 형광 전이, 및/또는 효모 디스플레이를 이용하여 측정될 수 있다. 다른 구체예에서, 결합 친화성은 적합한 생물학적 분석을 이용하여 스크리닝된다.

[0325] 다른 구체예에서, CDR 내 모든 아미노산 위치가 업계 인지된 돌연변이유발 방법(그 중 일부가 본원에서 설명됨)을 이용하여 모든 20개의 천연 아미노산으로 치환된다(일부 구체예에서, 동시에). 이것은 각각 20개의 구성원의 복잡성(만일 모든 20 아미노산이 모든 위치에서 치환되는 경우)으로, 소규모 라이브러리의 클론(일부 구체예에서, 모든 아미노산에 대한 것이 분석됨)을 생성한다.

[0326] 일부 구체예에서, 스크리닝 되는 라이브러리는 두개 이상의 위치에서 치환을 포함하는데, 이것은 동일한 CDR에서이거나 2 이상의 CDR에서 일 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, 라이브러리는 하나의 CDR의 2 이상의 CDR의 치환을 포함한다. 다른 구체예에서, 라이브러리는 2 이상의 CDR에서 2 이상 위치의 치환을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 라이브러리는 3, 4, 5 이상의 위치의 치환을 포함하는데, 상기 치환은 2, 3, 4, 5 또는 6 CDR에서 발견된다. 일부 구체예에서, 치환은 낮은 여유 코돈을 이용하여 제조된다. 예를 들어, 문헌[Table 2 of Balint et al., (1993) Gene 137 (1) : 109-18)] 참조하십시오.

[0327] 일부 구체예에서, CDR은 CDRH3 및/또는 CDRL3이다. 다른 구체예에서, CDR은 하나 이상의 CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2, 및/또는 CDRH3이다. 일부 구체예에서, CDR은 Kabat CDR, Chothia CDR, 또는 확장된 CDR이다.

[0328] 향상된 결합을 갖는 후보물질은 서열화될 수 있는데, 이로써 향상된 친화성을 야기하는 CDR 치환 돌연변이(또한 "향상된 치환"이라 칭함)를 동정한다. 예를 들어, 실시예 1에서 나타내는 바와 같이, 이러한 방법의 이용은 동일한 아미노산 위치에서 어립된 18개의 다른 치환이 결합을 갖지 않을 경우(즉, 항체 기능의 상실)에 조차도, 결합을 향상시키는 단일 치환의 동정을 허용하였다. 결합하는 후보물질이 서열화 될 수 있으며, 그로써 결합을 보유하는 CDR 치환을 동정한다.

[0329] 일부 구체예에서, 스크리닝의 복합 순환이 수행된다. 예를 들어, 향상된 결합을 갖는 후보물질(각각 하나 이상의 CDR의 하나 이상의 위치에 아미노산 치환을 포함함)는 또한 각각의 향상된 CDR 위치(즉, 치환 돌연변이가 향상된 결합을 보이는 CDR 내 아미노산 위치)에서 적어도 원래의 아미노산 및 치환된 아미노산을 함유하는 2차 라이브러리의 설계에 대하여 유용하다. 제조, 및 이러한 라이브러리의 스크리닝 또는 선택은 하기에서 더 논의된다.

[0330] 라이브러리 스캐닝 돌연변이유발은 또한 향상된 결합, 동일한 결합, 감소된 결합을 갖거나 또는 결합이 없는 클론의 빈도가 항체-항원 복합체의 안정성에 관한 각각의 아미노산 위치의 중요성과 관련한 정보를 또한 제공하는 한에서, CDR을 특성화하는 수단을 제공한다. 예를 들어, CDR의 위치가 모든 20개의 아미노산에서 변화된 결합을 보유한다면, 상기 위치는 항원 결합에 있어서 필요할 같지 않은 위치로서 동정된다. 반대로, 만일 CDR의 위치가 단지 적은 퍼센트의 치환의 결합을 보유한다면, 상기 위치는 CDR 기능에 대하여 중요한 위치로서 동정된다. 따라서, 라이브러리 스캐닝 돌연변이유발 방법은 많은 상이한 아미노산(모든 20개의 아미노산 포함)에 관하여 변화된 CDR 내 위치, 및 변화될 수 없거나 단지 적은 수의 아미노산이 변화될 수 있는 CDR 내 위치에 관한 정보를

생성한다. 이 양태는 실시예 1에 논의되고 예증된다.

- [0331] 일부 구체예에서, 향상된 친화성을 갖는 후보물질은 2차 라이브러리에 혼합되는데, 2차 라이브러리는 개선된 아미노산인 그 위치에서 원래의 아미노산을 포함하며, 그 위치에서 추가적 치환을 더 포함할 수 있는데, 이는 원하는, 또는 원하는 스크리닝 또는 선택 방법을 이용하여 허용되는 라이브러리의 복잡성에 따른다. 또한, 원한다면, 인접 아미노산 위치가 적어도 2개 이상의 아미노산에서 무작위 추출될 수 있다. 인접 아미노산의 무작위화는 돌연변이 CDR의 추가적 구조상의 유연성을 허용할 수 있는데, 이것은 많은 수의 개선 돌연변이의 도입을 차례로, 허용하거나 촉진할 수 있다. 일부 구체예에서, 라이브러리는 또한 스크리닝의 첫번째 순환에 있어서 개선된 친화성을 보이지 않는 위치에서 치환을 포함한다.
- [0332] 2차 라이브러리는 BIAcore 표면 플라즈몬 공명 분석법을 이용하는 스크리닝을 포함하는 당업계 공지된 임의의 방법, 및 파지 디스플레이, 효모 디스플레이, 및 리보솜 디스플레이를 포함하는 선택을 위한 당업계 공지된 임의의 방법을 이용하는 선택을 이용하여 개선된 및/또는 변경된 결합 친화성을 갖는 라이브러리 구성원에 대하여 스크리닝 또는 선택된다.
- [0333] *항체의 친화성을 조절하고 CDR을 특성화하는 방법의 이점*
- [0334] 상기 방법은 결합을 개선하거나 결합을 보유하는 아미노산 치환을 동정하기 위해 CDR 아미노산 위치를 사전 스크리닝하는데 유용하다. 중요한 잔기의 사전 동정, 결합을 개선하는 치환 및/또는 항체 기능을 보유하는 치환은 친화성 발달 라이브러리의 효율적인 설계 및 스크리닝을 허용한다.
- [0335] 본 방법은 또한 CDR을 특성화하는데 유용하며, 항원에 결합하기 위한 CDR 내 각 아미노산 위치의 중요성에 관한 종합적인 정보를 제공한다. 본 발명은 또한 결합을 향상시키는 치환을 동정하는데 이용될 수도 있다.
- [0336] 각 위치가 무작위화(일부 구체예에서, 한번에 하나씩) 될 수 있는 소규모 라이브러리의 이용은 상세한 동역학 정보를 제공하는 BIAcore와 같은 민감성 방법을 이용하여 치환 돌연변이의 스크리닝을 허용한다. 스크리닝 방법은 일반적으로 대규모 라이브러리가 스크리닝 되는 경우 비실용적이다. 대신에, 예를 들어 파지 디스플레이, 효모 디스플레이, 및 리보솜 디스플레이와 같은 선택 방법이 통상적으로 결합을 보유하는 클론을 동정하는데 사용된다. 파지 디스플레이 및 ELISA 분석법은 클론으로부터 제조되는 단백질 샘플의 농도에 극도로 좌우될 수 있으며, 따라서 증가된 결합 친화성을 갖는 클론을 동정하는 것 보다 증가된 발현, 증가된 안정성, 또는 감소된 독성을 갖는 클론쪽으로 극도로 치우치는 경향이 있을 수 있다. 또한, 클론의 발현 수준의 상이함은 결합 친화성의 소규모 개선을 가릴 수도 있다. 이들 이점은 높은 결합 친화성을 갖는 항체가 출발 물질로서 이용되는 경우 특히 중요한데, 왜냐하면 매우 낮은 수준의 항원이 충분히 엄격한 스크리닝을 위해 이용되어야만 하기 때문이다.
- [0337] 이와는 반대로, 각 위치에서 무작위화(일부 구체예에서, 한번에 한 위치씩)와 같은 본 발명의 방법은 주어진 위치에서 예를 들어 모든 20개의 아미노산의 치환의 효과의 도입 및 특성화를 허용한다. 이 분석법은 주어진 위치에서 얼마나 많은 치환이 허용되는지(즉, 항체 결합 보유)에 관한 정보를 제공하는데, 이것은 차례로, 항체 기능에 대한 각 아미노산의 중요성에 관한 정보를 제공한다. 또한, 개선된 결합을 유발하는 치환은 주어진 위치에서 많은 또는 대부분의 치환이 비-기능적(비-결합) 항체를 생산하는 상황에서 조차도, 동정될 수 있다. 반대로, 중요한 CDR 위치를 동정하는데 통상적으로 이용되는 알라닌-스캐닝 돌연변이유발은 알라닌의 치환이 결합을 허용하는지 또는 방해하는지 여부에 관한 정보를 제공한다. 일반적으로, 알라닌 치환이 결합을 방해하는 위치는 친화성 돌연변이 라이브러리로부터 제거된다. 그러나 대다수의 경우, 알라닌은 CDR 위치에서 빈약한 치환일 수 있다.
- [0338] 본 발명은 또한 단일 CDR 돌연변이의 효과의 동정 및 특성화를 허용한다. 이와는 반대로, 파지 디스플레이와 같은 방법은 다수의 돌연변이를 동시에 도입 및 선택하므로, 양성 돌연변이가 특정 클론 내에 존재하는 해로운 돌연변이의 존재에 의해 가려질 위험을 잠재적으로 증가시킨다.
- [0339] 본 방법은 또한 본 방법이 개선된 결합 친화성을 유발하는 적은 수의 돌연변이(예를 들어, 단일 CDR에서 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 돌연변이)의 동정을 허용하는 한, 원래의(출발) 항체의 결합 특이성을 보유하면서 친화성을 개선시키는데 유용하다. 이와는 달리, 파지 디스플레이와 같은 방법은 전형적으로 동시에 다수의 돌연변이를 이용하여 결합 친화성을 개선하는데, 이것은 항체의 특이성을 변경 및/또는 바람직하지 않은 교차-반응을 증가시키는 결과를 가져올 수 있다.
- [0340] 다음 실시예는 이에 한정되지는 않으나, 본 발명을 예증하기 위해 제공된다.

- [0341] **실시에**
- [0342] **실시에 1: 인간화 및 마우스의 대항제 항-NGF 항체 911의 친화성 발달**
- [0343] **A. 일반적인 방법**
- [0344] 하기의 일반적인 방법을 이 실시예에서 사용하였다.
- [0345] **라이브러리 생성**
- [0346] 문헌[Kay et al. (1996), *Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual*, San Diego, Academic Press (p.277-291 참조)]에 기재된 바와 같이, 변성된 올리고핵산으로 PCR 카세트 돌연변이에 의해서 라이브러리를 생성하였다. 20 가지 가능한 아미노산이 포함되도록, 도핑 코돈 NNK를 하나의 아미노산의 위치를 무작위화하는데 사용했다. 특정한 성질을 가진 아미노산의 서브셋만을 포함하도록 하나의 아미노산의 위치를 무작위화하기 위하여, 문헌[Balint et al, (1993) *Gene* 137(1):109-18)]에 기재된 바와 같이 도핑 코돈을 사용했다. 문헌[Innis et al, (1990) *PCR protocols: A guide to methods and applications* (p.177-183 참조)]에 기재된 바와 같이, 재조합체 PCR을 사용하여 부위 유도돌연변이를 수행하였다.
- [0347] **소규모 Fab 제조**
- [0348] 96 웰 플레이트에 소규모 발현을 Fab 라이브러리를 스크리닝하는 것에 최적화하였다. Fab 라이브러리와 함께 형질전환된 대장균으로부터 시작하여, 마스터 플레이트 (우무 LB + 암피실린 (50 µg/ml) + 2% 글루코스) 및 작업 플레이트 (2 ml/웰, 1.5 mL LB 함유 96 웰/플레이트 + 암피실린 (50 µg/ml) + 2% 글루코스)를 모두 콜로니에 접종시키도록 고른다. 두 플레이트를 모두 30°C에서 8-12 시간 동안 증식시킨다. 마스터 플레이트를 4°C에 보관하고, 작업 플레이트로부터 세포를 5000 rpm에서 펠렛하고, Fab의 발현을 유도하기 위해 1 mL의 LB + 암피실린 (50 µg/ml)+1 mM IPTG로 재현탁시킨다. 30°C에서 5 시간 발현 시간 이후에 원심분리를 이용하여 세포를 수집했고, 500 µl의 HBS-EP 완충제 (100 mM HEPES 완충제 pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.005% P20, 3 mM EDTA)에서 재현탁시켰다. HBS-EP 재현탁된 세포의 용해를 한 번의 주기의 냉동 (-80°C)과 37°C에서의 해동으로써 얻었다. 세포 용해물을 30 분 동안 5000 rpm으로 원심분리하여 Fab를 함유한 상청액으로부터 세포 debris를 분리한다. 그런 후에 상청액을 BIAcore 플라즈몬 공명각 기구에 주입하여 각각의 Fab의 친화성 정보를 얻는다. DNA서열을 결정하기 위해서, 하기에 기술된 바와 같이 대규모 Fab 생성물과 하기에 기술된 바와 같은 상술된 특성화를 위해서, Fab로 표현되는 클론은 마스터플레이트로부터 꺼내었다.
- [0349] **대규모 Fab 제조**
- [0350] 상세한 동역학 파라미터를 얻기 위해서, Fab는 발현되었고 대량 배양으로부터 정제했다. 200 mL의 LB + 암피실린 (50 µg/ml) + 2% 글루코스를 함유한 얼렌마이어 플라스크를 대장균 클론을 발현하는 선택된 Fab로부터 하루가 지난 배양균 5 mL를 접종했다. 클론을 OD_{550nm}가 1.0으로 얻어질 때까지 30°C에서 배양했고, LB + 암피실린 (50 µg/ml) + 1 mM IPTG의 200 ml 매개물로 대체되도록 유도한다. 30°C에서 5시간의 발현 시간 이후에, 세포를 원심분리로 펠렛하고, 10 mL PBS (pH 8)로 재현탁시킨다. 세포의 용균을 냉동/해동 (각각 -80°C 및 37°C에서)의 두 번의 주기를 통해서 얻는다. 세포 용해물의 상청액을 PBS, pH 8로 평형화시킨 Ni-NTA 슈퍼플로우(superflow) 세파로스 (키아젠, 발렌시아, 캘리포니아주) 컬럼에 적재하고, 그 다음에 PBS, pH8의 5 컬럼 부피를 가지고 세척했다. 개개의 Fab를 PBS (pH 8) + 300 mM 이미다졸과 함께 다른 소부분에서 용출했다. Fab를 함유한 소부분을 PBS에서 끄집어내고 다이얼라이징하고(dialized), 그 다음에 친화성 특성부여 이전에 ELISA로 양을 잰다.
- [0351] **전체 항체 제조**
- [0352] 전체 항체의 발현을 위해서, 중쇄 및 경쇄 가변부위를 2 포유동물용 발현 벡터 (경쇄용으로 Eb.911.E3 또는 Eb.pur.911.3E, 및 중쇄용 Db.911.3E; 본원에 기재됨)로 클론화하였고, 일과성 발현용으로 리포펙테민을 사용하여 HEK 293 세포로 세포감염시켰다. 기존 방법을 사용하여, 단백질 A를 사용하여 항체를 정제한다.
- [0353] **Biacore 측정법**
- [0354] 항-NGF Fab 및 단클론항체의 친화성을 BIAcore3000™ 표면 플라즈몬 공명각 (SPR) 시스템 (BIAcore, INC, 피스카웨이, 뉴저지주)을 사용하여 측정한다. CM5 칩은 제조업자의 지침에 따라서 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보다이리드 (EDC) 및 N-히드록시수신이미드 (NHS)와 함께 활성화된다. 인간의 NGF를 10 mM의 pH 4.0인 소듐아세트산염으로 희석하여, 0.005 mg/mL의 농도에서 활성 칩에 주입했다. 개개의 칩 경로를 가로지르는 다양한 흐름의 시간을 이용해서, 항원 밀도의 두 범위를 달성한다: 상

세한 동역학 연구용으로 100-200 반응 단위(response units (RU)) 및 스크리닝 측정법용으로 500-600 RU이다. 칩은 에탄올아민으로 차단되었다. 재생연구는 Pierce 용출 완충제(Product No. 21004, Pierce Biotechnology, 락포드, 일리노이주) 및 4 M의 NaCl (2:1)의 혼합물이 200번 이상 주입하는 동안 칩에서 hNGF의 활동을 유지하면서, 결합 Fab를 효과적으로 제거한다는 것을 보여준다. HBS-EP 완충제 (0.01M HEPES, pH 7.4, 0.15 NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P29)를 모든 BIAcore 측정법에 작용 완충제로 사용하였다.

[0355] **스크리닝 측정법**

[0356] 스크리닝 BIAcore 측정법은 라이브러리로부터 Fab 클론의 친화성을 측정하는데 능률적으로 활용된다. 소량 배양 용해물의 상청액을 2 분 동안 50 μ l/분에 주입했다. BIAevaluation 소프트웨어를 사용하여 단일의 지수 해리율 (k_{off})을 측정하는데 10 내지 15 분의 해리 시간이 소요되었다. 라이브러리(클론 8L2-6D5, k_{off} $1 \times 10^{-3} s^{-1}$)를 산출하는데 사용되는 주형과 동일한 범위에서 k_{off} 속도를 나타내는 샘플을 확인하기 위해 주입하고, 45 분까지의 해리 시간은 더 우수한 k_{off} 값을 얻게 해준다. 개선된(더 느린) k_{off} 값을 나타내는 클론은 대규모로 발현되었고, k_{on} 및 k_{off} 의 전 동역학 파라미터는 정제된 단백질로 측정된다. 측정법으로 약 2 배 또는 그 이상의 친화성에서의 차이의 측정이 가능했다.

[0357] **친화성 측정법**

[0358] 정제된 Fab 샘플의 일련의 희석용액(0.1-10x 추정 K_D)을 1 분 동안 100 μ l/분에 주입했고 2 시간까지의 해리 시간을 가졌다. 공지된 농도 (아미노산 분석법에 의하여 측정되는 것처럼)의 기준 Fab로서 사용되는 ELISA 및/또는 SDS-PAGE 전기영동으로 Fab 단백질의 농도를 측정했다. BIAevaluation 프로그램을 사용하여 데이터를 1:1 Langmuir 결합 모델 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). Methods Enzymology 6. 99-110)에 맞추어서 동역학적 회합 속도 (k_{on}) 및 해리 속도 (k_{off})를 동시에 얻었다. 평형화 해리 상수 (K_D) 값을 k_{off}/k_{on} 로 계산했다.

[0359] **B. 인간화 및 마우스의 대항체 항-NGF 항체 911의 친화성 발달 마우스의 대항체**

[0360] 항-NGF 항체, 911 (Hongo et al, (2000) Hybridoma 19(3):215-227) 참조)을 인간화 및 친화성 발달에 선택했다. Mab 911은 높은 친화성을 가지고 인간 및 마우스의 NGF와 결합하고, 뉴로트로핀 NT3, NT4/5 또는 BDNF와 함께 현저한 교차반응성을 나타내지 않는다. 앞서 언급한 Hongo와 동일 문서 참조. 상기에 기술한 바와 같이, BIAcore 분석법을 사용하여 마우스 Mab 911의 파파인에 결합된 Fab 단편의 친화성을 측정했다. 마우스 Mab 911의 파파인에 결합된 Fab 부분은 약 10 nM의 K_D 를 갖는 인간의 NGF와 결합되었다.

[0361] 인간화 및 친화성 발달을 하기와 같이 몇몇 단계로 수행하였다:

[0362] **(1) CDR-이식 주형의 제조.** 항체 911(예: Kabat 및 Chothia CDR 부위 모두 포함)의 CDR에 연장된 경쇄를 인간 생식세포(germline) 수용체 서열 JK2와 함께 08로 이식했고, 항체 911의 CDR에 연장된 중쇄를 인간 생식세포 수용체 서열 JH4와 함께 VH4-59로 이식했다. 인간 생식세포 수용체 서열의 아미노산 서열은 도 1A 및 1B에 나타났다. 아미노산 넘버링은 순차적이다. 상기에 기술된 단백질 외곽구조를 사용하여, 무린 CDR과 인간 외곽구조를 코딩하도록 합성 유전자용으로 DNA 서열을 설계하였다. 이렇게 인간화된 중쇄 및 경쇄 가변부위를 hVH 및 hVL로 각각 칭했다. 코돈을 대장균 및 햄스터 사용용으로 최적화하였다. 각각의 사슬에 두 개의 짧은 플랭킹(flanking) 프라이머(primers)를 가진 hVL 및 hVH의 전 길이를 연장한 몇몇의 중복 올리고핵산 (길이 69-90 염기)을 Prodromou et al, (1992) *Protein Eng* 5(8): 827-9에 기재된 바와 같이 본질적으로 순환(recursive) PCR에 의하여 두 유전자를 따로 합성하는데 사용하였다. 정확한 길이의 결과의 DNA 단편을 겔 정제하고, 그 다음으로 대장균 2시스템의(bicistronic) 발현 플라스미드로 클론화하였다. 항체의 발현은 Barbas (2001) Phage display: a laboratory manual, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press (p. 210의 Vector pComb3X 참조)에 기재된 것과 유사하지만, 인간의 카파(Kappa) 라이트(light) 사슬 불변영역 (GenBank Accession No. CAA09181 참조) 및 IgG2a 인간 면역글로불린 (GenBank Accession No. P01859)의 CHI 불변영역 등의 부가적인 영역의 첨가와 발현이 포함된 변형으로, IPTG 유도성의 lacZ 조촉매의 제어하에 있다.

[0363] 8L2-4D5로 지칭되는 CDR-이식 항체 ("주형"으로도 지칭됨)의 가변부위의 아미노산 서열을 도 1A 및 1B에 또한 나타내었다. 상기에 기재된 바와 같이 BIAcore 분석법을 사용해서 8L2-4D5의 친화성을 측정했다. 8L2-4D5는 약 38 nM의 K_D 를 가진 인간의 NGF와 결합했다.

- [0364] (2) 점 돌연변이를 외곽구조 서열로의 주입. Innis et al, (1995) PCR strategies, San Diego, Academic press 에 기재된 바와 같이, 재조합 PCR 부위 유도돌연변이를 사용하여 V71K 치환물질에 CDR-이식 중쇄에 주입했다. 이러한 치환물질은 인간의 외곽구조의 잔여물을 대응하는 마우스의 외곽구조 잔여물로 대체한다. 결과의 항체를 8L2-6D5로 지칭하고, 도 1A는 8L2-6D5의 중쇄의 가변부위의 아미노산 서열을 보여준다. 상기에 기술된 대로 8L2-6D5의 친화성을 BIAcore 측정법을 사용하여 측정한다. 8L2-6D5의 Fab 단편은 약 15 nM의 Kd를 가진 인간의 NGF와 결합했다. 8L2-6D5를 친화성 발달의 주형으로 선택했다.
- [0365] (3)CDR L1, L2, H1 및 H2의 인간화 및 친화성 발달.
- [0366] CDR L1, L2, H1 및 H2를 인간화 및 친화성 발달을 거쳤다. CDR L1, L2, H1 및 H2에서의 아미노산 위치는 Chothia 정준 구조(Al-Lazikani et al(1997)*J. Mol. Biol.* 273(4):927-48 참조)에 기초하여 CDR의 구조에 필수적인 것이 아닌 것으로 간주되었고, 하기와 같이 무작위화하였다. 문헌[Balint et al, (1993) *Gene* 137(1):109-18]에 기재된 대로 도핑 코돈을 사용하여, 문헌[Kay et al. (1996), Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual, San Diego, Academic Press]에 기술된 바와 같이 변성된 올리고핵산과의 PCR 카세트 유도돌연변이를 사용하여, 표 2에서 나타내는 경쇄 돌연변이 또는 중쇄 돌연변이 및 이식(마우스) CDR L3 또는 CDR H3를 각각 함유하도록 두 가지의 라이브러리를 제조했다. 통상적으로, 항체 911 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열과 인간 생식세포 항체 서열의 정렬에 바탕을 둔 아미노산 잔여물은 인간의 항체에서 더 보편적인 잔여물로 변경되었다. CDR H2 잔여물 50, 야생형(wildtype) 메티오닌은 라이브러리에서 나타나지 않은 메티오닌의 예외가 있고, 야생형(치환되지 않은) 아미노산 잔여물은 라이브러리에서 또한 나타난다. 메티오닌 잔여물은 산화하여, 그 잔여물의 치환은 결과의 항체의 안정성을 개선시키도록 예측되었다. 상기에 기술된 바와 같이, Fab의 라이브러리는 벡터 pComb3X 플러스 인간 CH1 및 C_κ부위로 클론화되었다.

[0367] 표 2

1. 중쇄 H1/H2 라이브러리:

CDR-H1

I34는 F, L, V, S, P, T, A, 또는 I로 변화했다

N35는 N, T, S, 또는 Y로 변화했다

CDR-H2

M50은 모두 20 가지의 천연 아미노산으로 변화했다

A62는 A 또는 S로 변화했다

L63는 L 또는 V로 변화했다

2. 경쇄 L1/L2 라이브러리

CDR-L1

S26은 S, A, V, 또는 F로 변화했다

D28은 D, A, S, 또는 Y로 변화했다

H32는 H, N, K, D, E, Q, 또는 Y로 변화했다

CDR-L2

Y50은 Y, D, A, 또는 S로 변화했다

I51은 I, T, A, 또는 V로 변화했다

F54는 F 또는 L로 변화했다

S56은 S 또는 T로 변화했다

[0368]

[0369]

친화성 스크리닝 실험용으로, 각각의 라이브러리를 대응하는 CDR-이식 경쇄 및 중쇄와 더 짝을 지었고(예를 들어서, H1/H2 라이브러리는 CDR-이식 경쇄와 짝을 지었다), 항체는 발현되었고, 제조업자의 지침과 상기의 기술에 따라서 BIACORE 표면 플라즈몬 공명각(SPR) 시스템 (BIAcore, Inc. 피스카타웨이, 뉴저지주)을 사용하여 개 개인의 클론의 인간의 NGF에 대한 친화성을 스크리닝했다. k_{off} , k_{on} 및 K_D 를 측정했다. 통상적으로 친화성의 대부분의 변화는 k_{off} 속도로 나타내어지므로, 더 나아가서 k_{off} 속도는 항체 농도와 무관하기 때문에, 항체 클론은 k_{off} 속도에 근거하여 순위를 매겼다.

[0370]

결합된 클론의 서열을 정했고 결합된 클론의 서열은 표 3에서 나타냈다.

[0371]

[0372]

표 3

[0373]

(H1/H2 또는 L1/L2 라이브러리 클론을 스크리닝하여 하기의 친화성과 결합한 클론의 L1 및 L2 아미노산 서열, H1 및 H2 아미노산 서열 및 결합된 클론의 동역학 데이터.)

CDR 1-2 돌연변이 동역학 데이터				
BL2 중쇄와 짝지 어진 경쇄 라이 브러리 클론	CDRL1 AA 서열	CDR2 AA 서열	k_{off} (s ⁻¹)	* K_D (nM)
BL2-6D5 (대조구)	RASQIISNHLN (SEQ ID NO:12)	YISRFHS (SEQ ID NO:13)	**1e-3	25
L129	RASQSISNNLN (SEQ ID NO:18)	YTSRFHS (SEQ ID NO:19)	4.5e-4	11
L208	RASQYISNHLN (SEQ ID NO:20)	YTSRFHS (SEQ ID NO:21)	4.6e-4	11
L97	RASQSISNQLN (SEQ ID NO:22)	YVSRFHS (SEQ ID NO:23)	5.6e-4	14
L81	RAFQATSNQLN (SEQ ID NO:24)	YISRFHT (SEQ ID NO:25)	7.4e-4	18
L6	RAFQSISNQLN (SEQ ID NO:26)	YASRFHS (SEQ ID NO:27)	8.2e-4	20
6D5 경쇄와 짝지 어진 중쇄 라이 브러리 클론	CDRH1 AA 서열	CDRH2 AA 서열	k_{off} (s ⁻¹)	* K_D (nM)
BL2-6D5 (대조구)	GFSLIGYDIN (SEQ ID NO:9)	HIWGDGPTDYN S AL (SEQ ID NO:10)	1e-3	25
H109	GFSLIGYDSN (SEQ ID NO:28)	IIWGDGPTDYN S AL (SEQ ID NO:29)	1.6e-4	4
H19	GFSLIGYDLN (SEQ ID NO:30)	IIWGDGPTDYN S AV (SEQ ID NO:31)	2.4e-4	6
H222	GFSLIGYDVT (SEQ ID NO:32)	GIWGDGPTDYN S AV (SEQ ID NO:33)	3.8e-4	9.5
H225	GFSLIGYDVT (SEQ ID NO:34)	GIWGDGPTDYN S SV (SEQ ID NO:35)	3.8e-4	9.5
H18	GFSLIGYDAT (SEQ ID NO:36)	GIWGDGPTDYN S AV (SEQ ID NO:37)	4.2e-4	10.5
H9	GFSLIGYDVS (SEQ ID NO:38)	IIWGDGPTDYN S SV (SEQ ID NO:39)	4.1e-4	10.2
H227	GFSLIGYDIS (SEQ ID NO:40)	QIWGDGPTDYN S SV (SEQ ID NO:41)	5.4e-4	13.5
H17	GFSLIGYDAS (SEQ ID NO:42)	GIWGDGPTDYN S SV (SEQ ID NO:43)	6.1e-4	15.2
H28	GFSLIGYDST (SEQ ID NO:44)	SIWGDGPTDYN S AL (SEQ ID NO:45)	7.5e-4	18.7

[0374]

[0375]

굵은 글씨 AA는 상기에 표기된 바와 같이 무작위화되었다

[0376]

* $k_{on}4e4M^{-1}s^{-1}$ 를 사용하여 KD를 계산했다

[0377]

**편의를 위하여, 여기에 사용된 "e"는 "x10"을 나타낸다. 따라서, 4e4는 호환성을 가지며 4x10⁴를 의미한다.

[0378]

(4) H3 및 L3 CDR의 친화성 발달. H3 및 L3 CDR의 친화성 발달을 두 단계에서 수행했다. 우선, "라이브러리 스캐닝 돌연변이유발"이라고 불리는 방법으로, 인간의 NGF에 증가된 결합 친화성을 야기시키는 돌연변이가 위치한 아미노산 위치를 확인하기 위해서 H3 및 L3에 있는 각각의 아미노산 잔여물을 하나씩 예비스크리닝한다. 라이브러리 스캐닝 돌연변이유발("소량 라이브러리 무작위화 분석법"으로 또한 불리움)의 결과에 근거하여, H3 및 L3에서의 아미노산 위치의 서브셋을 친화성 발달 라이브러리의 제조용으로 선택하고, 본원에 기술된 바와 같이 BIAcore를 사용하여 친화성 발달 라이브러리를 인간의 NGF에 대한 친화성을 스크리닝했다. 이러한 기술은 통상적으로 적용될 수 있는 것으로 확립되어 있다.

[0379]

(a) 라이브러리 스캐닝 돌연변이유발

[0380]

H3 및 L3 CDR에 있는 각각의 아미노산 위치를 인간의 NGF에 대한 증가된 결합 친화성을 야기시키는 치환물질로 하나씩 예비스크리닝했다. 개선된 결합, 동일한 결합, 더 불량한 결합 또는 결합이 없음을 야기시킨 임의의 주어진 위치에서 아미노산 치환물질의 빈도수는 많은 다른 아미노산(모든 20 가지의 아미노산 포함)으로 변화될 수 있는 CDR에 있는 위치 및 변화될 수 없거나 또는 몇몇의 아미노산으로만 변화될 수 있는 CDR에 있는 위치와 관련된 연관된 정보를 제공한다. 증가된 결합 친화성을 야기시키는 아미노산 치환물질을 또한 확인한다. 이러한 스크리닝의 결과에 근거하여, CDR H3 및 L3에 있는 아미노산 위치의 서브셋을 친화성 발달 라이브러리의 제조용

으로 선택했다.

[0381] 개개의 Fab 라이브러리를 L3 및 H3 CDR의 각각의 아미노산이 한 번에 모두 20 가지의 아미노산으로 무작위화하여 제조하여, 각각의 아미노산 위치에서 20 가지의 아미노산의 가능성의 복잡성을 각각 가진 몇몇(경쇄의 경우 5 라이브러리 및 중쇄의 경우 13 라이브러리)의 소량 라이브러리를 야기시킨다. 모든 경우에, 라이브러리에서 천연(즉 미변성의) 아미노산을 나타낸다. Kay et al.(1996), *Phage display of Peptides and Proteins: a laboratory manual*, San Diego, Academic Press에 기술된 바와 같이, 20 가지의 가능한 아미노산을 포함하도록 하나의 아미노산 위치를 무작위화하여 도핑 코돈 NNK를 사용하여, 변형된 올리고핵산과 함께 PCR 카세트 돌연변이 유발에 의해서 라이브러리를 제조했다. 스크리닝하는 동안 H3 및 L3에서의 친화성의 차이가 쉽게 검출되는 CDR 이식 항체의 낮은 친화성 때문에, 8L2-6D5(외곽구조 돌연변이 V71K를 가진 CDR 이식 항체)는 라이브러리 구조용 주형의 역할을 한다. 따라서, 라이브러리의 각각의 구성원은 하나의 아미노산 치환물질 및 5 개의 이식 CDR를 갖는 CDR3(H3 또는 L3)를 함유했다.

[0382] 상기에 기술된 바와 같이 BIAcore 분석법을 사용하여 각각의 소량 라이브러리로부터 20-80 개의 클론을 스크리닝했다. 중쇄 C 끝머리(terminus)에 있는 히즈택(his tag)을 검출하기 위해서 BIAcore 칩의 하나의 경로로 NGF에 대한 결합 친화성과 센서 칩의 다른 경로에 있는 펜타-히즈택(penta-histag) 항체에 결합함으로써 Fab가 존재함으로써 BIAcore 칩의 하나의 경로로 NGF에 대한 결합 친화성을 BIAcore로 샘플을 동시에 분석했다. 분류하기 위하여 k_{off} 를 사용하여, 단백질을 발현한 클론은 동일한 친화성, 더 불량한 친화성, 더 우수한 친화성 또는 결합없음을 갖는 것으로 분류된다: 이러한 분석의 결과는 표 5에 나타내었다.

[0383] 표 5

단백질을 발현한 클론은 k_{off} 에 기반하여, 동일한 친화력, 안좋은 친화력, 더 나은 친화력 또는 결합없음을 갖는 것으로 분류되었다

돌연변이	더우수함 $1e-3 <$	동일함 $\geq 1e-3,$ $2e-3 <$	더안좋은 $\geq 2e-3$	결합 없음	결합 능력을 보유하는 AAs의 퍼센트
경쇄					
L S91X	13%	40%	20%	26%	50%
L K92X		100%			~100%
L T93X		93%	7%		93%
L L94X		40%	60%		40%
L Y96X		13%	80%	7%	13%
중쇄					
H G98X		50%	37%	13%	50%
H G99X		46%	54%		46%
H Y100X		26%		73%	26%
H Y101X	6%		12%	82%	6%
H Y102X		7%	25	68%	7%
H_G103X	4%	21%	16%	58%	25%
H T104X		20%	30%	50%	20%
H S105X	10%	25%	26%	39%	35%
H Y106X		75%	25%		75%
H Y107X		8%	46%	46%	8%
H F108X		23%	27%	50%	23%
H D109X		29%	46%	25%	29%
H Y110X		90%	5%	5%	90%

[0384]

[0385] 개선된 친화성을 갖는 모든 클론의 서열이 결정되었고, 증가된 친화성을 초래한 아미노산 치환의 빈도와 동일성을 드러냈다. 게다가, 치환이 반드시 결합 친화성을 증가시키지는 않았지만, 812-6D5과 유사한 친화성을 보유한 몇몇 클론은 주어진 위치에서 허용된 아미노산 서열 치환을 확인하기 위해, 각각의 라이브러리로부터 선택되었다. 이 분석의 결과는 표 6에 요약되어 있다.

[0386] 표 6

CDR H3 돌연변이 (하기를 포함하는 8L2-6D5 주형 항체 911 CDR-H3 아미노산 서열 : GGYYYGTSYYFDY (SEQ ID NO:11))	$k_{off}(s^{-1})$ 1E-3	K_D^* (nM) 25
Y100L	1.2E-3	30
Y100R	1.1E-3	27
Y101W	5.6E-4	14
G103A	1.6E-4	4
T104S	2.2E-3	55
S105A	5.1E-4	13
S105T	6.4E-4	16
Y106R	1.6E-3	40
Y106T	2.0E-3	50
Y106M	2.7E-3	67
Y107F	1.4E-3	35
F108W	1.22E-3	30
D109N	1.5E-3	37
D109G	1E-3	25
Y110K	1.4E-3	35
Y110S	1.5E-3	37
Y110R	1.6E-3	40
Y110T	1.7E-3	42
CDR L3 돌연변이 (하기를 포함하는 8L2-6D5 주형 야생형 (치환되지 않음) CDR-L3 아미노산 서열 : QQSKTLPYT (SEQ ID NO: 14))	$k_{off}(s^{-1})$ 1E-3	K_D^* (nM) 25
S91E	2.5E-4	6
Y96R	1.7E-3	42

* $k_{on} 4e4 M^{-1}s^{-1}$ 를 사용하여 계산된 KD

[0387]

[0388]

몇개의 돌연변이가 증가된 결합 친화성을 초래하였다. 적어도 하기 돌연변이는 8L2-6D5 주형과 비교할때 상당히 증가된 결합 친화성을 초래하였다 : (HY101W (CDR 서열 GGYWYGTYYFDY (SEQ ID NO : 46)) ; H_S105A (CDR 서열 GGYYYGTAYYFDY (SEQ ID NO : 47)) ; H_S105T (CDR 서열 GGYYYGTYYFDY (SEQ ID NO : 48)) ;H_G103A (CDR 서열 GGYYYATSYFDY (SEQ ID NO : 49); 및 L_S91E (CDR 서열 QQEKTLPYT (SEQ ID NO : 50)).

[0389]

이 실험의 결과는 친화성 돌연변이 라이브러리의 생산을 위한 아미노산 위치의 선택을 가이드하는데 사용되었다.

[0390]

이 실험은 또한 표 5에서 나타낸 바와 같이, 개선된 결합, 동일한 결합, 약화된 결합 또는 결합이 없음을 초래한 어떠한 주어진 위치에서 아미노산 치환의 빈도에 관한 정보를 제공하였다. 이 정보는 많은 다른 아미노산 (모든 20 아미노산 포함)으로 변할 수 있는 CDR에서 아미노산 위치, 및 소수의 아미노산 또는 매우 소수의 아미노산으로 변할 수 있는 CDR에서 위치(일부 구체예에서, 아미노산 없음)의 동일성을 허용하였다. 이들 결과는 또한 결합 친화성을 증가시킨 아미노산 치환을 증명하였다.

[0391]

(b)친화성 발달

[0392] 다음에, 작은 라이브러리 무작위화 분석(상기)의 결과를, H3 및 L3 CDR의 친화성 발달을 위한 H3 및 L3 라이브러리의 제조를 위한 잔기를 선택하기 위해 사용하였다. CDR H3의 잔기 Y101 및 G103 그리고 CDR L3의 잔기 S91 및 K92가 H3 및 L3 CDR의 친화성 발달을 위한 H3 및 L3 라이브러리의 제조를 위해 선택되었다.

[0393] 이 라이브러리는 돌연변이를 CDR이식된 클론 8L2-6D5에서 동시에 H3 및 L3, 그리고 개별적으로 H19-L129의 백그라운드에서 조합하였고, 80 다른 클론의 다양성을 가졌다. 표 7은 치환을 위해 선택된 아미노산 잔기와 각각의 위치에서 치환된 아미노산을 보여준다.

[0394] 표 7

치환을 위해 선택된 H3 및 L3에서의 아미노산 잔기 그리고 각각의 위치에서 치환된 아미노산

CDR-H3:

Y101은 Y 및 W, C로 치환되었다. (하나의 퇴화된 올리고뉴클레오티드에서 코돈 TRS의 사용이 또한 코돈 C를 생성하였기 때문에 C가 포함되었다는 것을 주목하라).

G103는 A, P, S로 변화되었다.

CDR-L3:

S91는 E로 변화되었다.

K92는 모든 20 아미노산으로 변화되었다. A, R, K, 및 H 결합되었다.

[0395]

[0396] 각각의 폴리펩티드는 Fab으로 표현되었고, 96 개별적인 클론의 인간 NGF에 대한 친화성은 제조업체의 지시에 따라 BIACORE 분석을 사용하여 각각의 라이브러리에 대해 스크리닝되었다. 이 분석의 결과는 표 8에 나와있다.

[0397] 표 8a

<u>CDR L3 H3 COMBINATION</u> 돌연변이 (8L2-6D5 주형)	$k_{off}(s^{-1})$	$K_D^*(nM)$
L_S91E; L_K92A (CDR 서열 QQEATLPYT (SEQ ID NO:51)) H_Y101W; H_G103A (CDR 서열 GGYWYATSYFYDY (SEQ ID NO:52))	1E-3 5.5E-4	25 13
L_S91E; L_K92R (CDR 서열 QQERTLPYT (SEQ ID NO:53)) H_Y101W; H_G103A (CDR 서열 GGYWYATSYFYDY (SEQ ID NO:54))	1.0E-4	25
<u>CDR L3 H3 COMBINATION</u> 돌연변이 (HI9-L129 주형 , HIH2L1L2 성숙함)	$k_{off}(s^{-1})$	$K_D^*(nM)$
L_S91E; L_K92H (CDR 서열 QQEHTLPYT (SEQ ID NO:55)) H_Y101W; H_G103A (CDR 서열 GGYWYATSYFYDY (SEQ ID NO:56)) (CLONE E3)	1.1e-4 1.2E-5	0.3
L_S91E; L_K92S (CDR 서열 QQESTLPYT (SEQ ID NO:57)) H_Y101W; H_G103S (CDR 서열 GGYWYSTSYFYDY (SEQ ID NO:58))	4.7E-5	1.1
L_S91E; L_K92K (CDR 서열 QQEKTLPYT (SEQ ID NO:59)) H_Y101Y; H_G103A (CDR 서열 GGYYYATSYFYDY (SEQ ID NO:60))	2E-5	0.5
L_S91E; L_K92R	1.4E-5	0.35

[0398]

[0399] 표 8b

(CDR 서열 QQERTLPYT (SEQ ID NO:61)) H_Y101W; H_G103A (CDR 서열 GGYWYATSYFYDY (SEQ ID NO:62)) (CLONE 3C)		
L_S91E; L_K92R (CDR 서열 QQERTLPYT (SEQ ID NO:63)) H_Y101Y; H_G103A (CDR 서열 GGYYYATSYFYDY (SEQ ID NO:64))	1.5E-5	0.37

* $k_{on} 4e4 M^{-1}s^{-1}$ 를 사용하여 계산된 KD

[0400]

[0401] 결합 친화성에 기반하여, 최상의 클론은, E3 (상호교환적으로 용어 "3E") 및 3C는, 더 나아간 특성화를 위해 선택되었다. E3는 다음의 CDR 치환을 포함하였다: CDR-H3: Y101W, G103A; 및 CDR-L3: S91E, K92H, 이것은 단일 클론안으로 조합되었고 이는 또한 다음의 LI, L2, H1 및 H2 돌연변이를 포함하였다:

[0402] CDR-H1 : I34L :

[0403] CDR-H2: M50I ; L63V ;

[0404] CDR-L1 : D28S ; H32N ;

[0405] CDR-L2: 151T.

- [0406] E3의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 서열은 도 1A와 1B에 나타나있다. 3C는 하기의 CDR 치환을 포함하였다: CDR-L3: S91E; K92R; CDRH3: Y101W; G103A, 이것은 단일 클론 안으로 조합되었고 이는 또한 클론 3E에 대해 기술된 L1, L2, H1 및 H2 돌연변이를 포함하였다.
- [0407] 3E 및 3C 서열은 Fab 및 전체 항체의 제조를 위해 포유동물 발현 벡터 안으로 클로닝되었고, HEK293 세포에서 발현되었고 Ni-NTA 또는 단백질 A 크로마토그래피를 사용하여 정제되었다. 순수한 단백질은 아미노산 분석에 의해 정확히 정량되었다.
- [0408] Fabs E3 및 3C의 인간 NGF에 대한 결합 친화성은 100 RU NGF이 재결합 효과를 막기 위해 칩 위에서 사용되었다는 것을 제외하고는, 제조업체의 지시에 따라 위에서 기술한 바와 같이 BIA코어 분석을 사용하여 측정되었다. 간단히, 항체(Fabs)의 몇몇 농도는 CM5 칩 위로 100 RU의 부동화 인간 NGF와 함께 2분동안 주입되었고, 1800 초 동안 해리되었다. 마우스 항체 911 (Fab)는 대조군으로서 분석되었다. 데이터는 제조업체의 지시에 따라 BIA 평가 소프트웨어를 사용하여 분석되었다. 항체 E3 및 911의 분석 결과는 도 9와 10에 나타난다. E3는 KD의 대략 0.07 nM (약 $6.0 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 의 k_{on} , 및 약 $4.2 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 의 k_{off})과 함께 인간 NGF을 결합시켰다. 3C는 인간 NGF을 대략 0.35nM (약 1.4×10^{-5} 의 k_{off})의 KD와 결합시켰다. 대조적으로, 마우스 항체 911는 NGF를 3.7 nM의 KD의 $8.4 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 의 k_{off} 및 $2.2 \times 10^4 \text{Ms}^{-1}$ 의 k_{on} 와 결합시켰다. 항체 E3 (상호교환적으로 용어 3E)는 높은 결합 친화성에 기반하여 더 나아간 분석을 위해 선택되었다. E3가 NGF의 NGF 리셉터 trkA와의 상호작용을 막는 능력을 테스트하기 위해 p75, 2.5 nM의 인간 NGF를 미리혼합하고 1시간동안 0 내지 50 nM의 항체 E3 (Fab)로 배양하였다. 배양 후에, 샘플은 260 RU의 p75 (채널 2) 및 600 RU의 trkA (채널 3)을 함유하는 BIA코어 CM5 칩에서 10 ul/분으로 주입되었고, 퍼센트 결합을 결정하였다. 이 분석의 결과는 도 11에 나와있다. 증가된 농도의 Fab E3은 NGF의 p75 및 trkA의 상호작용을 차단하였고, 증가된 신호에 의해 나타난 바와 같이 (RU로 측정됨), Fab E3가 인간 NGF과 trkA 및 p75 둘다와의 상호작용을 차단한다는 것을 지시한다.
- [0409] 항체 E3 (Fab) 농도는 NGF 농도와 동일했고 (약 2.5nM NGF 농도에서), 어떤 NGF결합도 관찰되지 않았다(0의 신호에 의해 나타난 바와 같이). NGF의 농도가 항체 3E 농도와 동일할때 0 퍼센트 NGF-리셉터 결합이 일어났다는 사실은 2.5 nM NGF이 평형에서 NGF에 대한 E3의 kD보다 적어도 10배 더 높다는 것을 암시한다.
- [0410] **실시예 2 : 마우스 E13.5 3차 뉴런 생존 검정을 사용하여 항-NGF 항체의 NGF-차단 능력의 평가**
- [0411] Fab E3 또는 전체 항체 E3가 NGF 활성을 차단하는 능력은 항체의 시험관에서 마우스 E13.5 3차 뉴런의 NGF-의존 생존을 억제하는 능력의 측정에 의해 평가되었다. 3차 신경절은 얼굴 영역의 신경이 통하게 하는 피부 감각 뉴런으로 구성된다. 마우스 E13.5 3차 뉴런의 생존은 NGF는 이들 뉴런의 생존을 지지하기 위해 요구되기 때문에, 항-NGF 대항제 항체의 NGF-차단 활성을 평가하기 위한 민감한 검정이다. 예를 들어, NGF의 포화 농도에서, 생존은 48 시간에 의해 배양에서 100%에 가깝다. 대조적으로, 5% 미만의 뉴런은 NGF의 부재에서 48 시간에 의해 생존한다.
- [0412] 생존 검정은 하기와 같이 수행되었다: 시간-교미된 임신 Swiss Webster 암컷 마우스를 CO2 흡입에 의해 안락사시켰다. 자궁 돌기를 제거하고 태아 단계에서 태아 E13.5를 추출하고 단두시켰다. 3차 신경절을 전해질로 뺀 후 텅스텐 바늘을 사용하여 절개하였다. 신경절을 그후 트립시나아징하고, 기계적으로 분열시키고 폴리-L-오르니틴 및 라미닌으로 코팅된 96-웰 플레이트에서 한정된, 무혈청 배지에서 웰당 200-300 셀의 농도로 플레이트팅시켰다.
- [0413] 항-NGF Fabs 또는 항체의 차단 활성은 3차 뉴런에 첨가함으로써 평가하였다 변하는 용량의 항-NGF 항체 Mab 911 (Fab), 8L2-6D5; H19-L129; E3 및 3C; 및 하기의 농도에서 인간 또는 랫트 NGF: 0.4 ng/ml (-15 pM; 이 농도는 생존을 위한 NGF의 포화 농도를 나타내었다) 및 0.04 ng/ml (-1.5 pM; 이 농도는 약 IC50이다). 배양 48 시간후에, 세포는 다음과 같이 Biomek FX 액체 취급 워크스테이션 (Beckman Coulter)에서 수행된 자동화 면역세포 화학 프로토콜을 겪었다: 4% 포르말데히드, 5% 수크로스, 및 PBS를 사용하여 고정; PBS중의 0.3% Triton X-100 를 사용하여 삼투화); 5% 정상 염소 혈청, PBS 중의 0.11% BSA를 사용하여 비특정 결합 부위의 차단; 및 1차 및 2차 항체로 순차적인 배양하여 뉴런을 검출한다. 1차 항체는 단백질 유전자 생성물 89.5 (PGP9.5, Chemicon), 확립된 뉴런 표현형 마커에 대한 토끼 다클론 항체였다. 2차 항체는 핵 염료 Hoechst 33342 (Molecular Probes)과 함께 Alexa Fluor 488 염소 항-토끼 (Molecular Probes)였고, 배양에 존재하는 모든 셀의 핵을 라벨링한다. 이미지 획득 및 이미지 분석을 Discovery-I/GenII Imager (Universal Imaging Corporation)에서 수행하였다. 이미지는 Alexa Fluor 488 및 Hoechst 33342에 대해 자동으로 2개의 파장에서

얻어졌고, 핵 염색은 모든 웰에 존재하기 때문에, 핵 염색이 Imager의 이미지-기반 자동-초점 시스템을 위해 참고 포인트로서 사용된다. 적절한 목표 및 웰당 이미지화된 위치의 수는 각각의 웰의 전체 표면을 커버하기 위해 선택되었다. 자동화 이미지 분석은 항-PGP9.5 항체로 그들의 특정 염색에 기반하여 48 시간후에 배양에서 각각의 웰에 존재하는 뉴런의 수를 세기 위해 세팅되었다. 이미지의 조심스런 발단 및 형태학의 응용 및 선택성 필터에 기반한 형광성 강도는 웰당 뉴런의 정확한 수를 초래하였다.

[0414] 이 실험의 결과는 높은 친화성을 갖는 Fab E3 차단된 NGF 활성을 증명하였다. 결과는 도 4-6 및 표 9에 나타난다.

[0415] 도 4는 변하는 농도의 인간 및 랫트 NGF의 존재하에서 E13.5 뉴런의 NGF-의존 생존을 나타내는 그래프이다.

[0416] 도 5는 0.04 ng/ml의 인간 NGF (대략 1.5 pM; 하부 패널에 나타냄) 또는 0.4 ng/ml 인간 NGF (대략 15 pM; 상부 패널에 나타냄)중의 어느 하나의 존재하에서 다양한 Fabs의 NGF 차단 효과를 비교하는 그래프이다. 1.5 pM의 NGF는 생존을 촉진하는 NGF의 EC50 주변에 있었던 반면, 15 pM는 NGF의 포화 농도를 나타내었다. 다양한 농도의 Fab E3; 뮤린 911 Fab에서의 E13.5 마우스 3차 뉴런의 생존; 및 Fab H19-L129 및 Fab 8L2-6D5은 위에서 기술한 바와 같이 평가되었다. IC50 (in pM)는 각각의 NGF 농도에서 각각의 Fab에 대해 계산되었고, 표 9에 나타난다. Fab E3은 15 pM 인간 NGF의 존재하에서 IC50의 대략 21 pM, 및 1.5 pM 인간 NGF의 존재하에서 IC50의 대략 1.2 pM을 가지고 인간 NGF-의존 3차 뉴런 생존을 강하게 차단하였다. Fabs 3C과 H19-L129은 또한 인간 NGF-의존 3차 뉴런 생존을 강하게 차단하였다.

[0417] 도 6은 0.04 ng/ml의 랫트 NGF (대략 1.5 pM; 하부 패널에 나타냄) 또는 0.4 ng/ml 랫트 NGF (대략 15 pM; 상부 패널에 나타냄)중 어느 하나의 존재하에서 다양한 Fabs의 NGF 차단 효과를 비교하는 그래프이다. 1.5 pM의 NGF는 EC50 주변에 있었고, 한편 15 pM은 NGF의 포화 농도를 나타냈다. 다양한 농도의 Fab E3에서 E13.5 마우스 3차 뉴런의 생존; 뮤린 Fab 911; 및 FabH19-L129 및 8L2-6D5을 상기한 바와 같이 평가하였다. EC50 (pM으로)을 각각의 NGF 농도에서 각각의 Fab에 대해 계산하였고, 표 9에 나타난다. Fab E3은 15 pM 랫트 NGF의 존재하에서 IC50의 대략 31.6 pM, 및 1.5pM 랫트 NGF의 존재하에서 IC50의 대략 1.3 pM으로 강하게 인간 NGF-의존 3차 뉴런 생존을 차단하였다. Fabs 3C 및 H19-L129은 또한 강하게 랫트 NGF-의존 3차 뉴런 생존을 차단하였다.

[0418] 표 9

사람 NGF	IC50 (15 pM NGF 의 존재하에서)	IC50 (1.5 pM NGF 의 존재하에서)
	pM	pM
8L2-6D5 Fab	1580.5	461.8
H19-L129 Fab	60.1	9.6
3E Fab	<21.0	<1.2
3C Fab	80.9	5.6
911 Fab	322.3	63.5
Rat NGF	IC50 (15 pM NGF)	IC50 (1.5 pM NGF)
	pM	pM
8L2-6D5 Fab	730.3	169.4
H19-L129 Fab	31.0	6.0
3E Fab	<8.3	<1.3
3C Fab	31.6	6.0
911 Fab	161.0	34.6

[0419]

[0420] 다른 실험에서, 본 발명자는 0.4 ng/ml (포화 농도)의 인간 NGF의 존재하에서 전체 항체 E3 및 Fab 3E가 E13.5 뉴런의 NGF-의존 생존을 억제하는 능력을 비교하였다. 분석의 결과는 도 12에 나타난다. 전체 항체 E3 와 Fab 3E는 농도의 전체 항체 및 Fab가 NGF 결합 부위의 수로 표준화되었을때 NGF-의존 생존의 유사한 수준의 억제를 나타내었다(Fab은 하나의 결합 부위를 가지고 전체 항체는 두개의 결합 부위를 가진다). 이들 결과는 전체 항체

의 NGF 다이머로의 결합으로 인한 어떠한 갈망 효과 증명하였다.

- [0421] 또다른 실험에서, 본 발명자는 다양한 농도의 (20,4, 0.8, 0.16, 0.032, 0.0064, 0.00128, 및 0.0 nM)의 항체 E3, 항체 911, 및 trkA 리셉터 면역부착소(면역글로불린 Fc 도메인, CH2-CH3와 융합된 NGF 리셉터 trkA의 세포외 도메인으로 구성된다)가, 0.4 ng/ml (포화조건)의 존재하에서 E13.5 뉴런의 NGF-의존 생존을 억제하는 능력을 비교하였다. 이들 결과는 도 13에 나와있다. 이들 결과는 항체 E3가 항체 911 또는 trkA 면역부착소 중의 어느 하나보다도 더 잘, NGF를 차단했다는 것을 증명하였다.
- [0422] 실시예 3 : 마우스 3차 및 결절 뉴런 생존 검정을 사용하여 항-NGF 항체 E3의 특이성의 평가
- [0423] 특이적으로 NGF 활성을 차단하는 항체 E3의 능력은 포화 농도의 NGF, NGF-관련 뉴로트로핀 NT3, 또는 NGF-무관 항신경성 요인, 대식세포 자극 단백질 (MSP)의 존재하에서, 시험관내에서 마우스E17/18 3차 뉴런의 생존을 억제하는 항체의 능력을 측정함으로써 평가되었다. 마우스E17/18 3차 뉴런의 생존은 E13.5 TG 뉴런들의 생존을 지지하는데 요구된 NGF의 수준보다 더 높은 농도에서 NGF는 이들 뉴런의 생존을 지지하는데 요구되기 때문에, 항-NGF 대항제 항체의 NGF-차단 활성을 평가하기에 민감한 검정이다). 이들 뉴런의 생존은 또한 NT3 또는 MSP에 의해 지지된다 ; 따라서, 이들 뉴런의 생존은 또한 항-NGF 대항제 항체가 또한 NT3 또는 MSP을 차단한다는 여부를 평가하기에 민감한 검정이었다.
- [0424] 특이적으로 NGF 활성을 차단하는 항체 E3의 능력은 또한 항체가 포화 농도의 BDNF 또는 NT4/5의 존재하에서 마우스 결절 E17 뉴런의 생존을 억제하는 능력의 측정에 의해 평가되었다. 결절 뉴런의 생존은 BDNF 또는 NT4/5에 의해 지지되고 ; 따라서, 이들 뉴런의 생존은 항- NGF 대항제 항체의 BDNF 또는 NT4/5-차단 능력을 평가하기 위해 민감한 검정이다.
- [0425] 생존 검정은 다음과 같이 수행되었다: 시간-교미된 임신 Swiss Webster 암컷 마우스를 CO2 흡입에 의해 안락사시켰다. 자궁 돌기를 제거하고 태아는 (태아 일 17 또는 18째에) 추출하고 단두시켰다. 3차 및 결절 신경절 절개하였고 클리닝하였다. 신경절을 그후 트립시나이징하고, 기계적으로 분열시키고 폴리-L-오르티닌 및 라미닌으로 코팅된 4-웰 플레이트 (Greiner)에서 한정된, 무혈청 배지에서 웰당 100-300 셀의 밀도에서 플레이트하였다.
- [0426] E17/18 3차 뉴런은 첨가된 항신경성 요인 (음성 대조군)없이 또는 인간 NGF (400pM 및 15pM) (양성 대조군); NT3 (400 pM); 또는 MSP (600pM)의 포화 농도의 존재하에서 성장되었다. 복제 배양은 변하는 농도의 E3 및 911 Fabs 및 전체 항체를 포함하는 셋업이었다. 농도의 Fab 및 전체 항체는 결합 부위 당 지시되었다(예를 들어, 전체 항체는 두개의 결합 부위를 함유하는 한편, Fab은 하나의 결합 부위를 함유한다).
- [0427] E17 결절 뉴런은 첨가된 항신경성 요인 (음성 대조군) 또는 포화 농도의 BDNF (400pM) (양성 대조군) 또는 NT4/5 (400pM) 또는 NGF 무관 성장 요인 ILF (인터류킨 억제 요인)의 존재하에서 성장되었다. 높은 농도의 뉴로트로핀이 사용되었고, 이 실험의 목표는 항체의 특이성을 테스트하는 것이었다. 복제 배양은 항체 E3 및 911의 첨가 있고 또는 없이 다시 변하는 것을 포함하는 셋업이었다. 각각의 조건하에서 배양에서 48 시간 후에 각각의 웰에서 생존하는 총 수의 뉴런은 상-대조 현미경을 사용하여 매뉴얼 카운팅함으로써 확인되었다.
- [0428] 이들 실험의 결과는 E3 및 911 항체가 완전히 E1 8 3차 뉴런에 대한 NGF 의 생존 촉진 효과를 차단했다는 것을 증명하였다. 대조적으로, E3 및 911 항체는 NT3 또는 MSP에 의해 촉진된 3차 뉴런의 생존 또는 BDNF 또는 NT4/5 또는 LIF에 의해 촉진된 결절 뉴런의 생존에 대한 효과가 없다.
- [0429] 이들 결과는 항체 E3는 NGF에 대해 선택적인 특이성을 가졌고, 이들 항체와 다른 NGF 관련 뉴로트로핀 (NT3, NT4/5, BDNF) 사이에는 NGF 차단에 효과적인 농도보다 더높은 1000-배 내지 10, 000-배의 농도에서 어떤 검출된 상호작용도 존재하지 않았다는 것을 증명하였다. 더 나아가, 이들 결과는 항체 또는 Fab E3의 첨가시 NGF-의존 뉴런의 NGF-보충된 배양에서 보여진 뉴런 죽음은 이들 항체와 NGF 사이의 특이적 상호작용 때문이었고 일반화된 독성 효과 때문이 아니었다는 것을 증명하였다. 마우스 항-NGF 대항제 항체 911는 또한 시험되었고, 유사한 결과가 관찰되었다. 사용된 높은 농도의 뉴로트로핀으로 인해, 항체 E3 와 911 둘다는 그들의 적정조건에 매우 가깝다는 것과 NGF로의 이들 항체의 결합 친화성에서의 차이는 이들 조건 하에서 덜 명백하기 때문에 NGF를 유사한 수준에서 결합할 것이라고 예측되었다는 것이 주목된다.
- [0430] 이 실험의 결과는 도 14,15, 16, 및 17에 나와있다. 데이터는 48 시간후에 배양에서 각각의 실험에 대해 (각각, 예를 들어, 포화NGF 농도의 존재하에서 성장된 3차 뉴런의 100% 생존, 및 포화 BDNF 농도의 존재하에서 성장된 결절 뉴런의 100 % 생존) 양성 대조군에서 나타낸 생존에 대한 평균 퍼센트 생존(±평균의 표준 오차, 각 데이터 점에 대해 n=3)을 보여주었다. 도 14-15는 항- NGF 대항제 항체 E3 또는 Fab E3가 심지어 200 nM만큼 높은

항체 농도에서 NT3, 및 MSP에 의해 촉진된 생존을 억제하지 않았다는 것을 보여주는 그래프이다. 대조적으로, 항체 E3 또는 Fab 3E 및 Fab 911의 20nM는 NGF-유도된 생존을 완전히 차단된다. 마우스 항-NGF 대항체 항체 911는 또한 테스트되었고, 유사한 결과가 관찰되었다. 특이적으로, 도 14는 어떤 첨가된 뉴로트로핀 (용어 "대조군"), 400 pM NGF (용어 "NGF-400pM), 10 nMNT3(용어 "NT3-10nM) 또는 600 pM MSP (용어 "MSP-600 pM)의 무존재하에서, E3 Fab (도면에서 용어 "3E")의 다양한 농도의 (20nM, 2 nM, 또는 0.2nM)의 효과 및 E18 3차 뉴런의 생존에 대한 마우스 항체 911 Fab를 비교하는 그래프이다. 도 15는 뉴로트로핀 (용어 "무 요인"), 400pM NGF (용어 "NGF-400pM), 10 nMNT3(용어 "NT3-10nM) 또는 600 pM MSP (용어 "MSP-600 pM)이 첨가되지 않은 상황하에서, 다양한 농도 (200 nM 및 80nM)의 E3 Fab 및 전체 항체 및 마우스 항체 911 전체 항체 및 Fab의 E17 3차 뉴런의 생존의 효과의 비교를 나타내는 그래프이다.

[0431] 도 16-17는 항-NGF 대항체 항체 E3 또는 Fab E3는 BDNF, NT4/5 또는 LIF에 의해 촉진된 E17 결절 뉴런의 생존을 억제하지 않았다는 것을 보여주는 그래프이다. 마우스 항-NGF 대항체 항체 911가 또한 테스트되었고, 유사한 결과가 관찰되었다. 특이적으로, 도 16은 첨가된 뉴로트로핀 (용어 "요인 없음"), 400 pM BDNF (용어 "BDNF-400pM), 400 pM NT4/5(용어 "NT4/5-400pM), 또는 2.5 nM LIF (용어 "LIP-2.5 nM)의 무존재하에서, 생존 ofE17 결절 뉴런에 대한 다양한 농도 (200 nM 또는 80 nM)의 전체 항체 E3 (용어 "도에서 3E "), Fab E3, 전체 항체 911, 또는 Fab 911의 효과의 비교를 보여주는 그래프이다. 도 17는 첨가된 뉴로트로핀(용어 "대조군"), 400 pM BDNF (용어 "BDNF-400pM), 400 pM NT4/5(용어 "NT4/5-400pM), 또는 2.5 nM LIF (용어 "LIP-2.5nM)의 무존재하에서 생존 ofE17 결절 뉴런에 대한 다양한 농도 (200nM, 20nM,2nM)의 Fab E3 (용어 "3E in the 도"), 또는 Fab 911의 효과의 비교를 보여주는 그래프이다.

[0432] 실시예 4 : 포유동물 셀에서 포유동물 발현 벡터의 제조 및 항체 E3의 발현

[0433] 3가지 포유동물 발현 벡터가 설계되었고 포유동물 세포에서 항체 E3의 발현에 사용하기 위해 구성되었다.

[0434] 벡터 Db. 911. 3E는 E3 항체의 중쇄 가변 영역 및 인간 IgG2a 일정 영역을 포함하는 발현 벡터이고, 중쇄의 일시적인 또는 안정한 발현에 적합하다. Db. 911.3E는 하기의 영역에 해당하는 뉴클레오티드 서열로 구성된다: 뮤린 거대세포바이러스 프로모터 영역 (뉴클레오티드 1-612); 합성의 인트론 (뉴클레오티드 619-1507) DHFR 코딩 영역 (뉴클레오티드 707-1267); 인간 성장 호르몬 신호 펩티드 (뉴클레오티드 1525- 1602); 항체 3E 중쇄 가변 영역 (뉴클레오티드 1603-1965); 다음의 돌연변이를 함유하는 인간 중쇄 IgG2a 일정 영역: A330P331 내지 S330S331 (야생형 IgG2a 서열을 참조하여 아미노산 넘버링; Eur. J. Immunol. (1999) 29: 2613-2624)을 참조; SV40 늦은 폴리아데닐화 신호 (뉴클레오티드 2974- 3217); SV40 인핸서 영역 (뉴클레오티드 3218-3463); 파지 f1 영역 (뉴클레오티드 3551- 4006) 및 베타 락타마제 (AmpR) 코딩 영역 (뉴클레오티드 4443-5300). Db. 911.3E 은 2003년 1월 8일에 ATCC에 기탁되었고, ATCC Accession No. PTA- 4895으로 할당되었다.

[0435] 벡터 Eb. 911.3E는 E3 항체 및 인간 카파 사슬 일정 영역의 경쇄 가변 영역을 포함하는 발현 벡터이고, 경쇄의 일시적인 발현에 적합하다. Eb. 911.3E는 다음 영역에 해당하는 뉴클레오티드 서열로 구성된다 : 뮤린 거대세포바이러스 프로모터 영역 (뉴클레오티드 1-612); 인간 EF-1 인트론 (뉴클레오티드 619-1142); 인간 성장 호르몬 신호 펩티드 (뉴클레오티드 1173-1150); 항체 E3 경쇄 가변 영역 (뉴클레오티드 1251-1571); 인간 카파 사슬 일정 영역 (뉴클레오티드 1572-1892); SV40 늦은 폴리아데닐화 신호 (뉴클레오티드 1910-2153); SV40 인핸서 영역 (뉴클레오티드 2154-2399); 파지 f1 영역 (뉴클레오티드 2487-2942) 및 베타 락타마제 (AmpR) 코딩 영역 (뉴클레오티드 3379-4236). Eb. 911.3E는 2003년 1월 8일에 ATCC에 기탁되었고 ATCC Accession No. PTA-4893에 할당되었다.

[0436] 벡터 Eb. pur. 911.3E은 E3 항체의 경쇄 가변 영역과 인간 카파 일정 영역을 포함하는 발현 벡터이고, 경쇄의 안정한 발현에 적합하다. Eb. pur. 911.3E는 다음 영역에 해당하는 뉴클레오티드 서열로 구성된다: 뮤린 거대세포바이러스 프로모터 영역 (뉴클레오티드 1-612); 인간 EF-1 인트론 (뉴클레오티드 619-1758); pac 유전자 (퓨로마이신R) 코딩 영역 (뉴클레오티드 739-1235) ; 인간 hsp70 5'UTR 영역 (뉴클레오티드 1771- 1973); 인간 성장 호르몬 신호 펩티드 (뉴클레오티드 1985-2062); 항체 E3 경쇄 가변 영역 (뉴클레오티드 2063-2383) ; 인간 카파 사슬 일정 영역 (뉴클레오티드 2384-2704); SV40 늦은 폴리아데닐화 신호 (뉴클레오티드 2722-2965); SV40 인핸서 영역 (뉴클레오티드 2966-3211); 파지 f1 영역 (뉴클레오티드 3299-3654) 및 베타 락타마제 (AmpR) 코딩 영역 (뉴클레오티드 4191-5048). Eb. pur.911. E3는 2003년 1월 8일에 ATCC에 기탁하였고, ATCC Accession No. PTA- 4894가 할당되었다.

[0437] 일시적인 세포 발현을 다음과 같이 수행하였다: 150 mm 접시에서 CHO 및 HEK293T 셀은 일시적으로 25 ug 의 각각의 플라스미드로 공동-트랜스펙션시켰다 (즉, 중쇄를 함유하는 하나의 플라스미드 및 경쇄를 함유하는 하나의

플라스미드). DNA를 제조업체의 지시에 따라 100 ul 리포렉타민 2000(Invitrogen)와 혼합시켰다. The DNA-지질 복합체는 셀을 혈청 또는 항생물질없이 DMEM/F12 배지에서 5 시간동안 접촉시켰다. 이 배양후에, 배지를 발현을 위해 어떠한 첨가제없이 2틀동안 Opti-MEM (Invitrogen)로 바꾸었다. 항체를 함유하는 세포 상청액을 순차적으로 4회까지 수확하고 이어서 배지 교차하였다. 상청액을 MapSelect 단백질 A 수지 (Amersham 바이오사이언시스 17-5199-02)을 사용하여 친화성 크로마토그래피에 의해 정제시켰다. 항체는 pH 8에서 0.3M 글리신, 0.6MNaCl 완충액중에 단백질 A 수지에 결합되었고, 그후 pH 3에서 0.1 M 시트레이트 완충액으로 용출시켰다. 항체를 함유하는 분율을 pH 8.0에서 즉시 1M Tris 완충액으로 중화하고, 항체 분율은 그후 투석하고 PBS에서 농축시켰다.

[0438] 실시예 5 : 항-NGF 항체 E3은 수술후 고통을 치료하는데 효과적이다

[0439] 본 발명자는 항체 E3로 치료하는 효능을 평가하기 위해 수술 후 통증이 비슷한 통증 모델을 사용하였다. 항체 E3는 다음의 돌연변이를 함유하는 인간 중쇄 IgG2a 일정 영역을 포함하였다 : A330P331 내지 S330S331 (야생형 IgG2a 서열에 대한 참조와 함께 아미노산 넘버링; Eur. J Immunol. (1999) 29: 2613-2624를 참조); 인간 경쇄 카파 일정 영역 ; 및 표 1A 및 1B에서 나타난 중쇄 및 경쇄 가변 영역.

[0440] 동물. 220-240 그램 사이의 중량인 수컷 Sprague Dawley 랫트는 Harlan (Wisconsin)으로부터 구매하였고 수술 1주 전동안 동물 시설에 순응시켰다.

[0441] 수술. 수술은 Brennan, et al. 통증 64: 493-501 (1996)에 의해 기술된 과정을 기초로 하였다. 동물을 수술하는 동안 유지되었던 공기 혼합물중의 2% 이소플루란으로 노오즈 콘을 통해 마취시켰다. 오른쪽 후방 발의 발바닥 표면을 포비돈-요오드 패드로 제조하였고, 1-cm 중심 길이방향 절개를 피부와 근막을 통해 만들었고, 혈의 가장자리로부터 0.5 cm로 시작해서 발가락 쪽으로 연장된다. 측정은 고정된 위치에서 보유편 발로 자를 사용하여 이루어졌다. 발바닥은 근육은 구부러진 집게를 사용하여 올렸고 길이방향으로 절개하였다. 근육은 기원과 삽입 사이에서 그것의 전체 깊이를 통해 절개하였다. 출혈은 수술내내 거즈 패드를 통해 가해진 압력에 의해 제어되었다. 부상은 두개의 매트리스 봉합선 (5-0 에틸론 블랙 모노필라멘트)로 밀폐시켰다. 이들 봉합선은 5-6 회 피대졌고, 첫번째 매듭은 느슨하게 묶었다. 부상 부위는 바시트라신 용액으로 면봉 약칠하였다. 동물은 회복시켰고 거동 테스트를 시작하기 전에 깨끗한 사육장에서 2시간 시간 이상동안 휴식하였다.

[0442] 휴면 통증 평가. 누적 통증 점수를 사용하여 중량 거동에 관련된 통증을 평가하였다. 동물은 그들의 발의 안쪽면의 정밀검사를 허용하는 플랫폼 (h: 18")위에 상승된 깨끗한 플라스틱 사육장에 플라스틱 메시 (그리드: 8mm²) 위에 놓았다. 20분 새 환경 순응 기간 후에, 체중 부하는 0 내지2의 스케일에서 평가되었다. 만일 발이 창백해졌고 또는 메시에 대해 압축되었다면, 0의 점수가 주어졌고, 전체 체중 부하를 나타낸다. 만일 피부의 창백함 또는 만입없이, 단지 메시지를 접촉하면서 발이 피부로 촉진되면, 1의 점수가 주어졌다. 만일 발이 완전히 메시 밖으로 유지되면 2의 점수가 주어졌다. 만일 랫트가 여전히 휴식하고 있다면 발을 움짤하는 것은 2로 간주되었다. 각각의 동물은 30분동안 매 5분 마다 1분동안 관찰되었다. 1/2-시간동안에 얻어진 6 점의 총합 (0-12)은 예리한 발에서 통증을 평가하는데 사용되었다. 2의 점수의 빈도는 또한 계산되었고 심각한 통증의 유발 또는 동물에 의한 발의 전체적인 보호를 평가하는데 사용되었다. 각각의 동물은 외과수술 (베이스라인)전에, 2h, 24h, 48h, 및 72h 수술후, 24 시간 테스트되었다. 이 실험의 결과는 도 1에 나타내고, 그것은 35 mg/kg의 항-NGF 마우스 항체 911으로 처리된 동물에서 관찰된 누적 휴면 통증 점수를 나타낸다. 이들 결과는 항-NGF 항체로 상당히 감소된 수술후 휴면 통증의 치료를 증명하였다. 체중 부하는 동물이 얼마나 팔다리를 사용하느냐의 양호한 상호관계였고, 따라서 통증 경감의 효과적인 측정이었다.

[0443] E3 항체는 절개전 15 시간째에 항체의 다양한 농도 (동물 중량의 킬로그램 당 0.004, 0.01, 0.02, 0.1, 0.6, 및 1 mg)에서 복막내 (i. p.) 주입되었다. 음성 대조군은 항체를 받지 않았지만 식염수로 i. p. 주사되었다. 0.01 mg/kg에서의 펜타닐은 수술후 24 시간에서 테스트하기 30 분전에 양성 대조군으로서 i. p. 주사되었다. 각각의 실험은 각각의 상태에 대해 8 동물을 (그룹당 n=8) 수반하였고, 대조군은 56 동물을 가졌다. 수술을 수행하였고 누적 통증 점수를 상기와 같이 측정하였다. 휴면 통증은 수술후 24 시간 평가되었다.

[0444] 도 7에서 나타난 바와 같이, 인간화 항-NGF 항체 E3는 수술후에 0.02 mg/kg 내지 1 mg/kg 투여량에서 투여될 때 상당히 휴면 통증 (p < 0.05)을 감소시켰다. "*"는 대조군으로부터 상당히 중요한 차이를 나타낸다 (p < 0.05). 0.02 mg/kg으로 처리는 0.01 mg/kg 펜타닐로 처리하는것 만큼 적어도 효과적으로 통증 거동을 완화시켰다. 펜타닐의 이러한 투여는 이 유력한 오피오이드의 정상 인간 투약의 10배이다.

[0445] 또다른 실험에서, 수술후 투여될 때 통증을 줄이는데 있어서 E3 항체의 효능은 시험되었다. 항체 E3 (0.5

mg/kg)는 수술 2 시간 후에 정맥내 (i.v.) 주사하였다. 대조군은 항체를 받지 않지만 식염수를 정맥내 주사한다. 수술을 수행하였고 누적 통증 점수로 표현된 휴면 통증은 수술 24 시간 후에 평가되었다. 도 8에서 나타난 바와 같이, 항-NGF 항체로의 치료는 항체가 절개후 2 시간 후에 투여될 때 절개 후 24 시간째에 상당히 ($p < 0.05$) 휴면 통증을 감소시켰다. 이들 결과는 수술후 투여될 때 E3 항체가 효과적으로 수술후 통증을 완화하였다는 것을 증명하였다.

[0446] 실시예 6 : 류마티즘 관절염의 랫트 모델에서 항-NGF 대항제 항체 911의 진통 효과의 평가

[0447] 랫트에서 완전한 Freund의 보조약 (CFA) -유발된 만성 관절염에서 항-NGF 항체, 911의 진통 효과(Hongo et al., Hybridoma 19 (3): 215-227 (2000)참조)를 참조 물질로서 사용된 인도메타신과 비교하여, 발성 테스트를 사용하여 연구하였다.

[0448] 실험 상의 초기에 150 g 내지 220 g 중량의 오십(50) 수컷 Lewis 랫트 (LEWIS LEW/CrI Ico) (Charles River Belgium)는 본 연구에서 포함되었다. 모든 동물은 실험하기 전에 적어도 5 일동안 유지되었고, 전 실험으로 통해 여과된 수돗물 및 표준 펠릿화 실험실 식사 (U. A. R., France) 로의 임의대로 접근과 함께 온도 (19.5-24.5 °C), 상대 습도 (45-65 %) 및 12-h 빛/어둠 주기-제어된 방에 수용되었다. 동물은 개별적으로 꼬리에 확인되었다.

[0449] 0일째에(D0), 관절염은 꼬리안으로 미네랄 오일 (10 mg/ml)중의 0.05 ml의 Mycobacterium 부티리컴 (Difco, USA) 현탁액을 피내 주사함으로써 랫트에서 유발되었다. 14일째에 (D14), 관절염 랫트는 뒷발의 부드러운 굴곡 작용에 대한 그들의 발성 능력에 따른 연구에서 그들의 관절염 지수에 의해 포함되었고, 각각의 뒷발과 앞발 (Kuzuna et al., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 23: 1184-1191 (1975); Pearson et al., 관절염 Rheum. 2: 440-459 (1959) 참조)에 대한 염증 점수를 사용하여 평가되었다. 동물은 다음 기준에 근거하여 점수매겼다: 점수0: 정상 관절; 점수1: 흥반; 점수2: 약간 부종이 있는 흥반; 점수3: 관절 경직없는 강한 염증; 점수4: 관절 경직. 부드러운 굴곡작용에서 발성할 수 있고 2 또는 3 의 점수를 나타내는 동물들 만이 연구에 포함되었다.

[0450] 10 랫트 각각의 4 그룹은 본 연구에서 사용되었다. 그룹 1 (부형제)에 있어서, 14일에 (D14), 선택후에, 랫트는 부형제 (식염수)에 의해 정맥내 투여되었다. 18일째에(D18), 뒷발의 부드러운 굴곡작용에 의해 통각 강도를 측정하였고 발성의 수준의 강도는 각각의 동물에 대해 기록되었다. 그룹 2 (4일)에 대해서, D14일째에, 선택후에, 랫트는 911 (10 mg/kg)을 정맥내 투여하였다. 18일째에 (D18), 통각 강도는 뒷발의 부드러운 굴곡작용에 의해 평가되었고 발성의 수준의 강도는 또한 각각의 동물에 대해 기록되었다. 그룹 3 (24 시간)에 대해서, 17 일째에 CFA의 주입후에, 랫트는 911 (10 mg/kg) 정맥내 투여되었다. 통각 강도는 뒷발 24 시간 후의 부드러운 굴곡작용에 의해 평가되었고, 발성의 수준의 강도는 각각의 동물에 대해 기록되었다. 그룹 4에 대해서 (인도메타신), 18(D18)일째에, 통각 강도는 인도메타신 (10 mg/kg)의 경구 투여 1시간 후에 뒷발의 부드러운 굴곡작용에 의해 평가되었다. 발성의 수준의 강도는 또한 각각의 동물에 대해 기록되었다. 테스트 물질은 정맥내 경로에 의해 5 ml/kg의 부피하에서 블라인드 무작위 방식으로 투여되었고, 반면 인도메타신은 10ml/kg의 부피하에서 경구 경로에 의해 투여되었다.

[0451] 항-NGF 항체 911의 진통 효과는 표 10에 나타난다. 결과는 각각의 동물에 대해 mV (평균 SEM)로 기록된 발성의 수준의 강도를 측정한 통각 강도로서 각각의 그룹에 대해 표현되었고, 통각 강도의 변이의 퍼센트는 부형제-처리된 그룹의 평균값으로부터 계산된다. 처리된 그룹과 부형제 그룹 사이의 통계적인 유의성은 변이의 하나의 방식의 분석후에 잔여 변이를 사용하여 Dunnett's 테스트로 결정되었다($P < 0.05$).

[0452] 표 10

랫트에서 완전한 freund의 보조약-유발된 만성 관절염에서 911의 진통 효과

물질 (투여의 일수)	부형제 (D14)	911 (D14)	911 (D17)	인도메타신 (D18)
복용량 (mg/kg)		10	10	10
아름주는 자극 강도 (mV)	971.0 ± 116.2	234.7 ± 34.4 *	247.2 ± 41.8 *	145.8 ± 29.9 *
% 변화량	-	-76	-75	-85

[0453]

[0454] 결과는 평균 ± sem으로 표시된다.

[0455] 그룹 당 n=10 랫트

- [0456] 하루0(D0) : CFA의 투여에 의한 만성 관절염의 유도
- [0457] 부형제: 식염수
- [0458] 911 (10 mg/kg)은 D14 또는 D17에서 정맥내 투여되었고 통증 측정은 D18에서 수행되었다. 인도메타신 (10 mg/kg)은 D18에서 경구로 주어졌고 통증 측정은 투여 1시간 후에 수행되었다.
- [0459] Dunnett's 테스트: *는 $P < 0.05$ 에 대해서 부형제-처리된 그룹과 비교하여 상당한 차이를 나타낸다
- [0460] 표 10에서 나타난 바와 같이, 항-NGF 항체 911은 항체의 단일 투여 후에 24 시간 또는 4 일 류마티즘 관절염의 랫트 모델에서 통증을 상당히 감소시켰다.
- [0461] *실시예 7 : 류마티즘 관절염의 랫트 모델에서 항-NGF 대항제 항체 E3 및 911의 약리학적 효과*
- [0462] 내부 양성 대조군 물질로서 사용된 인도메타신과 비교하여, 랫트에서, 완전한 Freund의 보조약 (CFA)-유발된 만성 관절염의 모델에서 항-NGF 대항제 항체 E3 및 911의 약리학적 효과 (항-염증 및 진통 효과)를 연구하였다. E3 및 911의 진통 효과는 통각 반응을 측정함으로써 평가되었다. 항-염증 효과는 발 체적, 관절염 지수 (염증 점수), 체중 및 뒷발 중량에 의해 평가되었다. 발 시토키인 수준 (IL-6, IL-1 β , TNF- α 및 TGF- β 1), 혈청중에 순환하는 TGF- β 1, E3 및 911 플라즈마 농도, 생물학적 파라미터 및 X-선 방사선촬영법을 실험의 마지막에 수행하였다.
- [0463] 실험적 프로토콜
- [0464] 1. 연구 설계
- [0465] 80 수컷 Lewis 랫트 (LEWIS Lew/Ico) (Charles River Laboratories- Belgium) 5-주령은 본 연구에 포함되었다. 그들은 12-시간 밝음/어둠 주기와 함께 연구하는 동안내내 여과된 수돗물 및 표준 펠릿화 실험실 식사로의 임의대로 접근이 제공된 (SAFE, France) 온도(19.5-24.5 $^{\circ}$ C) 및 상대 습도(45-65%) 제어된 방에 수용되었다. 동물 시설에 수용될 때, 그들은 우리 당 5마리가 수용되었고 10-일 환경순응 기간이 어떠한 테스트 전에 관찰되었다. 동물은 개별적으로 꼬리에 확인되었다.
- [0466] 10 동물의 5 그룹(Charles River Laboratories-Belgium로부터의 5-주령 수컷 Lewis 랫트-LEWIS Lew/Ico) 각각은 이 연구에 포함되었다: 그룹 1: 관절염이 아닌 랫트/식염수 (부형제), 정맥내 큰환약, n=10 ; 그룹 2: 관절염 랫트/식염수 (부형제), 정맥내 큰환약, n=10 ; 그룹 3: 관절염 랫트/인도메타신 3 mg/kg, p. o 10 일에 걸쳐서 매일, n=10 ; 그룹 4: 관절염 랫트/E3, 1 mg/kg, 정맥내 큰환약, n=10 ; 그룹 5: 관절염 랫트/911, 10 mg/kg, 정맥내 큰환약, n=10. 복용량은 자유 활성 물질 (mg/kg)의 관점에서 표현되었다. E3와 911은 임시변통으로 원액으로부터 원하는 농도까지 식염수에서 제조되었다. E3 1 mg/kg: 3.41 mL의 원액 (0.88 mg/ml) q. s. p. 15 mL의 식염수. 911 10 mg/kg: 12 mL의 원액 (2.5 mg/ml) q. s. p. 15 mL의 식염수. 모든 희석 용액 (정맥내 주사 전에)을 0. 20 μ m의 무균 필터 장치를 사용하여 살균하였다. 각각의 정맥내 주사 전에 희석 용액의 pH와 삼투 값을 측정하였다. 첫번째 i.v.전에, 식염수, E3, 및 911에 대한 삼투 (mosm/L)는 각각 278,269, 및 308이었고; 식염수, E3, 및 911에 대한 pH는 각각 5.93, 6.76, 6.71였다. 두번째 i.v.전에, 식염수, E3, 및 911에 대한 삼투 (mosm/L)는 각각 280,270, 및 309였고; 식염수, E3, 및 911에 대한 pH는 각각 5.86, 6.72, 및 6.59였다.
- [0467] E3 또는 911 또는 식염수를 관절염 유발후 14일과 19일 제에 5mL/kg의 부피로 코드화 및 무작위 순서로 큰환약 주사에 의해 정맥내 투여하였다. 비-관절염 그룹에 식염수가 14일과 19일제에 5 mL/kg의 부피로 큰환약 주사에 의해 정맥내 주어졌다. 인도메타신을 임시변통으로 1% 메틸셀룰로오스중에서 제조하였다. 인도메타신을 관절염 유발후에 14일로부터 23일까지 10 일에 걸쳐서 하루에 한번 경구 경로 (p. o.)에 의해 10 mL/kg의 부피로 코드화 및 무작위 순서로 투여하였다.
- [0468] 2. 관절염의 유발
- [0469] 0일제에 (D 0), 관절염은 0.05 ml의 Mycobacterium 부티리컴 현탁액의 꼬리 안으로 70 랫트에서 피내 주사에 의해 유발되었다. 10 랫트의 그룹은 어떠한 피내 주사(비-관절염 랫트)를 받지 않는다. 14일제에 (D 14), 관절염 랫트가 다음 기준을 사용하여 연구에 포함되었다 : 비-관절염 그룹에서 (아래에서 기술한 바와 같이 발 체적 측정) 평균 발 체적 (왼쪽과 오른쪽 발 체적의 평균)에 비교하여, 적어도 0.30 ml의 평균 발 체적 (왼쪽과 오른쪽 발 체적의 평균)의 증가를 나타낸 랫트를 모두 포함하였다 ; 모두 부드러운 굴곡작용 (아래에 기술된 바와

같이 통각 반응 측정)시에 발성을 나타낸 랫트를 포함하였다; 각각의 뒷발 (아래에서 기술된 바와 같이 관절염 지수 측정에서 2-3의 관절염 지수의 점수를 나타낸 랫트를 모두 포함했다(0,1 또는 4의 점수를 갖는 동물은 버렸다).

[0470] 3. 체중

[0471] 동물을 0일 내지 24일동안 하루에 한번 무게를 잰다 (치료하기 전 주말 동안에는 제외하고: D 1, D 2, D 8, D 9, D10). 모든 측정은 D 14 (7: 30-9: 00 am)과 D 24 (7: 30- 8: 00 am)에서 제외하고 9: 00 와 12: 00 am 사이에서 수행하였다.

[0472] 3. 발 체적 측정

[0473] 각각의 랫트의 오른쪽과 왼쪽 뒷발 체적은(관절염 및 비-관절염 랫트) 체적변화유량계를 사용하여 측정되었다. 측정은 다음 시간에서 수행되었다(관절염의 유발후): 14일 (정맥내 큰환약 또는 p. o. 투여 전); 및 24일(마지막 정맥내 큰환약 주사 5 일 후 또는 마지막 p. o. 투여 24 h 후). 모든 측정은 9: 00와 12: 00 am 사이에서 수행되었다. 모든 데이터를 수집하였고 WinDas 소프트웨어에 의해 저장되었다.

[0474] 4. 관절염 지수

[0475] 각각의 뒷발과 앞발 (관절염 랫트)에 대한 염증 점수를 사용하여 관절염 지수를 평가하였다 : 점수0: 정상 관절; 점수1: 홍반; 점수2: 홍반 약간 부종이 있는; 점수3: 관절 경직이 없는 강한 염증; 점수4: 관절 경직. 이 평가는 다음 시간에서 수행되었다 (관절염의 유발후): 14일 (정맥내 큰환약 또는 p. o. 투여 전에); 및 24일 (마지막 정맥내 큰환약 주사후 5 일 또는 마지막 p. o. 투여후 24 h). 모든 측정은 2: 00내지 3: 00 pm (D 14), 8: 00내지 9: 00 am (D 24) 사이에서 수행되었다. 모든 데이터를 수집하였고 WinDas 소프트웨어에 의해 저장되었다.

[0476] 5. 통각 반응의 측정 (발성 테스트)

[0477] 통각 반응은 작동자의 손가락으로 4 내지 5 초의 간격을 두고 2번 반복해서 오른쪽과 왼쪽 뒷발의 부드러운 굴곡작용에 의해 평가되었다(관절염 랫트). 발성의 수준의 강도는 각각의 뒷발 (2 번: 오른쪽 뒷발에서: s1 및 s3; 2 회: 왼쪽 뒷발에서: s2 및 s4)에 대해 각각의 동물에 대해 기록되었다.

[0478] 이 평가는 다음 시간에서 수행되었다 (관절염의 유발 후에) : 14일 (정맥내 큰환약 또는 p. o. 투여 전); 18일 (두번째 정맥내 큰환약 주사 전 또는 p. o. 투여후 1 hr); 및 24일 (마지막 정맥내 큰 환약 주사후 5 일 또는 마지막 p. o. 투여후 24 h). 모든 측정은 D 14 (7: 30-9: 00 am)과 D 24 (7: 30-9: 00 am)에서 제외하고 9: 00과 12: 00 am 사이에서 수행하였다.

[0479] 6. E3 또는 911 농도의 측정 및 순환하는 TOP- 1 및 혈액학적 파라미터를 위한 혈액 수집

[0480] 24일에 (발 체적 및 관절염 지수 측정 및 테스트 발성 후), 이소푸란을 사용하는 일반적인 마취하에서(산소와 질소 산화물의 혼합물에서), 혈액 샘플(약 800-1000 μ l)을 눈뒤 공동으로부터 마이크로피펫으로 모세관 작용에 의해 수집하였다.

[0481] E3 또는 911 농도의 측정(그룹 2, 4 및 5): 혈액 샘플의 일부를 Li-Heparin(얼음위에 유지)를 함유하는 튜브에 수집하였고 10분동안 2500-3000g에서 원심분리하였다. 플라즈마 샘플(적어도 100 μ l)을 얻었고, 액체 질소에서 냉동시키고, -80 $^{\circ}$ C에서 저장하였다. 한 샘플을 약간 용혈시켰다(부형제 처리된 마취 랫트 #36).

[0482] 순환 TGF- β 1의 측정(그룹 1-2-3-4-5): 혈액 샘플의 일부를 주위 온도에서 세럼 제조를 위해 마이크로 튜브에 수집하였다. 샘플 수집 후에, 혈액을 원심분리 전에 혼합하고 30분동안 응고시켰다. 튜브를 약 6000g 에서 30 분동안 원심분리하였다. 각각의 혈청 샘플(적어도 100 μ l, 랫트 #52 및 #53을 제외하고)을 알리콧하고 TGF- β 1 분석을 위해 샘플 활성화때까지 -20 $^{\circ}$ C에서 저장하였다. 이들 알리콧(50 유리물약병)을 연구의 P으로부터 시작하여 6개월의 기간동안 유지하였다. 일부 샘플은 약간 용혈되었다(부형제-처리된 마취되지 않은 랫트: #2, #5, #9, #10; 부형제 처리된 마취 랫트: #53, #63,; E3-처리된 마취 랫트 #31, #51; 911-처리된 마취 랫트: #52, #62, #64). TGF- β 1 수준은 인간 TGF- β 1 ELISA 키트를 사용하여 측정되었다(ref. DB100, Batch 212258 및 213610, R&D Systems-France).

[0483] 혈액학적 파라미터를 위한 혈액 수집 (그룹 1-2-3-4-5: 50 유리물약병):

[0484] 혈액 샘플의 일부를 K3-EDTA (적어도100 μ L)을 함유하는 튜브에 수집하였다. 수집하는 날에 파라미터의 결정을

수행하였고 샘플은 저장되지 않았다. 혈액학적 파라미터는 적혈구, 흰색혈액셀, 혈소판, 헤모글로빈, 헤마토크리트는 혈액학 셀 카운터 (D 24)로 측정하였다. 일부 혈액학적 파라미터는 응고된 샘플때문에 측정되지 않았다 (부형제-처리된 비-관절염 랫트: # 10; E3-처리된 관절염 랫트: #59, # 67; 911-처리된 관절염 랫트: #16).

[0485] 7. 발 시토카인 수준

[0486] 24일째에 (마지막 정맥내 큰환약 주사후 5 일 또는 마지막 p. o. 투여후 24 시간) (X-선 방사선촬영법 후), 각각의 동물 뒷발 (관절염 및 비-관절염 랫트)의 중량을 재고 표지화 폴리에틸렌 유리물약병에 수집하였다. 조직 샘플은 액체 질소에 냉동시키고 -80℃에서 저장하였다.

[0487] 관절 호모제네이트의 제조: Bio-Pulverizer를 사용하여 냉동한 뒷발을 분쇄하였다. 분말화 뒷발은 그후 50 ul의 항-프로테아제 카테일로 보충되고 Ultra-Turrax 균질장치 (최대 속력의 50%)를 사용하여 얼음에서 균질화된 3 ml PBS를 함유하는 50 ml 원뿔형 원심분리 튜브위에 놓여진다.

[0488] 호모제네이트는 그후 2000 x g에서 15 분동안 4℃에서 원심분리되었고 상청액은 0.2 um Sartorius 필터를 통하여 과시키고, 알리콧팅하고 사용할 때까지 -80℃에서 저장하였다.

[0489] 시토카인 수준 측정 : TNF-α의 시토카인 수준 (랫트 TNF-α ELISA 키트, ref. RTA00, Batch 213718, R & D Systems, France), IL-1β 랫트 IL-1β ELISA 키트, ref. RLB00, Batch 212435, R & D Systems, France), IL-6 랫트 IL-6 ELISA 키트, ref. R6000, Batch 211773,214008 및 214362, R & D Systems, France), 및 TGF-β1인간 TGF-β1 ELISA 키트, ref. DB100, Batch 212258 및 213610, R & D Systems, France)는 제조업체의 지시에 따라, 복제하여 결정되었다. 뒷발 호모제네이트의 알리콧은 -80℃에서 저장되었다.

[0490] 8. X-선 분석

[0491] 24일째에, 혈액 수집 후에 동물을 희생시키고 관절 병소의 평가를 위해 X-선 방사선촬영법 (뒷발)을 얻었다. X-선 분석은 양 뒷발에서 관절 진무름, 관절 공간, 골막 비정상에 조점이 맞춰졌다.

[0492] 모든 방사선촬영법은 7개의 다른 항목을 살펴봄으로써 분석되었다: 연 조직 손상, 기형, 광물질소실, 관절 공간, 진무름, 골형성 및 골막성 반응. 각각의 동물에 대해서, 첫번째 6개 항목은 약화된 뒷발을 살펴봄으로써 독립적으로 분석되었다. 골막성 반응은 꼬리를 살펴봄으로써 분석되었다. 각각의 항목에 대해서, 점수는 0 (정상) 내지 4 (최대 손상)이 된다. 따라서 전체 점수는 0 내지 28이 된다. X선촬영 해석은 동물에 대해 어떤 도 모르는채 동일한 판독기에 의해 수행되었다 (처리 또는 미처리).

[0493] 9. 관찰

[0494] 한 동물(# 65)이 알려지지 않은 이유로 인해 인도메타신 투여후(D 23에서 투여전에) D 23에서 죽었다.

[0495] 10. 결과의 분석 및 발현

[0496] 모든 결과는 각각의 시점에서 각각의 그룹에서 10 랫트의 평균 ± S. E. M. 로서 보고되었다. 발 체적은 오른쪽과 왼쪽 발 체적의 평균 값으로부터 계산된 ml 로 표현되었다. 관절염 지수는 각각의 4 발에 대해 얻어진 점수의 총합으로부터 계산되었다. 통각 반응은 mV로 각각의 동물에 대해 기록된 발성의 수준의 강도에 의해 평가되었다(4 값: 2 회/발의 평균). 통각 반응의 퍼센트 억제 = 부형제-처리된 관절염 그룹의 평균 값으로부터 계산되었다[부형제-처리된 그룹의 평균값-처리된 관절염 그룹의 평균 값 / 부형제-처리된 관절염 그룹의 평균 값]*100]. 체중은 그램으로 표시되었다. 뒷발(왼쪽과 오른쪽) 중량은 그램으로 표시되었다.

[0497] 각각의 뒷발의 시토카인 수준 (IL-6, IL-1β, TNF-α 및 TGF-β1)은 pg/ml으로 표시되었다. TGF-β1의 순환하는 수준은 pg/ml으로 표시되었다. 각각의 파라미터 (광물질소실, 진무름, 골막성 반응, 연조직 손상, 공간 관절, 골형성 기형)에 대한 방사능 지수 및 총 방사능 지수 (전체 점수)는 각각의 파라미터에 대해 얻어진 점수의 총합으로부터 계산되었다. 부형제-처리된 그룹 (관절염 랫트)의 값과 부형제-처리된 그룹 (비-관절염 랫트) 사이의 변이의 내부-그룹 중요성은 동일한 변이 또는 정상성 테스트가 실패할때 Student t 테스트 또는 Mann-Whitney Rank Sum 테스트에 의해 평가되었다. 부형제-처리된 그룹 (관절염 랫트)과 E3-및911-및 인도메타신-처리된 그룹의 값 사이의 변이의 내부-그룹 중요성은 변이 아노바의 1-웨이 분석과 이어서 쌍을 이루지않은 Dunnett t 테스트에 의해 평가되었다. P ≤ 0.05의 확률은 유의한 것으로 간주되었다. 모든 통계적 분석은 Sigmatat™ 소프트웨어에 의해 수행되었다.

[0498] 결과

[0499] 1. 통각 반응 (발성 테스트)

[0500] 표 11 과 도 18에서 나타난 바와 같이, D 14일에, 통각 반응은 부형제-, 인도메타신-, E3-, 및 911-처리된 관절염 그룹에서 각각 4147±331, 4386±235, 4644 ±367 및 4468±143이었다. 인도메타신은 부형제-처리된 관절염 그룹 (D 18: 1511±398 vs 5279±326 mV; D 24: 1552±508 vs 5905±345 mV)에 비해, 3 mg/kg/하루 p. o. (10 일동안)후에 통각 반응을 D 18과 D 24에서 각각, 약-3768 mV (% 억제: 71 %) 및 -4353 mV (% 억제: 74 %)만큼 강하게 상당히 감소시켰다. E3(D 14 및 D 19에 1 mg/kg 정맥내)는 부형제-처리된 관절염 그룹 (D 18: 1112±401 vs 5279±326 mV; D 24: 0±0 vs 5905±345 mV)에 비해, D 18 및 D 24 각각에서 약-4167 mV (% 억제: 79 %) 및 -5905 mV (% 억제: 100 %)만큼 강하게 및 상당히 통각 반응을 감소시켰다. 911 (D 14 및 D 19에서 10 mg/kg 정맥내 2 일)는 부형제-처리된 관절염 그룹 (D 18: 1347±492 vs 5279±326 mV; D 24: 547±307 vs 5905 ±345 mV)에 비교할때, 통각 반응을 D18 및 D 24에서 약-3932 (% 억제: 74 %) 및 -5358 mV (% 억제: 91 %) 만큼, 강하게 상당히 감소시켰다.

[0501] 표 11

랫에서의 류마티즘 관절염에서 정맥내 주사(2 일: D 14-D 19)후에 아픔주는 반응에 대한 E3 및 911의 효과

Day	D14	D 18	D 24	
관절염 랫트	부형제 i.v.	4147 ±331	5279 ±326	5905 ±345
	E3 1 mg/kg i.v.	4644 ±367	1112 ±401	0 ±0 *
	% 억제	0	79	100
	911 10 mg/kg i.v.	4468 ±143	1347 ±492	547 ±307 *
	% 억제	0	74	91
	인도메타신 3 mg/kg p.o. (10일에 걸쳐)	4386 ±235	1511 ±398	1552 ±508
	% 억제	0	71	74

[0502]

[0503] 값은 평균 ± S. E. M.으로서 mV으로 표현된다.

[0504] 인도메타신(n=9)에 대해서 D 24 에서를 제외하고 그룹당 n=10 동물

[0505] Dunnett t 테스트: * P ≤ 0.05 vs 부형제-처리된 관절염 랫트

[0506] 2. 체중

[0507] 표 12 및 도 19에서 나타난 바와 같이, 관절염 확립으로 인한 D 0 내지 D 14의 체중 증가에서의 현저한 감소가 비-관절염 랫트에 비해, 관절염 랫트에서 관찰되었다. D 14일째에 (선택일) 관절염 랫트는 비-관절염 랫트와 비교할때, 체중의 상당한 감소를 나타냈다 (289± 2 vs 217±4 g) (Student t 테스트 P < 0.05). 그러나, 모든 관절염 그룹에서 (Dunnett t 테스트 P > 0.05) 체중에서 어떠한 유의한 변화도 (D 14)검출되지 않았다. 체중은 부형제-처리된 관절염 그룹 (261±5 vs 218±3 g)에 비교할때 약 43 g의 최대는 D 24에서이면서, D 17 에서 D 24로 적당하게 상당히 인도메타신-처리된 그룹 (10일동안 3 mg/kg/하루)에서 증가되었다.

[0508] E3 처리 (D 14 및 D 19에 1 mg/kg 정맥내)후에, 체중은 부형제-처리된 관절염 그룹 (264±5 g vs 218±3 g)에 비해, D 24 에서 약 46 g의 최대를 가지고, 적당하게 상당히 D 17에서 D 24로 증가되었다. 911 처리 (D 14 및 D 19에 10 mg/kg 정맥내)후에, 체중은 부형제-처리된 관절염 (265±7 vs 218±3 g)에 비해, D 24 에서 약 47g 의 최대를 가지고, 적당하게 상당히 D 18 에서 D 24로 증가되었다.

[0509] 표 12

래트에서의 류마티즘 관절염에서 체중에 대한 정맥내 주사
(2 일: D 14-D 19) 후에 E3 및 911의 효과

일수		D0	D3	D4	D5	D6	D7	D11	D12	D13	D14
관절염아닌 래트	부형제 i.v.	197 ±2	215 ±2	222 ±2	232 ±2	236 ±2	244 ±2	272 ±2	277 ±2	282 ±2	289 ±2
	부형제 i.v.	199 ±2	214 ±2	221 ±2	230 ±2	236 ±2	241 ±3	229 ±6	223 ±5	218 ±5	217 ±4
관절염 래트	E3 1 mg/kg i.v.	206 ±4	222 ±3	230 ±3	241 ±3	243 ±3	249 ±3	242 ±6	237 ±6	230 ±5	225 ±5
	911 10 mg/kg i.v.	201 ±2	211 ±5	218 ±5	227 ±5	231 ±5	239 ±5	234 ±8	228 ±7	221 ±7	218 ±6
	인도메타신 3 mg/kg p.o. 10일에 걸쳐서	202 ±3	217 ±4	225 ±4	235 ±4	239 ±4	246 ±4	242 ±7	235 ±7	227 ±6	224 ±5
	인도메타신 3 mg/kg p.o. 10일에 걸쳐서	202 ±3	217 ±4	225 ±4	235 ±4	239 ±4	246 ±4	242 ±7	235 ±7	227 ±6	224 ±5

일수		D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24
관절염이 아닌 래트	부형제 i.v.	285 ±2	291 ±2	297 ±2	302 ±3	307 ±3	308 ±3	312 ±3	316 ±3	321 ±3	326 ±3
	부형제 i.v.	213 ±4	212 ±4	211 ±3	210 ±3	208 ±3	210 ±3	212 ±3	214 ±3	216 ±3	218 ±3
관절염 래트	E3 1 mg/kg i.v.	223 ±5	224 ±5	227 ±4	232 ±4	235 ±4	238 ±4	245 ±4	250 ±5	257 ±5	264 ±5
	911 10 mg/kg i.v.	217 ±5	221 ±5	226 ±5	229 ±5	233 ±6	239 ±6	246 ±6	253 ±6	258 ±6	265 ±7
	인도메타신 3 mg/kg p.o. 10일에 걸쳐	230 ±4	230 ±5	231 ±4	234 ±4	236 ±4	241 ±4	246 ±4	248 ±5	253 ±5	261 ±5

값은 평균 S. E. M. 으로서 그램으로 표시된다
인도메타신에 대해 D 23 및 D 24 (n=9)에서를 제외하고 그룹당 n=10 동물
Dunnett t 테스트: * P< 0.05 vs 부형제-처리된 관절염 래트

[0510]

[0511] 3. 발 체적

[0512] D 14일째에, 발 체적의 관점에서 균일한 그룹을 얻기 위해서 무작위화를 수행하였다. 표 13에서 나타난 바와 같이, D 14일째에, 뒷발 체적 (오른쪽과 왼쪽 발 체적의 평균)은 비-관절염 그룹 (2.10±0.05 vs 1.44±0.02 mL (Student t 테스트 P < 0.05))에서의 그것보다 관절염 그룹에서 상당히 더 컸다.

[0513] 인도메타신(10일동안 3 mg/kg/하루 p. o.)은 부형제-처리된 관절염 그룹 (1.59±0.03 mL vs 2.34±0.08 mL)에 비교하여 약-0.75 mL (D 24)만큼 상당히 발 체적을 감소시켰다. E3 (D 14 및 D 19에 1 mg/kg 정맥내)은 부형제-처리된 관절염 그룹 (2.71±0.09 mL vs 2.34±0.08mL)에 비교할때 약 0.37 mL 만큼 약간 상당히 발 체적을 증가시켰다. 911 (D 14 및 D 19에 10 mg/kg 정맥내)은 부형제-처리된 관절염 그룹 (2.70±0.11 mL vs 2.34±0.08 mL)에 비교할때 약 0.36 mL 만큼 약간 상당히 발 체적을 증가시켰다.

[0514] 표 13

랫에서의 류마티즘 관절염에서 발 제적에 대한 정맥내 주사(2 일: D 14-D 19) 후의 E3 및 911의 효과

		일수	D14	D24
관절염 아닌 래트	부형제 i.v.		1.44 ±0.02	1.47 ±0.02
	관절염 래트	부형제 i.v.	2.10 ±0.05	2.34 ±0.08
	E3 1 mg/kg i.v.		2.06 ±0.03	2.71 ±0.09 *
	911 10 mg/kg i.v.		2.02 ±0.07	2.70 ±0.11 *
	인도메타신 3 mg/kg p.o. 10일에 걸쳐서		2.08 ±0.06	1.59 ±0.03 *

값은 평균±S. E. M.으로 mL로 표시된다.
인도메타신(n=9)에 대해 D 24에서를 제외하고 그룹당 n=10 동물
Dunnnett t 테스트: * P≤ 0.05 vs 부형제-처리된 관절염 래트

[0515]

[0516] 4. 관절염 지수

[0517] 표 14에서 나타낸 바와 같이, D 14일째에, 관절염 지수는 부형제-인도메타신-, E3-, 및 911-처리된 관절염 그룹에서 각각 10.1±0.8, 8.7±0.6, 10.2± 0.4 및 9.4±0.7이었다. 인도메타신은 부형제-처리된 관절염 그룹(2.7±0.7 vs 10.7±0.6)에 비교할때, 3 mg/kg/하루 p. o. (10일동안)후에 강하게 상당히 최대 약-8.0만큼 관절염 지수를 감소시켰다. E3 (D 14 및 D 19에서 1 mg/kg 정맥내)은 부형제-처리된 관절염 그룹(11.4±0.4 vs 10.7±0.6)에 비교할때 관절염 지수에 영향을 준다. 911 (D 14 및 D 19에서 10 mg/kg 정맥내)는 부형제-처리된 관절염 그룹(10.9±0.7 vs 10.7±0.6)에 비교하여, 관절염 지수에 영향을 주지 않았다.

[0518] 표 14

랫에서의 류마티즘 관절염에서 관절염 지수에 대한 정맥내 주사(2 일: D 14-D 19)후의 3 및 911의 효과

		일수	D14	D24
관절염 래트	부형제 i.v.		10.1 ±0.8	10.7 ±0.6
	E3 1 mg/kg i.v.		10.2 ±0.4	11.4 ±0.4
	911 10 mg/kg i.v.		9.4 ±0.7	10.9 ±0.7
	인도메타신 3 mg/kg p.o. 10일에 걸쳐		8.7 ±0.6	2.7 ±0.7 *

값은 평균± S. E. M. (점수)으로서 표현된다.
인도메타신(n=9)에 대해서만 제외하고 그룹 당 n=10 동물
Dunnnett t 테스트: * P ≤ 0.05 vs 부형제-처리된 관절염 래트

[0519]

[0520] 5. 발 시토카인 수준

[0521] 표 15에 나타난 바와 같이, D 24째에, 왼쪽과 오른쪽 발 시토카인 수준은 비-관절염 부형제-처리된 그룹과 비교할때 최대 약 3.5 (IL-1 β), 4(TNF- α) 및 1.8 (TGF- β 1)배만큼 관절염 부형제-처리된 그룹에서 증가되었다. 두개의 그룹 사이에 유의한 차이는 오른쪽과 왼쪽 발에서 IL-6 수준에 대해 관찰되지 않았다.

[0522] 관절염 그룹의 시토카인 수준은 왼쪽 및 오른쪽 발에서 유사하였다: IL-6, IL-1 β , TNF- α 및 TGF- β 1에 대해 각각 259.7 \pm 38.5 vs 219.2 \pm 32.4, 4802.8 \pm 365.5 vs 4007.1 \pm 380.4, 17.8 \pm 1.6 vs 18.6 \pm 1.9 및 9735.0 \pm 1219.8 vs 9161.4 \pm 846.1 pg/ml.

[0523] 인도메타신은 부형제-처리된 관절염 그룹 (7057.4 \pm 335. 6 vs 9161.4 \pm 846.1)에 비교할때 3 mg/kg/하루 p. o. (10일동안)후에 오른쪽 발에서 TGF- β 1 수준을 약간, 그러나 상당히, 약 1.3배만큼 감소시켰고, 반면에 그것은 IL-6, TNF- α 또는 IL-1 β 수준을 변경하지 않았다. 유사하지만 유의하지는 않은 효과가 왼쪽 발에서 관찰되었다. E3(D 14 및 D 19에서 1 mg/kg 정맥내)는 부형제-처리된 관절염 그룹에 비해 양쪽 발에서 IL-6, IL-1 β , TNF- α 또는 TGF- β 1수준에 영향을 주지 않았다. 911(D 14 및 D 19에서 10 mg/kg 정맥내)은 부형제-처리된 관절염 그룹 (6215.3 \pm 666.7 vs 4007.1 \pm 380.4)에 비교할때 오른쪽 발에서 IL-1 β 수준을 증가시켰다. 그것은 양쪽 발에서 다른 시토카인 수준에는 효과가 없었다.

[0524] 표 15a

류마티즘성 관절염 래트에서 정맥내 주사(D 14 및 D 19에서 2 일)후에
왼쪽 발 시토카인 수준에 대한 E3 및 911의 효과

관절염 아닌 래트		관절염 래트			
부형제 i.v.		부형제 i.v.	E3 1 mg/kg i.v.	911 10 mg/kg i.v.	인도메타신 3 mg/kg p.o.
IL-6	298.6 \pm 35.6	259.7 \pm 38.5	234.4 \pm 35.2	262.5 \pm 42.5	249.7 \pm 60.4
IL-1 β	1383.0 \pm 57.9	4802.8 \pm 365.5	5060.0 \pm 473.5	5500.8 \pm 625.3	4029.1 \pm 449.9
TNF- α	4.3 \pm 2.9	17.8 \pm 1.6	23.6 \pm 2.5	29.9 \pm 4.8	29.9 \pm 3.6
TGF- β 1	5264.7 \pm 209.2	9735.0 \pm 1219.8	9796.7 \pm 491.2	11053.5 \pm 713.3	7708.2 \pm 293.9

[0525]

[0526] 표 15b

오른쪽 발 시토카인 수준

관절염이 아닌 래트		관절염 래트			
부형제 i.v.		부형제 i.v.	E3 1 mg/kg i.v.	911 10 mg/kg i.v.	인도메타신 3 mg/kg p.o.
IL-6	286.4 \pm 76.1	219.2 \pm 32.4	214.6 \pm 47.2	284.9 \pm 38.9	295.9 \pm 47.8
IL-1 β	1342.1 \pm 86.1	4007.1 \pm 380.4	4853.5 \pm 605.0	6215.3 \pm 666.7 *	3884.4 \pm 534.4
TNF- α	15.7 \pm 4.8	18.6 \pm 1.9	21.5 \pm 2.5	33.4 \pm 5.7	30.6 \pm 5.7
TGF- β 1	5024.8 \pm 148.4	9161.4 \pm 846.1	9362.7 \pm 423.4	10861.2 \pm 604.6	7057.4 \pm 335.6 *

값은 평균 \pm S. E. M.로서 pg/ml)으로 표시된다.
비-관절염/부형제 (오른쪽 발), 관절염/부형제 (왼쪽 발) 및 인도메타신(n=9)에 대해서를 제외하고는 그룹당 n=10 동물
Dunnett t 테스트 : *P \leq 0.05 vs 부형제-처리된 관절염 래트

[0527]

[0528] 6. 순환하는 TGF- β 1의 측정

[0529] 표 16에서 나타낸 바와 같이, D 24에서, 혈청TGF-β1수준은 비-관절염 부형제-처리된 그룹 (81715.7±1984.1 vs 60269.9±2142.8)에 비교할때, 관절염 부형제-처리된 그룹에서 증가되었다. 인도메타신은 3 mg/kg/하루 p. o. (10일동안) 후에 혈청 TGF-β1 수준을, 부형제-처리된 관절염 그룹 (57222.2±3194.1 vs 81715.7 ±1984.1)에 비교할때 약 1.5배만큼, 상당히 감소시켰다. E3 (1 mg/kg 정맥내 on D 14 및 D 19) 및 911 (D 14 및 D 19에서 10 mg/kg 정맥내)은 혈청TGF-β1수준을 상당히 감소시켰고 따라서 E3-및 911-처리된 그룹에서의 시토카인 수준은 부형제-처리된 비-관절염 그룹 (각각 69408.8±3926.7 및 67214.5±3649.4, vs 60269.9 ±2142.8)에서 관찰된 것들과 필적하였다.

[0530] 표 16

류마티즘성 관절염 래트에서 혈청 TGF-β1 수준에 대한 정맥내 주사 (D 14 및 D 19에서 2 일)후의 E3 및 911의 효과

관절염 아닌 래트		관절염 래트			
부형제 i.v.		부형제 i.v.	E3 1 mg/kg i.v.	911 10 mg/kg i.v.	인도메타신 3 mg/kg p.o.
TGF-β1	60269.9 ±2142.8	81715.7 ±1984.1	69408.8 ±3926.7 *	67214.5 ±3649.4 *	57222.2 ±3194.1 *

값은 평균 ± S. E. M.으로서 pg/ml로 표시된다.
비-관절염/부형제(오른쪽발), 관절염/부형제(왼쪽 발) 및 인도메타신(n=9)에 대해서는 제외하고 그룹당 n=10 동물
Dunnett t 테스트: * P ≤ 0.05 vs 부형제-처리된 관절염 래트

[0531]

[0532] 7. 혈액학적 파라미터

[0533] 표 17에서 나타낸 바와같이, 백혈구 및 혈소판과같은 부형제-처리된 비 관절염 래트 (Student t 테스트 P < 0.05)와 비교할때 혈액학적 파라미터는 부형제-처리된 관절염 래트에서 더 컸던 반면, 적혈구, 헤모글로빈 및 헤마토크릿 (Student t 테스트 P > 0.05)은 변하지 않았다. 인도메타신은 부형제-처리된 관절염 그룹에 비교하여, 3 mg/kg/하루 p. o.(10 일동안)후에 혈액 파라미터에 영향을 주지 않았다. E3 (D 14 및 D 19에서 1mg/kg 정맥내)은 부형제-처리된 관절염 그룹에 비교할때 혈액 파라미터에 영향을 주지 않았다. 911 (D 14 및 D 19에서 10mg/kg 정맥내)은 부형제-처리된 관절염 그룹에 비해서 혈액 파라미터에 영향을 주지 않았다.

[0534] 표 17

랫트에서의 류마티즘 관절염에서 혈액 파라미터에 대한 정맥내 주사 (D 14 및 D 19에서의 2 일)후의 E3 및 911의 효과 (D 24에서 측정)

일수		백혈구	적혈구	헤모글로빈	헤마토크릿	혈소판
		10 ³ /mm ³	10 ⁶ /mm ³	g/dl	%	10 ³ /mm ³
관절염 아닌 래트	부형제 i.v.	8.7	7.98	15.1	42.6	322
		±0.9 n = 9	±0.31 n = 9	±0.7 n = 9	±1.6 n = 9	±89 n = 9
관절염 래트	부형제 i.v.	19.0	7.54	13.2	37.4	10.43
		±0.9 n = 10	±0.31 n = 10	±0.7 n = 10	±1.6 n = 10	±89 n = 10
	E3 1 mg/kg i.v.	19.1	7.74	12.9	38.5	827
		±1.2 n = 7	±0.17 n = 8	±0.3 n = 8	±1.0 n = 8	±77 n = 8
	911 10 mg/kg i.v.	22.6	7.30	12.1	36.5	799
		±2.9 n = 8	±0.40 n = 9	±0.7 n = 9	±2.1 n = 9	±121 n = 9
	인도메타신 3 mg/kg p.o. 10일에 걸쳐서	21.7	6.93	11.8	35.0	705
		±2.5 n = 9	±0.31 n = 9	±0.6 n = 9	±1.5 n = 9	±111 n = 9

값은 평균±S. E. M으로서 표현된다.
아노바: P > 0.05 vs 부형제-처리된 관절염 래트

[0535]

[0536] 7. 뒷발 중량

[0537]

표 18에서 나타낸 바와 같이, 왼쪽과 오른쪽 뒷발 중량은 부형제-처리된 비-관절염 래트 (각각 3.43± 0.11 vs 1.98±0.01 및 3.32±0.12 vs 1.99±0.02 g) (Student t 테스트 또는 Mann-Whitney P < 0.05)에서보다 부형제-처리된 관절염 래트에서 더 컸다. 3 mg/kg/하루 p. o. (10일동안) 후에, 인도메타신은 부형제-처리된 관절염 그룹 (왼쪽 뒷발: 2.23±0.04 vs 3.43±0.11 g; 오른쪽 뒷발: 2.20 ±0.05 vs 3.32±0.12 g)에 비해, 뒷발 중량을 상당히 감소시켰다. E3(D 14 및 D 19에서 1 mg/kg 정맥내)은 부형제-처리된 관절염 그룹 (왼쪽 뒷발: 3.86 ±0.14 vs 3.43±0.11 g; 오른쪽 뒷발: 3.72±0.13 vs 3.32±0.12 g)에 비교할때, 오직 왼쪽 뒷발 중량을 상당히 증가시켰다. 911 (D 14 및 D 19에서 10 mg/kg 정맥내)은 부형제-처리된 관절염 그룹에 비교할때, 오직 오른쪽 뒷발 중량을 상당히 증가시켰다 (왼쪽 뒷발: 3.73±0.12 vs 3.43±0.11 g; 오른쪽 뒷발: 3.83± 0.15 vs 3.32±0.12 g).

[0538] 표 18

랫트에서의 류마티즘 관절염에서 뒤쪽발 중량에 대한 정맥내 주사(D 14 및 D 19에서 2 일)후에 E3 및 911의 영향(D 24에서 측정)

		왼쪽발	오른쪽발
관절염 아닌 래트	부형제 i.v	1.98	1.99
		±0.01	±0.02
관절염 래트	부형제 i.v.	3.43	3.32
		±0.11	±0.12
	E3	3.86	3.72
	1 mg/kg i.v.	±0.14	±0.13
		*	
	911	3.73	3.83
	10 mg/kg i.v.	±0.12	±0.15
			*
	인도메타신	2.23	2.20
	3 mg/kg p.o.	±0.04	±0.05
	10일에 걸쳐서	*	*

값은 평균±S. E. M.으로서 그래프로 표시된다.
 인도메타신(n=9)에 대해서 제외하고 그룹당 n=10 동물
 Dunnett t 테스트: * P ≤ 0.05 vs 부형제-처리된 관절염 래트

[0539]

[0540] 8.X-선 분석

[0541] 표 19에서 나타난 바와 같이, 부형제-처리된 비-관절염 래트에서 0.0 ±0.0 의 총 점수를 관찰하였다. 부형제-처리된 관절염 래트는 광물질소실 (2.4 ±0.3), 진부름 (2.7± 0.3), 연조직 손상 (3.1± 0.2) 및 공간 관절 (3.3±0.2)에 대해서 높은 점수, 골막성 반응 (1.0±0.3), 골형성 (0.8±0.2) 및 기형 (1.8±0.2)에 대해서 적절한 점수를 가지고, 15.1±1.3의 총 점수를 가진다. 인도메타신 (3mg/kg/하루 p. o. 10일동안)은 부형제-처리된 관절염 래트 (4.4±0.9 vs 15.1±1.3)와 비교할때, 약 10.7만큼 강하게 상당히 총 점수를 감소시켰다. E3(D 14 및 D 19에서 1 mg/kg 정맥내)은 부형제-처리된 관절염 그룹 (14.2±1.3 vs 15.1±1.3)과 비교할때, 총 점수에 영향을 주지 않았다. 911 (D 14 및 D 19에서 10 mg/kg 정맥내)은 부형제-처리된 관절염 그룹 (15.4±1.0 vs 15.1±1.3)와 비교할때 총 점수에 영향을 주지 않았다.

[0542] 표 19

랫트에서의 류마티즘 관절염에서 정맥내 주사(D 14 및 D 19에서 2 일) 후에 E3 및 911의 X-선 파라미터에 대한 효과

	일수	광물질 소실	진무름	골막성 반응	연조직 손상	공간 관절	골형성	기형	총 점수
관절염 아닌 랫트	부형제 i.v.	0.0							
		±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0
관절염 랫트	부형제 i.v.	2.4	2.7	1.0	3.1	3.3	0.8	1.8	15.1
		±0.3	±0.3	±0.3	±0.2	±0.2	±0.2	±0.2	±1.3
	E3 1 mg/kg i.v.	2.0	2.4	0.8	3.3	2.7	1.2	1.8	14.2
		±0.2	±0.3	±0.2	±0.3	±0.2	±0.2	±0.2	±1.3
	911 10 mg/kg i.v.	2.3	2.5	1.0	3.4	3.3	0.9	2.0	15.4
	±0.3	±0.2	±0.3	±0.2	±0.2	±0.2	±0.2	±1.0	
	인도메타신 3 mg/kg p.o.	0.3	0.9	0.7	1.0	1.0	0.1	0.4	4.4
		±0.2	±0.2	±0.3	±0.2	±0.2	±0.1	±0.2	±0.9
		*	*		*	*		*	*

값은 평균±S. E. M (점수)으로서 표시된다.
 인도메타신(n=9)에 대한 것을 제외하고는 그룹 당 n=10 동물
 Dunnett t 테스트 : * P≤ 0.05 vs 부형제-처리된 관절염 랫트

[0543]

[0544] 결론

[0545] 상기한 실험 조건하에서, E3 (1 mg/kg 정맥내 2 일: D 14-D 19) 및 911 (10mg/kg 정맥내 2 일: D 14-D 19)은 강한 진통 효과를 나타냈지만, 이러한 관절염 모델에서 상당한 항-염증 효과를 나타내지 않았다.

[0546] 실시예 8

[0547] 류마티즘 관절염의 랫트 모델에서 항-NGF 항체 E3의 다른 용량의 효과

[0548] E3이 관절염 랫트에서 통증에서의 감소는 E3 투여와 통증 감소 사이의 용량 반응 관계를 검사함으로써 더욱 연구되었다. 랫트는 위에서 기술한 바와 같은 관절염을 유발하는 보조약으로 치료되었다. 보조약으로 주사되지 않은 10 랫트는 비-관절염 대조군으로서 사용되었다. 보조약 주사후의 14일에, 동물은 위에서 언급한 기준에 근거하여 연구에 자격이 주어졌고, 10 랫트의 8 그룹으로 무작위화되고 그들의 발성 반응의 강도에 대해 테스트되었다. 그들은 그후 14일날에 위에서 기술한 바와 같이 식염수, 또는 0.003 mg/kg, 0.01 mg/kg, 0.03mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 1 mg/kg 또는 5 mg/kg의 E3 항체를 복용하였다.

[0549] 동물은 16,18, 20, 및 24일에 그들의 발성 반응에 대해 테스트되었다. 동물은 발성 테스트 후에 18일에 식염수 또는 동일한 용량의 E3를 다시 복용되었다. 동물은 또한 14일에 시작하여, 각각의 날에 체중을 측정하였다. 따라서, 동물은 주어진 복용량의 항체 또는 식염수를 14일과 18일에 두번 복용되었고, 14,16, 18,20 및 24일에 5번 통증에 대해 평가되었다. 데이터는 표 20-22와 도 20-22에 나와있다.

[0550] 표 20

류마티즘성 관절염 래트에서 아픈주는 반응 (발성 강도)에 대한 다른 복용량의 E3의 효과. 발성 강도 값은 mV로 평균±s. e. m.로서 표시된다

	부형제	0.003mg/kg	0.01 mg/kg	0.03 mg/kg	0.1 mg/kg	0.3 mg/kg	1.0 mg/kg	5.0 mg/kg	
14 일	평균	1129.25	981.75	1007.28	963.18	1159.30	1191.58	1067.00	896.25
	s.e.m	143.06	71.00	66.50	62.12	132.76	123.44	69.73	57.53
16 일	평균	1042.85	825.60	576.88	448.43	283.71	151.85	98.62	79.18
	s.e.m	130.51	57.94	49.71	81.01	60.00	26.08	29.17	27.30
18 일	평균	968.10	427.43	334.45	292.52	262.96	194.19	174.13	200.42
	s.e.m	117.85	48.55	35.10	52.36	62.32	53.56	88.61	120.15
20 일	평균	942.18	448.00	313.13	209.48	79.74	66.27	71.23	63.57
	s.e.m	100.69	33.73	61.98	24.43	33.18	31.34	42.37	23.47
24 일	평균	913.68	724.50	596.38	513.60	432.45	176.32	19.21	12.35
	s.e.m	131.29	115.90	44.76	63.67	70.38	66.61	10.14	12.35

[0551]

[0552]

통증 유도된 발성에서 동물을 다양한 복용량의 항-NGF 항체 E3로 치료하는 효과는 (표 20에 나타난 데이터) 주어진 복용량의 항체 E3로 치료된 것들과 함께 부형제로 치료된 관절염 동물들 사이에서 쌍방향으로 얻어진 결과를 비교하기 위해, 2-방식 아노바를 사용함으로써 통계적으로 분석되었다. 테스트된 모든 수준의 E3 ($p < 0.0001$)에서 매우 상당한 효과가 있었다. 심지어 테스트된 가장 낮은 복용량에서(0.003 mg/kg의 E3), 발성에서의 차이는 유의하였다($p < 0.0001$).

[0553]

표 20 및 도 20에서 나타난 바와 같이, 상기 실험과 일치하여, 1 mg/kg에서 항체 E3로 처리하는 것은 통증의 신속하고 강한 경감을 나타냈다. 2일내에 (테스트된 가장 이른 시점) 발성 강도는 90%까지 떨어졌다. 비록 낮은 용량에서 통증 경감이 나타나는데 다소 더 오래 걸렸지만, 더 낮은 농도의 E3로 치료하는 것은 또한 확고한 통증 경감을 제공하였다. 테스트된 가장 높은 용량을 제외하고 모두의 24일째에 효능에서의 명백한 감소는 피험 랫트에 의한 면역 반응에 버금가는 플라즈마 E3 수준의 실제 수준에서의 감소로 인한 것이다. 0.003 mg/kg만큼 낮은 용량은 이 모델에서 적어도 부분적인 통증 경감을 제공하는 것이 명백하다.

[0554]

표 21

류마티즘성 관절염 래트에서 체중에 대한 다른 용량의 E3의 효과 (14일로 정상화).

일수	관절염 아님		부형제		0.003 mg/kg		0.01 mg/kg		0.03 mg/kg	
	평균	S.E.M	평균	S.E.M	평균	S.E.M	평균	S.E.M	평균	S.E.M
14	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
15	99.53	0.30	99.14	0.37	99.20	0.48	99.18	0.43	100.34	0.36
16	102.52	0.45	99.57	0.60	99.58	0.79	99.33	0.72	100.89	0.57
17	103.31	0.41	99.50	0.64	100.46	0.77	99.69	0.73	101.80	0.82
18	106.11	0.72	100.26	0.93	100.90	1.19	100.69	0.72	102.70	0.92
20	109.62	0.85	101.46	1.22	102.26	1.58	102.70	1.07	104.51	0.75
21	110.52	0.93	102.73	1.49	103.16	1.87	102.63	1.18	105.08	0.98
23	114.28	1.19	104.54	1.92	105.09	1.67	104.41	1.33	106.14	1.06
24	115.44	1.15	105.12	1.92	106.16	1.90	104.23	1.46	106.23	1.26

일수	0.1 mg/kg		0.3 mg/kg		1.0 mg/kg		5.0 mg/kg	
	평균	S.E.M	평균	S.E.M	평균	S.E.M	평균	S.E.M
14	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
15	99.83	0.59	101.05	0.38	100.53	0.37	101.61	0.41
16	101.07	0.82	102.88	0.50	102.95	0.56	104.09	0.60
17	101.89	1.12	104.76	0.70	105.74	0.76	106.85	0.79
18	103.69	1.47	107.11	0.78	108.46	0.82	109.53	1.00
20	107.36	1.78	111.26	0.77	113.57	0.83	115.32	1.11
21	108.50	2.01	113.31	0.87	116.71	0.92	119.11	1.21
23	109.25	2.15	115.59	1.38	123.35	1.13	126.36	1.94
24	108.77	2.08	115.58	1.43	124.41	1.00	127.25	1.79

[0555]

[0556] 표 22

류마티즘성 관절염 래트에서 체중에 대한 다른 용량의 E3의 효과
(0일로 정상화)

일수	관절염 아님		부형제		0.003 mg/kg		0.01 mg/kg		0.03 mg/kg	
	평균	S.E.M	평균	S.E.M	평균	S.E.M	평균	S.E.M	평균	S.E.M
0	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
1	100.45	0.19	98.34	0.48	98.37	0.35	98.86	0.33	98.67	0.34
2	105.94	0.33	101.75	0.71	102.47	0.59	102.61	0.40	102.05	0.53
3	109.29	0.33	105.04	1.04	106.54	0.99	106.29	0.60	105.31	0.85
4	113.13	0.46	109.14	1.15	110.09	0.72	110.61	0.41	109.24	0.82
7	124.15	0.70	119.90	1.39	121.29	1.32	121.59	0.72	117.15	1.36
8	127.82	0.80	123.38	1.52	124.44	1.43	124.47	1.24	118.52	1.89
9	132.40	0.80	125.50	1.59	125.91	1.69	125.82	1.95	118.60	2.62
10	135.91	0.83	123.51	1.77	123.30	2.47	123.87	2.59	115.26	3.19
11	140.42	1.13	119.82	1.98	119.55	2.76	121.20	2.99	112.94	3.48
14	152.59	1.72	111.79	1.40	111.50	1.87	111.80	1.65	108.37	2.75
15	151.87	1.87	110.82	1.41	110.63	2.05	110.85	1.44	108.68	2.45
16	156.47	2.25	111.33	1.74	111.08	2.32	110.98	1.31	109.21	2.16
17	157.65	2.08	111.24	1.62	112.06	2.36	111.42	1.66	110.16	2.03
18	161.98	2.71	112.16	2.21	112.60	2.78	112.54	1.64	111.14	2.11
20	167.36	2.93	113.49	2.37	114.17	3.24	114.82	2.12	113.17	2.49
21	168.73	3.07	114.93	2.62	115.25	3.68	114.76	2.30	113.80	2.68
23	174.51	3.54	116.96	3.02	118.48	3.49	116.76	2.51	114.93	2.62
24	176.27	3.50	117.63	3.13	118.58	3.71	116.56	2.57	114.99	2.51

일수	0.1 mg/kg		0.3 mg/kg		1.0 mg/kg		5.0 mg/kg	
	평균	S.E.M	평균	S.E.M	평균	S.E.M	평균	S.E.M
0	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
1	99.31	0.61	99.26	0.28	98.81	0.27	98.25	0.58
2	102.87	0.73	102.98	0.43	103.18	0.50	101.82	0.53
3	106.26	0.82	106.95	0.50	106.52	0.55	105.47	0.58
4	110.20	0.64	110.50	0.58	110.52	0.67	109.29	0.58
7	120.50	1.20	120.03	0.82	121.54	1.15	119.77	1.19
8	123.48	1.58	121.38	1.31	124.28	1.59	121.96	1.72
9	125.46	2.47	121.57	2.09	125.60	2.23	123.04	2.42
10	123.95	3.38	118.27	3.07	124.11	2.97	120.00	2.81
11	121.98	3.93	116.02	3.32	121.27	3.42	117.97	2.98
14	113.90	2.14	108.43	1.94	111.72	2.27	111.58	2.59
15	113.66	1.91	109.59	2.12	112.30	2.23	113.33	2.37
16	115.06	2.00	111.54	2.02	115.00	2.36	116.06	2.30
17	115.99	2.18	113.57	2.04	118.08	2.32	119.14	2.42
18	118.01	2.29	116.13	2.14	121.16	2.55	122.14	2.61
20	122.17	2.57	120.62	2.20	126.90	2.87	128.60	2.77
21	123.49	2.90	122.88	2.49	130.41	2.98	132.82	2.84
23	124.35	3.02	125.36	2.83	137.81	3.09	140.79	2.83
24	123.77	2.80	125.33	2.75	138.93	2.76	141.77	2.61

[0557]

[0558]

체중에 대해 다양한 용량의 항-NGF 항체 E3로 동물을 치료하는 효과는 주어진 복용량의 항체 E3로 처리된 것들과 함께 부형제로 처리된 관절염 동물들 사이에서 쌍방식으로 얻어진 결과를 비교하기 위해 2-방식 ANOVA를 사용함으로써 통계적으로 분석되었다.

[0559]

14일째의 체중으로 표준화된 데이터를 사용하여(표21), E3의 0.03 mg/kg의 용량은 체중(p < 0.005)에서 상당한 변화를 초래하였다. 모든 더높은 용량의 E3에서, 처리된 및 미처리된 관절염 동물들 사이의 차이는 유의하였다(p=또는 < 0.0001). 0일째의 체중으로 표준화된 데이터를 사용하여(표 22), E3의 0.03 mg/kg의 용량은 체중에서의 상당한 변화를 초래하였다(p < 0.002). 모든 더높은 용량의 E3에서, 처리된 그리고 미처리된 관절염 동물들 사이의 차이는 유의하였다(p < 0.0001).

[0560]

다시 더이른 연구와 일치하여, E3로 처리된 래트는 식염수 처리된 관절염 래트보다 덜 명백한 체중 손실을 나타냈다(표 22 및 도 22). 사실상, 높은 용량의 항체 E3로 처리된 래트는 더이른 체중 손실을 회복하고 있었고, 그들의 비-관절염 코호트보다 더 빠른 실질적으로 체중 증가를 얻고 있었다(표 21 및 도 21).

[0561]

생물학적 물질의 기탁

[0562]

다음 물질들은 American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia, USA (ATCC)에 기탁되었다:

[0563]

물질		ATCC 승인 No.	기탁일
----	--	-------------	-----

[0564]

Eb. 911.3E	E3 경쇄	PTA-4893	2003년 1월 8일
------------	-------	----------	-------------

[0565]

Eb. pur. 911.3E	E3 경쇄	PTA-4894	2003년 1월 8일
-----------------	-------	----------	-------------

- [0566] Db. 911.3E E3 중쇄 PTA-4895 2003년 1월 8일
- [0567] 벡터 Eb. 911.3E는 E3 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드이고; 벡터 Eb. pur. 911.3E는 E3 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드이고, 벡터 Db. 911.3E는 E3 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드이다.
- [0568] 이 기탁은 Patent Procedure 및 Regulations 그이하 (Budapest Treaty)의 목적을 위해 Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms의 규정하에서 만들어졌다. 이는 기탁일로부터 30년동안 기탁의 실용적인 배양의 유지를 보장한다. 기탁은 Budapest Treaty의 조항하에서 ATCC에 의해 이용가능하게 만들어질 것이고, Rinat Neuroscience Corp.와 ATCC 사이의 협정하에 종속되고, 이것은 적절한 U. S. 특허의 발행시에 또는 어떠한 U. S. 또는 외국 특허 출원의 대중에게 공개할때 대중에게 기탁의 배양의 결과의 영구적이고 무제한의 이용가능성을 보장하고, 어느쪽이든지 먼저 오는, 35 USC Section 122 및 거기에 따르는 Commissioner의 규칙(886 OG 638에 대한 특정 참조와 함께 37 CFR Section 1.14 을 포함)에 따라서, 거기에 자격이 부여되는 U. S. Commissioner of Patents 및 Trademarks에 의해 결정된 것에 대한 결과의 이용가능성을 보장한다.
- [0569] 특허 출원의 수탁자는 만일 기탁에 있어서 재료의 배양이 적절한 조건하에서 배양될 때 죽어야 하거나 또는 분실 또는 파괴되어야 한다면, 물질은 즉시 공고시에 동일한 다른 것으로 대체될 것이라는 것에 동의하였다. 기탁된 물질의 이용가능성은 어떠한 정부의 권한 하에서 수여된 권리를 위반하여 본 발명을 실행하는 자격증으로서 해석되지 않는다.
- [0570] **항체 서열**
- [0571] 중쇄 가변 영역 (Kabat CDR들은 밑줄이 그어져있다 ; Chothia CDR들은 굵은 이탤릭체이다)
- QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTD
YNSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFFDYWGQG
TLVTVS (SEQ ID NO:1)
- [0572]
- [0573] 경쇄 가변 영역 (Kabat CDR들은 밑줄이 그어져있다 ; Chothia CDR들은 굵은 이탤릭체이다)
- DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQISNNLNWYQKPKGKAPKLLIYYTSRFHSG
VPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIAATYYCQOEHTLPYTFGGGTKLEIKRT (SEQ ID
NO:2)
- [0574]
- [0575] E3 중쇄 연장된 CDR들
- [0576] CDRH1 : GFSLIGYDLN (SEQ ID NO : 3)
- [0577] CDRH2: IIWGDGTTDYN SAVKS (SEQ ID NO : 4)
- [0578] CDRH3: GGYWYATSYFFDY (SEQ ID NO :5)
- [0579] E3 경쇄 연장된 CDR들
- [0580] CDRL1 : RASQISNNLN (SEQ ID NO : 6)
- [0581] CDRL2: YTSRFHS(SEQ ID NO : 7)
- [0582] CDRL3: QOEHTLPYT (SEQ ID NO : 8)
- [0583] 마우스 단일클론 항체 911 연장된 CDR들
- [0584] 911 중쇄 연장된 CDR들
- [0585] CDRH1 : GFSLIGYDIN(SEQ ID NO : 9)
- [0586] CDRH2: MIWGDGTTDYN SALKS (SEQ ID NO : 10)
- [0587] CDRH3: GGYYYGTSYFFDY (SEQ ID NO:1 1)

- [0588] 911 경쇄 연장된 CDR들
- [0589] CDRL1 : RASQDISNHLN (SEQID NO : 12)
- [0590] CDRL2: YISRFHS (SEQ ID NO : 13)
- [0591] CDRL3: QQSKTLPYT (SEQ ID NO : 14)
- [0592] E3 중쇄 아미노산 서열 (전체)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIHWGDGTT
 DYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFFDYW
 GQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKRC
 CVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEK
 TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMITKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
 YKTTTPMLDSGSEFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK(SEQ ID NO:16)

- [0593]
- [0594] 3E 경쇄 아미노산 서열 (전체 항체)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQSSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSG
 VPSRFSGSGSDFTFTISSLQPEDATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSV
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYLSSTLTLSKADYKHXVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:17)

- [0595]

[0596] 3E 중쇄 뉴클레오티드 서열 (전체 항체)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCCGAGACCCT
 GTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGGTTCTCACTTATCGGCTATGATCTTAACTGG
 ATCCGACAGCCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGATTATCTGGGGTG
 ATGGAACCACAGACTATAATTCAGCTGTCAAATCCC CGCTCACCATCTCAAAAAGA
 CACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACAC
 GGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTTATTGGTACGCCACTAGCTACTACTT
 TGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGG
 CCCATCTGTCTTCCCCTGCCCCATGCTCCCGCAGCACCTCCGAGAGCACAGCC
 GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCAGAACCTGTGACCGTGTCTGG
 AACTCTGGCGCTCTGACCAGCGGGCTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCC
 TCAGGTCTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCATCCAGCAACTTCGGC
 ACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAAGCAACACCAAGGTCGAC
 AAGACCGTGGAGAGAAAAGTGTGTGGAGTGTCCACCTTGTCCAGCCCCTCCA
 GTGGCCGGACCATCCGTGTCTCCTGTTCCCTCCAAAGCCAAAGGACACCCTGATG
 ATCTCCAGAACCCAGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGA
 CCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTATGTGGACGGAGTGGAGGTGCACAACGCCA
 AGACCAAGCCAAGAGAGGAGCAGTCAACTCCACCTTCAAGTGGTGGAGCGTG
 CTGACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGAAAGGAGTATAAGTGTAAAGGT
 GTCCAACAAGGGACTGCCATCCAGCATCGAGAAGACCATCTCCAAGACCAAGGG
 ACAGCCAAGAGAGCCACAGGTGTATAACCCTGCCACCATCCAGAGAGGAGATGA
 CCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGATTCTATCCATCCGACA
 TCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCAGAGAACA ACTATAAGACCACC
 CCTCCAATGCTGGACTCCGACGGATCCTTCTTCTGTATTCCAAGCTGACCGTGG
 ACAAGTCCAGATGGCAGCAGGAAACGTGTTCTTGTTCCTGATGCACGAG
 GCCCTGCACAACCACTATAACCCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCAGGAAAATAA(
 SEQ ID NO: 65)

[0597]

[0598] 3E 중쇄 가변 도메인 뉴클레오티드 서열

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCCGAGACCCT
 GTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGGTTCTCACTTATCGGCTATGATCTTAACTGG
 ATCCGACAGCCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGATTATCTGGGGTG

[0599]

ATGGAACCACAGACTATAATTCAGCTGTCAAATCCC CGCTCACCATCTCAAAAAGA
 CACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACAC
 GGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTTATTGGTACGCCACTAGCTACTACTT
 TGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:66)

[0600]

[0601] 3E 경쇄 뉴클레오티드 서열 (전체 항체)

GATATCCAGATGACACAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCCTCTGTGGGTGACCGC
 GTCACCATCACCTGCCGCGCATCTCAGTCCATTAGCAATAATCTGAACTGGTATC
 AGCAGAAGCCAGGCAAAGCCCCAAAACCTCTGATCTACTACACCTCACGCTTCCA
 CTCAGGTGTCCCATCACGCTTCAGTGGCAGTGGCTCTGGTACAGATTTACCTTC
 ACCATTAGCAGCCTGCAACCAGAAGATATTGCCACTTATTACTGCCAACAGGAG
 CATACCCTTCCATATACTTCGGTCAAGGCACCAAGCTGGAGATCAAACGCACTG
 TGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTTCCCTCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCCGG
 AACTGCCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCACGCGAGGCCAAAAGT
 ACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCCGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA
 CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACCCTGA
 GCAAAGCAGACTACGAGAAACACMAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG
 GGCCTGAGTTCTCCAGTCACAAAGAGCTTCAACCGCGGTGAGTGCTAA(SEQ ID
 NO:67)

[0602]

[0603] 3E 경쇄 가변 도메인 뉴클레오티드 서열

GATATCCAGATGACACAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCCTCTGTGGGTGACCGC
 GTCACCATCACCTGCCGCGCATCTCAGTCCATTAGCAATAATCTGAACTGGTAT
 CAGCAGAAGCCAGGCAAAGCCCCAAAACCTCTGATCTACTACACCTCACGCTT
 CCACTCAGGTGTCCCATCACGCTTCAGTGGCAGTGGCTCTGGTACAGATTTCAC
 CTTCACCATTAGCAGCCTGCAACCAGAAGATATTGCCACTTATTACTGCCAAC
 GGAGCATACCCTTCCATATACTTCGGTCAAGGCACCAAGCTGGAGATCAAAC
 GC(SEQ ID NO:68)

[0604]

[0605] 본원에서 기술된 실시예와 구체예는 단지 예증의 목적이며 그들에 비추어 다양한 변형 또는 변화가 당업자들에
 게 제시될 것이며 본 출원의 정신과 범위내에 포함된다는 것이 이해된다.

도면

도면1a

CDR: 큰 이탤릭체 = Kabat, 밑줄 = Chothia

- 1A) 중쇄 가변 영역
- 1=마우스 911 항체(CDR)
- 2=VH4-59 사람 수용체 생식세포
- 3=CDR 이식됨
- 4=3+ 하나의 틀구조 돌연변이
- 5=4+ 친화성 발달 H1, H2
- 6=5+ 친화성 발달 H3 (항체 3E의 중쇄 가변 영역)

H1

```

1-      1      5      10      15      20      25      30      35      40      45
      G F S L I G Y D I N
2-Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S T I S S Y Y W S W I R Q P P G K G L E
3-Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G F S L I G Y D I N W I R Q P P G K G L E
4-Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G F S L I G Y D I N W I R Q P P G K G L E
5-Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G F S L I G Y D L N W I R Q P P G K G L E
6-Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G F S L I G Y D L N W I R Q P P G K G L E
    
```

H2

```

1-      50      55      60      65      70      75      80      85      90
      M I W G D G T T D Y N S A L K S
2-W I G Y I Y Y S G S T N Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V
3-W I G M I W G D G T T D Y N S A L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V
4-W I G M I W G D G T T D Y N S A L K S R V T I S K D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V
5-W I G I I W G D G T T D Y N S A V K S R V T I S K D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V
6-W I G I I W G D G T T D Y N S A V K S R V T I S K D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V
    
```

H3

```

1-      95      100      105      110      115      120
      G G Y Y Y G T S Y Y F D Y
2-Y Y C A R G
3-Y Y C A R G G Y Y Y G T S Y Y F D Y W G Q G T L V T V S
4-Y Y C A R G G Y Y Y G T S Y Y F D Y W G Q G T L V T V S
5-Y Y C A R G G Y Y Y G T S Y Y F D Y W G Q G T L V T V S
6-Y Y C A R G G Y W Y A T S Y Y F D Y W G Q G T L V T V S
    
```

도면1b

- 1B) 경쇄 가변 영역
- 1= 마우스 911 항체(CDR)
- 2=08 사람 수용체 생식세포
- 3=CDR 이식됨
- 4=3+ 친화성 발달 L1, L2
- 5=4+ 친화성 발달 L3(항체 3E의 경쇄 가변 영역)

L1

```

1-      1      5      10      15      20      25      30      35      40      45
      R A S Q D I S N H L N
2-D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C Q A S Q D I S N Y L N W Y Q Q K P G K A P K L
3-D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D I S N H L N W Y Q Q K P G K A P K L
4-D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S N N L N W Y Q Q K P G K A P K L
5-D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S N N L N W Y Q Q K P G K A P K L
    
```

L2

```

1-      50      55      60      65      70      75      80      85      90
      Y I S R F H S
2-L I Y D A S N L E T G V P S R F S G S G S G T D F T F T I S S L Q P E D I A T Y Y C Q Q S K
3-L I Y Y I S R F H S G V P S R F S G S G S G T D F T F T I S S L Q P E D I A T Y Y C Q Q S K
4-L I Y Y T S R F H S G V P S R F S G S G S G T D F T F T I S S L Q P E D I A T Y Y C Q Q S K
5-L I Y Y T S R F H S G V P S R F S G S G S G T D F T F T I S S L Q P E D I A T Y Y C Q Q E H
    
```

L3

```

1-      95      100      105      109
      T L P Y T
2-N L P
3-T L P Y T F G Q G T K L E I K R T
4-T L P Y T F G Q G T K L E I K R T
5-T L P Y T F G Q G T K L E I K R T
    
```

도면2

Db.911.3E 표준 ; 원형 DNA : 1429 BP.

이 파일은 벡터 NTI에 의해 생성된다

<http://www.informaxinc.com/>

VNTDATE|285871584|

VNTDBDATE|285873257|

VNTAUTHORNAME|Demo User|

Sequence 1429 BP; 331 A; 440 C; 380 G; 278 t;

```

atggccaccg actccagaac ctctggctg ctgacagtgt cctgctgtg tctgctgtg 60
ccacaggagg ccagcgctca ggtgcagctg caggagtctg gcccaggact ggtgaagcct 120
tccgagacc tgtccctcac ctgcactgtc tctgggtct cacttatcgg ctatgatctt 180
aactggatcc gacagcctcc agggaaggga ctggagtgga ttgggattat ctggggtgat 240
ggaaccacag actataatcc agctgtcaaa tcccgcgtca ccatctcaaa agacacctcc 300
aagaaccagt tctccctgaa gctgagctct gtgaccgcog cggacacggc cgtgtattac 360
tgtgcgagag gaggttattg gtacgccact agctactact ttgactactg gggccagggc 420
accctggtoa cctctctctc agcctccacc aagggcccat ctgtcttccc actggcccca 480
tgctcccgca gcacctccga gagcacagcc gccctgggct gccctggtoa ggactacttc 540
ccagaacctg tgaccgtgtc ctggaaactct ggcgctctga ccagcggcgt gcacacctc 600
ccagctgtcc tgcagtctcc aggtctctac tccctcagca gcgtgggtgac cgtgcoatcc 660
agcaacttcg gcaccacagc ctacacctgc aacgtagatc acaagccaag caacaccaag 720
gtcgacaaga ccgtggagag aaagtgttgt gtggagtgtc cacottgtcc agccctcca 780
gtggccggac catccgtgtt cctgttccct ccaaagccaa aggacacct gatgatctcc 840
agaaccccag agtggacctg tgtgggtgtg gacgtgtccc acgaggacc agaggtgac 900
ttcaactggt atgtggacgg agtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc aagagaggag 960
cagttcaact ccaccttcag agtgggtgagc gtgctgaccg tggtgacca ggactggtg 1020
aacggaaaag agtataatg taaggtgtcc aacaagggac tggcoatccag catcgagaag 1080
accatctcca agaccaagg acagccaaga gagccacagg tgtataacct gccacctacc 1140
agagaggaga tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tggtgaggg attctatcca 1200
tccgacatcg ccgtggagtg ggagtccaac ggacagccag agaacaacta taagaccacc 1260
cctccaatgc tggactccga cggatccttc ttctgttatt ccaagctgac cgtggacaag 1320
tccagatggc agcagggaaa cgtgttctct tgttccgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1380
cactatacc agaagagcct gtccctgtct ccaggaaagt aattctaga 1420
    
```

도면3

Eb.911.3E 표준 ; 원형 DNA ; 729 BP.

이 파일은 벡터 NTI에 의해 생성된다

<http://www.informaxinc.com/>

VNTDATE|285871514|

VNTDBDATE|285872959|

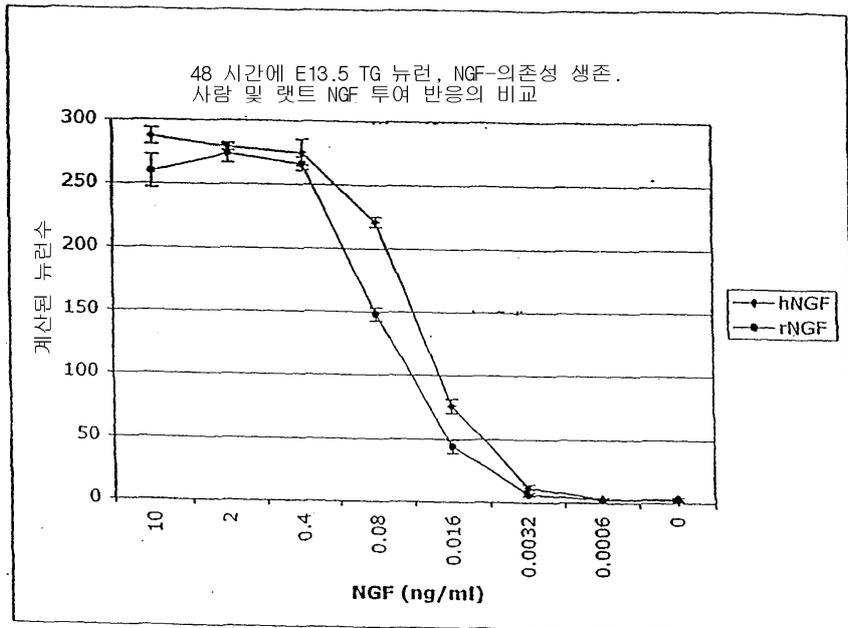
VNTAUTHORNAME|Demo User|

Sequence 729 BP; 182 A; 231 C; 161 G; 154 t; 1 other;

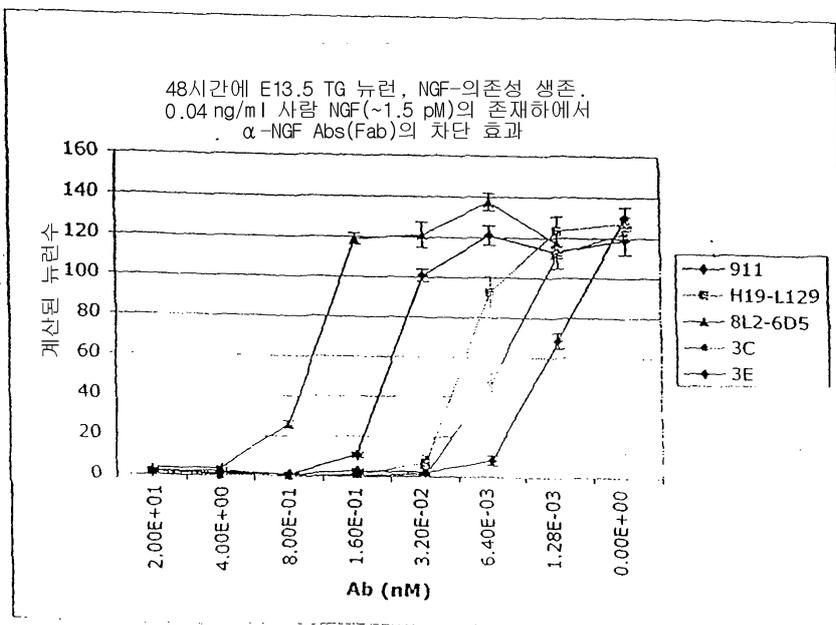
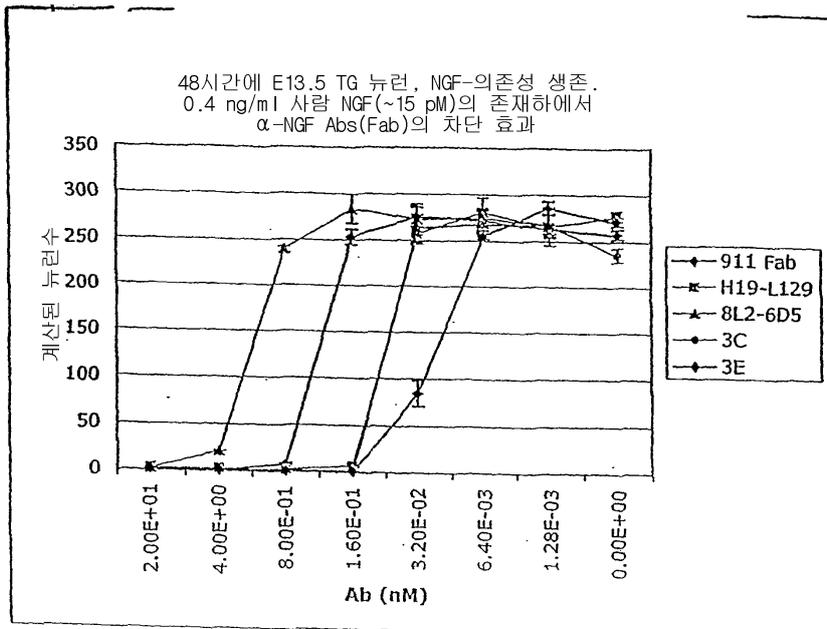
```

atggccaccg actccagaac ctctggctg ctgacagtgt cctgctgtg tctgctgtg 60
ccacaggagg ccagcgctga tatecagatg acacagtccc cctcctcct gtctgcctct 120
gtgggtgacc gctcaccat cacctgccgc gcatctcagt ccattagcaa taactggaac 180
tggtatcagc agaagccagg caaagcccca aaactcctga tctactaac ctcacgcttc 240
cactcagggt tcccatcacg cttcagtggc agtggctctg gtacagattt cacctcacc 300
attagcagcc tgcaaccaga agatattgcc acttattact gccaacagg gcataccctt 360
ccatatacct tcggtcaagg caccaagctg gagatcaaac gcaactgtggc tgcacctct 420
gtcttcact ttctccatc tgatgagcag ttgaaatccg gaactgcctc tgytgytgc 480
ctgctgaata actttatcc acgcgaggcc aaagtacagt ggaagggtga taacgccctc 540
caatccggta actcccagga gagtgcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 600
ctcagcagca ccctgacct gagcaagca gactacgaga aacacmaagt ctacgcctgc 660
gaagtcacce atcagggcct gagttctcca gtcacaaga gcttcaaccg cggtgagtgc 720
taattctag 729
    
```

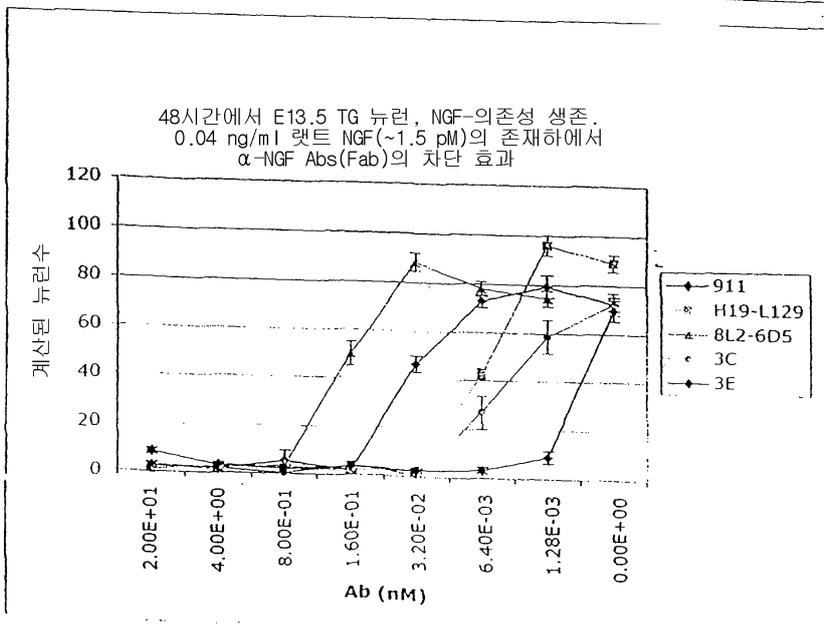
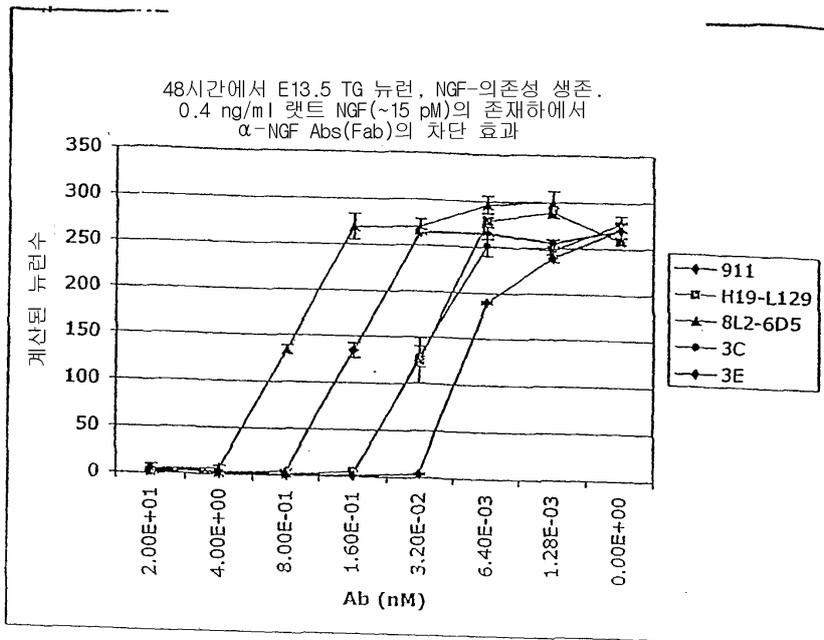
도면4



도면5

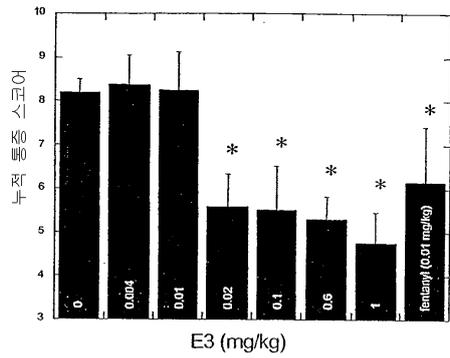


도면6



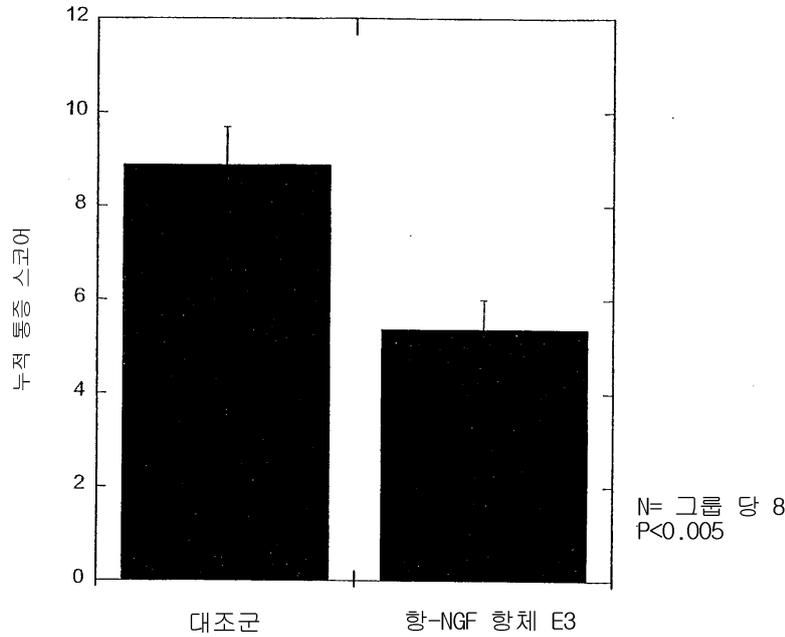
도면7

인간화 된 항-NGF 항체 E3가
외과적 수술 후 통증을 개선시킴



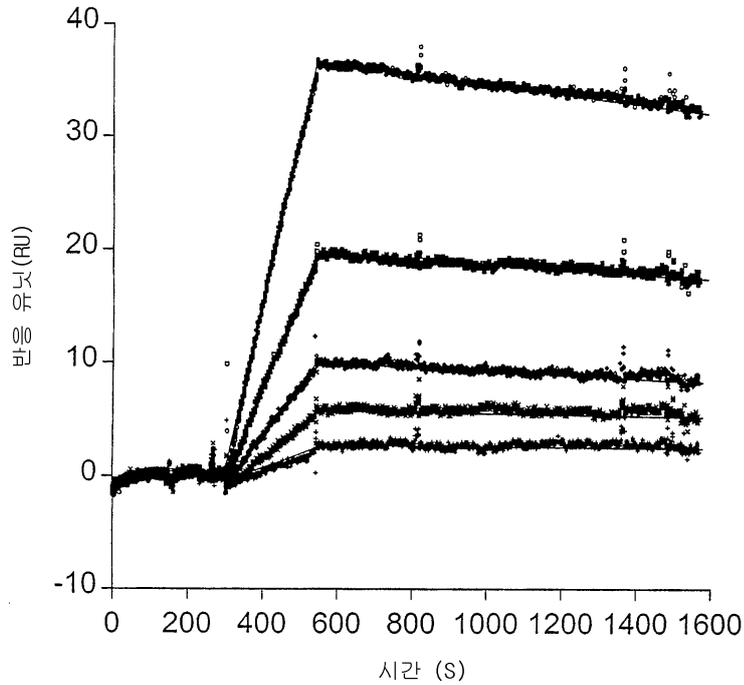
도면8

항-NGF 항체 E3는 외과 수술 2 시간 후에
주사되는 경우 통증을 개선시킴



도면9

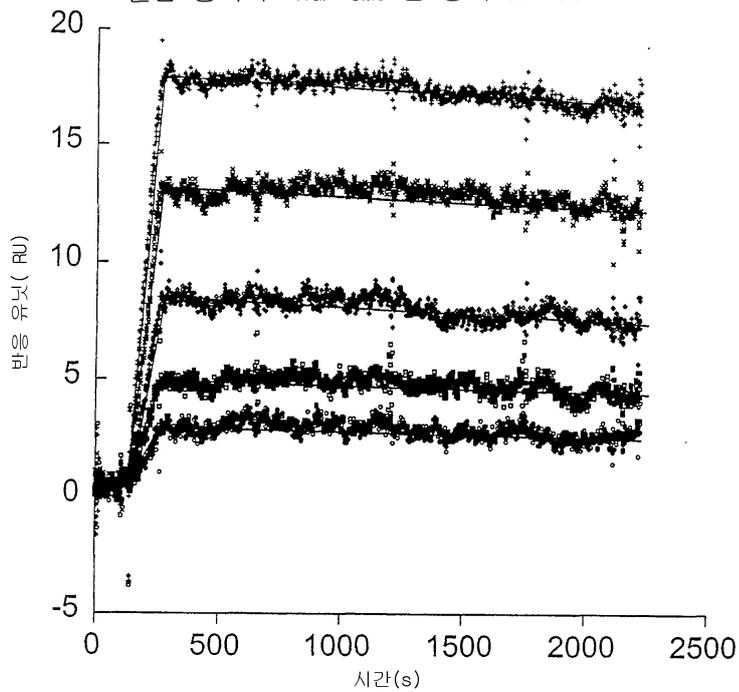
결합 동역학: NGF CM5 칩 상의 911 Fab



k_{on} $2.2 \cdot 10^4$ (1/Ms)
 k_{off} $8.4 \cdot 10^{-5}$ (1/s)
 K_D 3.7 nM

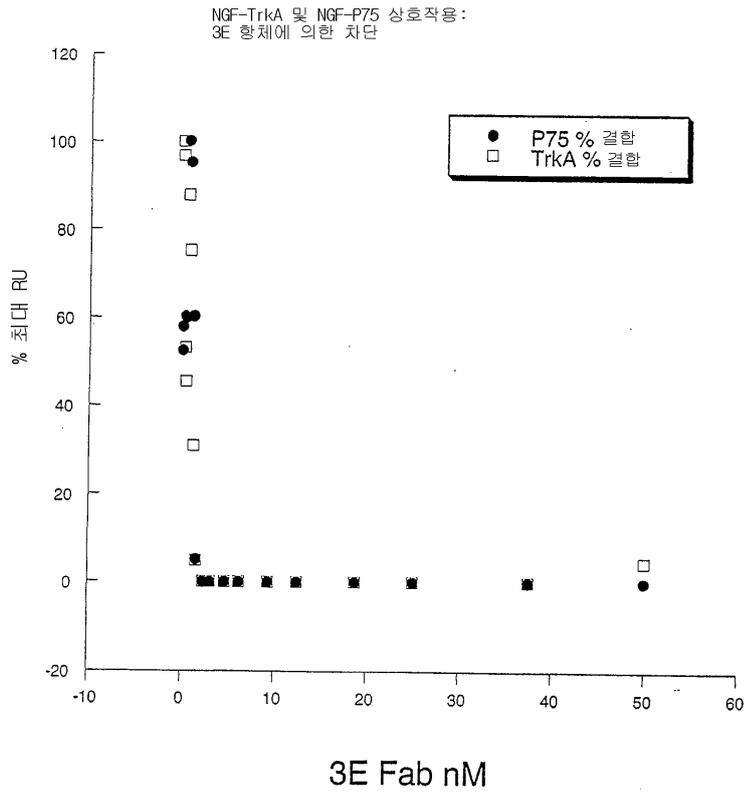
도면10

결합 동역학: NGF CM5 칩 상의 3E Fab

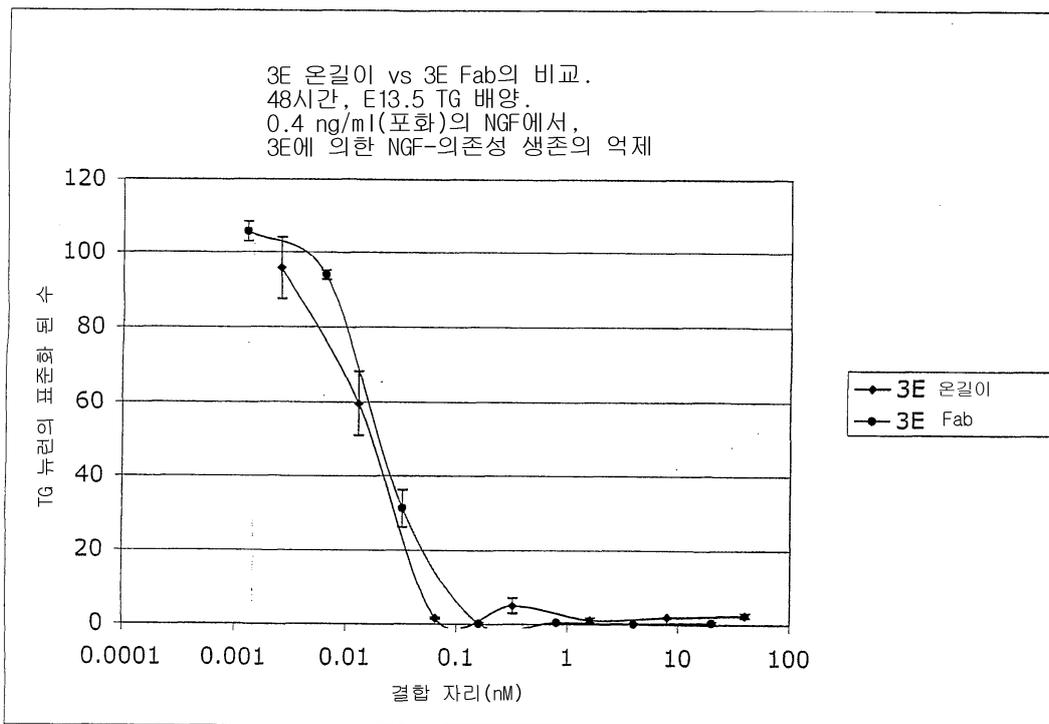


k_{on} $6.0 \cdot 10^5$ (1/Ms)
 k_{off} $4.2 \cdot 10^{-5}$ (1/s)
 K_D 0.07 nM

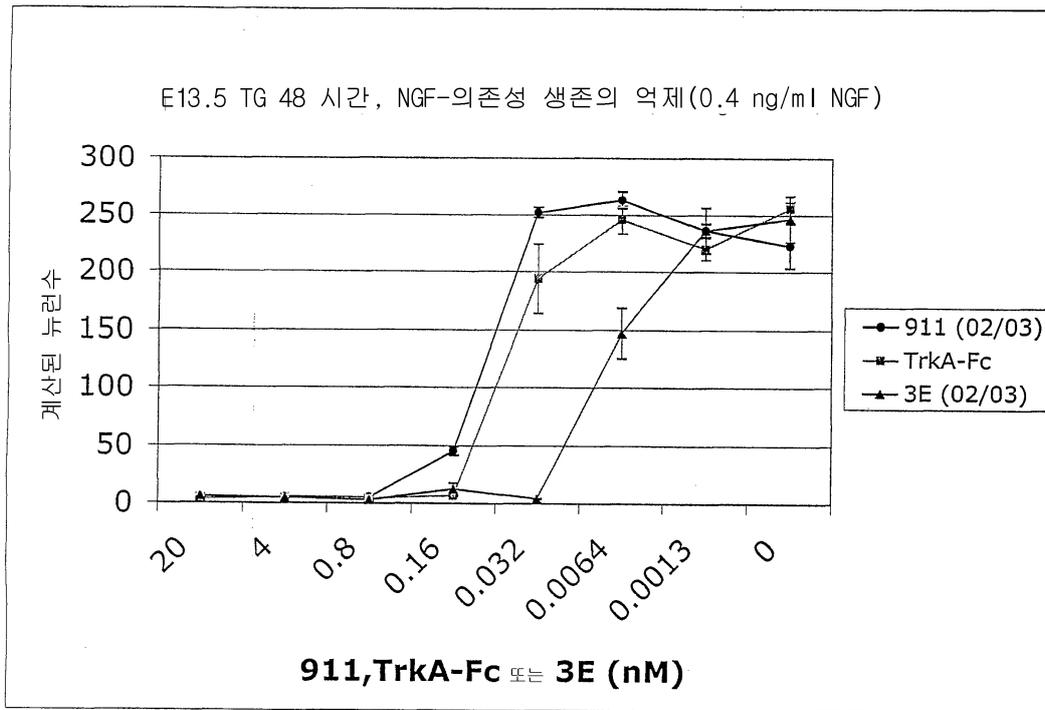
도면11



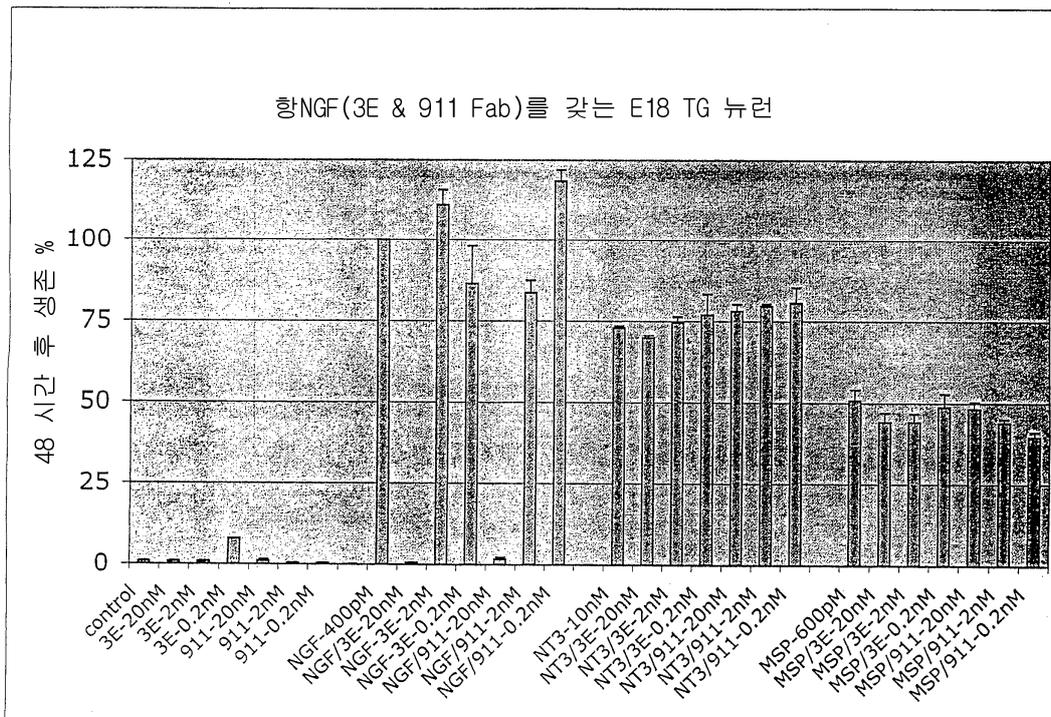
도면12



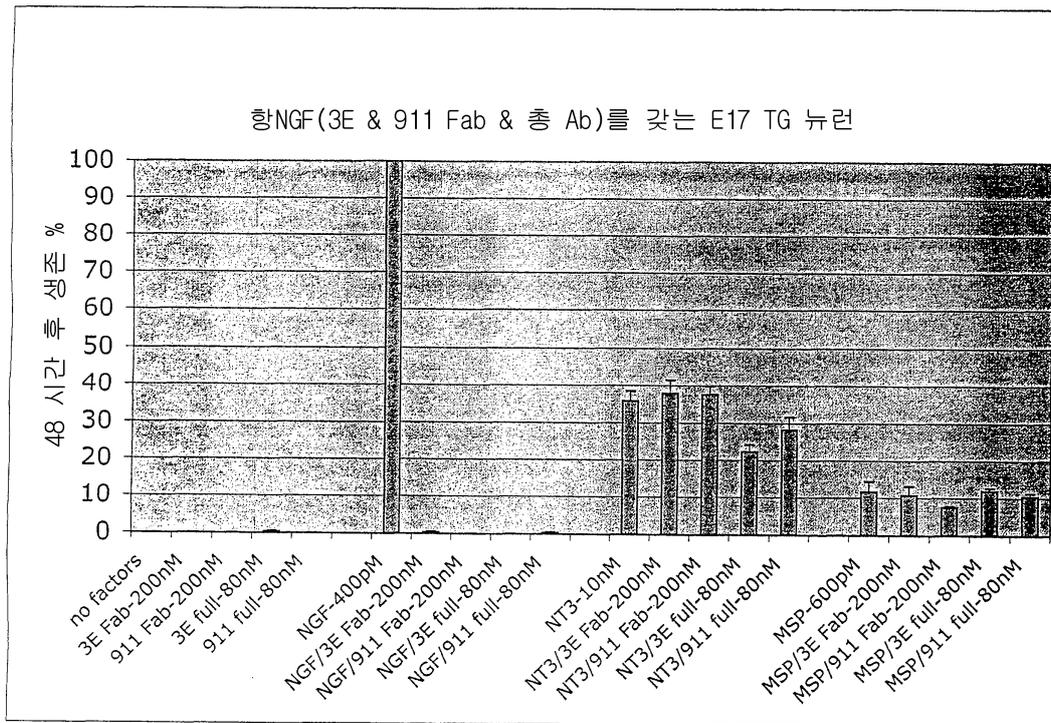
도면13



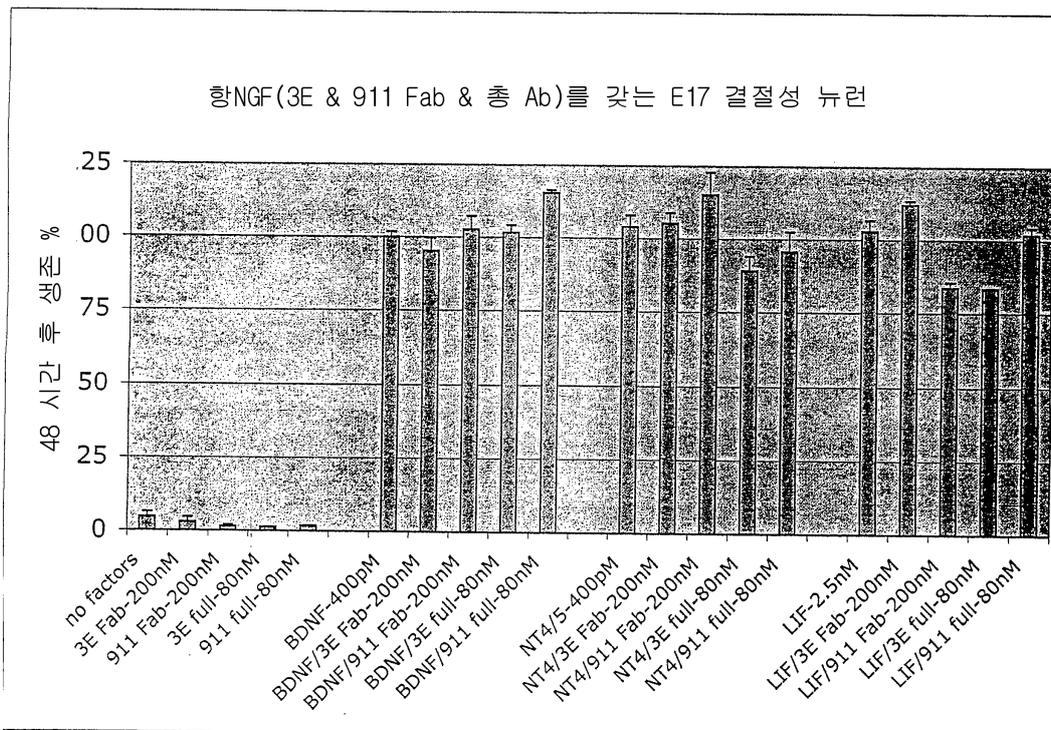
도면14



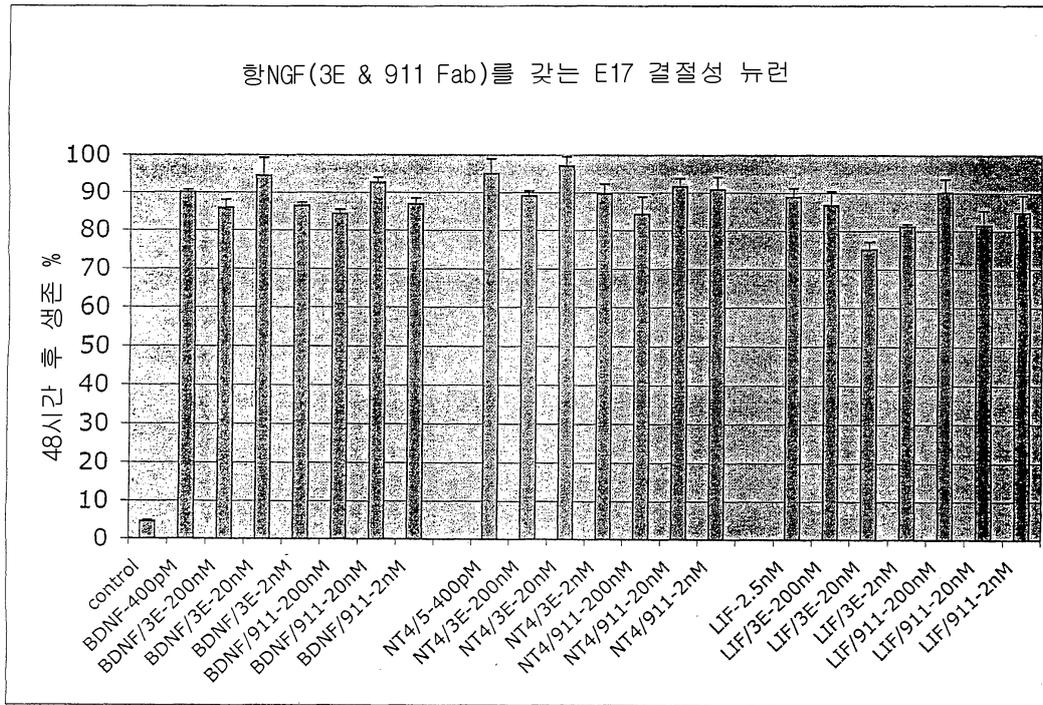
도면15



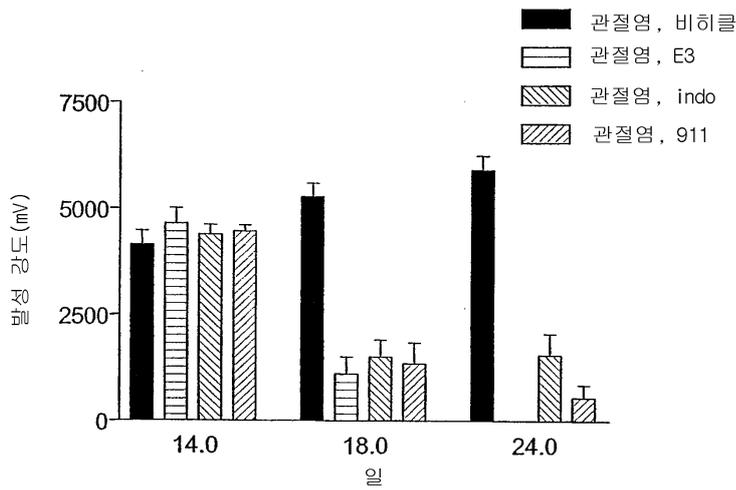
도면16



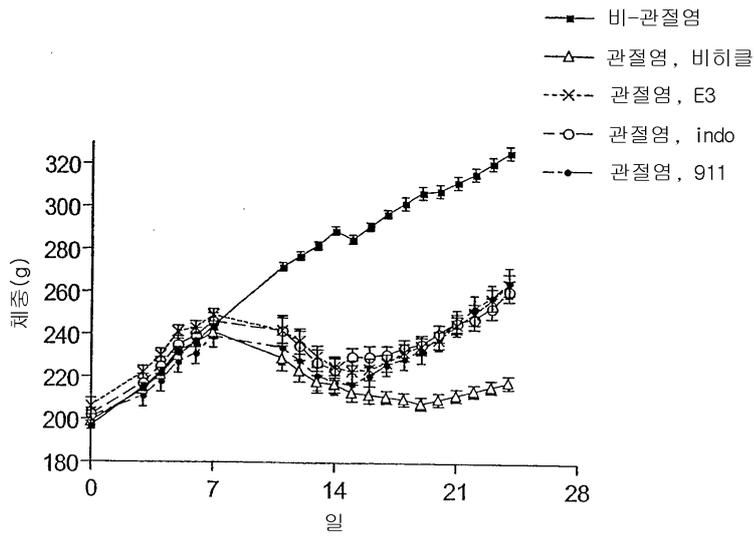
도면17



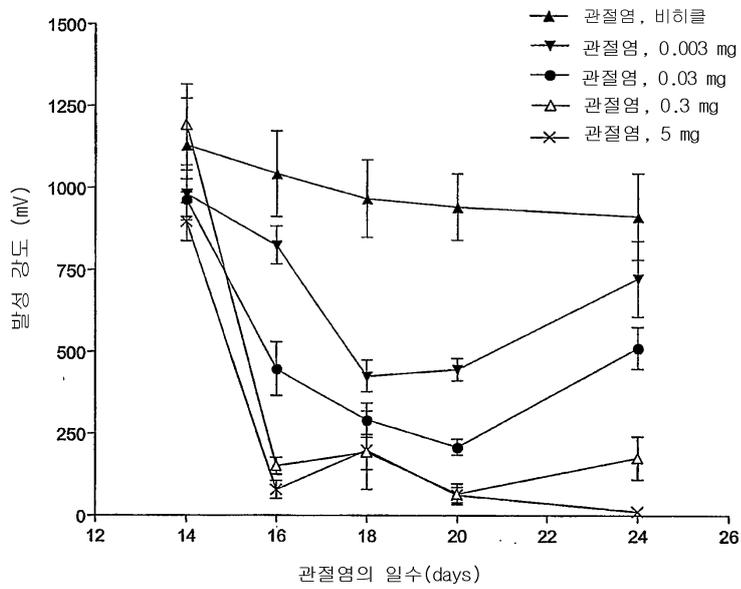
도면18



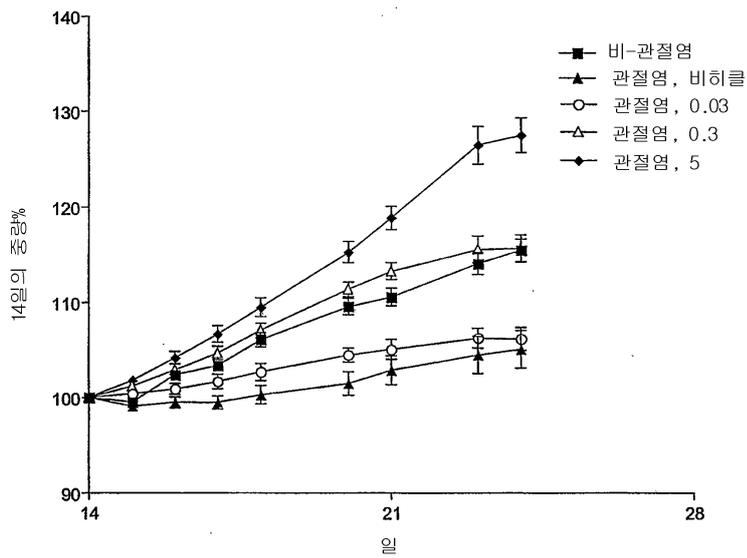
도면19



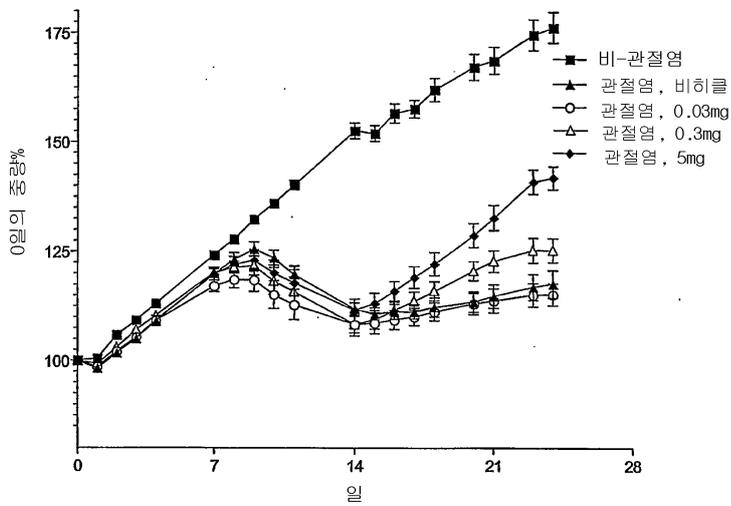
도면20



도면21



도면22



도면23a

3E 중쇄 가변 도메인 넘버링
 A- 단백질 순차적 넘버링
 B- KABAT 넘버링
 C- CHOTHIA 넘버링

박스 : CDR AS KABAT, 밑줄 =CDR AS CHOTHIA

A-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
B-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
C-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
	<u>Q</u>	<u>V</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>E</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>K</u>
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>G</u>
H1													
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>W</u>	<u>I</u>	<u>R</u>	<u>Q</u>
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>W</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>W</u>
H2													
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>K</u>	<u>S</u>
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	
	<u>R</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>D</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>N</u>	<u>Q</u>	<u>F</u>
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	
79	80	81	82	82A	82B	82C	83	84	85	86	87	88	
79	80	81	82	82A	82B	82C	83	84	85	86	87	88	
	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>T</u>	<u>A</u>
H3													
92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	
89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A	
89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A	
	<u>V</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>W</u>	<u>Y</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	
105	106	107	108	109	109	110	111	112	113	114	115	116	
100B	100C	100D	100E	101	102	103	104	105	106	107	108	109	
100B	100C	100D	100E	101	102	103	104	105	106	107	108	109	
	<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	<u>Y</u>	<u>W</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>V</u>
117	118	119											
110	111	112											
110	111	112											
<u>T</u>	<u>V</u>	<u>S</u>											

도면23b

3E 경쇄 가변 도메인 넘버링
 A- 단백질 순차적 넘버링
 B- Kabat 넘버링
 C- Chothia 넘버링

박스 : CDR AS KABAT, 밑줄 =CDR AS CHOTHIA

A-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
B-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
C-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A
													L1
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>S</u>
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	27
28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39		
	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>W</u>	Y	Q	Q	K
													L2
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	<u>Y</u>	<u>T</u>	<u>S</u>
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
	<u>R</u>	<u>F</u>	<u>H</u>	<u>S</u>	G	V	P	S	R	F	S	G	S
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	66
67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78		
	G	S	G	T	D	F	T	F	T	I	S	S	L
													L3
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	
	Q	P	E	D	I	A	T	Y	Y	C	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>E</u>
92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	
	<u>H</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>Y</u>	<u>T</u>	F	G	Q	G	T	K	L
105	106	107	108	109									
105	106	106A	107	108									
105	106	106A	107	108									
	E	I	K	R	T								

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Rinat Neuroscience Corp.

SHELTON, David L.

PONS, Jaume

ROSENTHAL, Arnon

<120> ANTI-NGF ANTIBODIES AND METHODS USING

SAME

<130> 514712001449

<140> KR 20057011944

<141> 2003-12-24

<150> PCT/US2003/041252

<151> 2003-12-24

<150> US 60/510,006

<151> 2003-10-08

<150> US 60/443,522

<151> 2003-01-28

<150> US 60/436,905

<151> 2002-12-24

<160> 77

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 1

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr

20 25 30

Asp Leu Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ile Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Val Lys

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120

<210> 2

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 2

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Glu His Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<

<223> Synthetic Construct

<400> 3

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Leu Asn

1 5 10

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 4

Ile Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Val Lys Ser

1 5 10 15

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 5

Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 6

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu Asn

1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 7

Tyr Thr Ser Arg Phe His Ser

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 8

Gln Gln Glu His Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ile Asn

1 5 10

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Met Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10
 <210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 12
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn His Leu Asn

1 5 10
 <210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 13
 Tyr Ile Ser Arg Phe His Ser

1 5
 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 14
 Gln Gln Ser Lys Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5
 <210> 15
 <211> 15
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 447
 <212> PRT

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220><221> VARIANT

<222> 190

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 17

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Phe His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Glu His Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Xaa Val Tyr

180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 18

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu Asn
 1 5 10

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 19

Tyr Thr Ser Arg Phe His Ser
 1 5

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 20

Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Asn His Leu Asn
 1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 21

Tyr Thr Ser Arg Phe His Ser

1 5

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Gln Leu Asn

1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 23

Tyr Val Ser Arg Phe His Ser

1 5

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 24

Arg Ala Phe Gln Ala Ile Ser Asn Gln Leu Asn

1 5 10

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 25

Tyr Ile Ser Arg Phe His Thr

1 5

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 26

Arg Ala Phe Gln Ser Ile Ser Asn Gln Leu Asn

1 5 10

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 27

Tyr Ala Ser Arg Phe His Ser

1 5

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 28

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ser Asn

1 5 10

<210> 29

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 29

Ile Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu

1 5 10

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 30

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Leu Asn

1 5 10

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 31

Ile Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Val

1 5 10

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 32

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Val Thr

1 5 10

<210> 33

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 33

Gly Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Val

1 5 10

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 34

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Val Thr

1 5 10

<210> 35

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 35

Gly Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ser Val

1 5 10

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 36

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ala Thr

1 5 10

<210> 37

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 37

Gly Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Val

1 5 10

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 38

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Val Ser

1 5 10

<210> 39

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 39

Ile Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ser Val

1 5 10
<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Construct
<400> 40

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ile Ser

1 5 10
<210> 41
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct
<400> 41

Gln Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ser Val

1 5 10
<210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct
<400> 42

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ala Ser

1 5 10
<210> 43
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 43

Gly Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ser Val

1 5 10

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 44

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ser Thr

1 5 10

<210> 45

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 45

Ser Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu

1 5 10

<210> 46

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 46

Gly Gly Tyr Trp Tyr Gly Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 47

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 47

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ala Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 48

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 48

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 49

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 49

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 50

Gln Gln Glu Lys Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 51

Gln Gln Glu Ala Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 52

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 52

Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 53

Gln Gln Glu Arg Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 54

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 54

Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 55

Gln Gln Glu His Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 56

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 56

Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 57

Gln Gln Glu Ser Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 58

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 58

Gly Gly Tyr Trp Tyr Ser Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 59

Gln Gln Glu Lys Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 60

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 60

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 61

Gln Gln Glu Arg Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 62

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 62

Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 63

Gln Gln Glu Arg Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 64

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 64

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 65

<211> 1344

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 65

caggtgcagc tgcaggagtc tggcccagga ctggtgaagc cttccgagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctgggtt ctcaattatc ggctatgata ttaactggat cgcacagcct 120

ccaggaagg gactggagtg gattgggatt atctggggtg atggaaccac agactataat 180

tcagctgtca aatccccgct caccatctca aaagacacct ccaagaacca gttctcctg 240

aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag aggaggttat 300

tggtagcca ctagctacta ctttgactac tggggccagg gcaccctggt caccgtctcc 360

tcagcctcca ccaagggccc atctgtcttc ccaactggccc catgctcccg cagcacctcc 420

gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tcccagaacc tgtgaccgtg 480

tcctggaact ctggcgctct gaccagcggc gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtcc 540

tcaggtctct actccctcag cagcgtggtg accgtgccat ccagcaactt cggcaccag 600

acctacacct gcaacgtaga tcacaagcca agcaacacca aggtcgaaa gaccgtggag 660

agaaagtgtt gtgtggagtg tccacctgtt ccagcccctc cagtggccgg accatccgtg 720

ttctgttcc ctccaaagcc aaaggacacc ctgatgatct ccagaacccc agaggtgacc 780

tgtgtggtgg tggacgtgtc ccacaggac ccagaggtgc agttcaactg gtatgtggac 840

ggagtggagg tgcacaacgc caagaccaag ccaagagagg agcagttcaa ctccaccttc 900

agagtggatg gcgtgctgac cgtggtgac caggactggc tgaacggaaa ggagtataag 960

tgtaaagtgt ccaacaaggg actgccatcc agcatcgaga agaccatctc caagaccaag 1020

ggacagccaa gagagccaca ggtgtatacc ctgccacat ccagagagga gatgaccaag 1080

aaccaggtgt cctgacctg tctggtgaag ggattctatc catccgacat cgccgtggag 1140

tgggagtcca acggacagcc agagaacaac tataagacca cccctccaat gctggactcc 1200

gacggatcct tcttctgta ttccaagctg accgtggaca agtccagatg gcagcagga 1260

aacgtgttct ctgttccgt gatgcacgag gcctgcaca accactatac ccagaagagc 1320

ctgtccctgt ctccagaaa gtaa 1344

<210> 66

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 66

caggtgcagc tgcaggagtc tggcccagga ctggtgaagc cttccgagac cctgtccctc 60

acctgcaactg tctctgggtt ctcaattatc ggctatgac ttaactggat ccgacagcct 120

ccaggaagg gactggagtg gattgggatt atctggggtg atggaaccac agactataat 180

tcagctgtca aatccccgct caccatctca aaagacacct ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag aggaggttat 300
tggtagcca ctagctacta ctttgactac tggggccagg gcaccctgtt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 67

<211> 645

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 67

gatatccaga tgacacagtc cccatcctcc ctgtctgctt ctgtgggtga ccgctcacc 60

atcacctgcc gcgcatctca gtccattagc aataatctga actggtatca gcagaagcca 120
ggcaaagccc caaaactcct gatctactac acctcacgct tccactcagg tgtcccatca 180
cgcttcagtg gcagtggctc tggtagagat ttcaccttca ccattagcag cctgcaacca 240
gaagatattg ccacttatta ctgccaacag gagcataccc ttccatatac cttcgggtcaa 300
ggcaccgaagc tggagatcaa acgcaactgtg gctgcacat ctgtcttcat ctttcttcca 360
tctgatgagc agttgaaatc cggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
ccacgcgagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatccgg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacc 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacmaa gtctacgctt gcgaagtac ccatcagggc 600
ctgagttctc cagtcacaaa gagcttcaac cgcggtgagt gctaa 645

<210> 68

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 68

gatatccaga tgacacagtc cccatcctcc ctgtctgctt ctgtgggtga ccgctcacc 60
atcacctgcc gcgcatctca gtccattagc aataatctga actggtatca gcagaagcca 120
ggcaaagccc caaaactcct gatctactac acctcacgct tccactcagg tgtcccatca 180

cgcttcagtg gcagtggtc tggtacagat ttcaccttca ccattagcag cctgcaacca 240

gaagatattg ccacttatta ctgccaacag gagcataccc ttccatatac cttcgggtcaa 300

ggcaccaagc tggagatcaa acgc 324

<210> 69

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Gly

<210> 70

<211> 120

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 70

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr

20 25 30

Asp Ile Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120

<210> 71

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 71

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr
 20 25 30
 Asp Ile Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120

<210> 72

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 72

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr
 20 25 30
 Asp Leu Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ile Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Val Lys

50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120

<210> 73

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro
 85 90 95

<210> 74

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 74

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

 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn His
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Ile Ser Arg Phe His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr

100 105

<210> 75

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 75

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn

20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr

100 105

<210> 76

<211> 1429

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 76

atggccaccg actccagaac ctctggctg ctgacagtgt cctgctgtg tctgctgtgg 60

ccacaggagg ccagcgetca ggtgcagctg caggagtctg gccaggact ggtgaagcct 120

tccgagacc tgcctcac ctgcactgtc tctgggttct cactatcgg ctatgatctt 180

aactggatcc gacagcctcc aggggaaggga ctggagtgga ttgggattat ctggggtgat 240

ggaaccacag actataattc agctgtcaaa tcccgcgtca ccatctcaaa agacacctcc 300

aagaaccagt tctccctgaa gctgagctct gtgaccgccg cggacacggc cgtgtattac 360

tgtgcgagag gaggttattg gtacgccact agctactact ttgactactg gggccagggc 420

accttggtca ccgtctctc agcctccacc aagggcccat ctgtcttccc actggcccca 480

tgctcccga geacctcga gagcacagcc gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc 540

ccagaacctg tgaccgtgtc ctggaactct ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc 600

ccagctgtcc tgcagctctc aggtctctac tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccatcc 660

agcaacttcg gcacccagac ctacacctgc aacgtagatc acaagccaag caacaccaag 720

gtcgacaaga ccgtggagag aaagtgtgtg gtggagtgtc caccttgtcc agcccctcca 780

gtggccggac catccgtgtt cctgttccct ccaaagecaa aggacacct gatgatctcc 840

agaaccccag aggtgacctg tgtggtggtg gacgtgtccc acgaggacct agaggtcag 900

ttcaactggt atgtggacgg agtggagggtg cacaacgcca agaccaagcc aagagaggag 960

cagttcaact ccaccttcag agtggtgagc gtgctgaccg tggtgacca ggactggctg 1020

aacggaaagg agtataagtg taagggtgtc aacaaggac tgccatccag catcgagaag 1080

accatctcca agaccaaggg acagccaaga gagccacagg tgtatacct gccaccatcc 1140

agagaggaga tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tggngaaggg attctatcca 1200

tccgacatcg ccgtggagtg ggagtccaac ggacagccag agaacaacta taagaccacc 1260

cctccaatgc tgactccga cggatccttc ttctgtatt ccaagctgac cgtggacaag 1320

tccagatggc agcagggaaa cgtgttctct tgttccgtga tgcacgagc cctgcacaac 1380

cactataccc agaagagcct gtcctgtct ccaggaaagt aattctaga 1429

<210> 77

<211> 729

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220>

<221> misc_feature

<222> 646

<223> m = A or C

<400> 77

atggccaccg actccagaac ctcttggctg ctgacagtgt ccctgctgtg tctgctgtgg 60

ccacaggagg ccagcgetga tatecagatg acacagtccc catctecctt gtctgcctct 120

gtgggtgacc gcgtcaccat cacctgccgc gcatctcagt ccattagcaa taatctgaac 180

tggatcagc agaagccagg caaagcccca aaactcctga tctactacac ctcacgcttc 240

cactcagggtg teccatcacg cttecagtggc agtggctctg gtacagattt caccttcacc 300

attagcagcc tgcaaccaga agatattgcc acttattact gccaacagga gcataccctt 360

ccatatacct tcggtcaagg caccaagctg gagatcaaac gcaactgtggc tgcaccatct 420

gtcttcatct ttctccatc tgatgagcag ttgaaatccg gaactgcctc tgttgtgtgc 480

ctgctgaata acttctatcc acgcgaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc 540

caatccggta actcccagga gagtgtcaca gacgaggaca gcaaggacag cacctacagc 600

ctcagcagca ccctgacct gagcaaagca gactacgaga aacacmaagt ctacgcctgc 660

gaagtcacce atcagggcct gatttctcca gtcacaaaga gttcaaccg cggtagtgc 720

taattctag

729