



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2010-0132559  
 (43) 공개일자 2010년12월17일

- (51) Int. Cl.  
*A61K 39/395* (2006.01) *A61P 11/06* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2010-7027004(분할)  
 (22) 출원일자(국제출원일자) 2002년05월09일  
 심사청구일자 2010년12월10일
- (62) 원출원 특허 10-2008-7027819  
 원출원일자(국제출원일자) 2002년05월09일  
 심사청구일자 2008년12월12일
- (85) 번역문제출일자 2010년12월01일  
 (86) 국제출원번호 PCT/US2002/015284  
 (87) 국제공개번호 WO 2002/96458  
 국제공개일자 2002년12월05일
- (30) 우선권주장  
 60/294,392 2001년05월30일 미국(US)
- (71) 출원인  
**제넨테크, 인크.**  
 미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우  
 쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
- (72) 발명자  
**셸튼, 데이빗, 엘.**  
 미합중국, 캘리포니아주 94618, 오클랜드, 클로버  
 드라이브 5845
- (74) 대리인  
**김 순 영, 김영철**

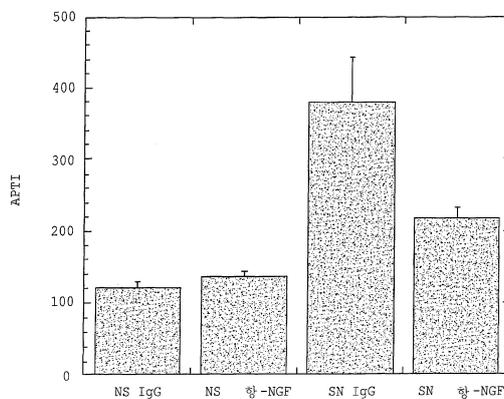
전체 청구항 수 : 총 27 항

**(54) 다양한 질환의 치료에 유용한 항-엔지오프 항체**

**(57) 요약**

본 발명은 총괄적으로 천식, 관절염 및 건선을 비롯한 다양한 NGF 관련 질환의 치료에 항-NGF 항체를 사용하는 방법에 것이다. 이 방법은 환자의 면역계에 유의적인 악영향을 미침이 없이 환자의 상기 질환을 치료하는데 효과적이다.

**대표도** - 도13



**특허청구의 범위**

**청구항 1**

0.10nM 내지 0.80nM(나노몰)의 친화성으로 인간 NGF(hNGF, human nerve growth factor, 인간신경성장인자)에 결합할 수 있고 생체 내에서 인간 TrkA(hTrkA)에 대한 hNGF의 결합을 억제할 수 있으며, 항원 투여에 대한 환자의 정상적인 면역 반응을 감소시키지 않는, 키메라, 인간화 또는 인간의 항-인간 NGF(항-hNGF) 단일클론 항체로서, MAb 911, MAb 912 및 MAb 938로 구성된 그룹 중에서 선택되는 항체와 동일한 hNGF 에피토프에 결합하는 항체를

약학적 허용성 담체와 함께 함유하는, NGF 관련 염증성 장애 치료용 약학 조성물.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 항체가 항체 단편인 것이 특징인 약학 조성물.

**청구항 3**

제2항에 있어서, 상기 항체 단편이 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv 단편, 다이아바디, 1본쇄 항체 분자 및 항체 단편들로부터 형성된 다특이성 항체로 구성된 그룹 중에서 선택되고,

상기 다특이성 항체는 항-인간 NGF 및 항-인간 IgE 특이성; 항-인간 NGF 및 항-인간 TNF(tumor necrosis factor, 종양괴사인자) 특이성; 또는 항-인간 NGF 및 항-인간 TNF 수용체 특이성을 가지는 것이 특징인 약학 조성물.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 상기 항체가 항-인간 NGF 및 항-인간 IgE 특이성; 항-인간 NGF 및 항-인간 TNF 특이성; 또는 항-인간 NGF 및 항-인간 TNF 수용체 특이성을 가지는 양특이성 항체인 것이 특징인 약학 조성물.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 추가로 다른 약학적 활성 성분을 함유하는 것이 특징인 약학 조성물.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 상기 다른 약학적 활성 성분이 염증성 증상의 치료에 적합한 것인 약학 조성물.

**청구항 7**

제6항에 있어서, 상기 염증성 증상이 만성통증, 천식, 다발성 경화증, 관절염, 홍반루푸스 및 건선으로 구성된 그룹 중에서 선택되는 것인 약학 조성물.

**청구항 8**

제7항에 있어서, 상기 염증성 증상이 천식인 것이 특징인 약학 조성물.

**청구항 9**

제7항에 있어서, 상기 염증성 증상이 관절염인 것이 특징인 약학 조성물.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 상기 관절염이 류마티스 관절염인 것이 특징인 약학 조성물.

**청구항 11**

제7항에 있어서, 상기 염증성 증상이 건선인 것이 특징인 약학 조성물.

**청구항 12**

용기;

제1항에 따른 약학 조성물; 및

인간 환자의 NGF 관련 염증성 장애를 치료하기 위한 상기 조성물의 사용에 관한 지침서를 포함하는 제조 물품.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 추가로 제2 약학적 활성 성분을 함유하는 것이 특징인 제조 물품.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 상기 제2 약학적 활성 성분이 염증성 증상의 치료에 적합한 것이 특징인 제조 물품.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 상기 염증성 증상이 만성통증, 천식, 다발성 경화증, 관절염, 홍반루푸스 및 건선으로 구성된 그룹 중에서 선택되는 것인 제조 물품.

**청구항 16**

제12항에 있어서, 추가로 조성물이 함유된 제2 용기를 함유하고, 상기 조성물은 NGF 수용체에 결합하여 리간드 활성화를 차단하는 제2 항체를 함유하는 것인 제조 물품.

**청구항 17**

제1항에 있어서, hNGF에 대한 상기 항체의 결합 친화성이 0.15 내지 0.75 nM 인 것이 특징인 약학 조성물.

**청구항 18**

제1항에 있어서, hNGF에 대한 상기 항체의 결합 친화성이 0.18 내지 0.72 nM 인 것이 특징인 약학 조성물.

**청구항 19**

제1항에 있어서, 상기 항체가 항체 MAb 911과 동일한 hNGF 에피토프에 결합하는 것이 특징인 약학 조성물.

**청구항 20**

제1항에 있어서, 상기 항체가 뮤린 NGF(muNGF)에도 결합할 수 있는 것이 특징인 약학 조성물.

**청구항 21**

제3항에 있어서, 상기 1본쇄 항체 분자가 1본쇄 Fv(scFv) 분자인 것이 특징인 약학 조성물.

**청구항 22**

제8항에 있어서, 상기 다른 약학적 활성 성분이 코르티코스테로이드인 것이 특징인 약학 조성물.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 상기 코르티코스테로이드가 베클로메타손 디프로프리오네이트 (BDP)인 것이 특징인 약학 조성물.

**청구항 24**

제8항에 있어서, 상기 다른 약학적 활성 성분이 항-IgE 항체인 것이 특징인 약학 조성물.

**청구항 25**

제24항에 있어서, 상기 항-IgE 항체가 rhuMAb-E25 또는 rhuMAb-E26인 것이 특징인 약학 조성물.

**청구항 26**

제10항에 있어서, 상기 다른 약학적 활성 성분이 항-TNF 항체 또는 TNF 수용체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 면역부착소인 것이 특징인 약학 조성물.

**청구항 27**

제1항에 있어서, 상기 NGF 관련 염증성 장애는 홍반루푸스, 접촉 피부염, 습진, 대상포진, 대상포진후 신경통, 통각과민, 만성통증, 과민대장질환, 크론병, 결장염, 방광염, 다발성경화증, 천식, 건선, 관절염, 만성관절염 및 류마티스관절염으로 구성된 NGF 관련 장애 그룹 중에서 선택되는 것인 약학 조성물.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 총괄적으로 천식, 관절염 및 건선을 비롯한 다양한 NGF 관련 질환의 치료에 항-NGF 항체를 사용하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 환자의 면역계에 유의적인 부작용을 미치지 없이 환자의 상기 질환을 치료하는데 효과적이다.

**배경기술**

[0002] **신경성장인자(NGF)**

[0003] 신경성장인자(NGF)는 동정된 최초의 뉴로트로핀(neurotrophin)으로서, 말초 뉴런 및 중추 뉴런 모두의 발달과 생존에 기여하는 역할에 대해서는 이미 잘 규명되어 있다. NGF는 말초 교감 및 배아 감각 뉴런의 발달과 기저 전뇌 콜린성 뉴런의 발달에 중요한 생존 및 유지 인자인 것으로 밝혀져 있다(Smeyne et al., Nature 368: 246-249 (1994); Crowley et al., Cell 76:1001-1011 (1994)). NGF는 감각 뉴런에서 신경펩타이드의 발현을 상승조절하며(Lindsay and Harmer, Nature 337:362-364 (1989)), 그 활성은 2개의 다른 막결합 수용체를 통해 매개되고 있다. 구체적으로, TrkA 타이로신 키나제 수용체는 높은 친화성 결합을 매개하고, p75 수용체, 즉 중앙 괴사 인자 수용체 패밀리의 다른 구성원들과 구조적 관련성이 있는 p75 수용체는 낮은 친화성 결합을 매개한다(Chao et al., Science 232:518-521(1986)).

[0004] 이와 같이 신경계에 기여하는 효과외에도, NGF는 신경계 외의 과정들에도 연관성이 있는 것으로 점차 밝혀지고 있다. 예를 들어, NGF는 혈관 투과성을 향상시키고(Otten et al., Eur.J.Pharmacol. 106:199-201 (1984)), T-세포 및 B-세포 면역반응을 향상시키며(Otten et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 86:10059-10063 (1989)), 림프구 분화 및 비만세포 증식을 유도하고 비만 세포로부터 가용성 생물학적 시그널의 해리를 유발하는 것으로 밝혀져 있다(Matsuda et al., Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 85:6508-6512 (1988); Pearce et al., J.Physiol. 372:379-393(1986); Bischoff et al., Blood 79:2662-2669 (1992); Horigome et al., J.Biol.Chem. 268:14881-14887 (1993)).

[0005] NGF는 비만 세포(Leon et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 91:3739-3743 (1994)), B 림프구(Torcia et al., Cell 85:345-356 (1996)), 각질세포(Di Marco et al., J.Biol.Chem. 268:22838-22846)) 및 평활근 세포(Ueyama et al., J.Hypertens. 11:1061-1065 (1993))를 비롯한 다양한 종류의 세포에서 생산된다. NGF 수용체는 이러한 신경계 외의 다양한 세포 종류에서도 발견된 바 있다. 예를 들어, TrkA는 인간 단핵구, T 림프구와 B 림프구 및 비만 세포에서 발견된 바 있다.

[0006] NGF의 뉴런 외의 역할에 일관되듯이, NGF의 증가된 농도와 다양한 염증 증상 간의 관련성이 여러 동물 모델에서 뿐만 아니라 인간 환자에서도 관찰되었다. 그 예로는, 전신흡반루푸스(Bracci-Laudiero et al., Neuroreport 4:563-565 (1993)), 다발성경화증(Bracci-Laudiero et al., Neurosci.Lett. 147:9-12(1992)), 건선(Raychaudhuri et al., Acta Derm.Venereol. 78:84-86 (1998)), 관절염(Falcini et al., Ann.Rheum.Dis. 55:745-748(1996) 및 천식(Braun et al., Eur.J.Immunol. 28:3240-3251(1998))이 있다. 이와 같은 만성 염증성 질환들은 공중보건의 중요한 문제이다. 예를 들어, 관절염 환자는 미국에서만 3790만명인 것으로 추정되고 있다. 현재 이러한 질환들을 치료하는 치료법은 극히 제한되어 있다. 따라서, 이러한 질환들에 작용하는 NGF의 역할에 대한 이해는 이들 질환 치료의 새로운 방안을 제공할 것이다.

[0007] 스트레스와 건선 사이의 상관관계는 관찰된 바 있다. 이러한 상관관계와 건선을 수반하는 피부 병변의 균형관계에 근거하여, 신경계와의 관계가 제안되었다(Raychaudhuri et al., Acta Derm.Venereol. 78:84-86 (1998)). 구

체적으로, 뉴로펩타이드는 건선의 발병에 일 역할을 하는 것으로 제안된 바 있다. 연구자들의 보고에 따르면 말단 피부 신경 수의 증가와 함께 1 이상의 뉴로펩타이드, 예컨대 물질 P(SP), 혈관활성 장 폴리펩타이드(VIP) 및 CGRP가 상승조절되었다. NGF는 피부의 신경분포를 조절하는데 일 역할을 하고, 또한 뉴로펩타이드를 상승조절하는 것으로 알려져 있는데, 이는 NGF 농도의 증가가 뉴로펩타이드의 상승조절과 건선에서 관찰되는 피부 신경분포의 증가를 초래할 수 있음을 암시한다. 실제로, 건선의 각질세포에서는 NGF의 발현 증가가 관찰된 바 있다(Raychaudhuri et al., Acta Derm.Venercol. 78:84-86(1998)). 이에 따라 NGF는 통상적으로 각질세포의 생존인자로서 작용하지만, NGF의 과잉발현은 정상 세포의 사멸을 방해하여 건선을 유도한다고 제안된 바 있다(Pincelli et al., J.Derm.Sci. 22:71-79(2000)).

[0008] 또한, 물질 P(SP)와 같은 뉴로펩타이드와 비만 세포에서 방출된 생물학적 활성 물질, 예컨대 히스타민이 자연 발생의 인간 관절염과 실험적으로 유도된 동물 모델의 관절염 모두에서 일 역할을 한다는 다수의 연구가 제시된 바 있다(예컨대, Levine, J., Science 226:547-549(1984)). NGF는 비만 세포 과립감소(Bruni et al., FEBS Lett. 138:190-193(1982)) 및 물질 P 방출(Donnerer et al., Neurosci. 49:693-698 (1992))에 영향을 미치어 관절염의 발병에 관련되는 것으로 밝혀진 바 있다.

[0009] 이에 일관되게, NGF의 말초 조직에서의 농도 상승은 통각과민 및 염증과 관련이 있으며, 다양한 형태의 관절염에서 관찰되었다. 류마티스성 관절염에 걸린 환자의 활액은 고농도의 NGF를 발현하는 반면, 비염증성 활액에서는 NGF가 검출되지 않는 것으로 보고된 바 있다(Aloe et al., Arch.Rheum. 35:351-355(1992)). 실험으로 유도된 류마티스성 관절염에 걸린 래트에서도 유사한 결과가 관찰되었다(Aloe et al., Clin.Exp.Rheumatol. 10:203-204(1992)). NGF의 상승된 농도는 비만 세포 수의 증가와 함께 트랜스제닉 관절염 마우스에서 보고된 바 있다(Aloe et al., Int. J. Tissue Reactions-Exp.Clin.Aspects 15:139-143(1993)). 하지만, 정상 래트의 관절 활액에 정제된 NGF를 주사한 경우, 무릎 관절의 염증을 유도하지 않는 바, NGF가 관절염의 원인 역할을 하는 것은 아님을 암시하였다(Aloe et al., Growth Factors 9:149-155(1993)).

[0010] 높은 NGF 농도는 알러지 염증과 관련이 있으며, 이것이 비만 세포 과립감소와 관련이 있다고 제안된 바 있다(Bonini et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 93:10955-10960(1996)).

[0011] 상승된 NGF 농도는 더욱이 알러지 천식 및 비알러지 천식에서 모두 관찰되었다(상기 Bonini et al. 문헌). 이러한 염증 질환에 일 역할을 하는 것으로 비만 세포, 호산구 및 T 림프구가 모두 제안된 바 있고, NGF 혈청 농도와 총 IgE 항체 역가 간의 상관관계를 통해 NGF가 염증의 면역 반응에 기여함이 암시되었다. 알러겐에 의해 유도된 기도 염증은 마우스 및 인간 모두에서 국소적인 NGF 생산 증가와 관련이 있었다(Braun et al., Int.Arch.Allergy Immunol. 118:163-165(1999)).

[0012] NGF는 기관지 천식의 지표인 기도 기능항진 반응 증가의 발달을 조절하는 것으로 관찰된 바 있다(Braun et al., Eur.J.Immunol. 28:3240-3251(1998)). 실제로 한 연구에서, 항-NGF 항체를 이용하여 알러겐 민감화된 마우스를 치료한 결과 국소적인 알러겐 투여 후 기도 과다반응의 발달이 방지되었다(Braun et al., Int.Arch.Allergy Immunol. 118:163-165(1999)).

[0013] 마우스에서 수득된 유망한 결과에도 불구하고, 면역계에 미치는 중화성 항-NGF 항체의 보고된 부작용으로 인해, 인간 환자에 있어서 천식이나 다른 질환이나 장애의 예방이나 치료에 항-NGF 항체를 치료제로서 사용할 수 있는 가능성에 대한 의문이 제기되어 왔다. 구체적으로, 토르시아 등(Torcica et al., Cell 85:345-356(1996))은 NGF를 기억 B 림프구의 자기분비 생존인자로 동정하여, 중화성 항-NGF 항체의 생체내 투여는 기억 B 세포 고갈을 유도하고 마우스의 2차 항원-특이적 면역 반응을 제거함을 입증하였다. 가라시 등(Garaci et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 96:14013-14018(1999))은 NGF가 HIV 감염에 의한 세포병변 효과로부터 인간 단핵구/대식세포를 보호하는 자기분비 생존인자라고 보고하였다. 이와 같은 보고는 상기 토르시아 등의 발견과 함께, 항-NGF 항체가 치료받는 피검체의 면역계를 타협시킬 잠재성이 있음을 암시하는 것이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0014] 본 발명은 치료적 유효량의 항-NGF 단일클론 항체(항체 911)의 생체내 투여가 알러지 실험 마우스 모델에서 면역계에 어떤 부작용도 미치지 않는다는 예기치 않은 발견에 기초한 것이다. 따라서, 상기 항체 및 이와 관련된 항체는 인간 환자들의 천식을 비롯한 NGF 관련 질환을 치료하는데 높은 전망이 있다.

**과제의 해결 수단**

- [0015] 본 발명은 나노물 범위의 친화성으로 hNGF에 결합할 수 있어서, 생체내에서 인간 TrkA(hTrkA)에 대한 hNGF의 결합을 억제할 수 있으며, 환자의 면역계에 유의적인 부작용이 없는 항-인간 NGF(항-hNGF) 단일클론 항체의 유효량을 환자에게 투여하여 인간 환자의 NGF 관련 질환을 제어하는 방법에 관한 것이다.
- [0016] 일 구체예에 있어서, hNGF에 대한 항체의 결합 친화성은 바람직하게는 약 0.10 내지 약 0.80 nM, 보다 바람직하게는 약 0.15 내지 약 0.75 nM, 보다 더 바람직하게는 약 0.18 내지 약 0.72 nM이다.
- [0017] 또 다른 구체예에 있어서, 상기 항체는 MAb911, MAb912 및 MAb938로 구성된 그룹 중에서 선택되는 항체와 거의 동일한 hNGF 에피토프, 보다 바람직하게는 MAb911과 동일한 에피토프에 실질적으로 결합한다.
- [0018] 또 다른 구체예에 있어서, 상기 항체는 뮤린(murine) NGF(muNGF)와 교차반응할 수 있다.
- [0019] 상기 항체는 또한 항체 단편, 바람직하게는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv 단편 및 다이아바디(diabody), 1본쇄(단일체인) 항체 분자로 구성된 그룹 중에서 선택되는 항체 단편 및 항체 단편들로부터 제조된 다특이성 항체 및 보다 바람직하게는 1본쇄 Fv(scFv) 분자일 수 있다.
- [0020] 다른 구체예에서는 항체가 키메라성이다. 항체는 또한 인간화된 항체이거나 인간 항체일 수 있다.
- [0021] 다른 구체예에서는 항체가 양특이성(bispecific)이다. 양특이성 항체는 항-IgE 특이성을 가질 수 있다.
- [0022] 상기 제어되는 NGF 관련 질환은 신경계에 미치는 NGF 효과와 관련이 없는 것이 바람직하다.
- [0023] 일 구체예에 있어서, NGF 관련 질환은 염증성 증상으로서, 바람직하게는 천식, 관절염, 다발성경화증, 홍반루푸스 및 건선으로 구성된 그룹 중에서 선택되는 것이다.
- [0024] 바람직한 구체예에서, 증상은 천식이다. 또 다른 구체예에서, 증상은 관절염, 바람직하게는 류마티스성 관절염이다. 또 다른 구체예에서 증상은 건선이다.
- [0025] 또 다른 추가 구체예에서, 상기 항체는 염증성 증상을 치료하기 위하여 다른 치료제와 함께 투여한다. 구체적으로, 상기 항체는 천식 치료용의 다른 치료제와 함께 투여할 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 항체는 코르티코스테로이드, 바람직하게는 베헤로메트손 디프로프리오네이트(BDP)와 함께 투여한다. 다른 구체예에 있어서, 항체는 항-IgE 항체, 예컨대 rhuMAb-E25 또는 rhuMAb-E26과 함께 투여한다. 류마티스관절염 치료에는, 상기 항체를 항-TNF 항체 또는 TNF 수용체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 면역부착소(immunoadhesin)와 함께 투여할 수 있다.
- [0026] 한편, 본 발명은 나노물 범위의 친화성으로 hNGF에 결합할 수 있고, 생체내에서 인간 TrkA에 대한 hNGF의 결합을 억제할 수 있으며, 환자의 면역계에 유의적인 부작용이 없는 키메라성, 인간화된 또는 인간의 항-인간 NGF 단일클론 항체를 약학적 허용성 담체와 함께 함유하는 약학 조성물에 관한 것이다. 이 약학 조성물 중의 항체는 항체 단편, 바람직하게는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv 단편, 다이아바디(diabody), 1본쇄 항체 분자로 구성된 그룹 중에서 선택되는 항체 단편 또는 항체 단편들로부터 제조된 다특이성 항체일 수 있다.
- [0027] 일 구체예에 있어서, 항체는 양특이성(bispecific) 항체이다. 이 양특이성 항체는 천연의 인간 IgE 또는 천연의 인간 TNF 또는 천연의 인간 TNF 수용체에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0028] 다른 구체예에 있어서, 약학 조성물은 다른 약학적 활성 성분, 예컨대 염증 증상의 치료에 적합한 성분을 추가로 함유한다. 염증 증상은 천식, 다발성경화증, 관절염, 홍반루푸스 및 건선으로 구성된 그룹 중에서 선택되는 것이 바람직하다. 다른 구체예에서, 상기 염증 증상은 천식이다. 또 다른 구체예에서, 상기 염증 증상은 관절염, 바람직하게는 류마티스관절염이다. 또 다른 구체예에서, 상기 염증 증상은 건선이다.
- [0029] 한편, 본 발명은 용기와, 나노물 범위의 친화성으로 hNGF에 결합할 수 있고 생체내에서 인간 TrkA에 대한 hNGF의 결합을 억제할 수 있으며 환자의 면역계에 유의적인 부작용이 없는 키메라성, 인간화된 또는 인간의 항-인간 NGF 단일클론 항체와 함께 약학적 허용성 담체를 함유하는 약학 조성물과, 인간 환자의 NGF 관련 질환을 제어하기 위하여 당해의 조성물을 사용하는 데에 관한 지침서를 포함하는 제조 물품에 관한 것이다.
- [0030] 일 구체예에 있어서, 상기 제조 물품은 다른 약학적 활성 성분, 바람직하게는 염증성 증상의 치료에 적합한 성분을 추가로 포함한다. 이 염증성 증상은, 천식, 다발성경화증, 관절염, 홍반루푸스 및 건선으로 구성된 그룹

중에서 선택되는 것이 바람직하다.

**발명의 효과**

[0031] 본 발명은 치료적 유효량의 항-NGF 단일클론 항체(항체 911)의 생체내 투여가 알리지 실험 마우스 모델에서 면역계에 어떤 부작용도 미치지 않는다는 예기치 않은 발견에 기초한 것이다. 따라서, 상기 항체 및 이와 관련된 항체는 인간 환자들의 천식을 비롯한 NGF 관련 질환을 치료하는데 높은 전망이 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0032] 도 1은 NGF/NT-3 키메라성 돌연변이체에 대한 6가지 항-NGF MAb의 결합능을 요약한 것이다. NGF/NT3 돌연변이체에 대한 각 MAb의 상대적 결합율을 야생형 hNGF의 결합율과 비교하였다: (-), <10%; (+), 10 내지 30%; (++) , 30 내지 60%; (+++), 60 내지 100%. hNGF에 대한 결합율을 나타내는 각 MAb의 EC<sub>50</sub>은 다음과 같다: MAb 908, 1.8x10<sup>-10</sup>M; MAb 911, 3.7x10<sup>-10</sup>M; MAb 912, 1.8x10<sup>-10</sup>M; MAb 938, 7.4x10<sup>-10</sup>M; MAb 14.14, 5.9x10<sup>-10</sup>M.

도 2a 내지 2f는 야생형 및 돌연변이 hNGF에 대한 MAb의 결합능을 도시한 것이다. 2 내지 5회의 독립된 ELISA 작업에서 취득한 각 돌연변이체의 평균 EC<sub>50</sub> 값을 야생형 NGF 결합능에서 취득된 EC<sub>50</sub> 값과 비교하였다. EC<sub>50</sub> 값은 칼레이다그래프 소프트웨어 프로그램(Abelbeck Software)을 사용하여 선형회귀분석(칭량 안됨)을 통해 측정하였다. MAb 결합능이 최소 2배 감소된 돌연변이체는 빗금친 막대로 표시하고 이에 기여한 잔기는 표시하였다.

도 2a는 야생형 및 돌연변이 NGF에 대한 MAb 908의 결합능을 도시한 것이다.

도 2b는 야생형 및 돌연변이 NGF에 대한 MAb 909의 결합능을 도시한 것이다.

도 2c는 야생형 및 돌연변이 NGF에 대한 MAb 911의 결합능을 도시한 것이다.

도 2d는 야생형 및 돌연변이 NGF에 대한 MAb 912의 결합능을 도시한 것이다.

도 2e는 야생형 및 돌연변이 NGF에 대한 MAb 938의 결합능을 도시한 것이다.

도 2f는 야생형 및 돌연변이 NGF에 대한 MAb 14.14의 결합능을 도시한 것이다.

도 3a 내지 3f는 항-NGF MAb 908, 909, 911, 912, 938 및 14.14 각각의 NGF에 대한 MAb 에피토프 분자 모델을 도시한 것이다. 밝은 회색 및 중간 회색 표시는 NGF의 각 단량체를 구분한 것이고, MAb 결합에 영향을 미치는, ELISA로 확인된 잔기는 검은 색으로 표시하였다. 도 3a에서는 각 가변 영역을 표시하였다.

도 4a 및 4b는 비환원 hNGF(A) 및 환원 hNGF(B)에 대한 항-NGF MAb 결합능의 면역블롯 분석을 도시한 것이다. 제1 레인은 가시화된 분자량 마커이다. 완충액과 음성 대조용 항체는 각각 레인 2와 3에 도시하였다. 비환원 조건하에, 정제된 hNGF는 단량체, 이량체 및 부분 가공된 이량체 hNGF에 반응하는 것으로 나타나는 3개의 밴드 세트로서 진행되었다.

도 5는 MAb 에피토프 맵핑 결과를 요약한 것이다.

도 6은 항-NGF MAb에 의해 억제된 Trk-IgG 수용체 면역부착소에 대한 hNGF의 결합능을 도시한 것이다.

도 7은 p75-IgG 면역부착소에 대한 hNGF의 결합을 억제하는 항-NGF MAb의 능력을 도시한 것이다.

도 8은 트랜스펙션된 CHO 세포에서 발현된 TrkA 세포외 도메인에 대한 hNGF의 결합을 억제하는 항-NGF MAb의 능력을 도시한 것이다. 타이로신 인산화의 억제는 항포스포타이로신 MAb를 사용하여 ELISA로 측정하였다.

도 9는 배아기 래트의 배근 신경절 뉴런에 미치는 hNGF의 생존 효과를 억제하는 항-NGF MAb의 능력을 도시한 것이다. 최대 생존능은 NGF 단독에 의해 취득되는 시그널에 근거하여 얻고 최대 억제능은 포화 농도의 가용성 TrkA-IgG 첨가 시 취득되는 시그널을 통해 측정하였다.

도 10은 항-NGF MAb 911에 의한 처리가 오브알부민에 대한 면역반응을 크게 증가시키지 않음을 입증하는 도면이다.

도 11은 병아리 감마 글로불린을 이용한 면역화 후 항-NGF MAb 911로 처리한 경우 면역반응이 크게 감소하지 않

음을 입증하는 도면이다.

도 12는 항-NGF MAb 911로의 처리에 의해 NGF 유도성 열과민증이 차단됨을 입증하는 도면이다.

도 13은 민감화된 C57/BL6 마우스(SN)에서, 항-NGF MAb 911의 처리로 인해, 흡입된 먼지 진드기 항원의 투여 후 기도 과다반응이 억제됨을 입증하는 도면이다.

도 14는 민감화된 C57/BL6 마우스(SN)에서 항-NGF MAb의 처리가, 흡입된 먼지 진드기 항원 투여 후 BAL로의 백혈구, 림프구 및 호산구의 침윤을 감소시킴을 입증하는 도면이다.

도 15는 항-NGF MAb 처리된 민감화된 마우스에서, BAL로의 세포 침윤은 감소되는 반면 호산구의 비율은 높게 유지됨을 입증하는 도면이다.

도 16은 항-NGF MAb 911 처리가 항원 투여 후 BAL 내의 IL-13 증가를 감소시킴을 입증하는 도면이다.

도 17은 알러겐에 대한 염증성 반응의 감소능에도 불구하고 항-NGF MAb 처리가, 먼지 진드기에 대한 총 혈청 면역글로불린 역가로 측정되었듯이, 체액 면역반응을 감소시키지 않음을 입증하는 도면이다.

도 18은 항-NGF MAb 처리가 또한 IgE의 총 혈청 내 농도를 감소시키지 않음을 입증하는 도면이다.

도 19는 NGF 처리가 삼차신경절 내의 CGRP 농도를 증가시키는 반면, 항-NGF MAb 처리가 CGRP 농도를 감소시킴을 입증하는 도면이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0033] 바람직한 구체예의 상세한 설명

[0034] A. 정의

[0035] 다르게 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 기술 용어와 과학 용어는 본 발명이 속하는 당해 기술분야에 통상적인 기술을 가진 자가 일반적으로 이해하는 것과 같은 의미를 갖는다. [예컨대, Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J.Wiley & Sons (New York, NY 1994); Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989) 참조]. 당업자라면, 본 명세서에 기술된 것과 유사하거나 동등한 다수의 방법과 재료가 본 발명을 실시하는데 사용될 수 있음을 잘 알고 있을 것이다. 실제로, 본 발명은 기술된 방법과 재료에만 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 목적상, 다음과 같은 용어는 다음과 같은 의미를 갖는다.

[0036] 본 명세서에 사용된 "신경성장인자" 및 "NGF"는 인간을 비롯한 모든 포유동물 중의 천연 서열 NGF를 의미하는 것이다.

[0037] "NGF 수용체"는 NGF에 의해 결합되거나 활성화되는 폴리펩타이드를 의미한다. NGF 수용체로는 인간을 비롯한 모든 포유동물 중의 TrkA 수용체 및 p75 수용체가 있다.

[0038] NGF 또는 임의의 다른 폴리펩타이드와 함께 사용된 "천연 서열"이란 용어는 그 제조 방식에 관계없이 천연에서 유래하는 해당 폴리펩타이드와 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 의미한다. 이와 같은 천연 서열의 폴리펩타이드는 천연에서 분리하거나, 또는 재조합 및/또는 합성 수단 또는 이의 조합 수단을 통해 획득할 수 있다. "천연 서열"이란 용어는 구체적으로 천연 발생의 절두형 또는 분비형 형태(예컨대, 세포외 도메인 서열), 천연 발생의 변형체 형태(예컨대, 선택적으로 스플라이싱된 형태) 및 전장 폴리펩타이드들의 천연 발생적 대립 유전자 변형체를 포함한다.

[0039] "항체(Ab)" 및 "면역글로불린(Ig)"은 구조 특성이 동일한 당단백질이다. 항체는 특정 항원에 대한 결합 특이성을 나타내지만, 면역글로불린은 항체와, 항원 특이성이 부족한 다른 항체 유사 분자를 모두 포함한다. 면역글로불린 종류에 속하는 폴리펩타이드는 예를 들어 림프계에서 낮은 농도로 생산되고 골수종에서는 증가된 농도로 생산되어진다.

[0040] "천연 항체 및 면역글로불린"은 통상적으로 2개의 동일한 경쇄(라이트체인)(L)와 2개의 동일한 중쇄(헤비체인)(H)로 이루어진, 약 150,000 달톤의 이종사량체 당단백질이다. 각각의 경쇄는 하나의 공유 다이설피드 결합에 의해 중쇄에 결합되어 있지만, 다이설피드 결합의 수는 다른 면역글로불린 이소타입의 중쇄 마다 다르다. 또한, 각 중쇄와 경쇄는 규칙적으로 이격된 사슬내 다이설피드 가교를 갖고 있다. 각 중쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인(VH)과 그 다음 다수의 불변 도메인을 갖고 있다. 각 경쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인(VL)과 다른쪽 말단에

불변 도메인을 갖고 있고; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되어 있고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬되어 있다. 이러한 경쇄와 중쇄의 가변 도메인들 사이의 계면은 특정 아미노산 잔기들로 구성된다고 생각되고 있다(Chothia et al., J.Mol.Biol. 186:651 [1985]; Novotny and Haber, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 82:4592 [1985]; Chothia et al., Nature 342: 877-883 [1989]).

- [0041] "가변"이란 용어는 가변 도메인 특정 부분의 서열이 항체들 간에 극도로 상이하여 특정 항원에 대한 각각의 특정 항체들의 결합능과 특이성에 사용된다는 사실을 의미하는 것이다. 하지만, 가변능은 항체의 가변 도메인 전체에 균일하게 분포되어 있지 않다. 가변능은 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 모두에 있어서 상보성 결정 영역(CDR) 또는 과가변(hypervariable) 영역이라 불리는 3개의 분절에 집중되어 있다. 가변 도메인 중 보다 고도로 보존되는 부분은 골격(FR)이라 부른다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인들은, 각각 주로  $\beta$  시이트 형태를 띠면서, 이  $\beta$  시이트 구조를 연결하는 루프를 형성하고 일부 경우에는  $\beta$  시이트 구조의 일부를 형성하는, 3개의 CDR에 의해 연결된 4개의 FR 영역을 포함한다. 각 사슬내의 CDR들은 이 FR 영역들에 의해 근접하게 함께 모여지고, 다른 사슬의 CDR과 함께 항체의 항원 결합 부위 형성에 관여한다(상기 Kabat et al.(1991) 문헌 참조). 불변 도메인은 항원에 대한 항체의 결합에 직접적으로 관여하지는 않지만 다양한 이펙터(effector) 기능, 예컨대 항체 의존적 세포 독성 작용에 대한 항체의 개입 등을 나타낸다.
- [0042] 파파인에 의한 항체 분해는 각각 단일 항원 결합 부위를 가진 "Fab" 단편이라 불리는 2개의 동일한 항원 결합 단편과, 쉽게 결정화하는 성질을 반영하는 이름을 가진 나머지 "Fc" 단편을 생산한다. 펩신 처리는 2개의 항원 결합 부위를 갖고 있어 항원에 여전히 교차결합할 수 있는  $F(ab')_2$  단편을 생산한다.
- [0043] "Fv"는 완전한 항원 인식 및 결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 2본쇄 Fv 중인 경우, 이 영역은 하나의 중쇄 가변 도메인과 하나의 경쇄 가변 도메인이 빈틈없이 비공유 회합되어 있는 이량체로 이루어진다. 1본쇄 Fv 중인 경우에는, 하나의 중쇄 가변 도메인과 하나의 경쇄 가변 도메인은 이 경쇄와 중쇄가 2본쇄 Fv 중과 유사한 "이량체" 구조로 회합할 수 있도록 유연한 펩타이드 링커를 통해 공유결합될 수 있다. 이것이 각 가변 도메인의 3개의 CDR들이 상호작용하여 VH-VL 이량체 표면 상의 항원 결합 부위를 한정할 수 있는 형태이다. 종합하면, 6개의 CDR들이 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 하지만, 하나의 가변 도메인(또는 항원 특이성이 있는 3개의 CDR만을 함유하는 Fv의 절반)은 전체 결합 부위 보다는 훨씬 낮은 친화성이지만 항원을 인식하여 항원에 결합하는 능력을 갖고 있다.
- [0044] Fab 단편 역시 경쇄의 불변 도메인과 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체의 힌지(hinge) 영역 유래의 1 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 있는 소수 잔기가 첨가되어 있어 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기가 유리 티올(thiol) 기를 보유하고 있는 Fab'에 대한 본 명세서에서 제시된 표현이다.  $F(ab')_2$  항체 단편은 본래 Fab' 단편의 쌍으로서 생산되어졌는데, 그 쌍 사이에 힌지 시스테인을 갖는다. 또한, 항체 단편의 다른 화학적 커플링에 대해서도 알려져 있다.
- [0045] 모든 척추동물 중 유래의 항체(면역글로불린)의 "경쇄"는 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라서  $\kappa$ 와  $\lambda$ 로 불리는 2개의 분명히 다른 종류 중 하나로 이루어질 수 있다.
- [0046] 중쇄의 불변 도메인을 구성하는 아미노산 서열에 따라서, 면역글로불린은 여러 부류로 나뉘어질 수 있다. 면역글로불린에는 5가지 주요 부류가 있다. 즉 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이며, 이 중 몇 개는 아류(이소타입), 예컨대 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub>, 및 IgA<sub>2</sub>로 추가 분류될 수 있다. 면역글로불린의 다른 부류에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  및  $\mu$ 라 불린다. 다른 부류의 면역글로불린들이 가진 서브유닛 구조와 3차원 형태는 잘 알려져 있다.
- [0047] "항체"라는 용어는 구체적으로 항체 단편 클론을 비롯하여 단일클론 항체를 포함하는 것이다.
- [0048] "항체 단편"은 완전 항체의 일부, 통상적으로 완전 항체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab',  $F(ab')_2$ , Fv 단편; 다이아바디; 1본쇄 Fv(scFv) 분자를 비롯한 1본쇄 항체 분자; 및 항체 단편들로부터 구성된 다특이성 항체, 예컨대 양특이성 항체가 있다.
- [0049] 본 명세서에 사용된 "단일클론 항체"란 용어는 실질적으로동종인 항체 집단에서 수득된 항체(또는 항체 단편)를 의미하는 것으로서, 즉 상기 집단을 구성하는 각 항체는 소량으로 존재할 수 있는, 가능한 천연발생의 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 단일클론 항체는 고도 특이성이어서, 단일 항원 부위에 대하여 지향성이다. 또한, 여러 결정인자(에피토프)들에 대하여 지향성인 여러 항체를 포함하는 것이 전형적인, 종래의(다클론)(폴리클로날) 항체 제제와는 대조적으로, 각 단일클론 항체는 항원 상에 존재하는 하나의 결정인자에

대해서만 지향성이다. 이러한 특이성 외에도, 단일클론 항체는 하이브리도마 배양물에 의해 합성되고 다른 면역글로불린에 의해 오염되어 있지 않다는 점에서 유리하다. 수식어구 "단일클론성"은 실질적으로 동종의 항체 집단에서 수득되는 것으로서 항체의 특성을 시사하는 것이지, 임의의 특정 방법에 의한 항체 생산을 필요로 하는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 단일클론 항체는 콜러 등(Kohler et al., Nature, 256:495 (1975))에 의해 최초로 개시된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있고, 또는 재조합 DNA 방법(예컨대, 미국 특허 제4,816,567호 참조)에 의해 제조될 수도 있다. 또한, 단일클론 항체는 예를 들어 클랙슨 등(Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991))과 막스 등(Marks et al., J.Mol.Biol., 222:581-597(1991))에 기술된 기법을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 분리한 항체 단편을 함유하는 항원 인식 및 결합 부위의 클론(Fv 클론)도 포함한다.

[0050] 본 명세서에 기술된 단일클론 항체는 구체적으로, 필요한 생물학적 활성을 나타내는 한, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 중 유래의 항체에 존재하는 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이거나 또는 특정 항체 클래스 또는 항체 서브클래스에 속하는 것인 반면, 사슬의 나머지는 다른 중 유래의 항체에 존재하는 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이거나 또는 다른 항체 클래스 또는 항체 서브클래스에 속하는 것인 "키메라" 항체(면역글로불린), 뿐만 아니라 이 항체의 단편을 포함한다(미국 특허 제4,816,567호, Cabilly et al.; Morrison et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 81:6851-6855 [1984]).

[0051] 비인간(예컨대 무인) 항체의 "인간화" 형태는 비인간 면역글로불린 유래의 최소 서열을 함유하는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 사슬 또는 이의 단편(예컨대, Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 또는 항체의 다른 항원 결합 준서열(subsequence))이다. 대부분 인간화 항체는 수령자(receipt)의 상보성 결정 영역(CDR) 유래의 잔기가 목적인 특이성, 친화성 및 능력을 가진 마우스, 래트 또는 래빗과 같은 비인간 종(공급자 항체)의 CDR 유래의 잔기로 치환된 인간 면역글로불린(수령자 항체)이다. 몇몇 경우에는, 인간 면역글로불린의 Fv 골격 영역(FR) 잔기가 상응하는 비인간 잔기로 치환되기도 한다. 또한, 인간화 항체는 수령자 항체 또는 치환된 CDR이나 골격 서열에서는 전혀 발견되지 않는 잔기를 함유할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 더욱 개량하여 최적화하기 위한 것이다. 일반적으로, 인간화 항체는 모든 또는 거의 모든 CDR 영역이 비인간 면역글로불린의 CDR 영역에 상응하고 모든 또는 거의 모든 FR 영역이 인간 면역글로불린 서열의 FR 영역인, 적어도 하나, 통상적으로 2개의 가변 도메인을 거의 모두 함유하는 것이다. 인간화 항체는 또한 면역글로불린 불변 영역(Fc), 전형적으로 인간 면역글로불린의 불변 영역 중 적어도 일부분을 포함하는 것이 가장 바람직하다. 더욱 상세한 설명은 다음과 같은 문헌을 참조할 수 있다(Jones et al., Nature, 321:522-525(1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-329(1988); Presta, Curr.Op.Struct.Biol., 2:593-596(1992); 및 Clark, Immunol.Today 21:397-402(2000)). 인간화 항체로는, 항체의 항원 결합 영역이 마카카(macaque) 원숭이를 관심의 항원으로 면역화시켜 생산한 항체에서 유래한 것인, Primatized™ 항체가 있다.

[0052] "1본쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하되, 이 도메인들이 단일 폴리펩타이드 사슬에 존재하는 것이다. 일반적으로, scFv 폴리펩타이드는 상기 VH 및 VL 도메인 사이에 폴리펩타이드 링커를 추가로 함유하여, scFv가 항원 결합에 바람직한 구조를 형성할 수 있도록 한다. scFv에 대해서는 다음과 같은 문헌을 통해 제검토해 볼 수 있다: Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315(1994), Dall'Acqua and Carter, Curr.Opin.Struct.Biol. 8:443-450(1998), 및 Hudson, Curr.Opin.Immunol. 11:548-557(1999).

[0053] "다이아바디(diabody)"란 용어는 2개의 항원 결합 부위를 가진 작은 항체 단편을 의미하는 것인데, 이 단편들은 동일한 폴리펩타이드 사슬에 존재하는 중쇄 가변 도메인(VH)와 이에 연결된 경쇄 가변 도메인(VL)을 함유한다(VH-VL). 이 도메인들은 동일한 사슬 상의 두 도메인 사이에서 쌍을 이루기에는 매우 짧은 링커를 사용함으로써, 다른 사슬의 보체성 도메인들과 쌍을 이루어 2개의 항원 결합 부위를 형성할 수 있다. 다이아바디에 대한 보다 상세한 내용은 예를 들어 다음과 같은 문헌에 설명되어 있다: EP404,097; WO 93/11161; 및 Hollinger et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90:6444-6448(1993).

[0054] "분리된" 항체는 천연 환경의 성분으로부터 동정되어 분리되고(또는) 회수된 것이다. 천연 환경의 오염 성분은 상기 항체의 진단 또는 치료 용도에 방해가 되는 물질로서, 효소, 호르몬 및 다른 단백질 또는 비단백질 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 구체예에 있어서, 항체는 (1) 로우리법으로 측정했을 때 95 중량% 초과 항체, 가장 바람직하게는 99 중량% 초과 항체로 정제되거나, (2) 회전 컵 서열분석기(spining cup sequenator)의 사용으로 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개 잔기를 수득하기에 충분한 정도로 정제되거나 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 이용한 환원 또는 비환원 조건하에서의 SDS-PAGE를 통해 동종으로 정제될

수 있다. 분리된 항체는 그 항체의 천연 환경의 적어도 1종의 성분도 존재하지 않는 재조합 세포 동일체 내의 항체도 포함한다. 하지만, 분리된 항체는 통상적으로 적어도 1 이상의 정제 단계를 통해 제조된 것이다.

- [0055] "중화 항체"는 이것이 결합하는 표적 항원의 이펙터 기능을 차단하거나 또는 유의적으로 감소시킬 수 있는 항체 분자를 의미한다. 따라서, "중화" 항-NGF 항체는 NGF의 이펙터 기능, 예컨대 수용체 결합 및/또는 세포 반응의 유인 기능을 차단 또는 유의적으로 감소시킬 수 있다. "유의적" 감소는 표적 항원(예, NGF)의 이펙터 기능이 적어도 약 60%, 바람직하게는 적어도 약 70%, 보다 바람직하게는 적어도 약 75%, 보다 더 바람직하게는 적어도 약 80%; 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 85%, 가장 바람직하게는 적어도 약 90% 감소되는 것을 의미한다.
- [0056] 항체는, 리간드가 수용체에 결합하는 능력의 감소를 객관적으로 측정할 수 있을 때, 수용체에 대한 리간드의 "결합을 억제"할 수 있는 것이다.
- [0057] "에피토프"라는 용어는 단백질 항원 상에 존재하는 항체(단일클론 또는 다클론 항체)의 결합 부위를 의미하는 것이다.
- [0058] 특정 에피토프에 결합하는 항체는 "에피토프 맵핑"를 통해 확인할 수 있다. 단백질 상에 존재하는 에피토프들의 위치를 맵핑하고 특성 규명하는 방법으로는 당해 기술분야에 공지된 다수의 방법이 있는데, 그 예로는 예시적 문헌 [Harlow and Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999]의 11장에 기술된 바와 같은 항원-항체 복합체의 결정 구조 해명법, 경쟁 분석법, 유전자 단편 발현 분석법 및 합성 펩타이드에 근거한 분석법 등이 있다. 경쟁 분석법은 이하에 논의되어 있다. 유전자 단편 발현 분석법에 따르면, 단백질을 암호화하는 오픈 리딩 프레임이 무작위 또는 특정 유전자 구성에 따라 단편화되고, 그 단백질의 발현 단편과 시험 항체와의 반응성이 측정되어진다. 이 유전자 단편은 예를 들어 PCR에 의해 생산된 뒤 시험관내에서 전사되고 방사능 아미노산의 존재하에 단백질로 해독될 수 있다. 그 다음, 방사능 표지된 단백질 단편에 대한 항체의 결합은 면역침전 및 겔 전기영동을 통해 측정한다. 또한, 특정 에피토프는 과지 입자의 표면에 표현되는 무작위 펩타이드 서열들의 대규모 라이브러리(과지 라이브러리)를 사용하여 확인할 수 있다. 대안 방법으로, 중복성 펩타이드 단편들의 한정적 라이브러리를, 간단한 결합 분석으로 시험 항체에 대한 결합성에 대하여 테스트할 수 있다. 이 후자의 방법은 약 5 내지 15개 아미노산으로 이루어진 선형 에피토프를 규명하는데 적합하다.
- [0059] 항체는, 두 항체가 동일하거나 입체적으로 중복성인 에피토프를 인식할 때, 참조 항체와 "본질적으로 동일한 에피토프"에 결합한다. 두 에피토프가 동일하거나 입체적으로 중복성인 에피토프에 결합하는지를 측정하는 방법 중 가장 널리 사용되고 신속한 방법은 경쟁 분석법으로서, 이 분석법은 표지된 항원이나 표지된 항체를 사용하여 상이한 형식의 모든 수로 배열될 수 있다. 보통, 항원이 96웰 평판에 고정되고 방사능 또는 효소 표지를 사용하여, 표지된 항체의 결합을 차단하는 미표지 항체의 능력을 측정한다.
- [0060] 본 명세서에 사용된 아미노산 또는 아미노산 잔기라는 용어는 이하에 변형체와 관련하여 보다 상세히 설명되는 바와 같이 천연 발생의 L 아미노산 또는 D 아미노산을 의미한다. 아미노산에 일반적으로 사용되는 1문자 및 3문자 약어를 본원에서도 사용하였다(Bruce Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing, Inc., New York(3d ed., 1994)).
- [0061] "변형체"는 동일한 생물학적 활성을 보유하지만 일부 측면이 천연 항체와 상이한 항체이다. 변형체는 천연 항체의 서열에 존재하는 1 또는 그 이상의 아미노산 잔기가 삽입, 결실, 변형 및/또는 치환된 결과로서 천연 항체의 서열과 상이한 아미노산 서열을 가질 수 있다. 변형체는 천연 항체와 상이한 글리코실화 패턴을 가질 수 있다. 또한, 변형체는 공유적으로 변형된 천연 항체일 수 있다.
- [0062] "장애"란, 본 발명의 따른 치료로 이익을 얻는 모든 증상이다. "장애" 및 "증상"은 본원에서 상호교환적으로 사용되는 것으로, 포유동물에 대한 당해 장애의 근원이 되는 병리적 증상을 비롯하여 만성 및 급성 장애나 질환을 포함한다. 본원에서 치료되는 장애의 예로는 홍반루푸스, 접촉 피부염, 습진, 대상포진, 대상포진후 신경통, 통각과민, 만성통증, 과민대장질환, 크론병, 결장염, 방광염, 다발성경화증, 천식, 건선 및 만성관절염과 류마티스관절염을 포함하는 관절염 등이 있으며, 이것에 국한되는 것은 아니다. 본 발명에 따라 치료되는 장애 중 바람직한 것은, 염증성 증상, 예컨대 천식, 다발성경화증, 관절염, 홍반루푸스 및 건선이 있다.
- [0063] "염증성 증상"이란, 통증, 열, 적변화, 종창 및 기능 상실 중 하나 이상을 특징으로 하는 증상으로서, 조직 상해, 감염, 자극 또는 손상과 관련이 있다.
- [0064] "질환 상태"라는 용어는 세포 또는 체 기능 시스템 또는 기관의 방해, 중지 또는 장애가 발생해 있는 세포 또는

포유동물 전체의 생리학적 상태를 의미한다.

- [0065] "유효량" 또는 "치료적 유효량"이란 용어는 포유동물의 질환, 장애 또는 바람직하지 않은 생리학적 증상을 치료 및/또는 예방하기에 효과적인 약물의 양을 의미한다. 본 발명에 있어서, 항-NGF 항체의 "유효량"은 루푸스, 다발성경화증, 천식, 건선 또는 관절염과 같은 장애의 개시를 방지, 감소, 지연시킬 수 있고; 루푸스, 다발성경화증, 천식, 건선 또는 관절염과 같은 장애의 발달을 감소, 방지 또는 억제(즉, 약간 지연시키고 바람직하게는 중지시킴)하며; 및/또는 이러한 장애와 관련된 1 이상의 증후군을 어느 정도 경감시킬 수 있다.
- [0066] 본 발명의 방법에 있어서, "제어"라는 용어와 이의 문법적 변형어는 바람직하지 않은 사건, 예컨대 생리학적 증상, 예컨대 천식과 같은 장애와 관련된 염증성 반응의 예방, 부분 또는 완전 억제, 감소, 지연 또는 지체를 의미하는 것이다.
- [0067] "치료" 또는 "치료하다"란 용어는 치료적 처리 및 예방 또는 방어적 처치를 모두 의미하는 것이다. 치료를 요하는 환자는 이미 장애를 가진 환자 뿐만 아니라 그 장애를 갖기 쉽거나 그 장애가 방지되어야 하는 환자를 포함한다. 본 발명의 목적상, 유리하거나 바람직한 임상 결과는, 검출 또는 미검출의 여부에 관계없이 증후군의 경감, 질환의 정도 감소, 안정화된(즉, 악화되지 않는) 질환 상태, 질환 진행의 지연 또는 지체, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 경감(부분적이든 전체적이든지에 관계없이)을 포함하며, 이것에 국한되는 것은 아니다. "치료"는 또한 치료받지 않은 경우 예상 생존능에 비해 연장된 생존능을 의미할 수 있다. 치료를 요하는 환자는 이미 증상이나 장애가 있는 환자 뿐만 아니라 증상이나 장애를 갖기 쉬운 환자 또는 증상이나 장애가 예방되어야 하는 환자를 포함한다.
- [0068] 면역계에서의 "유의적인 부작용"은 면역계를 타협시키고(또는) 항원 투여에 대한 정상적인 면역 반응을 억제하는 효과이다. 면역계에 미치는 유의적인 부작용의 예는 체액 면역반응의 감소일 수 있다.
- [0069] "약학적 허용성" 담체, 부형제 또는 안정화제는 이용된 투여량 및 농도에서 노출된 세포 또는 포유동물에 비독성인 것이다. 생리적 허용성 담체는 흔히 수성 pH 완충 용액이다. 생리적 허용성 담체의 예로는 인산염, 구연산염 및 다른 유기산과 같은 완충액; 아스코르브산을 비롯한 산화방지제; 저분자량(약 10개 잔기 미만)의 폴리펩타이드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리산, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 라이신; 단당류, 이당류 및 다른 탄수화물, 예컨대 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당 알코올, 예컨대 만니톨 또는 소르비톨; 염 형성 반대이온, 예컨대 나트륨; 및/또는 비이온 계면활성제, 예컨대 TWEEN™, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 PLURONICS™ 가 있다.
- [0070] "리포솜"은 약물(예컨대, 본 명세서에 개시된 항-NGF 항체 및 선택적으로, 화학치료제)을 포유동물에게 전달하기에 유용한 다양한 종류의 지질, 인지질 및/또는 계면활성제로 이루어진 작은 소포이다. 리포솜의 성분들은 일반적으로 생물학적 막의 지질 배열과 유사한 이중층 형태로 배열되어 있다.
- [0071] "패키지 삽입물"은 치료용 제품의 상업용 패키지에 통상적으로 포함되는 지침서를 의미하는 것으로서, 징후, 사용법, 투여량, 투여방법, 금기사항 및/또는 이 치료 제품의 사용에 관한 주의사항에 대한 정보를 포함하고 있다.
- [0072] 치료용 "포유동물"은 인간, 가축 및 농장 동물과, 동물원, 스포츠 또는 애완용 동물, 예컨대 개, 말, 고양이, 소 등을 비롯한 포유동물로서 분류되는 모든 동물을 의미한다. 바람직하게는, 포유동물이 인간인 것이다.
- [0073] **B. 발명을 실시하는 방법**
- [0074] 이하에 보다 상세하게 설명되는 바와 같이, 천식에 걸린 마우스 모델에 항-NGF 단일클론 항체 911을 투여한 결과, 기도 과민반응 및 염증의 정도는 감소시켰지만, 총 혈청 면역글로불린 농도 및 IgE의 혈청 농도를 통해 측정되는 바와 같은 흡입된 항원에 대한 체액 면역반응을 감소시키지는 않았다.
- [0075] 항-NGF 항체는 당해 기술분야에 공지된 것이다. 본 발명에 유용한 항-NGF 항체는 다클론 항체, 단일클론 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 양특이성 항체, 이중접합성 항체 및 항체 단편, 뿐만 아니라 변형 항체, 예컨대 항체의 글리코실화 변형체, 항체의 아미노산 서열 변형체 및 공유적으로 변형된 항체를 포함한다. 이러한 항체들은 당해 기술분야에 공지된 임의의 방법으로 제조할 수 있다.
- [0076] 즉, 단일클론 항체는 콜러 등(Kohler et al., Nature, 256: 495(1975))에 의해 최초로 개시된 하이브리도마 방법 또는 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,567호)을 이용하여 제조할 수 있다.

[0077] 간략히 설명하면, 하이브리도마 방법에서는 먼저 면역화에 사용된 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하거나 그 항체를 생산할 수 있는 림프구를 유도해내기 위해 마우스 또는 다른 적당한 숙주 동물, 예컨대 햄스터 또는 마카커 원숭이를 면역화시킨다. 대안 방법으로, 림프구를 시험관내에서 면역화시킬 수도 있다. 그 다음, 림프구를 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적당한 용해제를 이용하여 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성시킨다(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103, [Academic Press, 1986]). 이와 같이 제조된 하이브리도마 세포를, 비융합된 골수종 모세포의 성장이나 생존을 억제하는 1 이상의 물질을 함유하는 것이 바람직한 적당한 배양 배지에 접종하여 증식시킨다. 예를 들어, 골수종 모세포에 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제(HGPRT 또는 HPRT) 효소가 없다면, 이 하이브리도마의 배양 배지에는 HGPRT 결손형 세포의 증식을 억제하는 물질인 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 첨가한다(HAT 배지). 바람직한 골수종 세포주는 뮤린 골수종 세포주로서, 예컨대 미국 캘리포니아 산디에고에 소재하는 솔크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터(Salk Institute Cell Distribution Center)에서 입수가 가능한 MOP-21 및 MC-11 마우스 종양 유래의 세포주 및 미국 매릴랜드 록빌에 소재하는 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection)에서 입수가 가능한 SP-2 또는 XG3-Ag8-653 세포가 있다. 인간 단일클론 항체 생산을 위하여 인간 골수종 세포주 및 마우스-인간 이형접합골수종 세포주도 개시된 바 있다(Kozbor, *J.Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp.51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, [1987]). 그 다음으로, 하이브리도마 세포를 증식시킨 배양 배지를 사용하여, 항원에 대하여 지향성인 단일클론 항체를 생산하는지 분석한다. 하이브리도마 세포에 의해 생산되는 단일클론 항체의 결합 특이성은 면역침전법 또는 시험관내 결합 분석법, 예컨대 방사능면역분석법(RIA) 또는 효소 결합된 면역흡착제 분석법(ELISA)으로 측정하는 것이 바람직하다. 단일클론 항체의 결합 친화성은 예컨대 문선 등(Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220(1980))의 스캐차드(Scatchard) 분석법으로 측정할 수 있다. 목적인 특이성, 친화성 및/또는 활성의 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 동정한 후, 그 세포를 한계희석법(limiting dilution)으로 서브클로닝하고 표준 방법으로 증식시킬 수 있다(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). 서브클론에 의해 분비된 단일클론 항체는 예컨대 프로테인 A-세파로즈, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피 등의 통상적인 면역글로불린 정제 절차를 이용하여 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 분리하는 것이 적당하다.

[0078] 이 항체의 재조합 생산에는 항체 또는 항체 사슬을 암호화하는 DNA의 분리가 필요하다. 단일클론 항체를 암호화하는 DNA는 통상적인 절차(예컨대, 단일클론 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 탐침을 사용하는 방법)를 사용하여 쉽게 분리하고 서열분석할 수 있다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 공급원이다. DNA는 일단 분리하면 발현 벡터에 병입시킬 수 있으며, 그 다음 이 벡터를 이용하여 숙주 세포, 예컨대 대장균 세포, 시미안 COS 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 본래는 면역글로불린 단백질을 생산하지 않는 골수종 세포를 트랜스펙션시켜 이 재조합 숙주 세포에서 단일클론 항체를 합성시킨다. 이 DNA는 또한 변형될 수 있는데, 그 방법으로는 예컨대 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인의 암호 서열을 상동성 뮤린 서열 대신에 치환시키는 방법(Morrison, et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.* 81, 6851 (1984)) 또는 면역글로불린 암호 서열에 비면역글로불린 폴리펩타이드의 암호 서열 전체 또는 일부를 공유 접합시키는 방법이 있다. 이러한 방법을 통해, 본 명세서에 개시된 항-NGF 단일클론 항체의 결합 특이성을 가진 "키메라" 또는 "하이브리드" 항체가 제조된다.

[0079] 전형적으로, 이러한 비면역글로불린 폴리펩타이드는 본 발명의 항체 중 불변 도메인 대신에 치환되거나 또는 본 발명의 항체 중 하나의 항원 결합 부위의 가변 도메인 대신에 치환되어, 천연의 NGF 폴리펩타이드에 대한 특이성을 가진 하나의 항원 결합 부위와 다른 표적, 예컨대 고친화성 IgE 수용체 또는 TNF 수용체에 대한 특이성을 가진 다른 항원 결합 부위를 함유하는 키메라 2가 항체를 형성하게 된다. 키메라 또는 하이브리드 항체 역시 가교제를 수반하는 방법을 비롯하여 합성 단백질 화학에 공지된 방법을 사용하여 시험관내에서 제조할 수 있다. 예를 들어, 면역독소는 다이설피드 교환 반응 또는 티오에테르 결합 형성 반응을 통해 제작할 수 있다. 이러한 목적에 적합한 시약의 예로는 이미노티올레이트 및 메틸-4-머캅토부티리미데이트가 있다.

[0080] 비인간, 예컨대 뮤린 항체는 인간화될 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 비인간원 유래의 1 이상의 아미노산 잔기를 도입시킨 것이다. 이러한 비인간의 아미노산 잔기는 흔히 "수입(import)" 잔기라고 부르며, "수입" 가변 도메인에서 유래되는 것이 일반적이다. 인간화는 설치류의 CDR 또는 CDR 서열을 이에 대응하는 인간 항체 서열 대신에 치환시킴으로써, 대부분 윈터와 동료들의 방법(Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327(1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536(1988))에 따라서 실시할 수 있다.

[0081] 항원에 대한 높은 친화성과 다른 바람직한 생물학적 성질을 보유하면서 항체가 인간화되는 것이 중요하다. 이러한 목적을 위해, 바람직한 방법에 따르면 인간화 항체는 모서열과 인간화 서열의 3차원 모델을 사용하여 모서열과 다양한 유추된 인간화 산물의 분석 과정을 통해 제조되어진다. 3차원 면역글로불린 모델은 통상적으로 이용 가능하며 당업자에게 익숙한 것이다. 선발된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 형태 구조를 설명하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램도 이용가능하다. 이러한 디스플레이를 조사함으로써, 후보 면역글로불린 서열의 기능에 있어서 잔기들의 가능한 역할 분석, 즉 항원에 결합하는 후보 면역글로불린의 능력에 영향을 미치는 잔기들의 분석이 가능해진다. 이러한 방식으로, 목적한 항체 특성, 예컨대표적 항원에 대한 증가된 친화성을 가진 항체가 수득되어지도록 콘센서스(consensus) 및 수입 서열로부터 FR 잔기를 선발하여 조합할 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기는 항원 결합에 영향을 미치는데 직접적이며 가장 실질적으로 관여한다. 보다 상세한 내용은 미국 특허 제5,821,337호에 설명되어 있다.

[0082] 또한, 본 발명은 인간 항-NGF 항체를 포함한다. 전술한 바와 같이, 이러한 인간 항체는 인간 단일클론 항체 생산에 유용한 인간 골수종 또는 마우스-인간 이형접합골수종 세포주를 이용하는 하이브리도마 방법으로 제조할 수 있다(예컨대, Kozbor, J.Immunol. 133, 3001(1984), 및 Brodeur, et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, p.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York (1987)). 또한, 면역화시 내인성 면역글로불린 생산 없이 일련의 인간 항체를 생산할 수 있는 돌연변이 동물(예컨대, 마우스)을 제조하는 것도 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 배 단계 돌연변이 마우스에서 항체 중쇄 연결 영역(J<sub>H</sub>) 유전자의 동형접합 결실을 통해 내인성 항체의 생산을 완전히 억제할 수 있다고 기술된 바 있다. 따라서, 이러한 배 단계 돌연변이 마우스 내에 인간 배 단계 면역글로불린 유전자 배열의 전이는 항원 투여 시 인간 항체를 생성시킬 수 있을 것이다 [예컨대, Jakobovits et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90, 2551-2555(1993); Jakobovits et al., Nature 362, 255-258(1993)]. 이 기법의 개량 방식에 대해서는 문헌[Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156(1997)]을 참조한다.

[0083] 대안 방법으로, 비면역화된 공급자 유래의 면역글로불린 가변(V) 도메인 유전자 목록으로부터 인간 항체 및 항체 단편을 시험관내에서 생산하기 위하여 파지 표현 기법(McCafferty et al., Nature 348, 552-553 [1990])을 사용할 수 있다. 이 기법에 따르면, 항체 V 도메인 유전자는 사상 박테리오파지, 예컨대 M13 또는 fd의 주(major) 또는 부(minor) 외피 단백질 유전자 중 어느 하나에 인프레임(in-frame)으로 클로닝되어, 파지 입자의 표면에 기능적 항체 단편으로서 표현된다. 이 사상 입자는 파지 게놈의 1본쇄 DNA 카피(copy)를 함유하기 때문에, 이 항체의 기능적 성질에 근거한 선택을 통해 그 성질을 나타내는 항체를 암호화하는 유전자도 선택할 수 있게 된다. 즉, 이 파지는 B 세포의 성질 일부를 모방한다. 파지 표현은 다양한 방식으로 실시될 수 있는데, 이에 대해서는 예컨대 문헌[Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3, 564-571 (1993)]에 검토되어 있다. V 유전자 절편의 몇가지 공급원을 파지 표현에 사용할 수 있다. 클락슨 등(Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991))은 면역화된 마우스의 비장에서 유래하는 V 유전자들의 작은 무작위 조합 라이브러리로부터 항옥사졸론 항체들의 다양한 어레이(array)를 분리하였다. 면역화되지 않은 인간 공급자 유래의 V 유전자들의 목록은 제작할 수 있으며 항원(자가항원 포함)의 다양한 어레이에 대한 항체는 대부분 마크스 등(Marks et al., J.Mol.Biol. 222, 581-597 (1991)) 또는 그리피스 등(Griffiths et al., EMBO J. 12, 725-734 (1993))이 개시한 기법에 따라서 분리할 수 있다. 천연의 면역 반응에서 항체 유전자는 돌연변이를 높은 비율(체세포 과돌연변이)로 축적하고 있다. 도입된 변화 중 일부는 보다 높은 친화성을 부여하기도 하며, 이러한 고친화성 표면 면역글로불린을 표현하는 B 세포는 후속 항원 투여 동안 우선적으로 복제되고 분화된다. 이러한 천연 과정은 "사슬 셔플링(chain shuffling)"이라고 하는 기술(Marks et al., Bio/Technol. 10, 779-783 [1992])을 이용하여 모방할 수 있다. 이 방법에서, 파지 표현에 의해 수득된 "1차" 인간 항체의 친화성은 이어서 중쇄 및 경쇄 V 영역 유전자를 비면역화 공급자에서 얻은 V 도메인 유전자의 천연 발생의 변형체(목록) 목록으로 치환시켜 향상시킬 수 있다. 이러한 기술로 nM 범위의 친화성을 가진 항체 및 항체 단편을 수득할 수 있다. 특대형 파지 항체 목록("전체 라이브러리의 어머니(the mother-of-all libraries)"라고도 함)을 제조하는 기술은 문헌[Waterhouse et al., Nucl.Acids Res. 21, 2265-2266(1993)]에 기술되어 있으며, 이러한 대형 파지 라이브러리로부터 고친화성 인간 항체를 직접 분리하는 방법은 문헌[Griffiths et al., EMBO J. 13:3245-3260(1994)]에 보고되어 있다.

[0084] 또한, 유전자 셔플링은 설치류 항체로부터 인간 항체를 유도해내는데 사용할 수 있는데, 이 때 인간 항체는 출발물질인 설치류 항체와 유사한 친화성과 특이성을 갖는다. "에피토프 각인화(epitope imprinting)"라고도 불리는 이 방법에 따르면, 파지 표현 기법에서 수득된 설치류 항체의 중쇄 또는 경쇄 V 도메인 유전자가 인간 V 도메인 유전자 목록에 의해 치환되어 설치류-인간 키메라가 얻어진다. 항원을 이용한 선발을 통해, 기능적 항원

결합 부위를 복원시킬 수 있는 인간 가변 도메인을 분리할 수 있고, 즉 이 에피토프가 파트너의 선택을 지배한다(각인한다). 나머지 설치류 V 도메인을 치환시키기 위하여 이 과정을 반복하면 인간 항체가 얻어진다(1993.4.1.에 공개된 PCT 특허출원 WO 93/06213 참조). 이 기법은 CDR 접목에 의한 통상적인 설치류 항체의 인간화 기법과 달리, 설치류 기원의 골격이나 CDR 잔기를 전혀 갖지 않는 완전한 인간 항체를 제공한다.

[0085] 본 발명의 구체적으로 양특이성 항체를 제공한다. 통상적으로, 양특이성 항체의 재조합 생산은 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공동발현을 기초로 하는 것으로서, 이 때 2개의 중쇄는 특이성이 상이해야 한다(Millstein and Cuello, Nature 305, 537-539 (1983)). 보다 바람직한 다른 접근법에 따르면, 목적한 결합 특이성 (항체-항원 결합 부위)을 가진 항체 가변 도메인을 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합시킨다. 이 때, 융합에는 힌지의 적어도 일부분인, CH2 및 CH3 영역을 함유하는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인을 이용하는 것이 바람직하다. 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역(CH1)은 융합체 중 적어도 하나에 존재하는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합체 및 필요한 경우에는 면역글로불린 경쇄를 암호화하는 DNA를 다른 발현 벡터에 삽입하여 적합한 숙주 기관에 공동트랜스펙션시킨다. 이렇게 하면, 이 작체에 사용된 3가지 폴리펩타이드 사슬의 불균등한 비율로 최적의 수율을 수득하는 구체예일 때 상기 3가지 폴리펩타이드 단편의 상호 비율을 조절하기가 매우 쉬워진다. 하지만, 동등 비율의 적어도 2가지 폴리펩타이드 사슬의 발현이 높은 수율로 얻어지거나 또는 그 비율이 특별히 중요하지 않은 경우에는 하나의 발현 벡터에 2가지 또는 3가지 폴리펩타이드 사슬 모드의 암호 서열을 삽입하는 것도 가능하다. 양특이성 항체 생산에 관한 보다 상세한 설명은 예컨대 문헌 [Suresh et al., Methods in Enzymology 121, 210(1986)]을 참조할 수 있다.

[0086] 이형접합성 항체 역시 본 발명의 범위에 속하는 것이다. 이형접합성 항체는 2개의 공유 연결된 항체로 이루어진 것이다. 이 항체는, 예를 들어 면역계 세포를 비목적 세포로 표적화하고(미국 특허 제4,676,980호), HIV 감염 치료용(PCT 출원 공개 번호 WO 91/00360 및 WO 92/200373; EP03089)으로 제안된 바 있다. 이형접합성 항체는 임의의 간편한 교차결합법을 사용하여 제조할 수 있다. 적합한 교차결합제는 당해 기술분야에 공지되어 있고, 다양한 교차결합 기법과 함께 미국 특허 제4,676,980호에 개시되어 있다.

[0087] 항체 단편은 통상적으로 온전한 항체의 단백질분해적 절단을 통해 유도하였다 (예컨대, Morimoto et al., J.Biochem.Biophys.Methods 24:107-117 (1992) 및 Brennan et al., Science 229:81 (1985)). 하지만, 현재는 재조합 숙주 세포로부터 이 단편을 직접 생산할 수 있다. 예를 들어, Fab'-SH 단편은 대장균으로부터 직접 회수할 수 있고 화학적으로 커플링시켜 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 얻을 수 있다(Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). 다른 구체예에서는, F(ab')<sub>2</sub> 분자의 조립을 촉진시키기 위하여 루신 지퍼 GCN4를 사용하여 F(ab')<sub>2</sub>를 형성시킨다. 다른 시도에 따르면, Fv, Fab 또는 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 분리할 수도 있다. 당업자라면 자명하게 알고 있는 다른 항체 단편 생산 기법도 있다.

[0088] 본 발명의 특정 구체예에 사용하기 위한 목적으로, 항체 단편을 변형시켜 혈청내 반감기를 증가시키는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어 항체 단편에 셀비지(salvage) 수용체 결합 에피토프를 병입시켜(예컨대, 항체 단편 중의 적당한 영역을 돌연변이시키거나 또는 에피토프를 펩타이드 태그에 병입시킨 뒤 항체 단편의 어느 한쪽 말단이나 중간에 융합시킴, 예컨대 DNA 또는 펩타이드 합성을 통해) 달성할 수 있다. 예컨대 1996. 10. 17에 공개된 WO 96/32478 참조.

[0089] 셀비지 수용체 결합 에피토프는 일반적으로 Fc 도메인의 1개 또는 2개의 루프에 존재하는 어느 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기가 항체 단편의 유사한 위치로 전이되어 있는 영역을 구성한다. 보다 더 바람직하게는, Fc 도메인의 1개 또는 2개 루프 중에서 3개 또는 그 이상의 잔기가 전이된 것이 좋다. 보다 더 바람직하게는, 에피토프가 Fc 영역(예컨대 IgG)의 CH2 도메인에서 취해진 것이고 항체의 CH1, CH3 또는 V<sub>H</sub> 영역이나 이러한 영역 중 하나 이상으로 전이된 것이 좋다. 대안 방법에서, 에피토프는 Fc 영역의 CH2 도메인에서 취해지고 항체 단편의 C<sub>L</sub> 영역이나 V<sub>L</sub> 영역 또는 이 두 영역 모두로 전이된 것이 좋다.

[0090] 본 명세서에 구체적으로 개시된 항-NGF 항체의 아미노산 서열 변형체, 예컨대 치환, 삽입 및/또는 결실 변형체는 적당한 뉴클레오타이드 변화를 암호화 DNA에 도입시키거나 또는 펩타이드 합성을 통해 제조한다. 이러한 변형체를 제조하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 그 예로는 컨닝햄과 웰스(Science, 244:1081-1085(1989))에 의해 기술된 바와 같은 "알라닌 주사 돌연변이유발법(alanine scanning mutagenesis)"이 있다. 항체의 특정 아미노산 변형체 형태는 항체의 본래 글리코실화 패턴을 변화시킨다. 이 때 변화란, 그 항체에서 발견되는 1 이상의 탄수화물 부분이 결실되고(또는) 그 항체에 존재하지 않는 1 이상의 글리코실화 부위가 첨가된 것을 의미한다.

- [0091] 목적 성질을 가진 항체의 선별
- [0092] 본 발명에 유용한 항체는 NGF 활성을 중화시키는 것이다. 따라서, 예컨대 본 발명의 중화성 항-NGF 항체는 후보 항체를 NGF와 항온처리(인큐베이션)하고, 결합과 NGF의 생물학적 활성 중화를 모니터링하여 확인할 수 있다. 결합 분석은 정제된 NGF 폴리펩타이드를 사용하거나 NGF 폴리펩타이드를 천연적으로 발현하거나 발현하도록 트랜스펙션시킨 세포를 사용하여 실시할 수 있다. 일 구체예로서, 결합 분석은 NGF 결합에 대해 후보 항체가 공지의 항-NGF 항체와 경쟁하는 능력을 평가하는 경쟁적 결합 분석이다. 이 분석은 다양한 형식, 예컨대 ELISA 형식으로 수행될 수 있다.
- [0093] NGF의 생물학적 활성을 중화시키는 후보 항체의 능력은 예를 들어 문헌[Hongo et al., Hybridoma 19:215-227(2000)]에 기술된 바와 같이 태아 래트 배근 신경절 생존 생물검정법에서 NGF 매개의 생존을 억제하는 후보 항체의 능력을 모니터링하여 측정할 수 있다.
- [0094] 당해 항체가 결합되어 있는 NGF 상의 에피토프에 결합하는 항체를 선별하기 위하여 통상적인 교차 차단 분석법, 예컨대 문헌[Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기술된 분석법을 사용할 수 있다. 대안 방법으로, 또는 부가적 방법으로, 에피토프 맵핑을 당해 기술 분야에 공지된 방법으로 수행할 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 단일클론 항체가 결합하는 NGF 에피토프는 문헌[Fendly et al., Cancer Research 50:1550-1558(1990)]에 기술된 바와 같은 경쟁적 결합 분석법으로 측정할 수 있다. 교차 차단 연구는 형광성을 정량하는 PANDEX™스크린기를 사용하여 온전한 세포 상의 형광성을 직접 측정하여 실시할 수 있다. 이 방법에서 단일클론 항체는 기존의 절차(Wofsy et al., Selected Methods in Cellular Immunology, p.287, Mishel and Schiigi(eds.) San Francisco: W.J.Freeman Co. (1980))에 따라 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)와 접합된다. 상기 PANDEX™평판 웰에 현탁 상태의 NGF 발현 세포와 정제된 단일클론 항체를 첨가하고, 항온처리한 뒤, PANDEX™으로 형광성을 정량한다. 각 단일클론 항체가 다른 단일클론 항체의 결합을 무관한 단일클론 항체 대조군과 비교했을 때 50% 또는 그 이상까지 차단한다면 단일클론 항체들은 에피토프를 공유하는 것으로 간주된다.
- [0095] 또한, 본 발명에 유용한 항-NGF 항체는 조합 라이브러리에서 목적 활성 또는 활성들을 가진 합성 항체 클론을 선별하여 확인할 수도 있다. 이 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다. 간략히 설명하면, 파지 외피 단백질에 융합된 항체 가변 영역(Fv)의 다양한 단편(예, Fab, F(ab')<sub>2</sub> 등)을 표현하는 파지를 함유하는 파지 라이브러리를 선별하여 합성 항체 클론을 선별한다. 이러한 파지 라이브러리의 선별에는 목적 항체에 대한 친화성 크로마토그래피를 이용한다. 목적 항원에 결합할 수 있는 Fv 단편을 발현하는 클론은 상기 항원에 흡착하므로, 라이브러리 중의 다른 비결합 클론으로부터 분리되어진다. 이와 같이 결합한 클론을 항원으로부터 용출시키고, 추가 항원 흡착/용출 사이클을 실시하면 클론을 더 농축시킬 수 있다. 본 발명에 사용하기에 적합한 항-NGF 항체는 당해의 파지 클론을 선별하는 적합한 항원 선별 절차를 디자인한 뒤, 당해의 파지 클론 유래의 Fv 서열과 적합한 불변 영역(Fc) 서열을 사용하여 전장의 항-NGF 항체 클론을 작제함으로써 획득할 수 있다.
- [0096] 이와 같은 세포 단위의 생물학적 검정법에서 획득한 결과는 그 다음 동물, 예컨대 뮤린 모델과 인간 임상 시험에서 테스트할 수 있다. 목적 성질을 갖는 것으로 확인된 뮤린의 단일클론 항체는 필요한 경우 당해 기술분야에 공지된 기법, 예컨대 "유전자 변환 돌연변이유발법" (미국 특허 제5,821,337호에 기술되어 있음)을 사용하여 인간화하거나 또는 키메라 항체로 변환시킬 수도 있다.
- [0097] C. 약학적 제제
- [0098] 본 발명에 따라 사용되는 항체의 치료 제제는 바람직한 정도의 순도를 가진 항체를 선택적인 약학적 허용성 담체, 부형제 또는 안정화제(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed.(1980))와 동결건조제형 또는 수용액 형태로 혼합하여 보관용으로 제조한다. 적합한 담체, 부형제 또는 안정화제는 이용된 투여량과 농도에서 수령자에게 비독성인 것으로서, 인산염, 구연산염 및 다른 유기산과 같은 완충액; 아스코르브산과 메티오닌과 같은 항산화제; 보존제(예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메트늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조시놀; 사이클로헥산올; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10 잔기 미만)의 폴리펩타이드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 단당류, 이당류 및 다른 탄수화물, 예컨대 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당류, 예컨대 슈크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염형성용 반대이온, 예컨대 나트륨; 금속 착물(예컨대, Zn-단백질 착물); 및/또는 비이온성 계면

활성제, 예컨대 TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함할 수 있다.

- [0099] 본 발명의 방법에 유용한 중화성 항-NGF 항체는 또한 면역리포솜 형태로 제조될 수 있다. 항체를 함유하는 리포솜은 당해 기술분야에 공지된 방법, 예컨대 문헌[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 제4,485,045호 및 제4,544,545호]에 기술된 방법으로 제조한다. 순환 시간을 증가시킨 리포솜에 대해서는 미국 특허 제5,013,556호에 개시되어 있다.
- [0100] 특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG 유도체화된 포스파티딜에탄올아민(PEG-PE)을 함유하는 지질 조성물을 이용한 역상 증발법으로 제조할 수 있다. 리포솜은 소정의 세공 크기를 가진 필터를 통해 압출시키면 원하는 직경의 리포솜이 만들어진다. 본 발명에 따른 항체의 Fab' 단편은 다이실피드물 상호교환 반응을 통해 문헌[Martin et al., J.Biol.Chem. 257:286-288(1982)]에 기술된 바와 같이 리포솜에 접합시킬 수 있다. 필요에 따라, 화학치료제(예컨대, 독소루비신)를 리포솜에 첨가하기도 한다[Gabizon et al., J.National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989)].
- [0101] 또한, 활성 성분은 예컨대 코아서베이션(coacervation) 기법이나 계면 중합으로 제조한 마이크로캡슐, 예컨대 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴 마이크로캡슐 및 폴리(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에 각각 포획되거나, 콜로이드성 약물 전달 시스템(예컨대, 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀전, 나노 입자 및 나노 캡슐)에 포획되거나 마크로에멀전에 포획될 수 있다. 이와 같은 기법은 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A.Ed.(1980)]에 개시되어 있다.
- [0102] 지속 방출형 제제로도 제조할 수 있다. 지속 방출형 제제의 적합한 예로는 항체를 함유하는 고상 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 있으며, 이 매트릭스는 필름이나 마이크로캡슐과 같은 성형물 형태인 것이다. 지속 방출형 매트릭스의 예로는 폴리에스테르, 하이드로겔(예컨대, 폴리(2-하이드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 폴리(비닐알코올)), 폴리락타이드(미국 특허 제3,773,919호), L-글루탐산과 감마 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 LUPRON DEPOT<sup>TM</sup> (락트산-글리콜산 공중합체와 류프롤라이드 아세테이트)로 이루어진 주사용 미소구) 및 폴리-D-(-)-3-하이드록시부티르산이 있다.
- [0103] 본 발명의 제제는 또한 치료 중인 특정 징후에 필요한 1 이상의 활성 화합물, 바람직하게는 서로 약영향을 미치지 않는 보완적 활성을 가진 화합물을 함유할 수 있다. 예를 들어, NGF의 여러 에피토프 또는 NGF 수용체에 결합하는 항체들을 하나의 제제에 추가 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 대안 방법으로, 또는 부가적으로 조성물은 다른 생물학적 활성 화합물, 예컨대 소염제를 추가로 함유할 수 있다. 이와 같은 분자는 의도한 목적에 효과적인 함량으로 함께 제공되는 것이 적당하다.
- [0104] 생체내 투여용으로 사용되는 제제는 멸균성이어야 한다. 멸균은 예를 들어 멸균용 여과막을 통한 여과를 통해 간단하게 실시한다.
- [0105] 치료용 항-NGF 항체 조성물은 일반적으로 멸균된 접근구를 가진 용기, 예컨대 피하 주사 바늘이 관통할 수 있는 스톱퍼를 가진 바이알이나 정맥내 주사용 용액 백에 담는다.
- [0106] D. 항-NGF 항체에 의한 치료
- [0107] 본 발명에 따라서 항-NGF 항체를 사용하여 다양한 질환이나 장애를 치료할 수 있을 것으로 사료된다. 이러한 질환이나 장애의 예로는 천식, 건선 및 관절염이 있다. 이 항-NGF 항체는 활성 상태의 질병 개시를 예방하고, 진행 중인 증후군을 치료하며 근본적인 질병 자체를 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0108] 알러지 반응을 제어하는 세포 및 분자 기작의 이해와 개선된 치료법의 발전에도 불구하고, 알러지 질환, 구체적으로 천식의 발생 빈도는 최근에 급격히 증가하였다[Beasley et al., J.Allergy Clin. Immunol. 105:466-472 (2000); Peat and Li, J.Allergy Clin. Immunol. 103:1-10(1999)]. 알러지 질환은 예컨대 증가용량의 알러젠을 해마다 주사 투여하는 알러젠에 기초한 예방접종으로 치료할 수 있다. 약한 천식은 보통 비교적 낮은 용량의 코르티코스테로이드 흡입에 의해 대부분의 환자들에서 제어될 수 있는 반면, 증상이 중간 정도인 천식은 보통 장기지속형  $\beta$ -2 길항제 또는 류코트리엔 억제제를 추가로 흡입 투여하여 치료한다. 하지만, 정도가 심한 천식의 치료는 여전히 심각한 의학적 문제로 남아있다. 현재 FDA 승인을 기다리고 있는 항IgE 항체(rhuMAb-E25, Xolair<sup>TM</sup>, 제넨테크, 인코포레이티드, 타녹스, 인코포레이티드 및 노바티스 파마슈티컬스 코포레이션의 공동개발품)는 알러지 천식과 환절기 알러지 비염 증후군들을 유도하는 증상 치료에 조기 처방되어 유망한 결과를 나타내기는 하지만, 천식과 같은 알러지 질환을 제어하는 또 다른 치료 전략과 제제의 개발은 여전히 요구되고 있다.

- [0109] 본 발명의 항-NGF 항체는 천식 및 전형적으로 기침, 쌉쌉거림, 흉부 압박 및/또는 호흡 곤란의 에피소드를 특징으로 하는 기도 과다반응과 관련된 다른 장애를 치료하는데 사용할 수 있다.
- [0110] 본 발명의 항-NGF 항체는 또한 다른 염증 증상, 예컨대 다발성 경화증, 결장염, 염증성 장 질환, 방광염, 습진, 접촉 피부염, 관절염, 예컨대 만성 관절염과 류마티스 관절염, 크론병 및 건선 등의 치료에도 유용하다.
- [0111] 또한, 항-NGF 항체는 흉반루푸스, 대상포진, 대상포진후 신경통, 통각과민 및 만성통증을 비롯하여, 증가량의 NGF와 관련이 있을 수 있는 기타 다른 질환의 치료에도 유용하다.
- [0112] 항-NGF 항체는 포유동물, 바람직하게는 인간 환자에게 공지 방법, 예컨대 환피로 또는 연속 주입으로 일정 기간 동안 정맥내 투여, 근육내 경로, 복강내 경로, 뇌척수내 경로, 피하 경로, 관절내 경로, 활막내 경로, 수막공간내 경로, 경구 또는 국소 경로로 투여한다. 항-NGF 항체는 또한 흡입 투여될 수 있다. 액형 제제용 시판 분무기, 예컨대 제트 분무기 및 초음파 분무기가 투여에 유용하다. 액형 제제는 직접 분무될 수 있고, 동결건조된 분말은 복원 후 분무될 수 있다. 대안 방법으로, 항-NGF 항체는 플루오로탄소 제제와 계량 흡입기를 사용하여 분무될 수도 있고, 또는 동결건조 및 분쇄된 분말로서 흡입될 수도 있다. 천식 및 기도 과다반응을 특징으로 하는 다른 증상들의 치료에 바람직한 투여 경로는 흡입이다.
- [0113] 항-NGF항체의 투여와 함께 다른 치료 계획을 실시할 수 있다. 이러한 복합 투여는 별도의 제제 또는 단일 약학적 제제를 이용하는 공동투여 및 임의 순서로 이루어지는 연속 투여가 있으며, 이 때 두(또는 모든) 활성 제제가 자신의 생물학적 활성을 동시에 발휘하는 기간이 있는 것이 바람직하다. 천식 치료에는, 본 발명의 항체를 항IgE 항체, 구체적으로 rhuMAb-E25(Xolair™) 또는 제2 세대 항체 분자 rhuMAb-E26(Genentech, Inc.)과 함께 사용하는 것이 특히 유리할 것이다. rhuMAb-E25 항체는 알러지 과정의 초기에 관여하도록 개발된 재조합 인간화 항IgE 단일클론 항체이다. 복합 사용은 단일 약학적 제제 중의 두 항체를 투여할 수도 있고 또는 항-NGF 특이성과 항IgE 특이성을 가진 양특이성 항체를 사용하는 것을 포함하기도 한다. 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 항-NGF 항체는 코르티코스테로이드 흡입, 예컨대 베클로메타손 디프로프리오네이트(BDP) 치료와 함께 투여되기도 한다. 류마티스 관절염이나 크론병의 치료에는, 이들 증상을 치료하는 것으로 알려진 치료 계획과 함께 본 발명의 항체를 투여할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항-NGF 항체는 Remicade®(Infliximab, Centocor), 또는 Enbrel®(Etanercept, Wyeth-Ayerst)와 함께 투여될 수 있다. 또한, 본 발명은 이들 질환을 표적으로 하는 양특이성 항체를 포함한다. 예를 들어, 양특이성 항체는 본 발명의 NGF 결합 능력과 항TNF 특이성이 복합된 것을 포함할 수 있다.
- [0114] 상기 임의의 공동투여 제제의 적합한 투여량은 현재 사용되는 투여량이고, 이 제제와 항-NGF 항체의 복합 작용(상승작용)으로 인해 낮춰질 수도 있다.
- [0115] 질환의 예방이나 치료를 위하여, 항-NGF 항체의 적당한 투여량은 사용되는 항-NGF 항체, 치료하고자 하는 질환의 종류, 이 질환의 중증도 및 진행과정(항체 투여가 예방용인지 치료용인지의 여부에 불문하고), 이전 치료법, 환자의 임상 경력 및 항체에 대한 반응, 및 담당의의 판단에 따라 달라질 수 있다. 전형적으로, 담당의는 목적 결과가 달성되는 투여량에 이를 때까지 항-NGF 항체를 투여할 것이다.
- [0116] 항-NGF 항체는 한번에 또는 일련의 치료 과정 동안 환자에게 투여하는 것이 적당하다. 질환의 종류와 중증도에 따라서, 예컨대 1회 이상의 분할 투여이든지, 연속 또는 반복 투여이든지 여부에 관계없이 환자에게 투여되는 최초 후보 투여량은 약 2 mg/kg의 항체이다. 전형적인 1일 투여량은 전술한 요인에 따라 약 1µg/kg 내지 100 mg/kg 범위일 수 있다. 증상에 따라 달라지는 3 내지 4일 동안 또는 그 이상의 기간 동안의 반복 투여 시, 치료는 목적인 질환 증후들의 역제가 일어날 때까지 지속한다. 바람직한 투여 계획은 항-NGF 항체 약 2 mg/kg의 최초 용량과, 그 다음 약 1 mg/kg의 주간 유지 용량을 투여하는 것을 포함한다. 하지만, 담당의가 달성하고자 하는 약물동력학적 붕괴 패턴에 따라 다른 투여량 계획을 사용할 수도 있다. 이러한 치료법의 진행은 통상적인 기법과 분석법으로 용이하게 모니터링할 수 있다.
- [0117] E. 제조 물품
- [0118] 본 발명의 다른 구체예로서, 전술한 장애를 치료하는데 유용한 물질을 함유하는 제조 물품이 제공된다. 제조 물품은 용기와, 이 용기 상 또는 이 용기와 관련하여 제공된 라벨 또는 패키지 삽입물을 함유한다. 적합한 용기로는, 예컨대 병, 바이알, 주사기 등이 있다. 이 용기들은 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재질로 제조될 수 있다. 이 용기는 상기 증상의 치료에 효과적인 조성물을 담고 멸균 접근구를 구비할 수 있다(예컨대, 용기는 피하 주사 바늘이 관통할 수 있는 스톱퍼를 가진 바이알이거나 정맥내 투여용 액체 백일 수 있다). 상기 조성물

중에 적어도 하나의 활성제는 항-NGF 항체이다. 추가로, 이 용기는 제2 약학적 활성제를 함유할 수 있다. 제2 제제는 천식, 다발성 경화증, 관절염, 홍반루푸스 및 건선과 같은 염증성 질환 치료에 적합한 것이 바람직하다.

[0119] 라벨이나 패키지 삽입물은 염증성 증상과 같은 특정 증상을 치료하는데 유용하다는 것을 나타낸다. 일 구체예로서, 라벨이나 패키지 삽입물은 NGF에 결합하는 항체를 함유하는 조성물이 천식, 다발성 경화증, 관절염, 홍반루푸스 및 건선으로 구성된 그룹 중에서 선택되는 염증성 증상을 치료하는데 사용할 수 있음을 나타낸다. 또한, 라벨이나 패키지 삽입물은 치료 대상 환자가 천식, 건선, 관절염 또는 다른 질환이나 장애를 가진 환자임을 나타낼 수 있다. 더욱이, 제조 물품은 (a) NGF에 결합하여 그 생물학적 활성을 억제하는 제1 항체를 함유하는 조성물을 담고 있는 제1 용기; 및 (b) NGF 수용체에 결합하여 리간드 활성화를 차단하는 제2 항체를 함유하는 조성물을 담고 있는 제2 용기를 포함할 수 있다. 이러한 구체예의 본 발명에 따른 제조 물품은 추가로 상기 제1 및 제2 조성물이 천식, 건선, 관절염 또는 다른 질환이나 장애를 치료하는데 사용할 수 있음을 나타내는 패키지 삽입물을 함유할 수 있다. 대안 구체예 또는 부가적 구체예로서, 제조 물품은 추가로 약학적 허용성 완충액, 예컨대 정균성 주사용수(BWFI), 인산염 완충 식염수, 링거액 또는 텍스트로스 용액을 함유하는 제2 (또는 제3) 용기를 함유할 수 있다. 또한, 상업적 목적과 사용자 견지에서 바람직한 다른 재료, 예컨대 다른 완충액, 희석제, 필터, 주사바늘 및 주사기 등도 추가로 함유할 수 있다.

[0120] 이하 비제한적 실시예를 통해 본 발명의 보다 상세하게 설명하고자 한다.

[0121] 본 실시예에 언급된 시판용 시약은 별다른 표시가 없는 한 제조자의 지시에 따라 사용하였다. 이하 실시예와 본 명세서에 전반에 걸쳐 ATCC 수탁번호로 제시된 세포의 공급원은 미국 버지니아 마나사스에 소재하는 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(ATCC)이다.

[0122] 실시예 1

[0123] 항-NGF 단일클론 항체 생산 및 특성분석

[0124] *A. 항-NGF 단일클론 항체 생산*

[0125] 본 실시예는 인간 NGF(hNGF)에 특이적으로 결합할 수 있는 단일클론 항체의 제조방법을 예시한 것이다. 단일클론 항체를 생산하는 기술은 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌[Kohler and Milstein, Nature 256:495-497(1975)]에 설명되어 있다. 실시예 1과 2에 기술된 실험은 문헌[Hongo et al., Hybridoma 19:215-227]에 더욱 자세히 설명되어 있다.

[0126] hNGF에 대한 무린의 단일클론 항체 23개 패널을 문헌[Hongo et al., Hybridoma 14:253-260]에 기술된 것과 유사한 방법으로 발생시켰다. 간략히 설명하면, Balb/c 마우스(Charles River Laboratories, Wilmington, DE)를 리비 보조제(Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton, MO)에 함유된 인간 NGF로 면역화시켰다. 고정화된 NGF에 대하여 최고의 항체 역가를 나타내는 마우스로부터 얻은 비장세포를 마우스 골수종 세포(X63.Ag8.653; 아메리칸 타입 컬처 컬렉션, 매릴랜드 록크빌 소재)와 융합시켰다. 10 내지 14일 후, 배양 상청액을 수거하여 효소 결합 면역흡착 분석법(ELISA)으로 항체 생산에 대하여 선별하였다. 2차 클로닝 후 최고의 면역반응성을 나타내는 클론을, MAb의 생체내 생산을 위하여 프리스탄(Pristane)으로 자극된 마우스(Hoogenraad et al., J.Immunol.Methods 6:317-320(1983)에 주사하였다. 복수액을 수집하고, 기존의 절차(Moks et al., Eur.J.Biochem. 85:1205-1210(1986))를 사용하여 스타필로코커스 프로테인 A(Pharmacia)에 대한 친화성 크로마토그래피(파마시아 고속 단백질 액체 크로마토그래피; 스웨덴 울살라에 소재하는 파마시아 제품)로 정제하였다. 정제된 항체 제조물을 멸균 여과하고 인산염 완충 식염수(PBS)에 담아 4°C에 보관하였다.

[0127] *B. 도메인 교환 돌연변이체를 이용한 에피토프 맵핑*

[0128] 먼저, 항-NGF MAb의 에피토프 특이성은 상동체 주사 돌연변이유발법(homolog scanning mutagenesis)을 통해 수득한 키메라 NGF/뉴로트로핀-3(NT-3) 단백질에 대한 상기 Mab의 결합능을 평가하여 측정하였다. 이러한 도메인 교환 돌연변이체는 결실 돌연변이체와 다른 잇점을 갖고 있다. 도메인의 결실은 단백질의 2차 구조를 붕괴시킬 수 있지만, 도메인 교환 돌연변이체에서와 같이 한 도메인을 관련 단백질 유래의 유사 크기와 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 가진 대응 도메인으로 치환한 것은 2차 구조를 유지할 가능성이 있다.

[0129] 인간 NT-3(hNT-3) 서열의 3 내지 7개 잔기를 이에 상응하는 hNGF의 가변 영역에 치환시킨 8개의 hNGF/hNT-3 키메라 돌연변이체(도 1)를 올리고뉴클레오타이드 지시성 돌연변이유발법으로 제조하였다. 이 키메라 돌연변이체들을 인간 293 세포에서 일시 발현시키고, 돌연변이체 NGF에 대한 항hNGF Mab들의 결합능을, 이하에 기술되는 바와 같이 포획 항체로서 정제된 Mab를 사용하고 검출용 항체로서 HRP 접합된 친화성-정제 래빗 항hNGF 다클론

항체를 사용하여 효소 결합 면역흡착 분석법(ELISA)으로 평가하였다. 각 NGF 돌연변이체에 대한 항hNGF MAb의 결합능은 2회 내지 4회의 독립된 정량 ELISA를 통해 측정하고 야생형 NGF에 대한 결합능과 비교하였다.

[0130] 간략히 설명하면, 미량역가 평판(microtiter plate)(Nunc Maxisorb, VWR Scientific, San Francisco, CA)을 1  $\mu\text{g/ml}$  염소 항마우스 IgG(Boehringer-Mannheim, 인디애나주 인디애나폴리스 소재) 100 $\mu\text{l}$ /웰로 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 동안 코팅시키고, 세척한 뒤, 남아있는 결합 부위는 PBS에 0.05% Tween 20과 0.5% 소 혈청 알부민(BSA, Intergen, 캘리포니아 산디에고 소재; PBS/BSA/T20)을 함유하는 완충액으로 차단시켰다. MAb(PBS/BSA/T20에 1  $\mu\text{g/ml}$ 로 희석시킴)를 적당한 웰에 첨가하고 상온에서 1 내지 2시간 동안 항온처리하였다. 평판을 세척하고, 야생형 또는 돌연변이 hNGF(PBS/BSA/T20에 60 ng/ml→7.8 ng/ml로 희석시킴) 100 $\mu\text{l}$ 를 첨가하고, 상온에서 1 내지 2시간 동안 항온처리한 뒤 다시 세척하였다. 양고추냉이(horseradish) 퍼옥시다제(HRP; PBS/BSA/T20에 1:10,000으로 희석됨)에 접합된 정제 래빗 항hNGF 다클론 항체를 첨가(100  $\mu\text{l}$ /웰)하고 1시간 동안 항온처리하였다. 이 평판을 발색시키고 2중 과장에서 판독하였다. hNGF 돌연변이체에 대한 MAb의 결합능은 동일 조건하에 분석된 야생형 hNGF 결합능(100%로 설정)과 비교하였다.

[0131] hNGF에 대한 높은 친화성( $\text{EC}_{50}$  = MAb 908에 대해 0.18 nM, MAb 909에 대해 0.18 nM, MAb 911에 대해 0.37 nM, MAb 912에 대해 0.18 nM, MAb 938에 대해 0.74 nM 및 MAb 14.14에 대해 0.59 nM)과 다양한 키메라 돌연변이체 (도 1)에 대한 결합능의 60 내지 90% 초과 감소를 나타내는 6개의 인간 항-NGF 단일클론 항체 (MAb 908, 909, 911, 912, 938 및 14.14)를 선발하여 추가 분석하였다. 도 1에 제시한 바와 같이, 이 MAb 중 3개(908, 909 및 14.14)는 단일 가변 영역에 대한 60 내지 95% 최대 결합능의 상실을 특징으로 하는 명백한 영역별 결합 특이성을 나타냈다(도 1). 이보다 영향력이 적은 가변 영역 돌연변이체로서, 다수의 NGF 가변 영역이 이 항체들의 결합 에피토프로서 작용하는 MAb 911, 912 및 938이 관찰되었다. 하지만, 이 에피토프를 함유하는 가변 영역은 3 차원 구조에서 함께 근접해있다(도 3a).

[0132] C. 부위 지시성 돌연변이유발법을 이용한 에피토프 맵핑

[0133] 선발된 6개의 항-NGF MAb 각각의 에피토프 특이성을 보다 상세하게 규명하기 위하여, 특히 종래 TrkA 및 p75 결합과 생물학적 기능에 일 역할을 하는 것으로 보고된 영역에 있는 잔기들을 중심으로(Shih et al., J. Biol. Chem., 269(44): 27679-27686 (1994)), 1개, 2개 또는 3개 아미노산 점 돌연변이를 나타내는 NGF 돌연변이체를 제조하고, 발현시킨 뒤 특성분석하였다. 항-NGF MAb 결합에 미치는 돌연변이 효과는 전술한 바와 같이 ELISA로 특성분석하였다. 각 돌연변이체에 대한 항-NGF MAb의 결합능을 나타내는 평균  $\text{EC}_{50}$  값은 ELISA 결합 곡선으로부터 계산하여 야생형 NGF 결합 시 수득한  $\text{EC}_{50}$  값과 비교하였다(도 2a 내지 2f).

[0134] 6개 MAb 모두, 종래 특정 NGF 키메라 돌연변이체에 대한 결합 상실이 입증된 바 있는 영역들과 일반적으로 관련이 있는 hNGF 점 돌연변이체들의 결합 특이성을 나타내었다. 하지만, NGF 점 돌연변이가 MAb 911 및 938의 결합에 미치는 효과는 다른 MAb에서 관찰되는 효과와 비교했을 때 보다 낮게 나타났다(도 2a 내지 2f). 이 돌연변이 효과들의 영역 특이성은 NGF 키메라 돌연변이체에서 교환된 가변 영역들 내의 잔기 또는 그 부근의 잔기들과 상호관련이 있어서, MAb 911 또는 938의 최대 결합능이 50 내지 60% 초과로 상실되게 하였다. MAb 911의 경우, 돌연변이로는 K32A+K34A+E35A, Y79A+T81K, H84A+K88A 및 R103A를 포함하였다. 부근 돌연변이인 E11A, Y52A 및 L112A+S113A에 의해 결합능의 상실이 추가적으로 관찰되었다(도 2c). 이것은 MAb 911의 에피토프가 7개의 hNGF 가변 영역 중 4 곳에 걸쳐 존재한다는 것을 시사한다(도 3c).

[0135] D. MAb 결합시의 에피토프의 구조 의존성

[0136] hNGF에 존재하는 에피토프들의 구조 형태에 따라서 hNGF에 대한 항-NGF MAb들의 결합이 좌우되는 지를 관찰하기 위하여, hNGF의 비환원 형태 및 환원 형태에 대한 항-NGF MAb의 결합을 평가하였다.  $\beta$ -머캅토에탄올 처리에 의해 환원되거나 처리되지 않은 hNGF를 겔 전기영동하고 면역블롯팅을 위해 니트로셀룰로스 블롯으로 이동시켰다. hNGF 검출을 위해 니트로셀룰로스 블롯을 세척하고 1차 및 2차 항체와 항온처리한 뒤, 루미놀 기질(Amersham International, Amersham, U.K.)에 교환하여 상온에서 1분 동안 노출시키고, x선 필름(Eastman Kodak, Rochester, NY)에 10 내지 45초 동안 노출시켰다. 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 여러 개의 단일클론 항-NGF 항체는 환원된 형태의 hNGF에 대하여 최소의 결합능을 나타냈다. 이러한 항체로는 MAb 938, 908, 911 및 912가 있으며, 이들이 결합하는 hNGF 상의 에피토프들이 하전 변화 및 환원에 의해 구조적 영향을 받는다는 것을 시사한다.

[0137] E. 항-NGF 단일클론 항체에 대한 에피토프들의 분자 모델링

- [0138] 확인된 항-NGF MAb 에피토프들의 분자 모델링은 종래 기술된 바와 같이(McDonald et al., Nature, 354:411-414(1991)) 뮤린 NGF의 3차원 구조 좌표들에 근거하여 MidasPlus 프로그램(University of California at San Francisco, San Francisco, CA)을 사용하여 작성하였다.
- [0139] MAb 에피토프 맵핑은 도 5에 요약하였다.
- [0140] 실시예 2
- [0141] 항-NGF 단일클론 항체의 중화 활성 측정
- [0142] 일부 에피토프가 종래 TrkA 및/또는 p75와 NGF 상호작용에 유의적 역할을 하는 것으로 관찰된 영역들에 위치한다는 관찰은, 이에 상응하는 MAb가 상기 상호작용 중 하나 또는 둘 모두를 차단할 수 있음을 암시한다.
- [0143] A. <sup>125</sup>I-hNGF 결합 분석
- [0144] 항-NGF MAb 중 하나 또는 그 이상이 TrkA 및/또는 p75에 대한 NGF 결합을 차단할 수 있는지를 평가하기 위하여, 항-NGF 단일클론 항체의 존재하에 TrkA-IgG 수용체 면역부착소에 대한 <sup>125</sup>I-hNGF의 결합능을 측정하였다.
- [0145] 간략히 설명하면, <sup>125</sup>I-hNGF는 마칼로니스(Marchalonis, Biochem J., 113:299-305 (1969))에 의해 최초로 개시된 용해성 락토퍼옥시다제 방법의 변형을 사용하여 제조하였다. 최종 반응 혼합물을 pD-10 세파텍스 G-25 크기 배제 컬럼(스웨덴 옵살라에 소재하는 파마시아 제품)을 통해 분별하고 4°C에 보관하였다. 정제된 래빗 항인간 IgG-Fc 특이적 다클론 항체(탄산염 완충액에 2 µg/ml로 희석)를 이용하여 미량역가 평판(Nunc, Maxisorb)을 4°C에서 하룻밤 동안 코팅하고, PBS로 세척한 뒤, PBS/0.5% BSA(PBS/BSA) 150 µl로 차단하였다. PBS/BSA에 용해시킨 인간 TrkA-IgG 또는 p75-IgG 면역부착소(로버트 피티에게서 공급받음)(20 ng/ml)를 첨가하고(100 µl), 상온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 그 다음, PBS/BSA에 희석시킨 hNGF(최종 농도 150 pM)를 첨가하고(100 µl), 상온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 그 다음, 항-NGF 단일클론 항체(667 nM→0.58 nM) 또는 NGF 지향성이 아닌 무관한 단일클론 항체와 4°C에서 예비항온처리시킨 hNGF(최종 농도 150 pM)를 병렬로 첨가하고 전술한 바와 같이 항온처리하였다. 이 평판을 0.05% T20을 함유하는 PBS로 세척하고, 각 웰을 감마 계수기(Packard Cobra Model 5010, Downers Grove, IL)로 1분 동안 계수하였다.
- [0146] 도 6에서 확인할 수 있듯이, TrkA-IgG에 결합된 <sup>125</sup>I-표지된 hNGF의 농도로 측정되는 TrkA-IgG 수용체 면역부착소에 대한 hNGF의 결합능이 항-NGF 단일클론 항체들에 의해 억제되었다. 모든 MAb들은 분석된 최고 농도(667 nM)에서 차단능을 보였지만, 이보다 낮은 농도들에서는 분명하게 상이한 차단능을 나타내었다. MAb 911, 912 및 938은 동일한 차단능(IC<sub>50</sub> 약 0.5 내지 2 nM)을 나타내었는데, MAb 10nM 이상에서 80 내지 90%의 억제율을 보였다.
- [0147] 친화성이 낮은 p75 수용체에 대한 hNGF의 결합을 억제하는 MAb들의 능력은 전술한 결합 분석에 p75-IgG를 사용하여 평가하였다. 도 7에서 확인되듯이, 항hNGF MAb는 <sup>125</sup>I-표지된 hNGF를 사용한 실험 결과 p75-IgG 수용체 면역부착소에 대한 hNGF의 결합을 억제하였다. MAb 911, 912 및 938은 최고의 억제 활성을 나타내었는데, MAb 1nM 미만의 존재하에 관찰되는 결합 감소율이 75 내지 90% 였다. 또한, MAb 909도 강력한 차단능을 나타낸 반면(10nM MAb에 의해 >90% 억제율), MAb 908과 14.14는 차단능이 훨씬 적었다(도 7).
- [0148] B. 키나제 유도 수용체 활성화(KIRA) 분석법
- [0149] hNGF와 같은 리간드 및/또는 아고니스트 단일클론 항체를 이용한 자극에 대한 반응으로 트랜스펙션된 세포에서 나타나는 NGF 의존적 TrkA 자가인산화를 측정하기 위하여 키나제 유도 수용체 활성화(KIRA) 분석법을 사용하였다(Sadick et al., Exp. Cell Res. 234:354-361 (1997)). CHO 트랜스펙션된 세포에서 발현된 TrkA 세포의 도메인에 대한 hNGF의 결합과 후속되는 TrkA 상의 타이로신 잔기들의 인산화를, 항-NGF MAb가 억제하는 지를 평가하였다(도 8). 타이로신 잔기의 인산화는 안티포스포타이로신 MAb를 사용하여 ELISA로 측정하였다.
- [0150] 미량역가 평판(Costar, 매사추세츠 캠브리지 소재)을, 에피토프 태그로서 작용하는 26개 아미노산 폴리펩타이드인 헤르페스 단순 바이러스 당단백질 D 단편(gD)과 함께 TrkA 수용체의 세포의 도메인을 발현하는 1x10<sup>5</sup> 중국 햄스터 난소(CHO) 세포로 코팅하였다. 그 다음, 이 TrkA를 발현하는 CHO 세포가 함유된 웰(50 µl/웰)에 hNGF 단독(150 pM) (양성 대조군) 또는 각각의 항-NGF MAb(667 nM→최종 0.31 nM)와 4°C에서 하룻밤동안 예비항온처리된 hNGF(최종 150 pM) 샘플을 첨가하고 37°C에서 25분 동안 항온처리하였다. 음성 대조군으로서, NGF에 대하여

지향성이 아닌 무관한 단일클론 항체를 사용하였다. hNGF 자극된 세포를 그 다음 용해 완충액으로 처리하고, 이 용해물을 gD-MAb 코팅된 미량역가 평판에 첨가하여, 새딕 등(Sadick et al., Anal.Biochem., 235:207-214(1996))에 의해 개시된 절차와 유사하게 TrkA 함유 포스포타이로신을 ELISA 검출하였다. 비오틴화된 4G10(업스테이트 바이올로지컬스, 인코포레이티드 제품인 단일클론 안티포스포타이로신(UBI, Lake Placid, NY))을 희석 완충액(0.5% BSA, 0.05% Tween 20, 5mM EDTA 및 0.01% 티메로솔을 함유하는 PBS)에 0.2 mg/ml로 희석시킨 용액 100 $\mu$ l를 각 웰에 첨가하였다. 실온에서 2시간 동안 항온처리한 후, 평판을 세척하고, 희석 완충액에 1:50000으로 희석시킨 HRP 접합된 스트렙타비딘(Zymed Laboratories, S. San Francisco, CA) 100 $\mu$ l를 각 웰에 첨가하였다. 부드러운 교반하에 평판을 실온에서 30분 동안 항온처리하였다. 유리된 아비딘 접합체를 세척제거하고 새로 제조한 기질 용액(테트라메틸 벤지딘, TMB, 2성분 기질 키트, Kirkegard and Perry, Gaithersburg, MD) 100  $\mu$ l를 각 웰에 첨가하였다. 이 반응을 10분 동안 진행시킨 뒤, 1.0M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100  $\mu$ l/웰를 첨가하여 발색 정지시켰다. 450 nm에서의 흡광도를, 매킨토스 센트리스 650(Apple Computers, Cupertino, CA) 및 DeltaSoft 소프트웨어(BioMetallics, Inc., Princeton, NJ)에 의해 제어되는 Vmax 평판 판독기(Molecular Devices, Palo Alto, CA)를 사용하여 대조 과장인 650 nm(A<sub>450/650</sub>)와 함께 판독하였다.

[0151] 도 8에 제시된 바와 같이, 선발된 항-NGF 단일클론 항체 모두, CHO 트랜스펙션 세포에서 발현된 TrkA 세포의 도메인에 대한 hNGF 결합과 TrkA 수용체의 타이로신 잔기들의 인산화 둘 다를 억제할 수 있었다. 시험된 최저 농도(0.3 nM)의 MAb 911, 912 및 938과 hNGF의 예비항온처리는 대조용 MAb에 비해 타이로신 인산화 최대 억제율을 약 60 내지 80%로 나타냈다. MAb 908, 909 및 14.14는 이보다 효력이 적었다.

[0152] *C. 태아 래트 배근 신경절 생존 생물검정법*

[0153] NGF 의존적 과정들에 미치는 항-NGF 단일클론 항체의 효과를 측정하는데 사용한 또 다른 분석법은 태아 래트 E14 배근 신경절 (DRG) 생존 생물검정법이다. 항-NGF 단일클론 항체가, 태아 래트 E14 복근 신경절(DRG) 뉴런에 미치는 hNGF의 생존 효과를 억제하는 능력이 있는지 평가하였다(도 9).

[0154] E15 래트(6 내지 8마리 태아)에서 수득한 배근 신경절(DRG) 뉴런을, 첨가제(McMahon et al., Nat.Med. 8:774-780 (1995))와 hNGF 3 ng/ml를 함유하고 항-NGF 단일클론 항체가 첨가되거나 또는 무첨가된 F12 배지에서 배양하였다. 37°C에서 72시간 동안 항온배양한 후, 세포를 포름알데하이드로 고정시키고 생존하는 뉴런을 계수하였다.

[0155] 도 9에는 항-NGF 단일클론 항체에 의한 DRG 뉴런 생존 억제율을 도시하였다. MAb 908, 909 및 14.14는 최고 농도(67nM; 10 $\mu$ g/ml)에서 생존율을 20 내지 30%까지만 감소시킨 반면, MAb 911과 912는 약 30 내지 80배 더 낮은 농도(0.8 내지 2.4 nM; 0.12 내지 0.37  $\mu$ g/ml)에서 90% 초과 생존 억제율을 나타냈다. MAb 938은 생존 활성을 90%까지 억제할 수 있었지만, MAb 911 및 912 보다 10 내지 30배 낮은 효력이었다.

[0156] MAb 911은 NGF/TrkA 상호작용의 가장 강력한 차단인자였다. MAb 911은 중복된 NGF-TrkA 및 p75 결합 영역  $\beta$ -턴 A'-A"(V-1)와,  $\beta$  시이트 형에 있는 우성 TrkA 결합 영역을 함유하는 에피토프를 인식한다(도 3d). 그 다음 강력한 NGF/TrkA 억제제인 MAb 912는 종래 NGF/p75 상호작용에 중요한 것으로 밝혀진 바 있는 영역인 잔기 K32, K34 및 K35를 인식한다. TrkA 및 p75 결합의 또 다른 강력한 차단인자인 MAb 938 역시 TrkA 또는 p75 결합에 중요한 영역인 N-말단과 C-말단을 인식한다.

[0157] 관찰된 항체 차단 특이성의 차이는 가장 강력한 3가지 차단 항체 중 2가지(911 및 938)가 이보다 차단성이 약한 MAb 보다 NGF에 대한 친화성이 더 낮은 것으로 나타났기 때문에 hNGF에 대한 MAb들의 상대적 친화성에 기인하는 것은 아니다.

[0158] MAb 911 및 912에 대한 결합에 중요한 NGF 영역들은 TrkA 및 p75 결합에 중요한 영역으로 확인된 영역들과 중복된다. MAb 911 및 912는 NGF 유도 활성의 차단인자로서 작용할 수 있으며, 이것은 이 항체들이 염증성 통각과민과 같은 생체내 활동의 특이적 길항제일 수 있음을 시사하는 것이다.

[0159] 실시예 3

[0160] 면역반응에 대한 항-NGF의 효과

[0161] 0일 쯤 10 $\mu$ g 오브알부민을 피하 주사하여 마우스를 면역화시키고 회복시켰다. 면역화 후 40일 쯤 이 마우스에게 항-NGF 항체 911 또는 대조군으로서 이소타입 정합형 항체 10 mg/kg을 IP로 주사하였다. 2일 후, 마우스에게 오브알부민을 추가 투여하였다. 47일 쯤 혈청 샘플을 채취하여 면역반응을 ELISA로 측정하였다. 도 10에 제시된 바와 같이, 대조 항체가 투여된 마우스와 항-NGF 항체 911이 투여된 마우스의 면역 반응 간의 차이는 유의적이

지 않았다( $p>0.05$ ). 또한, 항-NGF 단일클론 항체로 처리된 마우스에서의 면역반응은 미약한 증가 경향을 보였다.

[0162] 이에 반해, 도 11은 병아리 감마 글로불린을 이용한 면역화 후 항-NGF 처리 결과 면역 반응의 미약한 감소 경향을 나타낸다는 것을 보여준다. 구체적으로 설명하면, 0일 째 병아리 감마 글로불린  $10\mu\text{g}$ 을 이용하여 마우스를 면역화시키고 40일 째 항-NGF 항체 911 또는 대조군인 이소타입 정합형 항체( $10\text{ mg/kg IP}$ )로 처리하였다. 42일 째, 감마글로불린을 마우스에게 추가 접종하고 47일 째 혈청 샘플을 취해 ELISA로 분석하였다. 두 그룹의 면역 반응 간에는 유의적 차이가 없었다( $p>0.05$ ). 하지만, 항-NGF 단일클론 항체 911 처리 후에는 면역 반응이 감소하는 경향이 있었다.

[0163] 실시예 4

[0164] 통각과민에 미치는 항-NGF 단일클론 항체의 효과

[0165] NGF가 유도한 열과민증에 미치는 항-NGF 항체의 효과를 조사하였다. 간략히 설명하면, 성숙한 피셔(Fischer) 래트 암컷을 치료하기 적어도 2일 전부터 하그리브스 시험(Hargreaves' test)을 통해 매일 2회씩 훈련시켰다. 장치와 프로토콜에 친숙하게 한 후, 동물을 무작위로 대조군 또는 실험군으로 분할하였다. 두 그룹을 기본 반응성에 대해 시험한 후, 이소플루오란 마취 하에 한쪽 앞발에 주사액  $50\mu\text{l}$ 를 발바닥내로 투여하였다. 각 그룹의 주사액은 1.25% 카라기난과 함께 항-NGF 항체  $90\mu\text{g}$  또는 무관한 이소타입 정합형 대조 항체  $90\mu\text{g}$ 을 함유한 것이다.

[0166] 하그리브스 시험을 이용하여 주사 후 0시간, 2시간, 4시간, 6시간 및 24시간째 열 저하 잠복기를 측정하였다. 도 12에서 관찰되듯이, 처리 후 4시간 및 6시간째, 카라기난 주사 후 열과민증이 대조 동물에 비해 항-NGF 단일클론 항체 911 처리 동물에서 크게 감소하였다.

[0167] 실시예 5

[0168] 알러겐에 대한 반응에 미치는 항-NGF 단일클론 항체의 효과

[0169] C57/BL6 마우스 수컷(Jackson Laboratories)에게 단일클론 항-NGF 항체 911 ( $n=16$ ) 또는 이소타입 정합형 항gD 대조 항체 (클론 1766;  $n=16$ )를 처리하였다. -1일 째, 마우스에게 항체  $20\text{ mg/kg}$ 를 처치하고, 6일, 13일, 20일 및 22일째 항체  $10\text{ mg/kg}$ 을 처치하였다. 모든 항체 처치는 목덜미에 피하 주사로 실시하였다.

[0170] 0일 및 14일 째, 각 그룹의 마우스 절반은 집먼지진드기 항원(DMA; 돌베코 PBS로 희석한 뒤 보조제로서 ALUM에 1:2로 희석하여, 최종 농도  $300\text{ AU/ml}$ 로 만든)  $30\text{AU}$ 를 복강내 주사하여 감작(SN)시켰다. 무감작된 마우스(NS)에게는 대조군으로서 ALUM으로 1:2 희석한 돌베코 PBS 동량을 투여하였다.

[0171] 그 다음, 21일과 22일 째 마우스에게 집먼지진드기 항원(DMA)을 흡입 투여했다. 집먼지진드기 항원은 분무화를 위해 돌베코 PBS + 0.01% Tween-20을 사용하여  $6000\text{ AU/ml}$ 로 희석하였다. 모든 흡입 투여는 플렉시글라스 파이노출실에서 실시하였다. DMA는 22 PSI 하에 작동되는 PARI IS-2 분무기를 사용하여 분무하였다. 분무기에는 3 ml을 충전한 뒤 종료시까지 작동시켰다(30분). 1회 노출 시 폐로 흡입된 총 침착 용량은 약  $6.5\text{AU DMA}$ 였다.

[0172] 마우스의 기도 과다반응, 세기관지 세척액(BAL) 중으로의 세포 침윤, BAL 중의 사이토킨 농도 및 집먼지진드기에 대한 혈청 역가 및 혈청 IgE 농도를 측정하였다. 간략히 설명하면, 24일 째, 최종 항원 투여 후 48시간 후 마우스를 마취하고 경정맥에 카테터를 삽입한 뒤 기관절개하였다. 그 다음, 판쿠로늄  $0.28\text{ mg/kg}$ 으로 마우스를 마비시키고 플렉시글라스 유량 체적변동측정기에 넣어 흉부 팽창과 기도 압력을 측정하였다.  $170\text{ bpm}$ 의 맥박수와  $9\mu\text{l /g}$ 와 동등한  $V_t$ 에서 100% 산소를 사용하여 마우스에게 공기를 불어넣었다. 호흡 역학(폐 저항 및 동적 탄성)은 북스코(Buxco XA) 데이터 획득 프로그램을 사용하여 연속 모니터링하였다. 마우스에게 용량 이력( $2.5 \times V_t$ 에서 5회 호흡)을 제공하고, 기초값을 측정하기 2분 전에 안정화시킨 뒤, 하바드 주사기 펌프와 주사기 적용 소프트웨어를 사용하여 체중별로 조정된 유속에서 아고니스트 5초 용량을 1회분으로 투여하였다.

[0173] 혈액(혈청), BAL 및 폐를 수집하였다. 혈청에 대해서는 전체 및 특정 IgE 및 IgG를 분석하였다. BAL은 동량의 NaCl을 3회 주사하여 수득한 뒤 ELISA로 총 IgE에 대해 분석하였다. BAL 세포에서 총 백혈구와 세포 차이를 수득하였다.

[0174] 항-NGF 단일클론 항체 치료는 기도 과다반응(도 13) 뿐만 아니라 BAL로의 세포 침윤에 의해 측정되는 염증의 유의적 저하(도 14)를 유도하였다. 하지만, 항-NGF 처리 동물 유래의 BAL에는 호산구가 여전히 매우 높은 비율로 존재하였다(도 15). 항-NGF 항체 처치는 또한 BAL 중의 Th2 사이토킨 IL-13의 농도를 감소시켰다(도 16).

[0175] 알러겐에 대한 염증 반응을 감소시키는 능력은 있지만, 항-NGF 항체 처치는 집먼지진드기에 대한 총 혈청 면역 글로불린 역가(도 17) 또는 IgE의 혈청 농도(도 18)에 의해 측정되는 바와 같이 집먼지진드기에 대한 체액 면역 반응은 감소시키지 않았다. 이것은 이 항체가 NGF의 생물학적 효과는 차단시키지만 B 림프구의 생존이나 기능에는 영향을 미치지 않음을 시사한다.

[0176] 항-NGF 항체 911이 NGF에 대해 기능적으로 유의적인 효과가 있음을 확인하기 위하여, 1일과 8일째 항-NGF 단일 클론 항체 911 0.1, 1 또는 10 mg/kg, 또는 1일, 3일, 6일 및 8일째 NGF 0.1, 1 또는 10 mg/kg을 마우스 모델 미로 피하 주사하는 실험을 함께 실시하였다. 9일째 동물을 죽이고 삼차신경절내의 뉴로펩타이드 CGRP 농도를 조사하였다. 1 또는 10 mg/kg의 NGF 처치는 CGRP를 증가시켰으며, 이것은 이 펩타이드가 NGF 농도에 의해 조절된다는 것을 입증하는 것이다(도 19). 1 또는 10 mg/kg의 항-NGF 단일클론 항체 911 처치는 상기 신경절의 CGRP 함량을 감소시켰으며(도 19), 이로써 상기 용량에 의해 전술한 실험에서 면역 반응이 일어나는 시기에 내인성 NGF가 유의적으로 기능적 봉쇄됨이 입증되었다.

도면

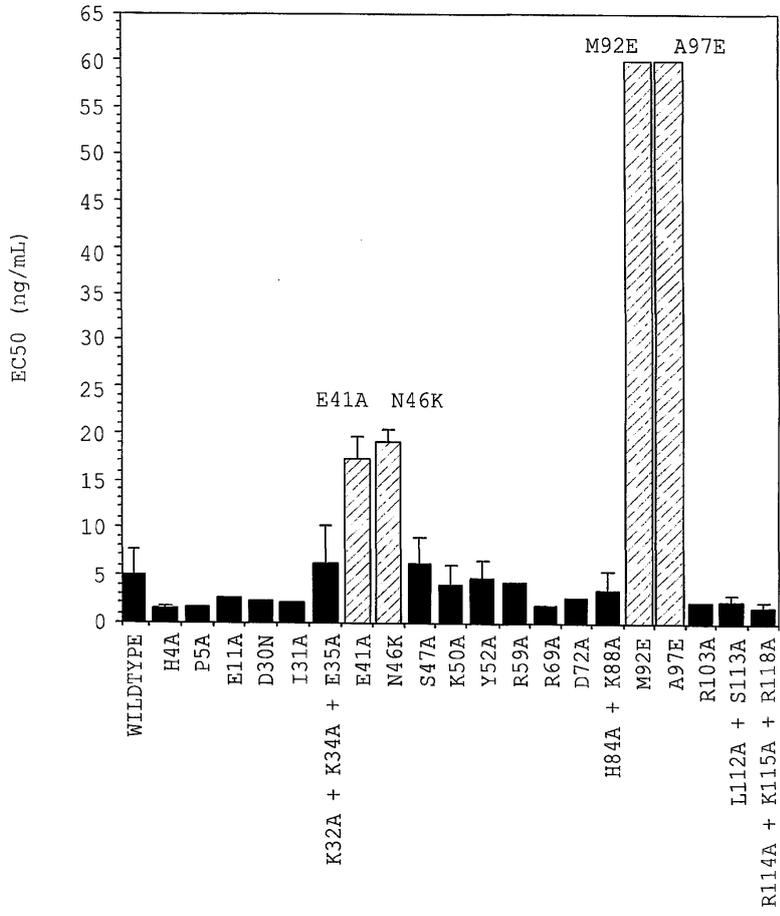
도면1

상동체 주사 돌연변이유발법에 의한 MAb 결합 영역의 동정

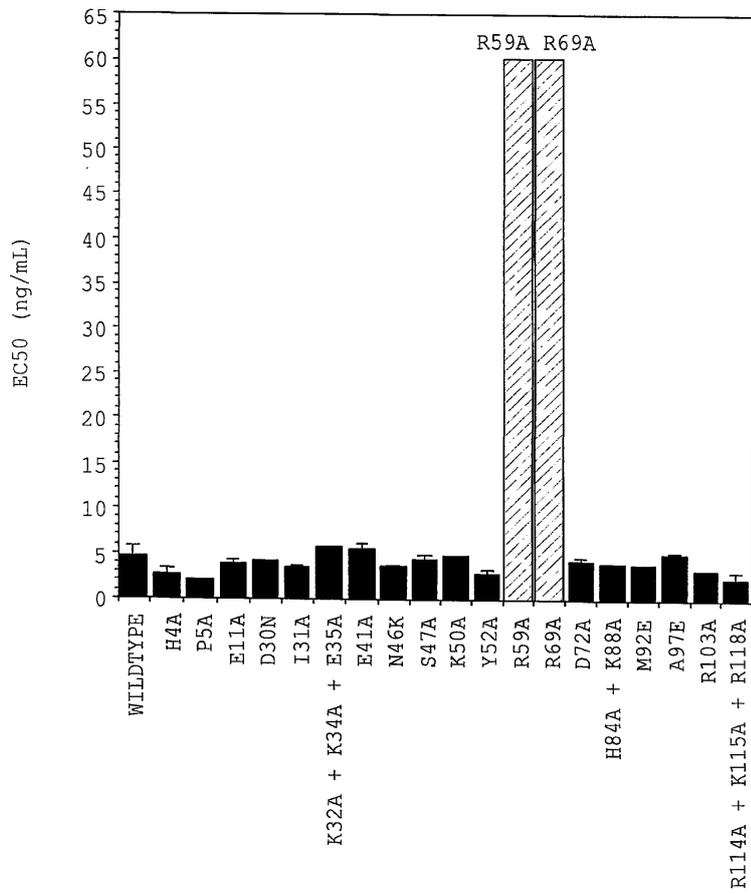
아생형	돌연변이체 NGF → NT3 도입된 돌연변이		돌연변이된 영역					
	부	영역	908 <sup>d</sup>	909	911	912	938	14.14
6	S1Y, S2A, S3E, P5K, I6S, F7S	N-말단	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
20	V18E, V20L, G23T	Pre-V-1 (β - 시트 A)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(++)	(+++)
19	T26S, T27S, T29I, K32R, K34H, E35Q	V-1 (β - 헤어핀 띠 A' - A'')	(+/++)	(+++)	(++)	(+/++)	(++)	(+++)
12	V42I, N43K, 144T, N45G, V48P, F49V	V-2 (β-헤어핀 띠 A'''-B)	(-)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
7	R59K, D60E, P61A, N62R, D65K, S66N	V-3 (β-리버스 띠 B-C)	(+++)	(-)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
16	Y79Q, T81K, T83S, H84Q, F86I, K88R	V-4 (β - 시트 C)	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	(+++)
8	M92S, D93E, G94N, +N94/95, Q96I, A97V, A98G	V-5 (β - 헤어핀 띠 C-D)	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)
23	A116I, V117G, R119E, R120(-)	C-말단	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+)	(+++)

<sup>a</sup> 돌연변이명은 돌연변이가 제조된 순서대로 지정하였다. <sup>b</sup> hNGF 잔기를 hNT3의 비상동성 잔기들로 치환시켰다. 돌연변이는 제시된 위치 번호의 바로 다음 잔기로 치환된 잔기들(1문자 기호 및 위치 번호)에 기초하고 있다. <sup>c</sup> hNGF의 각 가변 영역은 각 MAb의 결합 특이성을 측정하기 위하여 돌연변이시켰다. <sup>d</sup> NGF/NT-3 동족체 주사형 돌연변이체들에 대한 6개 MAb 각각의 상대적 결합능을 아생형 hNGF의 결합능과 비교하였다: (-), <10%; (+), 10 내지 30%; (++) , 30 내지 60%; (+++) , 60 내지 100%. hNGF에 대한 각 MAb의 결합능을 나타내는 EC<sub>50</sub>은 다음과 같다: MAb 908, 1.8 x 10<sup>-10</sup> M; MAb 909, 1.8 x 10<sup>-10</sup> M; MAb 911, 3.7 x 10<sup>-10</sup> M; MAb 912, 1.8 x 10<sup>-10</sup> M; MAb 938, 7.4 x 10<sup>-10</sup> M; MAb 14.14, 5.9 x 10<sup>-10</sup> M.

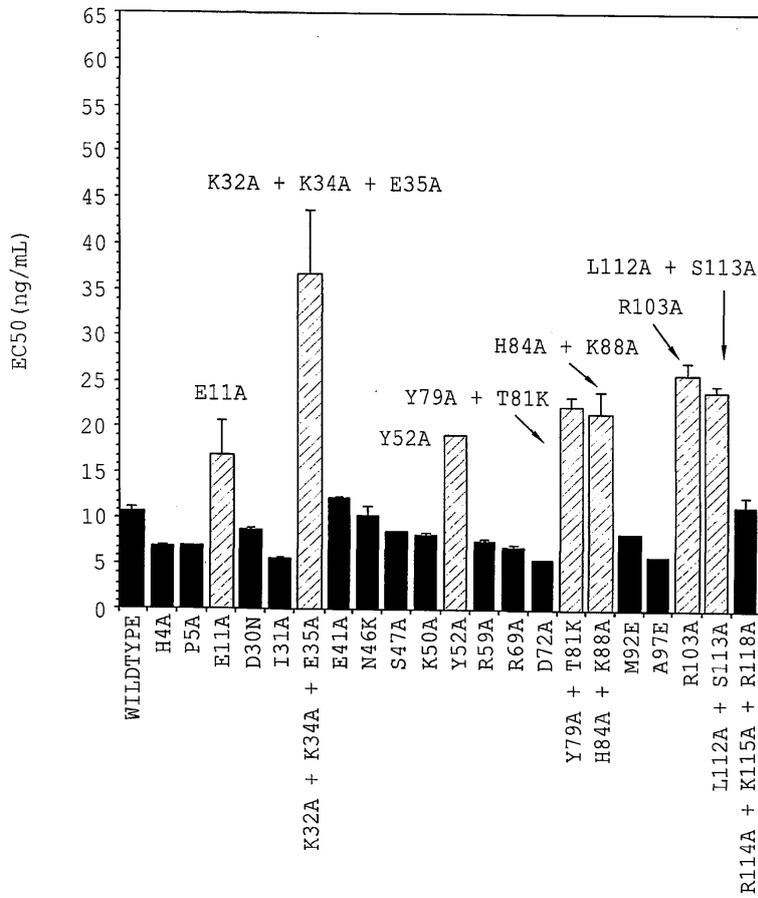
도면2a



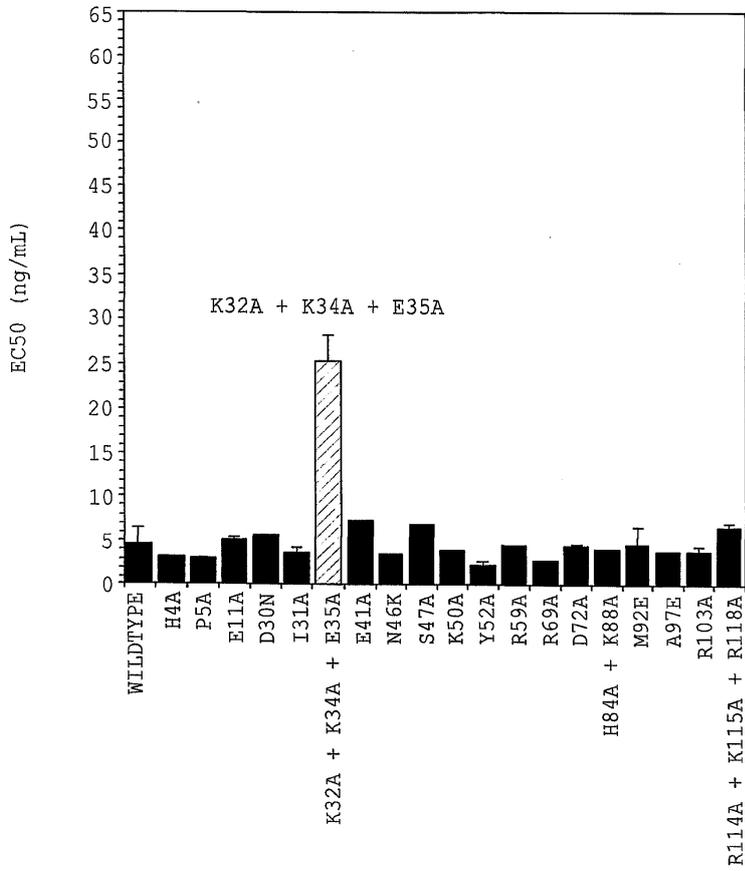
도면2b



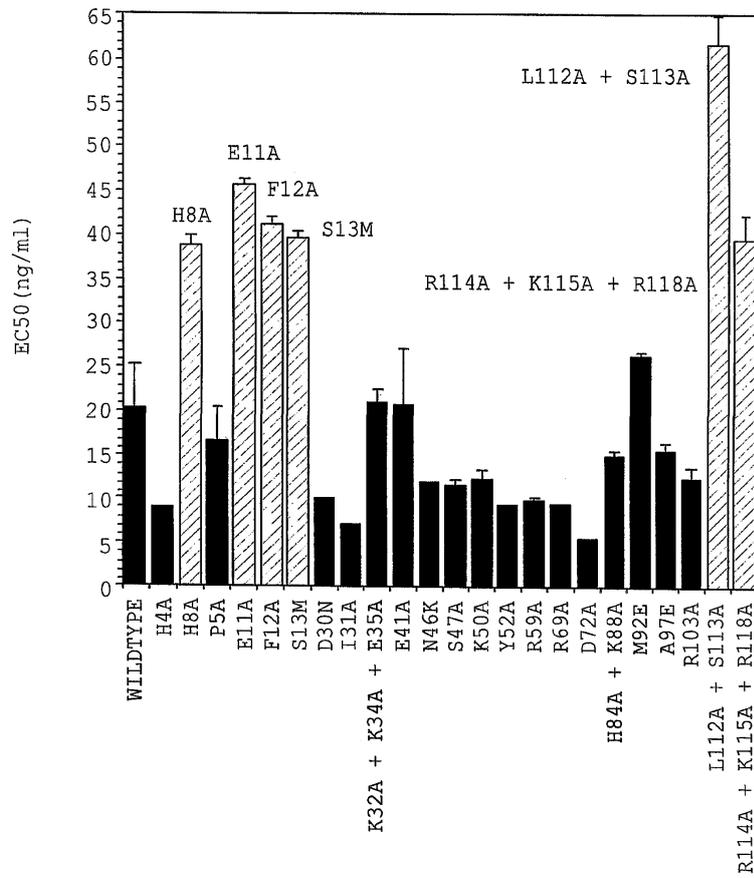
도면2c



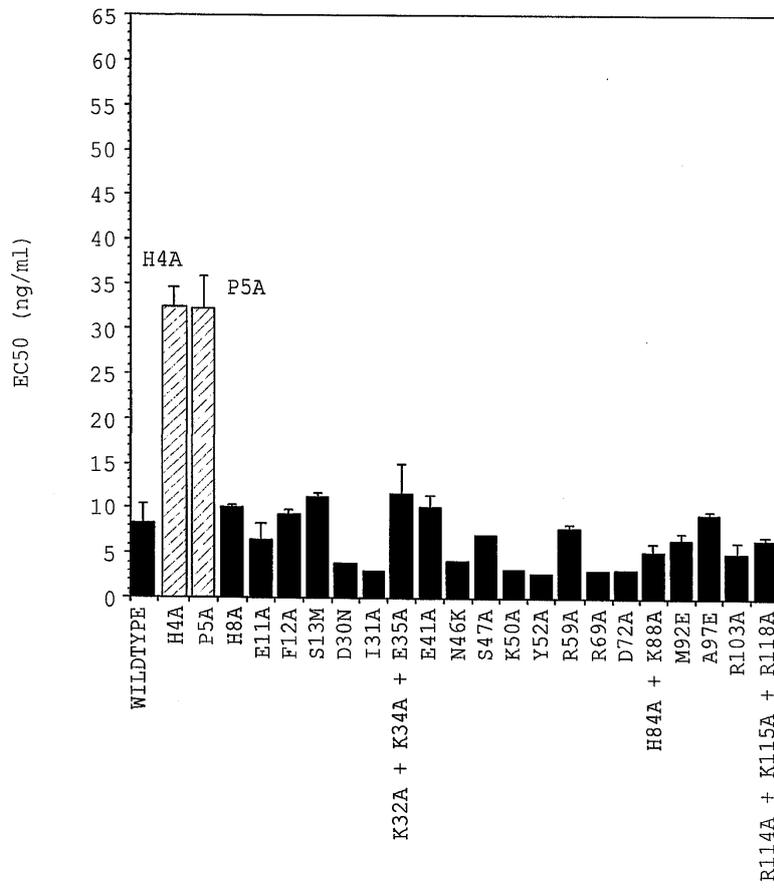
도면2d



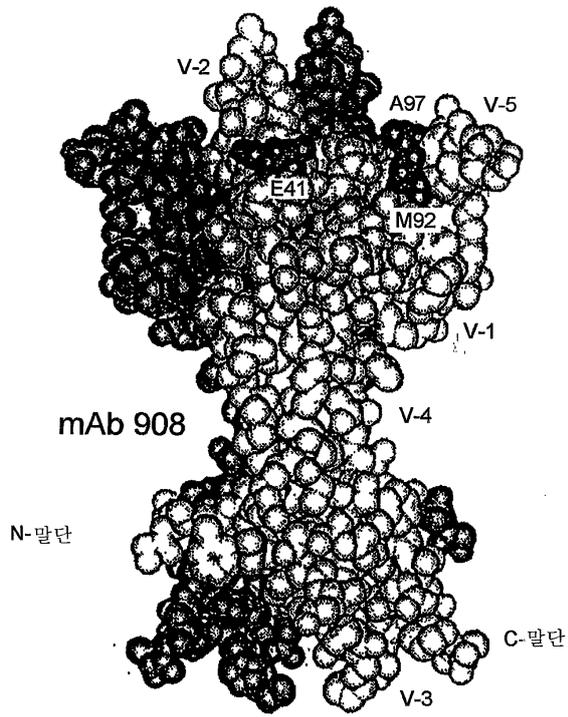
도면2e



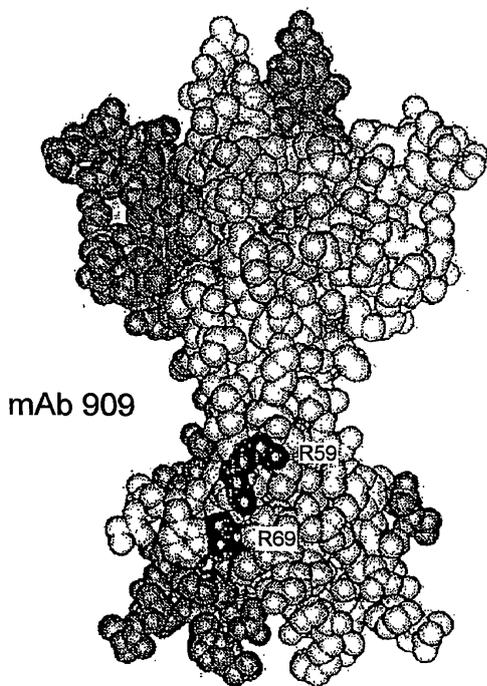
도면2f



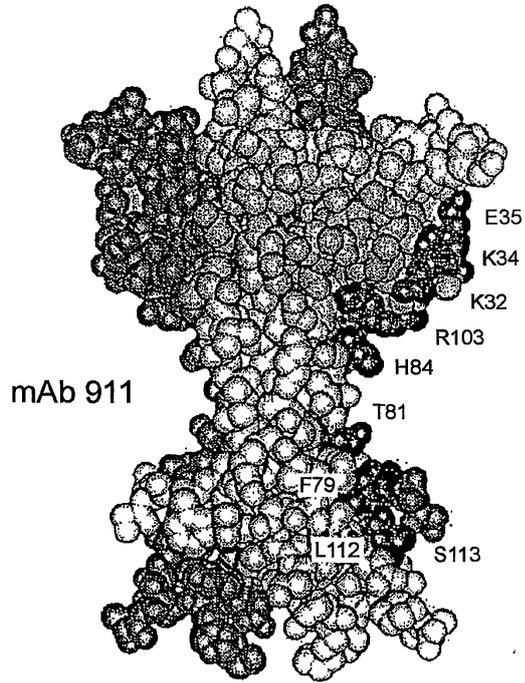
도면3a



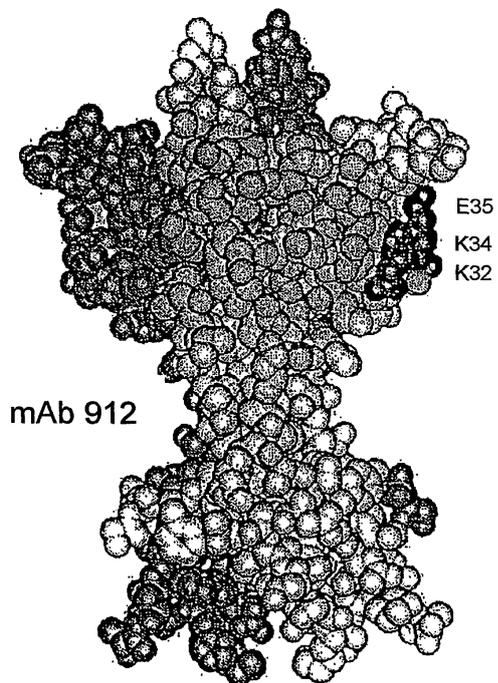
도면3b



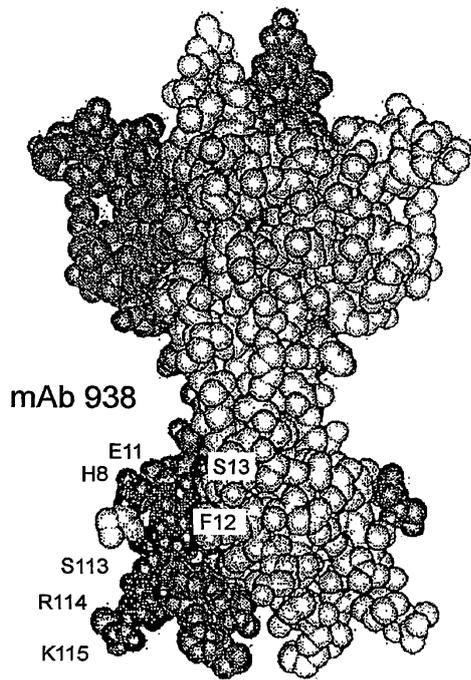
도면3c



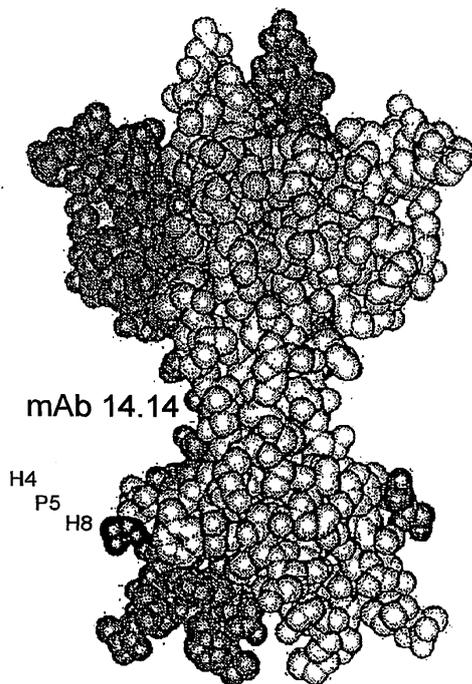
도면3d



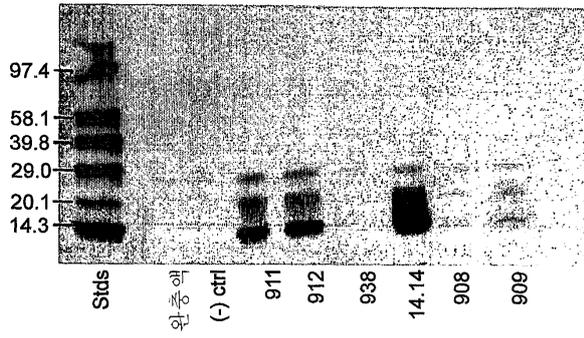
도면3e



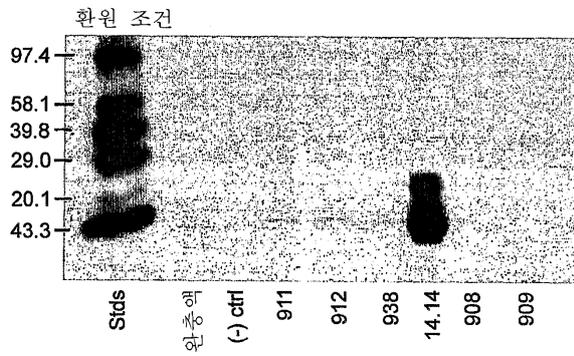
도면3f



도면4a



도면4b

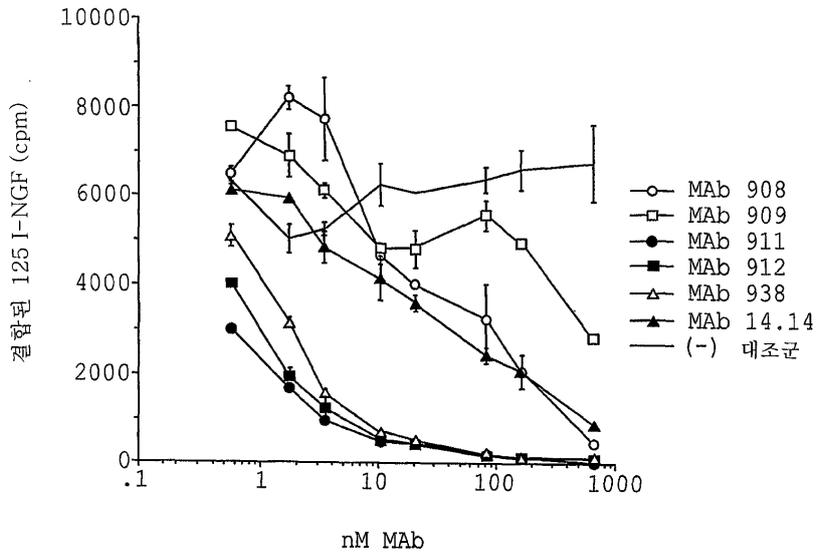


도면5

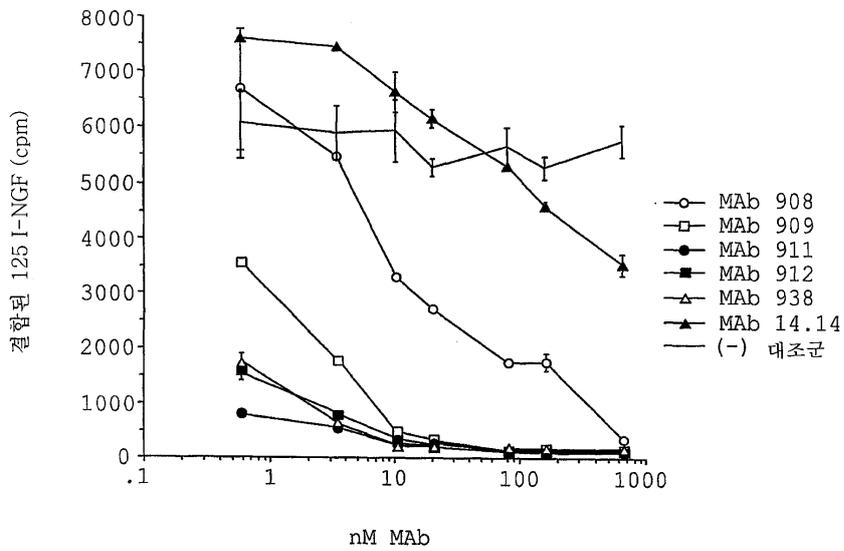
MAB 에피토프 맵핑 결과 요약

MAB	NGF 결합 영역 점 돌연변이	TKA 결합 부위 NGF/TKA 구조 <sup>a</sup>	D75 결합 부위 NGF-3 돌연변이유발 <sup>b</sup>	TKA 차단 활성	D75 차단 활성
908	M92, M97, E41, N46	무	무	(+/-)	(+/-)
909	R59, R69	무	유	(-)	(++)
911	다양	유	유	(++)	(++)
912	다양	무	유	(++)	(++)
938	L112/S113	유	유	(++)	(+)
14.14	H4, P5	유	무	(+/-)	(-)

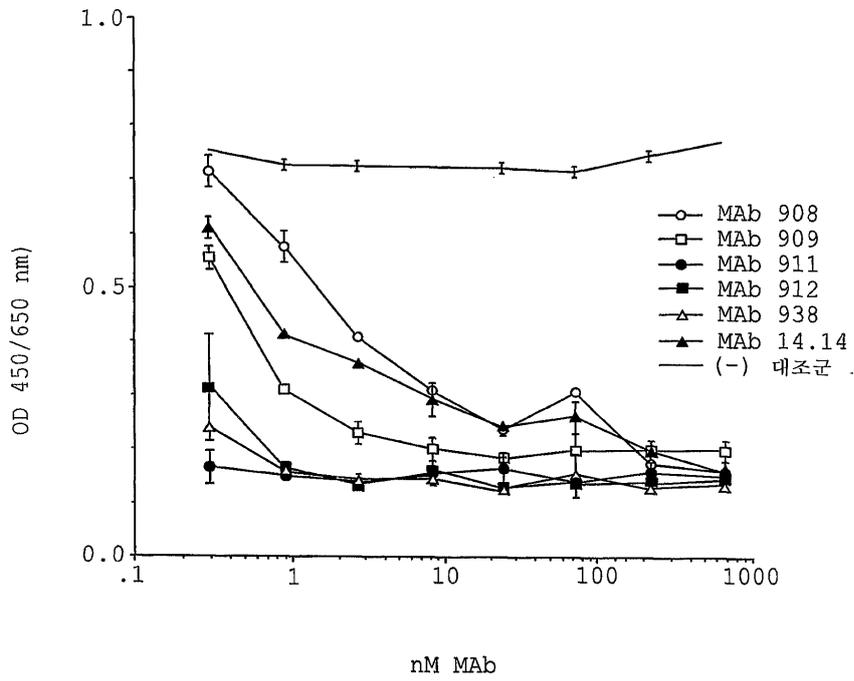
도면6



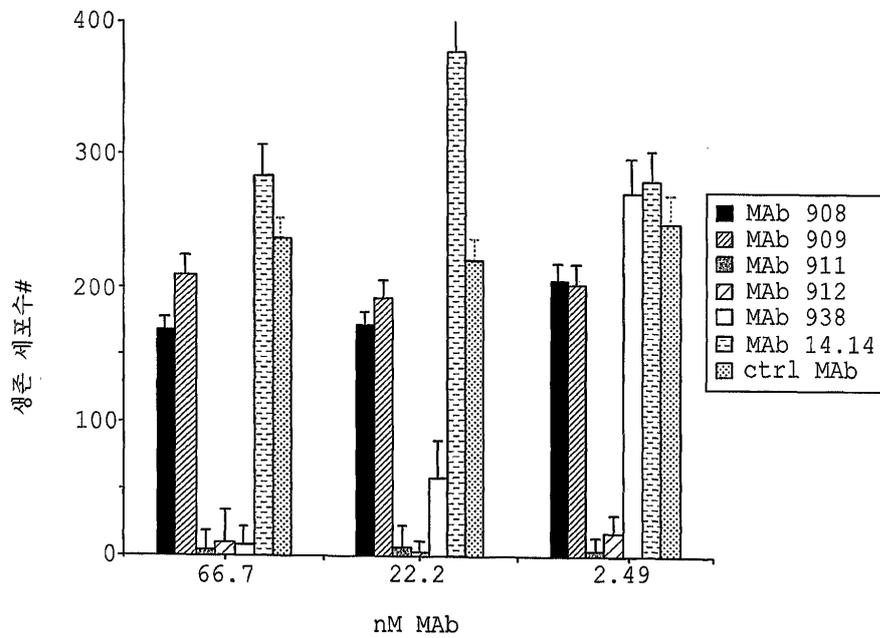
도면7



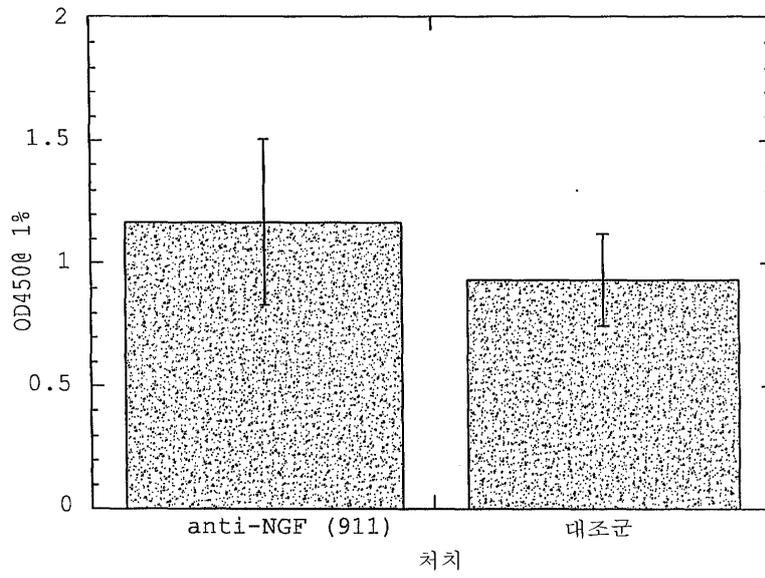
도면8



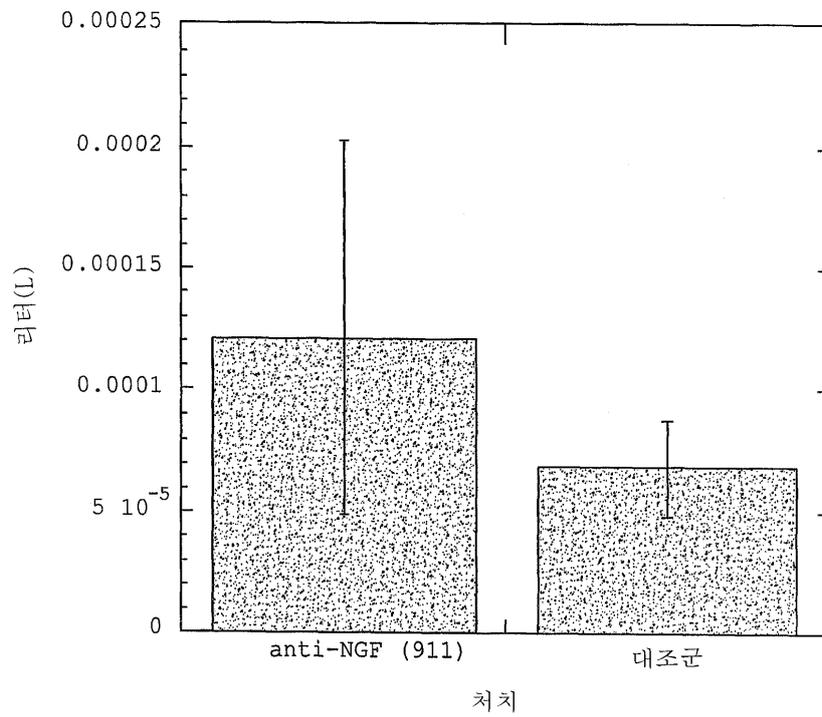
도면9



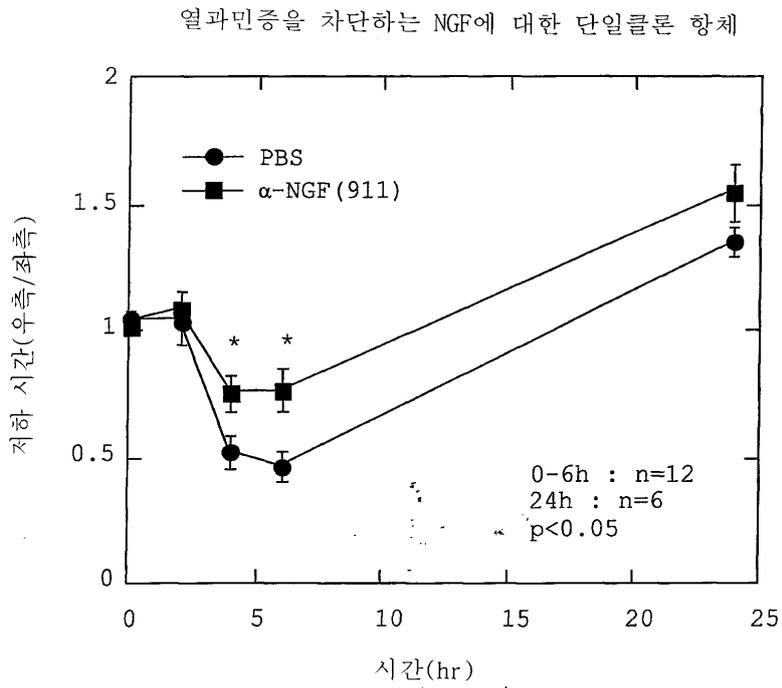
도면10



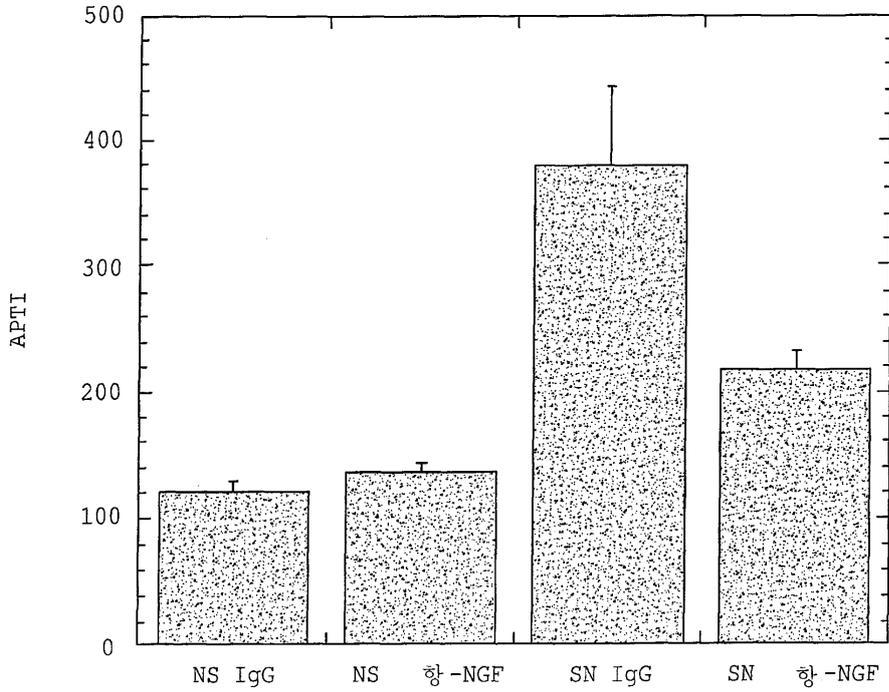
도면11



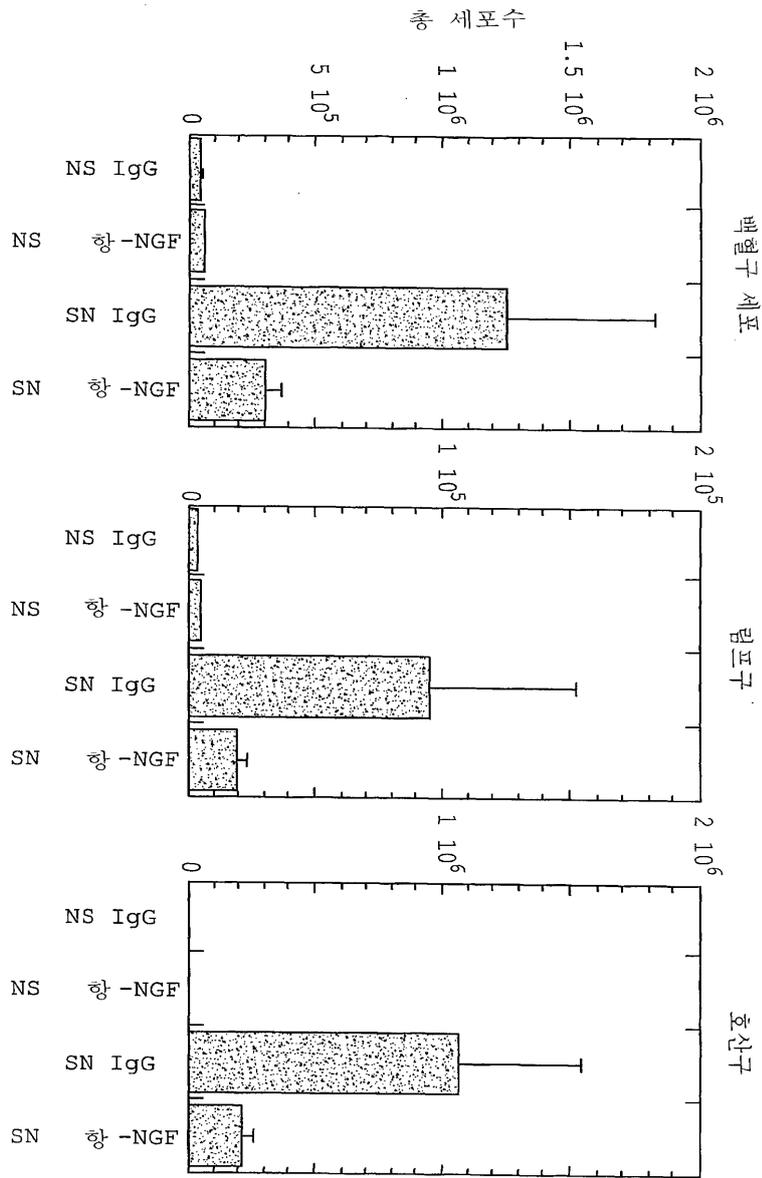
도면12



도면13

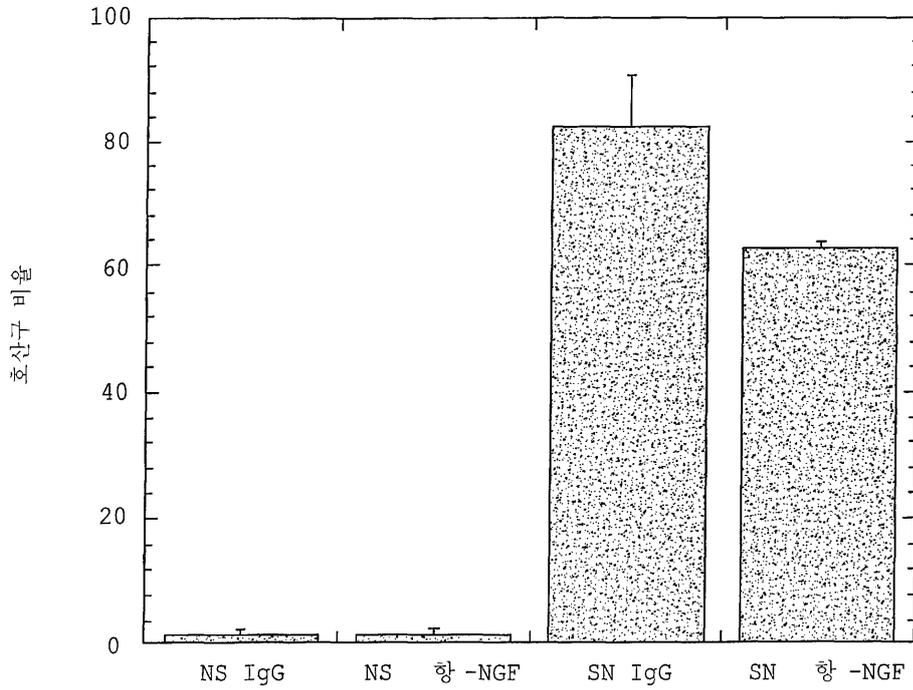


도면14



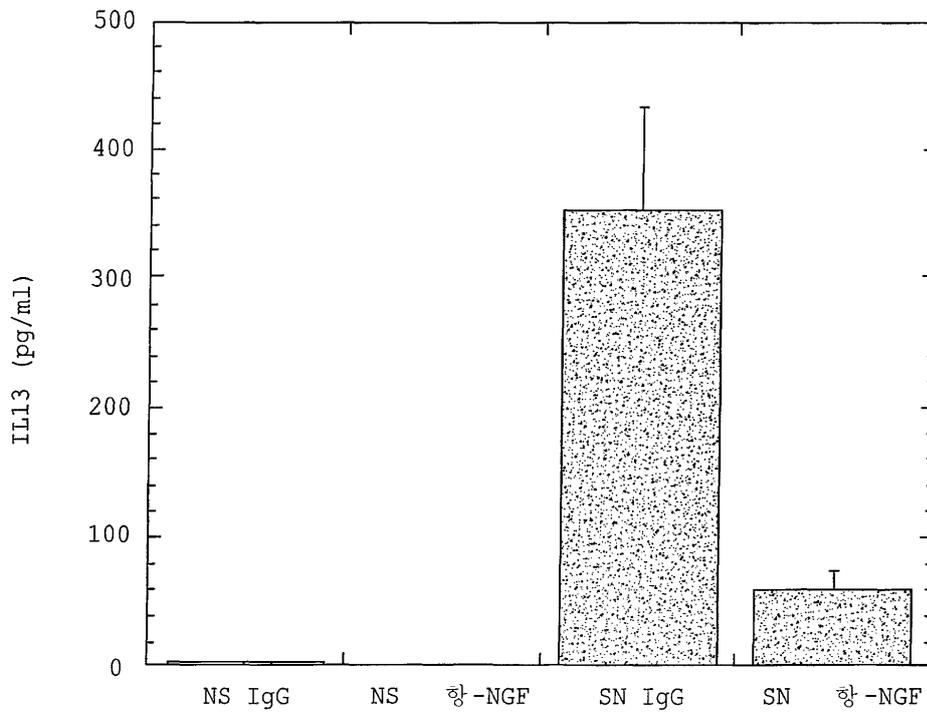
도면15

항NGF 동물의 BAL에 매우 다량으로 유지되는 호산구



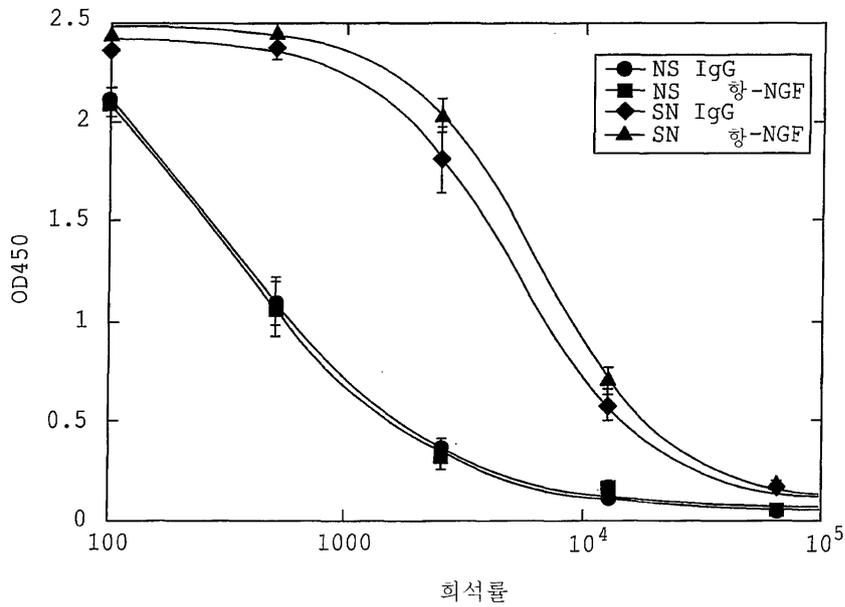
도면16

BAL IL-13 증가를 약화시키는 항NGF



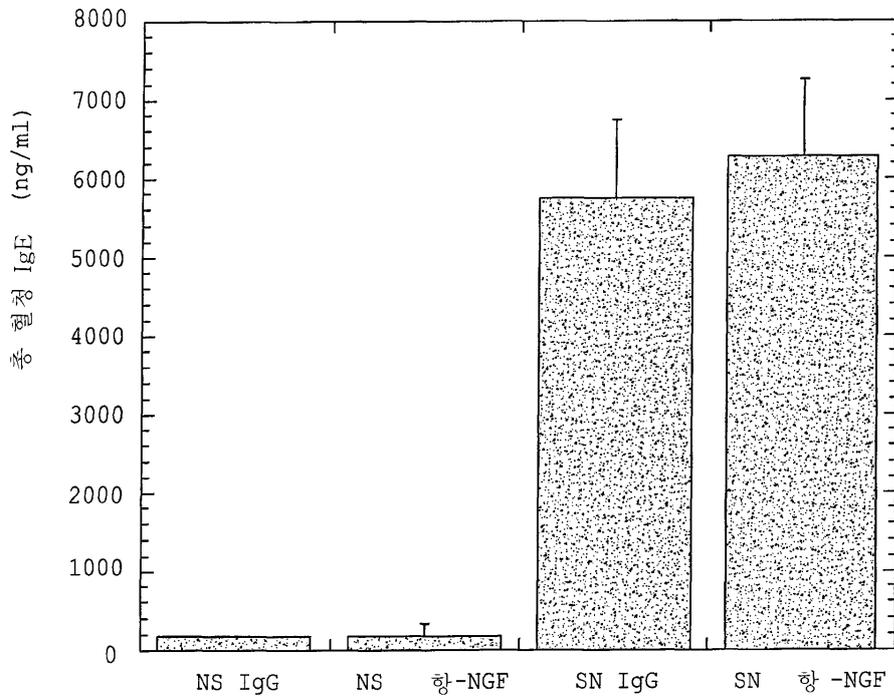
도면17

집먼지진드기 항원에 대한 체액면역반응을 억제하지 않는 항NGF



도면18

혈청 IgE를 감소시키지 않는 항NGF



도면19

삼차신경절의 CGRP 함량을 증가시키는 NGF 처치  
 및 삼차신경절의 CGRP 함량을 감소시키는 항NGF 처치

