

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480026242.2

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12N 15/68 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 10 月 18 日

[11] 公开号 CN 1849138A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 35/00 (2006.01)

[22] 申请日 2004.7.15

[21] 申请号 200480026242.2

[30] 优先权

[32] 2003.7.15 [33] US [31] 60/487,431

[86] 国际申请 PCT/US2004/022876 2004.7.15

[87] 国际公布 WO2005/019266 英 2005.3.3

[85] 进入国家阶段日期 2006.3.13

[71] 申请人 安姆根有限公司

地址 美国加利福尼亚州

共同申请人 米德列斯公司

[72] 发明人 K·D·小维尔德

J·J·S·特里诺尔 H·黄

H·伊诺埃 T·J·张 F·马丁

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 王景朝

权利要求书 23 页 说明书 86 页 序列表 70 页
附图 12 页

[54] 发明名称

作为选择性 NGF 途径抑制剂的人抗 NGF 中和
抗体

[57] 摘要

本发明提供了与人神经生长因子(NGF)相互作用或结合并因此中和 NGF 功能的抗体。本发明还提供了所述抗体的药物组合物,及通过给予药物有效量的抗 NGF 抗体来中和 NGF 的功能、特别是治疗 NGF 相关病症(例如慢性疼痛)的方法。本发明也提供了用抗 NGF 抗体检测样品中 NGF 的量的方法。

1. 一种特异性结合 NGF 的分离人抗体, 其中所述抗体包含具有重链可变区的重链和轻链可变区, 其中所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 10 表示的氨基酸序列有至少 80% 序列一致性的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

2. 权利要求 1 的抗体, 其中所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 12 表示的氨基酸序列有至少 90% 序列一致性的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

3. 权利要求 1 的抗体, 其中所述轻链包含人轻链 CDR1, 所述 CDR1 具有与 SEQ ID NO: 24 表示的氨基酸序列有至少 85% 一致性的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

4. 权利要求 1 的抗体, 其中所述轻链包含人轻链 CDR3, 所述 CDR3 具有与 SEQ ID NO: 16 表示的氨基酸序列有至少 85% 一致性的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

5. 权利要求 1 的抗体, 其中所述重链包含的重链可变区包含与 SEQ ID NO: 10 表示的氨基酸序列有至少 90% 一致性的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

6. 权利要求 1 的抗体, 其中所述重链包含人重链 CDR2, 所述 CDR2 具有与 SEQ ID NO: 18 表示的氨基酸序列有至少 80% 一致性的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

7. 权利要求 1 的抗体, 所述抗体包含:

(a) 具有重链可变区的重链, 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 10 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段, 和具有轻链可变区的轻链, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 12 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段;

(b) 具有重链可变区的重链, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 14

表示的氨基酸序列，或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段，和具有轻链可变区的轻链，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 16 表示的氨基酸序列，或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段；

5 (c) 具有重链可变区的重链，所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 18 表示的氨基酸序列，或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段，和具有轻链可变区的轻链，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 16 表示的氨基酸序列，或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段；或者

10 (d) 具有重链可变区的重链，所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 22 表示的氨基酸序列，或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段，和具有轻链可变区的轻链，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 16 表示的氨基酸序列，或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

15 8. 权利要求 1 的抗体，其中所述重链包含的重链可变区具有 SEQ ID NO: 10 表示的氨基酸序列，或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段，所述轻链包含的轻链可变区具有 SEQ ID NO: 12 表示的氨基酸序列，或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

20 9. 权利要求 1 的抗体，其中所述重链包含可变区和恒定区，其中所述可变区包含 SEQ ID NO: 10 表示的氨基酸序列，或其抗原结合或免疫原性片段。

10. 权利要求 9 的抗体，其中所述重链包含任何 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 22 表示的氨基酸序列，或其抗原结合或免疫原性片段。

25 11. 权利要求 1 的抗体，其中所述轻链包含可变区和恒定区，其中所述可变区包含 SEQ ID NO: 12 表示的氨基酸序列，或其抗原结合或免疫原性片段。

12. 权利要求 11 的抗体，其中所述重链包含 SEQ ID NO: 16 表示

的氨基酸序列，或其抗原结合或免疫原性片段。

13. 权利要求 1 的抗体，所述抗体包含：

a. 人重链框架区、人重链 CDR1 区、人重链 CDR2 区和人重链 CDR3 区，其中所述人重链 CDR3 区是 SEQ ID NO: 14 所示的重链 CDR3 区；

b. 人轻链框架区、人轻链 CDR1 区、人轻链 CDR2 区和人轻链 CDR3 区，其中所述人轻链 CDR3 区是 SEQ ID NO: 16 所示的轻链 CDR3 区。

14. 权利要求 13 的分离人抗体，其中所述人重链 CDR2 区是 SEQ ID NO: 18 所示的重链 CDR2 区，所述人轻链 CDR2 区是 SEQ ID NO: 20 所示的轻链 CDR2 区。

15. 权利要求 13 的分离人抗体，其中所述人重链 CDR1 区是 SEQ ID NO: 22 所示的重链 CDR1 区，所述人轻链 CDR1 区是 SEQ ID NO: 24 所示的轻链 CDR1 区。

16. 权利要求 13 的抗体，其中所述抗体以约 1×10^{-9} 或更低的 K_D 与人 NGF 多肽解离，在标准的体外试验中以约 1×10^{-8} M 或更低的 IC_{50} 中和人 NGF 生物活性。

17. 权利要求 16 的抗体，其中所述抗体以约 1×10^{-10} 或更低的 K_D 与人 NGF 多肽解离，在标准的体外试验中以约 1×10^{-9} M 或更低的 IC_{50} 中和人 NGF 生物活性。

18. 权利要求 17 的抗体，其中所述抗体以约 1×10^{-11} 或更低的 K_D 与人 NGF 多肽解离，在标准的体外试验中以约 0.2×10^{-9} M 或更低的 IC_{50} 中和人 NGF 生物活性。

19. 权利要求 1 的抗体，其中所述重链和轻链通过柔性连接基团连接，形成单链抗体。

20. 权利要求 19 的抗体，所述抗体是单链 Fv 抗体。

21. 权利要求 1 的抗体，所述抗体是 Fab 抗体。

22. 权利要求 1 的抗体，所述抗体是 Fab' 抗体。

23. 权利要求 1 的抗体, 所述抗体是(Fab')₂ 抗体。

24. 权利要求 1 的抗体, 其中所述抗体是完全人抗体。

25. 权利要求 1 的抗体, 其中所述抗体抑制 NGF 信号传导。

26. 一种治疗患者中疾病的方法, 所述疾病由 NGF 的表达增加或
5 对 NGF 的敏感性提高导致, 所述方法包括给予患者药物有效量的权利
要求 25 的抗体。

27. 权利要求 26 的方法, 其中所述疾病是急性痛、牙痛、外伤导
致的疼痛、外科手术疼痛、截肢或脓肿导致的疼痛、灼痛、脱髓鞘病、
三叉神经痛、癌症、慢性酒精中毒、中风、丘脑痛综合征、糖尿病、
10 获得性免疫缺陷综合征(“AIDS”)、毒素、化疗、一般性头痛、偏头
痛、丛集性头痛、混合型血管或非血管综合征、紧张性头痛、一般炎
症、关节炎、风湿病、狼疮、骨关节炎、纤维肌痛、炎性肠病、过敏
性肠综合征、炎性眼病、炎性或不稳定性膀胱功能障碍、牛皮癣、炎
性组分造成的皮肤不适、晒伤、心炎、皮炎、肌炎、神经炎、胶原血
15 管病、慢性炎性 疾病、炎性疼痛及相关痛觉过敏和异常性疼痛、神经
性疼痛及相关痛觉过敏和异常性疼痛、糖尿病性神经性疼痛、灼痛、
交感神经维持的疼痛、传入神经阻滞综合征、哮喘、上皮组织损伤或
功能紊乱、单纯疱疹、在呼吸、泌尿生殖、胃肠或者血管区域的内脏
活动障碍、创伤、烧伤、过敏性皮肤反应、瘙痒、白癜风、一般性胃
20 肠机能紊乱、结肠炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、血管舒缩性或过敏性
鼻炎或者支气管病、痛经、消化不良、胃食管反流、胰腺炎或内脏痛。

28. 一种药物组合物, 所述药物组合物包含药物可接受的载体和
治疗有效量的权利要求 25 的抗体。

29. 一种治疗患者中疾病的方法, 所述疾病由 NGF 的表达增加或
25 对 NGF 的敏感性提高导致, 所述方法包括给予患者权利要求 28 的
药物组合物。

30. 一种检测生物样品中的 NGF 的方法, 所述方法包括:

a. 在能让抗体结合 NGF 的条件下使样品与权利要求 1 的抗体接

触;

b. 测量样品中结合抗体的水平。

31. 一种特异性结合神经生长因子的分离人抗体, 所述抗体包含重链和轻链, 其中所述重链包含的重链可变区包含 SEQ ID NO: 10、
5 SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 81、SEQ ID NO: 83、SEQ ID NO: 85 或 SEQ ID NO: 87 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

32. 权利要求 31 的抗体, 其中所述重链包含的重链可变区包含与任何 SEQ ID NO: 81、SEQ ID NO: 83、SEQ ID NO: 85、SEQ ID NO: 87
10 或 SEQ ID NO: 79 表示的氨基酸序列有至少 90%一致性的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

33. 一种特异性结合 NGF 的分离人抗体, 所述抗体包含重链和轻链, 其中所述轻链包含的轻链可变区包含 SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 82、SEQ ID NO: 84、SEQ ID NO: 86、SEQ ID NO: 88、SEQ ID NO: 89、SEQ ID NO: 90、SEQ ID NO: 91 或 SEQ ID NO: 131
15 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

34. 权利要求 33 的分离人抗体, 其中所述轻链包含的轻链可变区包含与任何 SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 88、SEQ ID NO: 89、SEQ ID NO: 90、SEQ ID NO: 91、SEQ ID NO: 82、SEQ ID NO: 84、SEQ ID NO: 86 或 SEQ ID NO: 131 表示的氨基酸序列有至少 85%
20 一致性的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

35. 权利要求 33 的抗体, 其中所述轻链包含的轻链可变区包含如下氨基酸序列:
25

a. 与 SEQ ID NO: 80 表示的氨基酸序列有至少 89%或 94%的一致性的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段;

b. 与 SEQ ID NO: 88 表示的氨基酸序列有至少 91%或 94%的一

致性的氨基酸序列，或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段；

c. 与 SEQ ID NO: 89 表示的氨基酸序列有至少 86%或 87%的一致性的氨基酸序列，或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段；

5 d. 与 SEQ ID NO: 90 表示的氨基酸序列有至少 87%、91%或 94%的一致性的氨基酸序列，或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段；

e. 与 SEQ ID NO: 91 表示的氨基酸序列有至少 86%、94%、96%或 99%的一致性的氨基酸序列，或其抗原结合片段或免疫功能性免疫
10 球蛋白片段；

f. 与 SEQ ID NO: 82 表示的氨基酸序列有至少 91%、95%或 96%的一致性的氨基酸序列，或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段；

g. 与 SEQ ID NO: 84 表示的氨基酸序列有至少 86%、94%、95%、
15 98%或 99%的一致性的氨基酸序列，或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段；

h. 与 SEQ ID NO: 86 表示的氨基酸序列有至少 86%、94%、95%、98%或 99%的一致性的氨基酸序列，或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段；或者

20 i. 与 SEQ ID NO: 131 表示的氨基酸序列有至少 86%、89%、91%或 96%的一致性的氨基酸序列，或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

36. 一种特异性结合 NGF 的分离人抗体，所述抗体包含重链和轻链，其中所述重链包含任何 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:18、SEQ ID
25 NO:22、SEQ ID NO: 92、SEQ ID NO: 93、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO: 99、SEQ ID NO: 100、SEQ ID NO: 104、SEQ ID NO: 105、SEQ ID NO: 106、SEQ ID NO: 110、SEQ ID NO: 111、SEQ ID NO: 112、SEQ ID NO: 116、SEQ ID NO: 117 或 SEQ ID NO: 118 表示的氨

基酸序列，或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

37. 权利要求 36 的分离人抗体，其中所述重链包含人重链 CDR2，其中所述重链 CDR2 是与 SEQ ID NO: 99、SEQ ID NO: 106、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 111 表示的氨基酸序列有至少 80%一致性的氨基酸
5 序列，或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

38. 一种特异性结合 NGF 的分离人抗体，所述抗体包含重链和轻链，其中所述轻链包含任何 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 95、SEQ ID NO: 96、SEQ ID NO: 97、SEQ ID NO: 101、SEQ ID NO: 102、SEQ ID NO: 103、SEQ ID NO: 107、SEQ ID NO: 108、SEQ ID NO: 109、SEQ ID NO: 113、SEQ ID NO: 114、SEQ ID NO: 115
10 或者任何 SEQ ID NO: 119-134 表示的氨基酸序列，或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

39. 权利要求 38 的分离人抗体，所述抗体包含人轻链 CDR1，其中所述 CDR1 是与 SEQ ID NO: 101、SEQ ID NO: 95、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 122、SEQ ID NO: 125、SEQ ID NO: 107、SEQ ID NO: 113
15 表示的氨基酸序列有至少 85%一致性的氨基酸序列，或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

40. 权利要求 38 的分离人抗体，所述抗体包含人轻链 CDR3，其中所述 CDR3 是与 SEQ ID NO: 103、SEQ ID NO: 97、SEQ ID NO: 121、SEQ ID NO: 127、SEQ ID NO: 130、SEQ ID NO: 109、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 134 表示的氨基酸序列有至少 85%一致性的氨基酸序列，
20 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

41. 一种特异性结合 NGF 的分离人抗体，所述抗体包含的重链或重链片段包含 CDR3，所述 CDR3 包含选自 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 94、SEQ ID NO: 97、SEQ ID NO: 100、SEQ ID NO: 103、SEQ ID NO: 106、SEQ ID NO: 109、SEQ ID NO: 112、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 121、SEQ ID NO: 124、SEQ ID NO: 127、SEQ ID NO: 130、SEQ ID NO: 134 和其变体的氨基酸序列，其中
25

所述变体包含不超过一个氨基酸置换、插入或缺失。

42. 一种特异性结合 NGF 的分离人抗体, 所述抗体包含与选自 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO: 22 和其变体的序列有
5 至少 90%一致性的氨基酸序列, 其中所述变体包含不超过一个氨基酸置换、插入或缺失。

43. 权利要求 31、33、36、38、41 或 42 的抗体, 其中所述重链和轻链通过柔性连接基团连接, 形成单链抗体。

44. 权利要求 43 的抗体, 所述抗体是单链 Fv 抗体。

10 45. 权利要求 31、33、36、38、41 或 42 的抗体, 所述抗体是 Fab 抗体。

46. 权利要求 31、33、36、38、41 或 42 的抗体, 所述抗体是 Fab' 抗体。

15 47. 权利要求 31、33、36、38、41 或 42 的抗体, 所述抗体是(Fab')₂ 抗体。

48. 权利要求 31、33、36、38、41 或 42 的抗体, 其中所述抗体是完全人抗体。

49. 权利要求 31、33、36、38、41 或 42 的抗体, 其中所述抗体抑制 NGF 的信号传导。

20 50. 一种治疗患者中疾病的方法, 所述疾病由 NGF 的表达增加或对 NGF 的敏感性提高导致, 所述方法包括给予患者药物有效量的权利要求 49 的抗体。

51. 权利要求 50 的方法, 其中所述疾病是急性痛、牙痛、外伤导致的疼痛、外科手术疼痛、截肢或脓肿导致的疼痛、灼痛、脱髓鞘
25 病、三叉神经痛、癌症、慢性酒精中毒、中风、丘脑痛综合征、糖尿病、获得性免疫缺陷综合征(“AIDS”)、毒素、化疗、一般性头痛、偏头痛、丛集性头痛、混合型血管或非血管综合征、紧张性头痛、一般炎症、关节炎、风湿病、狼疮、骨关节炎、纤维肌痛、炎性肠病、

- 过敏性肠综合征、炎性眼病、炎性或不稳定性膀胱功能障碍、牛皮癣、炎性组分造成的皮肤不适、晒伤、心炎、皮炎、肌炎、神经炎、胶原血管病、慢性炎性 疾病、炎性疼痛及相关痛觉过敏和异常性疼痛、神经性疼痛及相关痛觉过敏和异常性疼痛、糖尿病性神经性疼痛、灼痛、
- 5 交感神经维持的疼痛、传入神经阻滞综合征、哮喘、上皮组织损伤或功能紊乱、单纯疱疹、在呼吸、泌尿生殖、胃肠或者血管区域的内脏活动障碍、创伤、烧伤、过敏性皮肤反应、瘙痒、白癜风、一般性胃肠机能紊乱、结肠炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、血管舒缩性或过敏性鼻炎或者支气管病、痛经、消化不良、胃食管反流、胰腺炎或内脏痛。
- 10 52. 一种药物组合物，所述药物组合物包含药物可接受的载体和治疗有效量的权利要求 49 的抗体。
53. 一种治疗患者中疾病的方法，所述疾病由 NGF 的表达增加或对 NGF 的敏感性提高导致，所述方法包括给予患者权利要求 52 的药物组合物。
- 15 54. 一种检测生物样品中的 NGF 的方法，所述方法包括：
- a. 在能让抗体结合 NGF 的条件下使样品与权利要求 31、33、36、38、41 或 42 的抗体接触；
- b. 测量样品中结合抗体的水平。
55. 一种核酸分子，所述核酸分子编码权利要求 31、33、36、38、
- 20 41 或 42 的抗体。
56. 一种宿主细胞，所述宿主细胞包含权利要求 55 的核酸。
57. 一种分离的细胞系，所述分离细胞系产生权利要求 31、33、36、38、41 或 42 任一项的抗体。
58. 一种 NGF 特异性结合物，所述结合物包含至少一种选自 SEQ
- 25 ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22，以及任何 SEQ ID NO: 79-130 的氨基酸序列，且其中所述抗体能结合 NGF。
59. 一种药物组合物，所述药物组合物包含药物可接受的载体和

治疗有效量的权利要求 58 的结合物。

60. 一种治疗患者中疾病的方法, 所述疾病由 NGF 的表达增加或对 NGF 的敏感性提高导致, 所述方法包括给予患者权利要求 58 的药物组合物。

5 61. 权利要求 58 的结合物, 所述结合物是蛋白质。

62. 一种核酸分子, 所述核酸分子编码权利要求 61 的结合物。

63. 一种宿主细胞, 所述宿主细胞包含权利要求 62 的核酸。

64. 一种分离的细胞系, 所述分离细胞系产生权利要求 63 的结合物。

10 65. 一种治疗患者中疾病的方法, 所述疾病由 NGF 的表达增加或对 NGF 的敏感性提高导致, 所述方法包括给予患者药物有效量的权利要求 58 的结合物。

66. 权利要求 65 的方法, 其中所述疾病是急性痛、牙痛、外伤导致的疼痛、外科手术疼痛、截肢或脓肿导致的疼痛、灼痛、脱髓鞘病、三叉神经痛、癌症、慢性酒精中毒、中风、丘脑痛综合征、糖尿病、获得性免疫缺陷综合征(“AIDS”)、毒素、化疗、一般性头痛、偏头痛、丛集性头痛、混合型血管或非血管综合征、紧张性头痛、一般炎症、关节炎、风湿病、狼疮、骨关节炎、纤维肌痛、炎性肠病、过敏性肠综合征、炎性眼病、炎性或不稳定性膀胱功能障碍、牛皮癣、炎性组分造成的皮肤不适、晒伤、心炎、皮炎、肌炎、神经炎、胶原血管病、慢性炎性 疾病、炎性疼痛及相关痛觉过敏和异常性疼痛、神经性疼痛及相关痛觉过敏和异常性疼痛、糖尿病性神经性疼痛、灼痛、交感神经维持的疼痛、传入神经阻滞综合征、哮喘、上皮组织损伤或功能紊乱、单纯疱疹、在呼吸、泌尿生殖、胃肠或者血管区域的内脏
15 活动障碍、创伤、烧伤、过敏性皮肤反应、瘙痒、白癜风、一般性胃肠机能紊乱、结肠炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、血管舒缩性或过敏性鼻炎或者支气管病、痛经、消化不良、胃食管反流、胰腺炎或内脏痛。
20 25

67. 一种检测生物样品中的 NGF 的方法, 所述方法包括:

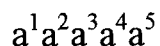
a. 在能让结合物结合 NGF 的条件下使样品与权利要求 58 的结合物接触;

b. 测量样品中结合抗体的水平。

68. 一种分离核酸分子, 所述分离核酸分子包含编码任何 SEQ ID
5 NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 44 或者任何 SEQ ID NO: 79-134 表示的氨基酸的核苷酸序列。

69. 一种特异性结合 NGF 的分离人抗体或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段, 其中所述抗体或片段包含的重链可变区包含:
10

a) 包含下式氨基酸序列的 CDR1 区:



其中:

15 a^1 是极性亲水性氨基酸残基;

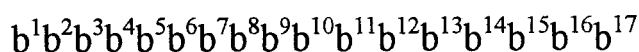
a^2 是芳族氨基酸残基;

a^3 是脂族、极性疏水性、芳族氨基酸残基;

a^4 是中性疏水性或脂族氨基酸残基;

a^5 是脂族或极性亲水性氨基酸残基;

20 b) 包含下式氨基酸序列的 CDR2 区:



其中:

b^1 是脂族、极性疏水性或芳族氨基酸残基;

b^2 是脂族疏水性氨基酸残基;

25 b^3 是极性亲水性或芳族氨基酸残基;

b^4 是极性亲水性、疏水性或芳族氨基酸残基;

b^5 - b^9 独立是极性亲水性或脂族氨基酸残基;

b^{10} 是极性亲水性、芳族或脂族氨基酸残基;

- b^{11} 是芳族或疏水性氨基酸残基;
 b^{12} 是脂族疏水性或极性亲水性氨基酸残基;
 b^{13} 是脂族、疏水性或极性亲水性氨基酸残基;
 b^{14} 和 b^{16} 独立是极性亲水性氨基酸残基;
 5 b^{15} 是脂族或芳族疏水性氨基酸残基;
 b^{17} 是脂族酸性氨基酸残基;
 c) 包含下式氨基酸序列的 CDR3 区:

$$c^1 c^2 c^3 c^4 c^5 c^6 c^7 c^8 c^9 c^{10} c^{11} c^{12} c^{13} c^{14} c^{15} c^{16} c^{17}$$
 其中:
 10 c^1 不存在或者是脂族氨基酸残基;
 c^2 不存在或者是极性亲水性或芳族疏水性氨基酸残基;
 c^3 和 c^4 独立是不存在或者极性亲水性、芳族疏水性或脂族氨基酸残基;
 c^5 不存在或者是极性亲水性、脂族或芳族氨基酸残基;
 15 c^6 不存在或者是极性亲水性或脂族氨基酸残基;
 c^7 是极性亲水性或脂族氨基酸残基;
 c^8 是极性亲水性、疏水性或芳族氨基酸残基;
 c^9 是极性亲水性、脂族或芳族疏水性氨基酸残基;
 c^{10} 是极性亲水性、芳族疏水性或脂族疏水性氨基酸残基;
 20 c^{11} - c^{13} 独立是极性亲水性或芳族疏水性氨基酸残基;
 c^{14} 是脂族或芳族疏水性氨基酸残基;
 c^{15} 是极性亲水性或中性疏水性氨基酸残基;
 c^{16} 是不存在或者极性亲水性氨基酸残基;
 c^{17} 是芳族疏水性或脂族疏水性氨基酸残基, 且其中所述抗体或片
 25 段以约 1×10^{-9} M 或更低的 K_D 与人 NGF 多肽解离, 在标准的体外试验中以约 1×10^{-8} M 或更低的 IC_{50} 中和人 NGF 生物活性。
 70. 权利要求 69 的抗体或片段, 其中:
 a^1 是极性亲水性氨基酸残基;

- a^2 是芳族疏水性氨基酸残基;
 a^3 是脂族疏水性氨基酸残基;
 a^4 是中性疏水性;
 a^5 是极性亲水性氨基酸残基;
- 5 b^1 是脂族或芳族氨基酸残基;
 b^2 是 Ile;
 b^3 是极性亲水性氨基酸残基;
 b^4 是极性亲水性或芳族氨基酸残基;
 b^5 - b^9 独立是极性亲水性或脂族氨基酸残基;
- 10 b^{10} 是脂族氨基酸残基;
 b^{11} 是 Tyr;
 b^{12} 是脂族疏水性氨基酸残基;
 b^{13} 是脂族或极性亲水性氨基酸残基;
 b^{14} 和 b^{16} 独立是极性亲水性氨基酸残基;
- 15 b^{15} 是脂族疏水性氨基酸残基;
 b^{17} 是脂族酸性氨基酸残基;
 c^1 不存在或者是脂族氨基酸残基;
 c^2 不存在或者是极性亲水性或芳族疏水性氨基酸残基;
 c^3 和 c^4 独立是不存在或者是极性亲水性、芳族疏水性或脂族氨基
- 20 酸残基;
 c^5 不存在或者是极性亲水性氨基酸残基;
 c^6 不存在或者是极性亲水性或脂族氨基酸残基;
 c^7 是极性亲水性或脂族氨基酸残基;
 c^8 是极性亲水性、疏水性或芳族氨基酸残基;
- 25 c^9 是极性亲水性、脂族或芳族疏水性氨基酸残基;
 c^{10} 是极性亲水性、芳族疏水性或脂族疏水性氨基酸残基;
 c^{11} - c^{13} 独立是极性亲水性或芳族疏水性氨基酸残基;
 c^{14} 是脂族或芳族疏水性氨基酸残基;

c¹⁵ 是极性亲水性或中性疏水性氨基酸残基;

c¹⁶ 不存在或者是极性亲水性氨基酸残基;

c¹⁷ 是芳族疏水性或脂族疏水性氨基酸残基。

71. 权利要求 69 的抗体或片段, 其中:

- 5 a¹ 是 Ser、Asp 或 Thr; a² 是 Tyr; a³ 是 Ala、Ser、Trp 或 Gly; a⁴ 是 Met 或 Ile; a⁵ 是 His、Gly 或 Asn; b¹ 是 Tyr、Gly、Ile 或 Asp; b² 是 Ile; b³ 是 Ser、Thr、Tyr 或 Asn; b⁴ 是 Trp、Arg 或 Pro; b⁵ 是 Ser、Asn 或 Gly; b⁶ 是 Ser、Arg、Asp 或 Gly; b⁷ 是 Ser、His 或 Gly; b⁸ 是 Ser、Ile、Asp 或 Thr; b⁹ 是 Leu、Ile 或 Thr; b¹⁰ 是 Gly、Lys 或 Phe;
- 10 b¹¹ 是 Tyr; b¹² 是 Ala 或 Ser; b¹³ 是 Asp、Gly 或 Pro; b¹⁴ 是 Ser; b¹⁵ 是 Val 或 Phe; b¹⁶ 是 Lys 或 Gln; b¹⁷ 是 Gly; c¹ 不存在或是脂族氨基酸残基; c² 不存在或是 Tyr; c³ 和 c⁴ 独立是不存在、Tyr、Asn、Val 或 Glu; c⁵ 是不存在、Ser、Gly 或 Trp; c⁶ 是不存在、Ser、Gly、Glu 或 Leu; c⁷ 是 Gly、Arg 或 Asp; c⁸ 是 Trp、Pro、Ser 或 Thr; c⁹ 是 His、Gly 或 Tyr; c¹⁰ 是 Val、Tyr 或 Arg; c¹¹ - c¹³ 独立是 Ser、Phe、Tyr、Asp 或 Asn;
- 15 c¹⁴ 是 Phe、Val 或 Gly; c¹⁵ 是 Met 或 Asp; c¹⁶ 是不存在、Asp 或 Asn; c¹⁷ 是 Tyr 或 Val。

72. 权利要求 69 的抗体或片段, 其中:

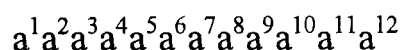
- 20 a¹ 是 Ser 或 Asp; a² 是 Tyr; a³ 是 Ala 或 Ser; a⁴ 是 Met 或 Ile; a⁵ 是 His 或 Asn; b¹ 是 Tyr 或 Gly; b² 是 Ile; b³ 是 Ser、Thr、Tyr 或 Asn; b⁴ 是 Trp、Arg 或 Pro; b⁵ 是 Ser 或 Asn; b⁶ 是 Ser 或 Arg; b⁷ 是 His 或 Gly; b⁸ 是 Ile 或 Thr; b⁹ 是 Leu、Ile 或 Thr; b¹⁰ 是 Gly 或 Phe; b¹¹ 是 Tyr; b¹² 是 Ala 或 Ser; b¹³ 是 Asp 或 Gly; b¹⁴ 是 Ser; b¹⁵ 是 Val 或 Phe; b¹⁶ 是 Lys 或 Gln; b¹⁷ 是 Gly; c¹ 不存在或是 Gly; c² 不存在或是 Tyr;
- 25 c³ 和 c⁴ 独立是不存在、Tyr、Gly 或 Val; c⁵ 不存在或是 Ser; c⁶ 是 Ser 或 Gly; c⁷ 是 Gly 或 Arg; c⁸ 是 Trp 或 Pro; c⁹ 是 His、Gly 或 Tyr; c¹⁰ 是 Val 或 Tyr; c¹¹ - c¹³ 独立是 Ser、Tyr、Phe 或 Asp; c¹⁴ 是 Phe 或 Val; c¹⁵ 是 Met 或 Asp; c¹⁶ 不存在或是 Asp; c¹⁷ 是 Tyr 或 Val。

73. 权利要求 69 的抗体, 其中:

- a) 重链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 22 表示的氨基酸序列, 重链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 18 表示的氨基酸序列, 重链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 14 表示的氨基酸序列;
- 5 b) 重链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 92 表示的氨基酸序列, 重链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 93 表示的氨基酸序列, 重链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 94 表示的氨基酸序列;
- c) 重链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 98 表示的氨基酸序列, 重链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 99 表示的氨基酸序列, 重链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 100 表示的氨基酸序列;
- 10 d) 重链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 104 表示的氨基酸序列, 重链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 105 表示的氨基酸序列, 重链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 106 表示的氨基酸序列;
- e) 重链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 110 表示的氨基酸序列, 重链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 111 表示的氨基酸序列, 重链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 112 表示的氨基酸序列;
- 15 f) 重链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 116 表示的氨基酸序列, 重链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 117 表示的氨基酸序列, 重链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 118 表示的氨基酸序列。

20 74. 一种特异性结合 NGF 的分离人抗体或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段, 其中所述抗体或片段包含的轻链可变区包含:

a) 包含下式氨基酸序列的 CDR1 区:



25 其中:

a^1 是极性亲水性氨基酸残基;

a^2 、 a^{11} 和 a^{12} 独立是脂族或疏水性氨基酸残基;

a^3 、 a^5 、 a^7 和 a^8 独立是脂族、极性亲水性或疏水性氨基酸残基;

a^4 是极性亲水性氨基酸残基;

a^6 是脂族或疏水性氨基酸残基;

a^9 不存在, 或是脂族或极性亲水性氨基酸残基;

a^{10} 是脂族、芳族或疏水性氨基酸残基;

5 b) 包含下式氨基酸序列的 CDR2 区:

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

其中:

b^1 是脂族、极性疏水性或疏水性氨基酸残基;

b^2 是脂族或疏水性氨基酸残基;

10 b^3 和 b^4 独立是极性亲水性、脂族或疏水性氨基酸残基;

b^5 是极性亲水性或脂族疏水性氨基酸残基;

b^6 是极性亲水性或脂族疏水性氨基酸残基;

b^7 是极性亲水性氨基酸残基;

c) 包含下式氨基酸序列的 CDR3 区:

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

其中:

c^1 和 c^2 独立是极性亲水性氨基酸残基;

c^3 是极性亲水性、脂族或疏水性氨基酸残基;

c^4 、 c^5 和 c^6 独立是脂族、极性亲水性或疏水性氨基酸残基;

20 c^7 不存在或者是极性亲水性或脂族疏水性氨基酸残基;

c^8 是极性亲水性或疏水性氨基酸残基;

c^9 是极性亲水性氨基酸残基,

且其中所述抗体或者片段以约 1×10^{-9} 或更低的 K_D 与人 NGF 多肽解离, 在标准的体外试验中以约 1×10^{-8} M 或更低的 IC_{50} 中和人 NGF

25 生物活性。

75. 权利要求 74 的抗体或片段, 其中:

a^1 、 a^3 、 a^4 、 a^7 和 a^8 独立是极性亲水性氨基酸残基;

a^2 、 a^6 、 a^{11} 和 a^{12} 独立是脂族疏水性氨基酸残基;

- a⁵ 是极性亲水性或脂族氨基酸残基;
a⁹ 不存在, 或是脂族或极性亲水性氨基酸残基;
a¹⁰ 是脂族或芳族氨基酸残基;
b¹ 是脂族、极性疏水性或疏水性氨基酸残基;
5 b² 是脂族疏水性氨基酸残基;
b³、b⁴ 和 b⁷ 独立是极性亲水性氨基酸残基;
b⁵ 和 b⁶ 独立是极性亲水性或脂族疏水性氨基酸残基;
c¹ 和 c² 独立是极性亲水性氨基酸残基;
c³ 是极性亲水性、脂族或疏水性氨基酸残基;
10 c⁴、c⁵ 和 c⁶ 独立是脂族、极性亲水性或疏水性氨基酸残基;
c⁷ 不存在或是脂族疏水性氨基酸残基;
c⁸ 是疏水性氨基酸残基;
c⁹ 是极性亲水性氨基酸残基。
76. 权利要求 75 的抗体或片段, 其中:
15 a¹、a³、a⁴ 和 a⁷ 分别是 Arg、Ser、Gln 和 Ser;
a² 是 Ala;
a⁵ 是 Gly 或 Ser;
a⁸ 是 Ser 或 Ile;
a⁹ 是不存在、Ser 或 Gly;
20 a¹⁰ 是 Ala、Tyr、Trp 或 Phe;
b¹ 是 Asp、Gly、Ala 或 Val;
b² 和 b³ 分别是 Ala 和 Ser;
b⁴ 是 Ser 或 Asn;
b⁵ 是 Leu 或 Arg;
25 b⁶ 是 Glu、Ala 或 Gln;
b⁷ 是 Ser 或 Thr;
c¹ 和 c² 是 Gln;
c³ 是 Phe、Tyr、Arg 或 Ala;

- c⁴ 是 Asn、Gly 或 Ser;
c⁵ 是 Ser 或 Asn;
c⁶ 是 Tyr、Ser、Trp 或 Phe;
c⁷ 是不存在、Pro 或 His;
5 c⁸ 是 Leu、Trp、Tyr 或 Arg;
c⁹ 是 Thr。
77. 权利要求 75 的抗体或片段, 其中:
a¹、a²、a³、a⁴ 和 a⁷ 分别是 Arg、Ala、Ser、Gln 和 Ser;
a⁵ 是 Gly 或 Ser;
10 a⁸ 是 Ser 或 Ile;
a⁹ 是不存在、Ser 或 Gly;
a¹⁰ 是 Ala 或 Tyr;
b¹ 是 Asp 或 Gly;
b² 和 b³ 分别是 Ala 和 Ser;
15 b⁴ 是 Ser 或 Asn;
b⁵ 是 Leu 或 Arg;
b⁶ 是 Glu、Ala 或 Gln;
b⁷ 是 Ser 或 Thr;
c¹ 和 c² 是 Gln;
20 c³ 是 Phe、Tyr、Arg 或 Ala;
c⁴ 是 Asn、Gly 或 Ser;
c⁵ 是 Ser 或 Asn;
c⁶ 是 Tyr、Ser、Trp 或 Phe;
c⁷ 是不存在、Pro 或 His;
25 c⁸ 是 Leu、Trp、Tyr 或 Arg;
c⁹ 是 Thr。

78. 权利要求 74 的抗体, 其中:

- a) 轻链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 24 表示的氨基酸序列, 轻链

- CDR2 具有 SEQ ID NO: 20 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 16 表示的氨基酸序列;
- 5 b) 轻链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 95 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 96 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 97 表示的氨基酸序列;
- c) 轻链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 101 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 102 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 103 表示的氨基酸序列;
- 10 d) 轻链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 107 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 108 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 109 表示的氨基酸序列;
- e) 轻链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 113 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 114 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 115 表示的氨基酸序列;
- 15 f) 轻链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 119 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 120 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 121 表示的氨基酸序列;
- g) 轻链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 122 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 123 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 124 表示的氨基酸序列;
- 20 h) 轻链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 125 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 126 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 127 表示的氨基酸序列;
- i) 轻链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 128 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 129 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 130 表示的氨基酸序列;
- 25 j) 轻链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 132 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 133 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR3 具

有 SEQ ID NO: 134 表示的氨基酸序列。

79. 一种多核苷酸, 所述多核苷酸编码权利要求 69-78 任一项的抗体或片段。

80. 一种表达载体, 所述表达载体包含权利要求 79 的多核苷酸。

5 81. 一种宿主细胞, 所述宿主细胞包含权利要求 80 的表达载体。

82. 权利要求 81 的宿主细胞, 其中所述细胞是真核细胞。

83. 权利要求 82 的宿主细胞, 其中所述细胞是 CHO 细胞。

84. 一种用以治疗疼痛病症或疾病的药物, 所述病症或疾病与 NGF 的表达增加或对 NGF 的敏感性提高有关, 所述药物包含药物有效量的单克隆抗体或其免疫功能性免疫球蛋白片段, 或者单克隆抗体或片段的药物可接受盐, 及药物可接受的载体、稀释剂或赋形剂, 其中所述单克隆抗体是至少一种权利要求 1 所述的单克隆抗体。

85. 权利要求 84 的药物, 其中所述单克隆抗体包含:

(a) 具有重链可变区的重链, 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 10 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段, 和具有轻链可变区的轻链, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 12 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段;

(b) 具有重链可变区的重链, 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 14 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段, 和具有轻链可变区的轻链, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 16 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段;

(c) 具有重链可变区的重链, 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 18 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段, 和具有轻链可变区的轻链, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 16 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段; 或者

(d) 具有重链可变区的重链, 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 20 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段, 和具有轻链可变区的轻链, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 16 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

86. 一种用以治疗疼痛病症或疾病的药物, 所述病症或疾病与 NGF 的表达增加或对 NGF 的敏感性提高有关, 所述药物包含药物有效量的单克隆抗体或其免疫功能性免疫球蛋白片段, 及药物可接受的载体、稀释剂或赋形剂, 所述抗体或片段包含与 SEQ ID NO: 10 表示的氨基酸序列有至少 80% 序列一致性的氨基酸序列, 或者与 SEQ ID NO: 12 表示的氨基酸序列有至少 90% 序列一致性的氨基酸序列。

87. 权利要求 86 的药物, 其中所述单克隆抗体以约 1×10^{-9} M 或更低的 K_D 与人 NGF 多肽解离, 在标准的体外试验中以约 1×10^{-8} M 或更低的 IC_{50} 中和人 NGF 生物活性。

88. 权利要求 86 的药物, 其中所述抗体以约 1×10^{-10} M 或更低的 K_D 与人 NGF 多肽解离, 在标准的体外试验中以约 1×10^{-9} M 或更低的 IC_{50} 中和人 NGF 生物活性。

89. 权利要求 86 的药物, 其中所述抗体以约 1×10^{-11} M 或更低的 K_D 与人 NGF 多肽解离, 在标准的体外试验中以约 0.2×10^{-9} M 或更低的 IC_{50} 中和人 NGF 生物活性。

90. 药物有效量的权利要求 1 的抗体在制备药物中的用途, 所述药物适合用于治疗与 NGF 的表达增加或对 NGF 的敏感性提高有关的疼痛病症或疾病。

91. 权利要求 90 的用途, 其中所述单克隆抗体以约 1×10^{-9} M 或更低的 K_D 与人 NGF 多肽解离, 在标准的体外试验中以约 1×10^{-8} M 或更低的 IC_{50} 中和人 NGF 生物活性。

92. 权利要求 90 的用途, 其中所述抗体以约 1×10^{-10} M 或更低的 K_D 与人 NGF 多肽解离, 在标准的体外试验中以约 1×10^{-9} M 或更低的

IC₅₀ 中和人 NGF 生物活性。

93. 权利要求 90 的用途, 其中所述抗体以约 1×10^{-11} M 或更低的 K_D 与人 NGF 多肽解离, 在标准的体外试验中以约 0.2×10^{-9} M 或更低的 IC₅₀ 中和人 NGF 生物活性。

- 5 94. 权利要求 93 的用途, 其中所述疼痛病症或疾病选自急性痛、牙痛、外伤导致的疼痛、外科手术疼痛、截肢或脓肿导致的疼痛、灼痛、脱髓鞘病、三叉神经痛、癌症、慢性酒精中毒、中风、丘脑痛综合征、糖尿病、获得性免疫缺陷综合征(“AIDS”)、毒素、化疗、一般性头痛、偏头痛、丛集性头痛、混合型血管或非血管综合征、紧张
- 10 性头痛、一般炎症、关节炎、风湿病、狼疮、骨关节炎、纤维肌痛、炎性肠病、过敏性肠综合征、炎性眼病、炎性或不稳定性膀胱功能障碍、牛皮癣、炎性组分造成的皮肤不适、晒伤、心炎、皮炎、肌炎、神经炎、胶原血管病、慢性炎性 疾病、炎性疼痛及相关痛觉过敏和异常性疼痛、神经性疼痛及相关痛觉过敏和异常性疼痛、糖尿病性神经
- 15 性疼痛、灼痛、交感神经维持的疼痛、传入神经阻滞综合征、哮喘、上皮组织损伤或功能紊乱、单纯疱疹、在呼吸、泌尿生殖、胃肠或者血管区域的内脏活动障碍、创伤、烧伤、过敏性皮肤反应、瘙痒、白癜风、一般性胃肠机能紊乱、结肠炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、血管舒缩性或过敏性鼻炎或者支气管病、痛经、消化不良、胃食管反流、
- 20 胰腺炎或内脏痛。

95. 一种特异性结合 NGF 的分离人抗体, 其中所述抗体包含:

- (a) 具有重链可变区的重链, 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 79 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段, 和具有轻链可变区的轻链, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 80
- 25 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段;

(b) 具有重链可变区的重链, 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 81 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片

段, 和具有轻链可变区的轻链, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 82 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段;

- (c) 具有重链可变区的重链, 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 83 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段, 和具有轻链可变区的轻链, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 84 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段; 或者

- (d) 具有重链可变区的重链, 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 86 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段, 和具有轻链可变区的轻链, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 87 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

作为选择性 NGF 途径抑制剂的人抗 NGF 中和抗体

- 5 本申请涉及 2003 年 7 月 15 日提交的美国临时申请系列号 60/487,431 并要求其优先权，其公开内容通过引用结合到本文中。

发明领域

- 本发明涉及结合神经生长因子(NGF)的人单克隆抗体。本发明还
10 描述了用以治疗疼痛和疼痛相关疾病的组合物和方法。

发明背景

- 美国每天有两百多万人因慢性疼痛而致残(Jessell 和 Kelly, 1991, “Pain and Analgesia”, PRINCIPLES OF NEURAL SCIENCE, 第 3 版, 15 (Kandel, Schwartz 和 Jessell 编辑), Elsevier, New York)。不幸的是，目前的疼痛治疗只是部分有效，而且这些治疗中有许多本身会导致人虚弱或者导致危险的副作用。例如，虽然非类固醇抗炎药(“NSAID”)，如阿司匹林、布洛芬和吲哚美辛对炎性疼痛有中度的效果，但它们同时也是肾脏毒素，剂量高时往往会导致胃肠刺激、溃疡、出血和精神
20 错乱。用阿片类治疗的患者也常常遭遇精神错乱，且长期使用阿片类与伴随出现药物耐受性和依赖性。局部麻醉剂如利多卡因和美西律在抑制疼痛的同时导致正常感觉的丧失。

- 疼痛是一种基于从周围环境接受并由神经系统传递和解释的信号
 的感知(有关综述参见 Millan, 1999, *Prog. Neurobiol.* 57:1-164)。有害
25 的刺激如热觉和触觉会促使皮肤中的专用感受器将信号传输到中枢神经系统(“CNS”)。这个过程称作伤害感受，介导这个过程的周围感觉神经元即伤害感受器。取决于来自伤害感受器的信号强度以及 CNS 对该信号的提取和解析，人可能会或者可能不会将有害刺激感受为疼痛

刺激。当一个人对疼痛的感知与刺激的强度正确校准时，疼痛能发挥其预期的保护功能。但是，某些类型的组织损害会导致称为痛觉过敏或早期痛觉(pronociception)的现象，其中相对无害的刺激被感知为强烈疼痛，这是因为人的疼痛阈已降低。炎症和神经损害均会引起痛觉过敏。受炎症疾病影响的人往往会体验到疼痛感觉增强，所述炎症例如晒伤、骨关节炎、结肠炎、心炎、皮炎、肌炎、神经炎、胶原血管病(其包括类风湿性关节炎和狼疮)等。同样，创伤、外科手术、截肢、脓肿、灼痛、胶原血管病、脱髓鞘病、三叉神经痛、癌症、慢性酒精中毒、中风、丘脑疼痛综合征、糖尿病、疱疹感染、获得性免疫缺陷综合征(“AIDS”)、毒素和化学疗法会造成神经损伤，导致过度疼痛。

随着对伤害感受器在正常和痛觉过敏条件下转导外界信号的机制的认识加深，可以把目标指向牵涉痛觉过敏的过程，以抑制疼痛阈的下降，从而减少所体验到的疼痛的量。

已显示神经营养因子在生理和病理疼痛的传递中发挥重要的作用。神经生长因子(NGF)看来似乎特别重要(有关综述参见 McMahon, 1996, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 351:431-40; 及 Apfel, 2000, *The Clinical Journal of Pain* 16:S7-S11)。已显示局部性和全身给予 NGF 能引起痛觉过敏和异常性疼痛(Lewin 等, 1994, *Eur. J Neurosci.* 6:1903-1912)。在人类中静脉输注 NGF 产生全身肌痛，而局部给予时除了会引起全身效应外，还会引起注射部位痛觉过敏和异常性疼痛(Apfel 等, 1998, *Neurology* 51:695-702)。还有大量的证据暗示内源 NGF 牵涉到以疼痛为主要特征的疾病。例如，出现周围神经损伤之后，NGF 在背根神经节(DRG)神经膜细胞中被上调至少 2 个月，已报告在患有各种关节炎模型的动物关节中 NGF 水平提高(例如 Aloe 等, 1993, *Growth Factors* 2:149-155)。在人类中，患有类风湿性关节炎或者其他类型关节炎的患者的滑液中 NGF 水平提高(例如 Aloe 等, 1992, *Arthritis and Rheumatism* 35:351-355)。此外，还已证明，在神经性和慢性炎性疼痛模型中，对 NGF 功能的拮抗能防止痛觉过敏和异常性疼痛。例如，神经性疼痛的

动物模型(例如神经干或脊神经结扎)中, 全身注射抗 NGF 中和抗体能防止异常性疼痛和痛觉过敏(Ramer 等, 1999, *Eur. J. Neurosci.* 11:837-846; 及 Ro 等, 1999, *Pain* 79:265-274)。本领域公知的抗 NGF 抗体的实例包括例如 PCT 公开 WO 01/78698、WO 01/64247、WO 02/096458 和 WO 2004/032870; 美国专利第 5,844, 092 号、第 5,877,016 号和第 6,153,189 号; Hongo 等, 2000, *Hybridoma* 19:215-227; Hongo 等, 1993, *Cell. Mol. Biol.* 13:559-568; 及 GenBank 检索号 U39608、U39609、L17078 或 L17077。

显然, 需要安全有效的新型疼痛治疗法, 特别是把目标指向小分子的疼痛介体或恶化体(exacerbator)如 NGF 的治疗法。

发明概述

本发明提供在治疗上用于控制疼痛的新型人单克隆抗体。具体的说, 本发明提供结合神经生长因子(NGF)的单克隆抗体。优选所述单克隆抗体是人单克隆抗体, 能中和 NGF 的生物活性, 可用于改善 NGF 介导的疼痛反应的效应。本发明还提供生产本发明单克隆抗体、最优选还将单克隆抗体分泌到细胞培养基中的细胞。本发明抗体除了在治疗和控制疼痛中的用途之外, 还用于治疗神经病性反应和炎性疼痛相关反应。

本发明进一步提供包含抗体 Fc 区序列和一个或多个标识为以下的序列的融合蛋白: SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 79-130。可使用例如在国际专利申请公开 WO 00/24782 中描述的方法制备这种分子, 所述专利申请通过引用结合到本文中。这种分子可例如在哺乳动物细胞(例如中国仓鼠卵巢细胞)或者细菌细胞(例如大肠杆菌细胞)中表达。

在某些方面, 本发明提供包含重链和轻链的抗体, 优选单克隆抗体、最优选人抗体和人单克隆抗体, 其中重链包含 SEQ ID NO: 2、SEQ

ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 6 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段, 重链的可变区包含 SEQ ID NO: 10 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。优选重链包含 SEQ ID NO: 4 表示的氨基酸序列。

5 在某些方面, 本发明提供包含重链和轻链的抗体, 优选人抗体, 更优选单克隆抗体, 最优选人单克隆抗体, 其中重链包含选自 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA 和 IgE 重链恒定区或其任何等位变异的重链恒定区(如在 Kabat 等, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 出版号 91-3242 中所讨论, 该文献通过引用结合到本文中), 重链的可变区包含 SEQ ID NO: 10 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。优选本发明抗体包含 SEQ ID NO: 4 表示的 IgG2 重链恒定区氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

15 在某些方面, 本发明提供包含重链和轻链的抗体, 优选人抗体, 更优选单克隆抗体, 最优选人单克隆抗体, 其中轻链包含 SEQ ID NO: 8 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段, 轻链可变区包含 SEQ ID NO: 12 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

20 在某些方面, 本发明抗体包含重链和轻链, 其中重链可变区包含 SEQ ID NO: 10 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。在其他方面, 轻链可变区包含 SEQ ID NO: 12 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。在另外的方面, 重链包含任何 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 18 或 SEQ ID NO: 20 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。在还其他方面, 轻链包含任何 SEQ ID NO: 16、20、24 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

本发明还提供特异性结合 NGF 的抗体, 其中重链包含的可变区包

含 SEQ ID NO: 10 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段, 轻链包含的可变区包含 SEQ ID NO: 12 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

5 本发明进一步提供特异性结合 NGF 的分离人抗体, 其中所述抗体包含:

(a) 具有重链可变区的重链, 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 79 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段, 和具有轻链可变区的轻链, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 80 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段;
10 段;

(b) 具有重链可变区的重链, 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 81 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段, 和具有轻链可变区的轻链, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 82 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段;
15 段;

(c) 具有重链可变区的重链, 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 83 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段, 和具有轻链可变区的轻链, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 84 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段;
20 段; 或者

(d) 具有重链可变区的重链, 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 86 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段, 和具有轻链可变区的轻链, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 87 表示的氨基酸序列, 或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段;
25 段。

在某些方面, 本发明还提供包含重链和轻链的抗体, 其中重链包含重链可变区, 且其中重链可变区包含与 SEQ ID NO: 10 表示的氨基酸序列有至少 75%、优选 80%、更优选至少 85%、甚至更优选至少

- 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、最优选约99%一致性的序列，其中轻链包含轻链可变区，且其中轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 12 表示的氨基酸序列有至少 80%、优选至少 85%、更优选至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、
5 最优选约 99%一致性的序列，其中所述抗体特异性结合 NGF。

本发明还提供特异性结合 NGF 的抗体，其中重链包含 SEQ ID NO: 14 表示的氨基酸序列，或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段，轻链包含 SEQ ID NO: 16 表示的氨基酸序列，或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

- 10 在某些方面，本发明提供包含重链和轻链的抗体，其中重链包含重链可变区，且其中重链可变区包含与 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 18 或 SEQ ID NO: 22 表示的氨基酸序列有至少 75%、优选 80%、更优选至少 85%、甚至更优选至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、最优选约 99%一致性的序列，其中轻链包含轻链可变区，
15 且其中轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 16 表示的氨基酸序列有至少 80%、优选至少 85%、更优选至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、最优选约 99%一致性的氨基酸序列，其中所述抗体特异性结合 NGF。

- 本发明还提供单链抗体、单链 Fv 抗体、F(ab)抗体、F(ab)'抗体和
20 F(ab')₂ 抗体。

在具体方面，本发明提供包含 SEQ ID NO: 16 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段的轻链。

- 另外，本发明提供包含任何 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 18 或 SEQ ID NO: 22 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段的重链。
25

本发明还涉及特异性结合 NGF 的分离人抗体，其中所述抗体包含 (a)人重链构架区、人重链 CDR1 区、人重链 CDR2 区和人重链 CDR3 区；及(b)人轻链构架区、人轻链 CDR1 区、人轻链 CDR2 区和人轻链

CDR3 区。在某些方面，人重链 CDR1 区可以是 SEQ ID NO: 22 所示的称为 4D4 的单克隆抗体(mAb)的重链 CDR1 区，人轻链 CDR1 区可以是 SEQ ID NO: 24 所示的 mAb 4D4 的轻链 CDR1 区。在其他方面，人重链 CDR2 区可以是 SEQ ID NO: 18 所示的 mAb 4D4 的重链 CDR2 区，人轻链 CDR2 区可以是 SEQ ID NO: 20 所示的 mAb 4D4 的轻链 CDR2 区。在还其他方面，人重链 CDR3 区是 SEQ ID NO: 14 所示的 mAb 4D4 的重链 CDR3 区，人轻链 CDR3 区是 SEQ ID NO: 16 所示的 mAb 4D4 的轻链 CDR3 区。

本发明还提供特异性结合神经生长因子的分离人抗体，所述分离人抗体包含重链和轻链，其中重链包含的重链可变区包含 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 81、SEQ ID NO: 83、SEQ ID NO: 85 或 SEQ ID NO: 87 表示的氨基酸序列，或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

本发明也提供特异性结合 NGF 的分离人抗体，所述分离人抗体包含重链和轻链，其中轻链包含的轻链可变区包含 SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 82、SEQ ID NO: 84、SEQ ID NO: 86、SEQ ID NO: 88、SEQ ID NO: 89、SEQ ID NO: 90、SEQ ID NO: 91 或 SEQ ID NO: 131 表示的氨基酸序列，或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

本发明抗体的特征为拮抗与 NGF 多肽相关的至少一种体外和/或体内活性的能力。优选本发明提供能与 NGF 多肽高亲和性结合的分离抗人 NGF 人抗体，其中所述抗体结合人 NGF 多肽并以约 50×10^{-12} M 或更低的解离常数(K_D)(用 KinExA 测定)与人 NGF 多肽解离，或者在体外中和试验中所述抗体以约 1×10^{-8} M 或更低的 IC_{50} 抑制 NGF 诱导的存活。

在优选的实施方案中，本发明提供具有以下特征的分离抗人 NGF 人抗体：

a) 在体外中和试验中以约 1×10^{-9} M 或更低的 IC_{50} 抑制 NGF 诱导

的存活;

b) 具有包含 SEQ ID NO: 14 氨基酸序列的重链 CDR3;

c) 具有包含 SEQ ID NO: 16 氨基酸序列的轻链 CDR3。

5 本发明还提供以高亲和性特异性结合 NGF 的分离人抗体或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段, 其中所述抗体或者片段以约 1×10^{-9} 或更低的 K_D 与人 NGF 多肽解离, 在标准的体外试验中以约 1×10^{-8} M 或更低的 IC_{50} 中和人 NGF 生物活性, 且其中所述抗体或者片段包含的重链可变区包含:

a) 包含下式氨基酸序列的 CDR1 区:

10 $a^1 a^2 a^3 a^4 a^5$

其中:

a^1 是极性亲水性氨基酸残基; a^2 是芳族氨基酸残基; a^3 是脂族、极性疏水性、芳族氨基酸残基; a^4 是中性疏水性或脂族氨基酸残基; a^5 是脂族或极性亲水性氨基酸残基;

15 b) 包含下式氨基酸序列的 CDR2 区:

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

其中:

b^1 是脂族、极性疏水性或芳族氨基酸残基; b^2 是脂族疏水性氨基酸残基; b^3 是极性亲水性或芳族氨基酸残基; b^4 是极性亲水性、疏水性或芳族氨基酸残基; b^5 - b^9 独立是极性亲水性或脂族氨基酸残基; b^{10} 是极性亲水性、芳族或脂族氨基酸残基; b^{11} 是芳族或疏水性氨基酸残基; b^{12} 是脂族疏水性或极性亲水性氨基酸残基; b^{13} 是脂族、疏水性或极性亲水性氨基酸残基; b^{14} 和 b^{16} 独立是极性亲水性氨基酸残基; b^{15} 是脂族或芳族疏水性氨基酸残基; b^{17} 是脂族酸性氨基酸残基;

25 c) 包含下式氨基酸序列的 CDR3 区:

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

其中:

c^1 不存在或者是脂族氨基酸残基; c^2 不存在或者是极性亲水性或

芳族疏水性氨基酸残基； c^3 和 c^4 独立是不存在或者极性亲水性、芳族疏水性或脂族氨基酸残基； c^5 不存在或者是极性亲水性、脂族或芳族氨基酸残基； c^6 不存在或者是极性亲水性或脂族氨基酸残基； c^7 是极性亲水性或脂族氨基酸残基； c^8 是极性亲水性、疏水性或芳族氨基酸残基； c^9 是极性亲水性、脂族或芳族疏水性氨基酸残基； c^{10} 是极性亲水性、芳族疏水性或脂族疏水性氨基酸残基； c^{11} - c^{13} 独立是极性亲水性或芳族疏水性氨基酸残基； c^{14} 是脂族或芳族疏水性氨基酸残基； c^{15} 是极性亲水性或中性疏水性氨基酸残基； c^{16} 不存在或者是极性亲水性氨基酸残基； c^{17} 是芳族疏水性或脂族疏水性氨基酸残基。

10 在一个方面， a^1 是极性亲水性氨基酸残基； a^2 是芳族疏水性氨基酸残基； a^3 是脂族疏水性氨基酸残基； a^4 是中性疏水性； a^5 是极性亲水性氨基酸残基； b^1 是脂族或芳族氨基酸残基； b^2 是Ile； b^3 是极性亲水性氨基酸残基； b^4 是极性亲水性或芳族氨基酸残基； b^5 - b^9 独立是极性亲水性或脂族氨基酸残基； b^{10} 是脂族氨基酸残基； b^{11} 是Tyr； b^{12} 是脂族疏水性氨基酸残基； b^{13} 是脂族或极性亲水性氨基酸残基； b^{14} 和 b^{16} 独立是极性亲水性氨基酸残基； b^{15} 是脂族疏水性氨基酸残基； b^{17} 是脂族酸性氨基酸残基； c^1 不存在或者是脂族氨基酸残基； c^2 不存在或者是极性亲水性或芳族疏水性氨基酸残基； c^3 和 c^4 独立是不存在或者极性亲水性、芳族疏水性或脂族氨基酸残基； c^5 不存在或者是极性亲水性氨基酸残基； c^6 不存在或者是极性亲水性或脂族氨基酸残基； c^7 是极性亲水性或脂族氨基酸残基； c^8 是极性亲水性、疏水性或芳族氨基酸残基； c^9 是极性亲水性、脂族或芳族疏水性氨基酸残基； c^{10} 是极性亲水性、芳族疏水性或脂族疏水性氨基酸残基； c^{11} - c^{13} 独立是极性亲水性或芳族疏水性氨基酸残基； c^{14} 是脂族或芳族疏水性氨基酸残基； c^{15} 是极性亲水性或中性疏水性氨基酸残基； c^{16} 不存在或者是极性亲水性氨基酸残基； c^{17} 是芳族疏水性或脂族疏水性氨基酸残基。

25 在一个具体方面， a^1 是Ser、Asp或Thr； a^2 是Tyr； a^3 是Ala、Ser、Trp或Gly； a^4 是Met或Ile； a^5 是His、Gly或Asn； b^1 是Tyr、Gly、

Ile 或 Asp; b² 是 Ile; b³ 是 Ser、Thr、Tyr 或 Asn; b⁴ 是 Trp、Arg 或 Pro; b⁵ 是 Ser、Asn 或 Gly; b⁶ 是 Ser、Arg、Asp 或 Gly; b⁷ 是 Ser、His 或 Gly; b⁸ 是 Ser、Ile、Asp 或 Thr; b⁹ 是 Leu、Ile 或 Thr; b¹⁰ 是 Gly、Lys 或 Phe; b¹¹ 是 Tyr; b¹² 是 Ala 或 Ser; b¹³ 是 Asp、Gly 或 Pro; b¹⁴ 是 Ser; b¹⁵ 是 Val 或 Phe; b¹⁶ 是 Lys 或 Gln; b¹⁷ 是 Gly; c¹ 不存在或是脂族氨基酸残基; c² 不存在或是 Tyr; c³ 和 c⁴ 独立是不存在、Tyr、Asn、Val 或 Glu; c⁵ 是不存在、Ser、Gly 或 Trp; c⁶ 是不存在、Ser、Gly、Glu 或 Leu; c⁷ 是 Gly、Arg 或 Asp; c⁸ 是 Trp、Pro、Ser 或 Thr; c⁹ 是 His、Gly 或 Tyr; c¹⁰ 是 Val、Tyr 或 Arg; c¹¹ - c¹³ 独立是 Ser、Phe、Tyr、Asp 或 Asn; c¹⁴ 是 Phe、Val 或 Gly; c¹⁵ 是 Met 或 Asp; c¹⁶ 是不存在、Asp 或 Asn; c¹⁷ 是 Tyr 或 Val。

在另一个具体方面, a¹ 是 Ser 或 Asp; a² 是 Tyr; a³ 是 Ala 或 Ser; a⁴ 是 Met 或 Ile; a⁵ 是 His 或 Asn; b¹ 是 Tyr 或 Gly; b² 是 Ile; b³ 是 Ser、Thr、Tyr 或 Asn; b⁴ 是 Trp、Arg 或 Pro; b⁵ 是 Ser 或 Asn; b⁶ 是 Ser 或 Arg; b⁷ 是 His 或 Gly; b⁸ 是 Ile 或 Thr; b⁹ 是 Leu、Ile 或 Thr; b¹⁰ 是 Gly 或 Phe; b¹¹ 是 Tyr; b¹² 是 Ala 或 Ser; b¹³ 是 Asp 或 Gly; b¹⁴ 是 Ser; b¹⁵ 是 Val 或 Phe; b¹⁶ 是 Lys 或 Gln; b¹⁷ 是 Gly; c¹ 不存在或是 Gly; c² 不存在或是 Tyr; c³ 和 c⁴ 独立是不存在、Tyr、Gly 或 Val; c⁵ 不存在或是 Ser; c⁶ 是 Ser 或 Gly; c⁷ 是 Gly 或 Arg; c⁸ 是 Trp 或 Pro; c⁹ 是 His、Gly 或 Tyr; c¹⁰ 是 Val 或 Tyr; c¹¹ - c¹³ 独立是 Ser、Tyr、Phe 或 Asp; c¹⁴ 是 Phe 或 Val; c¹⁵ 是 Met 或 Asp; c¹⁶ 不存在或是 Asp; c¹⁷ 是 Tyr 或 Val。

在其他具体方面:

- a) 重链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 22 表示的氨基酸序列, 重链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 18 表示的氨基酸序列, 重链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 14 表示的氨基酸序列;
- b) 重链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 92 表示的氨基酸序列, 重链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 93 表示的氨基酸序列, 重链 CDR3 具有 SEQ ID

NO: 94 表示的氨基酸序列;

c) 重链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 98 表示的氨基酸序列, 重链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 99 表示的氨基酸序列, 重链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 100 表示的氨基酸序列;

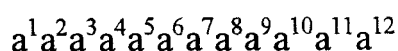
5 d) 重链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 104 表示的氨基酸序列, 重链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 105 表示的氨基酸序列, 重链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 106 表示的氨基酸序列;

10 e) 重链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 110 表示的氨基酸序列, 重链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 111 表示的氨基酸序列, 重链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 112 表示的氨基酸序列;

f) 重链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 116 表示的氨基酸序列, 重链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 117 表示的氨基酸序列, 重链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 118 表示的氨基酸序列。

15 本发明还提供特异性结合 NGF 的分离人抗体或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段, 其中所述抗体或其片段包含的轻链可变区包含:

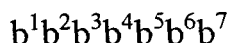
a) 包含下式氨基酸序列的 CDR1 区:



其中:

20 a^1 是极性亲水性氨基酸残基; a^2 、 a^{11} 和 a^{12} 独立是脂族或疏水性氨基酸残基; a^3 、 a^5 、 a^7 和 a^8 独立是脂族、极性亲水性或疏水性氨基酸残基; a^4 是极性亲水性氨基酸残基; a^6 是脂族或疏水性氨基酸残基; a^9 不存在, 或是脂族或极性亲水性氨基酸残基; a^{10} 是脂族、芳族或疏水性氨基酸残基;

25 b) 包含下式氨基酸序列的 CDR2 区:



其中:

b^1 是脂族、极性疏水性或疏水性氨基酸残基; b^2 是脂族或疏水性

氨基酸残基； b^3 和 b^4 独立是极性亲水性、脂族或疏水性氨基酸残基； b^5 是极性亲水性或脂族疏水性氨基酸残基； b^6 是极性亲水性或脂族疏水性氨基酸残基； b^7 是极性亲水性氨基酸残基；

c) 包含下式氨基酸序列的 CDR3 区：

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

其中：

c^1 和 c^2 独立是极性亲水性氨基酸残基； c^3 是极性亲水性、脂族或疏水性氨基酸残基； c^4 、 c^5 和 c^6 独立是脂族、极性亲水性或疏水性氨基酸残基； c^7 不存在或者是极性亲水性或脂族疏水性氨基酸残基； c^8 10 是极性亲水性或疏水性氨基酸残基； c^9 是极性亲水性氨基酸残基，且其中所述抗体或者片段以约 1×10^{-9} 或更低的 K_D 与人 NGF 多肽解离，在标准的体外试验中以约 1×10^{-8} M 或更低的 IC_{50} 中和人 NGF 生物活性。

在一个方面， a^1 、 a^3 、 a^4 、 a^7 和 a^8 独立是极性亲水性氨基酸残基； a^2 、 a^6 、 a^{11} 和 a^{12} 独立是脂族疏水性氨基酸残基； a^5 是极性亲水性或脂族氨基酸残基； a^9 不存在，或是脂族或极性亲水性氨基酸残基； a^{10} 是脂族或芳族氨基酸残基； b^1 是脂族、极性疏水性或疏水性氨基酸残基； b^2 是脂族疏水性氨基酸残基； b^3 、 b^4 和 b^7 独立是极性亲水性氨基酸残基； b^5 和 b^6 独立是极性亲水性或脂族疏水性氨基酸残基； c^1 和 c^2 独立 20 是极性亲水性氨基酸残基； c^3 是极性亲水性、脂族或疏水性氨基酸残基； c^4 、 c^5 和 c^6 独立是脂族、极性亲水性或疏水性氨基酸残基； c^7 不存在或是脂族疏水性氨基酸残基； c^8 是疏水性氨基酸残基； c^9 是极性亲水性氨基酸残基。

在一个具体方面， a^1 、 a^3 、 a^4 和 a^7 分别是 Arg、Ser、Gln 和 Ser； a^2 是 Ala； a^5 是 Gly 或 Ser； a^8 是 Ser 或 Ile； a^9 是不存在、Ser 或 Gly； a^{10} 是 Ala、Tyr、Trp 或 Phe； b^1 是 Asp、Gly、Ala 或 Val； b^2 和 b^3 分别是 Ala 和 Ser； b^4 是 Ser 或 Asn； b^5 是 Leu 或 Arg； b^6 是 Glu、Ala 或 Gln； b^7 是 Ser 或 Thr； c^1 和 c^2 是 Gln； c^3 是 Phe、Tyr、Arg 或 Ala； c^4 是 Asn、 25

Gly 或 Ser; c⁵ 是 Ser 或 Asn; c⁶ 是 Tyr、Ser、Trp 或 Phe; c⁷ 是不存在、Pro 或 His; c⁸ 是 Leu、Trp、Tyr 或 Arg; c⁹ 是 Thr。

在另一个具体方面, a¹、a²、a³、a⁴ 和 a⁷ 分别是 Arg、Ala、Ser、Gln 和 Ser; a⁵ 是 Gly 或 Ser; a⁸ 是 Ser 或 Ile; a⁹ 是不存在、Ser 或 Gly;
5 a¹⁰ 是 Ala 或 Tyr; b¹ 是 Asp 或 Gly; b² 和 b³ 分别是 Ala 和 Ser; b⁴ 是 Ser 或 Asn; b⁵ 是 Leu 或 Arg; b⁶ 是 Glu、Ala 或 Gln; b⁷ 是 Ser 或 Thr; c¹ 和 c² 是 Gln; c³ 是 Phe、Tyr、Arg 或 Ala; c⁴ 是 Asn、Gly 或 Ser; c⁵ 是 Ser 或 Asn; c⁶ 是 Tyr、Ser、Trp 或 Phe; c⁷ 是不存在、Pro 或 His; c⁸ 是 Leu、Trp、Tyr 或 Arg; c⁹ 是 Thr。

10 在其他具体方面:

a) 轻链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 24 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 20 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 16 表示的氨基酸序列;

15 b) 轻链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 95 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 96 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 97 表示的氨基酸序列;

c) 轻链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 101 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 102 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 103 表示的氨基酸序列;

20 d) 轻链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 107 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 108 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 109 表示的氨基酸序列;

e) 轻链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 113 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 114 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR3 具有
25 SEQ ID NO: 115 表示的氨基酸序列;

f) 轻链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 119 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 120 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 121 表示的氨基酸序列;

- g) 轻链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 122 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 123 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 124 表示的氨基酸序列;
- h) 轻链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 125 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 126 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 127 表示的氨基酸序列;
- i) 轻链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 128 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 129 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 130 表示的氨基酸序列;
- j) 轻链 CDR1 具有 SEQ ID NO: 132 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR2 具有 SEQ ID NO: 133 表示的氨基酸序列, 轻链 CDR3 具有 SEQ ID NO: 134 表示的氨基酸序列。

同时本发明的一部分是编码新型抗人 NGF 人抗体的多核苷酸序列、包含编码抗人 NGF 人抗体的多核苷酸序列的载体、用掺入编码抗人 NGF 人抗体的多核苷酸的载体转化的宿主细胞、包含抗人 NGF 人抗体的制剂以及制备和使用所述制剂的方法。

本发明还提供检测生物样品中的 NGF 水平的方法, 所述方法包括将样品与本发明抗体或其抗原结合片段接触的步骤。本发明的抗 NGF 抗体可应用于任何已知的分析测定方法, 如竞争性结合测定、直接和间接夹心测定、免疫沉淀测定及酶联免疫吸附测定(ELISA)(参见 Sola, 1987, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, 第 147-158 页, CRC Press, Inc.), 以对 NGF 进行检测和定量。本发明抗体能以适合于所采用的分析测定方法的亲和性结合 NGF。

此外, 本发明提供与 NGF 产生提高或者与对 NGF 敏感性提高有关的疾病的治疗方法, 所述方法包括将药学有效量的包含至少一种本发明抗体或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段的药物组合物给予有需要个体的步骤。

由某些优选实施方案的以下更详细描述以及权利要求书, 本发明

具体的优选实施方案将变得显而易见。

附图简述

图 1 描绘的图显示在基于 DRG 神经元的中和生物测定中，从杂交瘤条件培养基纯化的 4D4 单克隆抗体对 NGF 活性的中和作用。

图 2 描绘的图显示由人 NGF 活性刺激的 VR1 表达，以及在基于 DRG 神经元的中和生物测定中，从杂交瘤条件培养基纯化的抗 NGF 单克隆抗体(4D4)对 NGF 活性的中和作用。

图 3 描绘的图显示在基于 DRG 神经元的中和生物测定中，在滚瓶(R)或在旋动瓶(S)培养的细胞中表达为 IgG1 或 IgG2 的瞬时表达重组抗 NGF 4D4 单克隆抗体对 NGF 活性的中和作用。

图 4 描绘神经营养蛋白的序列比对。序列上方的编号和二级结构元件指的是成熟人 NGF。保守残基用星号标示，具有较低序列同源性的区域用阴影标示。人类 NGF 是 SEQ ID NO: 135；小鼠 NGF 是 SEQ ID NO: 136；BDNF 是 SEQ ID NO: 137；NT3 是 SEQ ID NO: 138。

图 5 显示 14D10 (SEQ ID NO: 98)、6H9 (SEQ ID NO: 104)、7H2 (SEQ ID NO: 110)、4G6 (SEQ ID NO: 116)、14D11 (SEQ ID NO: 92)和 4D4 (SEQ ID NO: 22)抗体的抗 NGF CDR1 重链比对和一致性百分率。

图 6 显示 14D10 (SEQ ID NO: 99)、6H9 (SEQ ID NO: 105)、7H2 (SEQ ID NO: 111)、4G6 (SEQ ID NO: 117)、14D11 (SEQ ID NO: 93)和 4D4 (SEQ ID NO: 18)抗体的抗 NGF CDR2 重链比对和一致性百分率。

图 7 显示 14D10 (SEQ ID NO: 100)、6H9 (SEQ ID NO: 106)、7H2 (SEQ ID NO: 112)、4G6 (SEQ ID NO: 118)、14D11 (SEQ ID NO: 94)和 4D4 (SEQ ID NO: 14)抗体的抗 NGF CDR3 重链比对和一致性百分率。

图 8 显示 14D10 (SEQ ID NO: 95)、6H9 (SEQ ID NO: 107)、7H2 (SEQ ID NO: 113)、4G6a (SEQ ID NO: 119)、4G6b (SEQ ID NO: 122)、4G6c (SEQ ID NO: 125)、4G6d (SEQ ID NO: 128)、4G6e (SEQ ID NO: 132)、14D11 (SEQ ID NO: 95)和 4D4 (SEQ ID NO: 24)抗体的抗 NGF

CDR1 轻链比对和一致性百分率(各图中的 20031028340 指 4G6a; 各图中的 20031028351 指 4G6b; 各图中的 20031071526 指 4G6c; 各图中的 20031028344 指 4G6d; 各图中的 20031000528 指 4G6e)。

图 9 显示 14D10 (SEQ ID NO: 96)、6H9 (SEQ ID NO: 108)、7H2 (SEQ ID NO: 114)、4G6a (SEQ ID NO: 120)、4G6b (SEQ ID NO: 123)、4G6c (SEQ ID NO: 126)、4G6d (SEQ ID NO: 129)、4G6e (SEQ ID NO: 133)、14D11 (SEQ ID NO: 96)和 4D4 (SEQ ID NO: 20)抗体的抗 NGF CDR2 轻链比对和一致性百分率(各图中的 20031028340 指 4G6a; 各图中的 20031028351 指 4G6b; 各图中的 20031071526 指 4G6c; 各图中的 20031028344 指 4G6d; 各图中的 20031000528 指 4G6e)。

图 10 显示 14D10 (SEQ ID NO: 97)、6H9 (SEQ ID NO: 109)、7H2 (SEQ ID NO: 115)、4G6a (SEQ ID NO: 121)、4G6b (SEQ ID NO: 124)、4G6c (SEQ ID NO: 127)、4G6d (SEQ ID NO: 130)、4G6e (SEQ ID NO: 134)、14D11 (SEQ ID NO: 97)和 4D4 (SEQ ID NO: 16)抗体的抗 NGF CDR3 轻链比对和一致性百分率(各图中的 20031028340 指 4G6a; 各图中的 20031028351 指 4G6b; 各图中的 20031071526 指 4G6c; 各图中的 20031028344 指 4G6d; 各图中的 20031000528 指 4G6e)。

图 11 显示 14D10 (SEQ ID NO: 82)、6H9 (SEQ ID NO: 84)、7H2 (SEQ ID NO: 86)、4G6a (SEQ ID NO: 88)、4G6b (SEQ ID NO: 89)、4G6c (SEQ ID NO: 90)、4G6d (SEQ ID NO: 91)、4G6e (SEQ ID NO: 131)、14D11 (SEQ ID NO: 80)和 4D4 (SEQ ID NO: 12)抗体的抗 NGF 轻链比对和一致性百分率(各图中的 20031028340 指 4G6a; 各图中的 20031028351 指 4G6b; 各图中的 20031071526 指 4G6c; 各图中的 20031028344 指 4G6d; 各图中的 20031000528 指 4G6e)。

图 12 显示 4D4 (SEQ ID NO: 10)、4G6 (SEQ ID NO: 87)、14D10 (SEQ ID NO: 81)、14D11 (SEQ ID NO: 79)、7H2 (SEQ ID NO: 85)和 6H9 (SEQ ID NO: 83)抗体的抗 NGF 重链比对和一致性百分率。

某些优选实施方案的详细描述

本文在此使用的章节标题只是出于组织目的，不应解释为对所描述的主题进行限制。对于任何目的，本申请中引用的所有参考文献通过引用结合到本文中。

5

定义

对于重组 DNA、寡核苷酸合成及组织培养和转化(例如电穿孔法、脂质转染法)可使用常规技术。酶反应和纯化技术可按照厂商说明书或者按照本领域常用的方式或者按照本文的描述来进行。上述技术和方法通常可按照本领域公知的方法，或者如本说明书中引用和讨论的各种一般及更具体的参考文献所述来进行。参见例如 Sambrook 等, 2001, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 第 3 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 对于任何目的其通过引用结合到本文中。除非提供了具体的定义，本文描述的涉及分析化学、合成有机化学及医学和药物化学的术语及实验室方法和技术，是本领域所公知和常用的。同样，可将常规技术用于化学合成、化学分析、药物制备、制剂和传递以及患者的治疗。

依照本发明公开内容应用的以下术语，除非另有指明，应被理解为具有以下含义：有关本发明抗体的词组“生物性质”、“生物特征”和术语“活性”在本文中可互换使用，包括但不限于表位亲和性和特异性(例如抗人 NGF 人抗体与人 NGF 的结合)、拮抗靶多肽的活性(例如 NGF 活性)的能力、抗体的体内稳定性以及抗体的免疫原性性质。本领域公认的抗体其他可鉴定生物性质或者特征包括例如交叉反应性(通常也就是与靶多肽的非人类同源物或者与其他蛋白质或组织的交叉反应性)，以及在哺乳动物细胞中保持蛋白质高表达水平的能力。上述性质或特征可用本领域公认的技术来观察或测定，包括但不限于 ELISA、竞争性 ELISA、表面等离子共振分析、体外和体内中和试验(如实施例 2)以及用不同来源(包括人类、灵长类动物或者任何其他可能

需要的来源)的组织切片进行的免疫组织化学分析。抗人 NGF 人抗体的具体活性和生物性质在下文实施例中有更详细的描述。

本文所用的术语“分离多核苷酸”应当指基因组、cDNA 的多核苷酸,或者合成起源的多核苷酸,或者它们的某些组合,由于其来源,5 分离多核苷酸(1)与其中天然发现该分离多核苷酸的多核苷酸的全部或一部分无关,(2)与其天然不相连的多核苷酸相连,或者(3)没有作为更大序列的一部分天然出现。

本文所指的术语“分离蛋白”意指主题蛋白质(1)没有至少某些其通常发现与其伴随的其他蛋白质,(2)基本没有相同来源(例如相同物种)10 的其他蛋白质,(3)由不同物种的细胞表达,(4)与至少约 50%的与其天然相关的多核苷酸、脂质、碳水化合物或其他物质分离,(5)不与该“分离蛋白”天然相连的蛋白质部分(通过共价或非共价相互作用)相连,(6)与其天然不相连的多肽(通过共价或非共价相互作用)有效相连,或者(7)在自然界中不出现。这种分离蛋白可由基因组 DNA、cDNA、mRNA 15 或合成起源的其他 RNA,或者它们的任何组合来编码。优选分离蛋白与见于其所在天然环境、会干扰其用途(治疗、诊断、预防、研究或者其他用途)的蛋白质或多肽或其他污染物基本分开。

“分离”抗体是已被鉴定且已与其所在天然环境的组分分离和/或从中回收的抗体。抗体天然环境中的污染成分是会干扰其诊断或治20 疗用途的物质,可包括酶、激素及其他蛋白质或非蛋白质溶质。在优选的实施方案中,抗体将被纯化(1)至超过 Lowry 法测定的抗体的 95%(重量),最优选超过 99%(重量),(2)至足以获得至少 15 个 N 端或者内部氨基酸残基序列(通过使用旋杯式测序仪)的程度,(3)至均一(通过在还原或非还原条件下使用考马斯蓝染色或优选银染色进行 SDS-25 PAGE)。分离抗体包括重组细胞内部的原位抗体,因为至少一种抗体的天然环境的组分不存在。

术语“多肽”或“蛋白质”指具有天然蛋白质序列的分子,即由天然细胞和具体非重组细胞,或者遗传工程细胞或重组细胞产生的蛋

白质，包括具有天然蛋白质的氨基酸序列的分子，或者缺失、插入和/或置换天然序列的一个或多个氨基酸的分子。术语“多肽”和“蛋白质”明确包涵抗 NGF 抗体或缺失、插入和/或置换抗 NGF 抗体的一个或多个氨基酸的序列。

- 5 术语“多肽片段”指具有氨基末端缺失、羧基末端缺失和/或内部缺失的多肽。在某些实施方案中，片段至少长为 5 至约 500 个氨基酸。可以理解，在某些实施方案中，片段至少长为 5、6、8、10、14、20、50、70、100、110、150、200、250、300、350、400 或 450 个氨基酸。特别有用的多肽片段包括功能域，包括结合域在内。在抗 NGF 抗体的情况中，有用的片段包括但不限于 CDR 区、重链或轻链的可变结构域、抗体链的一部分或者正好是其包括两个 CDR 的可变区等等。
- 10

术语“特异性结合物”指特异性结合靶标的天然或非天然分子。特异性结合物的实例包括但不限于蛋白质、肽、核酸、碳水化合物和脂质。在某些实施方案中，特异性结合物是抗体。

- 15 术语“NGF 的特异性结合物”指特异性结合 NGF 的任何部分的特异性结合物。在某些实施方案中，NGF 的特异性结合物是特异性结合 NGF 的抗体。

本文所用术语“免疫功能性免疫球蛋白片段”指含有至少免疫球蛋白重链和轻链的 CDR 的多肽片段。本发明的免疫功能性免疫球蛋白片段能够结合抗原。在优选的实施方案中，抗原是特异性结合受体的配体。在这些实施方案中，本发明的免疫功能性免疫球蛋白片段的结合防止配体与其受体结合，阻断由于配体与受体结合而产生的生物反应。优选本发明免疫功能性免疫球蛋白片段特异性结合 NGF。最优选所述片段特异性结合人 NGF。

20

- 25 本文所用的应用于某个对象的“天然”指该对象可在自然界中找到。例如，存在于可从自然界来源分离到的生物体(包括病毒)、且未被人们有意修饰的多肽或多核苷酸序列是天然的。

术语“有效连接”指该术语所指的组分处于允许它们在合适的条

件下执行其固有功能的关系之中。例如，与蛋白质编码序列“有效连接”的控制序列连接到该编码序列，从而在与控制序列的转录活性相容的条件下，蛋白质编码序列的表达得以实现。

本文所用术语“控制序列”指能够实现它们所连接的编码序列的
5 表达、加工或胞内定位的多核苷酸序列。这种控制序列的种类可能取决于宿主生物体。在具体实施方案中，原核生物的控制序列可包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列。在其他具体实施方案中，真核生物的控制序列可包括包含一个或多个转录因子的识别位点的启动子、转录增强序列、转录终止序列和聚腺苷酸化序列。在某些实施方案中，“控制序列”可包括前导序列和/或融合伴侣序列(fusion partner
10 sequence)。

本文所指的术语“多核苷酸”意指长度为至少 10 个核苷酸的单链或双链核酸聚合物。在某些实施方案中，包含多核苷酸的核苷酸可为核糖核酸或脱氧核糖核酸或任何类型的核苷酸的修饰形式。所述修饰
15 包括如碱基修饰如溴尿苷(bromuridine)、核糖修饰如阿拉伯糖苷和 2',3'-二脱氧核糖及核苷酸间键修饰如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、苯胺基硫代磷酸酯(phosphorothioate)、苯胺基磷酸酯(phosphorothioate)和氨基磷酸酯。术语“多核苷酸”明确包括单链和双链形式的 DNA。

20 本文所指术语“寡核苷酸”包括通过天然和/或非天然寡核苷酸键连接在一起的天然的和修饰的核苷酸。寡核苷酸是多核苷酸的子集，包含通常为单链且长度为 200 个核苷酸或更少的成员。在某些实施方案中，寡核苷酸的长度为 10-60 个核苷酸。在某些实施方案中，寡核苷酸的长度为 12、13、14、15、16、17、18、19 或 20-40 个核苷酸。
25 寡核苷酸可以是单链或双链，例如用于构建遗传突变体。本发明的寡核苷酸对于蛋白质编码序列可以是有义或反义寡核苷酸。

术语“天然核苷酸”包括脱氧核糖核酸和核糖核酸。术语“修饰核苷酸”包括带有修饰或取代糖基等的核苷酸。术语“寡核苷酸键”

包括寡核苷酸键如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、苯胺基硫代磷酸酯、苯胺基磷酸酯、氨基磷酸酯等。参见例如 LaPlanche 等, 1986, *Nucl. Acids Res.*, 14:9081; Stec 等, 1984, *J. Am. Chem. Soc.*, 106:6077; Stein 等, 1988, *Nucl. Acids Res.*, 16:3209; Zon 等, 5 1991, *Anti-Cancer Drug Design*, 6:539; Zon 等, 1991, *OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH*, 第 87-108 页(F.Eckstein 编辑), Oxford University Press, Oxford England; Stec 等, 美国专利第 5,151,510 号; Uhlmann 和 Peyman, 1990, *Chemical Reviews*, 90:543, 对于任何目的这些文献的公开内容通
10 过引用结合到本文中。寡核苷酸可包括可检测标记, 以便能进行寡核苷酸或其杂交的检测。

术语“载体”包括能够转运其所连接的另一种核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”, 其指另外的 DNA 节段可与其连接的环状双链 DNA 环。另一种类型的载体是病毒载体, 其中另外的 DNA 片段
15 可连接至病毒基因组中。某些载体能够在引入它们的宿主细胞中自主复制(例如具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其他载体(例如非附加型哺乳动物载体)在被引入到宿主细胞时可整合到宿主细胞的基因组中, 从而随着宿主基因组一起复制。此外, 某些载体能够指导它们有效连接的基因的表达。这种载体在本文中称为“重
20 组表达载体”(或简称“表达载体”)。一般的说, 在重组 DNA 技术中有用的表达载体往往以质粒的形式出现。在本说明书中, “质粒”和“载体”可互换使用, 因为质粒是最常用的载体形式。但是, 本发明包括这种其他类型的表达载体, 例如发挥等同功能的病毒载体(例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒)。

25 词组“重组宿主细胞”(或简称“宿主细胞”)包括重组表达载体已引入其中的细胞。本领域技术人员会理解, 这种术语不仅指具体对象细胞, 而且指这种细胞的后代。因为由于变异或环境影响, 在以后的各代中可能出现某些修饰, 这种后代实际上可不与母细胞完全相

同，但它们仍包括在本文所用的术语“宿主细胞”的范围内。有很多种宿主表达系统可用于表达本发明抗体，包括细菌、酵母、杆状病毒和哺乳动物表达系统(以及噬菌体展示表达系统)。合适的细菌表达载体的实例是 pUC19。为重组表达抗体，用一种或多种携有编码抗体免疫球蛋白轻链和重链的 DNA 片段的重组表达载体转染宿主细胞，以使轻链和重链在宿主细胞中表达，并优选被分泌到培养宿主细胞的培养基中，从所述培养基中可回收得到抗体。用标准的重组 DNA 方法获得重链和轻链基因，将这些基因掺入到重组表达载体中，并将载体引入到宿主细胞中，例如 Sambrook 等，2001, MOLECULAR CLONING, A
5
10 LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratories, Ausubel, F.M.等(编辑) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989)及 Boss 等的美国专利第 4,816, 397 号中所述。

术语“宿主细胞”用以指已用或者能够用核酸序列转化，然后能够表达选定的目的基因的细胞。该术语包括母细胞的后代，不论所述
15 后代是否在形态上或在遗传结构上与原始亲本完全相同，只要选定的基因存在即可。

术语“转导”用以指基因从一个细菌转移到另一个细菌，通常通过噬菌体转移。“转导”还指通过逆转录病毒获得和转移真核细胞序列。

20 术语“转染”用以指细胞摄入外来或外源 DNA，当外源 DNA 已被引入到细胞膜之内时，细胞即被“转染”。有多种转染技术为本领域所公知并公开于本文中。参见例如 Graham 等，1973, *Virology* 52:456 ; Sambrook 等，2001, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratories; Davis 等，
25 1986, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Elsevier; 及 Chu 等，1981, *Gene* 13:197。这种技术可用以将一种或多种外源 DNA 部分引入到合适的宿主细胞中。

术语“转化”在本文中用以指细胞的遗传特征的变化，当细胞已

被修饰从而包含新的 DNA 时, 细胞即被转化。例如, 在细胞由其天然状态被遗传修饰的情况中, 该细胞被转化。转染或转导之后, 转化 DNA 可通过在物理整合到细胞的染色体中与细胞的 DNA 重组, 或者可作为不复制的附加型元件而短暂保持, 或者可作为质粒而独立复制。当转化 DNA 随着细胞的分裂而复制时, 认为该细胞已被稳定转化。

当术语“天然出现的”或“天然的”用于生物材料如核酸分子、多肽、宿主细胞等等时, 指可在自然界中发现且未被人操控的材料。同样, 本文所用的“非天然出现的”或“非天然的”指未在自然界中发现的或者已被人结构修饰或合成的材料。

10 术语“抗原”指能由选择性结合物如抗体结合的分子或分子部分, 所述分子或分子部分另外还能够用于动物中以产生能够结合该抗原表位的抗体。抗原具有一个或多个表位。

本领域所公知的术语“一致性”指通过比较两种或更多种多肽分子的序列或者两种或更多种核酸分子的序列而确定的所述序列之间的关系。在本领域中, “一致性”也指通过两个或更多个核苷酸序列链之间或者两个或更多个氨基酸序列链之间的配对情况确定的, 核酸分子之间或多肽之间(视情况而定)的序列相关性的程度。“一致性”测定的是两个或更多个序列中(共有的)较小一个的相同配对百分率, 空位比对(如果有)通过特殊的数学模型或计算机程序(即“算法”)来处理。

术语“相似性”在本领域中用以指相关的概念, 但与“一致性”不同的是, “相似性”指的是相关性的度量, 其包括完全相同的配对和保守置换的配对。如果两个多肽序列具有例如 10/20 的相同氨基酸, 其余的均为非保守置换, 则一致性百分率和相似性百分率均为 50%。

25 在同一个实例中, 如果还有 5 个位置为保守置换, 则一致性百分率仍为 50%, 但相似性百分率将为 75% (15/20)。因此, 在存在保守置换的情况下, 两个多肽之间的相似性百分率将高于这两个多肽之间的一致性百分率。

相关核酸和多肽的一致性和相似性可通过公知的方法容易地计算出来。这种方法包括但不限于 COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, (Lesk, A.M. 编辑), 1988, Oxford University Press, New York; BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS, 5 (Smith, D.W. 编辑), 1993, Academic Press, New York; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, Part 1, (Griffin, A. M. 和 Griffin, H. G. 编辑), 1994, Humana Press, New Jersey; von Heinje, G., SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1987, Academic Press; SEQUENCE ANALYSIS PRIMER, (Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编辑), 10 1991, M. Stockton Press, New York; Carillo 等, 1988, SIAM J. Applied Math., 48:1073; 及 Durbin 等, 1998, BIOLOGICAL SEQUENCE ANALYSIS, Cambridge University Press 中描述的那些方法。

优选的一致性测定方法被设计成在受试序列之间产生最大程度的配对。一致性测定方法在可公开获得的计算机程序中有描述。优选的测定两个序列之间一致性的计算机程序方法包括但不限于 GCG 程 15 序包, 包括 GAP (Devereux 等, 1984, Nucl. Acid. Res., 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP、BLASTN 和 FASTA (Altschul 等, 1990, J. Mol. Biol., 215: 403-410)。BLASTX 程序可从美国国家生物技术信息中心 (National Center for 20 Biotechnology Information, NCBI) 和其他来源公开获得 (BLAST 手册, Altschul 等 NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul 等, 1990, 出处同上)。也可用著名的 Smith Waterman 算法测定一致性。

某些用以比对两个氨基酸序列的比对方案可能导致两个序列中只有较短一段区域配对, 而这个较小的比对区域可具有非常高的序列 25 一致性, 尽管两个全长序列之间并没有显著的关系。因此, 在某些实施方案中, 选定的比对方法 (GAP 程序) 将导致跨越靶多肽的至少 50 个连续氨基酸的比对。

例如, 使用 GAP 计算机算法 (Genetics Computer Group, University

of Wisconsin, Madison, WI), 比对两个待测定序列一致性百分率的多肽, 以对它们各自的氨基酸进行最佳配对。(“配对范围”, 由算法确定)。在某些实施方案中, 空位开放罚分(将计算为 3 乘以平均对角线; 其中“平均对角线”是所用的比较矩阵的对角线的平均值; “对角线”是由具体比较矩阵分配给各个完全氨基酸配对的分数或数值)和空位拓展罚分(其通常为空位开放罚分的十分之一), 以及比较矩阵如 PAM250 或 BLOSUM 62 与算法一起使用。在某些实施方案中, 算法中也使用标准的比较矩阵(PAM 250 比较矩阵参见 Dayhoff 等, 1978, *Atlas of Protein Sequence and Structure*, 5:345-352; BLOSUM 62 比较矩阵参见 Henikoff 等, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89:10915-10919)。

在某些实施方案中, 用于多肽序列比较的参数包括以下:

算法: Needleman 等, 1970, *J. Mol. Biol.*, 48:443-453;

比较矩阵: Henikoff 等, 1992(出处同上)的 BLOSUM 62;

空位罚分: 12

15 空位长度罚分: 4

相似性阈值: 0

GAP 程序可使用以上参数。在某些实施方案中, 上述参数是使用 GAP 算法进行多肽比较的默认参数(末端空位无罚分)。

术语“同源性”指蛋白质或核酸序列之间的相似性程度。同源信息用于理解某些蛋白质或核酸种类的遗传相关性。可通过比对和比较序列来确定同源性。通常, 为确定氨基酸同源性, 将蛋白质序列与已知蛋白质序列的数据库进行比较。同源序列在其序列上的某处享有共同的功能一致性。尽管较低程度的相似性或一致性并不一定表示缺乏同源性, 但较高程度的相似性或一致性通常表示有同源性。

25 有几种方法可用来比较一个序列的氨基酸与另一个序列的氨基酸, 以确定同源性。通常, 这些方法分为以下两类: (1)比较物理特征如极性、电荷和范德华体积, 以产生相似性矩阵; (2)基于对来自已知同源蛋白质的许多蛋白质序列的观察, 比较序列中的氨基酸被任何其

他氨基酸的可能置换,以产生可接受点突变矩阵(PAM)。

也可使用作为 Vector NTI suite 9.0.0 软件包模块的程序 needle (EMBOSS 包)或 stretcher (EMBOSS 程序包)或程序 align X, 采用默认参数(例如,空位罚分 5,空位开放罚分 15,空位拓展罚分 6.6),计算
5 一致性百分率。

本文所用的二十个常见氨基酸及其缩写遵循常规用法。参见 IMMUNOLOGY--A SYNTHESIS, 第 2 版, (E. S. Golub 和 D. R. Gren, 编辑), Sinauer Associates: Sunderland, MA, 1991, 对于任何目的其通过引用结合到本文中。二十个常见氨基酸的立体异构体(例如 D-氨基
10 酸);非天然氨基酸如 α -, α -二取代氨基酸、N-烷基氨基酸、乳酸及其他非常见氨基酸也可以作为本发明多肽的合适组分。非常见氨基酸的实例包括:4-羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、 ϵ -N,N,N-三甲基赖氨酸、 ϵ -N-乙酰赖氨酸、O-磷酸丝氨酸、N-乙酰丝氨酸、N-甲酰甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟赖氨酸、 α -N-甲基精氨酸及其他类似的氨基酸和亚氨基
15 酸(例如 4-羟脯氨酸)。依据标准用法和惯例,在本文所用的多肽符号中,左手方向是氨基末端方向,右手方向是羧基末端方向。

根据共同的侧链性质,可将天然残基分类如下:

- 1) 疏水性残基: 正亮氨酸(Nor), Met, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Tyr, Pro;
- 20 2) 极性亲水性残基: Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr;
- 3) 脂族残基: Ala, Gly, Ile, Leu, Val, Pro;
- 4) 脂族疏水性残基: Ala, Ile, Leu, Val, Pro;
- 5) 中性亲水性残基: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 6) 酸性残基: Asp, Glu;
- 25 7) 碱性残基: His, Lys, Arg;
- 8) 影响链的方向的残基: Gly, Pro;
- 9) 芳族残基: His, Trp, Tyr, Phe;
- 10) 芳族疏水性残基: Phe, Trp, Tyr。

保守氨基酸置换可能涉及这些类别中的某一类别的成员与同一类别的另一成员互换。保守氨基酸置换可包括非天然氨基酸残基，其通常通过化学肽合成而不是在生物体系中合成而掺入。这些包括肽模拟物和氨基酸部分的其它颠倒或反向形式。

- 5 非保守置换可包括这些类别中的某一类别的成员与另一类别的成员互换。这种置换残基可被引入到人抗体中与非人抗体同源的区域，或者被引入到分子中的非同源区域。

根据某些实施方案，在造成这种变化时，可考虑氨基酸的亲水性指数。根据每种氨基酸的疏水性和电荷特征，给予其亲水性指数。它们为：异亮氨酸(+4.5)；缬氨酸(+4.2)；亮氨酸(+3.8)；苯丙氨酸(+2.8)；半胱氨酸/胱氨酸(+2.5)；甲硫氨酸(+1.9)；丙氨酸(+1.8)；甘氨酸(-0.4)；苏氨酸(-0.7)；丝氨酸(-0.8)；色氨酸(-0.9)；酪氨酸(-1.3)；脯氨酸(-1.6)；组氨酸(-3.2)；谷氨酸(-3.5)；谷氨酰胺(-3.5)；天冬氨酸(-3.5)；天冬酰胺(-3.5)；赖氨酸(-3.9)；及精氨酸(-4.5)。

- 15 亲水性氨基酸指数在赋予蛋白质活性生物功能方面的重要性为本领域所认识(参见例如 Kyte 等, 1982, *J. Mol. Biol.* 157:105-131)。已知可用某些氨基酸置换具有类似亲水性指数或分数的其他氨基酸，且仍保持类似的生物活性。在根据亲水性指数造成这种变化时，在某些实施方案中，包括其亲水性指数在 ± 2 之内的氨基酸置换。在某些实施方案中，包括其亲水性指数在 ± 1 之内的氨基酸置换，还在某些实施方案中，包括其亲水性指数在 ± 0.5 之内的氨基酸置换。

本领域还认识到，如本文所公开的，可根据亲水性有效地造成相似氨基酸的置换，特别是在所创建的生物功能性蛋白质或肽意在用于免疫学实施方案中的情况下。在某些实施方案中，由其邻近氨基酸的亲水性所决定的蛋白质最大局部平均亲水性与其免疫原性和抗原性相关，即与该蛋白质的生物性质相关。

已给这些氨基酸残基分配以下亲水性值：精氨酸(+3.0)；赖氨酸(+3.0)；天冬氨酸(+3.0 $\pm$ 1)；谷氨酸(+3.0 $\pm$ 1)；丝氨酸(+0.3)；天冬酰胺

胺(+0.2); 谷氨酰胺(+0.2); 甘氨酸(0); 苏氨酸 (-0.4); 脯氨酸(-0.5±1); 丙氨酸(-0.5); 组氨酸(-0.5); 半胱氨酸 (-1.0); 甲硫氨酸(-1.3); 缬氨酸 (-1.5); 亮氨酸(-1.8); 异亮氨酸(-1.8); 酪氨酸(-2.3); 苯丙氨酸(-2.5)和色氨酸(-3.4)。在根据类似的亲水性值造成变化时, 在某些实施方案中, 包括其亲水性指数在±2 之内的氨基酸置换, 在某些实施方案中, 包括其亲水性指数在±1 之内的氨基酸置换, 还在某些实施方案中, 包括其亲水性指数在±0.5 之内的氨基酸置换。还可根据亲水性从一级氨基酸序列鉴别表位。这些区域也称为“表位核心区”。

示例性的氨基酸置换在表 1 中显示。

10

表 1

氨基酸置换

原始氨基酸	示例性置换	优选置换
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, 正亮氨酸	Leu
Leu	正亮氨酸, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 二氨基丁酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser

Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, 正亮氨酸	Leu

技术人员使用公知的技术，将能够确定本文表示的多肽的合适变体。在某些实施方案中，本领域技术人员可通过以认为对活性不重要的区域为目标，鉴别可改变而又不破坏活性的合适分子区域。在其他
5 实施方案中，技术人员能够鉴别在类似多肽中保守的残基和分子部分。在其它实施方案中，甚至对于生物活性或对于结构具有重要性的区域也可进行保守氨基酸置换，而又不破坏生物活性或者对多肽的结构产生不利影响。

另外，本领域技术人员可检阅有关鉴别类似多肽中对活性或结构
10 重要的残基的结构-功能研究。根据这种比较研究，技术人员能够预测出蛋白质中氨基酸残基的重要性，其对应于类似蛋白质中对活性或结构重要的氨基酸残基。本领域技术人员可为这种预测重要的氨基酸残基选择在化学上类似的氨基酸置换。

本领域技术人员还能够参照类似多肽中的三维结构，对三维结构
15 和氨基酸序列进行分析。根据这种信息，本领域技术人员可以参照抗体的三维结构预测其氨基酸残基的排列。在某些实施方案中，本领域技术人员可选择不对预测位于蛋白质表面的氨基酸残基造成基团变化，因为这种残基可能参与与其他分子的相互作用。此外，本领域技术人员可以产生出在各期望氨基酸残基处包含单个氨基酸置换的试验
20 变体。然后可以使用本领域技术人员公知的活性测定法对变体进行筛选。可以用这种变体来收集有关合适变体的信息。例如，如果发现特定氨基酸残基的变化导致活性破坏、不合乎需要的降低或者不合适的活性，则可以避免带有这种变化的变体。换句话说，根据从这种常规实验收集到的信息，本领域技术人员能够容易地确定应避免单独或者
25 与其他突变一起出现进一步的置换的氨基酸。

有许多科学出版物已致力于研究二级结构的预测。参见 Moulton, 1996, *Curr. Op. in Biotech.* 7:422-427; Chou 等, 1974, *Biochemistry* 13:222-245; Chou 等, 1974, *Biochemistry* 113:211-222; Chou 等, 1978, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47:45-148; Chou 等, 1979, *Ann. Rev. Biochem.* 47:251-276; 及 Chou 等, 1979, *Biophys. J.* 26:367-384。此外, 目前也有计算机程序可帮助预测二级结构。一种预测二级结构的方法基于同源性建模。例如, 序列一致性大于 30%或者相似性大于 40%的两种多肽或蛋白质通常具有类似的拓扑结构。蛋白质结构数据库(PDB)的近期发展已使二级结构(包括多肽或蛋白质结构内部的潜在折叠数目)的预测性提高。参见 Holm 等, 1999, *Nucl. Acid. Res.* 27:244-247。有人提出(Brenner 等, 1997, *Curr. Op. Struct. Biol.* 7:369-376), 在具体多肽或蛋白质中, 折叠的数目有限, 且一旦解析了结构的临界数目, 结构预测将明显变得更加准确。

另外的二级结构预测方法包括“串线算法(threading)” (Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:377-87; Sippl 等, 1996, *Structure* 4:15-19)、“序型分析”(Bowie 等, 1991, *Science* 253:164-170; Gribskov 等, 1990, *Meth. Enzym.* 183:146-159; Gribskov 等, 1987, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84:4355-4358)和“进化连锁”(参见 Holm, 1999, 出处同上; 及 Brenner, 1997, 出处同上)。

在某些实施方案中, 抗体变体包括糖基化变体, 与亲本多肽的氨基酸序列相比, 其中的糖基化位点数目和/或类型已改变。在某些实施方案中, 比起天然蛋白质, 蛋白质变体包含的 N-连接糖基化位点的数目更多或更少。N-连接糖基化位点特征为以下序列: Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr, 其中标记为 X 的氨基酸残基可以是除脯氨酸之外的任何氨基酸残基。产生这种序列的氨基酸残基置换为 N-连接碳水化合物链的添加提供潜在的新位点。或者, 消除该序列的置换将会除去现有的 N-连接碳水化合物链。还提供了 N-连接碳水化合物链的重排, 其中除一个或多个 N-连接糖基化位点(通常为天然 N-连接糖基化位点), 且创

建一个或多个新的 N-连接位点。另外的优选抗体变体包括半胱氨酸变体，比起亲本氨基酸序列，其中有一个或多个半胱氨酸残基缺失或被另一种氨基酸(例如丝氨酸)置换。当抗体必须重折叠成生物活性构象时(比如在不可溶包涵体分离之后)，半胱氨酸变体可能有用。半胱氨酸变体具有的半胱氨酸残基通常比天然蛋白质要少，且通常为偶数个，以使由非配对半胱氨酸产生的相互作用最少。

在另外的实施方案中，抗体变体可包括包含修饰 Fc 片段或修饰重链恒定区的抗体。Fc 片段(其表示可结晶片段)或重链恒定区可通过突变进行修饰，以赋予抗体改变的结合特征。参见例如 Burton 和 Woof, 1992, *Advances in Immunology* 51:1-84; Ravetch 和 Bolland, 2001, *Annu. Rev. Immunol.* 19:275-90; Shields 等, 2001, *Journal of Biol. Chem* 276:6591-6604; Telleman 和 Junghans, 2000, *Immunology* 100:245-251; Medesan 等, 1998, *Eur. J. Immunol.* 28:2092-2100; 所有这些文献通过引用结合到本文中)。这种突变可包括置换、插入、缺失或它们的任何组合，通常通过按照本文描述的方法，以及按照本领域公知的方法(参见例如 Sambrook 等, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 第 3 版, 2001, Cold Spring Harbor, N.Y. 及 Berger 和 Kimmel, METHODS IN ENZYMOLOGY, 第 152 卷, Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, Inc., San Diego, CA., 这些文献通过引用结合到本文中)，使用一种或多种诱变寡核苷酸进行定点诱变来产生。

根据某些实施方案，氨基酸置换作用为如下：(1) 降低对蛋白酶解的易感性，(2) 降低对氧化作用的易感性，(3) 改变使蛋白质复合物形成的结合亲和性，(4) 改变结合亲和性和/或(5) 赋予或修饰这种多肽其他生理化学或功能性质。根据某些实施方案，在天然序列中(在某些实施方案中，在形成分子间接触的结构域以外的多肽部分)，可以造成单个或多个氨基酸置换(在某些实施方案中，保守氨基酸置换)。在优选的实施方案中，保守氨基酸置换通常并不实质上改变亲本序列的结

构特征(例如置换氨基酸不应倾向于使亲本序列中出现的螺旋破裂,或者使表征亲本序列的其他类型的二级结构破坏)。本领域公认的多肽二级和三级结构的实例描述于 PROTEINS, STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES, (Creighton 编辑), 1984, W. H. Freeman 和 Company, New York; INTRODUCTION TO PROTEIN STRUCTURE (C. Branden 和 J. Tooze, 编辑), 1991, Garland Publishing, New York, N.Y.; 及 Thornton 等, 1991, *Nature* 354:105, 以上各文献通过引用结合到本文中。

肽类似物常作为性质与模板肽类似的非肽药物用于制药工业中。这些类型的非肽化合物称为“肽模拟物”。参见 Fauchere, 1986, *Adv. Drug Res.* 15:29; Veber & Freidinger, 1985, *TINS* 第 392 页; 及 Evans 等, 1987, *J. Med. Chem.* 30:1229, 对于任何目的以上文献通过引用结合到本文中。这种化合物通常是借助于计算机分子建模而被开发出来的。在结构上与治疗上有用肽类似的肽模拟物可用以产生类似的治疗或预防效果。一般的说, 肽模拟物在结构上与模式多肽(即具有某种生化性质或药物活性的多肽)如人抗体相类似, 但具有一个或多个肽键通过本领域公知的方法任选由选自以下的键替换: $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ (顺式和反式)、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2\text{SO}-$ 。用同一类型的 D-氨基酸对共有序列的一个或者多个氨基酸进行系统性置换(例如 D-赖氨酸置换 L-赖氨酸), 在某些实施方案中可用以产生更稳定的肽。另外, 包含共有序列或基本相同的共有序列变体的约束(constrained)肽可用本领域公知的方法来产生(Rizo & Gierasch, 1992, *Ann. Rev. Biochem.* 61:387, 对于任何目的其通过引用结合到本文中); 例如, 通过添加能够使肽环化形成分子内二硫桥的内部半胱氨酸残基来产生。

“抗体”或“抗体肽”指完整抗体或者与完整抗体竞争特异性结合的结合片段。在某些实施方案中, 结合片段由重组 DNA 技术产生。在另外的实施方案中, 结合片段通过对完整抗体进行酶法或化学法切

割来产生。结合片段包括但不限于 F(ab)、F(ab')、F(ab')₂、Fv 和单链抗体。

术语“重链”包括具有足够的可变区序列以赋予 NGF 特异性的任何免疫球蛋白多肽。术语“轻链”包括具有足够的可变区序列以赋予 NGF 特异性的任何免疫球蛋白多肽。全长重链包括一个可变区结构域 V_H 及三个恒定区结构域 C_{H1}、C_{H2} 和 C_{H3}。V_H 结构域位于多肽的氨基末端，C_{H3} 结构域位于羧基末端。本文所用术语“重链”涵括全长重链及其片段。全长轻链包括一个可变区结构域 V_L 和一个恒定区结构域 C_L。如同重链一样，轻链的可变区结构域位于多肽的氨基末端。本文所用术语“轻链”涵括全长轻链及其片段。F(ab) 片段由一条轻链及一条重链的 C_{H1} 和可变区组成。F(ab) 分子的重链不能与另一个重链分子形成二硫键。F(ab') 片段含有一条轻链和一条重链，所述重链含有 C_{H1} 和 C_{H2} 结构域之间的更多恒定区，这样在两条重链之间可形成链间二硫键，形成 F(ab')₂ 分子。Fv 区包含源自重链和轻链的可变区，但缺少恒定区。单链抗体是其中重链和轻链可变区已由柔性连接基团连接而形成单一多肽链的 Fv 分子，该单一多肽链形成抗体结合区。在国际专利申请公开 WO 88/01649 和美国专利第 4,946,778 号和第 5,260,203 号中对单链抗体有更详细的描述。

在某些实施方案中，“多特异性”或“多功能性”抗体之外的二价抗体应理解为包含具有相同抗原特异性的结合位点。

在根据本发明评估抗体结合性和特异性时，当过量的抗体减少结合到受体的配体量达到至少约 20%、40%、60%、80%、85% 或更高(尤其使用体外竞争性结合试验测定)时，则抗体基本抑制配体吸附至受体。

“中和抗体”是指能够封闭或实质上降低与其结合的靶抗原的效应子功能的抗体分子。因此，“中和”抗 NGF 抗体能够封闭或实质上降低 NGF 的效应子功能，例如受体结合和/或细胞反应的引发。“实质上降低”意指降低至少约 60%，优选至少约 70%，更优选至少约

75%，甚至更优选至少约 80%，还更优选至少约 85%，最优选至少约 90%的靶抗原(例如人 NGF)效应子功能。

术语“表位”包括能够特异性结合免疫球蛋白或 T 细胞受体的任何决定簇，优选多肽决定簇。在某些实施方案中，表位决定簇包括分子的化学活性表面基团，如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基，而且
5 在某些实施方案中，可具有特异性三维结构特征和/或特异性电荷特征。表位是抗原的可被抗体结合的区域。在某些实施方案中，当抗体在蛋白质和/或大分子的复合混合物中优先识别其靶抗原时，则可以说它特异性结合抗原。在优选的实施方案中，当平衡解离常数 $\leq 10^{-8}$ M，
10 更优选当平衡解离常数 $\leq 10^{-9}$ M，最优选当平衡解离常数 $\leq 10^{-10}$ M 时，则可以说抗体特异性结合抗原。

当某抗体与参比抗体这两种抗体识别相同表位或空间重叠表位时，则该抗体结合与参比抗体“基本上相同的表位”。测定两种抗体是否结合相同表位或空间重叠表位的最常用和快速的方法是竞争性试验，其使用标记抗原或标记抗体，能以所有数量的不同形式装配。通常，将抗原固定化于基质上，用放射性标记或酶标记测定未标记抗体
15 封闭标记抗体的结合的能力。

术语“作用物”在本文中用以表示化学化合物、化学化合物的混合物、生物大分子或从生物材料获得的提取物。

20 本文所用术语“标记”或“标记的”指将可检测标记的掺入，例如通过掺入放射性标记氨基酸或使可被标记亲和素(例如链霉亲和素，优选包含可检测的标记如荧光标记、化学发光标记或者可通过光学或比色方法检测的酶活性)检测到的生物素部分连接到多肽。在某些实施方案中，标记还具有治疗性。各种标记多肽和糖蛋白的方法为本
25 领域所公知，且可方便地用于本文公开的方法中。多肽标记的实例包括但不限于以下：放射性同位素或放射性核素(例如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、荧光标记(例如异硫氰酸荧光素或称 FITC、罗丹明或者磷化镧系(lanthanide phosphors))、酶标记(例如辣根过氧化

物酶、 β -半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶)、化学发光标记、半抗原标记如生物素基团及由第二报道分子识别的预定多肽表位(例如亮氨酸拉链对序列、第二抗体的结合位点、金属结合结构域或表位标签)。在某些实施方案中,标记通过各种长度的间隔臂(如 $(CH_2)_n$,其中
5 $n < \text{约 } 20$)连接,以减少潜在的空间位阻。

本文所用术语“生物样品”包括但不限于来自生命体或以前的生命体的任何数量的物质。所述生物体包括但不限于人类、小鼠、猴、大鼠、兔和其他动物。所述物质包括但不限于血液、血清、尿、细胞、器官、组织、骨、骨髓、淋巴结和皮肤。

10 本文所用术语“药物”指当将其正确给予患者时,能够诱导期望的治疗效果的化学化合物或组合物。涉及包含一种或多种本发明抗体的药物组合物的措辞“治疗有效量”按本发明应理解为意指所述药物组合物的量,其在受照顾患者中能够消除对外界刺激的灵敏度阈值的下降,使该灵敏度阈值恢复到可与健康对象中所观察到的阈值相比的
15 水平。

“病症”是可受益于本发明治疗的任何疾病。“病症”和“疾病”在本文中可互换使用,包括慢性和急性 NGF 介导病症或 NGF 介导的疾病,包括使哺乳动物倾向于发生所讨论病症的病理情况。

术语“NGF 介导的疾病”和“NGF 介导的病症”涵括与 NGF 水
20 平升高或对 NGF 敏感性提高有关的任何医学疾病或病症,包括但不限于急性痛、牙痛、外伤导致的疼痛、外科手术疼痛、截肢或脓肿导致的疼痛、灼痛、脱髓鞘病、三叉神经痛、癌症、慢性酒精中毒、中风、丘脑痛综合征、糖尿病、获得性免疫缺陷综合征(“AIDS”)、毒素和化疗、一般性头痛、偏头痛、丛集性头痛、混合型血管和非血管综合
25 征(mixed-vascular or non-vascular syndromes)、紧张性头痛、一般炎症、关节炎、风湿病、狼疮、骨关节炎、炎性肠病、过敏性肠综合征、炎性眼病、炎性或不稳定性膀胱功能障碍、牛皮癣、炎性组分造成的皮肤不适、晒伤、心炎、皮炎、肌炎、神经炎、胶原血管病、慢性炎性

疾病、炎性疼痛及相关痛觉过敏和异常性疼痛、神经性疼痛及相关痛觉过敏和异常性疼痛、糖尿病性神经性疼痛、灼痛、交感神经维持的疼痛、传入神经阻滞综合征、哮喘、上皮组织损伤或功能紊乱、单纯疱疹、在呼吸、泌尿生殖、胃肠或者血管区域的内脏活动障碍、创伤、5 烧伤、过敏性皮肤反应、瘙痒、白癜风、一般性胃肠机能紊乱、结肠炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、血管舒缩性或过敏性鼻炎或者支气管病、痛经、消化不良、胃食管反流、胰腺炎和内脏痛。

本文所用术语“有效量”和“治疗有效量”当用以指含一种或多种抗人 NGF 人抗体的运载体或药物组合物时，指足以产生期望的效果10 (即对于用本发明运载体或抗人 NGF 人抗体治疗的情况，期望的效果是例如炎症和/或疼痛的减少)或者足以帮助 NGF 的一种或多种生物活性的水平可观察下降的数量或剂量。更具体的说，治疗有效量是抗人 NGF 人抗体的量，其足以抑制用作用物体内治疗的对象中与所讨论的疾病(例如炎症或疼痛)有关的一种或多种临床定义的病理过程达一段15 时间。在本发明中，“有效量”的抗人 NGF 抗体可以防止、停止、控制或降低对与任何疼痛医学疾病有关的疼痛的感知。在本发明方法中，术语“控制”及其语法变体用以指不需要的事件(例如疼痛)的防止、部分或完全抑制、降低、延迟或减缓。有效量可根据选定的具体运载体或抗人 NGF 人抗体而变化，同时取决于与待治疗患者有关的多20 种因素和情况，以及病症的严重程度。例如，如果运载体或抗人 NGF 人抗体体内给予，则要考虑的因素有患者的年龄、体重和健康状况，以及在临床前动物试验中获得的剂量-反应曲线及毒性数据等等。如果作用物待与细胞进行体外接触，同样要设计多个临床前体外研究，以评估摄入、半寿期、剂量、毒性等参数。指定作用物的有效量或治疗25 有效量的确定完全在本领域技术人员的能力范围内。

本文所用术语“神经生长因子”和“NGF”定义为所有的哺乳动物种类的天然序列 NGF，包括 SEQ ID NO: 30 所示的重组人 1-120。

本文所用的“基本纯净的”或“基本纯化的”意指作为主要种类

而存在的化合物或种类(即以摩尔量计,它比组合物中的任何其他单独的种类都丰富得多)。在某些实施方案中,基本纯化的部分是其中某些种类占有所有存在的大分子种类的至少约 50% (以摩尔量计)的组合物。在某些实施方案中,基本纯净的组合物占组合物中存在的所有大分子种类的比例超过约 80%、85%、90%、95%或 99%。在某些实施方案中,该种类被纯化至基本均一(通过常规检测方法不能在组合物中检测到污染种类),其中组合物基本由单一大分子种类组成。

术语“患者”包括人类和动物对象。

“治疗”指治疗性处理和预防性或防护性措施。需要接受治疗的对象包括已患有病症的对象,以及易患上病症的对象或者须预防病症的对象。

除非上下文另有要求,单数形式的术语应包括复数含义,复数形式的术语应包括单数含义。

根据本发明的某些实施方案,导向 NGF 的抗体可用以治疗神经性和炎性疼痛及 NGF 介导的疾病,包括但不限于上述疼痛和疾病。

本发明的一个方面提供针对人 NGF 产生的和对结合人 NGF 具有生物和免疫特异性的完全人单克隆抗体。本发明另一方面提供核酸,其包含的核苷酸序列编码重链和轻链免疫球蛋白分子的氨基酸序列,特别是对应于其可变区的序列。本发明这个方面的具体实施方案是对应于互补决定区(CDR)的序列,具体的说是本发明提供的重链和轻链的 CDR1 至 CDR3。本发明的又一个方面提供表达免疫球蛋白分子和抗体、优选本发明单克隆抗体的杂交瘤细胞和细胞系。本发明还提供抗体的生物学上和免疫学上纯化的制剂,所述抗体优选是针对人 NGF 产生的和对结合人 NGF 具有生物和免疫特异性的单克隆抗体。

在酵母人工染色体(YAC)中,克隆和重建兆碱基大小的人基因座并将所述基因座引入到小鼠种系的能力,为阐明非常大的或粗略作图的基因座的功能成分以及产生有用的人类疾病模型提供有利的方法。此外,用人的对应等价物置换小鼠基因座这种技术的应用,对发育过

程中人基因产物的表达和调节、其与其他系统的通讯以及其在疾病引发和发展中的参与情况提供了独到深入了解。

这种策略的一种重要的实际应用是小鼠体液免疫系统的“人源化”。将人免疫球蛋白(Ig)基因座引入到其中的内源 Ig 基因已失活的小鼠，为研究抗体的程序表达和装配的基础机制以及抗体在 B 细胞发育中的作用提供了机会。此外，这种策略为完全人单克隆抗体(MAb)的生产提供了来源。

术语“人抗体”包括具有基本对应于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。在某些实施方案中，人抗体在非人哺乳动物中生产，包括但不限于啮齿类动物如小鼠和大鼠，及兔类动物如兔。在某些实施方案中，人抗体在杂交瘤细胞中生产。在某些实施方案中，人抗体用重组法生产。

涉及抗体的术语“重组”包括通过重组手段制备、表达、创建或分离得到的抗体。示例性的实例包括用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体、从重组组合人抗体文库分离的抗体、从转有人免疫球蛋白基因的动物(例如小鼠)分离的抗体(参见例如 Taylor, L.D.等, *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295, (1992); 或者通过任何涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接至其他 DNA 序列的手段制备、表达、创建或分离得到的抗体。这种重组人抗体具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。

相比于非人抗体和嵌合抗体，人抗体用于人类治疗时具有至少以下三个优点：

1) 由于抗体的效应子部分是人效应子，它可以更好地与人免疫系统的其他部分发生相互作用(例如更有效地通过依赖补体的细胞毒性(CDC)或依赖抗体的细胞毒性(ADCC)破坏靶细胞)；

2) 人免疫系统不会将人抗体识别为外源抗体，因此对这种注射抗体的抗体反应比对完全外源的非人抗体或部分外源的嵌合抗体要轻；

3) 据报道，注射的非人抗体在人体循环中的半寿期比人抗体的半

寿期要短得多。注射人抗体的半寿期与天然人抗体的半寿期基本相同，使得可以给予更少的剂量和更少的次数。

因此，预期完全人抗体能使小鼠 MAb 或者小鼠衍生化 MAb 固有的免疫原性反应和变应性反应减至最少，从而提高所给予抗体的效力和安全性。因此，本发明的完全人抗体可用于治疗慢性和复发性疼痛，所述疼痛的治疗需要反复给予抗体。因此，本发明抗 NGF 抗体的一个特别优点在于抗体是完全人抗体，可以非剧烈(non-acute)方式给予患者，同时又使通常伴随人抗小鼠抗体或其他前述来自非人物种的非完全人抗体的不利反应减至最少。

本领域技术人员能够用大的人 Ig 基因座片段工程改造小鼠抗体生产缺陷的小鼠品系，使该小鼠不产生小鼠抗体而产生人抗体。大的人 Ig 片段可保持较大的可变基因多样性以及抗体生产和表达的正确调节。通过充分利用抗体多样化和选择的小鼠细胞机制和对人蛋白质的免疫耐受性的缺乏，这些小鼠品系中再现的人抗体免疫细胞库产生对任何目的抗原(包括人抗原)具有高度亲和性的抗体。用杂交瘤技术可生产和选择出具有期望特异性的抗原特异性人 MAb。

可以利用在免疫时能够不产生内源免疫球蛋白而产生人抗体的完整免疫细胞库的转基因动物(例如小鼠)。将人种系免疫球蛋白基因阵列转移到这种种系突变体小鼠中，将导致在抗原攻击时产生人抗体(参见例如 Jakobovits 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551-2555, (1993); Jakobovits 等, Nature, 362:255-258, (1993); Bruggemann 等, Year in Immun., 7:33 (1993); Nature 148:1547-1553 (1994), Nature Biotechnology 14:826 (1996); Gross, J.A. 等, Nature, 404:995-999 (2000); 及美国专利第 5,877,397 号、第 5,874,299 号、第 5,814,318 号、第 5,789,650 号、第 5,770,429 号、第 5,661,016 号、第 5,633,425 号、第 5,625,126 号、第 5,569,825 号和第 5,545,806 号(对于任何目的以上各文献通过引用整体结合到本文中))。人抗体也可在噬菌体展示文库中生产(Hoogenboom 和 Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1992); Marks 等,

J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). Cole 等和 Boerner 等的技术也可用来制备人单克隆抗体(Cole 等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therap, Alan R. Liss, 第 77 页 (1985)及 Boerner 等, J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)).

- 5 也可使重组人抗体进行体外诱变(或者当使用转有人 Ig 序列的动物时, 进行体内体细胞诱变), 因此重组抗体的 VH 区和 VL 区的氨基酸序列是这样的序列, 其虽然源自与人种系 VH 序列和 VL 序列相关的序列, 但可能没有天然存在于体内人抗体种系细胞库中。

 在某些实施方案中, 技术人员可以将来自人类以外的物种的恒定
10 区与人可变区一起用于这种小鼠中, 以产生嵌合抗体。

天然抗体的结构

- 天然抗体的结构单元通常包含四聚体。每个这种四聚体通常由完全相同的两对多肽链组成, 每对链具有一条全长“轻”链(分子量通常
15 约为 25 kDa)和一条全长“重”链(分子量通常约为 50-75kDa)。每条轻链和重链的氨基末端部分通常包括含约 100-110 个或者更多个氨基酸、通常负责抗原识别的可变区。每条链的羧基末端通常确定负责效应子功能的恒定区。人轻链通常分为 κ 轻链和 λ 轻链。重链通常分为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ 重链, 并分别确定抗体的同种型为 IgM、IgD、IgG、IgA
20 和 IgE。IgG 具有几个亚类, 包括但不限于 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。IgM 的亚类包括但不限于 IgM1 和 IgM2。IgA 类似地可细分成亚类, 包括但不限于 IgA1 和 IgA2。通常在全长轻链和重链内部, 可变区和恒定区通过含约 12 个或者更多个氨基酸的“J”区连接, 重链同时还包括含约 10 个或更多个氨基酸的“D”区。参见例如 FUNDAMENTAL
25 IMMUNOLOGY, 第 7 章, 第 2 版, (Paul, W.编辑), 1989, Raven Press, N.Y. (对于任何目的其通过引用整体结合到本文中)。每个轻/重链对的可变区通常形成抗原结合位点。

 可变区通常展示相同的一般结构, 即相对保守的框架区(FR)与三

个高变区(也称互补决定区或 CDR)连接。每一对的两条链的 CDR 通常通过框架区排列, 这使与特定表位的结合成为可能。轻链和重链的可变区从 N 端到 C 端通常包含 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4 结构域。每个结构域的氨基酸排布通常是按照 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (1987 和 1991, National Institutes of Health, Bethesda, Md.)或者 Chothia & Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等, 1989, Nature 342:878-883 的定义来进行的。

双特异性或双功能性抗体

10 双特异性或双功能性抗体通常是具有两个不同的重链/轻链对和两个不同结合位点的人工杂交抗体。双特异性抗体可通过多种方法来生产, 包括但不限于杂交瘤的融合或 F(ab')片段的连接。参见例如 Songsivilai & Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny 等, 1992, J. Immunol 148:1547-1553。

15

抗体的制备

本发明提供结合人 NGF 的抗体。可通过用全长 NGF 或其片段进行免疫来生产这些抗体。本发明抗体可以是多克隆抗体或者单克隆抗体, 和/或可以是重组抗体。在优选的实施方案中, 本发明抗体是例如
20 通过免疫能够产生人抗体的转基因动物而制备的人抗体(参见例如国际专利申请公开 WO 93/12227)。

本发明抗 NGF 抗体的轻链可变区和重链可变区的互补决定区(CDR)可移植到同一物种或另一物种的框架区(FR)。在某些实施方案中, 抗 NGF 抗体的轻链可变区和重链可变区的 CDR 可移植到共有人
25 FR。为创建共有人 FR, 比对几个人重链或轻链氨基酸序列中的 FR, 以鉴别共有氨基酸序列。抗 NGF 抗体重链或轻链的 FR 可用来自不同的重链或轻链的 FR 置换。抗 NGF 抗体的重链和轻链的 FR 中的稀有氨基酸通常不被置换, 而其余的 FR 氨基酸则可被置换。稀有氨基酸

是特殊的氨基酸,其通常在FR中不能找到它们的位置。本发明抗NGF抗体的移植可变区可与不同于抗NGF抗体恒定区的恒定区一起使用。或者,移植可变区是单链Fv抗体的一部分,CDR移植描述于例如美国专利第6,180,370号、第5,693,762号、第5,693,761号、第5,585,089号和第5,530,101,它们对于任何目的通过引用结合到本文中。

本发明抗体优选转基因小鼠来制备,所述转基因小鼠的抗体产生细胞中插入了很大一部分的人抗体产生基因座,且进一步被工程改造成在产生内源鼠抗体方面出现缺陷。这种小鼠能够产生人免疫球蛋白分子和抗体,不产生或者产生量大为减少的鼠免疫球蛋白分子和抗体。用以获得这种结果的技术在本说明书中公开的专利、专利申请和参考文献中有公开。在优选的实施方案中,技术人员可采用如在国际专利申请公开WO 98/24893中公开的方法,所述公开对于任何目的通过引用结合到本文中。也参见Mendez等,1997, *Nature Genetics* 15:146-156,对于任何目的其通过引用结合到本文中。

本发明单克隆抗体(mAb)可通过多种技术生产,包括常规的单克隆抗体方法,例如Kohler和Milstein的标准体细胞杂交技术(1975, *Nature* 256:495)。虽然优选体细胞杂交程序,但原则上也可采用其他生产单克隆抗体的技术,例如B淋巴细胞的病毒或者癌基因转化。

优选的制备杂交瘤的动物系统是小鼠。已很好地确立在小鼠中生产杂交瘤,且免疫方案和分离免疫脾细胞以供融合的技术为本领域所公知。融合伙伴(例如鼠骨髓瘤细胞)和融合程序也是公知的。

在优选的实施方案中,导向NGF的人单克隆抗体可用携有人免疫系统而不是小鼠免疫系统部分的转基因小鼠来生产。这些转基因小鼠在本文称为“HuMab”小鼠,含有编码非重排人(μ 和 γ)重链和 κ 轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因小基因座,以及使内源 μ 和 κ 链基因座失活的靶向突变(Lonberg等,1994, *Nature* 368:856-859)。因此,小鼠对小鼠IgM或 κ 的表达减少,且为响应免疫,引入的人重链转基因和

- 轻链转基因发生类别转换和体细胞突变,以产生高度亲和性人 IgG κ 单克隆抗体(Lonberg等,出处同上;Lonberg和Huszar,1995,*Intern. Rev. Immunol.* **13**:65-93; Harding 和 Lonberg, 1995, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **764**:536-546)。HuMab 小鼠的制备在 Taylor 等,1992, *Nucleic Acids Res.* **20**:6287-6295; Chen 等,1993, *International Immunology* **5**:647-656; Tuailon 等,1994, *J. Immunol.* **152**:2912-2920; Lonberg 等,1994, *Nature* **368**:856-859; Lonberg, 1994, *Handbook of Exp. Pharmacology* **113**:49-101; Taylor 等,1994, *International Immunology* **6**:579-591; Lonberg & Huszar, 1995, *Intern. Rev. Immunol.* **13**:65-93; Harding & Lonberg, 1995, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **764**:536-546; Fishwild 等,1996, *Nature Biotechnology* **14**:845-851 中有详细的描述,所有这些文献的内容通过引用整体结合到本文中。另外参见 Lonberg 和 Kay 的美国专利第 5,545,806 号;第 5,569,825 号;第 5,625,126 号;第 5,633,425 号;第 5,789,650 号;第 5,877,397 号;第 5,661,016 号;第 5,814,318 号;第 5,874,299 号和第 5,770,429, 以及 Surani 等的美国专利第 5,545,807 号;1993 年 6 月 24 日出版的国际专利申请公开 WO 93/1227;1992 年 12 月 23 日出版的 WO 92/22646;及 1992 年 3 月 19 日出版的 WO 92/03918,所有这些文献的公开内容通过引用整体结合到本文中。或者,以下实施例中描述的 Hco7、Hco12 和 KM 转基因小鼠可用来产生人抗 NGF 抗体。
- 20 本发明提供对生物活性人 NGF 多肽具有特异性且能中和所述多肽的人单克隆抗体。本发明还提供抗体重链和轻链氨基酸序列,所述序列对 NGF 多肽具有高度特异性,且与 NGF 多肽结合时能将其中和。这种高度特异性使得抗人 NGF 人抗体及具有类似特异性的人单克隆抗体成为 NGF 相关疾病的有效免疫疗法。
- 25 在一个方面,本发明提供结合的表位与本文提供的 4D4 抗体相同或基本相同的分离人抗体。
- 在一个方面,本发明提供包含至少 SEQ ID NO: 10、12、14、16、18、20、22、24 和 79-130 所示的氨基酸序列之一的分离人抗体,所述

抗体能以高度亲和性结合 NGF 多肽表位, 且具有拮抗 NGF 多肽活性的能力。优选这些抗体结合的表位与本文提供的 4D4 抗体相同或基本相同。

在优选的实施方案中, 分离人抗体以 1×10^{-9} M 或更低的解离常数(K_D)结合 NGF 多肽, 且在体外中和试验中以 1×10^{-7} M 或更低的 IC_{50} 抑制 NGF 诱导的存活。在更优选的实施方案中, 分离人抗体以 1×10^{-10} M 或更低的解离常数(K_D)结合 NGF 多肽, 且在体外中和试验中以 1×10^{-8} M 或更低的 IC_{50} 抑制 NGF 诱导的存活。在甚至更优选的实施方案中, 分离抗 NGF 人抗体以 1×10^{-11} M 或更低的解离常数(K_D)结合人 NGF 多肽, 且在体外中和试验中以 1×10^{-9} M 或更低的 IC_{50} 抑制 NGF 诱导的存活。本文提供了符合以上结合和中和标准的抗人 NGF 人抗体的实例。

本发明的最优选抗人 NGF 人抗体在本文中称为 4D4, 其具有 SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 10 分别所示的 VL 多肽序列和 VH 多肽序列。编码 4D4 的 VL 和 VH 的多核苷酸序列分别如 SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 9 所示。本发明抗人 NGF 人抗体的性质在实施例中明确公开。本文显示的对 NGF 多肽的高度亲和性及拮抗 NGF 多肽活性的高能力特别值得注意。

如实施例 9 中的一般描述, 抗人 NGF 人抗体的解离常数(K_D)可通过表面等离子共振进行测定。通常, 表面等离子共振分析是使用 BIAcore 系统(Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ), 通过表面等离子共振(SPR)测定配体(固定化于生物传感器基质上的重组 NGF 多肽)和分析物(溶液中的抗体)之间的实时结合相互作用。也通过固定化分析物(生物传感器基质上的抗体)和呈递配体(溶液中的重组 V)进行表面等离子分析。抗人 NGF 人抗体的解离常数(K_D)也可用 KinExA 方法来测定。在本发明的某些实施方案中, 抗体以大约 10^{-8} M- 10^{-12} M 的 K_D 结合 NGF。本文所用术语“ K_D ”意指特定抗体-抗原相互作用的解离常数。对于本发明的目的, K_D 如实施例 9 所述进行测定。

在优选的实施方案中，本发明抗体属 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 同种型。优选抗体属 IgG3 同种型。更优选抗体属 IgG1 同种型。最优选抗体属 IgG2 同种型。在其他实施方案中，本发明抗体属 IgM、IgA、IgE 或 IgD 同种型。在本发明的优选实施方案中，抗体包含人κ轻链和
5 人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重链。包含 IgG1 或 IgG2 重链恒定区的本发明抗体的表达描述于以下实施例中。在具体实施方案中，抗体的可变区连接到 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 同种型的恒定区之外的恒定区。在某些实施方案中，本发明抗体已被克隆，以在哺乳动物细胞中表达。

10 在某些实施方案中，针对抗 NGF 抗体的重链和轻链的保守修饰(以及针对编码核苷酸的相应修饰)将产生具有与本文公开的抗 NGF 抗体类似的功能特征和化学特征的抗 NGF 抗体。相反，可通过选择如下重链和轻链的氨基酸序列中的置换，实现抗 NGF 抗体的功能特征和/或化学特征的实质修饰，所述重链和轻链在保持(a)置换部位的分子骨
15 架结构，例如折叠或螺旋构象，(b)靶位点处的分子电荷或疏水性或者(c)侧链的大小这三方面的作用相差很大。

例如，“保守氨基酸置换”可涉及用非天然氨基酸残基置换天然氨基酸残基，结果对置换位置的氨基酸残基的极性 or 电荷有极少或没有影响。此外，如前面对“丙氨酸扫描诱变”所述，多肽中的任何天
20 然残基也可用丙氨酸置换。

期望的氨基酸置换(无论是保守置换还是非保守置换)可由本领域技术人员在需要这种置换的时候进行确定。在某些实施方案中，氨基酸置换可用来鉴别抗 NGF 抗体的重要残基，或者用来提高或降低本文描述的抗 NGF 抗体的亲和性。

25 众所周知，氨基酸序列中的微小变化，如缺失、插入或置换一个、少数或甚至几个氨基酸可导致出现具有基本相同性质的原始蛋白质等位形式。因此，除了本文明确描述的抗体之外，其他“基本同源的”抗体也可用本领域技术人员公知的多种重组 DNA 技术容易地设计和

制备出来。一般的说,可通过多种公知技术如定点诱变,容易地实现基因的修饰。因此,本发明设想具有与本文公开的抗 NGF 人抗体基本类似特征的“变异的”或“突变的”抗 NGF 人抗体(参见例如 WO 00/56772,其全部内容通过引用结合到本文中)。因此,涉及抗 NGF 人抗体的术语“变体”或“突变体”意指如下的任何结合分子(分子 X)

5 (i) 其中重链高变区 CDR1、CDR2 和 CDR3 或者轻链的高变区 CDR1、CDR2 和 CDR3 作为整体分别与 SEQ ID NO: 14、18 和 22 或者 SEQ ID NO: 16、20 和 24 所示的高变区具有至少 80%的同源性,优选至少 90%的同源性,更优选至少 95%的同源性,(ii) 其中所述变体或突变体能够抑制人 NGF 的活性,其抑制程度与框架区完全相同于分子 X 的参

10 比抗 NGF 人抗体相同。

一般地,抗 NGF 人抗体变体的轻链和/或重链 CDR 作为整体,将分别与 SEQ ID NO: 14、18 和 22 和/或 SEQ ID NOS: 16、20 和 24 所示的氨基酸序列有至少约 80%的氨基酸序列一致性,优选至少约 85%的

15 序列一致性,还更优选至少约 90%的序列一致性,还更优选至少约 91%的序列一致性,还更优选至少约 92%的序列一致性,还更优选至少约 93%的序列一致性,还更优选至少约 94%的序列一致性,还更优选至少约 95%的序列一致性,还更优选至少约 96%的序列一致性,还更优选至少约 97%的序列一致性,还更优选至少约 98%的序列一致性,还

20 更优选至少约 99%的氨基酸序列一致性。

更优选地,抗 NGF 人抗体变体的轻链可变区作为整体,将与 SEQ ID NO: 12、80、82、84、86、88、89、90 或 91 所示的氨基酸序列有至少约 80%的氨基酸序列一致性,还更优选至少约 81%的序列一致性,还更优选至少约 82%的序列一致性,还更优选至少约 83%的序列

25 一致性,还更优选至少约 84%的序列一致性,还更优选至少约 85%的序列一致性,还更优选至少约 86%的序列一致性,还更优选至少约 87%的序列一致性,还更优选至少约 88%的序列一致性,还更优选至少约 89%的序列一致性,还更优选至少约 90%的序列一致性,还更优选至

少约 91%的序列一致性, 还更优选至少约 92%的序列一致性, 还更优选至少约 93%的序列一致性, 还更优选至少约 94%的序列一致性, 还更优选至少约 95%的序列一致性, 还更优选至少约 96%的序列一致性, 还更优选至少约 97%的序列一致性, 还更优选至少约 98%的序列一致性, 还更优选至少约 99%的氨基酸序列一致性, 和/或重链可变区作为整体, 将与 SEQ ID NO: 10、81、83、85、或 87 所示的氨基酸序列有至少约 70%的氨基酸序列一致性, 优选至少约 75%的序列一致性, 还更优选至少约 80%的序列一致性, 还更优选至少约 81%的序列一致性, 还更优选至少约 82%的序列一致性, 还更优选至少约 83%的序列一致性, 还更优选至少约 84%的序列一致性, 还更优选至少约 85%的序列一致性, 还更优选至少约 86%的序列一致性, 还更优选至少约 87%的序列一致性, 还更优选至少约 88%的序列一致性, 还更优选至少约 89%的序列一致性, 还更优选至少约 90%的序列一致性, 还更优选至少约 91%的序列一致性, 还更优选至少约 92%的序列一致性, 还更优选至少约 93%的序列一致性, 还更优选至少约 94%的序列一致性, 还更优选至少约 95%的序列一致性, 还更优选至少约 96%的序列一致性, 还更优选至少约 97%的序列一致性, 还更优选至少约 98%的序列一致性, 还更优选至少约 99%的氨基酸序列一致性。

涉及多核苷酸的“变体”意指与本发明多核苷酸序列具有至少约 75%核酸序列一致性的核酸分子。一般地, 多核苷酸的变体与本文公开的新型核酸序列将有至少约 75%的核酸序列一致性, 更优选至少约 80%的核酸序列一致性, 还更优选至少约 81%的核酸序列一致性, 还更优选至少约 82%的核酸序列一致性, 还更优选至少约 83%的核酸序列一致性, 还更优选至少约 84%的核酸序列一致性, 还更优选至少约 85%的核酸序列一致性, 还更优选至少约 86%的核酸序列一致性, 还更优选至少约 87%的核酸序列一致性, 还更优选至少约 88%的核酸序列一致性, 还更优选至少约 89%的核酸序列一致性, 还更优选至少约 90%的核酸序列一致性, 还更优选至少约 91%的核酸序列一致性, 还

- 更优选至少约 92%的核酸序列一致性, 还更优选至少约 93%的核酸序列一致性, 还更优选至少约 94%的核酸序列一致性, 还更优选至少约 95%的核酸序列一致性, 还更优选至少约 96%的核酸序列一致性, 还更优选至少约 97%的核酸序列一致性, 还更优选至少约 98%的核酸序列一致性, 还更优选至少约 99%的核酸序列一致性。
- 5 列一致性, 还更优选至少约 99%的核酸序列一致性。

在具体实施方案中, 本发明提供与本发明抗体有一部分一致性的抗体, 或者包含的重链可变区、轻链可变区、CDR1、CDR2 或 CDR3 区与本文实施例 10 和图 5-10 所示的本发明重链可变区、轻链可变区、CDR1、CDR2 或 CDR3 区有一部分一致性的抗体。

- 10 在某些实施方案中, 本发明提供特异性结合神经生长因子、包含重链和轻链的分离人抗体, 其中所述重链包含的重链可变区包含如下氨基酸序列: 其与 SEQ ID NO: 10 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%或 75%的一致性; 与 SEQ ID NO: 81 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%、80%、85%或 95%的同源性; 与 SEQ ID NO: 83 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%、80%、85%或 95%的一致性; 与 SEQ ID NO: 85 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%、80%或 85%的一致性; 与 SEQ ID NO: 87 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%、75%或 80%的一致性; 与 SEQ ID NO: 79 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 56%的一致性。
- 15 蛋白片段有至少 70%、80%、85%或 95%的同源性; 与 SEQ ID NO: 83 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%、80%、85%或 95%的一致性; 与 SEQ ID NO: 85 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%、80%或 85%的一致性; 与 SEQ ID NO: 87 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%、75%或 80%的一致性; 与 SEQ ID NO: 79 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 56%的一致性。
- 20 抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%、75%或 80%的一致性; 与 SEQ ID NO: 79 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 56%的一致性。

- 在某些实施方案中, 本发明提供特异性结合神经生长因子、包含重链和轻链的分离人抗体, 其中所述轻链包含的轻链可变区包含如下氨基酸序列: 其与 SEQ ID NO: 12 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%、75%、80%或 90%的一致性; 与 SEQ ID NO: 80 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%、85%或 90%的一致性; 与 SEQ ID
- 25 氨基酸序列: 其与 SEQ ID NO: 12 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%、75%、80%或 90%的一致性; 与 SEQ ID NO: 80 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%、85%或 90%的一致性; 与 SEQ ID

NO: 88 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%、74%、90%或 94%的一致性；与 SEQ ID NO: 89 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%、80%、85%或 87%的一致性；与 SEQ ID NO: 90 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%、85%、90%或 94%的一致性；与 SEQ ID NO: 91 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%、85%、90%、95%或 99%的一致性；与 SEQ ID NO: 82 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%、80%、90%、95%或 96%的一致性；与 SEQ ID NO: 84 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%、85%、90%、95%、98%或 99%的一致性；或者与 SEQ ID NO: 86 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%、85%、90%、95%、98%或 99%的一致性。

在某些其他实施方案中，本发明提供特异性结合神经生长因子、包含人重链 CDR1 的分离人抗体，其中所述重链 CDR1 是以下的氨基酸序列，其与 SEQ ID NO: 98、SEQ ID NO: 105、SEQ ID NO: 110 或 SEQ ID NO: 22 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 40%或 60%的一致性。

在其他实施方案中，本发明提供特异性结合神经生长因子、包含人重链 CDR2 的分离人抗体，其中所述重链 CDR2 是以下的氨基酸序列：其与 SEQ ID NO: 99 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%、82%或 94%的一致性；与 SEQ ID NO: 106 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%或 76%的一致性；与 SEQ ID NO: 18 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 59%的一致性；与 SEQ ID NO: 117 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%的一致性；与 SEQ ID NO: 111 表示

的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少70%、75%或80%的一致性。

在还其他实施方案中，本发明提供特异性结合神经生长因子、包含人轻链 CDR1 的分离人抗体，其中所述 CDR1 是以下的氨基酸序列：

5 其与 SEQ ID NO: 101 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%或 80%的一致性；与 SEQ ID NO: 95 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%、75%、80%或 90%的一致性；与 SEQ ID NO: 119 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 75%、

10 80%或 90%的一致性；与 SEQ ID NO: 122 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 75%、80%或 90%的一致性；与 SEQ ID NO: 125 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 80%的一致性；与 SEQ ID NO: 24 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少

15 75%、80%或 90%的一致性；与 SEQ ID NO: 107 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%或 80%的一致性；或者与 SEQ ID NO: 113 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%或 80%的一致性。

在另外的实施方案中，本发明提供特异性结合神经生长因子、包含人轻链 CDR2 的分离人抗体，其中所述 CDR2 是以下的氨基酸序列：

20 其与 SEQ ID NO: 102 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%或 85%的一致性；与 SEQ ID NO: 96 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%的一致性；与 SEQ ID NO: 120 表示的氨基酸序列或其抗原结合

25 片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%的一致性；与 SEQ ID NO: 123 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%的一致性；与 SEQ ID NO: 126 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%或 85%的一

致性；与 SEQ ID NO: 129 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%或 85%的一致性；与 SEQ ID NO: 20 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%的一致性；与 SEQ ID NO: 108 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%或 85%的一致性；与 SEQ ID NO: 133 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%的一致性；或者与 SEQ ID NO: 114 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%或 85%的一致性。

10 在其他实施方案中，本发明提供特异性结合神经生长因子、包含人轻链 CDR3 的分离人抗体，其中所述 CDR3 是以下的氨基酸序列：其与 SEQ ID NO: 103 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%或 85%的一致性；与 SEQ ID NO: 97 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%或 85%的一致性；与 SEQ ID NO: 121 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%或 78%的一致性；与 SEQ ID NO: 127 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%或 78%的一致性；与 SEQ ID NO: 130 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%或 78%的一致性；与 SEQ ID NO: 16 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%或 78%的一致性；与 SEQ ID NO: 109 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 70%或 85%的一致性；与 SEQ ID NO: 134 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 78%的一致性；或者与 SEQ ID NO: 115 表示的氨基酸序列或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段有至少 85%的一致性。

4D4 抗体重链可变区和轻链可变区的序列分别在 SEQ ID NO: 10 和 12 中显示。但是，许多潜在的 CDR-接触残基易被其他氨基酸置换，

且仍让抗体保持对抗原相当的亲和性。同样,许多不与重链和轻链中的 CDR 接触的框架残基能容纳相应位置的氨基酸被来自其他人抗体的人共有氨基酸或来自其他小鼠抗体的氨基酸置换,又不对人抗体的亲和性或非免疫原性造成显著的损失。可以选择各种另外的氨基酸,以产生各种形式的本文所公开抗 NGF 抗体及其片段,其具有亲和性、5 特异性、非免疫原性、制备容易性和其他需要性质的可变组合。

在另外的实施方案中,本发明抗体可在杂交瘤细胞系之外的细胞系中表达。在这些实施方案中,编码特定抗体的序列可用来转化合适的哺乳动物宿主细胞。根据这些实施方案,转化可用任何已知的用以10 将多核苷酸引入到宿主细胞中的方法来实现,包括例如将多核苷酸包装在病毒中(或包装到病毒载体中)并用病毒(或载体)转导宿主细胞,或者通过本领域公知的转染方法来实现,如美国专利第 4,399,216 号、第 4,912,040 号、第 4,740,461 号和第 4,959,455 号(所有这些专利对于任何目的通过引用结合到本文中)所例示的转染方法。通常,所用的转化方法15 可取决于待转化的宿主。用以将异源多核苷酸引入到哺乳动物细胞中的方法是本领域公知的,包括但不限于葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、polybrene 介导的转染、原生质体融合、电穿孔法、多核苷酸包入脂质体中及 DNA 直接显微注射到细胞核中。

用标准的连接技术,将本发明 NGF 抗体的重链恒定区、重链可变20 区、轻链恒定区或轻链可变区的氨基酸序列的编码核酸分子插入到适当的表达载体中。在优选的实施方案中,将抗 NGF 抗体重链恒定区或轻链恒定区附加到适当的可变区的 C 端,并连接到表达载体中。通常对载体进行选择,使其在所采用的特定宿主细胞中具有功能(即载体与宿主机制相容,使得基因的扩增和/或基因的表达能够发生)。有关表达25 载体的综述参见 METH. ENZ. 185 (Goeddel 编辑), 1990, Academic Press。

通常,用于任何宿主细胞的表达载体会含有用于维持质粒和克隆和表达外源核苷酸序列的序列。这种序列在某些实施方案中合称为“侧

翼序列”，通常包括一种或多种以下核苷酸序列：启动子、一种或多种增强子序列、复制起点、转录终止序列、含有供体和接纳体剪接位点的完全内含子序列、编码多肽分泌前导序列的序列、核糖体结合位点、聚腺苷酸化序列、用以插入编码待表达多肽的核酸的多接头区、

5 及选择标记元件。这些序列的每一个在下文中讨论。

任选载体可含有“标记”编码序列，即位于抗 NGF 抗体多肽编码序列的 5'或 3'末端的寡核苷酸分子；该寡核苷酸序列编码聚组氨酸(如六组氨酸)或者另一种“标记”，如 FLAG、HA (血凝素流感病毒)或 myc (存在针对其的市售抗体)。这种标记通常在多肽表达时融合至多肽，可作为对宿主细胞中的 NGF 抗体进行亲和纯化和检测的手段。可例如使用针对标记的抗体作为亲和基质，通过柱色谱法实现亲和纯10 化。任选随后可通过各种手段，如使用某些用于进行切割的肽酶，使标记从纯化的抗 NGF 抗体多肽除去。

侧翼序列可以是同源的(即来自与宿主细胞相同的物种和/或株系)、异源的(即来自宿主细胞物种或株系之外的物种)、杂交的(即来自15 不止一种来源的侧翼序列的组合)、合成的或者天然的。这样，侧翼序列的来源可以是任何原核或真核生物体、任何脊椎动物或无脊椎动物生物体、或任何植物，条件是侧翼序列在宿主细胞机制中具有功能，且能够被宿主细胞机制激活。

20 用于本发明载体的侧翼序列可通过任何本领域公知的几种方法来获得。通常，用于本文的侧翼序列先前已经通过作图和/或限制性内切核酸酶酶切消化鉴定，并因此可用适当的限制性内切核酸酶从合适的组织来源分离出来。在某些情况下，侧翼序列的完全核苷酸序列可能是已知的。在这一点上，可用本文描述的核酸合成或克隆方法合成25 侧翼序列。

不管侧翼序列的全部或者仅有一部分是已知的，其都可以通过用聚合酶链反应(PCR)来获得，和/或通过用合适的探针，如来自同一种或另一种物种的寡核苷酸和/或侧翼序列片段，筛选基因组文库来获

得。在侧翼序列未知的情况下,含有侧翼序列的 DNA 片段可从可能含有例如编码序列或者甚至另一种或几种基因的更大一段 DNA 分离出来。可如下实现分离:通过限制性内切核酸酶酶切消化产生合适的 DNA 片段,然后用琼脂糖凝胶纯化法、Qiagen®柱色谱(Chatsworth, CA)或技术人员公知的其他方法进行分离。为实现这个目的而选择合适的酶对于本领域普通技术人员来说是显而易见的。

复制起点通常是可从市场购得的原核表达载体的一部分,该起点协助载体在宿主细胞中的扩增。如果所选择的载体不含有复制起点位点,则可以根据已知的序列通过化学法合成一个位点,并将其连接到载体中。例如,质粒 pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA)的复制起点适合于大多数革兰氏阴性细菌,各种病毒起点(例如 SV40、多瘤病毒、腺病毒、水泡性口炎病毒(VSV)或乳头瘤病毒 HPV 或 BPV 的起点)可用于在哺乳动物细胞中克隆载体。通常,复制起点组分对于哺乳动物表达载体来说不是必要的(例如,SV40 起点经常只是因为它还含有病毒早期启动子才被使用)。

转录终止序列通常位于多肽编码区末端的 3',用以终止转录。通常,原核细胞中的转录终止序列是富含 G-C 的片段,紧接着 poly-T 序列。虽然该序列可容易地从文库中克隆出来,或者甚至作为载体的一部分而从市场购得,还也可用本文描述的核酸合成方法容易地合成出来。

选择标记基因编码对于生长于选择性培养基的宿主细胞的存活和生产所必需的蛋白质。典型的选择标记基因编码具有如下作用的蛋白质:(a) 赋予原核宿主细胞对抗生素或其他毒素(例如氨苄青霉素、四环素或卡那霉素)的抗性;(b) 补充细胞的营养缺陷;或(c) 供应不能从合成培养基或确定成分培养基获得的关键性营养物。优选的选择标记是卡那霉素抗性基因、氨苄青霉素抗性基因及四环素抗性基因。新霉素抗性基因也可有利地用于原核和真核宿主细胞的选择。

可用其他选择基因来扩增待表达的基因。扩增是这样的过程,其

中生产对细胞生长或存活具有关键作用的蛋白质所需要的基因在重组细胞的连续世代的染色体中串连重复。合适的哺乳动物选择标记的实例包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因和无启动子胸苷激酶基因。使哺乳动物细胞转化子处于选择压力中, 其中只有转化子才能依靠载体中存在的选择性基因唯一生存。通过在将培养基中选择因子的浓度逐次提高的条件下培养转化细胞, 来施加选择压力, 从而导致选择性基因和编码另一种基因产物(如结合 NGF 多肽的抗体)的 DNA 同时扩增。结果, 从扩增 DNA 合成出的多肽如抗 NGF 抗体的量增加。

核糖体结合位点通常是 mRNA 的翻译起始所必需的, 其特征为 Shine-Dalgarno 序列(原核生物)或 Kozak 序列(真核生物)。该位点元件通常位于启动子的 3', 位于待表达多肽的编码序列的 5'。

在某些情况下, 如需要在真核宿主细胞表达系统中糖基化的情况下, 可以对各种前序列进行操作, 以增进糖基化作用或提高产量。例如, 可以改变具体信号肽的肽酶切割位点, 或添加前序列, 这也可以影响糖基化作用。最终蛋白质产物在-1 位置(相对于成熟蛋白质的第一个氨基酸)可能具有一个或多个随表达产生的、尚未完全被除去的另外氨基酸。例如, 最终蛋白质产物可具有一个或多个在肽酶切割位点发现的连接到氨基末端的氨基酸残基。或者, 使用某些酶切割位点时, 如果酶在成熟多肽内的这种区域进行切割, 会导致出现所需多肽的略微截短形式。

本发明的表达和克隆载体通常会含有被宿主生物体识别, 且有效连接到编码抗 NGF 抗体的分子的启动子。启动子是位于结构基因的起始密码子的上游(即 5')的非转录序列(通常在约 100 至 1000 bp 之内), 其控制结构基因的转录。启动子通常可归入以下两类之一: 诱导型启动子和组成型启动子。诱导型启动子响应培养条件中的某种变化(如营养物的存在或缺乏或者温度的变化), 引发其控制下的 DNA 转录水平提高。另一方面, 组成型启动子均匀地转录它们所有有效连接的基因, 也就是说, 对基因表达的控制极少或者没有。已知有许多可被各种潜

在宿主细胞识别的启动子。合适的启动子如下有效连接到编码本发明抗 NGF 抗体(包含重链或轻链)的 DNA: 用限制性酶酶切消化将启动子从源 DNA 中除去, 并将期望的启动子序列插入到载体中。

供与酵母宿主一起使用的合适启动子也是本领域公知的。酵母增强子可有利地与酵母启动子一起使用。供与哺乳动物宿主细胞一起使用的合适启动子是公知的, 包括但不限于从病毒如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(如腺病毒 2)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙肝病毒和最优选猴病毒 40 (SV40)的基因组获得的启动子。其他合适的哺乳动物启动子包括异源哺乳动物启动子, 例如热休克启动子和肌动蛋白启动子。

可能具有重要性的另外启动子包括但不限于: SV40 早期启动子(Bernoist 和 Chambon, 1981, *Nature* 290:304-10); CMV 启动子(Thomsen 等, 1984, *Proc. Natl. Acad. USA* 81:659-663); Rous 肉瘤病毒的 3'长末端重复序列中包含的启动子(Yamamoto 等, 1980, *Cell* 22:787-97); 疱疹胸苷激酶启动子(Wagner 等, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-45); 金属硫蛋白基因中的启动子和调节序列(Brinster 等, 1982, *Nature* 296:39-42); 及原核启动子如 β -内酰胺酶启动子(Villa-Kamaroff 等, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:3727-31); 或者 tac 启动子(DeBoer 等, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:21-25)。同样具有重要性的是显示组织特异性且已应用于转基因动物的以下动物转录控制区: 在胰腺腺泡细胞中有活性的弹性蛋白酶 I 基因控制区(Swift 等, 1984, *Cell* 38:639-46; Ornitz 等, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409 (1986); MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); 在胰腺 β 细胞中有活性的胰岛素基因控制区(Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-22); 在淋巴样细胞中有活性的免疫球蛋白基因控制区(Grosschedl 等, 1984, *Cell* 38:647-58; Adames 等, 1985, *Nature* 318:533-38; Alexander 等, 1987, *Mol. Cell. Biol.*, 7:1436-44); 在睾丸细胞、乳腺细胞、淋巴样细胞和肥大细胞中有活性的小鼠乳腺癌病毒控制区(Leder 等, 1986,

Cell 45:485-95); 在肝脏中有活性的清蛋白基因控制区(Pinkert 等, 1987, *Genes* 和 *Devel.* 1:268-76); 在肝脏中有活性的甲胎蛋白基因控制区(Krumlauf 等, 1985, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1639-48; Hammer 等, 1987, *Science* 235:53-58); 在肝脏中有活性的 α 1-抗胰蛋白酶基因控制区(Kelsey 等, 5 1987, *Genes* 和 *Devel.* 1:161-71); 在髓样细胞中有活性的 β 珠蛋白基因控制区(Mogram 等, 1985, *Nature* 315:338-40; Kollias 等, 1986, *Cell* 46:89-94); 在大脑中少突胶质细胞中有活性的髓鞘碱性蛋白基因控制区(Readhead 等, 1987, *Cell* 48:703-12); 在骨骼肌中有活性的肌球蛋白轻链-2 基因控制区(Sani, 1985, *Nature* 314:283-86); 及在下丘脑中有活性的促性腺素释放激素基因控制区(Mason 等, 1986, *Science* 234:1372-10 78)。

增强子序列可插入到载体中, 以增强高等真核生物对编码本发明抗 NGF 抗体(包含轻链或重链)的 DNA 的转录。增强子是 DNA 的顺式作用元件, 长度通常为 10-300 bp, 作用于启动子以增强转录作用。增强子相对不依赖于方向和位置, 其已被发现于转录单位的 5'和 3'位置。已知有几种增强子序列可得自哺乳动物基因(例如珠蛋白、弹性蛋白酶、清蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)。但是, 通常使用来自病毒的增强子。本领域公知的 SV40 增强子、巨细胞早期启动子增强子、多瘤病毒增强子和腺病毒增强子是用以激活真核启动子的示例性增强子元件。虽然增强子在载体中可能位于编码序列的 5'和 3',但它通常位于启动子 5'的位点。15 20

可从起始载体如市售载体构建本发明表达载体。这种载体可含有或不含有所有期望的侧翼序列。在载体中不再存在本文描述的一种或多种侧翼序列的情况下, 可以个别地获得侧翼序列并将它们连接到载体中。用以获得每一种侧翼序列的方法对本领域技术人员是公知的。25

在载体已被构建出来, 且编码组成抗 NGF 抗体的轻链、重链或者轻链和重链的核酸分子已插入到载体的正确位点之后, 可将所完成的载体插入到合适的宿主细胞中, 以进行扩增和/或多肽表达。可通过公

知的方法将抗 NGF 抗体的表达载体转化到选定的宿主细胞中,方法包括转染、感染、磷酸钙共沉淀、电穿孔、显微注射、脂质转染、DEAE-葡聚糖介导的转染或者其他已知的技术。所选择的方法经常在部分上由待使用的宿主细胞的类型决定。这些方法和其他合适的方法对技术人员是公知的,在例如 Sambrook 等(出处同上)中有阐述。

宿主细胞当在适当的条件下培养时,会合成抗 NGF 抗体,所述抗体随后可从培养基中收集(如果宿主细胞将抗体分泌到培养基中)或者直接从产生抗体的宿主细胞收集(如果不分泌抗体)。适当的宿主细胞的选择往往取决于各种因素,如期望的表达水平、活性所要求或所必需的多肽修饰(如糖基化和磷酸化)及折叠成生物活性分子的容易程度。

可用作表达宿主的哺乳动物细胞系是本领域公知的,包括但不限于可获自美国典型培养物中心(ATCC)的无限增殖化细胞系,包括但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HeLa 细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如 Hep G2)和多种其他细胞系。在某些实施方案中,可通过确定哪种细胞系具有高表达水平且能组成型地产生具有 NGF 结合性质的抗体,来选择细胞系。在另一个实施方案中,可以选择不会产生自身抗体,但有能力产生和分泌异源抗体的 B 细胞谱系的细胞系。

本发明抗体可用于检测生物样品中的 NGF 和鉴定能产生 NGF 蛋白的细胞或组织。特异性结合 NGF 的本发明抗体可用于 NGF 介导疾病的治疗。所述抗体能用于结合试验中,以检测 NGF 和抑制 NGF 与 NGF 受体形成复合物。所述结合 NGF 和阻断与其他结合化合物相互作用的抗体在调节 NGF 介导的疾病方面可能具有治疗性用途。在优选的实施方案中,抗 NGF 抗体可阻断 NGF 与其受体的结合,这可能会导致 NGF 诱导的信号转导级联被破坏。

本发明还涉及一种或多种本发明抗体在制备药物中的用途,所述药物用于治疗患者中由 NGF 表达增加或对 NGF 敏感性提高而造成的

疼痛病症或疾病(例如本文公开的任一种病症或疾病)。

在优选的实施方案中,本发明提供包含治疗有效量的一种或多种本发明抗体以及药物可接受稀释剂、载体、增溶剂、乳化剂、防腐剂和/或佐剂的药物组合物。优选可接受的制剂材料在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒。在优选的实施方案中,提供了包含治疗有效量的抗 NGF 抗体的药物组合物。

在某些实施方案中,可接受的制剂材料优选在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒。

在某些实施方案中,药物组合物可含有用以调节、维持或保持例如组合物的 pH、摩尔渗透压浓度、粘度、透明度、颜色、等渗性、气味、无菌度、稳定性、溶解或释放速率、吸收或穿透速率的制剂材料。在这种实施方案中,合适的制剂材料包括但不限于氨基酸(甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸);抗微生物剂、抗氧化剂(如抗坏血酸、亚硫酸钠、亚硫酸氢钠);缓冲剂(如硼酸盐、碳酸氢盐、Tris-HCl、柠檬酸盐、磷酸盐或其他有机酸);膨胀剂(如甘露糖醇或甘氨酸);螯合剂(如乙二胺四乙酸(EDTA));络合剂(如咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、 β -环状糊精或羟丙基- β -环状糊精);填充剂;单糖;二糖;及其他碳水化合物(如葡萄糖、甘露糖或糊精);蛋白质(如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白);着色剂、矫味剂和稀释剂;乳化剂;亲水性聚合物(如聚乙烯吡咯烷酮);低分子量多肽;成盐反荷离子(如钠);防腐剂(如苯扎氯胺、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、尼泊金甲酯、尼泊金丙酯、氯己定、山梨酸或过氧化氢);溶剂(如甘油、丙二醇或聚乙二醇);糖醇(如甘露醇或山梨醇);悬浮剂;表面活性剂或湿润剂(如泊洛沙姆、PEG、脱水山梨糖酯、聚山梨酯如聚山梨酯 20、聚山梨酯 80、triton、氨丁三醇、卵磷脂、胆固醇、泰洛沙泊);稳定性增强剂(如蔗糖或山梨醇);张力增强剂(如碱金属卤化物,优选氯化钠或氯化钾,甘露糖醇、山梨糖醇);传递介质;稀释剂;赋形剂和/或药物佐剂。参见 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 第 18 版, (A.R.

Gennaro 编辑), 1990, Mack Publishing Company.

在某些实施方案中, 最佳的药物组合物往往由本领域技术人员根据例如预定的给药途径、传递形式和期望的剂量来决定。参见例如 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 出处同上。在某些
5 实施方案中, 这种组合物可能影响本发明抗体的物理状态、稳定性、体内释放速率和体内清除速率。

在某些实施方案中, 药物组合物中的主要运载体或载体在性质上可以是含水载体或非水载体。例如, 合适的运载体或载体可以是注射用水、生理盐水溶液或人工脑脊液, 可能补充有常用于胃肠外给药组
10 合物的其他材料。中性缓冲盐水或者混合有血清白蛋白的盐水是另外的示例性运载体。在优选的实施方案中, 本发明药物组合物包含 pH 约 7.0-8.5 的 Tris 缓冲液, 或者 pH 约 4.0-5.5 的乙酸缓冲液, 且可进一步包含山梨醇、蔗糖、吐温-20 和/或其合适的替代物。在本发明某些实施方案中, 抗 NGF 抗体组合物可如下制备, 以供保存: 将选定的具
15 有期望纯度的组合物与任选的配制物 (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 出处同上) 混合成冻干饼或水溶液的形式。此外, 在某些实施方案中, 可用适当的赋形剂如蔗糖, 将抗 NGF 抗体产品配制成冻干物。

可以选择本发明药物组合物, 以供胃肠外传递。另外, 也可选择
20 组合物, 以供吸入, 或者供通过消化道传递, 如口服传递。这种药物可接受的组合物的制备在本领域的技术范围之内。

制剂成分优选以给药位点可接受的浓度存在。在某些实施方案中, 用缓冲剂将组合物维持在生理 pH 或者稍低的 pH, 通常在约 5 至约 8 的 pH 范围。

25 当设想胃肠外给药时, 用于本发明的治疗性组合物可以无热源的、胃肠外可接受水溶液的形式提供, 其包含期望的抗 NGF 抗体与药物可接受的运载体。特别适合的胃肠外注射用运载体是无菌蒸馏水, 抗 NGF 抗体在其中配制成无菌的等渗溶液并被适当地保存。在某些实

5 施方案中, 制剂可能涉及将期望的分子与为产品(其能够通过长效制剂注射来递送)提供控释或缓释的介质一起配制, 所述介质如可注射微球体、生物可腐蚀颗粒、聚合物(如聚乳酸或聚乙醇酸)、玻珠或脂质体。在某些实施方案中, 也可使用具有提高在体循环中持续时间的作用的透明质酸。在某些实施方案中, 可使用可植入药物递送装置, 以引入期望的抗体分子。

可配制本发明药物组合物, 以供吸入。在这些实施方案中, 抗 NGF 抗体可方便地配制成可吸入干粉。在优选的实施方案中, 也可用推进剂配制抗 NGF 抗体吸入溶液, 供作气雾剂传递。在某些实施方案中, 10 可将溶液雾化。肺部给药及其配制方法在国际专利申请 PCT/US94/001875 (其通过引用结合到本文中) 中有进一步的描述, 所述专利申请描述了化学修饰蛋白质的肺部传递法。

还设想制剂可口服给予。以这种方式给予的抗 NGF 抗体可与常用于调配固体剂型(如片剂和胶囊剂)的载体一起或不与其一起进行配制。15 在某些实施方案中, 可设计胶囊剂, 以在生物利用度最大和体循环前降解最小的点在胃肠道中释放出制剂的活性部分。可包括另外的介质, 以促进抗 NGF 抗体的吸收。也可采用稀释剂、矫味剂、低熔点蜡、植物油、润滑剂、悬浮剂、片剂崩解剂和粘合剂。

优选所提供的本发明药物组合物包含有效量的一种或多种抗 20 NGF 抗体, 其与适合于制造片剂的无毒赋形剂混合。通过将片剂溶解于无菌水或另一种适当的运载体中, 可将溶液配制成单位剂量形式。合适的赋形剂包括但不限于惰性稀释剂, 如碳酸钙、碳酸钠或碳酸氢钠、乳糖、或磷酸钙; 或者粘合剂, 如淀粉、明胶或阿拉伯胶; 或者润滑剂, 如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。

25 另外的药物组合物对本领域技术人员来说是显然的, 包括涉及缓释或控释传递制剂中抗 NGF 抗体的制剂。用以配制多种其他缓释或控释传递方式, 如脂质体载体、生物可腐蚀微粒或多孔玻珠和长效注射剂的技术, 对本领域技术人员也是公知的。参见例如, 国际专利申请

PCT/US93/00829 (其通过引用结合到本文中), 该专利申请描述了用以递送药物组合物的多孔聚合物微粒的控制释放。缓释制剂可包括定型制件形式的半透性聚合物基质, 例如薄膜或微胶囊。缓释基质包括聚酯、水凝胶、聚交酯(如美国专利第 3,773,919 号和欧洲专利申请公开 EP 058481 所公开, 各专利通过引用结合到本文中)、L-谷氨酸和 γ -L-谷氨酸乙酯的共聚物(Sidman 等, 1983, *Biopolymers* 22:547-556)、聚(甲基丙烯酸-2-羟乙酯) (Langer 等, 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 和 Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105)、乙烯乙酸乙烯酯 (Langer 等, 出处同上)或聚-D(-)-3-羟基丁酸(欧洲专利申请公开 EP 133,988)。缓释组合物还可包括能通过任何本领域公知的几种方法制备的脂质体。参见例如 Eppstein 等, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688-3692; 欧洲专利申请公开 EP 036,676; EP 088,046 和 EP 143,949, 这些文献通过引用结合到本文中。

用于体内给药的药物组合物通常作为无菌制剂来提供。可通过滤过无菌过滤膜来实现灭菌。当组合物冻干时, 可在冻干和再生之前或之后用这种方法进行灭菌。供胃肠外给药的组合物可以冻干形式保藏, 或者保藏于溶液中。胃肠外组合物通常装入具有无菌入口的容器, 例如具有可用皮下注射针刺穿的塞子的静脉溶液袋或小瓶。

一旦配制好药物组合物, 其可以溶液、悬浮液、凝胶、乳浊液、固体的形式, 或者作为脱水或冻干粉末保藏于无菌小瓶中。这种制剂可以以现成可用的形式或者以给药前可再生的形式(例如冻干形式)进行保藏。

本发明还提供用以产生单剂量给药单位的药盒。每个本发明药盒可装有含有干燥蛋白质的第一容器和含有含水制剂的第二容器。在本发明的某些实施方案中, 提供装有单室和多室预灌装注射器(例如液体注射器和 lyosyringe)的药盒。

待进行治疗性应用的含抗 NGF 抗体的药物组合物的有效量取决于例如治疗内容和目标。本领域技术人员会认识到, 用于治疗的适当

剂量水平部分根据所递送的分子、抗 NGF 抗体所应用的适应症、给药途径以及患者的尺寸(体重、体表面积或器官大小)和/或状态(年龄和总体健康状况)而变化。在某些实施方案中,临床医生可滴定剂量和修改给药途径,以获得最佳治疗效果。取决于上述因素,典型的剂量可在
5 约 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至高达约 30 mg/kg 或更高的范围内。在优选的实施方案中,剂量可在 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至约 30 mg/kg 的范围内;更优选在 1 $\mu\text{g/kg}$ 至约 30 mg/kg 的范围内;或者甚至更优选在 5 $\mu\text{g/kg}$ 至约 30 mg/kg 的范围内。

给药频率往往取决于所用制剂中具体抗 NGF 抗体的药物动力学
10 参数。通常,临床医生给予组合物,直到达到能实现期望效果的剂量。因此,组合物可以单剂量给予,或者以两个或多个剂量(可能含有或不含有相同量的期望分子)随时间推移来给予,或者通过植入装置或插管进行连续输液来给予。适当剂量的进一步改进可由本领域普通技术人员常规进行,这在他们日常执行的任务范围内。可通过使用适当的剂
15 量-反应数据,对适当剂量加以确定。在某些实施方案中,本发明抗体可长时间给予患者。长期给予本发明抗体能使通常伴随针对非人动物中人抗原(例如在非人物种中产生的非完全人抗体)产生的抗体的不利免疫或变应性反应减至最少。

药物组合物的给药途径与已知的方法相一致,例如口服给药;通
20 过静脉内、腹膜内、脑内(实质内)、脑室内、肌肉内、眼内、动脉内、门静脉内(intraportal)或病灶内(intralesional)途径注射给药;通过缓释系统或通过植入装置给药。在某些实施方案中,可通过大剂量注射或连续输液给予组合物,或者通过植入装置给予组合物。

也可通过植入已吸收有或包入了期望分子的薄膜、海绵或其它适
25 当材料,局部给予组合物。在使用植入装置的某些实施方案中,植入装置可植入到任何合适的组织和器官中,期望分子的递送可通过扩散、定时释放大剂量或连续给予来进行。

还期望在活体外使用本发明的抗 NGF 抗体药物组合物。在这种情

况下,使从患者体内取出的细胞、组织或器官暴露于抗 NGF 抗体药物组合物,随后将细胞、组织和/或器官植回患者体内。

具体地说,可通过植入用本文所述方法基因工程改造的细胞以表达和分泌多肽,来递送抗 NGF 抗体。在某些实施方案中,这种细胞可以是动物细胞或人类细胞,且可以是自体同源细胞、异源细胞或异种细胞。在某些实施方案中,细胞可以是无限增殖化细胞。在其他实施方案中,为降低出现免疫反应的可能性,可使细胞包囊化,以避免周围组织的浸润。在其它实施方案中,包囊材料通常是生物相容性、半透性高分子包裹物或薄膜,其允许蛋白质产物释放,但防止细胞被患者的免疫系统或者被来自周围组织的其他有害因素破坏。

实施例

以下实施例,包括所进行的实验和所得到的结果,只供说明目的,不能被理解为限制本发明。

15

实施例 1

从大肠杆菌细胞产生人 NGF 蛋白

rHu-NGF (1-120)的克隆

20 用具有 SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:28 所示序列的寡核苷酸引物及标准的 PCR 技术,从 cDNA 扩增编码人 NGF 的核苷酸序列。5'引物产生 *NdeI* 限制性酶切位点和紧接在成熟序列的密码子 1 (丝氨酸)之前的甲硫氨酸起始密码子。3'引物产生紧接在终止密码子之后的 *BamHI* 限制性酶切位点。所得 PCR 产物经凝胶纯化,用限制性内切核酸酶

25 *NdeI* 和 *BamHI* 消化,然后连接到同样用 *NdeI* 和 *BamHI* 消化的载体 pCFM1656。将连接的 DNA 转化到大肠杆菌 657 株感受态宿主细胞中。筛选具有产生重组蛋白质产物和拥有携带正确核苷酸序列(即 SEQ ID NO:29)的质粒的能力的克隆。重组人 NGF 1-120 的氨基酸序列如

SEQ ID NO:30 所示。

表达载体 pCFM1656 (ATCC #69576) 来源于美国专利第 4,710,473 号描述的表达载体系统。pCFM1656 质粒可如下来源于所述的 pCFM836 质粒(专利第 4,710,473 号): (a) 通过用 T4 聚合酶进行末端补平, 然后进行平端连接, 破坏两个内源 *NdeI* 限制性酶切位点; (b) 用 5 得自 pCFM636 (专利第 4,710,473 号) 的含有 PL 启动子的类似片段, 替换独特 *AatII* 和 *ClaI* 限制性酶切位点之间的含有合成 P_L 启动子的 DNA 序列; 然后(c) 用由具有 SEQ ID NO: 31 和 SEQ ID NO:32 所示核苷酸序列的两个探针退火获得的寡核苷酸, 置换独特 *ClaI* 和 *KpnI* 限制性 10 酶切位点之间的小 DNA 序列。

大肠杆菌 K12 宿主株(Amgen 657 株)是获自大肠杆菌遗传储备中心(E.coli Genetic Stock Center, Yale University, New Haven, CT (CGSC 6159 株)的大肠杆菌 W1485 (为 K12 株)的衍生物。

15 rHu-NGF (1-120)的表达

在丰富培养基中以补料分批方式发酵含有 NGF 表达构建物(如上所述)的大肠杆菌细胞。细胞在 30°C 下生长至 OD (600 nm 处)为 49, 然后通过变温至 42°C 进行诱导。诱导后 4 小时离心收获细胞。最终 OD 为 75。表达产率经测定为大约 0.15 g/L。

20

rHu-NGF (1-120)的重折叠与纯化

细胞糊在微观流体装置(Microfluidizer)中裂解, 在 10,000 X g 离心 30 分钟, 沉淀用 1%脱氧胆酸洗涤, 如上离心, 然后所得沉淀用冷水洗涤, 再次离心。将所得沉淀(WIB—洗涤包涵体)重新悬浮于变性剂 25 8M 盐酸胍, 50 mM Tris pH 8.5 (含 10 mM DTT), 在室温下溶解 1 小时, 在 10,000 X g 离心 30 分钟, 小心倾析上清液, 然后在 4°C 含氧化还原对的含水缓冲液中稀释 25 倍, 持续 5 天。然后滴定所得重折叠物至 pH 3.0, 滤过 0.45μm 过滤器。用 Sp-Sepharose 快速流动柱以标准 NaCl

梯度纯化重折叠物。随后浓缩得自阳离子交换柱的合并液，并将等分部分冻藏于-80℃。蛋白质的纯度通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行测定，通过考马斯蓝染色进行分析。通过这种方法获得的纯化蛋白质超过主带的 90%。

5

实施例 2

抗神经生长因子(NGF)人单克隆抗体的生产

转基因 HuMab 小鼠和 KM 小鼠

- 10 用转基因小鼠 HCo7、HCo12、HCo7+HCo12 和 KM 品系(它们每一个都表达人抗体基因)制备抗 NGF 完全人单克隆抗体。在这些小鼠品系的每一个中，内源小鼠κ轻链基因已如 Chen 等(1993, *EMBO J.* 12:811-820)所述被纯合地破坏，内源小鼠重链基因已如国际专利申请公开 WO 01/09187 (通过引用结合到本文中)的实施例 1 所描述被纯合
- 15 地破坏。这些小鼠品系的每一个均携有如 Fishwild 等(1996, *Nature Biotechnology* 14:845-851)所述的人κ轻链转基因 KCo5。HCo7 品系携有如美国专利第 5,545,806 号、第 5,625,825 号和第 5,545,807 号(通过引用结合到本文中)描述的 HCo7 人重链转基因。HCo12 品系携有如国际专利申请公开 WO 01/09187 (通过引用结合到本文中)的实施例 2 所
- 20 描述 HCo12 人重链转基因。HCo7+HCo12 品系携有 HCo7 和 HCo12 重链转基因，对每个转基因来说都是半纯合的。KM 小鼠包含如 Tomizuka 等(1997, *Nature Genet.* 16, 133-143 和 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 722-727)所描述的 SC20 重链转基因。该转基因没有整合到小鼠染色体中，相反作为独立的染色体片段而增殖。该片段包括大约 15 MB
- 25 的人染色体 14。它包含整个人重链基因座，包括所有 VH、D 和 JH 基因节段及所有重链恒定区同种型。所有这些品系在本文中称为 HuMab 小鼠。

HuMab 免疫:

为产生抗 NGF 完全人单克隆抗体,用来源于大肠杆菌细胞的纯化重组 NGF 作为抗原(实施例 1)免疫 HuMab 小鼠。HuMab 小鼠的一般免疫方案描述于 Lonberg 等(1994, *Nature* 368:856-859; Fishwild 等, 出处同上, 及国际专利申请公开 WO 98/24884, 上述各文献的教导通过引用结合到本文中)。小鼠第一次灌注抗原时为 6-16 周龄。用纯化重组 NGF 抗原制剂(25-100 μg), 通过腹膜内(IP)或皮下(SC)免疫 HuMab 小鼠。

如下实现 HuMab 转基因小鼠的免疫: 用完全弗氏佐剂中的抗原进行两次注射, 随后 2-4 周内用完全弗氏佐剂中的抗原进行 IP 免疫(共 10 达 9 次免疫)。每种抗原免疫几打小鼠。共有 118 只 HCo7、HCo12、HCo7+HCo12 和 KM 品系的小鼠用 NGF 抗原免疫。通过眶后取血监测免疫应答。

为选出产生结合人 HGF 的抗体的 HuMab 小鼠, 如 Fishwild 等(出处同上)所述通过 ELISA 检测免疫小鼠的血清。简单的说, 用 1-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PBS 中的得自大肠杆菌的纯化重组 NGF (实施例 1)涂布微量滴定板(50 $\mu\text{L}/\text{孔}$), 在 4°C 下孵育过夜, 然后用 200 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的溶于 PBS/Tween (0.05%) 的 5%鸡血清封闭。将 NGF 免疫小鼠的血浆稀释液加入到每个孔中, 在环境温度下孵育 1-2 小时。用 PBS/Tween 洗涤微量滴定板, 然后在室温下与缀合辣根过氧化物酶(HRP)的山羊抗人 IgG Fc-特异性多克隆试剂孵育 1 小时。微量滴定板洗涤后, 用 ABTS 底物(Sigma Chemical Co., 20 St. Louis, MO, 目录号 A-1888, 0.22 mg/mL)显影, 通过在 415-495 nm 波长下测定光密度(OD)进行分光光度分析。具有足够滴度的抗 NGF 人免疫球蛋白的小鼠用来如下文所述产生单克隆抗体。

生产抗 NGF 人单克隆抗体的杂交瘤的产生

25 通过在小鼠处死前 2 天用抗原静脉内强化, 制备用以生产单克隆抗体的小鼠, 之后将其脾脏取出。采用标准的方案, 从 HuMab 小鼠分离小鼠脾细胞, 用 PEG 将其融合到小鼠骨髓瘤细胞系。通常, 对每种抗原, 执行 10-20 个融合。

简单的说, 用 50% PEG (Sigma), 将得自免疫小鼠的脾脏淋巴细胞的单细胞悬浮液融合到四分之一数量的 P3X63-Ag8.653 非分泌性小鼠骨髓瘤细胞(ATCC, 检索号 CRL 1580)。以大约 1×10^5 /孔将细胞涂布于平底微量滴定板, 之后在选择性培养基中孵育约 2 周, 所述选择性培养基含有 10%胎牛血清、10% P388D1-(ATCC, 检索号 CRL TIB-63) 条件培养基、DMEM (Mediatech, 目录号 CRL 10013, 含高含量葡萄糖、L-谷氨酰胺和丙酮酸钠)中的 3-5% origen (IGEN)加上 5 mM HEPES、0.055 mM 2-巯基乙醇、50 mg/mL 庆大霉素和 $1 \times$ HAT (Sigma, 目录号 CRL P-7185)。1-2 周后, 将细胞培养于用 HT 置换 HAT 的培养基中。

筛选所得杂交瘤, 找出能生产抗原特异性抗体的杂交瘤。通过 ELISA 筛选单独的孔(如上所述), 找出人抗 NGF 单克隆 IgG 抗体。一旦出现大量杂交瘤生长, 通常在 10-14 天后对培养基进行监测。重新涂布分泌抗体的杂交瘤, 再次筛选, 如果仍为人 IgG 阳性, 则通过有限稀释亚克隆抗 NGF 单克隆抗体至少两次。然后体外培养稳定的亚克隆, 以在组织培养基中产生少量的抗体, 供鉴定用。

结合 NGF 的人单克隆抗体的选择

用如上所述的 ELISA 试验筛选显示与 NGF 免疫原呈阳性反应性的杂交瘤。亚克隆分泌高亲和力结合 NGF 的单克隆抗体的杂交瘤, 并进一步进行表征。从每个杂交瘤选出一个保留亲本细胞反应性(通过 ELISA 测定)的克隆, 用来制备 5-10 个小瓶装细胞库, 并保藏于液氮中。

进行同种型特异性 ELISA, 以确定按本文公开而生产出来的单克隆抗体的同种型。在这些实验中, 用 $1 \mu\text{g/mL}$ 的小鼠抗人 κ 轻链的 PBS 溶液, 以 $50 \mu\text{L}$ /孔涂布微量滴定板, 并在 4°C 下孵育过夜。微量滴定板用 5%鸡血清封闭后, 与得自每个受试单克隆抗体的上清液及纯化的同种型对照反应。在环境温度下孵育微量滴定板 1-2 小时。然后各孔与各种人 IgG 特异性辣根过氧化物酶缀合山羊抗人多克隆抗血清反

应，微量滴定板如上所述进行显影和分析。

对于从杂交瘤上清液纯化得到的、经 ELISA 检测显示与 NGF 显著结合的单克隆抗体，用下文描述的多种生物测定法，进一步检测其生物活性。

5

实施例 3

选择和克隆具有有效 NGF 中和活性的抗 NGF 抗体

通过测定每个修饰肽封闭 NGF 诱导香草素受体-1 (VR1)表达的能力，来评价原先在实施例 2 中鉴定为 NGF 活性抑制剂(即 NGF “中和”)的抗体的有效性。

10

背根神经节神经元培养物

在无菌条件下，一个接一个地从 19 天龄(E19)胚胎大鼠的所有脊髓节段剖分背根神经节(DRG)，所述胚胎大鼠通过外科手术从定时怀孕、定期麻醉的 Sprague-Dawley 大鼠(Charles River, Wilmington, MA)的子宫中取出。将 DRG 收集于用冰预冷的、含 5%热灭活马血清(GibcoBRL)的 L-15 培养基(GibcoBRL, Grand Island, NY)，除去任何疏松结缔组织和血管。将 DRG 在无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 Dulbecco 磷酸盐缓冲盐水(DPBS), pH 7.4 (GibcoBRL)中漂洗两次。然后用木瓜蛋白酶解离系统(Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ)将 DRG 解离为单细胞悬浮液。简单的说，将 DRG 在消化溶液(含有 20 U/ml 木瓜蛋白酶的 Earle 平衡盐溶液(EBSS))中，37°C 下孵育 50 分钟。通过用火琢巴氏吸管在解离培养基中研磨，使细胞解离，所述解离培养基由 MEM/Ham's F12 (1:1)、1 mg/ml 卵类黏蛋白抑制剂和 1 mg/ml 卵清蛋白以及 0.005% 脱氧核糖核酸酶 I (DNA 酶)组成。

15

20

25

以 200 x g 将解离的细胞沉淀 5 分钟，然后重新悬浮于含 1 mg/ml 卵类黏蛋白抑制剂、1 mg/ml 卵清蛋白和 0.005% DNA 酶的 EBSS 中。以 200 x g 使细胞悬浮液离心通过含 10 mg/ml 卵类黏蛋白抑制剂、10 mg/ml 卵清蛋白的梯度溶液，持续 6 分钟，以除去细胞碎片，然后滤

过 88- μm 尼龙筛(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), 以除去所有的凝块。用血细胞计测定细胞数目, 在完全培养基中以 10×10^3 个细胞/孔将细胞接种于用聚鸟氨酸 100 $\mu\text{g/mL}$ (Sigma, St. Louis, MO)和小鼠层粘连蛋白 1 $\mu\text{g/mL}$ (GibcoBRL)涂布的 96 孔板。所述完全培养基由极限必需培养基(MEM)和 Ham's F12 (1:1)、青霉素(100 U/ml)、链霉素(100 $\mu\text{g/mL}$)及 10%热灭活马血清(GibcoBRL)组成。将培养物保持在 37°C、5% CO_2 和 100%湿度。为控制非神经元细胞的生长, 培养基中包含 5-氟-2'-脱氧尿苷 (75, μM)和尿苷(180, μM)。

用 NGF 和抗 NGF 进行处理

10 平板接种两小时后, 用重组人 β -NGF(Amgen)或重组大鼠 β -NGF(R&D Systems, Minneapolis, MN)以 10 ng/ml (0.38 nM)的浓度处理细胞。将包含连续稀释抗 NGF 抗体(R&D Systems)的阳性对照涂敷于每个培养板。用 3.16 倍连续稀释, 加入十个浓度的受试抗体。所有样品在加入到培养物之前均稀释于完全培养基中。孵育时间为 40 小时, 之后进行 VR1 表达的测定。

DRG 神经元中 VR1 表达的测定

培养物用含 4%多聚甲醛的 Hanks 平衡盐溶液固定 15 分钟, 用 Superblock (Pierce, Rockford, IL)封闭, 并在室温下用 0.25% Nonidet P-40 (Sigma) 的 Tris-HCl (Sigma)-缓冲盐水(TBS)透化处理 1 小时。培养物用含 0.1%吐温 20 (Sigma)的 TBS 漂洗一次, 接着在室温下与兔抗 VR1 IgG 孵育一个半小时, 然后再在室温下与 Eu 标记抗兔第二抗体 (Wallac Oy, Turku, 芬兰)孵育 1 小时。每次抗体孵育之后, 用 TBS (3 x 5 分钟, 慢慢振摇)进行洗涤。将加强溶液(150 μL /孔, Wallac Oy)加入到培养物中。然后用时间分辨荧光计(Wallac Oy)测量荧光信号。通过与 NGF 滴定的标准曲线(0-1000 ng/ml)比较, 测定用修饰肽处理的样品中的 VR1 表达。通过与不经 NGF 处理的对照比较, 确定 NGF 对 DRG 神经元中 VR1 表达的抑制百分率(与最大可能抑制相比较)。结果在表 2 和 5 中给出。

细胞系标记为#110-#129。细胞系#119、#124 和#125 的抗体显示极强的 NGF 中和活性(图 1)。#124 细胞系是亲本细胞系，也称为 4D4。#119 和#125 细胞系是 4D4 亲本的亚克隆。使包含杂交瘤#124 (4D4) 的原始小瓶中的另外样品生长，并标记为#167 (4D4)。

- 5 使由杂交瘤#167 (4D4)产生的抗体进行与前面样品一样的基于 DRG 神经元的 NGF 中和试验。抗体#167 (4D4)显示强烈的抗 NGF 活性，IC₅₀ 为 0.50 nM (图 2)，这与样品#119、#124 和#125 的活性一致。这四个样品的活性在表 2 中显示。

10

表 2

DRG 细胞中用 0.38 nM hNGF 获得的抗 hNGF 活性	
代号#	IC50
119 (来自 124)	< 1.2 nM
124 (亲本)	< 0.57 nM
125 (来自 124)	< 0.3 nM
167 (来自与 124 一样的样品) *	0.50 nM

N 端测序和质谱

- 15 制备纯化的抗 NGF 杂交瘤抗体样品，供蛋白质测序和 LC/MS 分析。通过用 Amicon centrprep-30 将培养基浓缩至体积小于 15 ml，从条件培养基中纯化抗体。用 PBS 洗涤一批 rProA (Pharmacia)树脂 4x，在最后一次洗涤之后用 PBS 调成 50%浆液。将适当量的 rProA 树脂(大约 5 ug 抗体/ul 树脂，但所用树脂不少于 50 ul)加入到抗体样品中，于 4°C 下孵育过夜。离心 Ab-树脂混合物，收集未结合的级分。加入 0.5 ml PBS，并将样品转移到 0.45um Spin-X (CoStar)管，然后以 10000 rpm 离心样品 3 分钟。接着用 0.5 ml PBS 洗涤树脂至少 3 次，然后加入 1.5x 树脂体积的 0.1M 甘氨酸(pH 2.7)，在室温下孵育 10 分钟，然后以 10000 rpm 再次离心 3 分钟，收集上清液。再重复这个洗脱步骤两次，然后
- 20

用二十五分之一体积的 1.0 M tris (pH 9.2)中和合并的上清液。

用新的 Spin-x 管(0.2 μ m)进行最后一次过滤步骤之后,以人 IgG 为标准,用标准的 Bradford 测定法,或者使用在 280 处的吸光度(对于较大的样本),对抗体进行定量。还用 2 μ g 的各样品与 2 μ g 的人 IgG1, k
5 (Sigma)跑胶。为进行质谱分析,使 4 微克的样品去糖基化、还原,并加样到与 Finigan LCQ 质谱仪在线连接的 HPLC (HP1090)。通过反相 HPLC 使轻链与重链分离。还收集轻链和重链,供 N 端蛋白质测序分析。

抗 NGF #167 (4D4)抗体样品的轻链和重链的 N 端序列与抗 NGF
10 #119 (4D4)抗体样品的两个 N 端序列吻合。此外,抗体的测量质量表明,得自#167 和#119 杂交瘤的分离抗体相同。抗 NGF #167 的轻链的去叠合测量质量(23096)与抗 NGF Ab #119 的轻链的测量质量(23096)吻合。

克隆抗 NGF 抗体重链和轻链

15 用表达最强 NGF 结合单克隆抗体的杂交瘤 4D4.D7 作为原始材料,用 TRIzol®试剂(Invitrogen)分离总 RNA。用具有突出端衔接头(5'-GGC CGG ATA GGC CTC CAN NNN NNT-3') (SEQ ID NO: 33)的随机引物,合成 cDNA 第一链,用 GeneRacer™ 试剂盒(Invitrogen)按照厂商说明书进行 5' RACE (cDNA 末端快速扩增)制备试验。为制备完全
20 轻链的编码 cDNA,正向引物用 GeneRacer™ 嵌套引物,反向引物用 5'-GGG GTC AGG CTG GAA CTG AGG-3' (SEQ ID NO: 34)。为制备编码重链可变区的 cDNA,正向引物用 GeneRacer™ 嵌套引物,反向引物用 5'-TGA GGA CGC TGA CCA CAC G-3' (SEQ ID NO 35)。将 RACE 产物克隆到 pCR4-TOPO (Invitrogen)中,并测定序列。用共有序列设计
25 用于全长抗体链 PCR 扩增的引物。

为制备编码抗 NGF 4D4.D7 κ 轻链的 cDNA, 5' PCR 引物编码信号序列的氨基末端、XbaI 限制性酶切位点和最优化的 Kozak 序列(5'-CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GGA CAT GAG GGT GCC CGC

TCA GCT CCT GGG-3'; SEQ ID NO: 36)。3'引物编码羧基末端和终止密码子以及 *SalI* 限制性酶切位点(5'-CTT GTC GAC TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT C-3'; SEQ ID NO: 37)。将所得 PCR 产物片段纯化, 用 *XbaI* 和 *SalI* 消化, 然后凝胶分离, 并连接到哺乳动物表达载体 pDSR α 20 (参见国际申请公开 WO 90/14363, 其对于任何目的通过引用结合到本文中)。pDSR α 20 通过用定点诱变使 pDSR α 19 中的核苷酸 2563 从“鸟苷”变成“腺苷”而产生。)

为制备编码抗 NGF4D4.D7 重链的 cDNA, 5'PCR 引物编码信号序列的氨基末端、*XbaI* 限制性酶切位点和最优化的 Kozak 序列(5'-CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GGA GTT GGG GCT GTG CTG GGT TTT CCT TGT T-3'; SEQ ID NO: 38)。3'引物编码羧基末端和终止密码子以及 *SalI* 限制性酶切位点(5'-GCA TGT CGA CTC ATT TAC CCG GAG ACA GGG AGA G-3'; SEQ ID NO: 39)。将所得产物纯化, 用 *XbaI* 和 *SalI* 消化, 凝胶分离, 并连接到 pDSR α 20 载体。

通过将核苷酸序列翻译成预测的氨基酸并把氨基酸的分子量加在一起而测算, 抗 NGF Ab 4D4 克隆的轻链的 DNA 序列的计算质量(23099)与通过质谱分析测量出来的测量质量吻合。在仪器偏差范围内, 抗-NGF Ab #167 的重链的去叠合测量质量(49479)与抗-NGF Ab #119 的重链的测量质量(49484)吻合, 也与抗 NGF Ab 4D4 克隆的重链的 DNA 序列的理论质量(49484)吻合(表 3)。

N 末端蛋白序列和 LC/MS 的数据证实, 杂交瘤#119 表达与杂交瘤#167 相同的抗体。此外, 基于序列的抗体计算质量进一步确证该观察结果。

表 3——质谱分析结果汇总

抗 NGF Ab	Ab #167 的 测量质量	Ab #119 的 测量质量	从 Ab 4D4 的 DNA 序 列推知的理论质量
轻链	23096	23096	23099
重链	49479	49484	49484

实施例 4

抗 NGF 抗体在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中的表达

通过用磷酸钙方法，将 4D4 重链/pDSRα19 IgG2 或 4D4-重链
5 /pDSRα19 IgG1 和 NGF-κ/pDSRα19 质粒共转染到二氢叶酸还原酶缺
陷型(DHFR-)无血清适应中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中,实现 4D4 抗 NGF
mAb 的稳定表达。在含有透析血清但不含次黄嘌呤-胸苷的培养基中选
择转染细胞，以确保表达 HDFR 酶的细胞的生长。用例如 ELISA 的试
验法筛选转染的克隆，以检测条件培养基中 4D4 抗 NGF mAb 的表达。
10 使表达量最高的克隆处于浓度不断增加的甲氨喋呤(MTX)之下，以进
行 HDFR 扩增。用例如 ELISA 的试验法筛选 MTX 扩增克隆，以检测
条件培养基中表达更高的 4D4 抗 NGF mAb。使表达量最高的克隆进行
亚克隆，以获得均一的群体，创建细胞库。

可用与以上描述的产生抗 NGF 单克隆抗体相同的方案，在 HDFR
15 缺陷型中国仓鼠卵巢细胞中产生本发明重组抗 NGF 抗体。将编码本发
明每种抗 NGF 抗体完全重链或轻链的 DNA 序列克隆到表达载体中。
用能够表达适当抗 NGF 抗体的完全重链的表达载体和表达适当抗
NGF 抗体的完全轻链的表达载体共转染 CHO 缺陷型细胞。例如，为
产生抗 NGF 抗体，用能够表达包含 SEQ ID NO: 40 所示氨基酸序列的
20 完全重链的载体和能够表达包含 SEQ ID NO: 44 所示氨基酸序列的完
全轻链的载体共转染细胞。表 4 总结了具有各种 IgG 重链恒定区的 4D4
抗体的完全重链和完全轻链。

表 4

抗体	重链可变区+重链恒定区	完全重链
4D4 (IgG2)	SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 40
4D4 (IgG1)	SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 41
4D4 (IgG4)	SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 42
4D4 (IgG3)	SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 43

抗体	轻链可变区+轻链恒定区	完全轻链
4D4	SEQ ID NO: 12 + SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 44

实施例 5

鉴定抗 NGF 4D4 抗体的活性

检测在生长于旋动培养(S)或滚瓶培养(R)条件下的细胞中产生的
5 瞬时表达的抗 NGF 4D4 抗体,以确认它们在如上所述(实施例 3)进行的基于 DRG 神经元的 NGF 中和生物测定中中和 NGF 的能力。

使 NGF 抗体在无血清悬浮液适应 293T 细胞中瞬时表达。用 500 mL 或 1L 培养物进行转染。简单的说,在 4°C 下,以 2,500 RPM 离心细胞接种物(5.0×10^5 个细胞/mL X 培养物体积)10 分钟,除去条件培
10 养基。将细胞重新悬浮于无血清 DMEM,在 4°C 下,以 2,500 RPM 再次离心 10 分钟。吸出洗涤溶液后,在 1L 或 3L 旋动培养瓶中,将细胞重新悬浮于生长培养基[DMEM/F12 (3:1) + 1X 胰岛素-转铁蛋白-硒补充物 + 1X Pen Strep Glut + 2mM L-谷氨酰胺 + 20 mM HEPES + 0.01% Pluronic F68]。在磁力搅拌板上以 125 RPM 维持旋动瓶培养物,所述
15 磁力搅拌板置于维持在 37°C 和 5% CO₂ 的加湿培养箱中。在 50 mL 锥形瓶中将质粒 DNA 与转染试剂复合。在无血清 DMEM 中制备 DNA-转染试剂复合物,体积为最终培养物体积的 5%。首先将 1 µg 质粒 DNA/mL 培养物加入无血清 DMEM,然后加入 1 µl X-TremeGene RO-1539/mL 培养物。将复合物在室温下孵育大约 30 分钟,然后加入
20 到旋动瓶中的细胞中。转染/表达进行 7 天之后,在 4°C 下,以 4,000 RPM 离心 60 分钟收获条件培养基。

对于滚瓶瞬时转染,我们使用了生长和维持于 DMEM 的 293T 贴壁细胞,所述 DMEM 补充有 5% FBS + 1X 非必需氨基酸 + 1X Pen Strep Glut + 1X 丙酮酸钠。将大约 $4-5 \times 10^7$ 个 293T 细胞接种于 850 cm²
25 滚瓶过夜。然后在第二天,用 FuGene6 转染试剂转染先前接种细胞。

用大约 6.75 mL 无血清 DMEM 制备 DNA-转染试剂混合物。首先加入 675 μ l FuGene6 转染试剂，然后加入 112.5 μ g 质粒 DNA。在室温下孵育所得复合物 30 分钟。然后将全部的混合物加入到滚瓶中。滚瓶用 5% CO₂ 气体混合物充气，盖紧，置于 37°C 培养箱中，所述培养箱放在以 0.35 RPM 旋转的滚架(roller rack)上。转染进行 24 小时后，用 100 mL DMEM + 1X 胰岛素-转铁蛋白-硒补充物 + 1X Pen Strep Glut + 1X 非必需氨基酸 + 1X 丙酮酸钠置换培养基。通常，每个滚瓶获得两份 100ml 48 小时收获物。将收获的无血清条件培养基集中在一起，在 4°C 下以 4,000 RPM 离心 30 分钟。

10 4D4.IgG1 和 4D4.IgG2 对人 NGF 均显示强活性，IC₅₀ 值约为 0.14 nM 至约 0.2 nM (图 2)。活性试验的结果在表 5 中汇总。这些抗体对大鼠 NGF 显示极少活性(图 3)。这些结果与从上述杂交瘤直接检测得出的抗体活性类似。

表 5

Ab	IC50 @ hNGF (nM)	IC50 @ rNGF (nM)
4D4.IgG1.R	0.1488	> 34 nM
4D4.IgG1.S	0.1587	> 45 nM
4D4.IgG2.R	0.2047	> 59 nM
4D4.IgG2.S	0.2063	> 37 nM

15 hNGF = 人 NGF, rNGF = 大鼠 NGF, R = 滚瓶培养, S = 旋动培养

实施例 6

抗 NGF 抗体的生产

20 抗 NGF 抗体在 CHO 细胞的克隆系中表达产生。对于每次生产运行，将单个小瓶中的细胞解冻到无血清细胞培养基中。先让细胞在 T 形瓶中生长，接着在旋动瓶中生长，然后在不锈钢反应器中生长，逐步放大到 2000L 生物反应器。生产是在 2000L 生物反应器中用补料分批培养方式进行的，将含浓缩培养基成分的营养物原料添加到反应器

中, 以维持细胞的生长和培养物的生存力。生产持续大约两周, 期间抗 NGF 抗体由细胞组成型产生, 并被分泌到细胞培养基中。

将生产反应器控制在预定的 pH、温度和溶氧水平: pH 通过加入二氧化碳气和碳酸钠进行控制; 溶氧通过通入空气、氮气和氧气进行
5 控制。

在生产结束时, 将细胞培养液加进圆盘式离心机, 使培养物上清液与细胞分离。通过深度滤膜, 然后是 0.2 μm 过滤器, 进一步澄清浓缩液。然后通过切向流超滤法浓缩澄清的条件培养基。浓缩条件培养基 15 至 30 倍。然后所得的浓缩条件培养基进行纯化加工, 或者冻藏
10 以待日后纯化。

实施例 7

与其他神经营养蛋白的交叉反应性

在不同的生物试验中, 检测 4D4 抗体对人 NT3 或者人 BDNF 的交叉反应性, 包括针对人 NT3 的 DRG 神经元存活试验, 及针对人 BDNF 的培养 DA 神经元中 DA 摄入的试验。
15

用 NT3、抗 NT3 和抗 NGF 处理 DRG 培养物

平板接种两小时后, 用重组 hNT-3 100 ng/ml (3.8 nM) 处理 DRG 细胞(分离程序在以上实施例 3 中描述)。连续稀释的抗 hNT3 抗体(R&D) 20 用作阳性对照样本。以 10 个点的 3.16 倍连续稀释的各种浓度加入未知样本(抗 NGF Ab 样本)。所有样本在加入到培养物之前先在完全培养基中稀释。

DRG 神经元中 MAP2 表达的测定

培养物用含 4%多聚甲醛的 Hanks 平衡盐溶液固定 15 分钟, 用 Superblock (Pierce) 封闭 1 小时, 并在室温(RT)下用 0.25% Nonidet P-40 (Sigma) 的 Tris-HCl (Sigma)-缓冲盐水(TBS)透化处理 1 小时。培养物用 25 含 0.1%吐温 20 (Sigma)的 TBS 漂洗一次, 接着在室温下与小鼠抗 MAP2 IgG (Chemicon, Temecula, CA)孵育 1.5 小时, 然后再在室温下与 Eu 标

记抗小鼠第二抗体(Wallac Oy, Turku, 芬兰)孵育 1 小时。每次抗体孵育之后, 用 TBS (3 x 5 分钟, 轻轻振摇)进行洗涤。将增强溶液(150 μ l/孔, Wallac Oy)加入到培养物中, 然后用时间分辨荧光计(Wallac Oy)测量荧光信号。

5 胚胎中脑培养

使用 19 天龄(E19)胚胎 Sprague-Dawley 大鼠(Jackson Labs)。将富集多巴胺能神经元的腹侧中脑组织切除下来, 并转移到冷的 Dulbecco 磷酸缓冲盐水(DPBS), pH 7.4, 不含 Ca^{++} 和 Mg^{++} (Gibco)。用木瓜蛋白酶解离系统(Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ)将组织片段解离为单细胞悬浮液。简单的说, 将组织片段在消化溶液(含有 20 单位/ml 木瓜蛋白酶在 Earle 平衡盐溶液(EBSS))中, 37°C 下孵育 50 分钟。通过用火琢巴氏吸管在解离培养基中研磨, 使细胞解离, 所述解离培养基由 MEM/Ham's F12 (1:1)、1 mg/ml 卵类黏蛋白抑制剂和 1 mg/ml 卵清蛋白以及 0.005%脱氧核糖核酸酶 I (DNA 酶)组成。以 200 x g 将解离的细胞沉淀 5 分钟, 然后重新悬浮于含 1 mg/ml 卵类黏蛋白抑制剂、1 mg/ml 卵清蛋白和 0.005% DNA 酶的 EBSS 中。以 200 x g 使细胞悬浮液离心通过含 10 mg/ml 卵类黏蛋白抑制剂、10 mg/ml 卵清蛋白的梯度溶液, 持续 6 分钟, 以除去细胞碎片; 然后滤过 25 μ g Nitex 尼龙筛(Tetko, Inc.), 以除去凝块。以 100,000/cm² 的密度将解离细胞平板接种于组织培养板中。如前所述(Louis JC 等, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992; 262:1274-1283.), 用聚鸟氨酸 100 μ g/ml (Sigma)和小鼠层粘连蛋白 1 μ g/ml (GibcoBRL)预先涂布组织培养板。培养基由极限必需培养基(MEM)/Ham's F12 (1:1)、12%马血清(GibcoBRL)、100 μ g/ml 转铁蛋白和 2.5 μ g/ml 胰岛素(Sigma)组成。培养物在 37°C、5% CO₂ 和 100%湿度下保持 6 天。

用 BDNF 和抗 BDNF 或抗 NGF 处理中脑培养物

平板接种两小时后, 以 10 ng/ml 的浓度将 BDNF 加入到细胞中, 然后加入系列浓度的抗 NGF Ab 样品。抗 BDNF 抗体(在 Amgen 公司

产生)用作阳性对照样本。

中脑神经元中的 DA 摄入

如前所述(Friedman, L.和 Mytilineou, C., *Neuroscience Letters* 1987; 79:65-72)进行多巴胺摄入试验。在第 6 天,用预加温的含 5.6 mM 葡萄糖、1.3 mM EDTA 和 0.5 mM 帕吉林(单胺氧化酶抑制剂)的 Krebs-Ringer 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)洗涤培养物一次。在 37°C 下,将培养物在含 50 nM [³H] DA (NEN)的摄入缓冲液中孵育 60 分钟。通过除去摄入缓冲液停止摄入,用 Krebs-Ringer 磷酸盐缓冲液洗涤培养物三次。通过将液体闪烁混合物 OpticPhase SuperMix (Wallac)直接加入到培养物中,使细胞裂解,以释放出 [³H] DA。然后用 Microbeta-Plus 液体闪烁计数器(Wallac, Inc.)计算细胞裂解物的放射性。通过将 0.5 mM GBR12909 (高亲和性 DA 摄入位点的特异性抑制剂, Heikkila RE 和 Mazino L, *European Journal of Pharmacology* 1984; 103:241-8)加入到摄入缓冲液中,来估算低亲和性 DA 摄入,然后总摄入量与其相减,得到高亲和性 DA 摄入值。

表 6

抗体	IC50 @hNT-3 (nM)	IC50 @hBDNF (nM)
4D4 (IgG2)	> 13.75	> 13.75

实施例 8

供抗 NGF 抗体结合的表位的鉴定

通过有限蛋白酶解进行表位作图

在 4°C 下,将 5 微克(μg) NGF 在 0.1M Tris 缓冲液(pH 7.5)中与 4D4 (11 μg)孵育 30 分钟。然后在 37°C 下,用 1 μg 蛋白酶(枯草杆菌蛋白酶)消化所得的复合物。将 HPLC 肽图互相比对,以找出受 4D4 抗体保护的肽。NGF 的有限蛋白酶解表明,有几种主要的肽最初从 NGF 中释放出来。特别令人感兴趣的是,肽 S18.3、S18.5 和 S34.4 得以产生,并受到抗体保护免遭蛋白酶解。其他峰没有明显形成出来或者得到保

护。两个实验(1 小时和 2 小时消化)中的受保护肽在表 7 中显示。

表 7

			%保护	
			1 小时消化	2 小时消化
S16.1	QAA (96-98)	C-端	--	57
S18.3	FFETK (53-57) (SEQ ID NO: 45)	环区	40	45
S18.5	SSSHPIFHR (1-9) (SEQ ID NO: 46) (HWNSY) * (SEQ ID NO: 47)	N-端	40	50
S34.4	NSVEKQYFFETK(46-57) (SEQ ID NO: 48)	环区	69	38

从肽的峰高计算出保护百分率。S18.5 含有两条肽，但在 280 nm
5 处的吸光度检测发现，只有一条肽(SSSHPIFHR; SEQ ID NO: 46)受到
4D4 抗体的保护，因为添加 4D4 抗体后另一条肽(HWNSY;SEQ ID NO:
47)的峰保持不变。肽 S18.3 是 S34.4 的 C 端部分，两者均来自相同的
环区。N 端和中央环区也是可能的表位。

Microcon 分离经消化的肽

10 在 4°C 下，将枯草杆菌蛋白酶消化过的材料(各 3 µg)在 0.1 M Tris
缓冲液(pH 7.5)中与活性 4D4 抗体和失活的单克隆抗体(#162) (8 µg)一
起孵育 30 分钟。用 Microcon 10 (Millipore Corp., Bedford, Mass)分离结
合/未结合肽，通过 HPLC 分析这两个级分(结合和未结合)，找出结合
抗体的肽。用 4D4 抗体和#162 处理并用 Microcon 分离之后，通过 HPLC
15 比较未结合级分，鉴定出两个耗减的峰，回收所述两个峰，其表示抗
体结合的肽。4D4 结合肽是：

S1 (4.4)----SRKAVRR (113-119) (SEQ ID NO: 49), C-端;

S2 (28.3)----EVMVL (35-39) (SEQ ID NO: 50), 环区。

另外用 Lys-C (K)消化 NGF 样本 24 小时。不加变性剂将半胱氨酸残基还原和羧甲基化。将样本与单克隆抗体 4D4 和 AMG162 一起孵育,接着用 Microcon 100 进行分离。用反相 HPLC 分析结合和未结合的部分。只有两条如下所示的肽被鉴定为抗体结合 K 肽。由序列分析测定的这两条肽的计算质量与它们的质谱观测结果一致。如下所示,这两条肽位于 N 端和 C 端区域。

K1 (37.6)----SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDK (SEQ ID NO: 51)

计算质量 = 2821; 观测质量 = 2828.2; N-端

K2 (39.5)----QAAWRFIRIDTACVCVLSRK (SEQ ID NO: 52)

10 计算质量= 2452; 观测质量= 2459.5; C-端

前述的表位作图实验表明,至少有三个区域是 4D4 抗体的可能表位,包括 N-端区域(1-9)、内部区域(46-57)和 C-端区域(96-98)。此外,AspN 消化揭示,由---SSHPIFHRGEFSVC--- (SEQ ID NO: 53)组成的肽片段受 4D4 抗体的保护,而胰蛋白酶消化揭示,由---SSHPIFHR--- (SEQ ID NO: 54)组成的肽片段不受 4D4 抗体的保护。因此,在 N 端,序列 GEFSVC (SEQ ID NO: 55)对于与 4D4 抗体的结合是最重要的。

为更清楚地明确抗 NGF 抗体 4D4.IgG1 的表位,根据完整的人成熟 NGF (hNGF)序列(表 8),用标准的技术由合成法产生总共 23 种肽。这些肽长为 15 个氨基酸,重叠达 10 个氨基酸, C 端以半胱氨酸结尾,以便缀合到基质。上述人抗 hNGF Ab 4D4. IgG1 用于作图实验。

表 8

肽#	序列	SEQ ID NO
33582-27-01	SSSHPIFHRGEFSVC (1-15)	56
33582-27-02	IFHRGEFSVADSVSVC (6-20)	57
33582-27-03	EFSVADSVSVWVGDKC (11-25)	58
33582-27-04	DSVSVWVGDKTTATDC (16-30)	59
33582-27-05	WVGDKTTATDIKGKEC (21-35)	60
33582-27-06	TTATDIKGKEVMVLGC (26-40)	61
33582-27-07	IKGKEVMVLGEVNIN (31-45)	62
33582-27-08	VMVLGEVNINNSVFKC (36-50)	63
33582-27-09	EVNINNSVFKQYFFEC (41-55)	64
33582-27-10	NSVFKQYFFETKARDC (46-60)	65
33582-27-11	QYFFETKARDPNPVDC (51-65)	66
33582-27-12	TKARDPNPVD SGARDC (56-70)	67
33582-27-13	PNPVDSGARDIDSKHC (61-75)	68
33582-27-14	SGARDIDSKHWNSYC (66-80)	69
33582-27-15	IDSKHWNSYATTTHTC (71-85)	70
33582-27-16	WNSYATTTHTFVKALC (76-90)	71
33582-27-17	TTHTFVKALTMDGKC (81-95)	72
33582-27-18	FVKALTMDGKQAAWRC (86-100)	73
33582-27-19	TMDGKQAAWRFIRIDC (91-105)	74
33582-27-20	QAAWRFIRIDTAAVC (96-110)	75
33582-27-21	FIRIDTA AVAVLSRKC (101-115)	76
33582-27-22	TAAVAVLSRKAVRRAC (106-120)	77
33582-27-23	CAAVAVLSRKAVRRA (107-120)	78

用 5% DMSO, 1 mM EDTA, pH 6.23 将人 NGF 肽片段稀释到 PBS 中。最终肽浓度归一化为同一摩尔浓度 55 μ M (约 100 μ g/ml)。在室温

5 下, 将肽以 100 μ l/孔在 Reacti-Bind 马来酰亚胺活化的 96 孔微量滴定

板(Pierce 目录号 15150)中孵育 2 小时,然后在 4°C 下搅拌孵育过夜。人 NGF(100 µg/ml)用作阳性对照样本。用洗涤缓冲液(KPL)洗涤微量滴定板,用 0.2%脱脂奶粉(溶于 PBS-EDTA 缓冲液, pH 6.23)在室温下封闭 2 小时,然后用 5% BSA 再封闭 1 小时。然后微量滴定板用各种浓度(0, 3, 10, 30 µg/ml)的人抗 NGF 抗体孵育,接着用山羊抗 hFc Ab-HRP (KPL)孵育,达 2 小时。用 TMB 底物使信号显影,加入终止液(KPL)后,在 450 nm 处读数。

在 23 种人 NGF 肽当中,至少观察到 4 个主要的峰,显示有 4D4 结合。这些峰对应于下列的肽: 肽 #1 (SEQ ID NO: 56),
 10 SSSHPIFHRGEFSVC (1-15); 肽 #10 (SEQ ID NO: 65),
 NSVFKQYFFETKARD (46-60); 肽#16-17 (SEQ ID NO: 71-SEQ ID NO: 72), WNSYATTTHTFVKAL--- (76-95); 及肽#18-21 (SEQ ID NO: 73-SEQ ID NO: 76), TTTHT---LSRKC (100-115)。

如在 Weismann 等(1999, *Nature* 401:184-8)中所描述,4D4 的四个
 15 结合峰位于 NGF 中的 N-端、C-端、内部结构域以及环 L2 和环 L4。
 这些结果汇总于表 9 中。

表 9

HNGF 表位	N-端	L2	内部	L4	内部	C-端
肽#	肽# 1 (SEQ ID NO: 56), SSSHPI---, 1-15	肽# 10 (SEQ ID NO: 65), NSVFKQ---, 46-60	肽# 16 (SEQ ID NO: 71), WNSYA---, 76-90	肽# 17 (SEQ ID NO: 72), TMDGKQ---, 81-95	肽# 19 (SEQ ID NO: 74), TMDGK---, 91-105	肽# 20-21 (SEQ ID NO: 75- SEQ ID NO: 76), QAAWR---, 96-115
Ab 结合信号	+++	+	++	++	+++	++

Wiesmann 等揭示了结合 trkA 受体的 hNGF 的晶体结构,显示 N
 20 端(残基 2-9)对于受体结合是重要的(Wiesmann 等, 1999, *Nature* 401:
 184-8)。NGF 中这个节段的残基对于其对 trkA 的特异性强于对 trkB 或
 trkC 受体这一点也是重要的。抗体 4D4 对人 NGF 的选择性比对小鼠/
 大鼠 NGF 以及 BDNF 和 NT-3 要强,这很可能是由于人 NGF 和其他

神经营养蛋白之间的 N 端差异造成的。

抗体 4D4 结合肽#10 (SEQ ID NO: 65) (NSVFK---, 46-60)和肽#17 (SEQ ID NO: 72) (TTHTFVKALTM DGKC, 81-95), 这两条肽分别对应于环 L2 和环 L4, 这两个环代表了神经营养蛋白当中序列多样性高于平均水平的七个独特区域中的两个。NGF 和 BDNF 之间这七个区域的交换实验显示, L2 和 L4 对 NGF 的生物活性是重要的。此外, 将环 L2 和环 L4 中的五个 NT3 残基用 NGF 中的残基置换, 引入了类似 NGF 的活性, 同时保持了 NT3 活性。因此, L2 和 L4 可能是抗体 4D4 选择性结合 NGF 而不是结合 BDNF 或 NT-3 的区域。

10 抗体 4D4 同样结合肽 #16 (SEQ ID NO: 71) (WNSYATTTHTFVKAL, 76-90), 与 NGF 晶体结构的内部结构域吻合。这个区域在人 NGF 和小鼠 NGF 之间 100%同源, 但与其他神经营养蛋白的截然不同。与其对人 NGF 的活性相比, 4D4 对大鼠/小鼠 NGF 的活性弱得多。因此, 与 NGF 的这个部分结合对物种特异性来说很可能不是关键的, 但对于神经营养蛋白当中的选择性来说是重要的。

抗体 4D4 同样结合 NGF 的 C 端区域(肽#19-21 (SEQ ID NO: 74 - SEQ ID NO: 76) TMDGK---LSRKC, 91-115), 这个区域是人 NGF 中使 NGF 与其他神经营养蛋白(BDNF 和 NT3)区别开来的区域之一。与这个区域结合有助于解释为什么 4D4 对其他神经营养蛋白不具有活性。此外, 人 NGF 和小鼠 NGF 之间在 C 端有单个氨基酸差异, 提示这单个氨基酸可能是造成 4D4 对人 NGF 的选择性强于对大鼠/小鼠 NGF 的选择性的原因之一, 这与观察到在 N 端有物种差异相似。

最后, 4D4 也与肽#10 (SEQ ID NO: 65) (---KARDC, 50-60)所示的人 NGF 内部结构域相互作用, 这个结构域是 NGF 优先结合 trkA 而不是 trkB 或 trkC 的重要区域, 这进一步解释了 4D4 对人 NGF 的选择性中和活性。

实施例 9

通过 KinExA 测定单克隆抗体的亲和性

通过 KinExA 测定 Ab 4D4 (38859-80)对 huNGF (29714-91)的结
合。简单的说，用 huNGF 预涂布 Reacti-Gel 6x (Pierce)，并用 BSA 封
闭。在室温下，将 10 pM 和 30 pM 的 Ab 4D4 样品与各种浓度的 huNGF
5 (Amgen)孵育 8 小时，然后流过涂有 huNGF 的玻璃珠。用荧光(Cy5)标记
的山羊抗人 IgG 抗体(Jackson Immune Research)对玻璃珠结合抗体的量
进行定量。结合信号与处于平衡状态的游离抗体的浓度成正比。用双
曲线单点同质结合模型(dual-curve one-site homogeneous binding model)
(KinExTM 软件)对竞争曲线进行非线性回归，得到解离平衡常数(K_D)。
10 对于 Ab 4D4 结合 huNGF，K_D 为约 4 pM。

实施例 10

另外的抗 NGF 抗体的鉴定

选择按以上实施例 2 和 3 的描述产生和鉴定的另外抗 NGF 抗体
15 (称为 14D10、6G9、7H2、14F11 和 4G6)，进行进一步的研究。简单
的说，检测条件培养基，寻找结合活性。纯化培养基中的抗体并测序。
将条件培养基中的抗体的预测质量与其质谱分析数据相比较。克隆抗
体。如上所述，使其中的两个克隆在 CHO 细胞中表达，并检测活性。
结果在表 10 中显示。

20

表 10

克隆	IC50 @ hNGF (nM)	IC50 @ rNGF (nM)	注解	分子 克隆	IC50 @ hNGF (nM)	IC50 @ rNGF (nM)
7H2	3.294	1.748	进行克隆	7H2-rFc	0.963	0.792
6H9	3.172	1.699	进行克隆	6H9-rFc	13.93	0.653
14D10	0.3918	> 13	进行克隆			
14D11	0.2803	> 20	进行克隆			
4G6	0.414	> 10	进行克隆			

然后将这些抗体的轻链可变区和重链可变区的序列与 4D4 抗体序

列相比较,同时相互比较(图5和6)。由这些比较所鉴定得出的重链可变区的同源性百分率在表11中显示。轻链可变区的同源性百分率在表12中显示。另外,各种抗体的CDR区的同源性百分率在图5-10中显示。

5

表 11

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

表 12

	V4D4 VK	14D11 LC	4G6a LC	4G6b LC	4G6c LC	14D10 LC	6H9 LC	4G6d LC	7H2 LC	4G6e
V4D4 VK	100%	89%	91%	72%	74%	69%	71%	71%	70%	73%
14D11 LC		100%	94%	68%	71%	67%	68%	68%	68%	70%
4G6a LC			100%	69%	74%	68%	70%	70%	69%	71%
4G6b LC				100%	87%	83%	86%	86%	86%	96%
4G6c LC					100%	91%	94%	94%	94%	91%
14D10 LC						100%	91%	94%	94%	86%
6H9 LC							100%	99%	98%	89%
4G6d LC								100%	99%	89%
7H2 LC									100%	
4G6e										100%

应当理解,前述公开内容强调本发明的具体特定实施方案,与其等同的所有修改方案或者替代方案落入后附权利要求书所阐明的本发明的精神和范围之内。

10

	<110> Kenneth, Wild	
5	Treanor, James	
	Huang, Haichun	
	Inoue, Heather	
10	Zhang, Tie J.	
	Martin, Frank	
15		
	<120> 作为选择性 NGF 途径抑制剂的人抗 NGF 中和抗体	
20	<130> 02-1240	
	<150> US 60/487, 431	
25	<151> 2003-07-15	
30	<160> 138	
	<170> PatentIn version 3.0	
35		
	<210> 1	
40	<211> 990	
	<212> DNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
45		

	<400> 1	
	gcctccacca agggcccacg ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	60
5	ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg	120
	tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtcctt acagtcctca	180
	ggactctact cctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	240
10	tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	300
	aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga	360
15	ccgtcagtct tctcttcccc cccaaaaccc aaggacaccc tcattgatctc ccggaccctt	420
	gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cagcaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	480
	taagtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	540
20	agcaagtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag	600
	gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	660
25	aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag	720
	ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	780
	gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg	840
30	ctggactccg acggtctctt ctctctctat agcaagctca ccgtggacaa gacaggtgg	900
	cagcagggga acgtcttctc atgtcccggtg atgcatgagg ctctgcacaa cactacacg	960
35	cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa	990
	<210> 2	
	<211> 330	
40	<212> PRT	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
45	<400> 2	
	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys	

	1	5	10	15
	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr	20	25	30
5	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser	35	40	45
10	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser	50	55	60
	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr	65	70	75
15	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	85	90	95
	Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys	100	105	110
20	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	115	120	125
25	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	130	135	140
	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	145	150	155
30	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	165	170	175
	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	180	185	190
35	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	195	200	205
40	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	210	215	220
	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu	225	230	235
45	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	245	250	255
	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	260	265	270

	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	
	275 280 285	
5	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn	
	290 295 300	
	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr	
	305 310 315 320	
10	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
	325 330	
	<210> 3	
15	<211> 978	
	<212> DNA	
20	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 3	
25	gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgcctt gctccaggag cacctccgag	60
	agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg	120
	tggaaactcag gcgtcttgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtctctca	180
30	ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccttcca gcaacttcgg caccagacc	240
	tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc	300
35	aaatgttgtg tcgagtgcct accgtgcccc gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc	360
	ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc	420
	gtgggtgggg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc	480
40	gtggagggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttcogt	540
	gtggtcagcg tctcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc	600
45	aaggtctcca acaaaggcct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaagggg	660
	cagccccgag aaccacaggt gtacacctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac	720
	caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatgc cgtggagtg	780

	gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac	840
5	ggctccttct tectctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac	900
	gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	960
	tcctgtctc cgggtaaa	978
10	<210> 4	
	<211> 326	
15	<212> PRT	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
20	<400> 4	
	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg	
25	1 5 10 15	
	Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr	
	20 25 30	
30	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser	
	35 40 45	
	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser	
	50 55 60	
35	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr	
	65 70 75 80	
	Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	
40	85 90 95	
	Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro	
	100 105 110	
45	Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp	
	115 120 125	
	Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp	
	130 135 140	

	Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly	
	145	150 155 160
5	Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn	
		165 170 175
	Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp	
		180 185 190
10	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro	
		195 200 205
	Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu	
		210 215 220
15	Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn	
		225 230 235 240
	Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile	
20		245 250 255
	Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr	
		260 265 270
25	Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys	
		275 280 285
	Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys	
		290 295 300
30	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu	
		305 310 315 320
	Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
35		325
	<210> 5	
	<211> 981	
40	<212> DNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
45	<400> 5	
	gccagcacca aggggccatc cgtcttcccc ctgggcgcct gctccaggag cacctccgag	60

	agcacagccg cctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg	120
	tggaactcag ggcacctgac cagcggcgtg cacaccttcc eggctgtcct acagtctctc	180
5	ggactctact cctcagcag cgtgggtgacc gtgcctcca gcagcttggg cacgaagacc	240
	tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc	300
10	aaatatggtc ccccatgccc atcatgccc gcacctgagt tcttgggggg accatcagtc	360
	ttctgttcc ccccaaaacc caaggacct ctcagtatct cccggacccc tgaggtcacg	420
	tgcgtgggtg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat	480
15	ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac	540
	cgtgtggtea gcgtctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag	600
20	tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtec tccatcgaga aaacctctc caaagccaaa	660
	gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat cccaggagga gatgaccaag	720
	aaccaggtea gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag	780
25	tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccgt gctggactcc	840
	gacggctcct tcttctcta cagcaggcta accgtgraca agagcagggtg gcaggagggg	900
30	aatgtttct catgctccgt gakgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc	960
	ctctccctgt ctctgggtaa a	981
35	<210> 6	
	<211> 327	
	<212> PRT	
40	<213> 智人(Homo sapiens)	
45	<400> 6	
	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg	
	1 5 10 15	
	Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr	

	20	25	30
	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
	35	40	45
5	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
	50	55	60
	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr		
10	65	70	75 80
	Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
	85	90	95
15	Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro		
	100	105	110
	Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
	115	120	125
20	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
	130	135	140
	Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
25	145	150	155 160
	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe		
	165	170	175
30	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
	180	185	190
	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu		
	195	200	205
35	Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
	210	215	220
	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys		
40	225	230	235 240
	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
	245	250	255
45	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
	260	265	270
	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
	275	280	285

	Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser	
	290 295 300	
5	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser	
	305 310 315 320	
	Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys	
	325	
10	<210> 7	
	<211> 321	
15	<212> DNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
20	<400> 7	
	cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac ttccegccat ctgatgagca gttgaaatct	60
	ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag	120
25	tggaaggtgg ataacgcct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac	180
	agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag	240
30	aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag	300
	agcttcaaca ggggagagtg t	321
35	<210> 8	
	<211> 107	
	<212> PRT	
40	<213> 智人(Homo sapiens)	
45	<400> 8	
	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu	
	1 5 10 15	

	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe	
	20 25 30	
5	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln	
	35 40 45	
	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser	
	50 55 60	
10	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu	
	65 70 75 80	
	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser	
	85 90 95	
15	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
	100 105	
	<210> 9	
20	<211> 369	
	<212> DNA	
25	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 9	
30	gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc	60
	tccctgtgcag cctctggctt caccttaaga agttatagca tgaactgggt tcgccaggct	120
	ccaggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtcgta gtagtcatac catattctac	180
35	gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ttcaactgtat	240
	ctgcaaatgg acagcctgag agaogaggac acggctatgt attactgtgc gagagtatat	300
40	agcagtggot ggcaogtctc tgattatattt gactactggg gccagggaat cctggtcacc	360
	gtttcctca	369
45	<210> 10	
	<211> 123	
	<212> PRT	

	<213> 智人(Homo sapiens)	
5	<400> 10	
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
	1 5 10 15	
10	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Arg Ser Tyr	
	20 25 30	
	Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
15	35 40 45	
	Ser Tyr Ile Ser Arg Ser Ser His Thr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val	
	50 55 60	
20	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr	
	65 70 75 80	
	Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys	
	85 90 95	
25	Ala Arg Val Tyr Ser Ser Gly Trp His Val Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr	
	100 105 110	
	Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser	
30	115 120	
	<210> 11	
	<211> 321	
35	<212> DNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
40	<400> 11	
	gccatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
45	atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc agtgcttttag cctggatatca gcagaaacca	120
	gggaaagetc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca	180
	aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct	240

	gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt acccgctcac ttteggcgga	300
5	gggaccaagg tggagatcaa a	321
	<210> 12	
	<211> 107	
10	<212> PRT	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
15		
	<400> 12	
20	Ala Ile Gln Leu 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 Gly Ile Ser Ser Ala 20 25 30	
25	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile 35 40 45	
	Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50 55 60	
30	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65 70 75 80	
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu 85 90 95	
35	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 100 105	
40	<210> 13	
	<211> 42	
	<212> DNA	
45	<213> 智人(Homo sapiens)	

	<400> 13	
	gtatatagca gtggctggca cgtctctgat tattttgact ac	42
5	<210> 14	
	<211> 14	
	<212> PRT	
10	<213> 智人(Homo sapiens)	
15	<400> 14	
	Val Tyr Ser Ser Gly Trp His Val Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr	
	1 5 10	
20	<210> 15	
	<211> 27	
	<212> DNA	
25	<213> 智人(Homo sapiens)	
30	<400> 15	
	caacagttta atagttaccc gtcact	27
	<210> 16	
35	<211> 9	
	<212> PRT	
40	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 16	
45	Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr	
	1 5	
	<210> 17	

	<211> 51	
	<212> DNA	
5	<213> 智人(Homo sapiens)	
10	<400> 17 tacattagtc gtagtagtca taccatattc tacgcagact ctgtgaaggg c	51
	<210> 18	
15	<211> 17	
	<212> PRT	
20	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 18	
25	Tyr Ile Ser Arg Ser Ser His Thr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys 1 5 10 15	
	Gly	
30	<210> 19	
	<211> 21	
35	<212> DNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
40	<400> 19 gatgcctcca gtttgaaag t	21
45	<210> 20	
	<211> 7	

	<212> PRT	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
5		
	<400> 20	
10	Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser 1 5	
	<210> 21	
15	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
20		
	<400> 21 agttatagca tgaac	15
25		
	<210> 22	
	<211> 5	
30	<212> PRT	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
35		
	<400> 22	
	Ser Tyr Ser Met Asn 1 5	
40		
	<210> 23	
	<211> 33	
45	<212> DNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	

	<400> 23	
	cgggcaagtc agggcattag cagtgttta gcc	33
5	<210> 24	
	<211> 11	
10	<212> PRT	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
15	<400> 24	
	Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala	
	1 5 10	
20	<210> 25	
	<211> 1131	
25	<212> DNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
30	<400> 25	
	gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctctggg	60
	ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg	120
35	tggaaactcag ggcacctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtcct acagtctctca	180
	ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	240
40	tacacctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagctc	300
	aaaaccccac ttggtgacac aactcacaca tgcccacggt gccagagcc caaatcttgt	360
	gacacacctc cccgtgccc acggtgccc gagcccaaat cttgtgacac acctcccccg	420
45	tgcccacggt gccagagcc caaatcttgt gacacacctc cccatgccc acggtgccc	480
	gcacctgaac tcctgggagg accgtcagtc ttctcttcc cccaaaacc caaggatacc	540

	cttatgattt cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac	600
	cccagaggtcc agttcaagtg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag	660
5	ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgttc cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac	720
	caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc	780
10	cccatcgaga aaaccatctc caaaaccaa ggacagcccc gagaaccaca ggtgtacacc	840
	ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag aaccaggtea gcctgacctg cctggtcaaa	900
	ggctttctacc ccagcgacat cgcctgggag tgggagagca gcgggcagcc ggagaacaac	960
15	tacaacacca cgcctcccat gctggactcc gacggtcctt tcttctctta cagcaagctc	1020
	accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg aacatcttct catgctccgt gatgcatgag	1080
20	gctctgcaca accgcttcac gcagaagago ctctccctgt ctccgggtaa a	1131
	<210> 26	
	<211> 376	
25	<212> PRT	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
30		
	<400> 26	
35	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg 1 5 10 15	
	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr 20 25 30	
40	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser 35 40 45	
	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser 50 55 60	
45	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr 65 70 75 80	
	Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	

	85	90	95
	Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro		
	100	105	110
5	Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg		
	115	120	125
	Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys		
10	130	135	140
	Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro		
	145	150	155
			160
15	Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys		
	165	170	175
	Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val		
	180	185	190
20	Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr		
	195	200	205
	Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu		
25	210	215	220
	Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His		
	225	230	235
			240
30	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys		
	245	250	255
	Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln		
	260	265	270
35	Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met		
	275	280	285
	Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro		
40	290	295	300
	Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn		
	305	310	315
			320
45	Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu		
	325	330	335
	Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile		
	340	345	350

	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln	
	355 360 365	
5	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
	370 375	
	<210> 27	
10	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
15		
	<220>	
20	<223> 人 NGF 的 PCR 引物	
	<400> 27	
	acaccacata tgtcatcatc ccatcccat	29
25		
	<210> 28	
	<211> 40	
30	<212> DNA	
	<213> 人工	
35		
	<220>	
	<223> 人 NGF 的 PCR 引物	
40	<400> 28	
	accacaggat cctccttatg cagcagcac agctttacgg	40
	<210> 29	
45	<211> 375	
	<212> DNA	

	<213> 人工	
5	<220>	
	<223> 编码重组人 met-NGF 的核苷酸序列	
	<400> 29	
10	catatgtcat catcccatcc catcttccac aggggcgaat tctcgggtgtg tgacagtgtc	60
	agcgtgtggg ttggggataa gaccaccgcc acagacatca agggcaagga ggtgatggtg	120
15	ttgggagagg tgaacattaa caacagtgtg ttcaaacagt acttttttga gaccaagtgc	180
	cgggacccaa atcccggtga cagcgggtgc cggggcattg actcaaagca ctggaactca	240
	tattgtacca cgactcacac ctttgtcaag gcgctgacca tggatggcaa gcaggtgcc	300
20	tggcggttta tccggataga tacggcctgt gtgtgtgtgc tcagccgtaa agctgtgcgt	360
	cgtgcataag gatcc	375
25	<210> 30	
	<211> 121	
	<212> PRT	
30	<213> 人工	
35	<220>	
	<223> 重组人 met-NGF 的氨基酸序列(1-120)	
	<400> 30	
40	Met Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys	
	1 5 10 15	
	Asp Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile	
45	20 25 30	
	Lys Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser	
	35 40 45	

	Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro	
	50 55 60	
5	Val Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr	
	65 70 75 80	
	Cys Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys	
	85 90 95	
10	Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val	
	100 105 110	
	Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg Ala	
	115 120	
15	<210> 31	
	<211> 55	
20	<212> DNA	
	<213> 人工	
25	<220>	
	<223> 产生表达载体 pCFM1656 (ATCC #69576)的 5' 引物序列	
30	<400> 31	
	cgatttgatt ctagaaggag gaataacata tggtaacgc gttggaattc ggtac	55
	<210> 32	
35	<211> 49	
	<212> DNA	
40	<213> 人工	
	<220>	
45	<223> 产生表达载体 pCFM1656 (ATCC #69576)的 3' 引物序列	
	<400> 32	
	taaactaaga tcttctcct tattgtatac caattgcgc accttaagc	49

	<210> 33	
5	<211> 24	
	<212> DNA	
10	<213> 人工	
	<220>	
15	<223> PCR 引物	
	<220>	
20	<221> 不确定	
	<222> (18).. (23)	
	<223> n 为 a、c、t 或 g	
25		
	<400> 33	
	ggcggatag gcctccannn nnnt	24
30		
	<210> 34	
	<211> 21	
35	<212> DNA	
	<213> 人工	
40		
	<220>	
	<223> PCR 引物	
45	<400> 34	
	ggggtcaggc tggaactgag g	21
	<210> 35	

	<211> 19	
5	<212> DNA	
	<213> 人工	
10	<220>	
	<223> PCR 引物	
15	<400> 35 tgaggacgct gaccacacg	19
	<210> 36	
20	<211> 54	
	<212> DNA	
25	<213> 人工	
	<220>	
30	<223> PCR 引物	
	<400> 36 cagcagaagc ttctagacca ccatggacat gaggggtgccg gctcagctcc tggg	54
35	<210> 37	
	<211> 34	
40	<212> DNA	
	<213> 人工	
45	<220>	
	<223> PCR 引物	

	<400> 37	
	cttgtcgact caacactctc ccctgttgaa gctc	34
5	<210> 38	
	<211> 55	
10	<212> DNA	
	<213> 人工	
15	<220>	
	<223> PCR 引物	
20	<400> 38	
	cagcagaagc ttctagacca ccatggagtt ggggctgtgc tgggttttcc ttgtt	55
	<210> 39	
25	<211> 34	
	<212> DNA	
30	<213> 人工	
	<220>	
35	<223> PCR 引物	
	<400> 39	
	gcatgtcgac tcatttaccc ggagacaggg agag	34
40	<210> 40	
	<211> 449	
45	<212> PRT	
	<213> 智人(Homo sapiens)	

<400> 40

5 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Arg Ser Tyr
 20 25 30

10 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Ser Tyr Ile Ser Arg Ser Ser His Thr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

15 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

20 Ala Arg Val Tyr Ser Ser Gly Trp His Val Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

25 Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 130 135 140

30 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

35 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

40 Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 195 200 205

 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys
 210 215 220

45 Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
 225 230 235 240

 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

	245	250	255
	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
	260	265	270
5	Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
	275	280	285
	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val		
10	290	295	300
	Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
	305	310	315
			320
15	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
	325	330	335
	Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
	340	345	350
20	Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
	355	360	365
	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
25	370	375	380
	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu		
	385	390	395
			400
30	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
	405	410	415
	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
	420	425	430
35	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
	435	440	445
40	Lys		
	<210> 41		
	<211> 453		
45	<212> PRT		
	<213> 智人(Homo sapiens)		

	<400>	41	
5	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	1 5 10 15	
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Arg Ser Tyr	20 25 30	
10	Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	35 40 45	
15	Ser Tyr Ile Ser Arg Ser Ser His Thr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val	50 55 60	
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr	65 70 75 80	
20	Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys	85 90 95	
	Ala Arg Val Tyr Ser Ser Gly Trp His Val Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr	100 105 110	
25	Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly	115 120 125	
30	Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly	130 135 140	
	Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val	145 150 155 160	
35	Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe	165 170 175	
	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val	180 185 190	
40	Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val	195 200 205	
45	Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys	210 215 220	
	Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu	225 230 235 240	

	Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	245	250	255
5	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val	260	265	270
	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val	275	280	285
10	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser	290	295	300
	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu	305	310	315
15	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala	325	330	335
	Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro	340	345	350
20	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln	355	360	365
	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala	370	375	380
	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr	385	390	395
30	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu	405	410	415
	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser	420	425	430
35	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser	435	440	445
40	Leu Ser Pro Gly Lys	450		
	<210> 42			
45	<211> 450			
	<212> PRT			
	<213> 智人(Homo sapiens)			

<400> 42

5
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

10
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Arg Ser Tyr
 20 25 30

15
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

20
 Ser Tyr Ile Ser Arg Ser Ser His Thr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

25
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

30
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

35
 Ala Arg Val Tyr Ser Ser Gly Trp His Val Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

40
 Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

45
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 130 135 140

50
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

55
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

60
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

65
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 195 200 205

70
 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
 210 215 220

75
 Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
 225 230 235 240

	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile	245	250	255
5	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu	260	265	270
	Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His	275	280	285
10	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg	290	295	300
15	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys	305	310	315
	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu	325	330	335
20	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr	340	345	350
	Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu	355	360	365
25	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp	370	375	380
30	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val	385	390	395
	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp	405	410	415
35	Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His	420	425	430
	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu	435	440	445
40	Gly Lys	450		
45	<210> 43			
	<211> 499			
	<212> PRT			

<213> 智人(Homo sapiens)

5 <400> 43

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

10 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Arg Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

15 Ser Tyr Ile Ser Arg Ser Ser His Thr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

20 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

25 Ala Arg Val Tyr Ser Ser Gly Trp His Val Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

30 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

35 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

40 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val
195 200 205

45 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Leu Lys
210 215 220

Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro

	225	230	235	240
	Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys			
		245	250	255
5	Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser			
		260	265	270
	Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu			
10		275	280	285
	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu			
		290	295	300
15	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser			
	305	310	315	320
	His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu			
		325	330	335
20	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr			
		340	345	350
	Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn			
25		355	360	365
	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro			
		370	375	380
30	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln			
	385	390	395	400
	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val			
		405	410	415
35	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val			
		420	425	430
	Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro			
40		435	440	445
	Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr			
		450	455	460
45	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val			
	465	470	475	480
	Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu			
		485	490	495

Ser Pro Gly

5 <210> 44

<211> 214

<212> PRT

10

<213> 智人(Homo sapiens)

15 <400> 44

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

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

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

25

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

35 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val 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

40

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

45 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 Lys Val Tyr
	180 185 190
5	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
10	<210> 45
	<211> 5
	<212> PRT
15	<213> 智人(Homo sapiens)
20	<400> 45
	Phe Phe Glu Thr Lys
	1 5
25	<210> 46
	<211> 9
	<212> PRT
30	<213> 智人(Homo sapiens)
35	<400> 46
	Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg
	1 5
40	<210> 47
	<211> 5
	<212> PRT
45	<213> 智人(Homo sapiens)

	<400>	47
	His Trp Asn Ser Tyr	
5	1	5
	<210>	48
	<211>	12
10	<212>	PRT
	<213>	智人(Homo sapiens)
15	<400>	48
	Asn Ser Val Glu Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys	
20	1	5 10
	<210>	49
	<211>	7
25	<212>	PRT
	<213>	智人(Homo sapiens)
30	<400>	49
	Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg	
35	1	5
	<210>	50
	<211>	5
40	<212>	PRT
	<213>	智人(Homo sapiens)
45	<400>	50
	Glu Val Met Val Leu	
	1	5

<210> 51
 <211> 25
 5 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 10
 <400> 51
 Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp
 15 1 5 10 15
 Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp Lys
 20 25
 20 <210> 52
 <211> 20
 <212> PRT
 25 <213> 智人(Homo sapiens)
 30 <400> 52
 Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val
 1 5 10 15
 35 Leu Ser Arg Lys
 20
 <210> 53
 40 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 45
 <400> 53

	Ser	Ser	His	Pro	Ile	Phe	His	Arg	Gly	Glu	Phe	Ser	Val	Cys	
	1				5					10					
5	<210> 54														
	<211> 8														
	<212> PRT														
10	<213> 智人(Homo sapiens)														
15	<400> 54														
	Ser	Ser	His	Pro	Ile	Phe	His	Arg							
	1				5										
20	<210> 55														
	<211> 6														
	<212> PRT														
25	<213> 智人(Homo sapiens)														
30	<400> 55														
	Gly	Glu	Phe	Ser	Val	Cys									
	1				5										
35	<210> 56														
	<211> 15														
	<212> PRT														
40	<213> 智人(Homo sapiens)														
45	<400> 56														
	Ser	Ser	Ser	His	Pro	Ile	Phe	His	Arg	Gly	Glu	Phe	Ser	Val	Cys
	1				5					10					15
	<210> 57														

	<211>	16
5	<212>	PRT
	<213>	智人(Homo sapiens)
10	<400>	57
	Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Ala Asp Ser Val Ser Val Cys	
	1 5 10 15	
15	<210>	58
	<211>	16
	<212>	PRT
20	<213>	智人(Homo sapiens)
25	<400>	58
	Glu Phe Ser Val Ala Asp Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp Lys Cys	
	1 5 10 15	
30	<210>	59
	<211>	16
	<212>	PRT
35	<213>	智人(Homo sapiens)
40	<400>	59
	Asp Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Cys	
	1 5 10 15	
45	<210>	60
	<211>	16
	<212>	PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

5

<400> 60

Trp Val Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Cys
 1 5 10 15

10

<210> 61

<211> 16

15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

20

<400> 61

Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly Cys
 1 5 10 15

25

<210> 62

<211> 15

30

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

35

<400> 62

Ile Lys Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn
 1 5 10 15

40

<210> 63

<211> 16

45

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

	<400>	63	
5	Val Met Val Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Cys		
	1	5	10 15
	<210>	64	
	<211>	16	
10	<212>	PRT	
	<213>	智人(Homo sapiens)	
15			
	<400>	64	
20	Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Cys		
	1	5	10 15
	<210>	65	
	<211>	16	
25	<212>	PRT	
	<213>	智人(Homo sapiens)	
30			
	<400>	65	
35	Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Ala Arg Asp Cys		
	1	5	10 15
	<210>	66	
	<211>	16	
40	<212>	PRT	
	<213>	智人(Homo sapiens)	
45			
	<400>	66	
	Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Ala Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Cys		

	1	5	10	15
	<210> 67			
5	<211> 16			
	<212> PRT			
10	<213> 智人(Homo sapiens)			
	<400> 67			
15	Thr Lys Ala Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Ser Gly Ala Arg Asp Cys			
	1	5	10	15
	<210> 68			
20	<211> 16			
	<212> PRT			
25	<213> 智人(Homo sapiens)			
	<400> 68			
30	Pro Asn Pro Val Asp Ser Gly Ala Arg Asp Ile Asp Ser Lys His Cys			
	1	5	10	15
	<210> 69			
35	<211> 15			
	<212> PRT			
40	<213> 智人(Homo sapiens)			
	<400> 69			
45	Ser Gly Ala Arg Asp Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys			
	1	5	10	15
	<210> 70			

	<211>	16
	<212>	PRT
5	<213>	智人(Homo sapiens)
	<400>	70
10	Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Ala Thr Thr Thr His Thr Cys 1 5 10 15	
	<210>	71
15	<211>	16
	<212>	PRT
20	<213>	智人(Homo sapiens)
	<400>	71
25	Trp Asn Ser Tyr Ala Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys Ala Leu Cys 1 5 10 15	
	<210>	72
30	<211>	16
	<212>	PRT
35	<213>	智人(Homo sapiens)
	<400>	72
40	Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Cys 1 5 10 15	
	<210>	73
45	<211>	16
	<212>	PRT

	<400>	76
	Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Ala Val Ala Val Leu Ser Arg Lys Cys	
5	1	5 10 15
	<210>	77
	<211>	16
10	<212>	PRT
	<213>	智人(Homo sapiens)
15	<400>	77
	Thr Ala Ala Val Ala Val Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg Ala Cys	
20	1	5 10 15
	<210>	78
	<211>	15
25	<212>	PRT
	<213>	智人(Homo sapiens)
30	<400>	78
	Cys Ala Ala Val Ala Val Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg Ala	
35	1	5 10 15
	<210>	79
	<211>	125
40	<212>	PRT
	<213>	智人(Homo sapien)
45	<400>	79
	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu	
	1	5 10 15

	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Asn	Phe	Thr	Thr	Tyr	
				20					25						30		
5	Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
	Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Asp	Thr	Lys	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe	
		50					55					60					
10	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
15					85					90					95		
	Ala	Arg	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	
			100						105						110		
20	Asn	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
		115						120					125				
	<210> 80																
25	<211> 107																
	<212> PRT																
	<213> 智人(Homo sapien)																
30																	
	<400> 80																
35	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	
	1				5					10					15		
	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ile	Trp	
			20						25					30			
40	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	His	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	
		35					40						45				
	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
45		50				55						60					
	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
	65					70					75				80		

	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp	
	85	90 95
5	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	100 105
	<210>	81
	<211>	127
10	<212>	PRT
	<213>	智人(Homo sapien)
15	<400>	81
20	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg	1 5 10 15
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Glu Asp Tyr	20 25 30
25	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	35 40 45
	Ser Gly Ile Ser Trp Asn Arg Gly Ile Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val	50 55 60
30	Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr	65 70 75 80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys	85 90 95
35	Ala Lys Glu Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Arg Pro Gly Tyr Phe Tyr Tyr	100 105 110
40	Val Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	115 120 125
	<210>	82
45	<211>	108
	<212>	PRT
	<213>	智人(Homo sapien)

5 <400> 82
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Gly
 10 20 25 30
 Phe Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 15 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Ala Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 20 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 25 100 105
 <210> 83
 <211> 127
 30 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapien)
 35
 <400> 83
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 40 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 45 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Arg Gly Ile Ile Gly Tyr Ala Gly Ser Val
 50 55 60

	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr	65	70	75	80
5	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys	85	90	95	
	Val Lys Glu Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Arg Pro Gly Tyr Phe Tyr Tyr	100	105	110	
10	Val Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	115	120	125	
	<210> 84				
15	<211> 108				
	<212> PRT				
20	<213> 智人(Homo sapien)				
	<400> 84				
25	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	1	5	10	15
	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser	20	25	30	
30	Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu	35	40	45	
35	Ile Tyr Val Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser	50	55	60	
	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu	65	70	75	80
40	Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro	85	90	95	
	Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	100	105		
45	<210> 85				
	<211> 121				

<212> PRT
 <213> 智人(Homo sapien)
 5
 <400> 85
 10 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 15 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Thr Trp Asn Ser Gly Ile Leu Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 20 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 25 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Glu Glu Gly Ser Gly Arg Tyr Tyr Asn Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 30 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 86
 35 <211> 107
 <212> PRT
 40 <213> 智人(Homo sapien)
 <400> 86
 45 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

	20	25	30
	Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu		
	35	40	45
5	Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser		
	50	55	60
	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu		
10	65	70	75 80
	Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr		
	85	90	95
15	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
	100	105	
	<210> 87		
20	<211> 124		
	<212> PRT		
	<213> 智人(Homo sapien)		
25			
	<400> 87		
30	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly		
	1	5	10 15
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr		
	20	25	30
35	Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35	40	45
	Ser Asp Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val		
40	50	55	60
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
	65	70	75 80
45	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys		
	85	90	95
	Ala Arg Glu Gln Trp Leu Asp Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp		
	100	105	110

	Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
	115 120
5	<210> 88
	<211> 107
	<212> PRT
10	<213> 智人(Homo sapien)
15	<400> 88
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
	1 5 10 15
20	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
	20 25 30
	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
	35 40 45
25	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
	50 55 60
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
30	65 70 75 80
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp
	85 90 95
35	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
	100 105
	<210> 89
40	<211> 107
	<212> PRT
	<213> 智人(Homo sapien)
45	<400> 89

	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
	1 5 10 15
5	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Tyr
	20 25 30
	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
	35 40 45
10	Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
	50 55 60
	Ser Gly Pro Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
15	65 70 75 80
	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp His Arg
	85 90 95
20	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
	100 105
	<210> 90
25	<211> 108
	<212> PRT
	<213> 智人(Homo sapien)
30	
	<400> 90
35	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
	1 5 10 15
	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
	20 25 30
40	Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
	35 40 45
	Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
45	50 55 60
	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
	65 70 75 80
	Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro

	85	90	95
	Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
	100	105	
5	<210> 91		
	<211> 107		
10	<212> PRT		
	<213> 智人(Homo sapien)		
15	<400> 91		
	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
	1 5 10 15		
20	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr		
	20 25 30		
	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile		
25	35 40 45		
	Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly		
	50 55 60		
30	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro		
	65 70 75 80		
	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp		
	85 90 95		
35	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
	100 105		
	<210> 92		
40	<211> 5		
	<212> PRT		
45	<213> 智人(Homo sapien)		
	<400> 92		

Thr Tyr Trp Ile Gly
 1 5

5 <210> 93
 <211> 17
 <212> PRT
 10 <213> 智人(Homo sapien)

15 <400> 93
 Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15

20 Gly
 <210> 94
 25 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapien)
 30
 <400> 94

35 Asn Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asn Val
 1 5 10 15
 <210> 95

40 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapien)
 45
 <400> 95

	Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ile Trp Leu Ala
	1 5 10
5	<210> 96
	<211> 7
	<212> PRT
10	<213> 智人(Homo sapien)
15	<400> 96
	Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
	1 5
20	<210> 97
	<211> 9
	<212> PRT
25	<213> 智人(Homo sapien)
30	<400> 97
	Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp Thr
	1 5
35	<210> 98
	<211> 5
	<212> PRT
40	<213> 智人(Homo sapien)
45	<400> 98
	Asp Tyr Ala Met His
	1 5
	<210> 99

<211> 17
 <212> PRT
 5 <213> 智人(Homo sapien)

 10 <400> 99
 Gly Ile Ser Trp Asn Arg Gly Ile Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 15 Gly

 <210> 100
 20 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapien)
 25
 <400> 100
 30 Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Arg Pro Gly Tyr Phe Tyr Tyr Val Met Asp
 1 5 10 15
 Val
 35
 <210> 101
 <211> 12
 40 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapien)

 45 <400> 101
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Gly Phe Leu Ala
 1 5 10

<210> 102

<211> 7

5 <212> PRT

<213> 智人(Homo sapien)

10

<400> 102

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

15 1 5

<210> 103

<211> 9

20 <212> PRT

<213> 智人(Homo sapien)

25

<400> 103

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Thr

30 1 5

<210> 104

<211> 5

35 <212> PRT

<213> 智人(Homo sapien)

40

<400> 104

Asp Tyr Ala Met His

45 1 5

<210> 105

<211> 17

<212> PRT
 <213> 智人(Homo sapien)
 5
 <400> 105
 10 Gly Ile Ser Trp Asn Arg Gly Ile Ile Gly Tyr Ala Gly Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 15
 <210> 106
 <211> 17
 20 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapien)
 25
 <400> 106
 Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Arg Pro Gly Tyr Phe Tyr Tyr Val Met Asp
 1 5 10 15
 30 Val
 <210> 107
 35 <211> 12
 <212> PRT
 40 <213> 智人(Homo sapien)
 <400> 107
 45 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 108

<211> 7

5 <212> PRT

<213> 智人(Homo sapien)

10 <400> 108

Val Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

15 <210> 109

<211> 9

<212> PRT

20 <213> 智人(Homo sapien)

25 <400> 109

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

30 <210> 110

<211> 5

<212> PRT

35 <213> 智人(Homo sapien)

40 <400> 110

Asp Tyr Ala Met His
1 5

45 <210> 111

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapien)

 5
 <400> 111

 Gly Ile Thr Trp Asn Ser Gly Ile Leu Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 10
 Gly

 <210> 112
 15
 <211> 11

 <212> PRT
 20
 <213> 智人(Homo sapien)

 <400> 112
 25
 Glu Gly Ser Gly Arg Tyr Tyr Asn Phe Asp Tyr
 1 5 10
 30
 <210> 113
 <211> 12

 <212> PRT
 35
 <213> 智人(Homo sapien)

 <400> 113
 40
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 45
 <210> 114
 <211> 7

 <212> PRT

	<213>	智人(Homo sapien)
5	<400>	114
	Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr	
	1	5
10	<210>	115
	<211>	8
	<212>	PRT
15	<213>	智人(Homo sapien)
20	<400>	115
	Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr Thr	
	1	5
25	<210>	116
	<211>	5
	<212>	PRT
30	<213>	智人(Homo sapien)
35	<400>	116
	Asp Tyr Gly Met Asn	
	1	5
40	<210>	117
	<211>	17
	<212>	PRT
45	<213>	智人(Homo sapien)

	Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
	1 5
5	<210> 121
	<211> 9
	<212> PRT
10	<213> 智人(Homo sapien)
15	<400> 121
	Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp Thr
	1 5
20	<210> 122
	<211> 11
	<212> PRT
25	<213> 智人(Homo sapien)
30	<400> 122
	Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Tyr Leu Ala
	1 5 10
35	<210> 123
	<211> 7
	<212> PRT
40	<213> 智人(Homo sapien)
45	<400> 123
	Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
	1 5

	<210>	124
	<211>	9
5	<212>	PRT
	<213>	智人(Homo sapien)
10		
	<400>	124
	Gln Gln Arg Ser Asn Trp His Arg Thr	
	1	5
15	<210>	125
	<211>	12
20	<212>	PRT
	<213>	智人(Homo sapien)
25		
	<400>	125
	Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala	
	1	5 10
30	<210>	126
	<211>	7
35	<212>	PRT
	<213>	智人(Homo sapien)
40		
	<400>	126
	Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr	
	1	5
45	<210>	127
	<211>	9

	<212>	PRT
	<213>	智人(Homo sapien)
5		
	<400>	127
10	Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp Thr	
	1	5
	<210>	128
	<211>	11
15	<212>	PRT
	<213>	智人(Homo sapien)
20		
	<400>	128
25	Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala	
	1	5 10
	<210>	129
	<211>	7
30	<212>	PRT
	<213>	智人(Homo sapien)
35		
	<400>	129
40	Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr	
	1	5
	<210>	130
	<211>	9
45	<212>	PRT
	<213>	智人(Homo sapien)

<400> 130
 5 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 131
 10 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapien)
 15
 <400> 131
 20 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 25 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 30 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 35 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 40
 <210> 132
 <211> 11
 45 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapien)

	<400>	132
5	Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Tyr Leu Ala	
	1	5 10
	<210>	133
10	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	智人(Homo sapien)
15		
	<400>	133
20	Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr	
	1	5
	<210>	134
25	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	智人(Homo sapien)
30		
	<400>	134
35	Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Thr	
	1	5
	<210>	135
40	<211>	120
	<212>	PRT
	<213>	智人(Homo sapien)
45		
	<400>	135
	Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp	

	1	5	10	15
	Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys			
		20	25	30
5	Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val			
		35	40	45
	Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val			
10		50	55	60
	Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys			
	65	70	75	80
15	Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln			
		85	90	95
	Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu			
		100	105	110
20	Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg Ala			
		115	120	
	<210> 136			
25	<211> 120			
	<212> PRT			
30	<213> 小家鼠(mus musculus)			
	<400> 136			
35	Ser Ser Thr His Pro Val Phe His Met Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp			
	1	5	10	15
	Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys			
40		20	25	30
	Gly Lys Glu Val Thr Val Leu Ala Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val			
		35	40	45
45	Phe Arg Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Cys Arg Ala Ser Asn Pro Val			
	50	55	60	
	Glu Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys			
	65	70	75	80

Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys Ala Leu Thr Thr Asp Glu Lys Gln
 85 90 95

5 Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu
 100 105 110

Ser Arg Lys Ala Thr Arg Arg Ala
 115 120

10 <210> 137
 <211> 126

15 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapien)

20 <400> 137

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu
 1 5 10 15

25 Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys
 20 25 30

Lys Thr Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys
 30 35 40 45

Val Pro Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys
 50 55 60

35 Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys
 65 70 75 80

Arg His Trp Asn Ser Gln Cys Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala
 85 90 95

40 Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile
 100 105 110

Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Arg Gly Arg
 115 120 125

45 <210> 138
 <211> 119

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapien)

5

<400> 138

10	Tyr Ala Glu His Lys Ser His Arg Gly Glu Tyr Ser Val Cys Asp Ser
	1 5 10 15
	Glu Ser Leu Trp Val Thr Asp Lys Ser Ser Ala Ile Asp Ile Arg Gly
	20 25 30
15	His Gln Val Thr Val Leu Gly Glu Ile Lys Thr Gly Asn Ser Pro Val
	35 40 45
	Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Arg Cys Lys Glu Ala Arg Pro Val Lys
20	50 55 60
	Asn Gly Cys Arg Gly Ile Asp Asp Lys His Trp Asn Ser Gln Cys Lys
	65 70 75 80
25	Thr Ser Gln Thr Tyr Val Arg Ala Leu Thr Ser Glu Asn Asn Lys Leu
	85 90 95
	Val Gly Trp Arg Trp Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Ala Leu
	100 105 110
30	Ser Arg Lys Ile Gly Arg Thr
	115

图 1

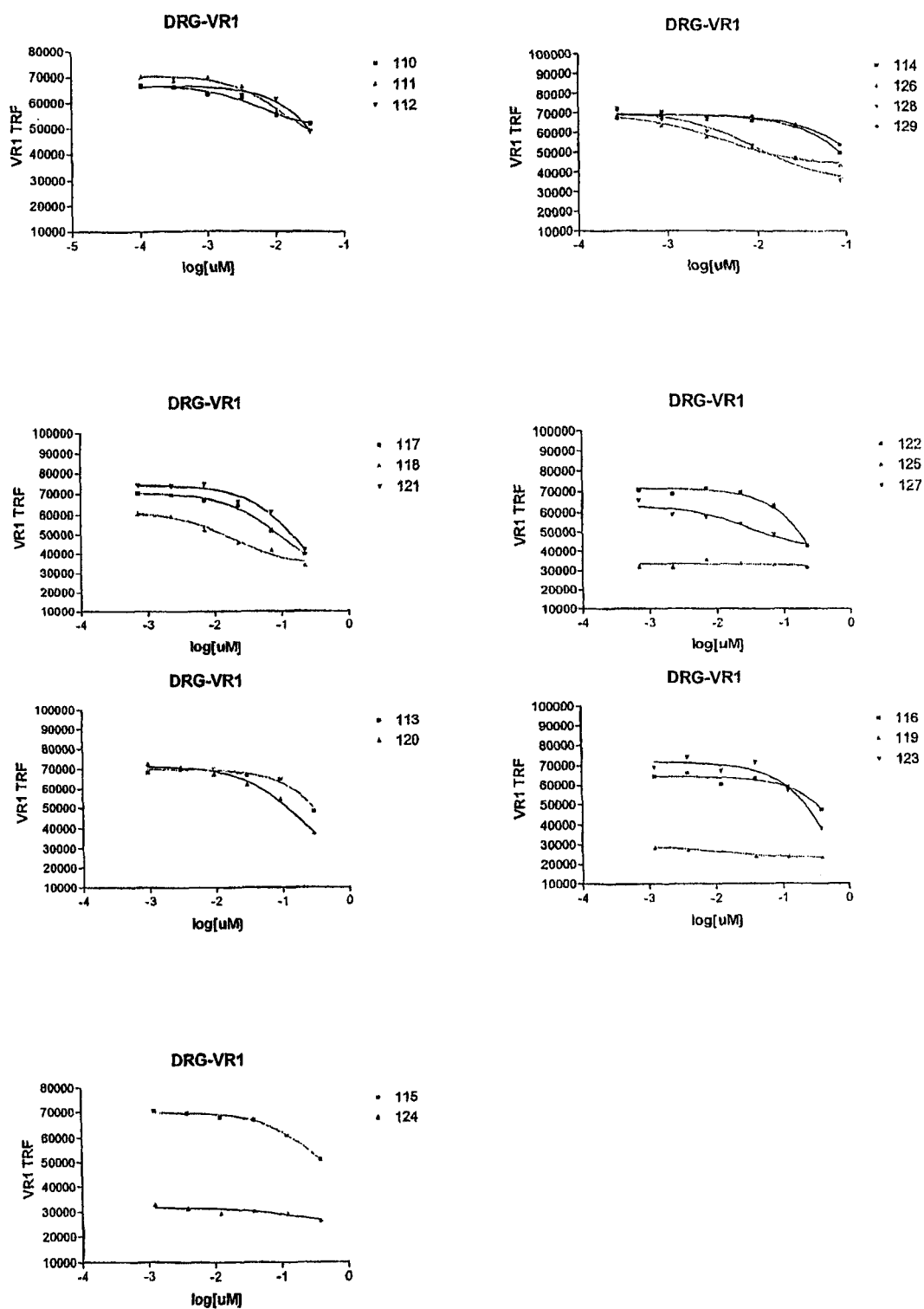


图 2

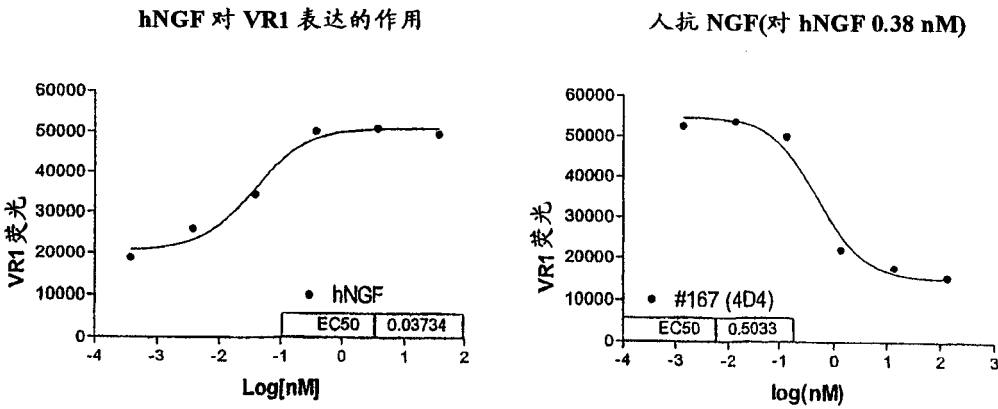


图 3

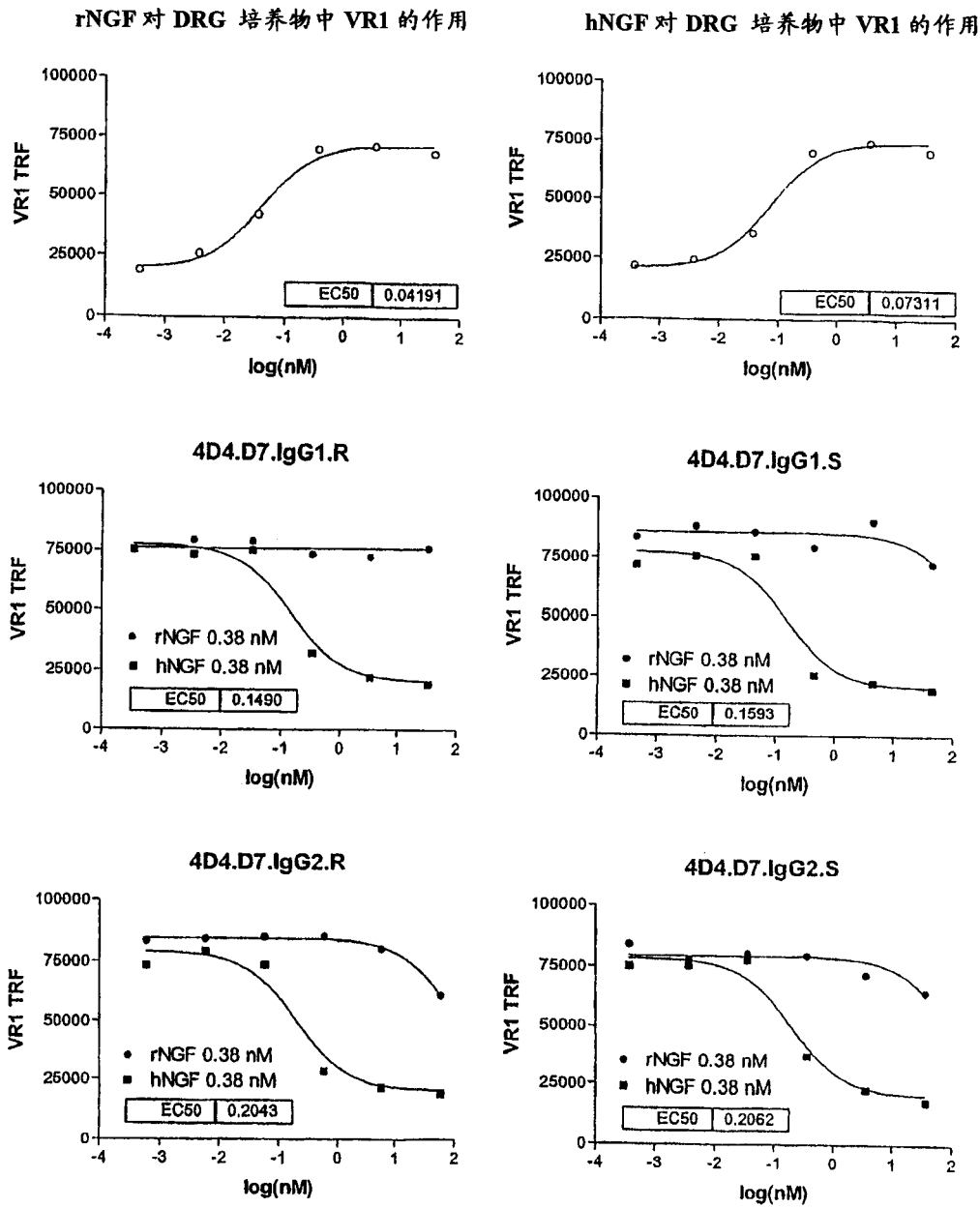


图 4

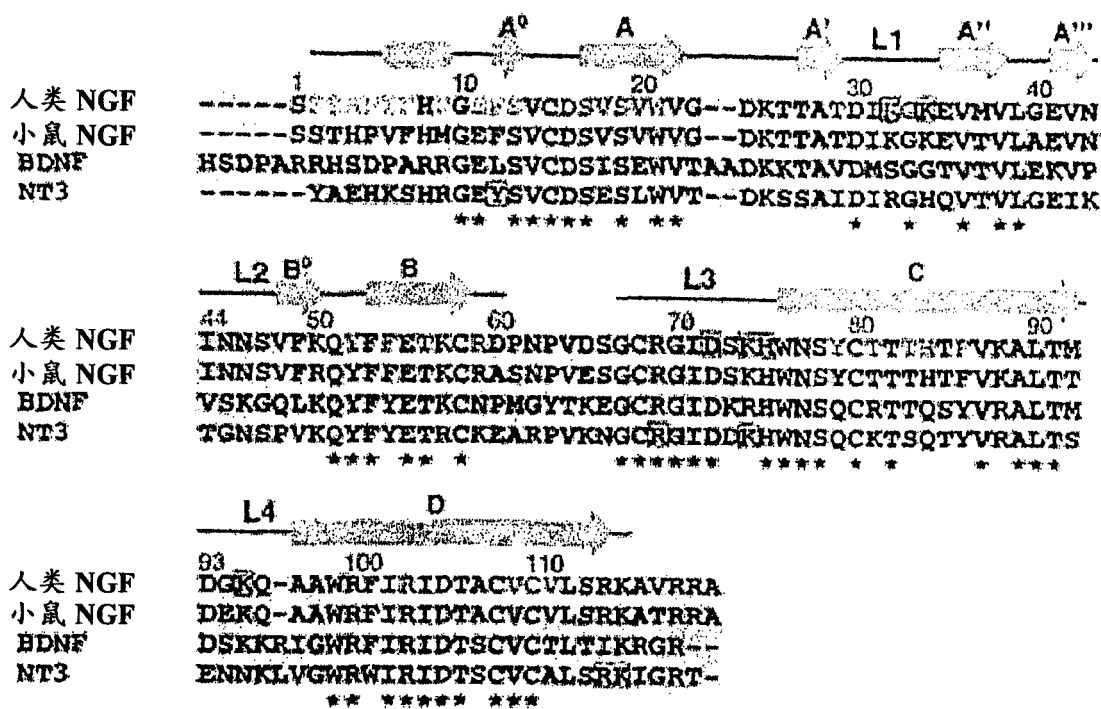


图 5

NGF CDR1 重链比对/%一致性

(1) 1 5
 14D10 HC CDR1 (1) DYAMH
 6H9 HC CDR1 (1) DYAMH
 7H2 HC CDR1 (1) DYAMH
 4G6 HC CDR1 (1) DYGMN
 14D11 HC CDR1 (1) TYWLG
 4D4 HC CDR1 (1) SYSMN

	14D10 HC CDR1	6H9 HC CDR1	7H2 HC CDR1	4G6 HC CDR1	14D11 HC CDR1	4D4 HC CDR1
14D10 HC CDR1	100	100	100	60	20	40
6H9 HC CDR1		100	100	60	20	40
7H2 HC CDR1			100	60	20	40
4G6 HC CDR1				100	20	60
14D11 HC CDR1					100	20
4D4 HC CDR1						100

图 6

NGF CDR2 重链比对/%一致性

	(1)	1	17
14D10 HC CDR2	(1)	GISWNRGIIGYADSVKG	
6H9 HC CDR2	(1)	GISWNRGIIGYAGSVKG	
7H2 HC CDR2	(1)	GISWNRGIIGYADSVKG	
4G6 HC CDR2	(1)	DINWNGGSTGYADSVKG	
4D4 HC CDR2	(1)	YISRSSHTIFYADSVKG	
14D11 HC CDR2	(1)	IIYPGDSDTKYSPSFQG	

	14D10 HC CDR2	6H9 HC CDR2	14D11 HC CDR2	4D4 HC CDR2	4G6 HC CDR2	7H2 HC CDR2
14D10 HC CDR2	100	94	24	59	70	82
6H9 HC CDR2		100	24	53	65	76
14D11 HC CDR2			100	24	29	24
4D4 HC CDR2				100	47	53
4G6 HC CDR2					100	70
7H2 HC CDR2						100

图 7

NGF CDR3 重链比对/%一致性

(1) 1 17
 14D10 HC CDR3 (1) GYYGSGRPGYFYYVMDV
 6H9 HC CDR3 (1) GYYGSGRPGYFYYVMDV
 14D11 HC CDR3 (1) -NYYGSGTYYYYYGMNV
 4G6 HC CDR3 (1) --EQWLDPYXYYGMDV
 4D4 HC CDR3 (1) -VYS-SGWHVSDY-FDY
 7H2 HC CDR3 (1) ---EGSGR---YYNFDY

	14D10 HC CDR3	6H9 HC CDR3	14D11 HC CDR3	4G6 HC CDR3	4D4 HC CDR3	7H2 HC CDR3
14D10 HC CDR3	100	100	35	41	18	18
6H9 HC CDR3		100	35	41	18	18
14D11 HC CDR3			100	53	29	35
4G6 HC CDR3				100	18	29
4D4 HC CDR3					100	41
7H2 HC CDR3						100

图 8

NGF CDR1 轻链比对/%一致性

	(1)	12
14D11 LC CDR1	(1) RASQGTSIWLA-	
4G6 LC CDR1 20031028340	(1) RASQGTSIWLA-	
4D4 LC CDR1	(1) RASQGTSIWLA-	
4G6 LC CDR1 20031028351	(1) RASQGVSSYLEA-	
14D10 LC CDR1	(1) RASQSVSSYLEA-	
4G6 LC CDR1 20031000528	(1) RASQSVSSYLEA-	
4G6 LC CDR1 20031071526	(1) RASQSVSSYLEA-	
6H9 LC CDR1	(1) RASQSVSSYLEA-	
7H2 LC CDR1	(1) RASQSVSSYLEA-	
NGF 4G6 LC CDR1 20031028344	(1) RASQSVSSYLEA-	

	14D11 LC CDR1	4G6 LC CDR1 20031028340	4D4 LC CDR1	4G6 LC CDR1 20031028351	14D10 LC CDR1	4G6 LC CDR1 20031000528	4G6 LC CDR1 20031071526	6H9 LC CDR1
14D11 LC CDR1	100	92	83	75	42	67	42	42
4G6 LC CDR1 20031028340		100	92	83	50	75	50	50
4D4 LC CDR1			100	83	50	75	50	50
4G6 LC CDR1 20031028351				100	58	92	58	58
14D10 LC CDR1					100	67	83	83
4G6 LC CDR1 20031000528						100	67	67
4G6 LC CDR1 20031071526							100	100
6H9 LC CDR1								100
7H2 LC CDR1								
NGF 4G6 LC CDR1 20031028344								

图 9

NGF CDR2 轻链比对/%一致性

14D11 LC CDR2 (1) 1 7
 4G6 LC CDR2 20031028340 (1) AASSLQS
 4D4 LC CDR2 (1) DASSLEH
 4G6 LC CDR2 20031000528 (1) DASNRAE
 4G6 LC CDR2 20031028351 (1) DASNRAE
 6H9 LC CDR2 (1) VASSRAE
 14D10 LC CDR2 (1) GASSRAE
 4G6 LC CDR2 20031071526 (1) GASSRAE
 7H2 LC CDR2 (1) GASSRAE
 NGF 4G6 LC CDR2 20031028344 (1) GASSRAE

	14D11 LC CDR2	4G6 LC CDR2 20031028340	4D4 LC CDR2	4G6 LC CDR2 20031000528	4G6 LC CDR2 20031028351	6H9 LC CDR2	14D10 LC CDR2	4G6 LC CDR2 20031071526	7H2 LC CDR2	NGF 4G6 LC CDR2 20031028344
14D11 LC CDR2	100	100	71	28	28	43	43	43	43	43
4G6 LC CDR2 20031028340		100	71	28	28	43	43	43	43	43
4D4 LC CDR2			100	43	43	43	43	43	43	43
4G6 LC CDR2 20031000528				100	100	71	71	71	71	71
4G6 LC CDR2 20031028351					100	71	71	71	71	71
6H9 LC CDR2						100	86	86	86	86
14D10 LC CDR2							100	100	100	100
4G6 LC CDR2 20031071526								100	100	100
7H2 LC CDR2									100	100
NGF 4G6 LC CDR2 20031028344										100

图 10

NGF CDR3 轻链比对/%一致性

(1) 1 9
 14D10 LC CDR3 (1) QQYGSSEYF
 7H2 LC CDR3 (1) QQYGSSEYF
 6H9 LC CDR3 (1) QQYGSSEYF
 4G6 LC CDR3 20031000528 (1) QQRSNWHRF
 4G6 LC CDR3 20031028351 (1) QQRSNWHRF
 14D11 LC CDR3 (1) QQANSEYF
 4D4 LC CDR3 (1) QQANSEYF
 4G6 LC CDR3 20031028340 (1) QQYNSYF
 4G6 LC CDR3 20031071526 (1) QQYNSYF
 NGF 4G6 LC CDR3 20031028344 (1) QQYGSSEYF

	14D10 LC CDR3	7H2 LC CDR3	6H9 LC CDR3	4G6 LC CDR3 20031000528	4G6 LC CDR3 20031028351	14D11 LC CDR3	4D4 LC CDR3	4G6 LC CDR3 20031028340	4G6 LC CDR3 20031071526	NGF 4G6 LC CDR3 20031028344
14D10 LC CDR3	100	89	100	44	33	56	56	67	67	100
7H2 LC CDR3		100	89	33	33	44	44	56	56	89
6H9 LC CDR3			100	44	33	56	56	67	67	100
4G6 LC CDR3 20031000528				100	78	56	44	56	56	44
4G6 LC CDR3 20031028351					100	33	33	33	33	33
14D11 LC CDR3						100	67	78	78	56
4D4 LC CDR3							100	78	78	56
4G6 LC CDR3 20031028340								100	100	67
4G6 LC CDR3 20031071526									100	67
NGF 4G6 LC CDR3 20031028344										100

图 11

mAb 4G6、7H2、14D10、14D11、4G6、4D4 的轻链可变区的 比对

	CDR 1					CDR 2		Section 1
	(1)	10	20	30	40	50	67	
4D4 VK	(1)	AIQLTQSPSSLSASVGD	RVTLT	CRASQGS	SS-ALL	WYQKPF	GKAPKLLI	YDASSLE
NGF 4G6 kappa 20031071526 rc V region	(1)	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATL	SCRA	SQSVSSYL	AYQKPF	GQAPRL	LIYSA
NGF 4G6 LC 20031028344 rv region	(1)	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATL	SCRA	SQSVSSYL	AYQKPF	GQAPRL	LIYSA
NGF 4G6 LC 20031028340 rv region	(1)	DIQMTQSPSSLSASVGD	RVTLT	CRASQGS	SS-WLA	WYQKPF	ENAPKSLI	YDASSL
NGF 4G6 LC 20031028351 rv region	(1)	EIVLTQSPATL	SLSPGERATL	SCRA	SQSVSS	YLA	WYQKPF	GQAPRL
NGF LC 4G6 GR5' pCR4 20031000528 V region#2	(1)	EIVLTQSPATL	SLSPGERATL	SCRA	SQSVSS	YLA	WYQKPF	GQAPRL
NGF 14D10 LC 20031028386 rc v region	(1)	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATL	SCRA	SQSVSS	GLA	WYQKPF	GQAPRL
NGF 14D11 lc 20031028405 rc v region	(1)	DIQMTQSPSSLSASVGD	RVTLT	CRASQGS	SS-WLA	WYQKPF	GKAPKLLI	YDASSL
NGF 6H9 Hu kappa V region no sp 2002120980	(1)	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATL	SCRA	SQSVSSYL	AYQKPF	GQAPRL	LIYSA
NGF 7H2 Hu kappa 2002120984 V region no sp	(1)	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATL	SCRA	SQSVSSYL	AYQKPF	GQAPRL	LIYSA
								Section 2
	(68)	68	80	CDR 3		108		
4D4 VK	(67)	SGTDFTLT	ISLQPEDF	ATYYC	QQFN	SYELT	PGG	TKVEIK
NGF 4G6 kappa 20031071526 rc V region	(68)	SGTDFTLT	ISLQPEDF	AVYYC	QQYN	SYELT	PGG	TKVEIK
NGF 4G6 LC 20031028344 rv region	(68)	SGTDFTLT	ISRLQPEDF	AVYYC	QQYGS	SPYT	PGG	TKLEIK
NGF 4G6 LC 20031028340 rv region	(67)	SGTDFTLT	ISLQPEDF	ATYYC	QQYN	SYELT	PGG	TKVEIK
NGF 4G6 LC 20031028351 rv region	(67)	SGTDFTLT	ISLQPEDF	AVYYC	QQRS	NWHT	PGG	TKVEIK
NGF LC 4G6 GR5' pCR4 20031000528 V region#2	(67)	SGTDFTLT	ISLQPEDF	AVYYC	QQRS	NWHT	PGG	TKVEIK
NGF 14D10 LC 20031028386 rc v region	(68)	SGTDFTLT	ISRLQPEDF	AVYYC	QQYGS	SPYT	PGG	TKLEIK
NGF 14D11 lc 20031028405 rc v region	(67)	SGTDFTLT	ISLQPEDF	ATYYC	QQAN	SFPYT	PGG	TKVEIK
NGF 6H9 Hu kappa V region no sp 2002120980	(68)	SGTDFTLT	ISRLQPEDF	AVYYC	QQYGS	SPYT	PGG	TKLEIK
NGF 7H2 Hu kappa 2002120984 V region no sp	(68)	SGTDFTLT	ISRLQPEDF	AVYYC	QQYGS	SPYT	PGG	TKLEIK

图 12

mAb 4D4、4G6、14D10、14D11、7H2、6H9 的重链可变区的
比对

	(1)	10	20	CDR1	40	50	CDR2	on1
4D4 VH	(1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTD	SYSMHWVRQAPGKLEWV	YISRSSTIF	YADSVK		86
NGF 14D10 HC 20031071581 v region	(1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTD	SYSMHWVRQAPGKLEWV	YISRSSTIF	YADSVK		86
NGF 6H9 HC Hu-Rat 2002120864 final V region	(1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTD	SYSMHWVRQAPGKLEWV	YISRSSTIF	YADSVK		86
NGF 7H2 Hu-Rat IgG2b.b 2002118141 final V region	(1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTD	SYSMHWVRQAPGKLEWV	YISRSSTIF	YADSVK		86
NGF 14D11 HC rat 20031028394rc V region	(1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTD	SYSMHWVRQAPGKLEWV	YISRSSTIF	YADSVK		86
NGF 4G6 HC pCR4TOPO 20031028328rc V region	(1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTD	SYSMHWVRQAPGKLEWV	YISRSSTIF	YADSVK		86
Section 2								
	(67)	67	80	90	100	CDR3	110	127
4D4 VH	(67)	RFTISRDNAKNSLYLQMS	LAEDTAL	YYCAR	--	VYSSGWHVSDYFD	YWGQILVT	VS
NGF 14D10 HC 20031071581 v region	(67)	RFTISRDNAKNSLYLQMS	LAEDTAL	YYCAR	--	VYSSGWHVSDYFD	YWGQILVT	VS
NGF 6H9 HC Hu-Rat 2002120864 final V region	(67)	RFTISRDNAKNSLYLQMS	LAEDTAL	YYCAR	--	VYSSGWHVSDYFD	YWGQILVT	VS
NGF 7H2 Hu-Rat IgG2b.b 2002118141 final V region	(67)	RFTISRDNAKNSLYLQMS	LAEDTAL	YYCAR	--	VYSSGWHVSDYFD	YWGQILVT	VS
NGF 14D11 HC rat 20031028394rc V region	(67)	RFTISRDNAKNSLYLQMS	LAEDTAL	YYCAR	--	VYSSGWHVSDYFD	YWGQILVT	VS
NGF 4G6 HC pCR4TOPO 20031028328rc V region	(67)	RFTISRDNAKNSLYLQMS	LAEDTAL	YYCAR	--	VYSSGWHVSDYFD	YWGQILVT	VS

专利名称(译)	作为选择性NGF途径抑制剂的人抗NGF中和抗体		
公开(公告)号	CN1849138A	公开(公告)日	2006-10-18
申请号	CN200480026242.2	申请日	2004-07-15
[标]申请(专利权)人(译)	安姆根有限公司 米德列斯公司		
申请(专利权)人(译)	安姆根有限公司 米德列斯公司		
当前申请(专利权)人(译)	安姆根有限公司 米德列斯公司		
[标]发明人	KD小维尔德 JJS特里诺尔 H黄 H伊诺埃 TJ张 F马丁		
发明人	K·D·小维尔德 J·J·S·特里诺尔 H·黄 H·伊诺埃 T·J·张 F·马丁		
IPC分类号	A61K39/395 A61P25/00 A61P35/00 C07K16/22 C12N5/10 C12N15/68 G01N33/53		
CPC分类号	A61P1/00 A61P1/02 A61P1/04 A61P1/14 A61P1/18 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/04 A61P11/06 A61P11/08 A61P13/00 A61P13/02 A61P13/10 A61P15/00 A61P15/08 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/04 A61P17/06 A61P17/16 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/04 A61P25/06 A61P25/32 A61P27/02 A61P27/16 A61P29/00 C07K16/22 C07K2317/21 C07K2317/56 A61K2039/505 C07K2317/14 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/51 C07K2317/565 C07K2317/567 C07K2317/76 C07K2317/92 G01N33/74 G01N2333/48 G01N2800/2842		
代理人(译)	王景朝		
优先权	60/487431 2003-07-15 US		
其他公开文献	CN1849138B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了与人神经生长因子(NGF)相互作用或结合并因此中和NGF功能的抗体。本发明还提供了所述抗体的药物组合物，及通过给予药物有效量的抗NGF抗体来中和NGF的功能、特别是治疗NGF相关病症(例如慢性疼痛)的方法。本发明也提供了用抗NGF抗体检测样品中NGF的量的方法。

