



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102762228 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 31

(21) 申请号 201080055899. 7	(51) Int. Cl.
(22) 申请日 2010. 10. 08	<i>A61K 39/395</i> (2006. 01)
(30) 优先权数据	<i>C07K 16/22</i> (2006. 01)
12/576, 522 2009. 10. 09 US	<i>G01N 33/53</i> (2006. 01)
(85) PCT申请进入国家阶段日	<i>C12N 15/68</i> (2006. 01)
2012. 06. 08	<i>C12N 5/10</i> (2006. 01)
(86) PCT申请的申请数据	<i>A61P 25/00</i> (2006. 01)
PCT/US2010/051960 2010. 10. 08	<i>A61P 35/00</i> (2006. 01)
(87) PCT申请的公布数据	<i>A61P 19/02</i> (2006. 01)
W02011/049758 EN 2011. 04. 28	<i>A61P 29/02</i> (2006. 01)
(71) 申请人 安姆根有限公司	
地址 美国加利福尼亚州	
申请人 米德列斯公司	
(72) 发明人 K. D. 维尔德 J. J. S. 特里诺尔	
H. 黄 H. 伊诺 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	
72001	
代理人 孔青 李进	

权利要求书 2 页 说明书 54 页 附图 13 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

本发明提供与人神经生长因子 (NGF) 相互作用或与之结合,从而中和 NGF 的功能的抗体。本发明还提供所述抗体的药物组合物和用于中和 NGF 功能的方法,特别是通过给予药学上有效量的抗 NGF 抗体来治疗 NGF 相关病症(例如慢性疼痛)的方法。还提供使用抗 NGF 抗体检测样品中的 NGF 的量的方法。

1. 一种治疗由神经生长因子 (NGF) 的表达增加或对 NGF 的敏感性增强引起的病况的方法,所述方法包括口服 ;通过经静脉内、腹膜内、脑内 (实质内)、脑室内、肌内、眼内、动脉内、门静脉内、损害内或皮下途径注射 ;通过缓释系统或通过植入装置给予患者药理学上有效量的 NGF 抗体。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述注射为皮下注射。

3. 权利要求 2 的方法,其中所述 NGF 抗体的药理学上有效量为约 3 mg/ 皮下注射 - 约 30 mg/ 皮下注射。

4. 权利要求 2 的方法,其中所述皮下注射包括多次皮下注射。

5. 权利要求 1 的方法,其中所述病况为急性疼痛、牙痛、创伤疼痛、手术疼痛、由截肢术或脓肿引起的疼痛、灼痛、脱髓鞘病、三叉神经痛、癌症、慢性酒精中毒、中风、丘脑性疼痛综合征、糖尿病、获得性免疫缺陷综合征 (“AIDS”)、毒素、化学治疗、普通头痛、偏头痛、丛集性头痛、混合型血管综合征或非血管综合征、紧张性头痛、普通炎症、关节炎、风湿性疾病、狼疮、骨关节炎、纤维肌痛、炎症性肠病症、肠易激综合征、炎症性眼病、炎症性或不稳定性膀胱病、银屑病、具有炎性组分的皮肤疾病、晒伤、心脏炎、皮炎、肌炎、神经炎、胶原血管病、慢性炎性病况、炎症性疼痛和相关痛觉过敏和异常性疼痛、神经性疼痛和相关痛觉过敏或异常性疼痛、糖尿病神经病变性疼痛、交感神经维持性疼痛、传入神经阻滞综合征、哮喘、上皮组织损伤或功能障碍、单纯疱疹、呼吸区、泌尿生殖区、胃肠区或血管区内脏运动失调、创伤、烧伤、变应性皮肤反应、瘙痒、白癜风、普通胃肠病症、结肠炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、血管运动性鼻炎或变应性鼻炎或支气管病症、痛经、消化不良、胃食管反流、胰腺炎或内脏痛。

6. 权利要求 5 的方法,其中所述骨关节炎为骨关节炎膝痛。

7. 权利要求 6 的方法,其中所述注射为皮下注射。

8. 权利要求 7 的方法,其中所述 NGF 抗体的药理学上有效量为约 3 mg/ 皮下注射 - 约 30 mg/ 皮下注射。

9. 权利要求 1 的方法,所述方法包括给予包含药理学上可接受的载体和分离抗体的药物组合物,其中所述抗体包含含有 SEQ ID NO. 44 的轻链和含有 SEQ ID. NO. 40 的重链。

10. 权利要求 9 的方法,其中所述抗体的重链和轻链通过柔性接头连接形成单链抗体。

11. 权利要求 1 的方法,其中所述 NGF 抗体是 Fab' 抗体。

12. 权利要求 1 的方法,其中所述 NGF 抗体是 (Fab')₂ 抗体。

13. 权利要求 1 的方法,其中所述 NGF 抗体是完全人 NGF 抗体。

14. 权利要求 1 的方法,其中所述 NGF 抗体是人源化 NGF 抗体。

15. 权利要求 1 的方法,其中所述 NGF 抗体抑制 NGF 信号转导。

16. 权利要求 1 的方法,其中所述 NGF 抗体包含含有 SEQ ID NO: 44 的轻链和含有 SEQ ID NO: 40 的重链,且抗体的重链和轻链通过柔性接头连接形成单链抗体。

17. 权利要求 16 的方法,其中所述 NGF 抗体是单链 Fv 抗体。

18. 权利要求 16 的方法,其中所述 NGF 抗体是 Fab' 抗体。

19. 权利要求 16 的方法,其中所述 NGF 抗体是 (Fab')₂ 抗体。

20. 权利要求 16 的方法,其中所述 NGF 抗体是完全人 NGF 抗体。

21. 权利要求 16 的方法,其中所述 NGF 抗体是人源化 NGF 抗体。

22. 权利要求 16 的方法,其中所述 NGF 抗体抑制 NGF 信号转导。
23. 权利要求 16 的方法,其中所述 NGF 抗体以约 1×10^{-9} 或更低的 K_D 从人 NGF 多肽上解离,且在标准体外测定中以约 1×10^{-8} 或更低的 IC_{50} 中和人 NGF 生物活性。
24. 权利要求 16 的方法,其中所述 NGF 抗体以约 1×10^{-10} 或更低的 K_D 从人 NGF 多肽上解离,且在标准体外测定中以约 1×10^{-9} 或更低的 IC_{50} 中和人 NGF 生物活性。
25. 权利要求 16 的方法,其中所述 NGF 抗体以约 1×10^{-11} 或更低的 K_D 从人 NGF 多肽上解离,且在标准体外测定中以约 0.2×10^{-9} 或更低的 IC_{50} 中和人 NGF 生物活性。

作为选择性 NGF 途径抑制剂的人抗 NGF 中和抗体

[0001] 本申请要求 2009 年 10 月 9 日提交的美国专利申请序列号 (U. S. S. N.) 12/576, 522 的优先权, 并且要求 2003 年 7 月 15 日提交的美国临时申请序列号 60/487, 431 的优先权的权益, 12/576, 522 是 2008 年 11 月 25 日提交的美国专利申请序列号 (U. S. S. N.) 12/277, 919 的部分继续申请, 12/277, 919 是 2004 年 7 月 15 日提交的美国专利申请序列号 (U. S. S. N.) 10/891, 658 的继续申请。本申请还涉及 2007 年 6 月 22 日提交的美国专利申请序列号 11/767, 326, 其是 U. S. S. N. 10/891, 658 的分案申请。所有这些申请的公开内容均通过引用结合到本文中。

[0002] 序列列表仅以电子格式随本申请一起提交, 并通过引用结合到本文中。序列列表文本文件“02-1240-F-CIP.SeqList.txt”于 2008 年 11 月 25 日创立, 大小为 79, 116 字节。

发明领域

[0003] 本发明涉及结合神经生长因子 (NGF) 的人单克隆抗体。本文还描述了用于治疗疼痛和疼痛相关病症的组合物和方法。

[0004] 发明背景

[0005] 每天, 美国有超过 200 万人因慢性疼痛而丧失能力 (Jessell 和 Kelly, 1991, “Pain and Analgesia”载于 PRINCIPLES OF NEURAL SCIENCE, 第 3 版 (Kandel, Schwartz 和 Jessell 主编), Elsevier, New York)。遗憾的是, 疼痛的现行治疗仅部分有效, 而且许多这类治疗本身引起衰弱性或危险的副作用。例如, 尽管非甾体抗炎药 (“NSAID”) 例如阿司匹林、布洛芬和吲哚美辛针对炎症性疼痛适度有效, 但是它们也是肾毒素, 而且高剂量趋于引起胃肠刺激、溃疡、出血和精神错乱。用阿片样物质治疗的患者也常常经历精神错乱, 长期使用阿片样物质与耐受性和依赖有关。局部麻醉剂例如利多卡因和美西律同时抑制疼痛和引起失去正常感觉。

[0006] 疼痛是在基于从环境接收并通过神经系统传送和解读的信号的知觉 (有关综述参见 Millan, 1999, Prog. Neurobiol. 57 :1-164)。伤害性刺激例如热和触碰引起皮肤中的特化感受器将信号发送至中枢神经系统 (“CNS”)。这个过程称为伤害感受, 介导伤害感受的外周感觉神经元是伤害性感受器。根据来自伤害性感受器的信号强度及通过 CNS 对信号提取和加工, 人便可将或不将伤害性刺激感受为疼痛。当一个人的疼痛知觉恰当对准于刺激强度时, 疼痛便起其预期的保护功能。然而, 某些组织损害类型引起称为痛觉过敏或促伤害感受 (pronociception) 的现象, 其中相对无害的刺激被感知为极度疼痛, 因为人的疼痛阈值被降低。炎症和神经损伤两者均可诱导痛觉过敏。受累于例如晒伤、骨关节炎、结肠炎、心脏炎、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) 等炎性病况的人, 常常感受到疼痛感增强。类似地, 创伤、手术、截肢术、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、丘脑性疼痛综合征、糖尿病、疱疹感染、获得性免疫缺陷综合征 (“AIDS”)、毒素和化学治疗引起导致过度疼痛的神经损伤。

[0007] 由于已较好地理解在正常和痛觉过敏的情况下伤害性感受器赖以转导外部信号的机制, 因此可靶向涉及痛觉过敏的过程以抑制疼痛阈值的降低, 并因此降低所感受到的

疼痛程度。

[0008] 已经表明神经营养因子在生理性疼痛和病理性疼痛的传递中起重要作用。神经生长因子 (NGF) 似乎特别重要 (有关综述参见 McMahon, 1996, Phil. Trans. R. Soc. Lond. 351 : 431-40 ;以及 Apfel, 2000, The Clinical Journal of Pain 16 :S7-S11)。已经表明局部和全身给予 NGF 两者诱发痛觉过敏和异常性疼痛 (Lewin 等, 1994, Eur. J. Neurosci. 6 : 1903-1912)。在人中静脉内输注 NGF 产生全身肌痛, 而局部给药除全身效应外, 还引起注射部位痛觉过敏和异常性疼痛 (Apfel 等, 1998, Neurology 51 :695-702)。在其中疼痛是突出特征的病况中, 还有相当多的涉及内源性 NGF 的证据。例如, 在外周神经损伤后至少 2 个月, NGF 在背根神经节 (DRG) 神经鞘细胞中增量调节, 而且据报道, 在患有各种关节炎的动物模型的关节中 NGF 水平升高 (例如 Aloe 等, 1993, Growth Factors 9 :149-155)。在人中, NGF 水平在患有类风湿关节炎或其它类型的关节炎的患者滑液中升高 (例如 Aloe 等, 1992, Arthritis and Rheumatism 35 :351-355)。此外, 已经证实 NGF 功能的拮抗作用在神经性疼痛和慢性炎症性疼痛模型中防止痛觉过敏和异常性疼痛。例如, 在神经性疼痛动物模型 (例如神经干或脊神经结扎) 中, 全身性注射抗 NGF 中和抗体既防止异常性疼痛又防止痛觉过敏 (Ramer 等, 1999, Eur. J. Neurosci. 11 :837-846 ;以及 Ro 等, 1999, Pain 79 :265-274)。本领域已知的抗 NGF 抗体的实例包括例如 PCT 公开号 WO 01/78698、WO 01/64247、WO 02/096458 和 WO 2004/032870 ;美国专利号 5, 844, 092、5, 877, 016 和 6, 153, 189 ;Hongo 等, 2000, Hybridoma 19 :215-227 ;Hongo 等, 1993, Cell. Mol. Biol. 13 :559-568 ;以及 GenBank 检索号 U39608、U39609、L17078 或 L17077。

[0009] 显然, 存在对特别是通过靶向疼痛的小分子介体或恶化因子 (exacerbator) (例如 NGF) 而用于疼痛的新的安全和有效治疗的需要。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明提供在治疗上可用于控制疼痛的新的人单克隆抗体。准确地讲, 本发明提供与神经生长因子 (NGF) 结合的单克隆抗体。优选单克隆抗体是人单克隆抗体, 中和 NGF 的生物活性, 并可用于改善 NGF 介导的疼痛反应的作用。本发明还提供产生本发明的单克隆抗体、最优选将所述抗体分泌至细胞培养基中的细胞。除其治疗和控制疼痛的应用以外, 本发明的抗体还可用于治疗神经性和炎症性疼痛相关反应。

[0012] 本发明还提供包含抗体 Fc 区的序列和一个或多个以下序列的融合蛋白, 所述序列鉴定为 :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。这类分子可采用例如描述于国际专利申请公开号 WO 00/24782 中的方法制备, 该申请通过引用予以结合。这类分子可在例如哺乳动物细胞 (例如中国仓鼠卵巢细胞) 或细菌细胞 (例如大肠杆菌细胞) 中表达。

[0013] 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, 其中重链包含如 SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :6 所示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, 重链可变区包含如 SEQ ID NO :10 所示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。优选重链包含如 SEQ ID NO :4 所示氨基酸序列。

[0014] 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

恒定区的重链恒定区或其任何等位基因变体（如 Kabat 等,1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, 美国卫生与公众服务部 (U. S. Department of Health and Human Services), NIH 出版号 91-3242 中所论述, 其通过引用包括在本文中), 而重链可变区包含如 SEQ ID NO :10 所示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。优选本发明的抗体包含如 SEQ ID NO :4 所示的 IgG2 重链恒定区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。

[0015] 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, 其中轻链包含如 SEQ ID NO :8 所示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, 轻链可变区包含如 SEQ ID NO :12 所示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。

[0016] 在某些方面, 本发明的抗体包含重链和轻链, 其中重链可变区包含如 SEQ ID NO :10 所示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。在其它方面, 轻链可变区包含如 SEQ ID NO :12 所示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, 重链包含如 SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :18 或 SEQ ID NO :20 中任一个所示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。在又一些方面, 轻链包含如 SEQ ID NO :16、20、24 中任一个所示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。

[0017] 本发明还提供与 NGF 特异性结合的抗体, 其中重链包含可变区, 所述可变区包含如 SEQ ID NO :10 所示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, 轻链包含可变区, 所述可变区包含如 SEQ ID NO :12 所示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。

[0018] 本发明还提供与 NGF 特异性结合的分离人抗体, 其中所述抗体包含:

[0019] (a) 重链和轻链, 所述重链具有包含如 SEQ ID NO :79 所示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可变区, 所述轻链具有包含如 SEQ ID NO :80 所示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可变区;

[0020] (b) 重链和轻链, 所述重链具有包含如 SEQ ID NO :81 所示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可变区, 所述轻链具有包含如 SEQ ID NO :82 所示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可变区;

[0021] (c) 重链和轻链, 所述重链具有包含如 SEQ ID NO :83 所示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可变区, 所述轻链具有包含如 SEQ ID NO :84 所示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可变区; 或

[0022] (d) 重链和轻链, 所述重链具有包含如 SEQ ID NO :86 所示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可变区, 所述轻链具有包含如 SEQ ID NO :87 所示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可变区。

[0023] 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, 其中重链可变区包含与如 SEQ ID NO :10 所示氨基酸序列有以下同一性的序列: 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%; 其中轻链包含轻链可变区, 其中轻链可变区包含与如 SEQ ID NO :12 所示氨基酸序列有以下同一性的序列: 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%，其中所述抗体与 NGF 特异性结合。

[0024] 本发明还提供与 NGF 特异性结合的抗体，其中重链包含如 SEQ ID NO:14 所示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，轻链包含如 SEQ ID NO:16 所示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。

[0025] 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，其中重链可变区包含与如 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO:22 中任一个所示的氨基酸序列有以下同一性的序列：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%；其中轻链包含轻链可变区，其中轻链可变区包含与如 SEQ ID NO:16 所示氨基酸序列有以下同一性的氨基酸序列：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%，其中抗体与 NGF 特异性结合。

[0026] 本发明还提供单链抗体、单链 Fv 抗体、F(ab) 抗体、F(ab)' 抗体和 (Fab')₂ 抗体。

[0027] 在具体方面，本发明提供包含如 SEQ ID NO:16 所示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。

[0028] 另外，本发明提供包含如 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO:22 中任一个所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。

[0029] 本发明还涉及与 NGF 特异性结合的分人抗体，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；和 (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 区可以是如 SEQ ID NO:22 所示命名为 4D4 的单克隆抗体 (mAb) 的重链 CDR1 区，人轻链 CDR1 区可以是如 SEQ ID NO:24 所示的 mAb 4D4 的轻链 CDR1 区。在其它方面，人重链 CDR2 区可以是如 SEQ ID NO:18 所示的 mAb 4D4 的重链 CDR2 区，人轻链 CDR2 区可以是如 SEQ ID NO:20 所示的 mAb 4D4 的轻链 CDR2 区。在另外的其它方面，人重链 CDR3 区是如 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。

[0030] 本发明还提供与神经生长因子特异性结合的包含重链和轻链的分人抗体，其中重链包含重链可变区，重链可变区包含如 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 所示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。

[0031] 本发明还提供与 NGF 特异性结合的包含重链和轻链的分人抗体，其中轻链包含轻链可变区，轻链可变区包含如 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 所示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。

[0032] 本发明的抗体的特征在于拮抗与 NGF 多肽相关的至少一种体外和 / 或体内活性的能力。优选本发明提供以高亲和力与 NGF 多肽结合的分人 NGF 人抗体，其中抗体与人 NGF 多肽结合并以约 $50 \times 10^{-12} \text{M}$ 或更低的解离常数 (K_D) 从人 NGF 多肽上解离 (如用 KinExA 所测定)，或其在体外中和测定中以约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低的 IC_{50} 抑制 NGF 诱导的存活。

[0033] 在一个优选的实施方案中，本发明提供具有下列特征的分人 NGF 人抗体：

[0034] a) 在体外中和测定中以约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 IC_{50} 抑制 NGF 诱导的存活；

[0035] b) 具有包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的重链 CDR3；和

[0036] c) 具有包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的轻链 CDR3。

[0037] 本发明还提供以高亲和力与 NGF 特异性结合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以约 1×10^{-9} 或更低的 K_D 从人 NGF 多肽解离,且在标准体外测定中以约 $1 \times 10^{-8} M$ 或更低的 IC_{50} 中和人 NGF 生物活性,且其中所述抗体或片段包含重链可变区,重链可变区包含:

[0038] a) CDR1 区, CDR1 区包含下式氨基酸序列:

[0039] $a^1 a^2 a^3 a^4 a^5$

[0040] 其中:

[0041] a^1 为极性亲水氨基酸残基; a^2 为芳族氨基酸残基; a^3 为脂族、极性疏水性、芳族氨基酸残基; a^4 为中性疏水或脂族氨基酸残基; a^5 为脂族或极性亲水氨基酸残基;

[0042] b) CDR2 区, CDR2 区包含下式氨基酸序列:

[0043] $b^1 b^2 b^3 b^4 b^5 b^6 b^7 b^8 b^9 b^{10} b^{11} b^{12} b^{13} b^{14} b^{15} b^{16} b^{17}$

[0044] 其中:

[0045] b^1 为脂族、极性疏水或芳族氨基酸残基; b^2 为脂族疏水氨基酸残基; b^3 为极性亲水或芳族氨基酸残基; b^4 为极性亲水、疏水或芳族氨基酸残基; b^5 - b^9 独立地为极性亲水或脂族氨基酸残基; b^{10} 为极性亲水、芳族或脂族氨基酸残基; b^{11} 为芳族或疏水氨基酸残基; b^{12} 为脂族疏水或极性亲水氨基酸残基; b^{13} 为脂族、疏水或极性亲水氨基酸残基; b^{14} 和 b^{16} 独立地为极性亲水氨基酸残基; b^{15} 为脂族或芳族疏水氨基酸残基; b^{17} 为脂族酸性氨基酸残基; 和

[0046] c) CDR3 区, CDR3 区包含下式氨基酸序列:

[0047] $c^1 c^2 c^3 c^4 c^5 c^6 c^7 c^8 c^9 c^{10} c^{11} c^{12} c^{13} c^{14} c^{15} c^{16} c^{17}$

[0048] 其中:

[0049] c^1 不存在或为脂族氨基酸残基; c^2 不存在或为极性亲水或芳族疏水氨基酸残基; c^3 和 c^4 独立地为不存在的或极性亲水、芳族疏水或脂族氨基酸残基; c^5 不存在或为极性亲水、脂族或芳族氨基酸残基; c^6 不存在或为极性亲水或脂族氨基酸残基; c^7 为极性亲水或脂族氨基酸残基; c^8 为极性亲水、疏水或芳族氨基酸残基; c^9 为极性亲水、脂族或芳族疏水氨基酸残基; c^{10} 为极性亲水、芳族疏水或脂族疏水氨基酸残基; c^{11} - c^{13} 独立地为极性亲水或芳族疏水氨基酸残基; c^{14} 为脂族或芳族疏水氨基酸残基; c^{15} 为极性亲水或中性疏水氨基酸残基; c^{16} 不存在或为极性亲水氨基酸残基; c^{17} 为芳族疏水或脂族疏水氨基酸残基。

[0050] 在一个方面, a^1 为极性亲水氨基酸残基; a^2 为芳族疏水氨基酸残基; a^3 为脂族疏水氨基酸残基; a^4 为中性疏水的; a^5 为极性亲水氨基酸残基; b^1 为脂族或芳族氨基酸残基; b^2 为 Ile; b^3 为极性亲水氨基酸残基; b^4 为极性亲水或芳族氨基酸残基; b^5 - b^9 独立地为极性亲水或脂族氨基酸残基; b^{10} 为脂族氨基酸残基; b^{11} 为 Tyr; b^{12} 为脂族疏水氨基酸残基; b^{13} 为脂族或极性亲水氨基酸残基; b^{14} 和 b^{16} 独立地为极性亲水氨基酸残基; b^{15} 为脂族疏水氨基酸残基; b^{17} 为脂族酸性氨基酸残基; c^1 不存在或为脂族氨基酸残基; c^2 不存在或为极性亲水或芳族疏水氨基酸残基; c^3 和 c^4 独立地为不存在的或极性亲水、芳族疏水或脂族氨基酸残基; c^5 不存在或为极性亲水氨基酸残基; c^6 不存在或为极性亲水或脂族氨基酸残基; c^7 为极性亲水或脂族氨基酸残基; c^8 为极性亲水、疏水或芳族氨基酸残基; c^9 为极性亲水、脂族或芳族疏水氨基酸残基; c^{10} 为极性亲水、芳族疏水或脂族疏水氨基酸残基; c^{11} - c^{13} 独立地

为极性亲水或芳族疏水氨基酸残基 ;c¹⁴ 为脂族或芳族疏水氨基酸残基 ;c¹⁵ 为极性亲水或中性疏水氨基酸残基 ;c¹⁶ 不存在或为极性亲水氨基酸残基 ;c¹⁷ 为芳族疏水或脂族疏水氨基酸残基。

[0051] 在一个具体方面, a¹ 为 Ser、Asp 或 Thr ;a² 为 Tyr ;a³ 为 Ala、Ser、Trp 或 Gly ;a⁴ 为 Met 或 Ile ;a⁵ 为 His、Gly 或 Asn ;b¹ 为 Tyr、Gly、Ile 或 Asp ;b² 为 Ile ;b³ 为 Ser、Thr、Tyr 或 Asn ;b⁴ 为 Trp、Arg 或 Pro ;b⁵ 为 Ser、Asn 或 Gly ;b⁶ 为 Ser、Arg、Asp 或 Gly ;b⁷ 为 Ser、His 或 Gly ;b⁸ 为 Ser、Ile、Asp 或 Thr ;b⁹ 为 Leu、Ile 或 Thr ;b¹⁰ 为 Gly、Lys 或 Phe ;b¹¹ 为 Tyr ;b¹² 为 Ala 或 Ser ;b¹³ 为 Asp、Gly 或 Pro ;b¹⁴ 为 Ser ;b¹⁵ 为 Val 或 Phe ;b¹⁶ 为 Lys 或 Gln ;b¹⁷ 为 Gly ;c¹ 不存在或为脂族氨基酸残基 ;c² 不存在或为 Tyr ;c³ 和 c⁴ 独立地为不存在的、Tyr、Asn、Val 或 Glu ;c⁵ 为不存在的、Ser、Gly 或 Trp ;c⁶ 为不存在的、Ser、Gly、Glu 或 Leu ;c⁷ 为 Gly、Arg 或 Asp ;c⁸ 为 Trp、Pro、Ser 或 Thr ;c⁹ 为 His、Gly 或 Tyr ;c¹⁰ 为 Val、Tyr 或 Arg ;c¹¹-c¹³ 独立地为 Ser、Phe、Tyr、Asp 或 Asn ;c¹⁴ 为 Phe、Val 或 Gly ;c¹⁵ 为 Met 或 Asp ;c¹⁶ 为不存在的、Asp 或 Asn ;c¹⁷ 为 Tyr 或 Val。

[0052] 在另一个具体方面, a¹ 为 Ser 或 Asp ;a² 为 Tyr ;a³ 为 Ala 或 Ser ;a⁴ 为 Met 或 Ile ;a⁵ 为 His 或 Asn ;b¹ 为 Tyr 或 Gly ;b² 为 Ile ;b³ 为 Ser、Thr、Tyr 或 Asn ;b⁴ 为 Trp、Arg 或 Pro ;b⁵ 为 Ser 或 Asn ;b⁶ 为 Ser 或 Arg ;b⁷ 为 His 或 Gly ;b⁸ 为 Ile 或 Thr ;b⁹ 为 Leu、Ile 或 Thr ;b¹⁰ 为 Gly 或 Phe ;b¹¹ 为 Tyr ;b¹² 为 Ala 或 Ser ;b¹³ 为 Asp 或 Gly ;b¹⁴ 为 Ser ;b¹⁵ 为 Val 或 Phe ;b¹⁶ 为 Lys 或 Gln ;b¹⁷ 为 Gly ;c¹ 不存在或为 Gly ;c² 不存在或为 Tyr ;c³ 和 c⁴ 独立地为不存在的、Tyr、Gly 或 Val ;c⁵ 不存在或为 Ser ;c⁶ 为 Ser 或 Gly ;c⁷ 为 Gly 或 Arg ;c⁸ 为 Trp 或 Pro ;c⁹ 为 His、Gly 或 Tyr ;c¹⁰ 为 Val 或 Tyr ;c¹¹-c¹³ 独立地为 Ser、Tyr、Phe 或 Asp ;c¹⁴ 为 Phe 或 Val ;c¹⁵ 为 Met 或 Asp ;c¹⁶ 不存在或为 Asp ;c¹⁷ 为 Tyr 或 Val。

[0053] 在其它的具体方面 :

[0054] a) 重链 CDR1 具有如 SEQ ID NO :22 所示氨基酸序列, 重链 CDR2 具有如 SEQ ID NO :18 所示氨基酸序列, 重链 CDR3 具有如 SEQ ID NO :14 所示氨基酸序列 ;

[0055] b) 重链 CDR1 具有如 SEQ ID NO :92 所示氨基酸序列, 重链 CDR2 具有如 SEQ ID NO :93 所示氨基酸序列, 重链 CDR3 具有如 SEQ ID NO :94 所示氨基酸序列 ;

[0056] c) 重链 CDR1 具有如 SEQ ID NO :98 所示氨基酸序列, 重链 CDR2 具有如 SEQ ID NO :99 所示氨基酸序列, 重链 CDR3 具有如 SEQ ID NO :100 所示氨基酸序列 ;

[0057] d) 重链 CDR1 具有如 SEQ ID NO :104 所示氨基酸序列, 重链 CDR2 具有如 SEQ ID NO :105 所示氨基酸序列, 重链 CDR3 具有如 SEQ ID NO :106 所示氨基酸序列 ;

[0058] e) 重链 CDR1 具有如 SEQ ID NO :110 所示氨基酸序列, 重链 CDR2 具有如 SEQ ID NO :111 所示氨基酸序列, 重链 CDR3 具有如 SEQ ID NO :112 所示氨基酸序列 ;和

[0059] f) 重链 CDR1 具有如 SEQ ID NO :116 所示氨基酸序列, 重链 CDR2 具有如 SEQ ID NO :117 所示氨基酸序列, 重链 CDR3 具有如 SEQ ID NO :118 所示氨基酸序列。

[0060] 本发明还提供与 NGF 特异性结合的分人抗体或其抗原结合片段或免疫功能免疫球蛋白片段, 其中所述抗体或片段包含轻链可变区, 轻链可变区包含 :

[0061] a) CDR1 区, CDR1 区包含下式氨基酸序列 :

[0062] a¹a²a³a⁴a⁵a⁶a⁷a⁸a⁹a¹⁰a¹¹a¹²

[0063] 其中 :

[0064] a¹ 为极性亲水氨基酸残基 ;a²、a¹¹ 和 a¹² 独立地为脂族或疏水氨基酸残基 ;a³、a⁵、a⁷ 和 a⁸ 独立地为脂族、极性亲水或疏水氨基酸残基 ;a⁴ 为极性亲水氨基酸残基 ;a⁶ 为脂族或疏水氨基酸残基 ;a⁹ 不存在或为脂族或极性亲水氨基酸残基 ;a¹⁰ 为脂族、芳族或疏水氨基酸残基 ;

[0065] b) CDR2 区, CDR2 区包含下式氨基酸序列 :

[0066] b¹b²b³b⁴b⁵b⁶b⁷

[0067] 其中 :

[0068] b¹ 为脂族、极性疏水或疏水氨基酸残基 ;b² 为脂族或疏水氨基酸残基 ;b³ 和 b⁴ 独立地为极性亲水、脂族或疏水氨基酸残基 ;b⁵ 为极性亲水或脂族疏水氨基酸残基 ;b⁶ 为极性亲水或脂族疏水氨基酸残基 ;b⁷ 为极性亲水氨基酸残基 ;和

[0069] c) CDR3 区, CDR3 区包含下式氨基酸序列 :

[0070] c¹c²c³c⁴c⁵c⁶c⁷c⁸c⁹c¹⁰c¹¹c¹²c¹³c¹⁴c¹⁵c¹⁶c¹⁷

[0071] 其中 :

[0072] c¹ 和 c² 独立地为极性亲水氨基酸残基 ;c³ 为极性亲水、脂族或疏水氨基酸残基 ;c⁴、c⁵ 和 c⁶ 独立地为脂族、极性亲水或疏水氨基酸残基 ;c⁷ 不存在或为极性亲水或脂族疏水氨基酸残基 ;c⁸ 为极性亲水或疏水氨基酸残基 ;c⁹ 为极性亲水氨基酸残基, 且其中所述抗体或片段以约 1x10⁻⁹ 或更低的 K_D 从人 NGF 多肽上解离, 且在标准体外测定中以约 1x10⁻⁸M 或更低的 IC₅₀ 中和人 NGF 生物活性。

[0073] 在一个方面, a¹、a³、a⁴、a⁷ 和 a⁸ 独立地为极性亲水氨基酸残基 ;a²、a⁶、a¹¹ 和 a¹² 独立地为脂族疏水氨基酸残基 ;a⁵ 为极性亲水或脂族氨基酸残基 ;a⁹ 不存在或为脂族或极性亲水氨基酸残基 ;a¹⁰ 为脂族或芳族氨基酸残基 ;b¹ 为脂族、极性疏水或疏水氨基酸残基 ;b² 为脂族疏水氨基酸残基 ;b³、b⁴ 和 b⁷ 独立地为极性亲水氨基酸残基 ;b⁵ 和 b⁶ 独立地为极性亲水或脂族疏水氨基酸残基 ;c¹ 和 c² 独立地为极性亲水氨基酸残基 ;c³ 为极性亲水、脂族或疏水氨基酸残基 ;c⁴、c⁵ 和 c⁶ 独立地为脂族、极性亲水或疏水氨基酸残基 ;c⁷ 不存在或为脂族疏水氨基酸残基 ;c⁸ 为疏水氨基酸残基 ;c⁹ 为极性亲水氨基酸残基。

[0074] 在一个具体方面, a¹、a³、a⁴ 和 a⁷ 分别为 Arg、Ser、Gln 和 Ser ;a² 为 Ala ;a⁵ 为 Gly 或 Ser ;a⁸ 为 Ser 或 Ile ;a⁹ 为不存在的、Ser 或 Gly ;a¹⁰ 为 Ala、Tyr、Trp 或 Phe ;b¹ 为 Asp、Gly、Ala 或 Val ;b² 和 b³ 分别为 Ala 和 Ser ;b⁴ 为 Ser 或 Asn ;b⁵ 为 Leu 或 Arg ;b⁶ 为 Glu、Ala 或 Gln ;b⁷ 为 Ser 或 Thr ;c¹ 和 c² 为 Gln ;c³ 为 Phe、Tyr、Arg 或 Ala ;c⁴ 为 Asn、Gly 或 Ser ;c⁵ 为 Ser 或 Asn ;c⁶ 为 Tyr、Ser、Trp 或 Phe ;c⁷ 为不存在的、Pro 或 His ;c⁸ 为 Leu、Trp、Tyr 或 Arg ;和 c⁹ 为 Thr。

[0075] 在另一个具体方面, a¹、a²、a³、a⁴ 和 a⁷ 分别为 Arg、Ala、Ser、Gln 和 Ser ;a⁵ 为 Gly 或 Ser ;a⁸ 为 Ser 或 Ile ;a⁹ 为不存在的、Ser 或 Gly ;a¹⁰ 为 Ala 或 Tyr ;b¹ 为 Asp 或 Gly ;b² 和 b³ 分别为 Ala 和 Ser ;b⁴ 为 Ser 或 Asn ;b⁵ 为 Leu 或 Arg ;b⁶ 为 Glu、Ala 或 Gln ;b⁷ 为 Ser 或 Thr ;c¹ 和 c² 为 Gln ;c³ 为 Phe、Tyr、Arg 或 Ala ;c⁴ 为 Asn、Gly 或 Ser ;c⁵ 为 Ser 或 Asn ;c⁶ 为 Tyr、Ser、Trp 或 Phe ;c⁷ 为不存在的、Pro 或 His ;c⁸ 为 Leu、Trp、Tyr 或 Arg ;c⁹ 为 Thr。

[0076] 在其它的具体方面 :

[0077] a) 轻链 CDR1 具有如 SEQ ID NO :24 所示氨基酸序列, 轻链 CDR2 具有如 SEQ ID NO : 20 所示氨基酸序列, 轻链 CDR3 具有如 SEQ ID NO :16 所示氨基酸序列 ;

[0078] b) 轻链 CDR1 具有如 SEQ ID NO :95 所示氨基酸序列,轻链 CDR2 具有如 SEQ ID NO :96 所示氨基酸序列,轻链 CDR3 具有如 SEQ ID NO :97 所示氨基酸序列;

[0079] c) 轻链 CDR1 具有如 SEQ ID NO :101 所示氨基酸序列,轻链 CDR2 具有如 SEQ ID NO :102 所示氨基酸序列,轻链 CDR3 具有如 SEQ ID NO :103 所示氨基酸序列;

[0080] d) 轻链 CDR1 具有如 SEQ ID NO :107 所示氨基酸序列,轻链 CDR2 具有如 SEQ ID NO :108 所示氨基酸序列,轻链 CDR3 具有如 SEQ ID NO :109 所示氨基酸序列;

[0081] e) 轻链 CDR1 具有如 SEQ ID NO :113 所示氨基酸序列,轻链 CDR2 具有如 SEQ ID NO :114 所示氨基酸序列,轻链 CDR3 具有如 SEQ ID NO :115 所示氨基酸序列;

[0082] f) 轻链 CDR1 具有如 SEQ ID NO :119 所示氨基酸序列,轻链 CDR2 具有如 SEQ ID NO :120 所示氨基酸序列,轻链 CDR3 具有如 SEQ ID NO :121 所示氨基酸序列;

[0083] g) 轻链 CDR1 具有如 SEQ ID NO :122 所示氨基酸序列,轻链 CDR2 具有如 SEQ ID NO :123 所示氨基酸序列,轻链 CDR3 具有如 SEQ ID NO :124 所示氨基酸序列;

[0084] h) 轻链 CDR1 具有如 SEQ ID NO :125 所示氨基酸序列,轻链 CDR2 具有如 SEQ ID NO :126 所示氨基酸序列,轻链 CDR3 具有如 SEQ ID NO :127 所示氨基酸序列;

[0085] i) 轻链 CDR1 具有如 SEQ ID NO :128 所示氨基酸序列,轻链 CDR2 具有如 SEQ ID NO :129 所示氨基酸序列,轻链 CDR3 具有如 SEQ ID NO :130 所示氨基酸序列 ;和

[0086] j) 轻链 CDR1 具有如 SEQ ID NO :132 所示氨基酸序列,轻链 CDR2 具有如 SEQ ID NO :133 所示氨基酸序列,轻链 CDR3 具有如 SEQ ID NO :134 所示氨基酸序列。

[0087] 本发明的组成部分还有编码新的抗人 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。

[0088] 本发明还提供用于检测生物样品中的 NGF 水平的方法,所述方法包括使样品与本发明的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测定方法中以检测和定量测定 NGF,所述测定方法为例如竞争结合测定法、直接和间接夹心测定法、免疫沉淀测定法和酶联免疫吸附测定法 (ELISA) (参见 Sola,1987, Monoclonal Antibodies :A Manual of Techniques,第 147-158 页, CRC Press, Inc.)。抗体可以适于所采用的测定方法的亲和力结合 NGF。

[0089] 另外,本发明提供用于治疗与 NGF 产生增加或对 NGF 的敏感性增强有关的疾病的方法,所述方法包括将药学上有效量的药物组合物给予有需要的个体的步骤,所述药物组合物包含至少一种本发明的抗体或其抗原结合片段或免疫功能性免疫球蛋白片段。

[0090] 在某些实施方案中,本发明涉及治疗由神经生长因子 (NGF) 的表达增加或对 NGF 的敏感性增强引起的病况的方法,其包括口服 ;经由静脉内、腹膜内、脑内 (实质内)、脑室内、肌内、眼内、动脉内、门静脉内、损害内或皮下途径注射 ;通过缓释系统或通过植入装置将药学上有效量的 NGF 抗体给予患者,其中所述病况为急性疼痛、牙痛、创伤疼痛、手术疼痛、由截肢或脓肿引起的疼痛、灼痛、脱髓鞘病、三叉神经痛、癌症、慢性酒精中毒、中风、丘脑性疼痛综合征、糖尿病、获得性免疫缺陷综合征 (“AIDS”)、毒素、化学治疗、普通头痛、偏头痛、丛集性头痛、混合型血管综合征或非血管综合征、紧张性头痛、普通炎症、关节炎、风湿性疾病、狼疮、骨关节炎、纤维肌痛、炎症性肠病症、肠易激综合征、炎症性眼病、炎症性或不稳定性膀胱病、银屑病、具有炎性组分的皮肤疾病、晒伤、心脏炎、皮炎、肌炎、神经炎、

胶原血管病、慢性炎性病况、炎症性疼痛和相关痛觉过敏和异常性疼痛、神经性疼痛和相关痛觉过敏或异常性疼痛、糖尿病神经病变性疼痛、灼痛、交感神经维持性疼痛、传入神经阻滞综合征、哮喘、上皮组织损伤或功能障碍、单纯疱疹、呼吸区、泌尿生殖区、胃肠区或血管区的内脏运动失调、创伤、烧伤、变应性皮肤反应、瘙痒、白癜风、普通胃肠病症、结肠炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、血管运动性鼻炎或变应性鼻炎或支气管病症、痛经、消化不良、胃食管反流、胰腺炎或内脏痛。

[0091] 在某些实施方案中,方法包括药学上有效量的 NGF 抗体,并可用于治疗或预防骨关节炎膝痛。在某些实施方案中,药学上有效量的 NGF 抗体为约 3mg/ 皮下注射 - 约 30mg/ 皮下注射。在某些实施方案中,给药包括多次皮下注射。在实施方案中,给药包括单次皮下注射。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包括 NGF 的抗体,所述抗体包含含有 SEQ ID NO. 44 的轻链。在某些实施方案中,NGF 抗体包含含有 SEQ ID. NO. 40 的重链。在其它实施方案中,NGF 抗体包含含有 SEQ ID NO. 44 的轻链和含有 SEQ ID. NO. 40 的重链。

[0092] 因此,按照本发明上面的描述,本发明在多个方面涉及包含 NGF 抗体的方法和组合物,所述抗体包含含有 SEQ ID NO :44 的轻链和含有 SEQ ID NO :40 的重链,其中抗体的重链和轻链通过柔性接头连接形成单链抗体。在这个方面的一些实施方案中,NGF 抗体包括单链 Fv 抗体、Fab' 抗体、(Fab')₂ 抗体、完全人抗体和 / 或人源化抗体。在这个方面的一些实施方案中,NGF 抗体抑制 NGF 信号转导。

[0093] 在这个方面的某些实施方案中,NGF 抗体从人 NGF 多肽上解离的 K_D 为约 1x10⁻⁹ 或更低、约 1x10⁻¹⁰ 或更低或约 1x10⁻¹¹ 或更低。在这个方面的某些实施方案中,在标准体外测定中,NGF 抗体中和人 NGF 生物活性的 IC₅₀ 为约 1x10⁻⁸ 或更低、约 1x10⁻⁹ 或更低或约 0. 2x10⁻⁹ 或更低。在某些实施方案中,NGF 抗体以上述 K_D 值从人 NGF 多肽上解离,并且在标准体外测定中以上述 IC₅₀ 值中和人 NGF 生物活性。

[0094] 根据下面对某些优选实施方案和权利要求书的更详尽描述,本发明具体的优选实施方案将是显而易见的。

[0095] 附图简述

[0096] 图 1 描述以下图,其表明在基于 DRG 神经元的中和生物测定中,通过自杂交瘤条件培养基中纯化的 4D4 单克隆抗体对 NGF 活性的中和。

[0097] 图 2 描述以下图,其表明受人 NGF 活性刺激的 VR1 表达和在基于 DRG 神经元的中和生物测定中通过自杂交瘤条件培养基中纯化的抗 NGF 单克隆抗体 (4D4) 对 NGF 活性的中和。

[0098] 图 3 描述以下图,其表明当作为 IgG1 或 IgG2 表达并在生长于滚瓶培养 (R) 或转瓶 (S) 中的细胞中时,在基于 DRG 神经元的中和生物测定中通过瞬时表达的重组抗 NGF 4D4 单克隆抗体对 NGF 活性的中和。

[0099] 图 4 描述神经营养蛋白的序列比对。序列上的编号和二级结构元件是指成熟的人 NGF。保守残基用星号标记,具有低序列同源性的区加上阴影。NGF 人为 SEQ ID NO :135 ; NGF 小鼠为 SEQ ID NO :136 ;BDNF 为 SEQ ID NO :137 ;NT3 为 SEQ ID NO :138。

[0100] 图 5 表示以下抗体的抗 NGF CDR1 重链比对和百分比同一性 :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)。

[0101] 图 6 表示以下抗体的抗 NGF CDR2 重链比对和百分比同一性: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)。

[0102] 图 7 表示以下抗体的抗 NGF CDR3 重链比对和百分比同一性: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)。

[0103] 图 8 表示以下抗体的抗 NGF CDR1 轻链比对和百分比同一性: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) (4G6a 在不同图中称为 20031028340;4G6b 在不同图中称为 20031028351;4G6c 在不同图中称为 20031071526;4G6d 在不同图中称为 20031028344;4G6e 在不同图中称为 20031000528)。

[0104] 图 9 表示以下抗体的抗 NGF CDR2 轻链比对和百分比同一性 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) (4G6a 在不同图中称为 20031028340;4G6b 在不同图中称为 20031028351;4G6c 在不同图中称为 20031071526;4G6d 在不同图中称为 20031028344;4G6e 在不同图中称为 20031000528)。

[0105] 图 10 表示以下抗体的抗 NGF CDR3 轻链比对和百分比同一性: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) (4G6a 在不同图中称为 20031028340;4G6b 在不同图中称为 20031028351;4G6c 在不同图中称为 20031071526;4G6d 在不同图中称为 20031028344;4G6e 在不同图中称为 20031000528)。

[0106] 图 11 表示以下抗体的抗 NGF 轻链比对和在百分比同一性: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) (4G6a 在不同图中称为 20031028340;4G6b 在不同图中称为 20031028351;4G6c 在不同图中称为 20031071526;4G6d 在不同图中称为 20031028344;4G6e 在不同图中称为 20031000528)。

[0107] 图 12 表示以下抗体的抗 NGF 重链比对和百分比同一性: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)。

[0108] 某些优选实施方案的详细说明

[0109] 本文所用章节标题仅用于组织目的,不得解释为限制所述主题。本申请引用的全部参考文献均通过引用明确结合到本文中用于任何目的。

[0110] 定义

[0111] 常规技术可用于重组 DNA、寡核苷酸合成及组织培养和转化(例如电穿孔、脂转染)。酶促反应和纯化技术可按照生产商说明书或者按本领域通常实施的或本文描述的方

法进行。前述技术和方法一般可按照本领域众所周知的方法和按照整个本说明书中引用和论述的各个通用的和更具体的参考文献中描述的方法进行。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., 该文献通过引用结合到本文用于任何目的。除非提供明确定义, 否则与本文所述分析化学、合成有机化学和医学与制药化学的实验室方法和技术联用的术语是本领域众所周知和通常使用的术语。类似地, 常规技术可用于化学合成、化学分析、药物制备、制剂和递送及患者治疗。

[0112] 正如按照本公开内容所使用的一样, 下列术语除非另有说明, 否则应理解为具有下列含义: 有关本发明抗体的措词“生物性质”、“生物特征”和术语“活性”在本文可互换使用, 包括但不限于表位亲和力和特异性(例如与人 NGF 结合的抗人 NGF 人抗体)、拮抗靶定多肽的活性(例如 NGF 活性)的能力、抗体的体内稳定性和抗体的免疫原性性质。本领域公认的抗体的其它已确定的生物性质或特征包括例如交叉反应性(概括地讲, 即与靶定多肽的非人同源物或者与其它蛋白质或组织的交叉反应性)和在哺乳动物细胞中保持高的蛋白质表达水平的能力。可采用本领域公认的技术, 包括但不限于 ELISA、竞争 ELISA、表面等离子共振分析、体外和体内中和测定(例如实施例 2)以及对不同来源(包括人、灵长类或可以是需要的任何其它来源)的组织切片进行的免疫组织化学, 观察或测定前述性质或特征。在下面的实施例中对抗人 NGF 人抗体的特定活性和生物性质作更详尽地描述。

[0113] 本文所用术语“分离多核苷酸”应意指基因组、cDNA 或合成来源或其某种组合的多核苷酸, 由于其来源, 分离多核苷酸 (1) 不与分离多核苷酸天然存在于其中的多核苷酸的全部或部分缔合, (2) 与分离多核苷酸天然不与之连接的多核苷酸连接, 或 (3) 天然不作为较长序列的部分出现。

[0114] 本文提及的术语“分离蛋白质”意指主题蛋白质 (1) 不含至少一些可正常与之一一起存在的其它蛋白质, (2) 基本不含来自相同来源(例如来自相同物种)的其它蛋白质, (3) 由来自不同物种的细胞表达, (4) 已与至少约 50%的天然与之缔合的多核苷酸、脂质、糖或其它物质相分离, (5) 不与“分离蛋白质”天然与之缔合的蛋白质的部分缔合(通过共价或非共价相互作用), (6) 与分离蛋白质天然不与之缔合的多肽有效缔合(通过共价或非共价相互作用), 或 (7) 天然不存在。这类分离蛋白质可由基因组 DNA、合成来源的 cDNA、mRNA 或其它 RNA 或其任何组合编码。优选分离蛋白质基本上不含存在于其自然环境中的可干扰其应用(治疗、诊断、预防、研究或其它方面的应用)的蛋白质或多肽或其它污染物。

[0115] “分离的”抗体是从其自然环境的成分中鉴定和分离和/或回收的抗体。其自然环境中的污染物成分可能是可能干扰抗体的诊断或治疗应用的物质, 可包括酶、激素和其它蛋白质或非蛋白质性溶质。在优选的实施方案中, 抗体可纯化至: (1) 通过 Lowry 方法所测定的大于 95%抗体重量, 最优选超过 99%重量, (2) 足以通过使用旋杯式测序仪获得 N 端或内部氨基酸序列的至少 15 个残基的程度, 或 (3) 通过在还原或非还原条件下使用考马斯蓝或优选银染色的 SDS-PAGE 所测得的同质性。分离抗体包括重组细胞内的原位抗体, 因为抗体自然环境中的至少一种成分可不存在。

[0116] 术语“多肽”或“蛋白质”意指具有天然蛋白质的序列的分子, 也就是说由天然存在的细胞、明确讲是非重组细胞产生的蛋白质、或由遗传工程改造的细胞或重组细胞产生的蛋白质; 并包括具有天然蛋白质的氨基酸序列的分子, 或者已自天然序列缺失一个或多个

个氨基酸、添加一个或多个氨基酸至天然序列和 / 或已取代天然序列的一个或多个氨基酸的分子。术语“多肽”和“蛋白质”特别包括抗 NGF 抗体或已自抗 NGF 抗体缺失一个或多个氨基酸、添加一个或多个氨基酸至抗 NGF 抗体和 / 或已取代抗 NGF 抗体的一个或多个氨基酸的序列。

[0117] 术语“多肽片段”是指具有氨基端缺失、羧基端缺失和 / 或内部缺失的多肽。在某些实施方案中,片段长为至少 5 个 - 约 500 个氨基酸。应理解的是在某些实施方案中,片段长为至少 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包括结合域在内的功能域。在抗 NGF 抗体的情况下,有用的片段包括但不限于 CDR 区、重链或轻链的可变结构域、抗体链的一部分或正好其包括两个 CDR 的可变区等。

[0118] 术语“特异性结合剂”是指与靶标特异性结合的天然或非天然分子。特异性结合剂的实例包括但不限于蛋白质、肽、核酸、糖和脂质。在某些实施方案中,特异性结合剂为抗体。

[0119] 术语“NGF 的特异性结合剂”是指与 NGF 的任何部分特异性结合的特异性结合剂。在某些实施方案中,NGF 的特异性结合剂为与 NGF 特异性结合的抗体。

[0120] 本文所用术语“免疫功能性免疫球蛋白片段”是指至少含有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与抗原结合。在优选的实施方案中,抗原为与受体特异性结合的配体。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,中断因配体与受体结合而产生的生物应答。优选本发明的免疫功能性免疫球蛋白片段与 NGF 特异性结合。最优选片段与人 NGF 特异性结合。

[0121] 本文所用的和应用用于一个对象的术语“天然存在的”是指该对象可天然存在的事实。例如,以下多肽或多核苷酸序列是天然存在的:它存在于生物(包括病毒)中,可从天然来源分离并且未经人为有意修饰。

[0122] 术语“有效连接的”意指该术语所应用于的成分处于允许它们在合适条件下实现其内在功能的关系之中。例如,与蛋白质编码序列“有效连接”的控制序列与之连接使得在与控制序列的转录活性相容的条件下实现蛋白质编码序列的表达。

[0123] 本文所用术语“控制序列”是指可实现与之连接的编码序列的表达、加工或胞内定位的多核苷酸序列。这类控制序列的性质可取决于宿主生物。在具体的实施方案中,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。在其它具体实施方案中,真核生物的控制序列可包括启动子(包含转录因子的一个或多个识别位点)、转录增强子序列、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 / 或融合配偶体序列。

[0124] 本文提及的术语“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,包含核苷酸的多核苷酸可以是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或任一核苷酸类型的修饰形式。所述修饰包括碱基修饰,例如溴尿苷(bromuridine);核糖修饰,例如阿拉伯糖苷和 2',3' - 双脱氧核糖以及核苷酸间键修饰,例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯(phosphoroselenoate)、二硒代磷酸酯(phosphorodiselenoate)、苯胺基硫代磷酸酯(phosphoroanilothioate)、苯胺基磷酸酯(phosphoraniladate)和氨基磷

酸酯 (phosphoramidate)。术语“多核苷酸”特别包括 DNA 的单链和双链形式。

[0125] 本文提及的术语“寡核苷酸”包括通过天然存在的和 / 或非天然存在的寡核苷酸键连接在一起的天然存在的和修饰的核苷酸。寡核苷酸是包含一般是单链且长为 200 个核苷酸或更少的成员的多核苷酸子集。在某些实施方案中,寡核苷酸长度为 10-60 个核苷酸。在某些实施方案中,寡核苷酸长度为 12、13、14、15、16、17、18、19 或 20-40 个核苷酸。寡核苷酸可以是例如用于构建遗传突变体的单链或双链寡核苷酸。对于蛋白质编码序列,本发明的寡核苷酸可以是有义或反义寡核苷酸。

[0126] 术语“天然存在的核苷酸”包括脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。术语“修饰核苷酸”包括具有修饰或取代糖基等的核苷酸。术语“寡核苷酸键”包括例如硫代磷酸酯、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、氨基磷酸酯等寡核苷酸键。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,1991, Anti-Cancer Drug Design, 6:539; Zon 等,1991, OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES :A PRACTICAL APPROACH, 第 87-108 页 (F. Eckstein, 主编), Oxford University Press, Oxford England; Stec 等, 美国专利号 5, 151, 510; Uhlmann 和 Peyman, 1990, Chemical Reviews, 90:543, 所述文献的公开内容通过引用结合到本文中用于任何目的。寡核苷酸可包含能够检测寡核苷酸或其杂交的可检测标记。

[0127] 术语“载体”包括能够转运其已连接的另一个核酸的核酸分子。载体的一种类型是“质粒”,其是指额外的 DNA 区段可连接至其中的环状双链 DNA 环。载体的另一种类型为病毒载体,其中额外的 DNA 区段可连接至病毒基因组。某些载体能够在其所导入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)。其它载体(例如非附加型哺乳动物载体)可在导入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导与其有效连接的基因表达。这类载体在本文称为“重组表达载体”(或简称“表达载体”)。总体来说,在重组 DNA 技术中使用的表达载体常常呈质粒的形式。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。然而,本发明欲包括提供等同功能的表达载体的这类其它形式,例如病毒载体(例如复制缺陷型反转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒)。

[0128] 措词“重组宿主细胞”(或简称“宿主细胞”)包括重组表达载体被导入其中的细胞。本领域技术人员应了解的是,这类术语旨在不仅仅是指特定的主题细胞,而且还指这类细胞的子代。因为某些修饰可因突变或环境影响所致而发生在后代中,所以这类子代实际上可能不同于亲本细胞,但仍包括在本文所用术语“宿主细胞”的范围内。多种宿主表达系统可用来表达本发明的抗体,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)。合适细菌表达载体的实例是 pUC19。为了重组表达抗体,宿主细胞用一个或多个重组表达载体(其携带编码抗体的免疫球蛋白轻链和重链的 DNA 片段)转染,使得轻链和重链在宿主细胞表达,优选分泌到培养宿主细胞的培养基中,可从该培养基中回收抗体。应用标准重组 DNA 方法获得抗体重链和轻链基因,将这些基因整合到重组表达载体中,并将载体导入宿主细胞中,例如下列文献描述的方法:Sambrook 等,2001, MOLECULAR CLONING, LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratories, Ausubel, F. M. 等(主编)Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989)

和 Boss 等人的美国专利号 4,816,397。

[0129] 术语“宿主细胞”用来指已用核酸序列转化或能够用核酸序列转化然后表达选定的目标基因的细胞。该术语包括亲代细胞的子代,不管子代在形态学或在遗传组成方面是否与原始亲代相同,只要选定基因存在即可。

[0130] 术语“转导”用来指基因通常通过噬菌体从一个细菌转移到另一个细菌中。“转导”还指通过反转录病毒获得和转移真核细胞序列。

[0131] 术语“转染”用来指外来或外源 DNA 被细胞摄取,且当外源 DNA 被导入细胞膜内时,细胞被“转染”。许多转染技术是本领域众所周知的并公开于本文中。参见例如 Graham 等,1973, *Virology* 52:456; Sambrook 等,2001, *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratories; Davis 等,1986, *BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Elsevier; 以及 Chu 等,1981, *Gene* 13:197。这类技术可用来将一个或多个外源 DNA 部分导入合适的宿主细胞中。

[0132] 本文所用术语“转化”是指细胞遗传特征的改变,且当细胞被修饰以含有新的 DNA 时,细胞被转化。例如,当细胞从其天然状态被遗传修饰时便被转化。在转染或转导后,转化的 DNA 可通过物理整合至细胞的染色体中而与细胞的 DNA 重组,或者可作为不被复制的附加型元件暂时保持,或者可作为质粒独立地复制。当 DNA 随细胞分裂复制时,细胞被视为稳定转化。

[0133] 术语“天然存在的”或“天然的”当与例如核酸分子、多肽、宿主细胞等生物材料联用时,是指存在于自然中的且不被人操纵的材料。类似地,本文所用的“非天然存在的”或“非天然的”是指不存在于自然中的或已被人进行结构修饰或合成的材料。

[0134] 术语“抗原”是指能够被选择性结合剂(例如抗体)结合,且另外地能够用于动物中产生能够与该抗原表位结合的抗体的分子或分子的一部分。抗原可具有一个或多个表位。

[0135] 本领域已知的术语“同一性”是指两个或更多个多肽分子或者两个或更多个核酸分子的序列之间的关系,正如通过比较其序列所确定的一样。在本领域中,“同一性”还意指核酸分子或多肽(视情况而定)之间的序列相关性的程度,正如通过两个或更多个核苷酸或者两个或更多个氨基酸序列链间的匹配所确定的一样。“同一性”衡量由特定数学模型或计算机程序(即“算法”)得出的具有空位比对(如有的话)的两个或更多个序列的较小者之间相同匹配的百分比。

[0136] 术语“相似性”用于本领域相关概念,但与“同一性”不同,“相似性”是指相关性的衡量,其包括相同匹配和保守取代匹配两者。如果两个多肽序列具有例如 10/20 相同的氨基酸,且其余氨基酸全为非保守取代,则百分比同一性和相似性两者皆为 50%。如果在同一实例中,还有 5 个其中存在保守取代的位置,则百分比同一性仍为 50%,但百分比相似性为 75% (15/20)。因此,在其中有保守取代的情况下,2 个多肽之间的百分比相似性高于这 2 个多肽之间的百分比同一性。

[0137] 可通过已知方法容易地计算相关核酸和多肽的同一性和相似性。这类方法包括但不限于以下文献中描述的方法: *COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY*, (Lesk, A. M., 主编), 1988, Oxford University Press, New York; *BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS*, (Smith, D. W., 主编), 1993, Academic Press, New York; *COMPUTER ANALYSIS*

OF SEQUENCE DATA, 第 1 部分 (Griffin, A.M. 和 Griffin, H.G., 主编), 1994, Humana Press, New Jersey; von Heinje, G., SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1987, Academic Press; SEQUENCE ANALYSIS PRIMER, (Gribskov, M. 和 Devereux, J., 主编), 1991, M. Stockton Press, New York; Carillo 等, 1988, SIAM J. Applied Math., 48:1073; 以及 Durbin 等, 1998, BIOLOGICAL SEQUENCE ANALYSIS, Cambridge University Press。

[0138] 设计确定同一性的优选方法, 以给出所测序列之间的最大匹配。在可公开获取的计算机程序中描述了确定同一性的方法。确定 2 个序列之间的同一性的优选计算机程序方法包括但不限于 GCG 程序包, 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 程序可公开获自国立生物技术信息中心 (NCBI) 和其它来源 (BLAST Manual, Altschul 等, NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul 等, 1990, 同上)。众所周知的 Smith Waterman 算法也可用来确定同一性。

[0139] 用于比对 2 个氨基酸序列的某些比对方案可导致仅 2 个序列的短区域的匹配, 即使在 2 个全长序列之间没有显著关系, 该个小的比对区域也可具有非常高的序列同一性。因此, 在某些实施方案中, 所选择的比对方法 (GAP 程序) 产生跨越靶多肽的至少 50 个连续氨基酸的比对。

[0140] 例如, 应用计算机算法 GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), 针对其各自氨基酸的最佳匹配 (通过算法测定的“匹配跨距 (matched span)”), 对要确定其百分比序列同一性的 2 个多肽进行比对。在某些实施方案中, 空位开放罚分 (其计算为 3 乘以平均对角线 (average diagonal)); 其中“平均对角线”是所采用的比较矩阵的对角线的平均值; “对角线”是通过特定比较矩阵指派给各完美氨基酸匹配的分值或数值) 和空位延伸罚分 (通常是空位开放罚分的 1/10) 以及比较矩阵例如 PAM250 或 BLOSUM 62 与算法联用。在某些实施方案中, 算法也采用标准比较矩阵 (对于 PAM 250 比较矩阵参见 Dayhoff 等, 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure, 5:345-352; 对于 BLOSUM 62 比较矩阵参见 Henikoff 等, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89:10915-10919)。

[0141] 在某些实施方案中, 用于多肽序列比较的参数包括下列参数:

[0142] 算法: Needleman 等, 1970, J. Mol. Biol., 48:443-453;

[0143] 比较矩阵: Henikoff 等, 1992, 同上的 BLOSUM 62;

[0144] 空位罚分: 12

[0145] 空位长度罚分: 4

[0146] 相似性阈值: 0

[0147] GAP 程序可与上述参数一起使用。在某些实施方案中, 前述参数是应用 GAP 算法用于多肽比较的默认参数 (以及对末端空位无罚分)。

[0148] 术语“同源性”是指蛋白质或核酸序列之间的相似性程度。同源性信息可用于了解某些蛋白质或核酸物类的遗传相关性。同源性可通过比对和比较序列确定。通常为了确定氨基酸同源性, 将蛋白质序列与已知蛋白质序列的数据库进行比较。同源序列沿其序列在某处具有共同的功能特性。高度相似性或同一性通常表明同源性, 然而低度相似性或同一性不一定表明缺乏同源性。

[0149] 可采用若干方法将一个序列的氨基酸与另一个序列的氨基酸进行比较以确定同源性。方法一般分成两类：(1) 物理性质（例如极性、电荷和范德瓦尔斯体积）的比较以产生相似性矩阵；和(2) 序列中氨基酸被任何其它氨基酸的可能取代的比较，其基于来自自己知同源蛋白质的许多蛋白质序列的观察结果，以产生可接受点突变矩阵 (Point Accepted Mutation Matrix, PAM)。

[0150] 还可通过使用程序针 (program needle) (EMBOSS 包) 或程序扩展器 (program stretcher) (EMBOSS 包) 或程序比对 X, 作为载体 NTI 套件 9.0.0 软件包的模块, 使用默认参数 (例如空位罚分 5, 空位开放罚分 15, 空位延伸罚分 6.6), 来计算同一性百分比。

[0151] 本文所用 20 种常规氨基酸及其缩写遵照常规用法。参见 IMMUNOLOGY—A SYNTHESIS, 第 2 版 (E. S. Golub 和 D. R. Gren, 主编), Sinauer Associates: Sunderland, MA, 1991, 其通过引用结合到本文中用于任何目的。20 种常规氨基酸的立体异构体 (例如 D-氨基酸); 非天然氨基酸例如 α -, α -二取代氨基酸、N-烷基氨基酸、乳酸和其它非常规氨基酸也可适于本发明多肽的成分。非常规氨基酸的实例包括: 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、 σ -N-甲基精氨酸和其它类似的氨基酸和亚氨基酸 (例如 4-羟脯氨酸)。在本文所用的多肽记号中, 按照标准用法和惯例, 左手方向为氨基端方向, 右手方向是羧基端方向。

[0152] 可根据常见的侧链性质将天然存在的残基分类:

[0153] 1) 疏水的: 正亮氨酸 (Nor)、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Phe、Trp、Tyr、Pro;

[0154] 2) 极性亲水的: Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Lys、Ser、Thr;

[0155] 3) 脂族的: Ala、Gly、Ile、Leu、Val、Pro;

[0156] 4) 脂族疏水的: Ala、Ile、Leu、Val、Pro;

[0157] 5) 中性亲水的: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0158] 6) 酸性: Asp、Glu;

[0159] 7) 碱性: His、Lys、Arg;

[0160] 8) 影响链取向的残基: Gly、Pro;

[0161] 9) 芳族的: His、Trp、Tyr、Phe; 和

[0162] 10) 芳族疏水的: Phe、Trp、Tyr。

[0163] 保守氨基酸取代可包括这些类别之一的成员与同一类别的另一个成员的交流。保守氨基酸取代可包括非天然存在的氨基酸残基, 其通常通过化学肽合成而不是通过生物系统中的合成而掺入。这些包括模拟肽和氨基酸部分的其它反转或反向形式。

[0164] 非保守取代可包括这些类别之一的成员与另一类别的成员的交流。这类取代残基可导入与非人抗体同源的人抗体区中, 或者导入该分子的非同源区。

[0165] 按照某些实施方案, 在进行这类变化时, 可考虑氨基酸的亲水指数。根据每个氨基酸的疏水性和电荷特性为其指定亲水指数。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) 和精氨酸 (-4.5)。

[0166] 亲水氨基酸指数在赋予蛋白质交互生物功能方面的重要性为本领域所了解（参见例如 Kyte 等, 1982, *J. Mol. Biol.* 157:105-131）。已知某些氨基酸可用具有类似亲水指数或分值的其它氨基酸取代并仍保持类似的生物活性。在某些实施方案中, 在根据亲水指数进行改变时, 包括其亲水指数在 ± 2 的范围内的氨基酸的取代。在某些实施方案中, 包括在 ± 1 范围内的氨基酸的取代, 而在某些实施方案中, 包括在 ± 0.5 范围内的氨基酸的取代。

[0167] 本领域还要理解的是, 可根据亲水性有效地进行类似氨基酸的取代, 特别是预期将由此产生的生物功能性蛋白质或肽用于本文公开的免疫学实施方案时。在某些实施方案中, 受其邻近氨基酸亲水性控制的蛋白质的最大局部平均亲水性与其免疫原性和抗原性（即具有蛋白质的生物性质）相关。

[0168] 下列亲水性值被指派给这些氨基酸残基: 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 (+0.2)、谷氨酰胺 (+0.2)、甘氨酸 (0)、苏氨酸 (-0.4)、脯氨酸 (-0.5 \pm 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)。在某些实施方案中, 在根据类似亲水性值进行改变时, 包括其亲水性值在 ± 2 范围内的氨基酸的取代, 在某些实施方案中, 包括在 ± 1 范围内的氨基酸的取代, 而在某些实施方案中, 包括在 ± 0.5 范围内的氨基酸的取代。还可根据亲水性由一级氨基酸序列鉴定表位。这些区域亦称为“表位核心区”。

[0169] 表 1 给出示例性的氨基酸取代。

[0170] 表 1

[0171] 氨基酸取代

[0172]

原始残基	示例性取代	优选的取代
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

[0173]

原始残基	示例性取代	优选的取代
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, 正亮氨酸	Leu

[0174] 技术人员能够采用众所周知的技术测定本文给出的多肽的合适变体。在某些实施方案中,本领域的技术人员可鉴定可通过靶向被认为对活性不重要的区域而被改变却又不破坏活性的分子的合适区域。在其它实施方案中,技术人员可鉴定在类似的多肽之间保守的分子的残基和部分。在其它实施方案中,甚至对生物活性或结构可以是重要的区域也可进行保守氨基酸取代而又不破坏生物活性或不会不利地影响多肽结构。

[0175] 另外,本领域的技术人员可回顾鉴定对活性或结构重要的类似多肽中的残基的结构-功能研究。鉴于这类比较,技术人员可预测与在类似蛋白质中对活性或结构重要的氨基酸残基相应的蛋白质中的氨基酸残基的重要性。本领域的技术人员可针对这类预测的重要氨基酸残基选择化学上类似的氨基酸取代。

[0176] 本领域的技术人员还可分析三维结构和与类似多肽中的三维结构有关的氨基酸序列。鉴于这类信息,本领域的技术人员可根据其三维结构预测抗体的氨基酸残基的排列。在某些实施方案中,本领域的技术人员可选择不对预测位于蛋白质表面的氨基酸残基进行重大改变,因为这类残基可参与与其它分子的重要相互作用。此外,本领域的技术人员可产

生在各个所需氨基酸残基上含有单个氨基酸取代的试验变体。然后可采用本领域技术人员已知的活性测定法筛选变体。这类变体可用于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改变导致活性破坏、不当降低或不适宜,则可避免具有这类改变的变体。换句话说,根据从这类例行试验收集的信息,本领域的技术人员可容易地确定其中单独的或与其它突变组合的进一步取代应予以避免的氨基酸。

[0177] 许多科技出版物致力于预测二级结构。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; 以及 Chou 等, 1979, *Biophys. J.* 26: 367-384。此外,目前可获得辅助预测二级结构的计算机程序。预测二级结构的一种方法基于同源性建模。例如,序列同一性大于 30% 或相似性大于 40% 的 2 个多肽或蛋白质通常具有相似的拓扑结构。蛋白质结构数据库 (PDB) 的最新增长, 提高二级结构的可预测性, 包括多肽或蛋白质结构内折叠的可能数目。参见 Holm 等, 1999, *Nucl. Acid. Res.* 27: 244-247。研究表明 (Brenner 等, 1997, *Curr. Op. Struct. Biol. Biol.* 7: 369-376), 在给定多肽或蛋白质中存在有限数目的折叠, 一旦解析出结构的临界值, 则结构预测将变得明显更准确。

[0178] 预测二级结构的其它方法包括“穿线法 (threading)” (Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7: 377-87; Sippl 等, 1996, *Structure* 4: 15-19); “概况分析 (profile analysis)” (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 (evolutionary linkage)” (参见 Holm, 1999, 同上; 以及 Brenner, 1997, 同上)。

[0179] 在某些实施方案中, 抗体变体包括糖基化变体, 其中糖基化位点的数目和 / 或类型与亲本多肽的氨基酸序列相比发生改变。在某些实施方案中, 蛋白质变体包含数目比天然蛋白质多或少的 N 联糖基化位点。N 联糖基化位点的特征在于序列: Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr, 其中命名为 X 的氨基酸残基可以是脯氨酸以外的任何氨基酸残基。产生该序列的氨基酸残基取代提供加入 N 联糖链的潜在新位点。或者, 清除该序列的取代可除去现有的 N 联糖链。还提供 N 联糖链重排, 其中一个或多个 N 联糖基化位点 (通常是天然存在的 N 联糖基化位点) 被清除, 并产生一个或多个新的 N 联糖基化位点。其它优选的抗体变体包括半胱氨酸变体, 其中与亲本氨基酸序列相比, 一个或多个半胱氨酸残基缺失或被另一个氨基酸 (例如丝氨酸) 取代。当抗体必需再折叠成生物活性构象 (例如在分离不可溶包含体之后) 时, 半胱氨酸变体可以是有用的。半胱氨酸变体一般具有比天然蛋白质少的半胱氨酸残基, 并且通常具有偶数以使因非配对半胱氨酸引起的相互作用降到最小。

[0180] 在其它的实施方案中, 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。表示“结晶的片段”的 Fc 片段或重链恒定区, 可通过突变进行修饰以为抗体提供变化的结合性质。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; 所述全部文献均通过引用结合到本文中)。这类突变可包括取代、添加、缺失或其任何组合, 通常按照本文所述方法以及按照本领域已知方法使用一个或多个诱变的寡核苷酸, 通过位点定向诱变来产生 (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., 所述文献通过引用结合到本文中)。

[0181] 按照某些实施方案, 氨基酸取代是以下氨基酸取代, 其: (1) 降低对蛋白酶解的敏感性, (2) 降低对氧化的敏感性, (3) 改变形成蛋白质复合物的结合亲和力, (4) 改变结合亲和力和 / 或 (5) 赋予这类多肽其它物理化学性质或功能性质, 或者改变这类多肽的其它物理化学性质或功能性质。按照某些实施方案, 可在天然存在的序列 (在某些实施方案中, 在形成分子间接触的一个或多个结构域以外的多肽部分) 中进行单个或多个氨基酸取代 (在某些实施方案中为保守氨基酸取代)。在优选的实施方案中, 保守氨基酸取代通常基本不改变亲本序列的结构特征 (例如置换氨基酸不应趋于断开出现在亲本序列中的螺旋, 或破坏表征亲本序列的二级结构的其它类型)。本领域公认的多肽二级结构和三级结构的实例描述于 PROTEINS, STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES, (Creighton, 主编), 1984, W. H. Freeman and Company, New York; INTRODUCTION TO PROTEIN STRUCTURE (C. Branden 和 J. Tooze, 主编), 1991, Garland Publishing, New York, N. Y.; 以及 Thornton 等, 1991, Nature 354:105, 所述各文献均通过引用结合到本文中。

[0182] 肽类似物常用于制药工业作为具有类似于模板肽的性质的非肽药物。非肽化合物的这些类型称为“肽模拟物”或“模拟肽”。参见 Fauchere, 1986, Adv. Drug Res. 15: 29; Veber & Freidinger, 1985, TINS 第 392 页; 以及 Evans 等, 1987, J. Med. Chem. 30: 1229, 所述文献通过引用结合到本文中用于任何目的。常常借助计算机化分子建模开发这类化合物。在结构上类似于治疗有用的肽的肽模拟物可用来产生类似的治疗或预防效果。一般而言, 模拟肽在结构上类似于范例多肽 (即具有生化性质或药理活性的多肽), 例如人抗体, 但是通过本领域众所周知的方法, 将一个或多个肽键用选自以下的键任选取代: $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ (顺式和反式)、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2\text{SO}-$ 。共有序列的一个或多个氨基酸用同一类型的 D-氨基酸的系统取代 (例如 D-赖氨酸替换 L-赖氨酸) 可用于某些实施方案中以产生更稳定的肽。另外, 包含共有序列或基本相同的共有序列变异的约束肽可通过本领域已知方法产生 (Rizo 和 Gierasch, 1992, Ann. Rev. Biochem. 61:387, 通过引用结合到本文中用于任何目的); 例如, 通过加入能够形成使肽环化的分子间二硫桥的内部半胱氨酸残基。

[0183] “抗体”或“抗体肽”是指完整抗体或其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, 结合片段通过重组 DNA 技术产生。在另外的实施方案中, 结合片段通过酶促切割或化学切割完整抗体而产生。结合片段包括但不限于 $\text{F}(\text{ab})$ 、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 、 Fv 和单链抗体。

[0184] 术语“重链”包括具有足够可变区序列以赋予对 NGF 的特异性的任何免疫球蛋白多肽。术语“轻链”包括具有足够可变区序列以赋予对 NGF 的特异性的任何免疫球蛋白多肽。全长重链包括可变区结构域 V_H 和 3 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端, C_H3 结构域位于羧基端。本文所用术语“重链”包括全长重链及其片段。全长轻链包括可变区结构域 V_L 和恒定区结构域 C_L 。像重链一样, 轻链可变区结构域位于多肽的氨基端。本文所用术语“轻链”包括全长轻链及其片段。 $\text{F}(\text{ab})$ 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,所述重链在 C_H1 与 C_H2 结构域之间含有更多的恒定区,使得可在两条重链之间形成链间二硫键以形成 F(ab')₂ 分子。Fv 区包含来自重链和轻链两者的可变区,但是缺乏恒定区。单链抗体为 Fv 分子,其中重链和轻链可变区被柔性接头连接形成单一多肽链,单一多肽链形成抗原结合区。在国际专利申请公开号 W088/01649 和美国专利号 4,946,778 和 5,260,203 中详细论述了单链抗体。

[0185] 在某些实施方案中,除“多特异性”或“多功能”抗体以外,二价抗体要理解为包含具有相同抗原特异性的结合部位。

[0186] 在评价本发明的抗体结合和特异性方面,当过量抗体降低与受体结合的配体的量至少约 20%、40%、60%、80%、85% 或更多(正如特别采用体外竞争结合测定法所测定的)时,抗体基本抑制配体与受体的粘附。

[0187] 所谓“中和抗体”意指能够阻断或显著降低抗体与之结合的靶抗原的效应子功能的抗体分子。因此,“中和”抗 NGF 抗体能够阻断或显著降低 NGF 的效应子功能,例如 NGF 的受体结合和 / 或 NGF 细胞反应的诱导。“显著降低”意指靶抗原(例如人 NGF)的效应子功能降低至少约 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%。

[0188] 术语“表位”包括能够与免疫球蛋白或 T 细胞受体特异性结合的任何决定簇、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聚簇(grouping),例如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基,而在某些实施方案中,可具有特定的三维结构特性和 / 或特定的电荷特性。表位是被抗体结合的抗原区。在某些实施方案中,当抗体在蛋白质和 / 或大分子的复杂混合物中优先识别其靶抗原时被称为特异性结合抗原。在优选的实施方案中,当平衡解离常数 $\leq 10^{-8}$ M 时、更优选当平衡解离常数 $\leq 10^{-9}$ M 时、最优选当解离常数 $\leq 10^{-10}$ M 时,抗体被称为特异性结合抗原。

[0189] 当 2 个抗体识别相同表位或空间上重叠的表位时,抗体结合“基本相同的表位”作为参比抗体。确定 2 个抗体是否与相同的表位或空间上重叠的表位结合的最广泛使用的和快捷的方法是竞争测定法,该方法可使用标记的抗原或标记的抗体,以多种不同方式进行配置。抗原通常被固定在基质上,并且使用放射性标记或酶标记测定未标记的抗体阻断经标记的抗体的结合的能力。

[0190] 术语“作用剂”在本文中用于指化学化合物、化学化合物的混合物、生物大分子或从生物材料中制备的提取物。

[0191] 本文所用术语“标记”或“标记的”是指掺入可检测标记,例如通过掺入放射性同位素标记的氨基酸或与可通过标记的抗生物素蛋白(例如链霉抗生物素,优选包含可检测标记例如荧光标记、化学发光标记或可通过光学或比色方法检测的酶活性)检测的生物素部分的多肽连接。在某些实施方案中,标记还可以是治疗性的。标记多肽和糖蛋白的各种方法是本领域已知的,并可有利地用于本文公开的方法中。多肽的标记的实例包括但不限于以下标记:放射性同位素或放射性核素(例如 ³H、¹⁴C、¹⁵N、³⁵S、⁹⁰Y、^{99m}Tc、¹¹¹In、¹²⁵I、¹³¹I)、荧光标记(例如异硫氰酸荧光素或 FITC、罗丹明或镧系元素磷光体)、酶标记(例如辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶)、化学发光标记、半抗原标记例如生物素基和被第二报道分子识别的预先确定的多肽表位(例如亮氨酸拉链对序列、第二抗体的结合

部位、金属结合域或表位标签)。在某些实施方案中,标记被各种长度的间隔臂(例如(CH₂)_n,其中n < 约20)连接以降低可能的位阻。

[0192] 本文所用术语“生物样品”包括但不限于来源于活的生物或之前是活的生物的任意量的物质。这类活的生物包括但不限于人、小鼠、猴、大鼠、兔和其它动物。这类物质包括但不限于血液、血清、尿液、细胞、器官、组织、骨、骨髓、淋巴结和皮肤。

[0193] 本文所用术语“药剂或药物”是指当适当给予患者时能够诱导所需治疗效果的化学化合物或组合物。按照本发明,关于包含一种或多种本发明的抗体的药物组合物的表述“药学上有效量”要理解为意指能够在所述患者中终止对外部刺激的敏感性阈值的降低、使该敏感性阈值恢复到与在健康受试者中观察到敏感性阈值相当的水平水平的所述药物组合物的量。

[0194] “病症”是可获益于本发明的治疗的任何病况。“病症”和“病况”在本文可互换使用,包括慢性和急性NGF介导的病症或NGF介导的疾病,包括使哺乳动物易患所述病症的病理状况。

[0195] 术语“NGF介导的疾病”和“NGF介导的病况”包括与NGF的水平升高或对NGF的敏感性增强有关的任何医学病况或病症,包括但不限于急性疼痛、牙痛、创伤疼痛、手术疼痛、由截肢或脓肿引起的疼痛、灼痛、脱髓鞘病、三叉神经痛、癌症、慢性酒精中毒、中风、丘脑性疼痛综合征、糖尿病、获得性免疫缺陷综合征(“AIDS”)、毒素和化学治疗、普通头痛、偏头痛、丛集性头痛、混合型血管综合征和非血管综合征、紧张性头痛、普通炎症、关节炎、风湿性疾病、狼疮、骨关节炎、炎症性肠病症、肠易激综合征、炎症性眼病、炎症性或不稳定性膀胱病、银屑病、具有炎性组分的皮肤疾病、晒伤、心脏炎、皮炎、肌炎、神经炎、胶原血管病、慢性炎性病况、炎症性疼痛和相关痛觉过敏和异常性疼痛、神经性疼痛和相关痛觉过敏和异常性疼痛、糖尿病神经病变性疼痛、灼痛、交感神经维持性疼痛、传入神经阻滞综合征、哮喘、上皮组织损伤或功能障碍、单纯疱疹、呼吸区、泌尿生殖区、胃肠区或血管区内脏运动失调、创伤、烧伤、变应性皮肤反应、瘙痒、白癜风、普通胃肠病症、结肠炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、血管运动性鼻炎或变应性鼻炎或支气管病症、痛经、消化不良、胃食管反流、胰腺炎和内脏痛。

[0196] 当用于包含一种或多种抗人NGF人抗体的溶媒-或者药物组合物时,本文所用术语“有效量”和“治疗有效量”是指足以产生所需结果(即如果用本发明的溶媒-或抗-人NGF人抗体治疗,则所需结果是例如理想地减轻炎症和/或疼痛)或支持可观察到地降低NGF的一种或多种生物活性水平的量或剂量。更准确地讲,治疗有效量为一种或多种抗人NGF人抗体足以抑制体内用作用剂治疗的受试者的与所述病况(例如炎症或疼痛)有关的一个或多个临床上界定的病理过程达一段时间的量。在本发明中,抗NGF抗体的“有效量”可预防、终止、控制或减轻与任何疼痛医学病况有关的疼痛知觉。在本发明的方法中,术语“控制”及其语法变体用来指预防、部分或完全抑制、减轻、延迟或减慢不良事件,例如疼痛。有效量可随所选择的具体溶媒-或者抗-人NGF人抗体而变化,并且还取决于与待治疗的受试者有关的各种因素和状况以及病症的严重程度。例如,如果体内给予溶媒-或者抗-人NGF人抗体,则例如患者的年龄、体重和健康状况以及在临床前动物研究获得的剂量反应曲线和毒性数据等因素在要考虑的因素之中。如果该作用剂与细胞体外接触,则还可设计各种临床前体外研究以评价例如摄取、半寿期、剂量、毒性等这类参数。对给定作用剂的有效

量或治疗有效量的确定尽在本领域技术人员的能力之内。

[0197] 本文所用术语“神经生长因子”和“NGF”定义为所有哺乳动物种类天然序列 NGF, 包括如 SEQ ID NO :30 所示的重组人 NGF 1-120。

[0198] 本文所用的“基本纯的”或“基本纯化的”意指作为存在的主要物类的化合物或物类(即以摩尔浓度计, 它比组合物中的任何其它各种物类更丰富)。在某些实施方案中, 基本纯化的部分是这样的组合物, 其中该物类占存在的全部大分子物类的至少约 50% (以摩尔浓度计)。在某些实施方案中, 基本纯的组合物可包含组合物中存在的全部大分子物类的超过约 80%、85%、90%、95% 或 99%。在某些实施方案中, 该物类被纯化至基本同质性(无法通过常规检测方法检测组合物中的污染物物类), 其中该组合物基本上由单一大分子物类组成。

[0199] 术语“患者”包括人和动物受试者。

[0200] “治疗”是指治疗性治疗和预防用或预防性措施。需要治疗的受试者包括已患病症的受试者以及易患病症的受试者或其中要预防病症的受试者。

[0201] 除非文中另有要求, 否则单数术语应包括复数, 复数术语应包括单数。

[0202] 按照本发明的某些实施方案, 针对 NGF 的抗体可用于治疗神经性疼痛和炎症性疼痛及 NGF 介导的疾病, 包括但不限于上述疾病。

[0203] 在本发明的一个方面, 提供针对人 NGF 产生的并且对与人 NGF 的结合具有生物特异性和免疫特异性的完全人单克隆抗体。在另一个方面, 本发明提供包含编码重链和轻链免疫球蛋白分子氨基酸序列、特别是与其可变区相应的序列的核苷酸序列的核酸。本发明这个方面的具体实施方案是相当于本发明提供的重链和轻链的互补决定区(CDR)、具体来说是从 CDR1 到 CDR3 的序列。在又一个方面, 本发明提供表达本发明的免疫球蛋白分子和抗体、优选单克隆抗体的杂交瘤细胞和细胞系。本发明还提供生物学上和免疫学上纯化的抗体(优选针对人 NGF 产生的并且对于与人 NGF 的结合具有生物特异性和免疫特异性的单克隆抗体)的制剂。

[0204] 酵母人工染色体(YAC)中克隆和重建兆碱基(megabase)大小的人基因座并将其导入小鼠种系的能力, 为阐明非常大的或粗略制图的基因座的功能成分以及产生人类疾病的有用模型提供了有利方法。此外, 利用用小鼠基因座人等同物取代小鼠基因座的这类技术, 为了解发育期间人基因产物的表达和调节、与其它系统的连通及其在疾病诱导和进展方面的参与提供了独特的见解。

[0205] 这类策略的一个重要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)基因座导入其中内源性 Ig 基因已失活的小鼠中, 为研究抗体的程序化表达和装配的基础机制及其在 B 细胞发育中的作用提供了机会。此外, 这类策略为产生完全人单克隆抗体(MAb)提供了来源。

[0206] 术语“人抗体”包括具有基本上相当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, 人抗体在非人类哺乳动物中产生, 所述动物包括但不限于啮齿动物(例如小鼠和大鼠)和兔形目动物(例如兔)。在某些实施方案中, 人抗体在杂交瘤细胞中产生。在某些实施方案中, 人抗体经重组产生。

[0207] 有关抗体的术语“重组”包括通过重组方法制备、表达、产生或分离的抗体。代表性实例包括使用转染至宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体、从重组的组合人抗体文库

中分离的抗体、从对于人免疫球蛋白基因而言是转基因的动物（例如小鼠）中分离的抗体（参见例如 Taylor, L. D. 等, Nucl. Acids Res. 20 :6287-6295, (1992) ;或通过包括将人免疫球蛋白基因序列剪接至其它 DNA 序列的任何方法制备、表达、产生或分离的抗体。这类重组人抗体具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。

[0208] 对用于人治疗而言,人抗体具有至少 3 个优于非人抗体和嵌合抗体的优势:

[0209] 1) 由于抗体的效应子部分是人的,因此它可与免疫系统的其它组成部分更好地相互作用(例如通过补体依赖性细胞毒性(CDC)或抗体依赖性细胞毒性(ADCC)更有效地破坏靶细胞);

[0210] 2) 人免疫系统不会视人抗体为外源,因此针对这类注射的抗体的抗体应答小于针对完全外源的非人抗体或部分外源的嵌合抗体的抗体应答;

[0211] 3) 据报道,注射的非人抗体在人循环中的半寿期比人抗体的半寿期短很多。注射的人抗体可具有基本等同于天然存在的人抗体的半寿期,允许给予较少的剂量和较不频繁的剂量。

[0212] 因此,预期完全人抗体使对小鼠 MAb 或小鼠衍生 MAb 固有的免疫原性和变应性反应最小化,从而提高所给予的抗体的功效和安全性。因此,本发明的完全人抗体可用于治疗慢性和复发性疼痛,其治疗需要重复给予抗体。因此,本发明的抗 NGF 抗体的一个具体优势在于抗体是完全人类的,并且可以非急性方式给予患者,同时使通常与人抗小鼠抗体或得自非人类物种的其它前述非完全人抗体有关的有害反应降到最低。

[0213] 本领域的技术人员可将小鼠品系改造成在小鼠抗体产生方面是缺陷型的并具有人 Ig 基因座的大片段,使得这类小鼠在缺乏小鼠抗体的情况下产生人抗体。大的人 Ig 片段可保持大可变基因多样性以及适当调节抗体产生和表达。通过针对抗体多样化和选择及对人蛋白质缺乏免疫耐受性开发小鼠细胞机构,在这些小鼠品系中再生的人抗体库产生针对任何目标抗原(包括人抗原)的高亲和力抗体。采用杂交瘤技术,可产生和选择具有所需特异性的抗原特异性人 MAb。

[0214] 可以利用免疫后能够在缺乏内源性免疫球蛋白产生的情况下产生人抗体的完整库的转基因动物(例如小鼠)。在这类种系突变体小鼠中人种系免疫球蛋白基因阵列的转移可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) ;以及美国专利号 5,877,397、5,874,299、5,814,318、5,789,650、5,770,429、5,661,016、5,633,425、5,625,126、5,569,825 和 5,545,806(所述各文献均通过引用以其整体结合到本文中用于所有目的))。人抗体还可在噬菌体展示文库中产生(Hoogenboom 和 Winter, J. Mol. Biol., 227 :381(1992) ;Marks 等, J. Mol. Biol., 222 :581(1991))。Cole 等人和 Boerner 等人的技术也可用于制备人单克隆抗体(Cole 等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therap, Alan R. Liss, 第 77 页(1985) 和 Boerner 等, J. Immunol., 147(1) :86-95(1991))。

[0215] 还可对重组人抗体进行体外诱变(或当使用人 Ig 序列转基因的动物时,进行体内细胞诱变),因此,重组抗体 VH 区和 VL 区的氨基酸序列是这样的序列,其虽然衍生自与人种系 VH 和 VL 序列相关的序列,但可能在体内并不天然存在于人抗体种系库内。

[0216] 在某些实施方案中,技术人员可在这类小鼠中使用来自非人物种的恒定区连同可变区,以产生嵌合抗体。

[0217] 天然存在的抗体结构

[0218] 天然存在的抗体结构单元通常包含四聚体。这类四聚体的每一个通常由两对相同的多肽链对组成,每对具有一条全长“轻”链(通常分子量约为 25kDa)和一条全长“重”链(通常分子量约为 50-70kDa)。每条轻链和重链的氨基端部分通常包括约 100-110 个或更多个氨基酸的可变区,可变区通常负责抗原识别。每条链的羧基端部分通常界定负责效应子功能的恒定区。人轻链通常被归类为 κ 和 λ 轻链。重链通常被归类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ , 并限定抗体的同种型分别为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。IgG 有几个亚类,包括但不限于 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。IgM 具有包括但不限于 IgM1 和 IgM2 的亚类。类似地将 IgA 再分为亚类,包括但不限于 IgA1 和 IgA2。在全长轻链和重链内,可变区和恒定区通常被约 12 个或更多个氨基酸的“J”区连接,其中重链还包括约 10 多个氨基酸的“D”区。参见例如 FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, 第 7 章,第 2 版 (Paul, W., 主编), 1989, Raven Press, N. Y. (通过引用以其整体结合用于所有目的)。每对轻链/重链对的可变区通常形成抗原结合部位。

[0219] 可变区通常具有相同的通用结构,相对保守的构架区 (FR) 由 3 个超变区 (亦称互补决定区或 CDR) 连接。来自每对的两条链的 CDR 通常通过构架区对准,这可使得能够与特定表位结合。从 N 端到 C 端,链和重链可变区二者通常包含结构域 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。各个结构域氨基酸的分配通常按照以下文献的定义: Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (1987 和 1991, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) ; 或 Chothia 和 Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196 :901-917 ; Chothia 等, 1989, Nature 342 :878-883。

[0220] 双特异性或双功能抗体

[0221] 双特异性或双功能抗体通常为具有两对不同的重链/轻链对和两个不同结合部位的人工杂合抗体。双特异性抗体可通过各种方法产生,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 和 Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79 : 315-321 ; Kostelny 等, 1992, J. Immunol. 148 :1547-1553。

[0222] 抗体制备

[0223] 本发明提供与人 NGF 结合的抗体。这些抗体可通过用全长 NGF 或其片段免疫产生。本发明的抗体可以是多克隆或单克隆抗体和/或可以是重组抗体。在优选的实施方案中,本发明的抗体是通过例如免疫能够产生人抗体的转基因动物制备的人抗体(参见例如国际专利申请公布 W0 93/12227)。

[0224] 本发明抗 NGF 抗体的轻链和重链可变区的互补决定区 (CDR) 可移植至相同物种或另一种物种的构架区 (FR)。在某些实施方案中,抗 NGF 抗体轻链和重链可变区的 CDR 可移植至共有人 FR 中。为了产生共有人 FR, 对若干人重链或轻链氨基酸序列的 FR 进行比对以鉴定共有氨基酸序列。抗 NGF 抗体重链或轻链的 FR 可用不同重链或轻链的 FR 置换。抗 NGF 抗体重链和轻链的 FR 中的稀有氨基酸通常不被置换,而 FR 氨基酸其余部分可被置换。稀有氨基酸是特定氨基酸,其在 FR 的其所不常存在于的位置上。来自本发明抗 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 抗体的组成部分。CDR 移植描述于例如美国专利号 6, 180, 370、5, 693, 762、5, 693, 761、

5, 585, 089 和 5, 530, 101, 所述专利通过引用结合到本文用于任何目的。

[0225] 本发明的抗体优选使用转基因小鼠制备, 该转基因小鼠具有插入小鼠产抗体细胞中的相当部分的产人抗体的基因座, 并被进一步工程改造成在产内源鼠抗体方面的缺陷型。这类小鼠能够产生人免疫球蛋白分子和抗体, 且不产生鼠免疫球蛋白分子和抗体, 或者产生鼠免疫球蛋白分子和抗体的量显著降低。用于实现这个结果的技术公开于本文说明书中公开的专利、申请和参考文献中。在优选的实施方案中, 技术人员可采用国际专利申请公开号 WO 98/24893 中公开的方法, 所述申请通过引用结合到本文用于任何目的。另参见 Mendez 等, 1997, *Nature Genetics* 15:146-156, 所述文献通过引用结合到本文用于任何目的。

[0226] 本发明的单克隆抗体 (mAb) 可通过包括常规单克隆抗体方法在内的各种技术产生, 例如 Kohler 和 Milstein (1975, *Nature* 256:495) 的标准体细胞杂交技术。虽然原则上优选体细胞杂交方法, 但是可采用用于产生单克隆抗体的其它技术, 例如 B 淋巴细胞的病毒或致癌性转化。

[0227] 用于制备杂交瘤的优选动物系统是小鼠。在小鼠中产生杂交瘤是极完善的, 分离经免疫的脾细胞用于融合的免疫方案和技术是本领域众所周知的。融合配偶体 (例如鼠骨髓瘤细胞) 和融合方法也是已知的。

[0228] 在一个优选的实施方案中, 针对 NGF 的人单克隆抗体可用携带部分非小鼠系统的人免疫系统的转基因小鼠产生。这些转基因小鼠, 本文称为 “HuMab” 小鼠, 含有编码未重排人重 (μ 和 γ) 链和 κ 轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因微型基因座, 以及钝化内源 μ 和 κ 链基因座的靶向突变 (Lonberg 等, 1994, *Nature* 368:856-859)。因此, 小鼠显示小鼠 IgM 或 κ 的表达降低, 且在响应免疫时, 导入的人重链和轻链转基因经历类别转换和体细胞突变以产生高亲和力人 IgG κ 单克隆抗体 (Lonberg 等, 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 小鼠的制备详细描述于 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 和 Huszar, 1995, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93; Harding 和 Lonberg, 1995, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764:536-546; Fishwild 等, 1996, *Nature Biotechnology* 14:845-851, 所述全部参考文献的内容均通过引用以其整体结合到本文中。另参见皆为 Lonberg 和 Kay 的美国专利号 5, 545, 806、5, 569, 825、5, 625, 126、5, 633, 425、5, 789, 650、5, 877, 397、5, 661, 016、5, 814, 318、5, 874, 299 和 5, 770, 429 以及 Surani 等人的美国专利号 5, 545, 807; 1993 年 6 月 24 日公布的国际专利申请公开号 W093/1227; 1992 年 12 月 23 日公布的 W0 92/22646; 以及 1992 年 3 月 19 日公布的 W0 92/03918, 所述全部专利的公开内容均通过引用以其整体结合到本文中。或者, 下面实施例描述的 HCo7、HCo12 和 KM 转基因小鼠品系可用来产生人抗 NGF 抗体。

[0229] 本发明提供对有生物活性的人 NGF 多肽有特异性并中和有生物活性的人 NGF 多肽的人单克隆抗体。还提供对 NGF 多肽有高特异性并且与其结合时中和 NGF 多肽的抗体重链和轻链氨基酸序列。这种高特异性能够使抗人 NGF 人抗体和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。

[0230] 在一个方面,本发明提供结合与本文提供的 4D4 抗体相同或基本相同的表位的分离人抗体。

[0231] 在一个方面,本发明提供包含 SEQ ID NO :10、12、14、16、18、20、22、24 和 79-130 所示的至少一个氨基酸序列的分离人抗体,所述抗体以高亲和力结合 NGF 多肽表位,并且具有拮抗 NGF 多肽活性的能力。优选这些抗体结合与本文提供的 4D4 抗体相同或基本相同的表位。

[0232] 在优选的实施方案中,分离人抗体以 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的解离常数 (K_D) 与 NGF 多肽结合,并在体外中和测定中以 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更低的 IC_{50} 抑制 NGF 诱导的存活的。在更优选的实施方案中,分离人抗体以 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 或更低的解离常数 (K_D) 与 NGF 多肽结合,并在体外中和测定中以 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 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 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 或更低的解离常数 (K_D) 与人 NGF 多肽结合,并在体外测定中以 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 IC_{50} 抑制 NGF 诱导的存活。本文提供符合前述结合与中和标准的抗人 NGF 人抗体的实例。

[0233] 本发明最优选的抗人 NGF 人抗体本文亦称 4D4,并具有分别在 SEQ ID NO :12 和 SEQ ID NO :10 中所示的 VL 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。在实施例中特别公开了本发明的抗人 NGF 人抗体的性质。特别值得注意的是本文证实的对 NGF 多肽的高亲和力和拮抗 NGF 多肽活性的强大能力。

[0234] 抗人 NGF 人抗体的解离常数 (K_D) 可通过实施例 9 中概述的表面等离子共振来测定。总的来讲,表面等离子共振分析采用 BIAcore 系统 (Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ),通过表面等离子共振 (SPR) 测量配体 (固定在生物传感器矩阵上的重组 NGF 多肽) 和分析物 (溶液中的抗体) 之间的实时结合相互作用。表面等离子共振分析还可通过固定分析物 (生物传感器矩阵上的抗体) 并提供配体 (溶液中的重组 V) 来进行。还可采用 KinExA 方法测定抗人 NGF 人抗体的解离常数 (K_D)。在本发明的某些实施方案中,与 NGF 结合的抗体的 K_D 介于约 10^{-8}M 和 10^{-12}M 之间。本文所用术语“ K_D ”意思是指特定抗体-抗原相互作用的解离常数。对于本发明的目的,如实施例 9 中所述测定 K_D 。

[0235] 在优选的实施方案中,本发明的抗体是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 同种型抗体。优选抗体是 IgG3 同种型抗体。更优选抗体是 IgG1 同种型抗体。最优选抗体是 IgG2 同种型抗体。在其它实施方案中,本发明的抗体是 IgM、IgA、IgE 或 IgD 同种型抗体。在本发明优选的实施方案中,抗体包含人 κ 轻链和人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重链。在下列实施例中描述了包含 IgG1 或 IgG2 重链恒定区的本发明抗体的表达。在具体的实施方案中,抗体可变区与非 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 同种型的恒定区的恒定区连接。在某些实施方案中,对本发明的抗体进行克隆以在哺乳动物细胞中表达。

[0236] 在某些实施方案中,抗 NGF 抗体的重链和轻链的保守修饰 (和对编码核苷酸的相应修饰) 可产生具有类似于本文公开的抗 NGF 抗体的功能和化学特性的抗 NGF 抗体。相比之下,抗 NGF 抗体的功能和 / 或化学特性的大量修饰可通过选择其对保持以下方面的作用中有显著不同的在重链和轻链的氨基酸序列中的取代来实现:(a) 在取代区域中的分子骨架的结构,例如片层构象或螺旋构象,(b) 靶位点上分子的电荷或疏水性,或 (c) 侧链大小 (bulk)。

[0237] 例如,“保守氨基酸取代”可包括天然氨基酸残基被非天然残基取代,使得对该位置上的氨基酸残基的极性或电荷几乎无作用或无作用。此外,多肽中的任何天然残基还可被丙氨酸取代,正如之前对“丙氨酸扫描诱变”的描述一样。

[0238] 在需要这类取代时,可由本领域技术人员测定所需要的氨基酸取代(不论是保守还是非保守取代)。在某些实施方案中,氨基酸取代可用来鉴定抗 NGF 抗体的重要残基,或增加或降低本文所述抗 NGF 抗体的亲和力。

[0239] 正如众所周知的一样,氨基酸序列中的较小变化例如一个、几个或甚至若干个氨基酸的缺失、添加或取代可导致具有基本相同性质的原始蛋白质的等位基因形式。因此,除本文具体描述的抗体以外,可采用本领域技术人员熟知的各种重组 DNA 技术,容易地设计并制备其它“基本同源的”抗体。总体来说,基因的修饰可容易地通过各种众所周知的技术实现,例如位点定向诱变。因此,本发明预期具有与本文公开的抗 NGF 人抗体基本类似的特征的“变体”或“突变体”抗 NGF 人抗体(参见例如 WO 00/56772,其全部内容在此通过引用结合到本文中)。因此,有关抗 NGF 人抗体的术语“变体”或“突变体”意指任何结合分子(分子 X), (i) 其中总的来说重链的超变区 CDR1、CDR2 和 CDR3 或轻链的超变区 CDR1、CDR2 和 CDR3 分别与 SEQ ID NO :14、18 和 22 或 SEQ ID NO :16、20 和 24 所示超变区有至少 80% 同源性、优选至少 90% 同源性、更优选至少 95% 同源性,和 (ii) 其中变体或突变体能够抑制人 NGF 的活性至与具有与分子 X 相同的构架区的参比抗 NGF 人抗体的相同程度。

[0240] 通常,抗 NGF 人抗体变体具有轻链 CDR 和 / 或重链 CDR,其从整体而言分别与 SEQ ID NO :14、18 和 22 和 / 或 SEQ ID NO :16、20 和 24 所示氨基酸序列有至少约 80% 氨基酸序列同一性、优选至少约 85% 序列同一性、甚至更优选至少约 90% 序列同一性、甚至更优选至少约 91% 序列同一性、甚至更优选至少约 92% 序列同一性、甚至更优选至少约 93% 序列同一性、甚至更优选至少约 94% 序列同一性、甚至更优选至少约 95% 序列同一性、甚至更优选至少约 96% 序列同一性、甚至更优选至少约 97% 序列同一性、甚至更优选至少约 98% 序列同一性、甚至更优选至少约 99% 氨基酸序列同一性。

[0241] 更优选抗 NGF 人抗体变体具有轻链可变区和 / 或重链可变区,所述轻链可变区从整体而言与 SEQ ID NO :12、80、82、84、86、88、89、90 或 91 所示氨基酸序列有至少约 80% 氨基酸序列同一性、甚至更优选至少约 81% 序列同一性、甚至更优选至少约 82% 序列同一性、甚至更优选至少约 83% 序列同一性、甚至更优选至少约 84% 序列同一性、甚至更优选至少约 85% 序列同一性、甚至更优选至少约 86% 序列同一性、甚至更优选至少约 87% 序列同一性、甚至更优选至少约 88% 序列同一性、甚至更优选至少约 89% 序列同一性、甚至更优选至少约 90% 序列同一性、甚至更优选至少约 91% 序列同一性、甚至更优选至少约 92% 序列同一性、甚至更优选至少约 93% 序列同一性、甚至更优选至少约 94% 序列同一性、甚至更优选至少约 95% 序列同一性、甚至更优选至少约 96% 序列同一性、甚至更优选至少约 97% 序列同一性、甚至更优选至少约 98% 序列同一性、甚至更优选至少约 99% 氨基酸序列同一性;从整体而言,所述重链可变区与 SEQ ID NO :10、81、83、85 或 87 所示氨基酸序列有至少约 70% 氨基酸序列同一性、优选至少约 75% 序列同一性、甚至更优选至少约 80% 序列同一性、甚至更优选至少约 81% 序列同一性、甚至更优选至少约 82% 序列同一性、甚至更优选至少约 83% 序列同一性、甚至更优选至少约 84% 序列同一性、甚至更优选至少约 85% 序列同一性、甚至更优选至少约 86% 序列同一性、甚至更优选至少约 87% 序列同一性、甚

至更优选至少约 88% 序列同一性、甚至更优选至少约 89% 序列同一性、甚至更优选至少约 90% 序列同一性、甚至更优选至少约 91% 序列同一性、甚至更优选至少约 92% 序列同一性、甚至更优选至少约 93% 序列同一性、甚至更优选至少约 94% 序列同一性、甚至更优选至少约 95% 序列同一性、甚至更优选至少约 96% 序列同一性、甚至更优选至少约 97% 序列同一性、甚至更优选至少约 98% 序列同一性、甚至更优选至少约 99% 氨基酸序列同一性。

[0242] 有关多核苷酸的“变体”意思是指与本发明的多核苷酸序列有至少约 75% 核酸序列同一性的核酸分子。通常,多核苷酸变体与本文公开的新的核酸序列有至少约 75% 核酸序列同一性、更优选至少约 80% 核酸序列同一性、甚至更优选至少约 81% 核酸序列同一性、甚至更优选至少约 82% 核酸序列同一性、甚至更优选至少约 83% 核酸序列同一性、甚至更优选至少约 84% 核酸序列同一性、甚至更优选至少约 85% 核酸序列同一性、甚至更优选至少约 86% 核酸序列同一性、甚至更优选至少约 87% 核酸序列同一性、甚至更优选至少约 88% 核酸序列同一性、甚至更优选至少约 89% 核酸序列同一性、甚至更优选至少约 90% 核酸序列同一性、甚至更优选至少约 91% 核酸序列同一性、甚至更优选至少约 92% 核酸序列同一性、甚至更优选至少约 93% 核酸序列同一性、甚至更优选至少约 94% 核酸序列同一性、甚至更优选至少约 95% 核酸序列同一性、甚至更优选至少约 96% 核酸序列同一性、甚至更优选至少约 97% 核酸序列同一性、甚至更优选至少约 98% 核酸序列同一性、甚至更优选至少约 99% 核酸序列同一性。

[0243] 在具体的实施方案中,本发明提供与本发明的抗体具有同一性百分比的抗体,或以下抗体,其包含与如本文实施例 10 和图 5-10 所示的本发明的重链可变区、轻链可变区、CDR1、CDR2 或 CDR3 区有同一性百分比的重链可变区、轻链可变区、CDR1、CDR2 或 CDR3 区。

[0244] 在某些实施方案中,本发明提供特异性结合神经生长因子并包含重链和轻链的分离人抗体,其中重链包含重链可变区,重链可变区包含以下氨基酸序列,其:与如 SEQ ID NO:10 所示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% 同一性;与如 SEQ ID NO:81 所示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% 同源性;与如 SEQ ID NO:83 所示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% 同一性;与如 SEQ ID NO:85 所示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 85% 同一性;与如 SEQ ID NO:87 所示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% 同一性;与如 SEQ ID NO:79 所示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% 同一性。

[0245] 在某些实施方案中,本发明提供特异性结合神经生长因子并包含重链和轻链的分离人抗体,其中轻链包含轻链可变区,轻链可变区包含以下氨基酸序列,其:与如 SEQ ID NO:12 所示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% 同一性;与如 SEQ ID NO:80 所示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% 同一性;与如 SEQ ID NO:88 所示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% 同一性;与如 SEQ ID NO:89 所示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% 同一性;与如 SEQ ID NO:90 所示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% 同一性;与如 SEQ ID NO:91

所示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% 同一性；与如 SEQ ID NO :82 所示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% 同一性；与如 SEQ ID NO :84 所示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% 同一性；或与如 SEQ ID NO :86 所示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% 同一性。

[0246] 在某些其它实施方案中，本发明提供特异性结合神经生长因子并包含人重链 CDR1 的分离人抗体，其中重链 CDR1 是以下氨基酸序列，其与如 SEQ ID NO :98、SEQ ID NO :105、SEQ ID NO :110 或 SEQ ID NO :22 所示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% 同一性。

[0247] 在其它实施方案中，本发明提供特异性结合神经生长因子并包含人重链 CDR2 的分离人抗体，其中重链 CDR2 是以下氨基酸序列，其：与如 SEQ ID NO :99 所示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% 同一性；与如 SEQ ID NO :106 所示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% 同一性；与如 SEQ ID NO :18 所示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% 同一性；与如 SEQ ID NO :117 所示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% 同一性；或与如 SEQ ID NO :111 所示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% 同一性。

[0248] 在另外其它的实施方案中，本发明提供特异性结合神经生长因子并包含人轻链 CDR1 的分离人抗体，其中 CDR1 是以下氨基酸序列，其：与如 SEQ ID NO :101 所示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% 同一性；与如 SEQ ID NO :95 所示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% 同一性；与如 SEQ ID NO :119 所示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% 同一性；与如 SEQ ID NO :122 所示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% 同一性；与如 SEQ ID NO :125 所示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% 同一性；与如 SEQ ID NO :24 所示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% 同一性；与如 SEQ ID NO :107 所示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% 同一性；或与如 SEQ ID NO :113 所示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% 同一性。

[0249] 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并包含人轻链 CDR2 的分离人抗体，其中 CDR2 是以下氨基酸序列，其：与如 SEQ ID NO :102 所示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% 同一性；与如 SEQ ID NO :96 所示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% 同一性；与如 SEQ ID NO :120 所示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% 同一性；与如 SEQ ID NO :123 所示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% 同一性；与如 SEQ ID NO :126 所示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% 同一性；与如 SEQ ID NO :129 所示氨基酸

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% 同一性；与如 SEQ ID NO :20 所示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% 同一性；与如 SEQ ID NO :108 所示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% 同一性；与如 SEQ ID NO :133 所示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% 同一性；或与如 SEQ ID NO :114 所示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% 同一性。

[0250] 在其它实施方案中,本发明提供特异性结合神经生长因子并包含人轻链 CDR3 的分离人抗体,其中 CDR3 是以下氨基酸序列,其:与如 SEQ ID NO :103 所示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% 同一性;与如 SEQ ID NO :97 所示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% 同一性;与如 SEQ ID NO :121 所示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% 同一性;与如 SEQ ID NO :127 所示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% 同一性;与如 SEQ ID NO :130 所示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% 同一性;与如 SEQ ID NO :16 所示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% 同一性;与如 SEQ ID NO :109 所示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% 同一性;与如 SEQ ID NO :134 所示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% 同一性;或与如 SEQ ID NO :115 所示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% 同一性。

[0251] 4D4 抗体重链和轻链可变区的序列分别如 SEQ ID NO :10 和 12 中所示。然而,许多可能的 CDR 接触残基经受得起被其它氨基酸取代,并仍允许抗体保留对抗原的基本亲和力。同样地,重链和轻链中不与 CDR 接触的许多构架残基可容纳来自其它人抗体相应位置的氨基酸的取代、被人共有氨基酸取代或来自其它小鼠抗体的相应位置的氨基酸取代,而又不显著丧失人抗体的亲和力或非免疫原性。各种备选氨基酸的选择可用来产生所公开的抗 NGF 抗体及其片段的以下形式,其具有亲和力、特异性、非免疫原性、易于制备和其它所需性质的可变组合。

[0252] 在备选实施方案中,本发明的抗体可在杂交瘤细胞系以外的细胞系中表达。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。按照这些实施方案,可利用将多核苷酸导入宿主细胞的任何已知方法(包括例如将多核苷酸包装在病毒(或病毒载体)中,并用病毒(或载体)转导宿主细胞)或者通过本领域已知转染方法(如美国专利号 4,399,216、4,912,040、4,740,461 和 4,959,455 列举的方法(其全部内容在此通过引用结合到本文中用于任何目的)),实现转化。所用转化方法一般可取决于待转化的宿主。用于将异源多核苷酸导入哺乳动物细胞的方法是本领域众所周知的,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、多核苷酸在脂质体中的包囊化和 DNA 直接显微注射入核中。

[0253] 采用标准连接技术,将编码本发明的 NGF 抗体的重链恒定区、重链可变区、轻链恒定区或轻链可变区的氨基酸序列的核酸分子插入适当的表达载体中。在一个优选的实施方案中,抗 NGF 抗体重链或轻链恒定区附加在合适可变区的 C 端,并与表达载体连接。通常选择在所用的具体宿主细胞中有功能的载体(即载体与宿主细胞机构相容,使得可进行基

因的扩增和 / 或基因的表达)。有关表达载体的综述参见 METH. ENZ. 185 (Goeddel 主编), 1990, Academic Press。

[0254] 用于任何宿主细胞的表达载体通常可含有用于质粒维持和用于外源核苷酸序列的克隆和表达的序列。在某些实施方案中, 统称为“侧翼序列”的这类序列通常包括一个或多个下列核苷酸序列: 启动子、一个或多个增强子序列、复制起点、转录终止序列、含有剪接供体位点和剪接受体位点的完全内含子序列、编码用于多肽分泌的前导序列的序列、核糖体结合位点、聚腺苷酸化序列、用于插入编码待表达的多肽的核酸的多接头区和选择标记元件。下面论述了这些序列的每一种。

[0255] 载体任选可含有“标签”编码序列, 即位于抗 NGF 抗体多肽编码序列 5' 端或 3' 端的寡核苷酸分子; 寡核苷酸序列编码聚 His (例如六聚 His) 或另一“标签”例如 FLAG、HA (血凝素流感病毒 (hemagglutinin influenza virus)) 或 myc (存在针对其的市售抗体)。这种标签通常在多肽表达时与多肽融合, 并且可用作从宿主细胞中亲和纯化或检测 NGF 抗体的手段。亲和纯化可通过例如用抗标签的抗体作为亲和基质的柱层析法来实现。任选随后可通过各种方法 (例如使用用于切割的某些肽酶), 从纯化的抗 NGF 抗体多肽除去标签。

[0256] 侧翼序列可以是同源的 (即来自与宿主细胞相同的物种和 / 或品系)、异源的 (即来自非宿主细胞物种或品系的物种)、杂合的 (即来自不止一种来源的侧翼序列的组合)、合成的或天然的。因此, 侧翼序列的来源可以是任何原核生物或真核生物、任何脊椎生物或无脊椎生物或任何植物, 条件是侧翼序列在宿主细胞机构中是有功能的, 并可被宿主细胞机构激活。

[0257] 可用于本发明载体的侧翼序列可通过本领域众所周知的若干方法的任一种获得。通常, 先前已通过作图和 / 或通过限制性内切核酸酶消化来鉴定本文可用的侧翼序列, 因此可使用合适的限制性内切核酸酶将其从合适的组织来源中分离出来。在一些情况下, 侧翼序列的完全核苷酸序列可以是已知的。在此, 侧翼序列可采用本文描述的用于核酸合成或克隆的方法来合成。

[0258] 不论侧翼序列的全部是已知的还是仅一部分是已知的, 都可使用聚合酶链式反应 (PCR) 和 / 或通过用合适的探针 (例如来自相同物种或另一物种的寡核苷酸和 / 或侧翼序列片段) 筛选基因组文库获得。如果侧翼序列是未知的, 则可从可含有例如编码序列或甚至从另一种或多种基因的较大片 DNA 中分离含有侧翼序列的 DNA 片段。可通过限制性内切核酸酶消化以产生合适的 DNA 片段, 接着采用琼脂糖凝胶纯化、Qiagen[®] 柱层析法 (Chatsworth, CA) 或技术人员已知的其它方法进行分离, 来实现分离。实现该目的合适酶的选择对于本领域普通技术人员而言是很显而易见的。

[0259] 复制起点通常是市面上购买的那些原核表达载体的一部分, 该复制起点有助于载体在宿主细胞中扩增。如果选定的载体不含复制起点位点, 则可根据已知序列以化学法合成一个, 并与载体连接。例如, 质粒 pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) 的复制起点适于大多数革兰氏阴性菌, 而各种病毒起点 (例如 SV40、多瘤病毒、腺病毒、水泡性口炎病毒 (VSV) 或乳头瘤病毒例如 HPV 或 BPV) 可用于在哺乳动物细胞中克隆载体。对于哺乳动物表达载体, 一般不需要复制起点成分 (例如常常使用 SV40 起点, 因为它还含有病毒早期启动子)。

[0260] 转录终止序列通常位于多肽编码区的 3' 端, 并用于终止转录。原核细胞中的转录

终止序列通常是富含 G-C 的片段接着是聚 T 序列。虽然该序列易从文库克隆或甚至在市面上购买作为载体的部分,但是它还可容易采用核酸合成方法例如本文描述的核酸合成方法合成。

[0261] 选择标记基因编码生长在选择性培养基中的宿主细胞存活和生长所必需的蛋白质。典型的选择标记基因编码以下蛋白质,其:(a) 赋予原核宿主细胞对抗生素或其它毒素(例如氨苄西林、四环素或卡那霉素)的抗性;(b) 补充细胞的营养缺陷;或(c) 供给从复合培养基或确定成分培养基中不可得到的关键营养物。优选的选择标记为卡那霉素抗性基因、氨苄西林抗性基因和四环素抗性基因。有利的是,新霉素抗性基因也可用于在原核和真核宿主细胞两者中进行选择。

[0262] 其它选择基因可用于来扩增将要表达的基因。扩增是其中基因在重组细胞连续世代的染色体前后重复的过程,所述基因是产生对生长或细胞存活至关重要的蛋白质所必需的。用于哺乳动物细胞的合适选择标记的实例包括二氢叶酸还原酶(DHFR)和无启动子的胸苷激酶基因。将哺乳动物细胞转化体置于选择压力下,其中仅转化体由于存在于载体中的选择基因而唯一适于存活。通过在培养基中选择剂的浓度逐步增加的条件,培养转化细胞,来施加选择压力,从而导致选择基因和编码另一基因(例如与 NGF 多肽结合的抗体)的 DNA 两者扩增。结果,从扩增的 DNA 中合成增加量的多肽(例如抗 NGF 抗体)。

[0263] 核糖体结合位点通常是 mRNA 翻译起始所必需的,且特征在于 Shine-Dalgarno 序列(原核生物)或 Kozak 序列(真核生物)。该元件通常位于启动子的 3' 和待表达多肽的编码序列的 5'。

[0264] 在一些情况下,例如在真核宿主细胞表达系统中需要糖基化时,可操作各种前序列(presequence)或序列原(prosequence)以改进糖基化或产量。例如,可以改变特定信号肽的肽酶切割位点,或加入还可影响糖基化的序列原。最终的蛋白质产物可在 -1 位置(相当于成熟蛋白质的第一氨基酸)上具有易发生表达的一个或多个额外氨基酸,其可不被完全除去。例如,最终的蛋白质产物可具有与氨基端连接的存在于肽酶切割位点上的一个或两个氨基酸残基。或者,如果酶在成熟多肽内切割这类区域,则一些酶切割位点的使用可产生所需多肽的稍微截短的形式。

[0265] 本发明的表达和克隆载体通常可含有被宿主生物识别并与编码抗 NGF 抗体的分子有效连接的启动子。启动子是非转录序列,位于控制结构基因转录的结构基因(一般在约 100-1000bp 的范围内)的起始密码子的上游(即 5')。按惯例将启动子归类为两类中的一种:诱导型启动子和组成型启动子。诱导型启动子在响应培养条件的一些变化(例如存在或缺乏营养物或温度改变)时,启动在其控制下的自 DNA 的增加水平的转录。另一方面,组成型启动子一致转录与之有效连接的基因,也就是说,对基因表达几乎没有控制或没有控制。被各种潜在宿主细胞识别的很多启动子是众所周知的。通过用限制性内切酶消化移出来源 DNA 的启动子,并将所需启动子序列插入载体,使合适的启动子与编码构成本发明抗 NGF 抗体的重链或轻链的 DNA 有效连接。

[0266] 与酵母宿主一起使用的合适启动子也是本领域众所周知的。酵母增强子有利地与酵母启动子一起使用。与哺乳动物宿主细胞一起使用的合适启动子是众所周知的,包括但不限于得自病毒基因组的启动子,所述病毒例如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(例如腺病毒 2)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、反转录病毒、乙型肝炎病毒,最优选猿猴病

毒 40 (SV40)。其它合适的哺乳动物启动子包括异源哺乳动物启动子,例如热激启动子和肌动蛋白启动子。

[0267] 可感兴趣的其它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);包含在劳斯肉瘤病毒的 3' 长末端重复序列中的启动子 (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 (metallothionine) 基因的启动子和调节序列 (Brinster 等,1982, *Nature* 296:39-42);以及原核启动子,例如 β -内酰胺酶启动子 (Villa-Kamaroff 等,1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 75:3727-31);或 tac 启动子 (DeBoer 等,1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 80:21-25)。同样感兴趣的是具有组织特异性并已用于转基因动物的下列动物转录调控区:在胰腺腺泡细胞中有活性的弹性蛋白酶 I 基因调控区 (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 β 细胞中有活性的胰岛素基因调控区 (Hanahan,1985, *Nature* 315:115-22);在淋巴样细胞中有活性的免疫球蛋白基因调控区 (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肿瘤病毒调控区 (Leder 等,1986, *Cell* 45:485-95);在肝中有活性的白蛋白基因调控区 (Pinkert 等,1987, *Genes and Devel.* 1:268-76);在肝中有活性的甲胎蛋白基因调控区 (Krumlauf 等,1985, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1639-48;Hammer 等,1987, *Science* 235:53-58);在肝中有活性的 α 1-抗胰蛋白酶基因调控区 (Kelsey 等,1987, *Genes and Devel.* 1:161-71);在髓样细胞中有活性的 β -珠蛋白基因调控区 (Mogram 等,1985, *Nature* 315:338-40;Kollias 等,1986, *Cell* 46:89-94);在脑少突胶质细胞中有活性的髓磷脂碱性蛋白质基因调控区 (Readhead 等,1987, *Cell* 48:703-12);在骨髓肌中有活性的肌球蛋白轻链-2 基因调控区 (Sani,1985, *Nature* 314:283-86);以及在丘脑下部有活性的促性腺素释放素基因调控区 (Mason 等,1986, *Science* 234:1372-78)。

[0268] 可将增强子序列插入载体中以通过高等真核生物增加编码构成本发明抗 NGF 抗体的轻链或重链的 DNA 的转录。增强子是作用于启动子以增加转录的 DNA 的顺式作用元件,长度通常约为 10-300bp。增强子是相对的方向和位置独立性的,已在转录单元的 5' 和 3' 位置二者发现增强子。已知可获自哺乳动物基因的若干增强子序列(例如珠蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)。然而,通常使用来自病毒的增强子。本领域已知的 SV40 增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、多瘤病毒增强子和腺病毒增强子是真核启动子活化的示例性增强元件。虽然增强子在载体中可定位于编码序列的 5' 或 3',但通常位于启动子的位点 5' 上。

[0269] 本发明的表达载体可从起始载体(例如市售载体)构建。这类载体可含有或可不含所有所需的侧翼序列。如果本文所述侧翼序列的一个或多个并非已存在于载体中,则将其单独获得并与载体连接。本领域技术人员熟知用于获得各个侧翼序列的方法。

[0270] 在构建载体以及将编码构成抗 NGF 抗体的轻链、重链或轻链和重链的核酸分子插入载体的适当位点后,可将已完成的载体插入合适的宿主细胞中用于扩增和/或多肽表达。将抗 NGF 抗体的表达载体转化至所选宿主细胞中可通过众所周知的方法实现,包括转

染、感染、磷酸钙共沉淀、电穿孔、显微注射、脂转染、DEAE-葡聚糖介导的转染或其它已知的技术。所选方法部分可随待使用的宿主细胞的类型而变化。这些方法和其它合适方法为技术人员所熟知,参见例如 Sambrook 等,同上。

[0271] 宿主细胞当培养在适当条件下时合成抗 NGF 抗体,抗 NGF 抗体随后可从培养基收集(如果宿主细胞将其分泌到培养基中)或直接从其生产宿主细胞中收集(如果不分泌的话)。合适宿主细胞的选择可取决于各种因素,例如所需表达水平、活性所需要或必需的多肽修饰(例如糖基化或磷酸化)和折叠成生物活性分子的容易程度。

[0272] 可用作用于表达的宿主的哺乳动物细胞系是本领域众所周知的,包括但不限于可获自美国典型培养物保藏中心(ATCC)的永生化细胞系,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)和多种其它细胞系。在某些实施方案中,可通过测定哪些细胞系具有高的表达水平和组成型产生具有 NGF 结合性质的抗体来选择细胞系。在另一个实施方案中,可选择来自不产生自身抗体但却具有产生和分泌异源抗体的 B 细胞谱系的细胞系。

[0273] 本发明的抗体可用于检测生物样品中的 NGF,并鉴定产生 NGF 蛋白的细胞或组织。与 NGF 特异性结合的本发明抗体可用于治疗 NGF 介导的疾病。所述抗体可用于结合测定法以检测 NGF 并防止 NGF 与 NGF 受体形成复合物。与 NGF 结合并阻断与其它结合化合物相互作用的所述抗体可在调节 NGF 介导的疾病中具有治疗用途。在优选的实施方案中,抗 NGF 抗体可阻断 NGF 与其受体结合,这可导致 NGF 诱导的信号转导级联中断。

[0274] 本发明还涉及一种或多种本发明的抗体在制备用于治疗患者的由 NGF 表达增加或对 NGF 的敏感性增强引起的疼痛病症或病况(例如本文公开的任一种病症或病况)的药物中的用途。

[0275] 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的抗体以及药学上可接受的稀释剂、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,提供包含治疗有效量的抗 NGF 抗体的药物组合物。

[0276] 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。

[0277] 在某些实施方案中,药物组合物可含有用于改进、保持或维持例如 pH、摩尔渗透压浓度、粘度、澄清度、颜色、等渗性、气味、无菌度、稳定性、溶出速率或释放速率、组合物的吸收或渗透的制剂材料。在这类实施方案中,合适的制剂材料包括但不限于氨基酸(例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸);抗微生物剂;抗氧化剂(例如抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠);缓冲剂(例如硼酸盐、碳酸氢盐、Tris-HCl、柠檬酸盐、磷酸盐或其它有机酸);膨胀剂(例如甘露醇或甘氨酸);螯合剂(例如乙二胺四乙酸(EDTA));络合剂(例如咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、 β -环糊精或羟丙基- β -环糊精);填充剂;单糖、双糖和其它糖(例如葡萄糖、甘露糖或糊精);蛋白质(例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白);着色剂、矫味剂和稀释剂;乳化剂;亲水聚合物(例如聚乙烯吡咯烷酮);低分子量多肽;成盐反荷离子(例如钠);防腐剂(例如苯扎氯铵、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯己定、山梨酸或过氧化氢);溶剂(例如甘油、丙二醇或聚乙二醇);糖醇(例如甘露醇或山梨糖醇);助悬剂;表面活性剂或润湿剂(例如 pluronic、

PEG、脱水山梨糖醇酯、聚山梨酯例如聚山梨酯 20、聚山梨酯 80、triton、氨丁三醇、卵磷脂、胆固醇、四丁酚醛)；稳定性提高剂(例如蔗糖或山梨糖醇)；张力增强剂(例如碱金属卤化物，优选氯化钠或氯化钾、甘露醇、山梨糖醇)；递送溶媒；稀释剂；赋形剂和/或药用佐剂。参见 REMINGTON' S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 第 18 版, (A. R. Gennaro, 主编), 1990, Mack Publishing Company。

[0278] 在某些实施方案中, 本领域的技术人员可根据例如预期给药途径、递送方式和所需剂量, 确定最佳的药物组合物。参见例如 REMINGTON' S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 同上。在某些实施方案中, 这类组合物可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率。

[0279] 在某些实施方案中, 药物组合物中的主要溶媒或载体在性质上可以是含水或无水的。例如, 合适的溶媒或载体可以是注射用水、生理盐水溶液或人工脑脊液, 可能补充了胃肠外给予的组合物中常用的其它物质。中性缓冲盐水或与血清白蛋白混合的盐水也是示例性溶媒。在优选的实施方案中, 本发明的药物组合物包含约 pH 7.0-8.5 的 Tris 缓冲剂或约 pH 4.0-5.5 的乙酸盐缓冲剂, 并且还可包含山梨糖醇、蔗糖、Tween-20 和/或其合适的代用品。在本发明的某些实施方案中, 可通过将选定的具有所需纯度的组合物与任选的调配剂 (formulation agent) (REMINGTON' S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 同上) 混合, 以冻干饼或水溶液形式制备抗 NGF 抗体组合物用于贮存。此外, 在某些实施方案中, 可使用合适的赋形剂(例如蔗糖), 将抗 NGF 抗体制品配制成冻干物。

[0280] 可选择用于胃肠外递送的本发明的药物组合物。或者, 可选择用于吸入或通过消化道递送(例如口服)的组合物。这类药学上可接受的组合物的制备属于本领域的技术。

[0281] 制剂成分优选以给药部位可接受的浓度存在。在某些实施方案中, 使用缓冲剂以保持组合物在生理 pH 或略微较低的 pH 下, 通常在约 5-约 8 的 pH 范围内。

[0282] 预期胃肠外给予时, 用于本发明的治疗组合物可以在药学可接受的溶媒中包含所需抗 NGF 抗体的无热原、胃肠外可接受的水溶液形式提供。胃肠外注射的特别合适的溶媒是无菌蒸馏水, 其中抗 NGF 抗体配成无菌的适当防腐的等渗溶液。在某些实施方案中, 制备可包括所需分子与以下物质一起配制: 例如可注射微球、可生物蚀解的颗粒、聚合物(例如聚乳酸或聚乙醇酸)、珠粒或脂质体, 其可提供可通过积存注射递送的制品的控释或缓释。在某些实施方案中, 还可使用具有在循环中延长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所需的抗体分子。

[0283] 可配制用于吸入的本发明的药物组合物。在这些实施方案中, 抗 NGF 抗体有利地配成干的吸入粉末。在优选的实施方案中, 抗 NGF 抗体吸入溶液还可与抛射剂一起配制用于气雾剂递送。在某些实施方案中, 可使溶液雾化。在国际专利申请号 PCT/US94/001875 中进一步描述了肺部给予和为此的配制方法, 所述申请通过引用予以结合并描述了化学修饰蛋白质的肺部递送。

[0284] 还预期可口服给予制剂。可与或不与通常用于固体剂型(例如片剂和胶囊剂)的复合中的载体一起配制以这种方式给予的抗 NGF 抗体。在某些实施方案中, 胶囊可设计成在胃肠道的当生物利用度最大化且系统前降解最小化的点上释放制剂的活性部分。可包括促进抗 NGF 抗体吸收的其它物质。还可使用稀释剂、矫味剂、低熔点蜡、植物油、润滑剂、助悬剂、片剂崩解剂和粘合剂。

[0285] 优选提供包含有效量的一种或多种抗 NGF 抗体与适于制备片剂的无毒赋形剂的混合物的本发明药物组合物。可通过将片剂溶于无菌水或另一种合适的溶媒中,制备呈单位剂型的溶液剂。合适的赋形剂包括但不限于惰性稀释剂,例如碳酸钙、碳酸钠或碳酸氢钠、乳糖或磷酸钙;或粘合剂,例如淀粉、明胶或阿拉伯树胶;或润滑剂,例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。

[0286] 其它药物组合物对于本领域技术人员而言是显然的,包括呈持续递送或受控递送制剂的含有抗 NGF 抗体的制剂。用于配制各种其它持续递送或受控递送手段(例如脂质体载体、可生物蚀解的微粒或多孔珠粒和长效注射剂)的技术,也是本领域技术人员已知的。参见例如国际专利申请号 PCT/US93/00829,所述专利通过引用予以结合并描述了用于递送药物组合物的多孔聚合物微粒的控释。缓释制剂可包括呈成型制品形式的半渗透聚合物基质,例如膜剂或微囊剂。缓释基质可包括聚酯、水凝胶、聚丙烯交酯(如美国专利号 3,773,919 和欧洲专利申请公开号 EP 058481 所公开的,所述各专利通过引用予以结合)、L-谷氨酸和 L-谷氨酸 γ 乙酯的共聚物(Sidman 等,1983,Biopolymers 22:547-556)、聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)(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,同上)或聚-D(-)-3-羟基丁酸(欧洲专利申请公开号 EP 133,988)。缓释组合物还可包括可通过本领域已知的若干方法的任一种制备的脂质体。参见例如 Eppstein 等,1985,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692;欧洲专利申请公开号 EP 036,676、EP 088,046 和 EP 143,949,其通过引用予以结合。

[0287] 用于体内给予的药物组合物通常作为无菌制剂提供。可通过无菌滤膜过滤实现灭菌。在组合物为冻干的时,采用这种方法的灭菌可在冻干和复溶之前或之后进行。用于胃肠外给予的组合物可以冻干形式或以溶液剂保存。一般将胃肠外组合物放置在有无菌入口的容器中,例如具有可被皮下注射针刺穿的塞子的静脉注射溶液袋或小瓶。

[0288] 一旦配成药物组合物,则可将其作为溶液剂、混悬剂、凝胶剂、乳剂、固体剂或脱水粉末或冻干粉末保存在无菌小瓶中。这类制剂可以随时可用的形式或以在给予前复溶的形式(例如冻干形式)保存。

[0289] 本发明还提供用于生产单剂量给药单位的药盒。本发明的药盒可各自包括装有干燥蛋白质的第一容器和装有含水制剂的第二容器两者。在本发明的某些实施方案中,提供包括单室和多室预灌装注射器(例如液体注射器和 lyosyringe)的药盒。

[0290] 治疗上要使用的含有抗 NGF 抗体的药物组合物的有效量可取决于例如治疗背景和治疗目的。本领域的技术人员应理解的是,用于治疗的适当剂量水平将部分随所递送的分子、使用抗 NGF 抗体所针对的适应症、给药途径和患者尺寸(体重、体表面或器官大小)和/或状况(年龄和一般健康状况)而变化。在某些实施方案中,临床医生可滴定剂量,并修改给药途径以获得最佳治疗效果。典型剂量的范围可为约 0.1 μ g/kg 至最高约 30mg/kg 或更高,这取决于上述因素。在优选的实施方案中,剂量的范围可为 0.1 μ g/kg 至最高约 30mg/kg;更优选为 1 μ g/kg 至最高约 30mg/kg;或甚至更优选 5 μ g/kg 至最高约 30mg/kg。

[0291] 在某些实施方案中,组合物可通过皮下注射给予。如上所述,剂量可由临床医生确定,然而,在某些实施方案中,待通过皮下注射给予的组合物中的 NGF 抗体的药理学上有有效量为约 0.1 μ g/kg 至最高约 30mg/kg。在某些实施方案中,NGF 抗体的药理学上有有效量为约 3mg/皮下注射-约 30mg/皮下注射。在某些实施方案中,给药包括多次皮下注射。在另外其它

的实施方案中,给药包括单次皮下注射。

[0292] 给药频率将取决于所用制剂中具体抗 NGF 抗体的药代动力学参数。通常,临床医生给予组合物直到达到获得所需效果的剂量。因此,可接单剂量、或者随时间按两剂或更多剂(其可含或不含相同量的所需分子)、或者按通过植入装置或导管连续输注,来给予组合物。合适剂量的进一步精细化由本领域普通技术人员常规进行,并属于他们日常进行的工作范围。可通过使用合适的剂量反应数据来确定合适的剂量。在某些实施方案中,可在整个延长时期内给予患者本发明的抗体。本发明抗体的长期给予使常与在非人动物中针对人抗原产生的抗体(例如非人物种中产生的非完全人抗体)有关的不良免疫应答或变应性应答降到最小。

[0293] 药物组合物的给药途径与已知方法一致,例如口服;通过经静脉内、腹膜内、脑内(实质内)、脑室内、肌内、眼内、动脉内、门静脉内或损害内途径注射;通过缓释系统或通过植入装置。在某些实施方案中,组合物可通过推注给予或通过输注或通过植入装置连续给予。

[0294] 还可通过植入在其上已吸收或包封所需分子的膜、海绵或另一合适材料,局部给予组合物。在其中使用植入装置的某些实施方案中,可将该装置植入任何合适的组织或器官中,并可通过扩散、定时释药推注或连续给予递送所需分子。

[0295] 在某些实施方案中,本发明涉及治疗由神经生长因子(NGF)的表达增加或对 NGF 的敏感性增强引起的病况的方法,所述方法包括口服;通过静脉内、腹膜内、脑内(实质内)、脑室内、肌内、眼内、动脉内、门静脉内、损害内或皮下途径注射;通过缓释系统或通过植入装置给予患者药学上有效量的 NGF 抗体,其中所述病况为急性疼痛、牙痛、创伤疼痛、手术疼痛、由截肢或脓肿引起的疼痛、灼痛、脱髓鞘病、三叉神经痛、癌症、慢性酒精中毒、中风、丘脑性疼痛综合征、糖尿病、获得性免疫缺陷综合征(“AIDS”)、毒素、化学治疗、普通头痛、偏头痛、丛集性头痛、混合型血管综合征或非血管综合征、紧张性头痛、全身炎症、关节炎、风湿性疾病、狼疮、骨关节炎、纤维肌痛、炎症性肠病症、肠易激综合征、炎症性眼病、炎症性或不稳定性膀胱病、银屑病、具有炎性组分的皮肤疾病、晒伤、心脏炎、皮炎、肌炎、神经炎、胶原血管病、慢性炎性病况、炎症性疼痛和相关痛觉过敏和异常性疼痛、神经性疼痛和相关痛觉过敏或异常性疼痛、糖尿病神经病变性疼痛、灼痛、交感神经维持性疼痛、传入神经阻滞综合征、哮喘、上皮组织损伤或功能障碍、单纯疱疹、呼吸区、泌尿生殖区、胃肠区或血管区内脏运动失调、创伤、烧伤、变应性皮肤反应、瘙痒、白癜风、普通胃肠病症、结肠炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、血管运动性鼻炎或变应性鼻炎或支气管病症、痛经、消化不良、胃食管反流、胰腺炎或内脏痛。

[0296] 在某些实施方案中,方法包括药学上有效量的 NGF 抗体并可用于治疗或预防骨关节炎膝痛。在某些实施方案中,NGF 抗体的药学上有效量为约 3mg/皮下注射 - 约 30mg/皮下注射。在某些实施方案中,给药包括多次皮下注射。在实施方案中,给药包括单次皮下注射。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法包含 NGF 抗体,其包含含有 SEQ ID NO. 44 的轻链。在某些实施方案中,NGF 抗体包含含有 SEQ ID. NO. 40 的重链。在其它实施方案中,NGF 抗体包含含有 SEQ ID NO. 44 的轻链和含有 SEQ ID. NO. 40 的重链。

[0297] 因此,按照本发明上面的描述,本发明在各个方面涉及包含 NGF 抗体的方法和组合物,所述抗体包含含有 SEQ ID NO :44 的轻链和含有 SEQ ID NO :40 的重链,其中抗体的重

链和轻链通过柔性接头连接形成单链抗体。在这个方面的一些实施方案中, NGF 抗体包含单链 Fv 抗体、Fab' 抗体、(Fab')₂ 抗体、完全人抗体和 / 或人源化抗体。在这个方面的一些实施方案中, NGF 抗体抑制 NGF 信号转导。

[0298] 在这个方面的某些实施方案中, NGF 抗体从人 NGF 多肽上解离的 K_D 为约 1x10⁻⁹ 或更低、约 1x10⁻¹⁰ 或更低或者约 1x10⁻¹¹ 或更低。在这个方面的某些实施方案中, 在标准体外测定中, NGF 抗体中和人 NGF 生物活性的 IC₅₀ 为约 1x10⁻⁸ 或更低、约 1x10⁻⁹ 或更低或者约 0. 2x10⁻⁹ 或更低。在某些实施方案中, NGF 抗体以上述 K_D 值从人 NGF 多肽上解离, 并且在标准体外测定中以上述 IC₅₀ 值中和人 NGF 生物活性。

[0299] 离体使用本发明的抗 NGF 抗体药物组合物也可以是适宜的。在这种情况下, 将取自患者的细胞、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 / 或器官植入回到患者中。

[0300] 具体地讲, 可通过植入已采用诸如本文描述的方法等方法遗传工程改造以表达和分泌多肽的某些细胞, 来递送抗 NGF 抗体。在某些实施方案中, 这类细胞可以是动物或人细胞, 且可为自体的、异源的或异种的。在某些实施方案中, 可使细胞永生化。在其它实施方案中, 为了降低免疫应答的可能性, 可将细胞包封以避免浸润周围组织。在另外的实施方案中, 包封材料通常是生物相容性的半渗透高分子封装物或膜, 其允许释放蛋白质产物但防止通过患者免疫系统或通过周围组织的其它有害因子破坏细胞。

实施例

[0301] 下列实施例 (包括所进行的实验和得到的结果) 仅供说明目的, 并不得解释为限制本发明。

[0302] 实施例 1

[0303] 自大肠杆菌细胞产生人 NGF 蛋白

[0304] rHu-NGF (1-120) 的克隆

[0305] 采用具有如 SEQ ID NO :27 和 SEQ ID NO :28 所示序列的寡核苷酸引物和标准 PCR 技术, 由 cDNA 扩增编码人 NGF 的核苷酸序列。5' 引物产生 NdeI 限制位点和紧接成熟序列密码子 1 (丝氨酸) 之前的甲硫氨酸起始密码子。3' 引物产生紧接终止密码子后的 BamHI 限制位点。所得 PCR 产物经凝胶纯化, 用限制性内切核酸酶 NdeI 和 BamHI 消化, 然后连接至同样用 NdeI 和 BamHI 消化的载体 pCFM1656 中。连接的 DNA 转化至大肠杆菌菌株 657 的感受态宿主细胞。根据产生重组蛋白产物及具有有正确核苷酸序列 (即 SEQ ID NO :29) 的质粒的能力筛选克隆。重组人 NGF 1-120 的氨基酸序列如 SEQ ID NO :30 所示。

[0306] 表达载体 pCFM1656 (ATCC #69576) 来源于美国专利号 4, 710, 473 描述的表达载体系统。pCFM1656 质粒可通过以下步骤自所述 pCFM836 质粒 (专利号 4, 710, 473) 衍生: (a) 通过用 T4 聚合酶末端补平, 接着通过平端连接破坏 2 个内源性 NdeI 限制位点; (b) 含有合成 PL 启动子的独特的 AatII 和 ClaI 限制位点之间的 DNA 序列用获自含有 PL 启动子的 pCFM636 (专利号 4, 710, 473) 的类似片段置换, 然后 (c) 独特的 ClaI 和 KpnI 限制位点之间的小 DNA 序列用由具有如 SEQ ID NO :31 和 SEQ ID NO :32 所示核苷酸序列的两个探针退火产生的寡核苷酸替换。

[0307] 大肠杆菌 K12 宿主菌株 (Amgen 菌株 657) 为获自大肠杆菌品种中心 (E. coli

Genetic Stock Center), Yale University, New Haven, CT (CGSC 菌株 6159) 的大肠杆菌 W1485 (K12 菌株) 的衍生株。

[0308] rHu-NGF(1-120) 的表达

[0309] 将含有 NGF 表达构建体的大肠杆菌细胞 (如上所述) 以补料分批方式在丰富的培养基中发酵。使细胞在 30°C 下生长至 600nm 的 OD 为 49, 然后通过改变温度至 42°C 诱导。诱导后 4 小时通过离心收获细胞。最终的 OD 为 75。测定表达产量约为 0.15g/L。

[0310] rHu-NGF(1-120) 的重折叠和纯化

[0311] 将细胞糊在微流化器 (Microfluidizer) 中裂解, 以 10,000Xg 离心 30 分钟, 沉淀用 1% 脱氧胆酸洗涤, 如上所述进行离心, 所得沉淀然后用冷水洗涤后, 再离心。将所得沉淀 (WIB- 经洗涤的包含体) 重新悬于含有 10mM DTT 的变性剂 8M 胍 HCl、50mM Tris pH 8.5 中, 在室温下增溶 1 小时, 以 10,000xg 离心 30 分钟, 小心地倾析上清液, 然后在 4°C 下在含有氧化还原偶的水性缓冲液中稀释 25 倍达 5 天。然后滴定所得重折叠物至 pH 3.0, 经 0.45uM 过滤器过滤。使用标准 NaCl 梯度, 用 Sp-Sepharose 快流速柱纯化重折叠物。随后对阳离子交换柱的合并物进行浓缩, 将等分试验在 -80°C 下冷冻。蛋白质的纯化用 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 评价, 用考马斯蓝染色分析。通过该方法, 纯化的蛋白质多于 90% 主带。

[0312] 实施例 2

[0313] 抗神经生长因子 (NGF) 的人单克隆抗体的产生

[0314] 转基因 HuMab 和 KM 小鼠

[0315] 使用各自表达人抗体基因的转基因小鼠 HCo7、HCo12、HCo7+HCo12 和 KM 品系, 制备抗 NGF 的完全人单克隆抗体。在这些小鼠品系的每个中, 按照 Chen 等人 (1993, EMBO J. 12 : 811-820) 所述, 以纯合子方式破坏内源性小鼠 κ 轻链基因, 并且按照国际专利申请公开号 WO 01/09187 的实施例 1 (通过引用予以结合) 中所述, 以纯合子方式破坏内源性小鼠重链基因。这些小鼠品系每个都携带如 Fishwild 等人 (1996, Nature Biotechnology 14 : 845-851) 描述的人 κ 轻链转基因 KCo5。HCo7 品系携带美国专利号 5,545,806、5,625,825 和 5,545,807 (通过引用予以结合) 中描述的 HCo7 人重链转基因。HCo12 品系携带国际专利申请公开号 WO 01/09187 的实施例 2 (通过引用予以结合) 中描述的 HCo12 人重链转基因。HCo7+HCo12 品系既携带 HCo7 又携带 HCo12 重链转基因, 且对于各转基因都是半合子的。KM 小鼠包含 Tomizuka 等人 (1997, Nature Genet. 16, 133-143 和 2000, Proc. Natl. Acad. Sci, 97, 722-727) 描述的 SC20 重链转基因。该转基因不整合至小鼠染色体, 而是作为独立的染色体片段增殖。该片段包括约 15MB 的人染色体 14。它含有包括全部 VH、D 和 JH 基因区段及全部重链恒定区同种型的完整人重链基因座。所有这些品系在本文皆称为 HuMab 小鼠。

[0316] HuMab 免疫 :

[0317] 为了产生抗 NGF 的完全人单克隆抗体, 用来源于大肠杆菌细胞的纯化的重组 NGF 作为抗原免疫 HuMab 小鼠 (实施例 1)。HuMab 小鼠的通用免疫方案参见 Lonberg 等 (1994, Nature 368 : 856-859 ; Fishwild 等, 同上 ; 以及国际专利申请公开号 WO 98/24884, 各文献的教导通过引用予以结合)。小鼠在第一次抗原输注时为 6-16 周龄。NGF 抗原的纯化的重组制剂 (25-100 μ g) 用来腹膜内 (IP) 或皮下 (SC) 免疫 HuMab 小鼠。

[0318] 使用弗氏完全佐剂中的抗原和 2 次注射, 接下来的 2-4 周用弗氏不完全佐剂中的

抗原 IP 免疫（多达共 9 次免疫），来完成 HuMab 转基因小鼠的免疫。对于各抗原，免疫数打小鼠。HCo7、HCo12、HCo7+HCo12 和 KM 品系共 118 只小鼠用 NGF 抗原免疫。通过眶后放血监测免疫应答。

[0319] 为了选择产生结合人 NGF 的抗体的 HuMab 小鼠，按照 Fishwild 等人（同上）所述，通过 ELISA 检测免疫小鼠的血清。简而言之，微量滴定板用 1-2 $\mu\text{g/mL}$ PBS 中的大肠杆菌的纯化的重组 NGF（实施例 1）包被，以 50 μL /孔在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下温育过夜，然后用 200 μL /孔 PBS/Tween(0.05%) 中的 5% 鸡血清封闭。将 NGF 免疫小鼠的血浆稀释物加到各孔中，在环境温度下温育 1-2 小时。各板用 PBS/Tween 洗涤，然后同与辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的山羊-抗人 IgG Fc 特异性多克隆试剂一起在室温下温育 1 小时。板用 PBS/Tween 洗涤，同与辣根过氧化物酶 (HR) 缀合的山羊抗人 IgG Fc 特异性多克隆试剂在室温下一起温育 1 小时。洗涤后，板用 ABTS 底物 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, 目录号 A-1888, 0.22mg/mL) 显色，通过在 415-495nm 波长下测定光密度 (OD)，以分光光度法进行分析。如下所述，使用具有充分效价的抗 NGF 人免疫球蛋白的小鼠产生单克隆抗体。

[0320] 产抗 NGF 的人单克隆抗体的杂交瘤的产生

[0321] 在处死前，通过用抗原静脉内加强免疫 2 天，来制备用于产生单克隆抗体的小鼠，然后取出脾。将小鼠脾细胞自 HuMab 小鼠分离，并采用标准方案，用 PEG 与小鼠骨髓瘤细胞系融合。通常每种抗原进行 10-20 次融合。

[0322] 简而言之，用 50% PEG (Sigma) 将免疫小鼠脾淋巴细胞的单细胞悬液与四分之一数目的 P3X63-Ag8.653 非分泌性小鼠骨髓瘤细胞 (ATCC, 检索号 CRL 1580) 融合。将细胞按约 1×10^5 /孔铺到平底微量滴定板，接着在选择性培养基中温育 2 周左右，所述培养基含有 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, 具有高葡萄糖、L-谷氨酰胺和丙酮酸钠) 中的 3-5% origen (IGEN) 加上 5mM HEPES、0.055mM 2-巯基乙醇、50mg/mL 庆大霉素和 1xHAT (Sigma, 目录号 CRL P-7185)。在 1-2 周后，将细胞培养在其中 HAT 被 HT 替换的培养基中。

[0323] 针对抗原特异性抗体的产生筛选所得杂交瘤。通过 ELISA (见上) 针对人抗 NGF 单克隆 IgG 抗体筛选各孔。一旦出现大量杂交瘤生长，便监测培养基，通常在 10-14 天后。重新将分泌抗体的杂交瘤铺板，再次筛选，如果仍对人 IgG 呈阳性，则通过有限稀释将抗 NGF 单克隆抗体亚克隆至少两次。然后体外培养稳定的亚克隆以在组织培养基中产生少量抗体用于表征。

[0324] 与 NGF 结合的人单克隆抗体的选择

[0325] 采用如上所述的 ELISA 测定以筛选与 NGF 免疫原具有阳性反应性的杂交瘤。对分泌以高亲和力结合 NGF 的单克隆抗体的杂交瘤进行亚克隆，并进一步表征。选出保持亲本细胞反应性（通过 ELISA 测定）的各个杂交瘤的一个克隆，用于制备 5-10 小瓶细胞库，保存在液氮中。

[0326] 进行同种型特异性 ELISA 以确定按照本文公开方法产生的单克隆抗体的同种型。在这些实验中，微量滴定板孔用 50 μL /孔的含 1 $\mu\text{g/mL}$ 小鼠抗人 κ 轻链的 PBS 溶液包被，并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下温育过夜。在用 5% 鸡血清封闭后，将板与来自各经测试的单克隆抗体的上清液和纯化的同种型对照反应。在环境温度下使板温育 1-2 小时。然后使各孔与各种人 IgG 特异性辣根过氧化物酶缀合的山羊抗人多克隆抗血清反应，如上所述使板显影，并进行

分析。

[0327] 采用下述各种生物测定法,进一步测定自杂交瘤上清液纯化的单克隆抗体的生物活性,所述上清液通过 ELISA 检测显示与 NGF 显著结合。

[0328] 实施例 3

[0329] 选择和克隆具有强效 NGF 中和活性的抗 NGF 抗体

[0330] 通过测定各修饰肽阻断 NGF 对香草素受体-1 (VR1) 表达的诱导的能力,对最初在实施例 2 中鉴定为 NGF 活性的抑制剂(即 NGF “中和”)的抗体的功效进行评价。

[0331] 背根神经节神经元培养

[0332] 经手术从定时妊娠、终末麻醉的 Sprague-Dawley 大鼠(Charles River, Wilmington, MA) 子宫中取出 19 日胚龄(E19) 大鼠的全部脊髓节段,在无菌条件下,逐一解剖脊髓节段的背根神经节(DRG)。将 DRG 收集到冰冷的含有 5% 热灭活的马血清(GibcoBRL) 的 L-15 培养基(GibcoBRL, Grand Island, NY) 中,除去任何松散的结缔组织和血管。将 DRG 在不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 Dulbecco 磷酸缓冲盐水(DPBS), pH 7.4 (GibcoBRL) 中漂洗两次。然后使用木瓜蛋白酶解离系统(Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ), 将 DRG 解离为单细胞悬液。简而言之,将 DRG 置于 Earle 平衡盐溶液(EBSS) 中含有 20U/ml 木瓜蛋白酶的消化溶液中于 37°C 温育 50 分钟。在由 MEM/Ham's F12(1 : 1)、1mg/ml 卵类黏蛋白抑制剂和 1mg/ml 卵清蛋白和 0.005% 脱氧核糖核酸酶 I (DNase) 组成的解离培养基中,经由通过火琢巴斯德移液管(fire-polished Pasteur pipette) 研磨解离细胞。

[0333] 将解离细胞以 200xg 离心沉淀 5 分钟后,重新悬浮于含有 1mg/ml 卵类黏蛋白抑制剂、1mg/ml 卵清蛋白和 0.005% DNase 的 EBSS 中。使细胞悬液通过含有 10mg/ml 卵类黏蛋白抑制剂、10mg/ml 卵清蛋白的梯度溶液以 200xg 离心 6 分钟除去细胞碎片,然后通过 88- μm 尼龙网(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) 过滤除去任何团块。用血细胞计数器测定细胞数,将细胞以 10×10^3 个细胞/孔接种到多聚鸟氨酸 100 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma, St. Louis, MO) 和小鼠层粘连蛋白 1 $\mu\text{g/ml}$ (GibcoBRL) 包被的 96 孔板的完全培养基中。完全培养基由最小必需培养基(MEM) 和 Ham's F12(1 : 1)、青霉素(100U/ml)、链霉素(100 $\mu\text{g/ml}$) 和 10% 热灭活马血清(GibcoBRL) 组成。将培养物保持在 37°C、5% CO_2 和 100% 湿度下。为了控制非神经元细胞的生长,将 5-氟-2'-脱氧尿苷(75 μM) 和尿苷(180 μM) 包括在培养基中。

[0334] 用 NGF 和抗 NGF 进行处理

[0335] 铺板后 2 小时,细胞用重组人 β -NGF (Amgen) 或重组大鼠 β -NGF (R&D Systems, Minneapolis, MN) 以 10ng/ml (0.38nM) 的浓度处理。将包含连续稀释的抗 NGF 抗体(R&D Systems) 的阳性对照加到各个培养板中。利用 3.16 倍连续稀释,以 10 个浓度加入试验抗体。所有样品在完全培养基中稀释后,加到培养物中。温育时间为 40 小时,之后测定 VR1 表达。

[0336] 测定 DRG 神经元中的 VR1 表达

[0337] 培养物在 Hank 平衡盐溶液中用 4% 低聚甲醛固定 15 分钟,用 Superblock (Pierce, Rockford, IL) 封闭,并在室温下在 Tris-HCl (Sigma) 缓冲盐水(TBS) 中用 0.25% Nonidet P-40 (Sigma) 透化 1 小时。培养物用含有 0.1% Tween 20 (Sigma) 的 TBS 漂洗一次,在室温下与兔抗 VR1 IgG 一起温育 1 小时和 1.5 小时,接着在室温下与 Eu 标记的抗兔第二抗体 (Wallac Oy, Turku, Finland) 一起温育 1 小时。在各个抗体温育后,用 TBS 进行洗涤 (3x5

分钟,同时缓慢振荡)。将增强溶液(Enhance solution)(150 μ l/孔, Wallac Oy)加到培养物中。然后在时间分辨荧光计(Wallac Oy)中测量荧光信号。通过与从0至1000ng/ml的NGF滴定的标准曲线进行比较,测定用修饰肽处理的样品中的VR1表达。通过与不用NGF处理的对照进行比较,测定NGF对DRG神经元中VR1表达的作用的百分比抑制(与最大可能抑制相比)。表2和表5中给出了结果。

[0338] 细胞系标为#110-#129。得自细胞系#119、#124和#125的抗体显示出极有效的NGF中和活性(图1)。**#124**细胞系是亲本细胞系,亦称为**4D4**。**#119**和**#125**细胞系是**4D4**亲本的亚克隆。使来自包含杂交瘤**#124(4D4)**的最初小瓶的另一样品生长并标为**#167(4D4)**。

[0339] 对由杂交瘤**#167(4D4)**产生的抗体进行与之前样品相同的基于DRG神经元的NGF中和测定。抗体**#167(4D4)**表明强的抗NGF活性,其 IC_{50} 为0.50nM(图2),与**#119**、**#124**和**#125**的样品活性一致。4个样品的活性如表2中所示。

[0340] 表2

DRG 细胞中使用 0.38 nM hNGF 的抗 hNGF 活性	
编号#	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 相同的样品)*	0.50 nM

[0341]

[0342] N端测序和质谱法

[0343] 制备用于蛋白质测序和LC/MS分析的纯化的抗NGF杂交瘤抗体样品。通过使用Amicon centrprep-30浓缩培养基直到体积小于15ml,从条件培养基纯化抗体。一批rProA(Pharmacia)树脂用PBS洗涤4次,在最后一次洗涤后,在PBS中制成50%浆状物。将适量的rProA树脂(约5 μ g抗体/ μ l树脂,但使用不少于50 μ l树脂)加入抗体样品中,在4 $^{\circ}$ C下温育过夜。将Ab-树脂混合物离心,收集未结合的部分。加入0.5ml PBS并转移到0.45 μ m Spin-X(CoStar)管中后,将样品以10000rpm离心3分钟。树脂接着用0.5ml PBS洗涤至少3次,然后以1.5x树脂体积加入0.1M甘氨酸(pH 2.7),在室温下温育10分钟,接着再以10000rpm离心3分钟,收集上清液。再重复该洗脱步骤两次,然后合并的上清液用1/25体积的1.0M tris(pH 9.2)中和。

[0344] 在通过新的Spin-x管(0.2 μ m)的最终过滤步骤后,采用使用人IgG作为标准物的标准Bradford测定法,或对于较大量的样品备选在280下的吸光度,对抗体进行定量测定。还使用2 μ g各样品与2 μ g人IgG1, k(Sigma)一起跑胶。对于质谱法,使4微克样品去糖基化、还原,并加样到与Finigan LCQ质谱仪联机的HPLC(HP1090)中。通过反相HPLC将轻链与重链分离开来。还收集轻链和重链用于N端蛋白质测序分析。

[0345] 抗NGF**#167(4D4)**抗体样品的轻链和重链N端序列两者与抗NGF**#119(4D4)**抗体样品的N端序列两者匹配。另外,抗体的测定质量表明得自**#167**和**#119**杂交瘤的分离抗体相同。抗NGF**#167**轻链的测定的解卷积质量(23096)与抗NGF Ab**#119**轻链的测定质量(23096)匹配。

[0346] 克隆抗NGF抗体重链和轻链

[0347] 利用**TRIzol**[®]试剂(Invitrogen),使用表达最有效的NGF结合单克隆抗体**4D4**。

D7 的杂交瘤作为来源,以分离总 RNA。使用随机引物与延伸衔接子 (5' -GGC CGG ATA GGC CTC CAN NNN NNT-3') (SEQ ID NO :33) 合成第一链 cDNA,按照生产商的说明书,使用 GeneRacer™Kit (Invitrogen),进行 5' RACE (cDNA 末端快速扩增) 预备测定。对于制备完整轻链编码 cDNA,正向引物为 GeneRacer™ 嵌套引物,反向引物为 5' -GGG GTC AGG CTG GAA CTG AGG-3' (SEQ ID NO :34)。对于制备编码重链可变区的 cDNA,正向引物为 GeneRacer™ 嵌套引物,反向引物为 5' -TGA GGA CGC TGA CCA CAC G-3' (SEQ ID NO 35)。将 RACE 产物克隆至 pCR4-TOPO (Invitrogen) 后,测定序列。共有序列用来设计用于全长抗体链 PCR 扩增的引物。

[0348] 对于制备编码抗 NGF 4D4.D7 κ 轻链的 cDNA,5' PCR 引物编码信号序列的氨基端、XbaI 限制性内切酶位点和优化的 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' 引物编码羧基端和终止密码子以及 SalI 限制位点 (5' -CTT GTC GAC TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT C-3'; SEQ ID NO :37)。所得 PCR 产物片段经纯化,用 XbaI 和 SalI 消化,然后凝胶分离并连接至哺乳动物表达载体 pDSR α 20 (参见国际专利申请公开号 WO 90/14363,其通过引用结合到本文中用于任何目的。通过在 pDSRa19 中位点定向诱变,由“鸟苷”至“腺苷”改变核苷酸 2563,产生 pDSR α 20)。

[0349] 对于制备编码抗 NGF 4D4.D7 重链的 cDNA,5' PCR 引物编码信号序列的氨基端、XbaI 限制性内切酶位点和优化的 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' 引物编码羧基端和终止密码子以及 SalI 限制位点 (5' -GCA TGT CGA CTC ATT TAC CCG GAG ACA GGG AGA G-3'; SEQ ID NO :39)。所得产物经纯化,用 XbaI 和 SalI 消化,凝胶分离,并连接至 pDSR α 20 载体。

[0350] 抗 NGF Ab 4D4 克隆轻链 DNA 序列的计算质量 (23099) (通过将核苷酸序列翻译为预测的氨基酸,然后将氨基酸的分子量加在一起而确定) 与通过质谱法测定的测定质量匹配。抗 NGF Ab #167 重链的测定的解卷积质量 (49479) 与抗 NGF Ab #119 重链的测定质量 (49484) 匹配,并且还在仪器偏差内与抗 NGF Ab 4D4 克隆重链的 DNA 序列的理论质量 (49484) 匹配 (表 3)。

[0351] N 端蛋白质序列和 LC/MS 的数据证实,杂交瘤 #119 表达与杂交瘤 #167 相同的抗体。另外,基于序列的抗体的计算质量进一步证实了观察结果。

[0352] 表 3- 质谱法研究结果总结

	抗 NGF Ab	Ab #167 的 测定质量	Ab #119 的 测定质量	由 Ab 4D4 的 DNA 序列得到的理 论质量
[0353]	轻链	23096	23096	23099
	重链	49479	49484	49484

[0354] 实施例 4

[0355] 中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中抗 NGF 抗体的表达

[0356] 通过采用磷酸钙方法,将 4D4- 重链 /pDSR α 19 IgG2 或 4D4- 重链 /pDSR α 19 IgG1 和 NGF- κ /pDSR α 19 质粒共转染至二氢叶酸还原酶缺陷型 (DHFR-) 适应无血清的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中,实现 4D4 抗 NGF mAb 的稳定表达。在含有经透析的血清但不含次黄嘌呤

呤 - 胸苷的培养基中选择转染细胞以确保表达 DHFR 酶的细胞的生长。采用例如 ELISA 等测定法筛选转染克隆, 以便检测 4D4 抗 NGF mAb 在条件培养基中的表达。使最高表达性克隆经受递增浓度的甲氨蝶呤 (MTX), 用于 DHFR 扩增。采用例如 ELISA 等测定法筛选 MTX 扩增的克隆, 目的在于检测条件培养基中较高表达的 4D4 抗 NGF mAb。使最高表达性克隆进行亚克隆以获得均质群并产生细胞库。

[0357] 可采用与上述用于抗 NGF 单克隆抗体相同的方案, 在 DHFR 缺陷型中国仓鼠卵巢细胞中产生本发明的重组抗 NGF 抗体。将编码本发明各个抗 NGF 抗体的完整重链或轻链的 DNA 序列克隆至表达载体中。CHOd 细胞用能够表达完整重链的表达载体和表达合适抗 NGF 抗体的完整轻链的表达载体共转染。例如, 为了产生抗 NGF 抗体, 细胞用能够表达包含如 SEQ ID NO:40 所示氨基酸序列的完整重链的载体和能够表达包含如 SEQ ID NO:44 所示氨基酸序列的完整轻链的载体共转染。表 4 概括了具有不同 IgG 重链恒定区的 4D4 抗体的完整重链和完整轻链。

[0358] 表 4

[0359]

抗体	重链可变区 + 重链恒定区	完整重链
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	完整轻链
4D4	SEQ ID NO: 12 + SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 44

[0360] 实施例 5

[0361] 表征抗 NGF 4D4 抗体的活性

[0362] 检测在生长在转瓶 (S) 或滚瓶 (R) 条件下的细胞中产生的瞬时表达的抗 NGF 4D4 抗体, 以证实其在如上所述 (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。

[0363] NGF 抗体在适应无血清悬浮的 293T 细胞中瞬时表达。以 500mL 培养物或以 1L 培养物进行转染。简而言之, 使细胞接种物 (5.0X10⁵ 个细胞 /mL X 培养体积) 在 4°C 下以 2,500RPM 离心 10 分钟以除去条件培养基。将细胞重新悬浮于无血清 DMEM 中, 再次在 4°C 下以 2,500RPM 离心 10 分钟。吸出洗涤溶液后, 将细胞重新悬浮于 1L 或 3L 转瓶培养物中的生长培养基 [DMEM/F12 (3 : 1)+1X 胰岛素 - 运铁蛋白 - 硒补充剂 +1X Pen Strep Glut+2mM L- 谷氨酰胺 +20mM HEPES+0.01% Pluronic F68] 中。将转瓶培养物以 125RPM 保持在磁力搅拌盘中, 将磁力搅拌盘置于保持在 37°C 和 5% CO₂ 下的潮湿培养箱中。在 50mL 锥形管中, 质粒 DNA 与转染试剂形成复合物。在无血清 DMEM 中以最终培养体积为 5% 制备 DNA- 转染试剂复合物。先将 1 μg 质粒 DNA/mL 培养物加入无血清 DMEM 中, 接着加入 1 μl X-TremeGene RO-1539/mL 培养物。将该复合物在室温下温育约 30 分钟, 然后加到转瓶中的细胞中。使转

染 / 表达进行 7 天,之后通过在 4℃ 下以 4,000RPM 离心 60 分钟来收获条件培养基。

[0364] 对于滚瓶瞬时转染,我们使用生长并保持在补充了 5% FBS+1X 非必需氨基酸 +1X Pen Strep Glut+1X 丙酮酸钠的 DMEM 中的 293T 贴壁细胞。将约 $4-5 \times 10^7$ 个 293T 细胞接种到 850cm² 滚瓶中过夜。次日,将之前接种的细胞接着使用 FuGene6 转染试剂转染。在约 6.75mL 无血清 DMEM 中制备 DNA- 转染试剂混合物。先加入 675 μ l FuGene6 转染试剂,接着加入 112.5 μ g 质粒 DNA。将复合物在室温下温育 30 分钟。然后将全部混合物加到滚瓶中。向滚瓶中充入 5% CO₂ 混合气体,塞紧,置于以 0.35RPM 旋转的辊筒架上的 37℃ 培养箱中。使转染进行 24 小时,之后用 100mL DMEM+1X 胰岛素 - 运铁蛋白 - 硒补充剂 +1X Pen Strep Glu+1X 非必需氨基酸 +1X 丙酮酸钠更换培养基。通常,从各滚瓶获得 2 个 100ml 48 小时收获物。将收获的无血清条件培养基合并在一起,在 4℃ 下以 4,000RPM 离心 30 分钟。

[0365] 4D4. IgG1 和 4D4. IgG2 两者显示强效活性,其针对人 NGF 的 IC₅₀ 值为约 0.14nM- 约 0.2nM(图 2)。活性测定结果概括于表 5 中。抗体对大鼠 NGF 显示极少活性(图 3)。结果类似于上述从杂交瘤直接测试的抗体活性。

[0366] 表 5

	Ab	IC50 @ hNGF (nM)	IC50 @ rNGF (nM)
[0367]	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

[0368] hNGF = 人 NGF, rNGF = 大鼠 NGF, R = 滚瓶培养, S = 转瓶培养

[0369] 实施例 6

[0370] 抗 NGF 抗体的产生

[0371] 通过在 CHO 细胞的克隆系中表达来产生抗 NGF 抗体。对每次生产运行,使单个小瓶的细胞融化在无血清细胞培养基中。最初使细胞在 T 培养瓶中生长,接着在转瓶中生长,然后在逐渐放大至 2000L 生物反应器的不锈钢反应器中生长。生产使用补料分批培养在 2000L 生物反应器中进行,其中加入含有浓缩培养基成分的营养物进料以维持细胞生长和培养物生存力。生产持续约 2 周,期间抗 NGF 抗体由细胞组成型产生,并分泌到细胞培养基中。

[0372] 在预先确定的 pH、温度和溶解氧水平下控制生产反应器:通过加入二氧化碳气体和碳酸钠控制 pH;通过空气、氮气和氧气流控制溶解氧。

[0373] 在生产结束时,将细胞肉汤加进碟式离心机中,将培养物上清液与细胞分离。将浓缩物通过深层过滤器(depth filter)接着通过 0.2 μ m 过滤器进一步澄清。然后使澄清的条件培养基通过切向流超滤浓缩。将条件培养基浓缩 15 倍 -30 倍。然后将所得的浓缩条件培养基通过纯化加工,或冷冻以在稍后时间用于纯化。

[0374] 实施例 7

[0375] 与其它神经营养蛋白的交叉反应性

[0376] 在不同的生物测定中,测试 4D4 抗体针对人 NT3 或人 BDNF 的交叉反应性,所述生物测定包括用于人 NT3 的 DRG 神经元存活测定和用于人 BDNF 的培养 DA 神经元中 DA 摄取的测定。

[0377] DRG 培养物用 NT3、抗 NT3 和抗 NGF 抗体处理

[0378] 铺板后 2 小时,将 DRG 细胞(上述实施例 3 中描述的分选方法)用重组 hNT-3 100ng/ml (3.8nM) 处理。连续稀释的抗 hNT3 抗体(R&D)用作阳性对照。以不同浓度(10 个点,3.16 倍连续稀释)加入未知物(抗 NGF Ab 样品)。所有样品在完全培养基中稀释后,加入培养物中。

[0379] DRG 神经元中 MAP2 表达的测定

[0380] 将培养物在 Hank 平衡盐溶液中用 4% 低聚甲醛固定 15 分钟,用 Superblock(Pierce) 封闭 1 小时,在室温(RT)下于 Tris-HCl(Sigma)-缓冲盐水(TBS)中用 0.25% Nonidet P-40(Sigma) 透化 1 小时。培养物用含有 0.1% Tween20(Sigma) 的 TBS 漂洗一次,在室温下与小鼠抗 MAP2IgG(Chemicon, Temecula, CA) 一起温育 1.5 小时,接着在室温下与 Eu 标记的抗小鼠第二抗体(Wallac Oy, Turku, Finland) 一起温育 1 小时。在各种抗体温育后,用 TBS 进行洗涤(3x5 分钟,同时轻轻振荡)。将增强溶液(150ml/孔,Wallac Oy) 加入培养物中,然后在时间分辨荧光计(Wallac Oy) 中测量荧光信号。

[0381] 胚胎中脑培养物

[0382] 使用 19 日胚龄(E19) Sprague-Dawley 大鼠(Jackson Labs)。取出富含多巴胺能神经元的中脑腹侧组织,转移到冷的无 Ca^{++} 和 Mg^{++} 的 Dulbecco 磷酸缓冲盐水(DPBS) (pH 7.4) (Gibco) 中。使用木瓜蛋白酶解离系统(Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ), 使组织碎片解离为单细胞悬液。简而言之,将组织碎片置于 Earle 平衡盐溶液(EBSS) 中含有 20 单位/ml 木瓜蛋白酶的消化溶液中于 37°C 温育 50 分钟。在由 MEM/Ham's F12(1:1)、1mg/ml 卵类黏蛋白抑制剂和 1mg/ml 卵清蛋白和 0.005% 脱氧核糖核酸酶 I (DNase) 组成的解离培养基中,通过火琢巴斯德移液管经研磨解离细胞。解离的细胞以 200xg 离心沉淀 5 分钟,重新悬浮于含有 1mg/ml 卵类黏蛋白抑制剂、1mg/ml 卵清蛋白和 0.005% DNase 的 EBSS 中。使细胞悬液通过含有 10mg/ml 卵类黏蛋白抑制剂、10mg/ml 卵清蛋白的梯度溶液以 200xg 离心 6 分钟以除去细胞碎片;经 25 μg Nitex 尼龙网(Tetko, Inc.) 过滤除去团块。将解离细胞以 100,000/cm² 的密度铺板到组织培养板上。板按之前所述用多聚鸟氨酸 100 μg /ml (Sigma) 和小鼠层粘连蛋白 1 μg /ml (Gibco BRL) 预先包被(Louis JC 等, J. Pharmacol. Exp. Ther. 1992; 262:1274-1283.)。培养基由最小必需培养基(MEM)/Ham's F12(1:1)、12% 马血清(Gibco)、100 μg /ml 运铁蛋白和 2.5 μg /ml 胰岛素(Sigma) 组成。将培养物在 37°C、5% CO₂ 和 100% 湿度下保持 6 天。

[0383] 中脑培养物用 BDNF 和抗 BDNF 或抗 NGF 处理

[0384] 铺板后 2 小时,将 BDNF 以 10ng/ml 加到细胞中,接着加入系列浓度的抗 NGF Ab 样品。抗 BDNF 抗体(于 Amgen 生产)用作阳性对照。

[0385] 中脑神经元中的 DA 摄取

[0386] 多巴胺摄取测定按前述方法进行(Friedman, L. 和 Mytilineou, C., Neuroscience Letters 1987; 79:65-72)。第 6 天时,培养物用预先加热的含有 5.6mM 葡萄糖、1.3mM EDTA 和 0.5mM 帕吉林(pargylin)、单胺氧化酶抑制剂的 Krebs-Ringer 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)

洗涤一次。将培养物在含有 50nM [³H]DA (NEN) 的摄取缓冲液中于 37°C 温育 60 分钟。通过除去摄取缓冲液终止摄取, 将培养物用 Krebs-Ringer 磷酸盐缓冲液洗涤三次。通过将液体闪烁混合物 opticphase supermix (Wallac) 直接加到培养物中, 裂解细胞释放出 [³H]DA。然后在 microbeta-plus 液体闪烁计数器 (Wallac, Inc.) 中统计细胞裂解物的放射性。通过向摄取缓冲液中加入 0.5mM GBR12909 (一种高亲和力 DA 摄取部位的特异性抑制剂) (Heikkila RE 和 Mazino L, European Journal of Pharmacology 1984;103:241-8), 来评价低亲和力 DA 摄取, 然后将其从摄取总量中减去以获得高亲和力 DA 摄取值。

[0387] 表 6

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

[0388]

[0389] 实施例 8

[0390] 鉴定抗 NGF 抗体的表位

[0391] 通过限制性蛋白酶解的表位作图

[0392] 在 4°C 下, 将 5 微克 (μg) NGF 与 4D4 (11 μg) 一起在 0.1M Tris 缓冲液 (pH 7.5) 中温育 30 分钟。然后将复合物用蛋白酶 (枯草杆菌蛋白酶) 1 μg 于 37°C 消化 1 小时和 2 小时。将 HPLC 肽图彼此进行比较以发现受 4D4 抗体保护的肽。NGF 的限制性蛋白酶解表明, 若干主要肽最初从 NGF 中释放。特别有趣的是, 产生肽 S18.3、S18.5 和 S34.4, 并且被抗体保护免受蛋白酶解。并不明显形成或保护其它峰。两项实验 (1 小时和 2 小时消化) 的受保护的肽见表 7。

[0393] 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

[0394]

[0395] 根据肽峰高计算出保护百分比。S18.5 含有两种肽, 但用 4D4 抗体只保护一种肽 (SSSHPIFHR; SEQ ID NO: 46), 因为另一个肽峰 (HWNSY; SEQ ID NO: 47) 不因 4D4 抗体的加入而改变, 正如在 280nm 下的吸光度所检测的。肽 S18.3 是 S34.4 的 C 端部分, 两者均来自同一环区。N 端和中部环区也是潜在的表位。

[0396] 消化肽的 Microcon 分离

[0397] 将枯草杆菌蛋白酶消化的物质（各 3 μg）与有活性的 4D4 抗体和无活性的单克隆抗体（#162）（8 μg）一起在 0.1M Tris 缓冲液（pH 7.5）中于 4℃ 温育 30 分钟。结合 / 未结合肽通过 Microcon 10 (Millipore Corp., Bedford, Mass) 分离, 两种片段（结合和未结合片段）用 HPLC 进行分析以找出与抗体结合的肽。将用 4D4 抗体和 #162 处理和 Microcon 分离后通过对未结合片段的 HPLC 比较鉴定出的两个消耗峰回收, 表明抗体结合肽。4D4 结合肽为：

[0398] S1(4.4)----SRKAVRR(113-119) (SEQ ID NO :49), C 端 ;和

[0399] S2(28.3)----EVMVL(35-39) (SEQ ID NO :50), 环区。

[0400] 或者, NGF 样品用 Lys-C(K) 消化 24 小时。在无变性剂的情况下还原半胱氨酸残基并羧甲基化。将样品与单克隆抗体 4D4 和 AMG162 一起温育, 接着 Microcon 100 分离。用反相 HPLC 分析结合和未结合片段。如下所述, 仅两种肽被鉴定为抗体结合 K- 肽。通过序列分析确定的肽的计算质量和肽质谱法的一致。如下表示的肽对应于 N 端区和 C 端区。

[0401] K1(37.6)----SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDK (SEQ ID NO :51)

[0402] 计算质量 = 2821 ; 实测质量 = 2828.2 ; N 端

[0403] K2(39.5)----QAARWFIRIDTACVCLSRK (SEQ ID NO :52)

[0404] 计算质量 = 2452 ; 实测质量 = 2459.5 ; C 端

[0405] 之前的表位作图实验表明, 至少 3 个区是 4D4 抗体的可能表位, 包括 N 端 (1-9)、内部 (46-57) 和 C 端 (96-98) 区。另外, AspN 消化显示由 ---SSHPIFHRGEFSVC--- (SEQ ID NO :53) 组成的肽片段受 4D4 抗体保护, 而胰蛋白酶消化显示由 ---SSHPIFHR--- (SEQ ID NO :54) 组成的肽片段不受 4D4 抗体保护。因此, 在 N 端中, GEFSVC 序列 (SEQ ID NO :55) 对与 4D4 抗体结合最为重要。

[0406] 为了更明确地限定抗 NGF 抗体 4D4. IgG1 的表位, 根据完整人成熟 NGF (hNGF) 序列, 应用标准技术合成产生共 23 种肽 (表 8)。肽长 15 个氨基酸, 重叠达 10 个氨基酸, 并在 C 端加半胱氨酸尾以允许与基质缀合。下述人抗 hNGF Ab 4D4. IgG1 用于作图实验。

[0407] 表 8

[0408]

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
-------------	--------------------------	----

[0409]

肽 #	序列	SEQ ID NO
33582-27-09	EVNINNSVFKQYFFEC (41-55)	64
33582-27-10	NSVFKQYFFETKARDC (46-60)	65
33582-27-11	QYFFETKARDPNPVC (51-65)	66
33582-27-12	TKARDPNPVDSGARDC (56-70)	67
33582-27-13	PNPVDSGARDIDSKHC (61-75)	68
33582-27-14	SGARDIDSKHWNSYC (66-80)	69
33582-27-15	IDSKHWNSYATTTHTC (71-85)	70
33582-27-16	WNSYATTTHTFVKALC (76-90)	71
33582-27-17	TTTHTFVKALTMKGK (81-95)	72
33582-27-18	FVKALTMKGKQAAWRC (86-100)	73
33582-27-19	TMDGKQAAWRFIRIDC (91-105)	74
33582-27-20	QAAWRFIRIDTAAVC (96-110)	75
33582-27-21	FIRIDTAAVAVLSRKC (101-115)	76
33582-27-22	TAAVAVLSRKAVRRAC (106-120)	77
33582-27-23	CAAVAVLSRKAVRRA (107-120)	78

[0410] 将人 NGF 肽片段在具有 5% DMSO、1mM EDTA 的 PBS (pH 6.23) 中稀释。将最终的肽浓度标准化至 55 μ M (约 100 μ g/ml) 的相同摩尔浓度。使肽在 Reacti-Bind Maleimide 活化的 96 孔微量滴定板 (Pierce 目录号 15150) 中以 100 μ l/孔于室温温育 2 小时,然后在搅拌的同时在 4°C 下过夜。人 NGF (100 μ g/ml) 用作阳性对照。板用洗涤缓冲液 (KPL) 洗涤,并用 0.2% 脱脂奶粉 (PBS-EDTA 缓冲液中, pH 6.23) 在室温下封闭 2 小时,然后再用 5% BSA 封闭 1 小时。然后将板与不同浓度 (0、3、10、30 μ g/ml) 的人抗 NGF 抗体一起温育,接着与山羊抗 hFc Ab-HRP (KPL) 温育 2 小时。信号用 TMB 底物显影,在加入终止溶液 (KPL) 后,在 450nm 下读数。

[0411] 在 23 种人 NGF 肽中,观察到表明 4D4 结合的至少 4 个主要峰。这些峰对应于下列肽: 肽 #1 (SEQ ID NO :56), 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); 和 肽 #18-21(SEQ ID NO :73-SEQ ID NO :76), TTTHT---LSRKC(100-115)。

[0412] 4D4 的 4 个结合峰对应于如 Weismann 等人 (1999, Nature401 :184-8) 所描述的 NGF 中的 N 端、C 端、内部结构域以及环 L2 和 L4。这些结果概括于表 9 中。

[0413] 表 9

[0414]

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	+++	+	++	++	+++	++

[0415] Wiesmann 等人解析了与 trkA 受体结合的 hNGF 的晶体结构,表明 N 端 (残基 2-9) 对受体结合重要 (Wiesmann 等,1999, Nature401 :184-8)。相对于 trkB 或 trkC 受体, NGF 中该区段的残基亦在对 trkA 受体的特异性方面重要。抗体 4D4 具有对人 NGF 相对于对小鼠 / 大鼠 NGF 以及 BDNF 和 NT-3 的选择性,最可能是因为人 NGF 和其它神经营养蛋白之间的 N 端差异。

[0416] 抗体 4D4 与分别相当于环 L2 和 L4 的肽 #10 (SEQ ID NO :65) (NSVFK---, 46-60) 和肽 #17 (SEQ ID NO :72) (TTTHTFVKAL TMDGKC, 81-95) 结合,环 L2 和 L4 表示具有高于在神经营养蛋白中的平均序列多样性的 7 个截然不同的区中的两个。这 7 个区的 NGF 和 BDNF 之间的交换实验表明,L2 和 L4 对于 NGF 的生物活性很重要。此外,环 L2 和 L4 中 5 个 NT3 残基被 NGF 的残基取代引入 NGF 样活性,同时保持 NT3 活性。因此,L2 和 L4 可能是其中抗体 4D4 与 NGF 选择性结合而不与 BDNF 或 NT-3 结合的区域。

[0417] 抗体 4D4 还与肽 #16 (SEQ ID NO :71) (WNSYATTTHTFVKAL, 76-90) 结合,肽 #16 与 NGF 晶体结构的内部结构域匹配。在人 NGF 和小鼠 NGF 之间该区有 100% 同源性,但与其它神经营养蛋白截然不同。当与其针对人 NGF 的活性进行比较时,4D4 显示针对大鼠 / 小鼠 NGF 弱得多的活性。因此,对于种特异性,与 NGF 的该部分的结合极可能不是关键性的,但对于在神经营养蛋白之间的选择性则是重要的。

[0418] 抗体 4D4 还与 NGF 的 C 端区 (肽 #19-21 (SEQ ID NO :74-SEQ ID NO :76) TMDGK---LSRKC, 91-115) 结合,该区是将 NGF 与其它神经营养蛋白 (BDNF 和 NT3) 区分开来的人 NGF 的区域之一。与该区的结合有助于解释为什么 4D4 对其它神经营养蛋白无活性。此外,在 C 端中,在人 NGF 和小鼠 NGF 之间有单个氨基酸差异,这就表明这个单独的氨基酸可能是 4D4 具有对人 NGF 相对于对大鼠 / 小鼠 NGF 的选择性的原因之一,与其中观察到种间差异的 N 端类似。

[0419] 最后,4D4 还与通过人 NGF 的肽 #10 (SEQ ID NO :65) (---KARDC,50-60) 描述的内部结构域相互作用,该内部结构域是 NGF 优先结合 trkA 而非 trkB 或 trkC 的重要区域,这进一步解释了其针对人 NGF 的选择性中和活性。

[0420] 实施例 9

[0421] 单克隆抗体通过 KinExA 的亲和力测定

[0422] 在 KinExA 上检测了 Ab 4D4 (38859-80) 与 huNGF (29714-91) 的结合。简而言之,将 Reacti-Gel 6x (Pierce) 用 huNGF 预先包被,并用 BSA 封闭。将 10pM 和 30pM 的 Ab 4D4 样品与不同浓度的 huNGF (Amgen) 一起在室温下温育 8 小时后,从 huNGF 包被的珠粒中流过。通过荧光 (Cy5) 标记的山羊抗人 -IgG 抗体 (Jackson Immuno Research) 定量测定珠粒结合的抗体的量。在平衡时,结合信号与游离抗体的浓度成比例。采用双曲线一位点均质结合模型 (dual-curve one-site homogeneous binding model) (KinExTM 软件),由竞争曲线的非线性回归得到解离平衡常数 (K_D)。与 huNGF 结合的 Ab 4D4 的 K_D 约为 4pM。

[0423] 实施例 10

[0424] 其它抗 NGF 抗体的鉴定

[0425] 选择按上述实施例 2 和 3 中所述产生和鉴定的其它抗 NGF 抗体 (命名为 14D10、6G9、7H2、14F11 和 4G6) 用于进一步研究。简而言之,测定条件培养基的结合活性。对来自培养基的抗体进行纯化和测序。将预测质量与来自条件培养基的抗体的质谱数据进行比较。克隆抗体。使 2 个克隆在 CHO 细胞中表达,并如上所述测定活性。结果见表 10。

[0426] 表 10

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

[0428] 然后将这些抗体的轻链和重链可变区的序列与 4D4 抗体序列以及彼此进行比较 (图 5 和图 6)。从这些比较中鉴定的重链可变区的百分比同源性见表 11。轻链可变区的百分比同源性见表 12。另外,各种抗体的 CDR 区的百分比同源性见图 5-10。

[0429] 表 11

[0430]

	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%

[0431] 表 12

	V4D4 VK	14D11 LC	4G6a LC	4G6b LC	4G6c LC	14D10 LC	6H9 LC	4G6d LC	7H2 LC	4G6e
[0432] V4D4 VK	100%	89%	91%	72%	74%	69%	71%	71%	70%	73%
14D11		100%	94%	68%	71%	67%	68%	68%	68%	70%
LC										
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%
[0433] 14D10 LC						100%	91%	94%	94%	86%
6H9 LC							100%	99%	98%	89%
4G6d LC								100%	99%	89%
7H2 LC									100%	
4G6e										100%

[0434] 实施例 11

[0435] 人中皮下 NGF 抗体的安全性和耐受性

[0436] 本项研究的目的在于评价在患有骨关节炎 (OA) 膝痛的受试者中多个皮下 (SC) 剂量的抗神经生长因子的抗体 (NGF 抗体) 的安全性和耐受性, 以及检查在将多个 SC 剂量的 NGF 抗体给予患 OA 膝痛的受试者后 NGF 抗体的血清药代动力学 (PK)。通过 Western Ontario 和 McMaster Universities 关节炎指数 [WOMACTM3.1] 评价多个 SC 剂量的临床益处。

[0437] 在患 OA 膝痛的受试者中进行了 I 期、序贯随机、双盲安慰剂对照的多剂量、剂量递增研究。研究设计包括 4 个受试者群组, 每个群组 8 名受试者 (n = 32)。使用 NGF 抗体的 3 种剂量水平 (3mg、10mg、20mg)。用于本研究的 NGF 抗体是按类似于给出的方法制备的完全人单克隆抗体 (此处? - 我们需要确认 / 阐明产生这些 I 期 mAb 的产生方法吗?)。

[0438] 虽然功效数据变化大, 且本研究并不足以以评价功效衡量的统计显著性, 但是疼痛相关治疗效果似乎是显然的。平均 WOMAC 总分、平均 WOMAC 亚类分数、平均患者总体疾病评价和平均医师总体疾病评价显示在治疗组第一次给药后的第一时间点有改善的总趋势, 其效果在整个给药期间保持。这些趋势在安慰剂组中并不同样明显。在 NGF 抗体的最后剂量后, 治疗效果随时间趋向基线。

[0439] 在给予患 OA 膝痛的受试者单个或多个 SC 剂量后, NGF 抗体暴露似乎在 3mg-20mg 的剂量范围中大致与剂量成比例地增加。T_{max} 中值的范围为 7.5-11.5 天。对于在治疗组中的 10 名受试者 (56%) 和在安慰剂组中的 2 名受试者 (33%) 报告为治疗相关的不良事件 (AE)。无受试者因 AE 而提早中止研究。然而, 由于 2 级感觉神经 AE, 方案规定的停止规则变得适用, 使得群组中 5 名受试者 (2 名安慰剂, 3 名治疗的) 未接受第 4 个剂量和最终剂量的研究中制品。感觉神经 AE 似乎是剂量依赖性的。

[0440] 在年龄介于 36 和 63 岁的男性和女性 OA 受试者中, 多次 SC 给药似乎在本研究中所给予的剂量下耐受良好, 除了对接受 20mg 抗体的 6 名受试者中的 4 名报告的治疗突发性、可能的剂量依赖性感觉神经事件 (严重程度为轻度或中度) 以外。NGF 抗体暴露似乎在 3mg-20mg 的剂量范围内大致与剂量成比例地增加。末期半寿期 (t_{1/2,z}) 的范围为 20.3-26.4 天。

[0441] 应当理解的是, 前述公开内容强调本发明的某些具体实施方案, 与其等同的全部修改或备选方案均落入随附权利要求书中给出的本发明的精神和范围内。

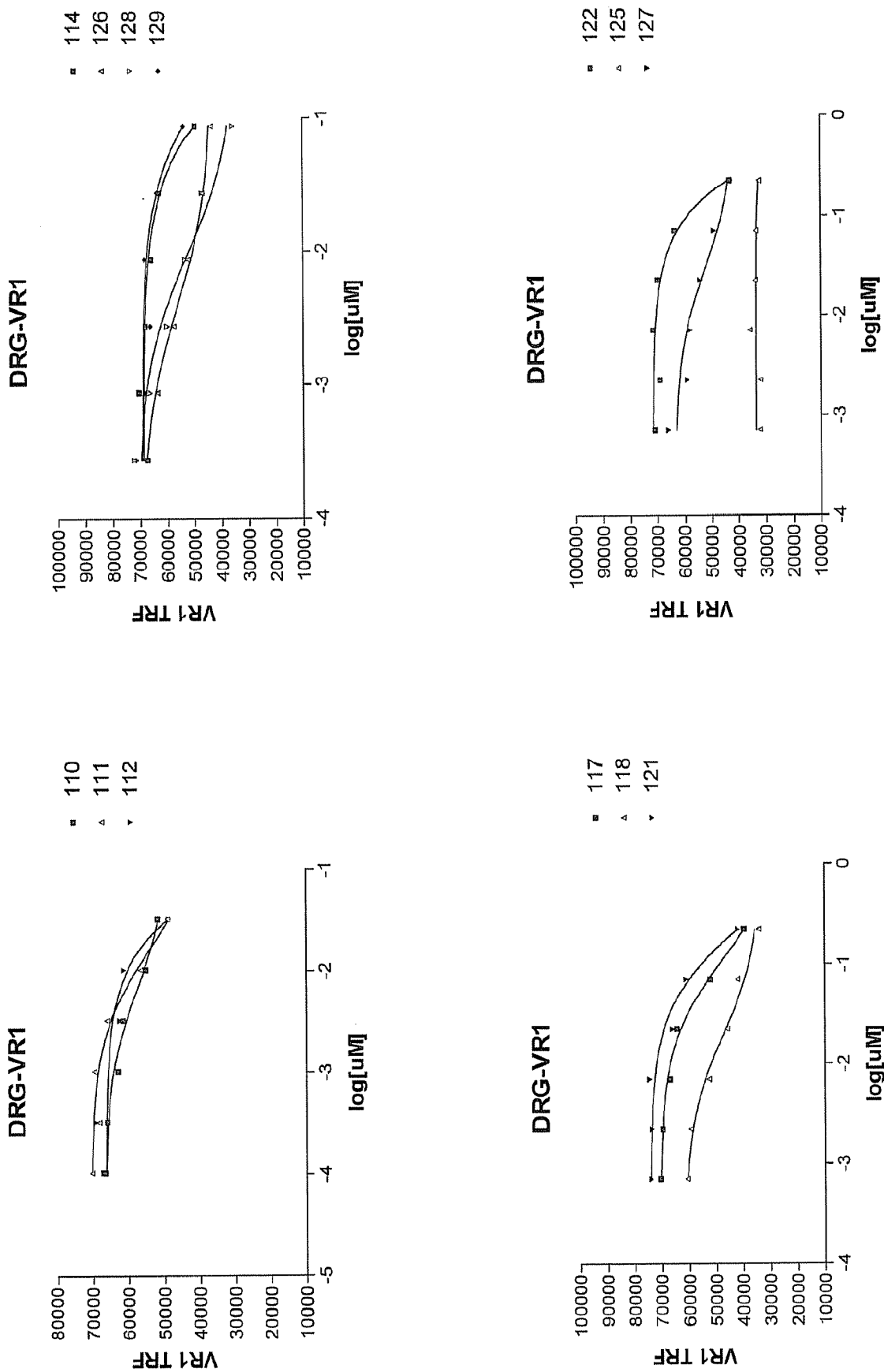


图 1(a)

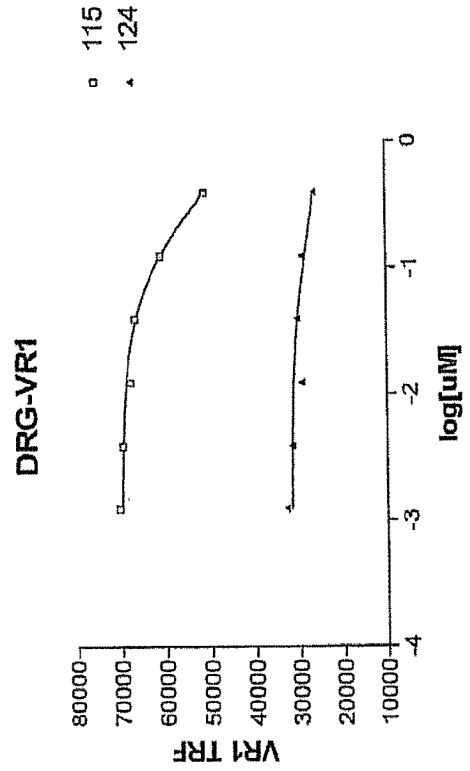
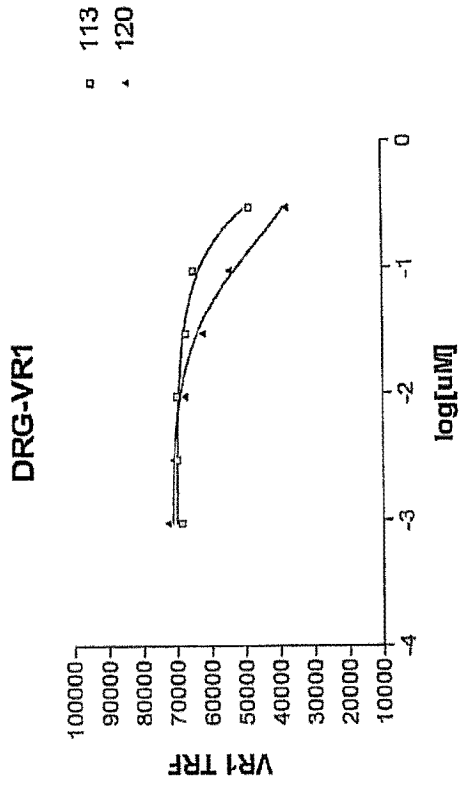
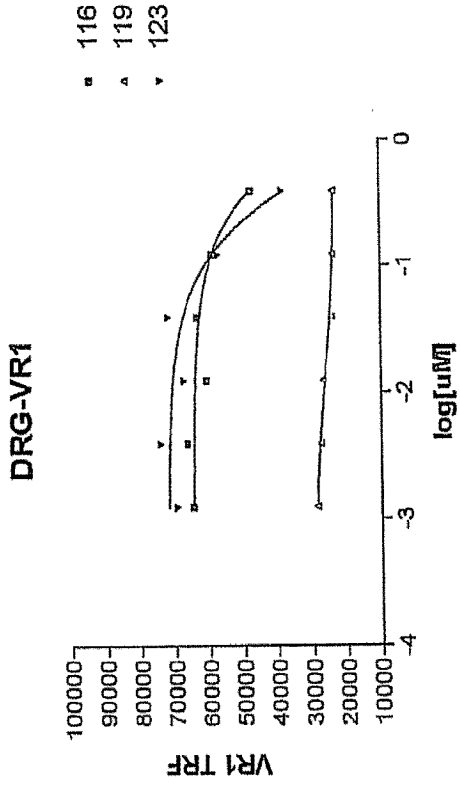


图 1(b)

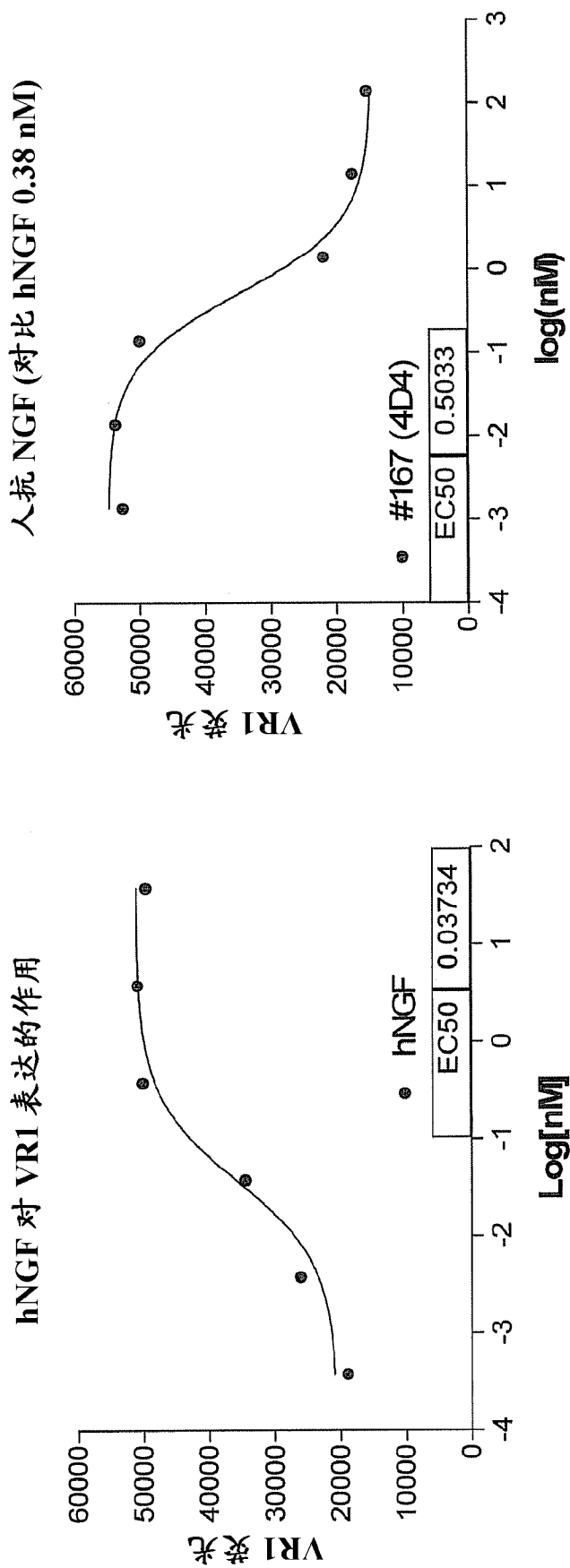
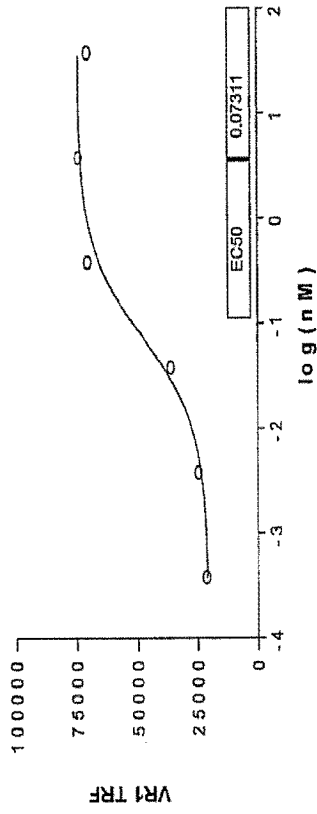
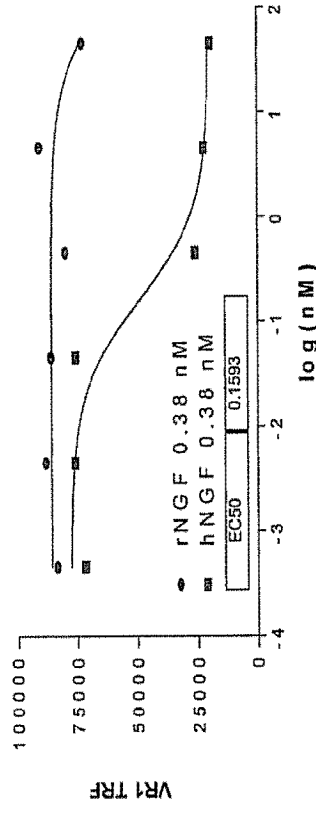


图 2

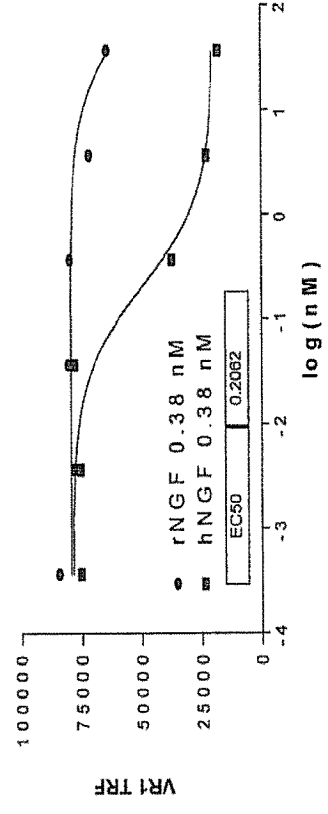
在 DRG 培养物中 hNGF 对 VR1 的作用



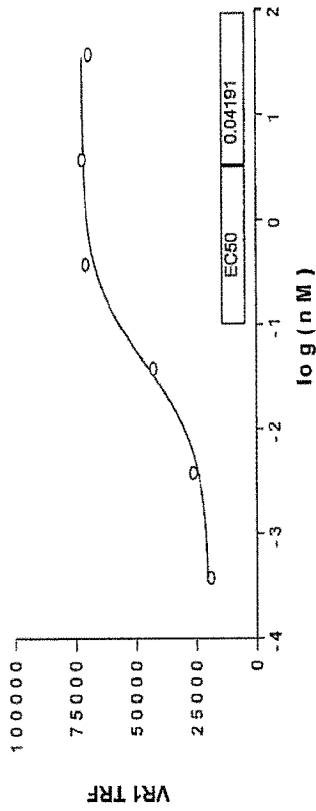
4 D 4 . D 7 . I g G 1 . S



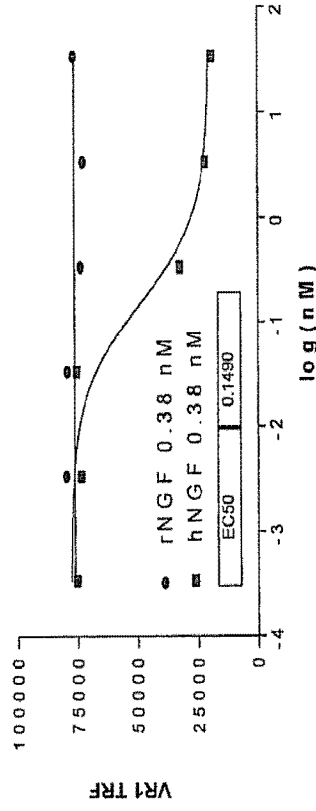
4 D 4 . D 7 . I g G 2 . S



在 DRG 培养物中 rNGF 对 VR1 的作用



4 D 4 . D 7 . I g G 1 . R



4 D 4 . D 7 . I g G 2 . R

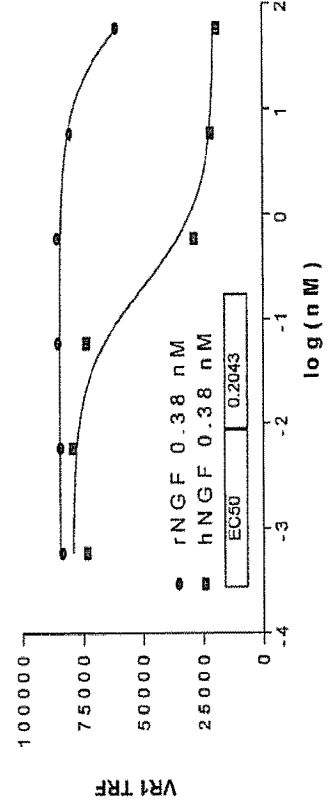


图 3

NGF CDR1 重链比对/同一性%

	(1)	1	5
14D10 HC CDR1 (1)	DY	AMH	
6H9 HC CDR1 (1)	DY	AMH	
7H2 HC CDR1 (1)	DY	AMH	
4G6 HC CDR1 (1)	DY	GMM	
14D11 HC CDR1 (1)	TY	WIG	
4D4 HC CDR1 (1)	SY	SMM	

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

图 5

NGF CDR2 重链比对/同一性%

	(1)	1	17
14D10 HC CDR2	(1)	GISWNRGIIIGYADSVK	G
6H9 HC CDR2	(1)	GISWNRGIIIGYAGSVK	G
7H2 HC CDR2	(1)	GIPTWNSGIIIGYADSVK	G
4G6 HC CDR2	(1)	DINWNGGSTGYADSVK	D
4D4 HC CDR2	(1)	YISRSSHTIFFYADSVK	Y
14D11 HC CDR2	(1)	IIYPGDSDTKYSPSFQ	I

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

图 6

NGF CDR3 重链比对/同一性%

```

(1) 1 _____ 17
14D10 HC CDR3 (1) GYYGSGREGYFYYVMDV
6H9 HC CDR3 (1) GYYGSGREGYFYYVMDV
14D11 HC CDR3 (1) -NYYGSGTYYYGMDV
4G6 HC CDR3 (1) --EQWLDEYYYYGMDV
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 7

NGF CDR1 轻链比对/同一性%

(1)	1	12
	(1)	RASQGISIWIIA-
14D11 LC CDR1	(1)	RASQGISIWIIA-
4G6 LC CDR1 20031028340	(1)	RASQGISIWIIA-
4D4 LC CDR1	(1)	RASQGISIWIIA-
4G6 LC CDR1 20031028351	(1)	RASQGVSSSYLA-
14D10 LC CDR1	(1)	RASQGVSSSYLA-
4G6 LC CDR1 20031000528	(1)	RASQSVSSGFIA
4G6 LC CDR1 20031071526	(1)	RASQSVSSSYLA-
6H9 LC CDR1	(1)	RASQSVSSSYLA
7H2 LC CDR1	(1)	RASQSVSSSYLA
NGF 4G6 LC CDR1 20031028344	(1)	RASQSVSSSYLA

	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 8

NGF CDR2 轻链比对/同一性%

(1) 1 7
 14D11 LC CDR2 (1) ~~ASSTQ~~
 4G6 LC CDR2 20031028340 (1) ~~ASSTQ~~
 4D4 LC CDR2 (1) ~~ASSTQ~~
 4G6 LC CDR2 20031000528 (1) ~~ASSTQ~~
 4G6 LC CDR2 20031028351 (1) ~~ASSTQ~~
 6H9 LC CDR2 (1) ~~ASSTQ~~
 14D10 LC CDR2 (1) ~~ASSTQ~~
 4G6 LC CDR2 20031071526 (1) ~~ASSTQ~~
 7H2 LC CDR2 (1) ~~ASSTQ~~
 NGF 4G6 LC CDR2 20031028344 (1) ~~ASSTQ~~

	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 9

NGF CDR3 轻链比对/同一性%

(1) 1 9

14D10 LC CDR3 (1) QYGSSEPYT
 7H2 LC CDR3 (1) QYGSSE-YT
 6H9 LC CDR3 (1) QYGSSEPYT
 4G6 LC CDR3 20031000528 (1) QQRSNWPEWT
 4G6 LC CDR3 20031028351 (1) QQRSNWHRIT
 14D11 LC CDR3 (1) QQANSEFPWT
 4D4 LC CDR3 (1) QQFNSEYPLT
 4G6 LC CDR3 20031028340 (1) QQYNSEYFPT
 4G6 LC CDR3 20031071526 (1) QQYNSEYFPT
 NGF 4G6 LC CDR3 20031028344 (1) QYGSSEPYT

	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 10

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

	1	10	20	30	40	50	67
4D4 VK	(1)	AIQLTQSPSSLSASVGD	RVITTCRASQGIS	-ALAMYQQKPGKAP	KLLIYDASSL	ESGVP	SRFSGSG
NGF 4G6 κ 20031071526rc v 区 (1)	EIVLTQSPG	TLSSLSPGERAT	CDR 1	QSVSSSYLAMYQQKPGQAP	CDR 2	ASSRATG	IPDRFSGSG
NGF 4G6 LC 2003102834rv 区 (1)	EIVLTQSPG	TLSSLSPGERAT	TCRASQGIS	SSSYLAMYQQKPGQAP	KSLIYDASSL	QSGVPSRF	SGSG
NGF 4G6 LC 2003102834rv 区 (1)	DIQMTQSP	8SLSAVGD	RVITTCRASQGIS	SSSYLAMYQQKPEKAP	RLLIYDASNR	ATGIPARF	SGSG
NGF 4G6 LC 2003102835rv 区 (1)	EIVLTQSP	8P8SLSAVGD	RVITTCRASQGIS	SSSYLAMYQQKPGQAP	RLLIYDASNR	ATGIPARF	SGSG
NGF LC 4G6 GR5' pCR4 20031000528V 区 #2 (1)	EIVLTQSP	8P8SLSAVGD	RVITTCRASQGIS	SSSYLAMYQQKPGQAP	RLLIYDASNR	ATGIPARF	SGSG
NGF 14D10 LC 20031028386rc v 区 (1)	EIVLTQSP	8P8SLSAVGD	RVITTCRASQGIS	SSSYLAMYQQKPGQAP	RLLIYDASNR	ATGIPARF	SGSG
NGF 14D11 lc 20031028405rc v 区 (1)	DIQMTQSP	8SVSAVGD	RVITTCRASQGIS	SSSYLAMYQQKPGQAP	KLLIYDASSL	QSGVPSRF	SGSG
NGF 6H9 Hu κ V 区不分种 2002120980 (1)	EIVLTQSP	8GTLSSLSPGERAT	TCRASQGIS	SSSYLAMYQQKPGQAP	RLLIYDASSL	QSGVPSRF	SGSG
NGF 7H2 Hu κ 2002120984V 区不分种 (1)	EIVLTQSP	8GTLSSLSPGERAT	TCRASQGIS	SSSYLAMYQQKPGQAP	RLLIYDASSL	QSGVPSRF	SGSG
4D4 VK	(68)	68	80	108			
4D4 VK	(67)	SGTDF	FTLTISSLQPEDFA	YVYQQDFNSYPLTFGG	GTKV	ELK	
NGF 4G6 κ 20031071526rc v 区 (68)	SGTDF	FTLTISSLQPEDFA	YVYQQDFNSYPLTFGG	GTKV	ELK		
NGF 4G6 LC 2003102834rv 区 (68)	SGTDF	FTLTISSLQPEDFA	YVYQQDFNSYPLTFGG	GTKV	ELK		
NGF 4G6 LC 2003102834rv 区 (67)	SGTDF	FTLTISSLQPEDFA	YVYQQDFNSYPLTFGG	GTKV	ELK		
NGF 4G6 LC 2003102835rv 区 (67)	PGTDF	FTLTISSLQPEDFA	YVYQQDFNSYPLTFGG	GTKV	ELK		
NGF 4G6 LC 2003102835rv 区 #2 (67)	SGTDF	FTLTISSLQPEDFA	YVYQQDFNSYPLTFGG	GTKV	ELK		
NGF LC 4G6 GR5' pCR4 20031000528V 区 (68)	SGTDF	FTLTISSLQPEDFA	YVYQQDFNSYPLTFGG	GTKV	ELK		
NGF 14D10 LC 20031028386rc v 区 (67)	SGTDF	FTLTISSLQPEDFA	YVYQQDFNSYPLTFGG	GTKV	ELK		
NGF 14D11 lc 20031028405rc v 区 (67)	SGTDF	FTLTISSLQPEDFA	YVYQQDFNSYPLTFGG	GTKV	ELK		
NGF 6H9 Hu κ V 区不分种 2002120980 (68)	SGTDF	FTLTISSLQPEDFA	YVYQQDFNSYPLTFGG	GTKV	ELK		
NGF 7H2 Hu κ 2002120984V 区不分种 (68)	SGTDF	FTLTISSLQPEDFA	YVYQQDFNSYPLTFGG	GTKV	ELK		

图 11

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

		1	10	20	30	CDR1	40	50	CDR2	66	第 1 部分	
	(1)	1	10	20	30	CDR1	40	50	CDR2	66	第 1 部分	
4D4 VH	(1)	EVQLVESGGGLVQPGGSR	LRISCAA	SGFTLR	SYSMN	VRQA	PEKGL	EMV	SYIS	RS	SSHT	IFYADSVK
NGF 14D10 HC 20031071581v 区	(1)	EVQLVESGGGLVQPGSR	LRISCTA	SGFTFD	YAMH	VRQA	PEKGL	EMV	SYIS	RS	SSHT	IFYADSVK
NGF 6H9 HC Hu-大鼠 2002120864 最终 V 区	(1)	EVQLVESGGGLVQPGSR	LRISCAA	SGFTFD	YAMH	VRQA	PEKGL	EMV	SYIS	RS	SSHT	IFYADSVK
NGF 7H2 Hu-大鼠 IgG2b.b 2002118141 最终 V 区	(1)	EVQLVESGGGLVQPGSR	LRISCAA	SGFTFD	YAMH	VRQA	PEKGL	EMV	SYIS	RS	SSHT	IFYADSVK
NGF 14D11 HC 种族 20031028394rcV 区	(1)	EVQLVQSGAEVKKP	GESLR	IKISCK	GGSYN	FTTY	MTIG	MVRQ	MP	EKGL	EMV	SDIN
NGF 4G6 HC pCR4TOPO 20031028328v 区	(1)	EVQLVESGGGVVRR	GGSLR	LRISCAA	SGFTFD	YGMN	VRQA	PEKGL	EMV	SDIN	NGG	STGYADSVK
						CDR3						
	(67)	67	80	90	100	110	127				第 2 部分	
4D4 VH	(67)	RFTISR	DNAKNSLYLQMD	SLR	DEDT	AMY	CAR	--	VYSS	GMHV	SDYFD	YMG
NGF 14D10 HC 20031071581v 区	(67)	RFTVSR	DNAKNSLYLQMN	SLRA	EDT	ALYY	CAKE	GY	SGR	PGY	FYYV	MDVM
NGF 6H9 HC Hu-大鼠 2002120864 最终 V 区	(67)	RFTISR	DNAKNSLYLQMN	SLRA	EDT	ALYY	CAKE	GY	SGR	PGY	FYYV	MDVM
NGF 7H2 Hu-大鼠 IgG2b.b 2002118141 最终 V 区	(67)	RFTISR	DDAKNSLYLQMN	SLRA	EDT	ALYY	CAKE	---	EG	SGRY	NFD	YMG
NGF 14D11 HC 种族 20031028394rcV 区	(67)	QV	TISADK	SI	TAYL	QW	SS	LK	A	S	D	T
NGF 4G6 HC pCR4TOPO 20031028328v 区	(67)	RFTISR	DNAKNSLYLQMN	SLRA	EDT	ALYY	CAR	--	EQ	WLD	P	Y

图 12

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	CN102762228A	公开(公告)日	2012-10-31
申请号	CN201080055899.7	申请日	2010-10-08
[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	K D 维尔德 J J S 特里诺尔 H 黄 H 伊诺 T J 张 F 马丁		
发明人	K.D.维尔德 J.J.S.特里诺尔 H.黄 H.伊诺 T.J.张 F.马丁		
IPC分类号	A61K39/395 C07K16/22 G01N33/53 C12N15/68 C12N5/10 A61P25/00 A61P35/00 A61P19/02 A61P29/02		
CPC分类号	C07K2317/21 A61K2039/54 C07K16/22 A61K2039/505 C07K2317/56 A61P1/04 A61P1/14 A61P1/18 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P13/00 A61P13/10 A61P15/00 A61P15/08 A61P17/02 A61P17/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/04 A61P25/06 A61P25/32 A61P27/02 A61P29/00 A61P29/02 A61P31/18 A61P31/20 A61P31/22 A61P35/00 A61P37/08 G03F7/091 A61K39/00 A61K39/3955 C07K2317/76		
代理人(译)	孔青 李进		
优先权	12/576522 2009-10-09 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供与人神经生长因子(NGF)相互作用或与之结合，从而中和NGF的功能的抗体。本发明还提供所述抗体的药物组合物和用于中和NGF功能的方法，特别是通过给予药学上有效量的抗NGF抗体来治疗NGF相关病症(例如慢性疼痛)的方法。还提供使用抗NGF抗体检测样品中的NGF的量的方法。

NGF CDR3 重链比对/同一性%

(1) 1 17
 14D10 HC CDR3 (1) SYVGSGRPGYFYVNDV
 6H9 HC CDR3 (1) SYVGSGRPGYFYVNDV
 14D11 HC CDR3 (1) SYVGSGRPGYFYVNDV
 4G6 HC CDR3 (1) EQWLDEYYGMDV
 4D4 HC CDR3 (1) VLS-SGWHSDYFDY
 7H2 HC CDR3 (1) SSGR--YVFDY

	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