



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103732622 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 16

(21) 申请号 201280033616. 8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 05. 08

C07K 16/22 (2006. 01)

C07K 16/46 (2006. 01)

(30) 优先权数据

1114858. 2 2011. 08. 29 GB

61/483, 481 2011. 05. 06 US

61/531, 439 2011. 09. 06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 01. 06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2012/051002 2012. 05. 08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/153121 EN 2012. 11. 15

(71) 申请人 NVIP 私人有限公司

地址 澳大利亚维多利亚州

(72) 发明人 大卫·吉尔芮

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

公司 11002

代理人 谢顺星 刘成春

权利要求书8页 说明书37页

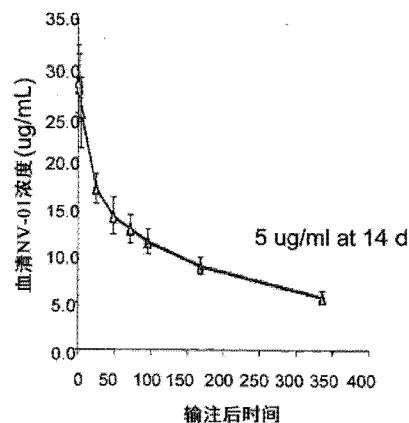
序列表33页 附图18页

(54) 发明名称

抗神经生长因子抗体及其制备和使用方法

(57) 摘要

本发明提供了一种制备适用于犬的抗体的方法。还提供了与犬神经生长因子 (NGF) 特异性结合且中和犬 NGF 结合 p75 或 TrkA 犬 NGF 受体能力的犬源化抗体。本发明延及编码所述抗体的核酸和使用所述抗体和 / 或核酸治疗犬疼痛和关节炎的方法。



1. 一种制备适用于犬的抗体的方法,包括以下步骤:

从犬以外的物种中提供供体抗体,其中所述供体抗体对所述犬中存在的靶抗原具有结合特异性;

将所述供体抗体框架区氨基酸序列的每一氨基酸残基与一个或多个犬抗体框架区氨基酸序列中对应位置存在的每一氨基酸残基进行比较,以鉴别出所述供体抗体框架区氨基酸序列内与所述一个或多个犬抗体框架区氨基酸序列内对应位置的一个或多个氨基酸残基不同的一个或多个氨基酸残基;以及

用所述一个或多个犬抗体中对应位置存在的一个或多个氨基酸残基取代所述供体抗体中的一个或多个鉴别出的氨基酸残基。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中取代所述一个或多个鉴别出的氨基酸残基的步骤包括:用对应位置存在的与一个或多个被取代的氨基酸残基具有最高同源性的一个或多个氨基酸残基取代所述一个或多个鉴别出的氨基酸残基。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述方法进一步包括下述步骤:用来自犬抗体的重链和 / 或轻链的恒定结构域取代所述供体抗体的重链和 / 或轻链的恒定结构域。

4. 如权利要求 3 所述的方法,其中用 HCA 或 HCD 型犬恒定结构域取代所述重链的恒定结构域。

5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的方法,其中所述靶抗原是神经生长因子 (NGF)。

6. 能够特异性结合犬神经生长因子 (NGF) 的中和抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗体结合片段包含轻链可变区和 / 或重链可变区,所述轻链可变区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 或者与所述氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列,所述重链可变区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 或者与所述氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列。

7. 如权利要求 6 所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是嵌合抗体或犬源化抗体。

8. 如权利要求 6 或 7 所述的抗体或其抗原结合片段,其中通过氨基酸取代或缺失的方式来选择或修饰所述抗体的重链恒定结构域,使得所述恒定结构域并不介导下游的效应子功能。

9. 如权利要求 6-8 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述轻链包含氨基酸序列 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:10 或者与所述氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列。

10. 如权利要求 6-9 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链包含选自 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列。

11. 如权利要求 6-9 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链包含选自 SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21 和 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列具有至少 85% 序列同一性的氨基酸序列。

12. 如权利要求 6-9 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链包含选自

SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19 和 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列具有至少 85% 序列同一性的氨基酸序列。

13. 抗犬 NGF 抗体或其犬 NGF 结合片段,包含轻链可变区和 / 或重链可变区,其中所述轻链可变区包含以下中的至少一个:

由氨基酸序列 SEQ ID NO:23 或 SEQ ID NO:24 组成或包含所述氨基酸序列的 FR1 框架区;

由氨基酸序列 SEQ ID NO:25 组成或包含所述氨基酸序列的 FR2 框架区;

由氨基酸序列 SEQ ID NO:26 或 SEQ ID NO:27 组成或包含所述氨基酸序列的 FR3 框架区;

由氨基酸序列 SEQ ID NO:28 组成或包含所述氨基酸序列的 FR4 框架区;

所述重链可变区包含以下中的至少一种:

由氨基酸序列 SEQ ID NO:29 组成或包含所述氨基酸序列的 FR1 框架区;

由氨基酸序列 SEQ ID NO:30 组成或包含所述氨基酸序列的 FR2 框架区;

由氨基酸序列 SEQ ID NO:31 或 SEQ ID NO:32 组成或包含所述氨基酸序列的 FR3 框架区;

由氨基酸序列 SEQ ID NO:33 组成或包含所述氨基酸序列的 FR4 框架区。

14. 如权利要求 13 所述的抗犬 NGF 抗体或犬 NGF 结合片段,其包含具有 SEQ ID NO:23 的 FR1 区的轻链可变结构域,所述 SEQ ID NO:23 通过被选自以下的一个或多个氨基酸取代进行修饰:氨基酸残基 Q3 被 V 取代, T5 被 M 取代, S7 被 T 取代, A9 被 L 取代, L13 被 V 取代, Q15 被 P 或 R 取代, E16 被 G 取代, K18 被 T 或 P 取代, V19 被 A 取代, T20 被 S 取代, T22 被 S 取代, T5 被 I 取代, A9 被 P 取代, S12 被 A 取代, S14 被 R 或 T 取代, E16 被 D 取代, E17 被 D 取代, K18 被 A、E 或 L 取代, T22 被 Y 取代,以及 C23 被 Y 取代。

15. 如权利要求 13 所述的抗犬 NGF 抗体或犬 NGF 结合片段,其包含具有 SEQ ID NO:24 的 FR1 区的轻链可变结构域,所述 SEQ ID NO:24 通过被选自以下的一个或多个氨基酸取代进行修饰:残基 V3 被 Q 取代, T5 被 M 取代, S7 被 T 取代, A9 被 L 取代, L13 被 V 取代, Q15 被 P 或 R 取代, E16 被 G 取代, K18 被 T 或 P 取代, V19 被 A 取代, T20 被 S 取代,以及 T22 被 S 取代, T5 被 I 取代, A9 被 P 取代, S12 被 A 取代, S14 被 R 或 T 取代, E16 被 D 取代, E17 被 D 取代, K18 被 A、E 或 L 取代, T22 被 Y 取代,以及 C23 被 Y 取代。

16. 如权利要求 13-15 中任一项所述的抗犬 NGF 抗体或犬 NGF 结合片段,其包含具有 SEQ ID NO:25 的 FR2 区的轻链可变结构域,所述 SEQ ID NO:25 通过被选自以下的一个或多个氨基酸取代进行修饰:Y2 被 F 取代, Q3 被 R 取代, A9 被 S 取代, K11 被 Q 取代, L12 被 R 取代, Y2 被 I 或 L 取代, Q3 被 I 或 L 取代, Q4 被 H 取代, K5 被 R 取代, P6 被 A 或 S 取代, G7 被 D 取代, A9 被 P 或 T 取代, K11 被 E 或 R 取代, L12 被 A、G、P 或 S 取代, I14 被 L 取代,以及 Y15 被 E、F、N、S 或 V 取代。

17. 如权利要求 13-16 中任一项所述的抗犬 NGF 抗体或犬 NGF 结合片段,其包含具有 SEQ ID NO:26 的 FR3 区的轻链可变结构域,所述 SEQ ID NO:26 通过被选自以下的一个或多个氨基酸取代进行修饰:S4 被 D 取代, E14 被 D 取代, Y15 被 F 取代, S16 被 T 取代, L17 被 F 取代, T18 被 K 取代, N20 被 S 取代, L22 被 V 取代, S24 被 P 取代, V27 被 A 取代, F31 被 Y 取

代, G1 被 A 取代, V2 被 A 取代, P3 被 S 取代, F6 被 L 或 V 取代, S7 被 I 取代, G8 被 A 取代, T13 被 A 取代, S16 被 R 取代, T18 被 R 取代, S24 被 A 取代, E25 被 D、G、I 或 N 取代, V27 被 G、S 或 T 取代, A28 被 G 取代, 以及 V29 被 I 或 L 取代。

18. 如权利要求 13-16 中任一项所述的抗犬 NGF 抗体或犬 NGF 结合片段, 其包含具有 SEQ ID NO:27 的 FR3 区的轻链可变结构域, 所述 SEQ ID NO:27 通过被选自以下的一个或多个氨基酸取代进行修饰: S4 被 D 取代, E14 被 D 取代, F15 被 Y 取代, S16 被 T 取代, L17 被 F 取代, T18 被 K 取代, S20 被 N 取代, L22 被 V 取代, P24 被 S 取代, V27 被 A 取代, Y31 被 F 取代, G1 被 A 取代, V2 被 A 取代, P3 被 S 取代, F6 被 L 或 V 取代, S7 被 I 取代, G8 被 A 取代, T13 被 A 取代, S16 被 R 取代, T18 被 R 取代, S24 被 A 取代, E25 被 D、G、I 或 N 取代, V27 被 G、S 或 T 取代, A28 被 G 取代, 以及 V29 被 I 或 L 取代。

19. 如权利要求 13-18 中任一项所述的抗犬 NGF 抗体或犬 NGF 结合片段, 其包含具有 SEQ ID NO:28 的 FR4 区的轻链可变结构域, 所述 SEQ ID NO:28 通过被选自以下的一个或多个氨基酸取代进行修饰: E8 被 D 取代, G2 被 S 取代, A3 被 P、Q 或 T 取代, G4 被 E 取代, T5 被 P 取代, K6 被 Q 或 S 取代, V7 被 L 或 W 取代, E8 被 R 取代, 或 L9 被 I 取代。

20. 如权利要求 13-19 中任一项所述的抗犬 NGF 抗体或犬 NGF 结合片段, 其包含具有 SEQ ID NO:29 的 FR1 区的重链可变结构域, 所述 SEQ ID NO:29 通过被选自以下的一个或多个氨基酸取代进行修饰: D10 被 G 取代, N13 被 Q 取代, G15 被 T 取代, G16 被 E 取代, T17 被 S 取代, T19 被 R 取代, V24 被 A 取代, S28 被 T 取代, L29 被 F 取代, T30 被 S 取代, E1 被 D 或 G 取代, V2 被 E、G、I、L 或 M 取代, Q3 被 A、E、H、K、L、P、R、S 或 V 取代, L4 被 P 或 V 取代, V5 被 A、E、L 或 M 取代, E6 被 A 或 Q 取代, S7 被 F、L 或 T 取代, G9 被 E 取代, D10 被 A、E、N 或 T 取代, L11 被 Q、R、V 或 W 取代, V12 被 A、I 或 M 取代, N13 被 K 或 R 取代, P14 被 F 或 T 取代, G15 被 A 或 E 取代, G16 被 A 取代, T17 被 P 取代, L18 被 R 取代, T19 被 G、K 或 V 取代, L20 被 I 或 V 取代, S21 被 Y 取代, V23 被 A、E、I 或 L 取代, V24 被 G、I、S 或 T 取代, S25 被 G、P 或 T 取代, G26 被 D、R 或 T 取代, F27 被 D、I、L、S、T 或 V 取代, S28 被 A、D、I、L、M、N、P 或 R 取代, L29 被 I、M 或 V 取代, T30 被 D、G、H、I、K、N、R 或 V 取代。

21. 如权利要求 13-20 中任一项所述的抗犬 NGF 抗体或犬 NGF 结合片段, 其包含具有 SEQ ID NO:30 的 FR2 区的重链可变结构域, 所述 SEQ ID NO:30 通过被选自以下的一个或多个氨基酸取代进行修饰: L6 被 P 取代, R8 被 K 取代, E11 被 Q 取代, G14 被 A 取代, W1 被 C 取代, V2 被 A、F、I 或 L 取代, Q4 被 H 或 L 取代, A5 被 D、G、P、S、T 或 V 取代, G7 被 E、L 或 R 取代, R8 被 A、E、G、M 或 Q 取代, G9 被 D、E、R、T 或 V 取代, L10 被 F、M 或 P 取代, E11 被 D、H、L、P 或 R 取代, W12 被 C、F、L、M、S 或 Y 取代, V13 被 F、I 或 L 取代, G14 被 L、S 或 T 取代。

22. 如权利要求 13-21 中任一项所述的抗犬 NGF 抗体或犬 NGF 结合片段, 其包含具有 SEQ ID NO:31 的 FR3 区的重链可变结构域, 所述 SEQ ID NO:31 通过被选自以下的一个或多个氨基酸取代进行修饰: L2 被 F 取代, T5 被 S 取代, T8 被 N 取代, S9 被 A 取代, S11 被 N 取代, V13 被 L 取代, F14 被 Y 取代, K16 被 Q 取代, H18 被 N 取代, Q21 被 R 取代, S22 被 A 取代, T27 被 V 取代, R32 被 K 取代, R1 被 Q 取代, L2 被 V 取代, T3 被 A、I 或 S 取代, I4 被 L、M、T 或 V 取代, T5 被 A 或 F 取代, R6 被 K 取代, D7 被 E 或 N 取代, T8 被 D、G、I 或 S 取代, S9 被 D、G、P、T 或 V 取代, K10 被 E、G、M、N、Q 或 R 取代, S11 被 D、H、K 或 R 取代, T12 被 A、I、M 或 S 取代, V13 被 A、I 或 M 取代, F14 被 H、S 或 T 取代, L15 被 I 取代, K16 被 A、D、E、H 或

R 取代, M17 被 L 取代, H18 被 D、K、P、R、S 或 T 取代, S19 被 D、G、N、R 或 T 取代, L20 被 V 取代, Q21 被 G、I、K、S 或 T 取代, S22 被 D、G、P、T 或 V 取代, E23 被 A、D 或 V 取代, T25 被 A、M 或 S 取代, A26 被 G 或 V 取代, T27 被 F、I、K、L、M 或 Q 取代, Y28 被 H 取代, Y29 被 F 或 H 取代, A31 被 C、G、L、M、R、S、T 或 V 取代, R32 被 A、D、E、G、I、L、M、N、P、Q、S、T 或 V 取代。

23. 如权利要求 13-21 中任一项所述的抗犬 NGF 抗体或犬 NGF 结合片段, 其包含具有 SEQ ID NO:32 的 FR3 区的重链可变结构域, 所述 SEQ ID NO:32 通过被选自以下的一个或多个氨基酸取代进行修饰: L2 被 F 取代, T5 被 S 取代, T8 被 N 取代, S9 被 A 取代, S11 被 N 取代, V13 被 L 取代, F14 被 Y 取代, Q16 被 K 取代, H18 被 N 取代, R21 被 Q 取代, S22 被 A 取代, T27 被 V 取代, R32 被 K 取代, R1 被 Q 取代, L2 被 V 取代, T3 被 A、I 或 S 取代, I4 被 L、M、T 或 V 取代, T5 被 A 或 F 取代, R6 被 K 取代, D7 被 E 或 N 取代, T8 被 D、G、I 或 S 取代, S9 被 D、G、P、T 或 V 取代, K10 被 E、G、M、N、Q 或 R 取代, S11 被 D、H、K 或 R 取代, T12 被 A、I、M 或 S 取代, V13 被 A、I 或 M 取代, F14 被 H、S 或 T 取代, L15 被 I 取代, K16 被 A、D、E、H 或 R 取代, M17 被 L 取代, H18 被 D、K、P、R、S 或 T 取代, S19 被 D、G、N、R 或 T 取代, L20 被 V 取代, Q21 被 G、I、K、S 或 T 取代, S22 被 D、G、P、T 或 V 取代, E23 被 A、D 或 V 取代, T25 被 A、M 或 S 取代, A26 被 G 或 V 取代, T27 被 F、I、K、L、M 或 Q 取代, Y28 被 H 取代, Y29 被 F 或 H 取代, A31 被 C、G、L、M、R、S、T 或 V 取代, R32 被 A、D、E、G、I、L、M、N、P、Q、S、T 或 V 取代。

24. 如权利要求 13-23 中任一项所述的抗犬 NGF 抗体或犬 NGF 结合片段, 其包含具有 SEQ ID NO:33 的 FR34 区的轻链可变结构域, 所述 SEQ ID NO:33 通过被选自以下的一个或多个氨基酸取代进行修饰: W1 被 L 取代, G2 被 A 或 S 取代, Q3 被 D、H、P 或 R 取代, T5 被 A、I、N 或 S 取代, L6 被 P、Q 或 R 取代, V7 被 I、L 或 P 取代, T8 被 A、F、I、L、P、S 或 Y 取代, V9 被 A 取代, S10 被 A、C、P 或 T 取代, S11 被 A、L 或 P 取代。

25. 如权利要求 13-24 中任一项所述的抗体, 其中所述抗体具有 HCA 或 HCD 型犬恒定结构域。

26. 通过权利要求 1-5 中任一项所述的方法制备的抗体或其结合片段。

27. 如权利要求 6-26 中任一项所述的抗体或其结合片段, 其中所述抗体或片段与犬 NGF 的结合抑制犬 NGF 结合 p75 或 TrkA 犬 NGF 受体的能力。

28. 如权利要求 6-27 中任一项所述的抗体或结合片段, 其以平衡解离常数为 1×10^{-8} 或更小的结合亲和性与犬 NGF 特异性结合。

29. 如权利要求 6-28 中任一项所述的抗体或结合片段, 其中所述抗原结合片段选自单链 Fv(scFv) 抗体片段、Fab 抗体片段、Fab' 抗体片段和 F(ab')₂ 抗体片段。

30. 如权利要求 6-29 中任一项所述的抗体或结合片段, 其中所述抗体是多特异性抗体或多价抗体。

31. 如权利要求 6-30 中任一项所述的抗体或结合片段, 其中所述抗体或结合片段在犬中的血清寿命为至少一周。

32. 如权利要求 6-31 中任一项所述的抗体或结合片段, 其中所述抗体或结合片段在犬中不是免疫原性的。

33. 如权利要求 6-32 中任一项所述的抗体或结合片段, 其中所述抗体通过包括阴离子交换层析、疏水作用层析和尺寸排阻层析的步骤的方法可纯化。

34. 如权利要求 6-33 中任一项所述的抗体或结合片段, 其中所述抗体通过包括

Captodhere 亲和层析和阴离子交换层析的步骤的方法可纯化。

35. 一种治疗、抑制或减轻犬疼痛的方法,所述方法包括以下步骤:

提供治疗有效量的抗犬 NGF 抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是犬源化抗体;以及

将所述抗犬 NGF 抗体或其抗原结合片段施用至有需要的犬。

36. 如权利要求 35 所述的方法,其中所述抗犬 NGF 抗体是权利要求 6-34 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

37. 如权利要求 35 所述的方法,其中所述抗犬 NGF 抗体包含轻链可变结构域和 / 或重链可变结构域,所述轻链可变结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 或与所述氨基酸序列具有至少 85% 同一性的序列,所述重链可变结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 或与所述氨基酸序列具有至少 85% 序列同源性的氨基酸序列。

38. 如权利要求 35 所述的方法,其中所述抗犬 NGF 抗体包括轻链和 / 或重链,所述轻链具有氨基酸序列 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:10 或与所述氨基酸序列具有至少 85% 序列同一性的序列,所述重链包含、组成为或基本组成为:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:14 或与所述氨基酸序列具有至少 85% 序列同一性的氨基酸序列。

39. 如权利要求 35-38 中任一项所述的方法,其中所述疼痛选自神经病理性疼痛、炎性疼痛、瘙痒疼痛、围术期疼痛、手术后疼痛和外科手术后疼痛。

40. 如权利要求 39 所述的方法,其中术后疼痛选自矫形外科手术、软组织外科手术、卵巢子宫切除术和阉割手术引起的疼痛。

41. 一种治疗犬个体关节炎或关节炎病症的方法,所述方法包括以下步骤:

提供治疗有效量的抗犬 NGF 抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是犬源化抗体;以及

将所述抗犬 NGF 抗体或其抗原结合片段施用至有需要的犬。

42. 如权利要求 41 所述的方法,其中所述抗犬 NGF 抗体是权利要求 6-34 中任一项所述的抗体。

43. 如权利要求 41 所述的方法,其中所述抗犬 NGF 抗体包含轻链可变结构域和 / 或重链可变结构域,所述轻链可变结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 或与所述氨基酸序列具有至少 85% 序列同一性的序列,所述重链可变结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 或与所述氨基酸序列具有至少 85% 序列同源性的氨基酸序列。

44. 如权利要求 41 所述的方法,其中所述抗犬 NGF 抗体包括轻链和 / 或重链,所述轻链具有氨基酸序列 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:10 或与所述氨基酸序列具有至少 85% 序列同一性的序列,所述重链包含、组成为或基本组成为选自 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 85% 序列同一性的氨基酸序列。

45. 如权利要求 41-44 中任一项所述的方法,其中所述关节炎或关节炎病症包括选自免疫介导的多发性关节炎、风湿性关节炎和骨关节炎的病症。

46. 如权利要求 41-45 中任一项所述的方法,其中所述关节炎或关节炎病症的治疗包括减轻、抑制、降低、压制或延迟与所述关节炎病症相关或由其引起的疼痛的发作。

47. 治疗犬个体由犬 NGF 表达增强或对 NGF 敏感性增强引起的或与其相关的或导致其病症的方法,所述方法包括以下步骤:

提供治疗有效量的抗犬 NGF 抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是犬源化抗体;以及

将所述抗犬 NGF 抗体或其抗原结合片段施用至有需要的犬。

48. 如权利要求 47 所述的方法,其中所述抗犬 NGF 抗体是权利要求 6-34 中任一项所述的抗体。

49. 如权利要求 47 所述的方法,其中所述抗犬 NGF 抗体包含轻链可变结构域和 / 或重链可变结构域,所述轻链可变结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 或与所述氨基酸序列具有至少 85% 同一性的序列,所述重链可变结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 或与所述氨基酸序列具有至少 85% 序列同源性的氨基酸序列。

50. 如权利要求 47 所述的方法,其中所述抗犬 NGF 抗体包含轻链和 / 或重链,所述轻链包含氨基酸序列 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:10 或与所述氨基酸序列具有至少 85% 序列同一性的序列,所述重链可变结构域包含、组成为或基本组成为选自 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 85% 序列同一性的氨基酸序列。

51. 治疗犬中由 NGF 诱发增殖的肿瘤和与其相关的病症的方法,所述方法包括以下步骤:

提供治疗有效量的抗犬 NGF 抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是犬源化抗体;以及

将所述抗犬 NGF 抗体或其抗原结合片段施用至有需要的犬。

52. 如权利要求 51 所述的方法,其中所述抗犬 NGF 抗体是权利要求 6-34 中任一项所述的抗体。

53. 如权利要求 51 所述的方法,其中所述抗犬 NGF 抗体包含轻链可变结构域和 / 或重链可变结构域,所述轻链可变结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 或与所述氨基酸序列具有至少 85% 同一性的序列,所述重链可变结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 或与所述氨基酸序列具有至少 85% 序列同源性的氨基酸序列。

54. 如权利要求 51 所述的方法,其中所述抗犬 NGF 抗体包含轻链和 / 或重链,所述轻链包含氨基酸序列 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:10 或与所述氨基酸序列具有至少 85% 序列同一性的序列,所述重链包含组成为或基本组成为选自 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 85% 序列同一性的氨基酸序列。

55. 如权利要求 51-54 中任一项所述的方法,其中所述肿瘤是由自分泌或旁分泌 NGF 诱导增殖的。

56. 如权利要求 55 所述的方法,其中所述肿瘤是骨肉瘤。

57. 如权利要求 35-56 中任一项所述的方法,其进一步包括共施用至少一种另外的治疗剂的步骤。

58. 如权利要求 57 所述的方法,其中所述至少一种治疗剂选自镇痛剂、NSAID、阿片样物质、皮质类固醇和类固醇。

59. 如权利要求 57 所述的方法,其中所述至少一种治疗剂选自抗生素、抗真菌治疗剂、抗原生动物治疗剂和抗病毒治疗剂。

60. 如权利要求 57 所述的方法,其中所述至少一种治疗剂选自炎症介质的抑制剂、PGE 受体拮抗剂、免疫抑制剂、环孢霉素、抗炎糖皮质激素、用于治疗认知功能障碍或损伤的药剂、抗高血压药剂、用于治疗心血管功能障碍的化合物、利尿剂、血管扩张剂、 β 肾上腺素受体拮抗剂、血管紧张肽 II 转化酶抑制剂、钙通道阻滞剂和 HMG-CoA 还原酶抑制剂。

61. 如权利要求 35-60 中任一项所述的方法,其中将所述抗体或抗原结合片段以约 0.01mg/kg 体重至约 10mg/kg 体重的剂量施用至犬。

62. 如权利要求 35-60 中任一项所述的方法,其中将所述抗体或抗原结合片段以约 0.03mg/kg 体重至约 3mg/kg 体重的剂量施用至犬。

63. 用于治疗由犬疼痛引起或导致的疼痛或病症或由 NGF 诱导增殖的肿瘤的药物组合物,其包含治疗有效量的权利要求 6-34 中任一项所述的抗犬 NGF 犬源化抗体或其结合片段,以及至少一种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

64. 如权利要求 63 所述的药物组合物,还包含至少一种镇痛剂、NSAID、阿片样物质、皮质类固醇或类固醇。

65. 如权利要求 63 或 64 所述的药物组合物,其中所述导致疼痛的病症选自风湿性关节炎、骨关节炎、瘙痒、炎症、免疫介导的多发性关节炎、急性疼痛、慢性疼痛、外科手术疼痛、外科手术后的疼痛,或所述由 NGF 诱导增殖的肿瘤是骨肉瘤。

66. 分离的核酸,其编码权利要求 6-34 中任一项所述的抗体或抗原结合片段。

67. 分离的核酸,其编码具有氨基酸序列 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 的抗犬 NGF 抗体或抗体片段的轻链可变结构域或具有氨基酸序列 SEQ ID NO:5 或 10 的轻链。

68. 分离的核酸,其编码具有氨基酸序列 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 的抗犬 NGF 犬源化抗体或抗体片段的轻链可变结构域或具有选自 SEQ ID NO:6-9、SEQ ID NO:11-22 的氨基酸序列的重链。

69. 如权利要求 66-68 中任一项所述的分离的核酸,其可操作地连接于一个或多个调控序列。

70. 表达载体,其包含权利要求 66-69 中任一项所述的核酸。

71. 如权利要求 70 所述的表达载体,其进一步包含一个或多个调控序列。

72. 如权利要求 70 或 71 所述的表达载体,其中所述载体是质粒或逆转录病毒载体。

73. 宿主细胞,其并入了权利要求 70-72 中任一项所述的表达载体。

74. 产生犬源化抗犬 NGF 中和抗体的方法,所述方法包括:培养权利要求 73 所述的宿主细胞,以使所述细胞表达犬源化抗犬 NGF 中和抗体。

75. 治疗、减轻或抑制犬疼痛或者治疗由 NGF 诱导增殖的肿瘤的方法,所述方法包括将治疗有效量的权利要求 66-69 中任一项所述的核酸施用至所述犬。

76. 权利要求 6-34 中任一项所述的抗体或抗体结合片段,权利要求 63-65 中任一项所述的药物组合物,权利要求 66-69 中任一项所述的核酸或者权利要求 70-72 所述的表达载体,用于治疗或预防犬疼痛。

77. 如权利要求 76 所述的抗体或抗体结合片段,其中所述疼痛选自:急性疼痛、慢性疼痛、围术期疼痛、手术后疼痛、矫形外科手术引起的疼痛、与软组织外科手术相关的疼痛、由

卵巢子宫切除术引起的疼痛、由阉割手术引起的疼痛、炎性疼痛、瘙痒疼痛、与癌症或癌性病症相关的慢性疼痛以及与风湿性关节炎或骨关节炎相关的或由其引起的疼痛。

78. 权利要求 6-34 中任一项所述的抗体或抗体结合片段, 权利要求 63-65 中任一项所述的药物组合物, 权利要求 66-69 中任一项所述的核酸或者权利要求 70-72 所述的表达载体, 用于治疗关节炎。

79. 如权利要求 78 中所述的抗体或抗体结合片段, 其中所述关节炎是骨关节炎、免疫介导的多发性关节炎或风湿性关节炎。

80. 权利要求 6-34 中任一项所述的抗体或抗体结合片段, 权利要求 63-65 中任一项所述的药物组合物, 权利要求 66-69 中任一项所述的核酸或者权利要求 70-72 所述的表达载体, 用于治疗或预防犬个体中由 NGF 诱导增殖的肿瘤及其相关病症。

81. 如权利要求 80 所述的抗体或抗体结合片段, 其中所述肿瘤是骨肉瘤。

82. 权利要求 6-34 中任一项所述的抗体或抗体结合片段, 权利要求 63-65 中任一项所述的药物组合物, 权利要求 66-69 中任一项所述的核酸或者权利要求 70-72 所述的表达载体, 在制备用于治疗或预防犬的疼痛的药物中的用途。

83. 如权利要求 82 所述的用途, 其中所述疼痛选自急性疼痛、慢性疼痛、围术期疼痛、手术后疼痛、矫形外科手术引起的疼痛、与软组织外科手术相关的疼痛、由卵巢子宫切除术引起的疼痛、由阉割手术引起的疼痛、与癌症或癌性病症相关的慢性疼痛以及与风湿性关节炎相关的或由其引起的疼痛、炎性疼痛、瘙痒疼痛、免疫介导的多发性关节炎或骨关节炎。

84. 权利要求 6-34 中任一项所述的抗体或抗体结合片段, 权利要求 63-65 中任一项所述的药物组合物, 权利要求 66-69 中任一项所述的核酸或者权利要求 70-72 所述的表达载体, 在制备用于治疗、抑制、减轻或预防犬关节炎的药物中的用途。

85. 如权利要求 84 所述的用途, 其中所述关节炎是骨关节炎、免疫介导的多发性关节炎或风湿性关节炎。

86. 权利要求 6-34 中任一项所述的抗体或抗体结合片段, 权利要求 63-65 中任一项所述的药物组合物, 权利要求 66-69 中任一项所述的核酸或者权利要求 70-72 所述的表达载体, 在制备用于治疗犬中由 NGF 诱导增殖的肿瘤和其相关病症的药物中的用途。

87. 如权利要求 86 所述的用途, 其中所述肿瘤是骨肉瘤。

88. 细胞系或其衍生细胞或后代细胞, 其产生权利要求 6-34 中任一项所述的抗犬 NGF 中和单克隆抗体或其片段。

89. 用于治疗犬疼痛、或者用于治疗与疼痛相关的病症、或者用于治疗、减轻或抑制与免疫介导关节炎、骨关节炎或风湿性关节炎相关的疼痛、或者用于治疗犬中由 NGF 诱导增殖的肿瘤和其相关病症的试剂盒, 所述试剂盒包含权利要求 6-34 中任一项所述的抗犬 NGF 抗体或结合片段及其使用说明。

90. 用于检测抗犬 NGF 单克隆抗体或结合片段的诊断试剂盒, 其包含权利要求 6-34 中任一项所述的抗犬 NGF 抗体或结合片段。

抗神经生长因子抗体及其制备和使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及充当犬神经生长因子的拮抗剂抗体及其片段。本发明还涉及制备这些抗体的方法以及这些抗体和片段在治疗犬的与神经生长因子相关的病症中的治疗用途,例如疼痛、疼痛相关病症以及与导致慢性疼痛发作的病症。

背景技术

[0002] 神经生长因子(NGF)是天然存在的分泌蛋白,其由 α 多肽链、 β 多肽链和 γ 多肽链构成。NGF 是神经营养因子家族的成员,其参与许多不同的作用。NGF 促进感觉神经元和交感神经元的生存和分化,并且通过两类膜结合受体即低亲和性 NGF 受体 p75 和高亲和性 NGF 受体跨膜酪氨酸激酶 TrkA 来传达信号。NGF 与 TrkA 或 p75 的结合导致感觉神经元中神经肽的上调。

[0003] 已经描述了使用 NGF 拮抗剂治疗人类的疼痛和疼痛敏感 (Cattaneo A.、Curr. Op. Mol. Ther. 201012(1):94-106)。例如,国际专利申请 W02006/131951 描述了人源化形式的大鼠 α D11 (aD11) 单克隆抗体。 α D11 抗体对小鼠 NGF 具有结合特异性,但已知也与人类和大鼠形式的 NGF 结合。在施用至人之前,需要对 α D11 大鼠衍生单克隆抗体进行人源化,从而使产生的中和抗体最少,该中和抗体是由人类对啮齿类衍生抗体的抗大鼠抗体 (HAMA) 反应产生的。而且,用人恒定结构域取代小鼠恒定结构域允许选择下游效应子功能。

[0004] 目前,通过施用数种镇痛剂包括局部和全身麻醉剂、麻醉性镇痛剂、 $\alpha 2$ 拮抗剂、非类固醇抗炎药 (NSAIDs) 和类固醇来进行犬的疼痛管理。这些药物中的每一种都需要频繁地施用并且在功效和安全性方面也有局限性。因此,对于患有慢性疼痛例如患有癌痛或关节炎的犬,需要不频繁施用且持久有效的疼痛缓解。

[0005] 虽然 NGF 在犬组织中表达,并且已经表征了犬 NGF 分子 (Eisele I. Wood I.S. German A.J. Hunter L. Trayhurn P. "Adipokine gene expression in dog adipose tissues and dog white adipocytes differentiated in primary culture" Hormone & Metabolic Research. 37(8):474-81, 2005 Genbank XP_540250), 但该文章既没有描述犬 NGF 的拮抗剂,也没有在犬中使用阻塞 NGF 介导的信号传导以防止或缓解疼痛。由于中和抗体的产生,因此在犬中使用在其他物种中充当抗 NGF 拮抗剂的已知抗体并不可行。而且,包含犬衍生恒定结构域和衍生自己知的抗 NGF 抗体例如 α D11 的可变结构域的嵌合抗体的产生,并不能保证与犬 NGF 结合。此外,这样的抗体可以显示出与犬中可能存在但最初衍生该抗体的物种中不存在的其他靶表位的交叉反应。另外,中和抗体的产生将限制该抗体的长期治疗施用,当治疗与慢性疼痛相关的病症或癌病症况时,这是特别重要的条件。同样,使用 CDR 移植或相关的技术产生犬源化形式的抗 NGF 抗体可能导致中和抗体的产生,并且可能进一步显示抗原结合亲和性与亲合力的降低。因此,迫切需要用于犬疼痛治疗中充当犬 NGF 拮抗剂的结合成员 (binding member), 其中该结合成员保持高水平的结合亲和性与亲合力,同时避免了针对其的中和抗体的产生。

[0006] 发明概述

[0007] 经过大量的努力,本发明人意外地发现了一种制备抗体的方法,该抗体产生特异性结合犬 NGF 且中和犬 NGF 生物活性的非免疫原性抗体及其结合片段。特别是,出乎意料地,本文表明,本发明的抗体及其结合片段与犬 NGF 的结合,通过抑制犬 NGF 与高亲和性 TrkA 受体或与 p75 受体的结合,隔绝了犬 NGF 的生物活性。这反过来阻止了感知神经元中神经肽的上调,结果减轻或消除了痛觉。使用重组 DNA 方法生产抗体,并且出乎意料地该抗体是非免疫原性的,也就是说,在施用至犬个体之后,针对该抗体的中和抗体并未产生。由于使用标准方法例如 CDR 移植等并未产生抗体,因此这样的发现是令人惊讶且完全出乎意料的。

[0008] 根据本发明的第一方面,提供了制备适用于犬中的抗体的方法,其包括或基本上由以下步骤组成:

[0009] 从犬之外的物种提供供体抗体,其中所述供体抗体对犬中存在的靶抗原具有结合特异性;

[0010] 将所述供体抗体框架区氨基酸序列的每一氨基酸残基与一个或多个犬抗体的框架区的氨基酸序列中对应位置的每一氨基酸残基比较,以鉴别出所述供体受体框架区氨基酸序列内与所述一个或多个犬抗体的框架区的氨基酸序列的对应位置的一个或多个氨基酸残基不同的一个或多个氨基酸残基;以及

[0011] 用存在于一个或多个犬抗体中对应位置的一个或多个氨基酸残基来取代所述供体抗体中一个或多个鉴别出的氨基酸残基。

[0012] 本发明的方法修饰了犬中使用的供体抗体,这样的方法使得修饰的抗体的框架区内的任何位置不含有在犬中的该位置将是外来的任何氨基酸。因此,修饰的抗体保持了供体抗体对靶抗原的特异性和亲和性,但重要的是修饰并没有产生潜在的外来表位。因此,在犬中,修饰的抗体不被看做外来的,并且尤其是在长期施用后,也没有在犬中引起可能导致抗体功效的中和的免疫反应。

[0013] 在某些实施方案中,取代所述一个或多个鉴别出的氨基酸残基的步骤包括,用存在于对应位置的与所述一个或多个取代的氨基酸残基具有最高同源性的一个或多个氨基酸残基来取代所述一个或多个鉴别出的氨基酸残基。

[0014] 在某些实施方案中,该方法还包括用衍生自犬抗体的重链和/或轻链的恒定结构域取代所述供体抗体的重链和/或轻链的恒定结构域的步骤。通常,该重链的恒定结构域被 HCA 或 HCD 犬恒定结构域取代。

[0015] 在某些实施方案中,靶抗原是神经生长因子(NGF)。

[0016] 本发明第一方面的方法并不包括 CDR 移植。根据本发明第一方面的方法制备的抗体包含供体抗体的 CDR、根据本发明的第一方面的方法制备的犬源化框架区,以及犬的恒定结构域。

[0017] 本发明延及根据本发明的第一方面例如以下的描述制备的抗体。

[0018] 因此,根据本发明的另一方面,提供了特异性结合犬神经生长因子(NGF)的犬源化抗体或其结合片段。通常,当与 NGF 结合时,犬源化抗体或其结合片段中和 NGF 生物功能。也就是说,犬源化抗体或结合片段与 NGF 的结合隔绝了 NGF 与 TrkA 受体或与 p75 受体结合的能力。在某些实施方案中,犬源化抗体或其结合片段与 NGF 结合的结合亲和力 K_D 为 1×10^{-8} 或更小。

[0019] 在本发明的另一或相关方面,提供了中和抗体或其抗原结合片段,其能够与犬神经生长因子(NGF)特异性结合,该抗体或抗体结合片段包含、组成为或基本组成为:包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 或与其具有至少 85、90、95 或 99% 同一性的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方案中,所述同一性是在至少约 15 个氨基酸,优选约 20 个氨基酸,更优选为约 25 个氨基酸的长度上。

[0020] 在一些实施方案中,中和抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗体是嵌合抗体。在一些实施方案中,抗体是犬源化抗体,即具有已经去免疫的氨基酸序列的抗体,从而,当施用至犬后,并不产生针对所述抗体的中和抗体。在某些实施方案中,根据本发明第一方面的制备抗体的方法来制备犬源化抗体。通常通过氨基酸取代或缺失的方式来选择或修饰抗体的重链恒定结构域,从而使得恒定结构域并不介导下游的效应子功能。

[0021] 在一些实施方案中,抗体或抗体结合片段包含、组成为或基本组成为:包含氨基酸序列 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:10 或与其具有至少 85、90、95 或 99% 序列同源性的氨基酸序列的轻链。在某些实施方案中,所述同一性是在至少约 15 个氨基酸,优选约 20 个氨基酸,更优选约 25 个氨基酸的长度上。

[0022] 在本发明的另一或相关方面,提供了中和抗体或其抗原结合片段,其能够与犬神经生长因子(NGF)特异性结合,该抗体或抗体结合片段包含、组成为或基本组成为:包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 或与其具有至少 85、90、95 或 99% 同一性的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施方案中,所述同一性是在至少约 15 个氨基酸,优选约 20 个氨基酸,更优选约 25 个氨基酸的长度。

[0023] 通常,重链(VH)的可变区与包含至少一个免疫球蛋白恒定结构域的另一氨基酸序列结合。在某些实施方案中,免疫球蛋白恒定结构域衍生自子类 IgG(免疫球蛋白 G)抗体,以形成本发明的犬源化抗体的完整重链。已知四种不同的犬恒定结构域。通常,所述恒定结构域包含 CH1、CH2 和 CH3 以及位于 CH1 和 CH2 结构域之间的合适的连接体(或铰链“hinge”)。通常,本发明的抗犬 NGF 抗体包含与恒定结构域结合的重链可变结构域,其中该恒定结构域并不介导下游的效应子功能例如补体结合、ADCC、Fc 受体结合等。通常,所述重链具有犬重链同种型 A 或 D。

[0024] 在某些实施方案中,抗体或抗体结合片段包含、组成为或基本组成为:包含 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 85、90、95 或 99% 同一性的氨基酸序列的重链。在某些实施方案中,所述同一性是在至少约 15 个氨基酸,优选约 20 个氨基酸,更优选约 25 个氨基酸的长度上。

[0025] 在某些另外的实施方案中,抗体或结合片段可以包含其中恒定结构域中的至少一个氨基酸残基被取代或缺失以阻止该氨基酸残基糖基化的重链。因此,在某些另外的实施方案中,抗体或抗体结合片段包含、组成为或基本组成为:包含选自 SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21 和 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 85、90、95 或 99% 序列同一性的氨基酸序列的重链。在某些实施方案中,所述同一性是在至少约 15 个氨基酸,优选约 20 个氨基酸,更优选约 25 个氨基酸的长度上。

[0026] 在一些实施方案中,优选不介导下游效应子功能例如补体结合、ADCC、Fc 受体结合

等且具有重链恒定结构域的抗体或片段。这样的重链可以包含犬来源的亚型 IgG-A 的重链并且可以具有氨基酸序列 SEQ ID NO:6、11、15 或 19。而且,这样的重链可以包含犬来源的亚型 IgG-D 并且可以具有氨基酸序列 SEQ ID NO:9、14、18 或 22。

[0027] 在另一个或相关的方面,本发明延及中和抗体或其抗原结合片段,其能够与犬神经生长因子 (NGF) 特异性结合,所述抗体或抗体结合片段包含、组成为或基本组成为:轻链和重链,其中轻链 (VL) 的可变区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、95 或 99% 序列同一性的氨基酸序列,并且其中重链 (VH) 的可变区包含、组成为或基本组成为:与氨基酸序列 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 相同或基本上同源的氨基酸序列或与其具有至少 85%、90%、95 或 99% 序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述同一性是在至少约 15 个氨基酸,优选约 20 个氨基酸,更优选约 25 个氨基酸的长度上。

[0028] 在某些实施方案中,抗体或结合成员 (binding member) 包含轻链,所述轻链包含、组成为或基本组成为:氨基酸序列 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:10 或与其具有至少 85%、优选为 95%、更优选为至少 98% 氨基酸同一性的序列。在某些实施方案中,所述同一性是在至少约 15 个氨基酸,优选约 20 个氨基酸,更优选约 25 个氨基酸的长度上。

[0029] 在某些实施方案中,抗体或结合成员包含重链,所述重链包含、组成为或基本组成为:选自 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列具有至少 85%、优选 95%、更优选至少 98% 序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述同一性是在至少约 15 个氨基酸,优选约 20 个氨基酸,更优选约 25 个氨基酸的长度上。

[0030] 在某些实施方案中,抗体可以与至少受体分子缀合。

[0031] 在某些另外的实施方案中,可以取代或缺失恒定结构域中的至少一个残基,以防止该残基的糖基化。因此,在某些另外的实施方案中,抗体或抗体结合片段包含、组成为或基本组成为:重链,其中该重链包含选自 SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21 和 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列具有至少 85%、优选 95%、更优选至少 98% 同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述同一性是在至少约 15 个氨基酸,优选约 20 个氨基酸,更优选约 25 个氨基酸的长度上。

[0032] 本发明人进一步限定了一系列可以与互补性决定区 (CDRs) 结合以形成犬源化重链可变结构域和犬源化轻链可变结构域的框架区 (FR)。每一个重链结构域和轻链结构域都具有 4 个框架区,称为 FR1、FR2、FR3 和 FR4。

[0033] 抗体分子可以包含重链可变结构域,其包含 CDR1、CDR2 和 CDR3 区以及相关的插入框架区。重链可变结构域 (VH) CDR 称为 HCDRs,根据 Kabat 编号系统在下列位置可以找到这些 CDRs:VHCDR1 - Kabat 残基 31-35、VHCDR2 - Kabat 残基 50-65、VHCDR3 - Kabat 残基 95-102 (Kabat EA et al. (1991) Sequences of proteins of immunological interest (具有免疫学重要性的蛋白质序列), 5th edition. Bethesda:US Department of Health and Human Services,)。

[0034] 而且,抗体进一步包含轻链可变结构域,其包含 CDR1、CDR2 和 CDR3 区以及相关的插入框架区。轻链可变结构域 (VL) CDR 称为 VLCDR,根据 Kabat 编号系统在下列氨基

酸残基位置可以找到这些 CDRs:VLCDR1 - Kabat 残基 24-34、VLCDR2 - Kabat 残基 50-56、VLCDR3 - Kabat 残基 89-97。

[0035] 轻链可变结构域或重链可变结构域包含四个框架区, FR1、FR2、FR3 和 FR4, 以 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 排列插入 CDR。

[0036] 在另一方面, 本发明延及抗 NGF 抗体或其 NGF 结合片段, 所述抗体或抗体结合片段包含轻链可变区和 / 或重链可变区, 所述轻链可变区包含以下中的至少一个:

[0037] 包含或由氨基酸序列 SEQ ID NO:23 或 SEQ ID NO:24 组成的 FR1 框架区;

[0038] 包含或由氨基酸序列 SEQ ID NO:25 组成的 FR2 框架区;

[0039] 包含或由氨基酸序列 SEQ ID NO:26 或 SEQ ID NO:27 组成的 FR3 框架区;

[0040] 包含或由氨基酸序列 SEQ ID NO:28 组成的 FR4 框架区;

[0041] 所述重链可变区, 包含以下中的至少一个:

[0042] 包含或由氨基酸序列 SEQ ID NO:29 组成的 FR1 框架区;

[0043] 包含或由氨基酸序列 SEQ ID NO:30 组成的 FR2 框架区;

[0044] 包含或由氨基酸序列 SEQ ID NO:31 或 SEQ ID NO:32 组成的 FR3 框架区;

[0045] 包含或由氨基酸序列 SEQ ID NO:33 组成的 FR4 框架区。

[0046] 通常, 轻链 CDR 和重链 CDR 衍生自对犬 NGF 具有结合特异性的抗体。

[0047] 通常, 本发明犬源化抗犬 NGF 抗体的产生不需要待引入轻链可变结构域或重链可变结构域的框架区内的回复突变。

[0048] 在某些实施方案中, 包含以上描述的所述至少一个框架区的轻链可变结构域与犬来源的轻链恒定结构域结合, 犬衍生轻链恒定结构域通常为轻链 κ 恒定结构域, 但任选地为 λ 轻链。在某些实施方案中, 所述轻链包含具有氨基酸序列 SEQ ID NO:23 或 SEQ ID NO:24 的 FR1 区, 具有氨基酸序列 SEQ ID NO:25 的 FR2 区, 具有氨基酸序列 SEQ ID NO:26 或 SEQ ID NO:27 的 FR3 区, 具有氨基酸序列 SEQ ID NO:28 的 FR4 区, 或与前述氨基酸序列具有至少 85、90、95 或 98% 序列同一性的氨基酸序列的框架区。在某些实施方案中, 所述同一性是在至少于 5 个氨基酸, 优选约 10 个氨基酸的长度上。

[0049] 在某些另外的实施方案中, 包含以上描述的至少一个框架区的重链可变区与犬衍生重链恒定结构域结合。在某些实施方案中, 恒定结构域的氨基酸序列没有任何翻译后修饰, 或者可以被修饰以除去可能经历 N- 连接或 O- 连接糖基化的任何残基或全部残基, 这样使得恒定结构域未被糖基化。在某些实施方案中, 重链包含具有氨基酸序列 SEQ ID NO:29 的 FR1 区, 具有氨基酸序列 SEQ ID NO:30 的 FR2 区, 具有氨基酸序列 SEQ ID NO:31 或 SEQ ID NO:32 的 FR3 区和具有氨基酸序列 SEQ ID NO:33 的 FR4 区, 或具有与前述氨基酸序列有至少 85、90、95 或 98% 序列同一性的氨基酸序列的框架区。在某些实施方案中, 所述同一性是在至少约 5 个氨基酸, 优选约 10 个氨基酸的长度上。

[0050] 在某些另外的实施方案中, 可以对本文描述的框架区进行修饰。也就是说, 发明者确认, 对于每一框架区中的一些残基来说, 可以为指定位置选择氨基酸。重要的是, 这些框架区修饰不会导致互补性决定区的构象改变, 这是由于这可以改变所得抗体的结合特异性和 / 或亲和性。在某些实施方案中, 本发明延及将 2 个或以上氨基酸取代引入到轻链可变区和 / 或重链可变区的框架区的氨基酸残基。

[0051] 因此, 在某些另外的实施方案中, 本发明延及多肽, 例如包含具有 FR1 区的轻链可

变结构域的抗体或其抗原结合片段,所述 FR1 区包含被以下氨基酸取代(其中氨基酸用其单字母代码表示)中的一个或多个修饰的氨基酸序列 SEQ ID NO:23,即位置 3 的氨基酸残基 Q(Q3) 被氨基酸残基 V 取代,T5 被 M 取代,S7 被 T 取代,A9 被 L 取代,L13 被 V 取代,Q15 被 P 或 R 取代,E16 被 G 取代,K18 被 T 或 P 取代,V19 被 A 取代,T20 被 S 取代,以及 T22 被 S 取代。此外,还可以提供一个或多个以下取代:T5 被 I 取代,A9 被 P 取代,S12 被 A 取代,S14 被 R 或 T 取代,E16 被 D 取代,E17 被 D 取代,K18 被 A、E 或 L 取代,T22 被 Y 取代,以及 C23 被 Y 取代。

[0052] 在某些另外的实施方案中,其中轻链可变区具有包含氨基酸序列 SEQ ID NO:24 的 FR1 区,其可以被一个或多个以下氨基酸取代来修饰:位置 3 的氨基酸残基 V(V3) 被氨基酸残基 Q 取代,T5 被 M 取代,S7 被 T 取代,A9 被 L 取代,L13 被 V 取代,Q15 被 P 或 R 取代,E16 被 G 取代,K18 被 T 或 P 取代,V19 被 A 取代,T20 被 S 取代,以及 T22 被 S 取代。此外,还可以提供一个或多个以下取代:T5 被 I 取代,A9 被 P 取代,S12 被 A 取代,S14 被 R 或 T 取代,E16 被 D 取代,E17 被 D 取代,K18 被 A、E 或 L 取代,T22 被 Y 取代,以及 C23 被 Y 取代。

[0053] 在某些另外的实施方案中,具有氨基酸序列 SEQ ID NO:25 的轻链 FR2 区可以通过被一个或多个以下氨基酸取代进行修饰:Y2 被 F 取代,Q3 被 R 取代,A9 被 S 取代,K11 被 Q 取代,以及 L12 被 R 取代。此外,Y2 可以被 I 或 L 取代,Q3 可以被 I 或 L 取代,Q4 可以被 H 取代,K5 可以被 R 取代,P6 可以被 A 或 S 取代,G7 可以被 D 取代,A9 可以被 P 或 T 取代,K11 可以被 E 或 R 取代,L12 可以被 A、G、P 或 S 取代,I14 可以被 L 取代,以及 Y15 可以被 E、F、N、S 或 V 取代。

[0054] 在某些另外的实施方案中,具有氨基酸序列 SEQ ID NO:26 的轻链 FR3 区可以通过被一个或多个以下氨基酸取代进行修饰:S4 被 D 取代,E14 被 D 取代,Y15 被 F 取代,S16 被 T 取代,L17 被 F 取代,T18 被 K 取代,N20 被 S 取代,L22 被 V 取代,S24 被 P 取代,V27 被 A 取代,以及 F31 被 Y 取代。此外,G1 可以被 A 取代,V2 可以被 A 取代,P3 可以被 S 取代,F6 可以被 L 或 V 取代,S7 可以被 I 取代,G8 可以被 A 取代,T13 可以被 A 取代,S16 可以被 R 取代,T18 可以被 R 取代,S24 可以被 A 取代,E25 可以被 D、G、I 或 N 取代,V27 可以被 G、S 或 T 取代,A28 可以被 G 取代,以及 V29 可以被 I 或 L 取代。

[0055] 在某些另外的实施方案中,其中轻链可变区具有包含氨基酸序列 SEQ ID NO:27 的 FR3 区,其可以被一个或多个以下氨基酸取代修饰:S4 被 D 取代,E14 被 D 取代,F15 被 Y 取代,S16 被 T 取代,L17 被 F 取代,T18 被 K 取代,S20 被 N 取代,L22 被 V 取代,P24 被 S 取代,V27 被 A 取代,以及 Y31 被 F 取代。此外,G1 可以被 A 取代,V2 可以被 A 取代,P3 可以被 S 取代,F6 可以被 L 或 V 取代,S7 可以被 I 取代,G8 可以被 A 取代,T13 可以被 A 取代,S16 可以被 R 取代,T18 可以被 R 取代,S24 可以被 A 取代,E25 可以被 D、G、I 或 N 取代,V27 可以被 G、S 或 T 取代,A28 可以被 G 取代,以及 V29 可以被 I 或 L 取代。

[0056] 在某些另外的实施方案中,具有氨基酸序列 SEQ ID NO:28 的轻链 FR4 区可以通过被一个或多个以下氨基酸取代进行修饰:E8 被 D 取代。此外,G2 可以被 S 取代,A3 可以被 P、Q 或 T 取代,G4 可以被 E 取代,T5 可以被 P 取代,K6 可以被 Q 或 S 取代,V7 可以被 L 或 W 取代,E8 可以被 R 取代,或 L9 可以被 I 取代。

[0057] 在某些另外的实施方案中,具有氨基酸序列 SEQ ID NO:29 的重链 FR1 区可以被一个或多个以下氨基酸取代修饰:D10 被 G 取代,N13 被 Q 取代,G15 被 T 取代,G16 被 E 取代,

T17 被 S 取代, T19 被 R 取代, V24 被 A 取代, S28 被 T 取代, L29 被 F 取代, 以及 T30 被 S 取代。此外, E1 可以被 D 或 G 取代, V2 可以被 E、G、I、L 或 M 取代, Q3 可以被 A、E、H、K、L、P、R、S 或 V 取代, L4 可以被 P 或 V 取代, V5 可以被 A、E、L 或 M 取代, E6 可以被 A 或 Q 取代, S7 可以被 F、L 或 T 取代, G9 可以被 E 取代, D10 可以被 A、E、N 或 T 取代, L11 可以被 Q、R、V 或 W 取代, V12 可以被 A、I 或 M 取代, N13 可以被 K 或 R 取代, P14 可以被 F 或 T 取代, G15 可以被 A 或 E 取代, G16 可以被 A 取代, T17 可以被 P 取代, L18 可以被 R 取代, T19 可以被 G、K 或 V 取代, L20 可以被 I 或 V 取代, S21 可以被 Y 取代, V23 可以被 A、E、I 或 L 取代, V24 可以被 G、I、S 或 T 取代, S25 可以被 G、P 或 T 取代, G26 可以被 D、R 或 T 取代, F27 可以被 D、I、L、S、T 或 V 取代, S28 可以被 A、D、I、L、M、N、P 或 R 取代, L29 可以被 I、M 或 V 取代, T30 可以被 D、G、H、I、K、N、R、V 取代。

[0058] 在某些另外的实施方案中, 具有氨基酸序列 SEQ ID NO:30 的重链 FR2 区可以通过被一个或多个以下氨基酸取代进行修饰: L6 被 P 取代, R8 被 K 取代, E11 被 Q 取代, G14 被 A 取代。此外, W1 可以被 C 取代, V2 可以被 A、F、I 或 L 取代, Q4 可以被 H 或 L 取代, A5 可以被 D、G、P、S、T 或 V 取代, G7 可以被 E、L 或 R 取代, R8 可以被 A、E、G、M 或 Q 取代, G9 可以被 D、E、R、T 或 V 取代, L10 可以被 F、M 或 P 取代, E11 可以被 D、H、L、P 或 R 取代, W12 可以被 C、F、L、M、S 或 Y 取代, V13 可以被 F、I 或 L 取代, G14 可以被 L、S 或 T 取代。

[0059] 在某些另外的实施方案中, 具有氨基酸序列 SEQ ID NO:31 的重链 FR3 区可以通过被一个或多个以下氨基酸取代进行修饰: L2 被 F 取代, T5 被 S 取代, T8 被 N 取代, S9 被 A 取代, S11 被 N 取代, V13 被 L 取代, F14 被 Y 取代, K16 被 Q 取代, H18 被 N 取代, Q21 被 R 取代, S22 被 A 取代, T27 被 V 取代, R32 被 K 取代。此外, R1 可以被 Q 取代, L2 可以被 V 取代, T3 可以被 A、I 或 S 取代, I4 可以被 L、M、T 或 V 取代, T5 可以被 A 或 F 取代, R6 可以被 K 取代, D7 可以被 E 或 N 取代, T8 可以被 D、G、I 或 S 取代, S9 可以被 D、G、P、T 或 V 取代, K10 可以被 E、G、M、N、Q 或 R 取代, S11 可以被 D、H、K 或 R 取代, T12 可以被 A、I、M 或 S 取代, V13 可以被 A、I 或 M 取代, F14 可以被 H、S 或 T 取代, L15 可以被 I 取代, K16 可以被 A、D、E、H 或 R 取代, M17 可以被 L 取代, H18 可以被 D、K、P、R、S 或 T 取代, S19 可以被 D、G、N、R 或 T 取代, L20 可以被 V 取代, Q21 可以被 G、I、K、S 或 T 取代, S22 可以被 D、G、P、T 或 V 取代, E23 可以被 A、D 或 V 取代, T25 可以被 A、M 或 S 取代, A26 可以被 G 或 V 取代, T27 可以被 F、I、K、L、M 或 Q 取代, Y28 可以被 H 取代, Y29 可以被 F 或 H 取代, A31 可以被 C、G、L、M、R、S、T 或 V 取代, R32 被 A、D、E、G、I、L、M、N、P、Q、S、T 或 V 取代。

[0060] 在某些另外的实施方案中, 其中重链可变结构域具有包含氨基酸序列 SEQ ID NO:32 的 FR3 区, 其可以通过被一个或多个以下氨基酸取代进行修饰: L2 被 F 取代, T5 被 S 取代, T8 被 N 取代, S9 被 A 取代, S11 被 N 取代, V13 被 L 取代, F14 被 Y 取代, Q16 被 K 取代, H18 被 N 取代, R21 被 Q 取代, S22 被 A 取代, T27 被 V 取代, R32 被 K 取代。此外, R1 可以被 Q 取代, L2 可以被 V 取代, T3 可以被 A、I 或 S 取代, I4 可以被 L、M、T 或 V 取代, T5 可以被 A 或 F 取代, R6 可以被 K 取代, D7 可以被 E 或 N 取代, T8 可以被 D、G、I 或 S 取代, S9 可以被 D、G、P、T 或 V 取代, K10 可以被 E、G、M、N、Q 或 R 取代, S11 可以被 D、H、K 或 R 取代, T12 可以被 A、I、M 或 S 取代, V13 可以被 A、I 或 M 取代, F14 可以被 H、S 或 T 取代, L15 可以被 I 取代, K16 可以被 A、D、E、H 或 R 取代, M17 可以被 L 取代, H18 可以被 D、K、P、R、S 或 T 取代, S19 可以被 D、G、N、R 或 T 取代, L20 可以被 V 取代, Q21 可以被 G、I、K、S 或 T 取代, S22

可以被 D、G、P、T 或 V 取代, E23 可以被 A、D 或 V 取代, T25 可以被 A、M 或 S 取代, A26 可以被 G 或 V 取代, T27 可以被 F、I、K、L、M 或 Q 取代, Y28 可以被 H 取代, Y29 可以被 F 或 H 取代, A31 可以被 C、G、L、M、R、S、T 或 V 取代, R32 被 A、D、E、G、I、L、M、N、P、Q、S、T 或 V 取代。

[0061] 在某些另外的实施方案中, 具有氨基酸序列 SEQ ID NO:33 的重链 FR4 区可以通过被一个或多个以下氨基酸取代进行修饰: L6 被 S 取代。此外, W1 可以被 L 取代, G2 可以被 A 或 S 取代, Q3 可以被 D、H、P 或 R 取代, T5 可以被 A、I、N 或 S 取代, L6 可以被 P、Q 或 R 取代, V7 可以被 I、L 或 P 取代, T8 可以被 A、F、I、L、P、S 或 Y 取代, V9 可以被 A 取代, S10 可以被 A、C、P 或 T 取代, S11 可以被 A、L 或 P 取代。

[0062] 在本发明以上方面的某些实施方案中, 抗体是单克隆抗体。通常, 所述抗体是犬源化抗体。

[0063] 在本发明以上方面的某些实施方案中, 本发明的犬源化 NGF 中和抗体或由其衍生的结合片段与犬 NGF (神经生长因子) 特异性结合且其结合亲和性的平衡解离常数 (K_D) 为 1×10^{-8} 或更小。而且, 优选该犬源化抗体不与犬内存在的任何其他表位交叉反应, 并且进一步, 当将本发明的抗体施用于犬时, 不产生针对本发明的抗体的中和抗体。此外, 优选抗体的恒定结构域不介导任何下游的效应子功能, 包括但不限于补体结合和激活、ADCC 以及 Fc 受体结合和激活。

[0064] 在本发明的以上方面的某些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段在犬中的血清半衰期为至少一周。通常, 血清半衰期是至少 8 天。通常, 该抗体在犬中不是免疫原性的。

[0065] 在本发明的以上方面的某些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段是纯化的或通过包括阴离子交换层析、疏水作用层析和尺寸排阻层析等方法被纯化。在可选的实施方案中, 抗体或其抗原结合片段是纯化的或通过包括 Captopadhere 亲和层析之后进行阴离子交换层析的方法纯化。

[0066] 在某些实施方案中, 抗体或其抗原结合片段并不介导下游的效应子功能。通常, 该抗体或结合片段具有犬重链同种型 A 或 D。

[0067] 在某些实施方案中, 根据本发明第一方面制备抗体的方法来制备犬源化抗体。在某些另外的实施方案中, 可以对本发明的抗体进行重链的恒定结构域的氨基酸序列修饰。所述修饰可以包括一个或多个氨基酸残基的添加、取代或缺失。通常为了改变抗体的功能特性而进行这些氨基酸改变。例如, 可以进行氨基酸修饰以防止被抗体恒定结构域介导的下游效应子功能, 例如通过防止抗体结合 Fc 受体、激活补体或诱导 ADCC 的能力。此外, 为了改变当施用于犬时抗体的循环半衰期, 可以对重链恒定结构域铰链区 (hinge region) 的氨基酸残基进行修饰。

[0068] 本发明延及结合犬 NGF 并且隔绝其结合 p75 或 TrkA 受体的能力的抗体片段。

[0069] 在某些实施方案中, 抗体结合片段可以包括被柔性连接体连接以形成单链抗体的本发明的重链和轻链序列。

[0070] 单链 Fv (scFv) 包含 VH 结构域和 VL 结构域。VH 结构域和 VL 结构域结合形成靶结合位点。这两个结构域通过肽连接体共价连接。scFv 分子在 N 末端需要轻链可变结构域的情况下可以具有 VL-连接体-VH 的形式, 或在 N 末端需要 VH 结构域的情况下为 VH-连接体-VL。因此, 在某些另外的实施方案中, 抗原结合片段是单链 Fv (scFv) 抗体片段。在某些另外的实施方案中, 抗体结合片段选自 Fab 抗体片段、Fab' 抗体片段、F(ab')₂ 抗体片

段、Fv 抗体片段、scFV 抗体片段等,但并不限于此。

[0071] 在一些实施方案中,本发明提供了用于联合疗法的多特异性或多价抗体,其包含以不同的结合特异性与其他抗体偶联或结合的本发明的抗 NGF 抗体或结合片段。多特异性抗体包含对第一 NGF 表位有特异性的至少一个抗体或结合片段,和对 NGF 上存在的另一表位或对不同的抗原有特异性的至少一个结合位点。多价抗体包含对同一 NGF 表位有结合特异性的抗体或抗体结合片段。因此,在某些实施方案中,本发明延及包含本发明的犬源化抗体的四个或更多 Fv 区或 Fab 区的抗体融合蛋白。另外的实施方案还延及抗体融合蛋白,其包含衍生自本文描述的抗体的一个或多个 Fab 区与来自对 NGF 有特异性的抗体的一个或多个 Fab 区或 Fv 区。在某些另外的实施方案中,本发明延及双特异性抗体,其中本发明的抗体或其结合片段与对第二靶标有结合特异性的第二抗体或其结合片段连接,所述第二靶标不是 NGF。优选地,所述第二靶标通过 p75 或 TrkA 受体有助于阻止 NGF 介导的信号传导。可以通过本领域技术人员熟知的多种方法或重组方法来制得这样的多价抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。

[0072] 本发明的另一方面提供了抗神经营养因子中和抗体,其包含具有氨基酸序列 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 的轻链可变结构域,和/或具有氨基酸序列 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 的重链可变结构域。在某些实施方案中,神经营养因子是犬神经生长因子 (NGF)。

[0073] 本发明的又一方面提供了治疗、抑制或减轻犬的疼痛的方法,该方法包括以下步骤:

[0074] 提供治疗有效量的抗犬 NGF 抗体或其抗原结合片段;以及

[0075] 将所述抗犬 NGF 抗体或其抗原结合片段施用至有需要的犬。

[0076] 在某些实施方案中,该抗体是犬源化抗体。

[0077] 在某些实施方案中,该抗体包含轻链可变结构域和/或重链可变结构域,所述轻链可变结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 或与所述氨基酸序列具有至少 85% 同一性的序列,所述重链可变结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 或与所述氨基酸序列具有至少 85% 序列同源性的氨基酸序列。

[0078] 在某些实施方案中,该抗体包括轻链和/或重链,所述轻链具有氨基酸序列 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:10 或与所述氨基酸序列具有至少 85% 序列同一性的序列,所述重链包含、组成为或基本组成为:选自 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列具有至少 85%、更优选为至少 98 氨基酸同一性的序列。

[0079] 在某些实施方案中,抗犬 NGF 抗体或其抗原结合片段是本发明的前述方面提供的任何抗犬 NGF 抗体或其抗原结合片段。

[0080] 在某些实施方案中,疼痛是指神经病理性疼痛 (neuropathic pain)。特别是,疼痛可以是围手术期、手术后或外科手术后疼痛。手术后疼痛 (post-operative pain) 可能在犬的以下任何手术程序后发生,其包括但不限于矫形外科手术、软组织外科手术、卵巢子宫切除术、阉割手术等。在某些另外的实施方案中,疼痛是与癌症或癌性病征相关的慢性疼痛 (肿瘤疼痛)。在某些另外的实施方案中,疼痛与风湿性关节炎或骨关节炎相关或由它们导致。在某些实施方案中,疼痛是炎性疼痛或瘙痒疼痛。

[0081] 根据本发明的另一方面,提供了治疗犬个体的关节炎或关节炎病症的方法,所述

方法包括以下步骤：

[0082] 提供治疗有效量的本发明的抗犬 NGF 抗体或其抗原结合片段；以及

[0083] 将所述抗犬 NGF 抗体或其抗原结合片段施用至有需要的犬。

[0084] 在某些实施方案中，该抗体是犬源化抗体。在某些实施方案中，该抗体包含轻链可变结构域和 / 或重链可变结构域，所述轻链可变结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 或与所述氨基酸序列具有至少 85% 同一性的序列，所述重链可变结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 或与所述氨基酸序列具有至少 85% 序列同源性的氨基酸序列。

[0085] 在某些实施方案中，关节炎或关节炎病症包括选自免疫介导的多发性关节炎、风湿性关节炎、骨关节炎和相关病症。

[0086] 通常，关节炎或关节炎病症的治疗包括减轻、抑制、降低、压制或延迟与关节炎病症相关的或由其引起的疼痛的发作。

[0087] 本发明的又一方面提供了治疗犬个体中由犬 NGF 表达增加或对 NGF 敏感性增加引起的或与其相关的或导致其的病症的方法，所述方法包括以下步骤：

[0088] 提供治疗有效量的本发明的犬源化抗犬 NGF 抗体或其抗原结合片段；以及

[0089] 将所述犬源化抗犬 NGF 抗体或其抗原结合片段施用至有需要的犬。

[0090] 根据本发明的又一方面，提供了治疗犬中被 NGF 诱发增殖的肿瘤和与其相关的病症的方法，所述方法包括以下步骤：

[0091] 提供治疗有效量的本发明的抗犬 NGF 抗体或其抗原结合片段；以及

[0092] 将所述抗犬 NGF 抗体或其抗原结合片段施用至有需要的犬。

[0093] 在某些实施方案中，肿瘤是骨肉瘤。在某些实施方案中，自分泌或旁分泌 NGF 诱导肿瘤增殖。

[0094] 在某些实施方案中，本发明的前述方法进一步包括共施用至少一种另外的药剂的步骤，该药剂可以提高和 / 或补足本发明的抗 NGF 抗体的功效。例如，该抗体或其抗原结合片段可以与至少一种镇痛剂、NSAID、阿片样物质、皮质类固醇或类固醇共施用。

[0095] 合适的镇痛剂的实例包括但不限于布托啡诺、丁丙诺啡、芬太尼、氟尼辛葡甲胺 (flunixin meglumine)、哌替啶、吗啡、纳布啡及其衍生物。合适的 NSAIDS 包括但不限于对乙酰氨基酚、乙酰水杨酸、卡洛芬、依托度酸、酪洛芬、美洛昔康、非罗考昔、罗贝考昔 (robenacoxib)、德拉昔布等。

[0096] 在某些另外的实施方案中，所述至少一种另外的药剂可以是活性治疗剂，其可以是选自抗生素、抗真菌剂、抗原生动物剂、抗病毒剂或类似药剂中的一组或多组。而且，所述至少一种另外的药剂可以是炎症介质 (mediator) 的抑制剂，例如 PGE 受体拮抗剂，免疫抑制剂例如环孢霉素，或抗炎糖皮质激素。在某些另外的实施方案中，所述至少一种另外的药剂可以是用于治疗认知功能障碍或损伤的药剂，例如老龄犬中日益普遍的失忆或相关病症。而且，所述至少一种另外的药剂可以是用于治疗心血管疾病的抗高血压药剂或者其他化合物，例如以治疗高血压、心肌缺血、充血性心力衰竭等。此外，所述至少一种另外的药剂可以是利尿剂、血管扩张剂、 β 肾上腺素受体拮抗剂、血管紧张肽 II 转化酶抑制剂、钙通道阻滞剂或 HMG-CoA 还原酶抑制剂。

[0097] 在某些实施方案中，作为前述方法的一部分，将抗体或抗原结合片段以从约

0.01mg/kg 体重至约 3mg/kg 体重,特别是从约 0.03mg/kg 体重至约 3mg/kg 体重的剂量施用于犬。

[0098] 在各种其它方面,本发明延及包含本发明任何前述方面的抗体或其结合片段的组合物。在某些实施方案中,所述组合物进一步包含至少一种药学上可接受的载体。

[0099] 本发明的另一方面提供了用于治疗导致犬慢性疼痛或由犬的慢性疼痛引起的疼痛或病症或通过 NGF 诱导增殖的肿瘤的药物组合物,其包含药学有效量的本发明的抗体,以及至少一种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

[0100] 在某些实施方案中,所述组合物可以进一步包括至少一种镇痛剂、NSAID、阿片类药物、皮质类固醇或类固醇。

[0101] 在各种其它方面,本发明延及编码本发明的抗体或抗体结合片段的分离核酸。

[0102] 因此,本发明的另一方面提供了编码根据本发明任意前述方面的抗体或抗原结合片段的分离核酸。

[0103] 在某些实施方案中,多核苷酸编码具有氨基酸序列 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 的抗犬 NGF 抗体或抗体片段的轻链可变结构域或具有氨基酸序列 SEQ ID NO:5 或 10 的轻链。

[0104] 在某些另外的实施方案中,多核苷酸编码具有氨基酸序列 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 的抗犬 NGF 抗体或抗体片段的轻链可变结构域或具有选自 SEQ ID NO:6-9、SEQ ID NO:11-14、SEQ ID NO:15-18 和 SEQ ID NO:19-22 的氨基酸序列的重链。

[0105] 在某些实施方案中,所述分离核酸进一步编码与其可操作地连接的一个或多个调控序列。

[0106] 在另一方面,本方面提供了包含多核苷酸的表达载体,该多核苷酸包含编码本发明的重链可变结构域和 / 或轻链可变结构域,或重链恒定结构域和 / 或轻链恒定结构域的多核苷酸。在某些实施方案中,所述表达载体进一步包含一个或多个调控序列。在某些实施方案中,所述载体是质粒或逆转录病毒载体。

[0107] 本发明的另一方面提供了并入本发明的前述方面的表达载体的宿主细胞。本发明的又一方面提供了产生本发明的任意前述方面的抗体的宿主细胞。

[0108] 本发明的又一方面提供了产生抗犬 NGF 中和抗体的方法,该方法包括以下步骤:培养本发明前述方面的宿主细胞以允许该细胞表达抗犬 NGF 中和抗体。

[0109] 本发明的另一方面提供了纯化本发明的抗犬 NGF 抗体的方法,包括以下步骤:

[0110] (i) 阴离子交换层析;

[0111] (ii) 疏水作用层析;以及

[0112] (iii) 尺寸排阻层析。

[0113] 本发明的另一方面提供了纯化本发明的抗犬 NGF 抗体的方法,包括以下步骤:

[0114] (i) Captoadhere 亲和层析;以及

[0115] (ii) 阴离子交换层析。

[0116] 本发明的又一方面提供了产生本发明的抗犬 NGF 犬源化抗体的方法,包括以下步骤:在合适的宿主细胞内表达本发明前述方面的一个或多个多核苷酸 / 核酸或载体,其表达本发明抗体的轻链和 / 或重链;回收表达的多肽,其可以在一个宿主细胞内一起表达或者在不同的宿主细胞内单独表达;以及分离抗体。

[0117] 本发明的又一方面提供了治疗、减轻或抑制犬的疼痛或者治疗通过 NGF 诱导增殖的肿瘤的方法,所述方法包括:将有效量的本发明任意前述方面的多核苷酸施用至犬。

[0118] 本发明的又一方面提供了本发明的任意前述方面的抗体或抗体结合片段,或者本发明前述方面的药物组合物,或者包含本发明任意前述方面的抗体或抗体结合片段的核酸或载体,用于治疗或预防犬的疼痛。

[0119] 在某些实施方案中,疼痛是急性疼痛。在某些另外的实施方案中,疼痛是慢性疼痛。而且,疼痛可以是手术后疼痛或者由犬的任何手术程序造成的疼痛,其包括但不限于矫形外科手术、软组织外科手术、卵巢子宫切除术、阉割手术等。在某些另外的实施方案中,疼痛是与癌症或癌性病症相关的慢性疼痛。在某些另外的实施方案中,疼痛与风湿性关节炎相关或由其引起。在某些实施方案中,疼痛是炎性疼痛或瘙痒疼痛。

[0120] 本发明的另一方面提供了本发明任意前述方面的抗体或抗体结合片段,或者本发明前述方面的药物组合物,或者包含本发明任意前述方面的抗体或抗体结合片段的核酸或载体,用于治疗关节炎尤其是骨关节炎和 / 或风湿性关节炎。

[0121] 本发明的另一方面提供了本发明任意前述方面的抗体或抗体结合片段,或者本发明前述方面的药物组合物,或者包含本发明任意前述方面的抗体或抗体结合片段的核酸或载体,用于治疗患病犬个体的通过 NGF 诱导增殖的肿瘤及其相关的病症、尤其是骨肉瘤。在某些实施方案中,自分泌或旁分泌 NGF 诱导肿瘤增殖。

[0122] 本发明的另一方面提供了本发明任意前述方面的抗体或抗体结合片段、或者本发明前述方面的药物组合物、或者包含本发明任意前述方面的抗体或抗体结合片段的核酸或载体,在制备用于治疗或预防犬的疼痛的药物中的用途。

[0123] 通常,疼痛是慢性疼痛。而且,疼痛可以是手术后疼痛或者由犬的任何手术程序造成的疼痛,其包括但不限于矫形外科手术、软组织外科手术、卵巢子宫切除术、阉割手术等。在某些另外的实施方案中,疼痛是与癌症或癌性病症相关的慢性疼痛。在某些另外的实施方案中,疼痛与风湿性关节炎相关或由其引起。在某些实施方案中,疼痛是炎性疼痛或瘙痒疼痛。

[0124] 本发明的另一方面提供了本发明任意前述方面的抗体或抗体结合片段,或者本发明前述方面的药物组合物,或者包含本发明任意前述方面的抗体或抗体结合片段的核酸或载体,在制备用于治疗、抑制、减轻或预防犬的风湿性关节炎或骨关节炎的药物中的用途。

[0125] 本发明的另一方面提供了本发明任意前述方面的抗体或抗体结合片段、或者本发明前述方面的药物组合物、或者包含本发明任意前述方面的抗体或抗体结合片段的核酸或载体,在制备用于治疗犬的通过 NGF 诱导增殖的肿瘤及其相关病症、尤其是骨肉瘤的药物中的用途。在某些实施方案中,自分泌或旁分泌 NGF 诱导肿瘤增殖。

[0126] 本发明的另一方面提供了产生本发明的抗犬 NGF 中和单克隆抗体或其片段的细胞系或其衍生细胞或后代细胞。

[0127] 本发明的又一方面提供了用于治疗犬的疼痛、或者用于治疗与疼痛相关的病症、或者用于治疗、减轻或抑制与骨关节炎或风湿性关节炎相关的疼痛的试剂盒,所述试剂盒包含本发明任意前述方面的抗犬 NGF 抗体或结合片段以及其使用说明。

[0128] 本发明的又一方面提供了体外、离体和体内检测流体中抗犬 NGF 单克隆抗体的诊断试剂盒,用于确定所述抗体的浓度。该试剂盒可以包含本发明任意抗体或其结合片段。该

试剂盒可以包含使用说明。

附图说明

[0129] 图 1 示出根据本发明产生的犬源化抗体与鼠 NGF 和犬 NGF 结合的图表。

[0130] 图 2A-2D 示出一系列显示本发明的犬源化抗体的蛋白 A 纯化的凝胶。

[0131] 图 3 示出显示使用 SDS-Page 纯化犬源化抗体的结果的凝胶。

[0132] 图 4 示出显示犬源化抗体抑制 TF-1 细胞的 NGF 诱导的增殖的曲线图。

[0133] 图 5 示出显示抗原捕获的犬源化抗体诱导的补体沉积 (complement deposition) 的图表。

[0134] 图 6 示出犬源化抗 NGF 轻链可变结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1)。下划线标注根据 Kabat 编号识别的三个 CDR 区。特定残基上方的星号表明犬源化序列与小鼠 α D11 抗鼠 NGF 单克隆抗体的氨基酸序列之间序列上的区别。

[0135] 图 7 示出犬源化抗 NGF 重链可变结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2)。下划线标注根据 Kabat 编号识别的三个 CDR 区。特定残基上方的星号表明犬源化序列与小鼠 α D11 抗鼠 NGF 单克隆抗体的氨基酸序列之间序列上的区别。

[0136] 图 8 示出犬 κ 轻链 (caN-kLC) 抗体的犬源化抗 NGF 轻链可变结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:5)。用黑体表示可变结构域。

[0137] 图 9 示出犬 IgG-A 重链 (caN-HCA) 的犬源化抗 NGF 重链可变结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:6)。用黑体表示可变结构域。

[0138] 图 10 示出犬 IgG-B 重链 (caN-HCB) 的犬源化抗 NGF 重链可变结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:7)。用黑体表示可变结构域。

[0139] 图 11 示出犬 IgG-C 重链 (caN-HCC) 的犬源化抗 NGF 重链可变结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:8)。用黑体表示可变结构域。

[0140] 图 12 示出犬 IgG-D 重链 (caN-HCD) 的犬源化抗 NGF 重链可变结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:9)。用黑体表示可变结构域。

[0141] 图 13A 示出显示使用不同稀释度的 SEQ ID No:5 和 SEQ ID No:7 与 SEQ ID No:10 和 SEQ ID No:11 比较抗犬 NGF 单克隆抗体与 NGF 结合的图表。

[0142] 图 14A 示出显示具有 HCB 和 HCC 重链同种型的抗犬 NGF 单克隆抗体的 N-糖基化和非糖基化 (aglycosylated) 与 NGF 结合比较的图表。图 14B 示出显示来自图 14A 的上清液的补体沉积的图表。

[0143] 图 15A 和 15B 示出使用三步法(方法 I)定量纯化本发明的抗犬 NGF 抗体,包括 (1) 阴离子交换层析, (2) 疏水作用层析, 以及 (3) 尺寸排阻层析。图 15A 示出通过尺寸排阻 HPLC 分级的结果。图 15B 示出每一步骤后级分的还原性 SDS-PAGE 凝胶。图 15C 和 15D 示出使用两步法(方法 II) 定量纯化本发明的抗犬 NGF 抗体,包括 (1) Captopadhere 层析, (2) 阴离子交换层析。图 15C 是非还原条件和还原条件下的 SDS-PAGE 分析。泳道 1 是 MWS, 泳道 2 是 2 μ g/mL3450 样品和 0 μ l 还原剂, 泳道 3 是 4 μ g/mL3450 样品和 0 μ l 还原剂, 泳道 4 是 6 μ g/mL3450 样品和 0 μ l 还原剂, 泳道 5 是 MWS, 泳道 6 是 2 μ g/mL3450 样品和 3 μ l 还原剂, 泳道 7 是 4 μ g/mL3450 样品和 3 μ l 还原剂, 泳道 8 是 6 μ g/mL3450 样品和 3 μ l 还原剂, 以及泳道 9 是 MWS。图 15D 是尺寸排阻色谱。

[0144] 图 16A 示出方法 I 和方法 II 纯化的抗 NGF 单克隆抗体的比较。图 16A 是通过非还原 SDS-PAGE 和还原 SDS-PAGE 进行比较。图 16B 是通过抗 NGF ELISA 进行比较。

[0145] 图 17 示出将抗犬 NGF 抗体静脉内给药至狗后, 体重(上组) 和温度(下组) 是稳定的。

[0146] 图 18 示出静脉注射至狗后, 抗犬 NGF 单克隆抗体血浆浓度的动力学分析。静脉注射 2mg/kg 抗 NGF 抗体至小猎犬, 在指示的时间采集血浆样品并且通过 NGF ELISA 检测抗 NGF 单克隆抗体。抗犬 NGF 单克隆抗体具有出人意料的约 9 天的长消除 (β) 阶段半衰期。

[0147] 图 19 示出抗犬 NGF 单克隆抗体减低狗的炎性疼痛。在 -1 天时将瓷土注射到小猎犬的垫脚中, 在 0 天时注射抗体或或媒介对照, 并且通过视觉评分量表估算跛度。

[0148] 发明详述

[0149] 通过大量的试验, 发明人获得了大鼠抗 - 小鼠 NGF 单克隆抗体 (MAb) α D11 氨基酸序列, 并且出乎意料地用其产生了非免疫原性抗 - 犬 NGF 抗体。所得到的非免疫原性抗体, 其并不是使用标准 CDR 移植技术产生的, 经证明, 其显示了结合犬 NGF 的高亲和性。抗体中和了犬 NGF 生物功能, 特别是通过抑制 NGF 基于细胞的受体 TrkA 和 p75 的结合。而且, 还意外地发现, 当施用至犬时, 并不在犬中产生针对它的中和抗体。因此, 本发明的犬源化抗体适合于长期缓解狗的慢性疼痛。

[0150] 发明人利用的产生本发明抗体的重链可变结构域和轻链可变结构域的方法, 导致轻链可变结构域和重链可变结构域的框架区内存在的特定大鼠(供体) 氨基酸残基被这样的残基取代, 基于本发明人的分析, 所述残基会保留 CDR 区的构象, 并因此保持结合特异性和亲合力, 同时如果将抗体以不变的形式施用至犬, 降低可能导致针对该抗体产生的中和抗体的免疫原性表位的存在。具体而言, 制备本发明(被称为 PETisation) 抗体的方法包括: 通过将供体抗体框架区的序列与衍生自犬的一个抗体或抗体库的序列进行比较, 评价供体(例如大鼠) 抗体框架区的序列施用至犬的适宜性。尽管该比较是在供体序列与靶序列的单个成员之间进行, 但是显而易见的是, 与靶序列库进行比较是优选的, 因为这将扩展靶标种类中每一 Kabat 位置的自然选择的数目。这不但将增加供体与靶标之间匹配的可能性, 而且还将扩展不存在匹配的取代的选择。因此, 将能够选择与供体尽可能紧密的特征的取代。当供体序列与犬序列在任何 Kabat 数目或对应的位置不同时, 修饰供体序列以用犬中该位置的自然的氨基酸残基来取代正在讨论的氨基酸残基。

[0151] 如果需要取代供体免疫球蛋白中存在的氨基酸残基, 通常采用保守取代的原则, 其中该氨基酸残基天然位于犬 Kabat 位置并且在大小、电荷、疏水性方面与供体序列中被取代的氨基酸尽可能密切相关的氨基酸残基取代。目的是选择不引起供体抗体的三维结构扰动或破坏或引起最低程度的扰动或破坏。在某些情况下, 将没有清楚的选择, 并且每一选择都有利弊。最终的决定可能要求各种可选序列的三维建模甚至表达。然而, 通常利用明显的偏好。作为该步骤的结果, 当残基在靶中是外来的并且该取代氨基酸与被取代的氨基酸尽可能密切相关时, 仅对供体序列作出改变。因而, 避免了外来表位的产生, 但是由于维持了整个三位结构, 因此, 还维持了亲和性和特异性。

[0152] 轻链恒定结构域和重链恒定结构域通常衍生自犬(靶) 衍生的抗体。选择或修饰重链恒定结构域, 从而使得它们不介导下游的效应子功能。非常意外的是, 由于发现并没有产生针对本发明产生的抗体的中和抗体或者产生了最少的所述抗体, 因此惊人地发现该抗体

具有长循环半衰期和重复剂量给药的相关益处。而且,由于以不影响 CDR 区的三位构造的方式进行框架残基取代,使得其,与期望的靶标的结合特异性没有变化。

[0153] 在人类和小鼠中存在四种主要的 IgG 同种型,虽然术语是类似的,但它们在行为和功能上是不同的,其包括对细菌产物例如蛋白 A 和蛋白 G 的亲合性,激活补体依赖性细胞溶解 (CDC) 的能力以及通过抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 诱导杀死靶细胞的能力。当将抗体设计为清除具有它们的同源抗原的靶细胞时,用 CDC 和 ADCC 活性或“防护的”恒定结构域选择 IgG 同种型在临床上被认为是有益的,例如在肿瘤控制或感染控制方面(例如,为了上述目的,在人类医学应用中优选人 IgG1 同种型)。相比之下,在其他情况中,例如缓解炎症、疼痛或自身免疫中,激活免疫系统被认为是不可取的,因此优选具有最小 CDC 和 ADCC 活性的人 IgG 同种型(例如,在这样的人类医学应用中,常常优选 IgG4 同种型)。已经描述了犬免疫系统四个不同的免疫球蛋白 γ (IgG) 重链恒定结构域同型(美国专利号 5852183, Tang L. et al. 2001. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 80. 259-270) 以及单个 κ 和 λ 恒定结构域序列。并没有按照由其介导的功能活性来表征四个犬重链恒定结构域 A、B、C 和 D。不管与 IgG 家族的总体同源性如何,与来自其它物种的家族成员相比,编码犬 IgG 的蛋白彼此更接近,因此如果将任一种认为是四种犬同种型的每一种,那么仅通过同源来限定上述功能是不合适的。当将抗体设计为例如在肿瘤控制或感染控制中清除具有同源抗原的靶细胞时,用 CDC 和 ADCC 活性恒定结构域选择 IgG 同种型是有利的,例如在人类医学应用中优选人 IgG1 同型。相比之下,在其他情况中,例如缓解炎症、疼痛或自身免疫中,激活免疫系统被认为是不可取的,因此优选具有最小或“非防卫”的 CDC 和 ADCC 活性的人 IgG 同型,例如在人类医疗用途中,选择 IgG4 同种型。

[0154] 本发明的抗体包含犬来源的重链恒定结构域和犬来源的轻链恒定结构域。而且,互补性决定区衍生自大鼠 α D11 抗 - 小鼠 NGF 抗体。 α D11 抗体首先描述于 Cattaneo et al. (Cattaneo A, Rapposelli B, Calissano P. (1988) “Three distinct types of monoclonal antibodies after long-term immunization of rats with mouse nerve growth factor”. *J Neurochem* 50(4):1003-1010,)。随后 Ruberti et al. (Ruberti, F. et al. (1993) “Cloning and Expression of an Anti-Nerve Growth Factor (NGF) Antibody for Studies Using the Neuroantibody Approach”. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 13(5):559-568) 克隆了 α D11 抗体。

[0155] 将衍生自 α D11 抗体的 CDR 区与本发明人确定的框架区序列组合来维持 CDR 的三级结构,因此维持了结合特异性,同时当将抗体施用至犬时,阻止针对所述抗体产生中和抗体。

[0156] 每一轻链可变结构域和重链可变结构域都包含四个框架区,称为 FR1-FR4。对于这些框架区中的每一个,本发明人已经确定了每一特定位置的优选氨基酸残基(所谓的优选残基),和还可能在該位置提供的可选的氨基酸残基。以下表 1 至表 8 示出每一重链和轻链的四个框架区。这些表相对特定框架区,并且进一步根据用于沿完整的重链可变结构域或轻链可变结构域的长度识别特定残基位置的编号系统,提供了氨基酸位置。组 1 示出的一个残基或多个残基是优选的残基,而组 2 的残基是可选的残基。然而,对于涉及该特定位置的组 1 所示的残基来说,这些残基通常不是优选的。使用单字母系统确定氨基酸残基。

[0157] 表 1 - 轻链可变结构域 FR1 残基

[0158]

轻链 FR1 位置	Kabat 轻链编号位置	组 1 氨基酸残基	组 2 氨基酸残基
1	1	D	
2	2	I	
3	3	QV	
4	4	M	
5	5	TM	I
6	6	Q	
7	7	ST	
8	8	P	
9	9	AL	P
10	10	S	
11	11	L	
12	12	S	A
13	13	LV	
14	14	S	RT
15	15	QPR	
16	16	GE	D
17	17	E	D
18	18	TKP	AEL
19	19	VA	
20	20	TS	
21	21	I	
22	22	ST	Y
23	23	C	Y

[0159] 表 2 - 轻链可变结构域 FR2 残基

[0160]

轻链 FR2 位置	Kabat 轻链编号位置	组 1 氨基酸残基	组 2 氨基酸残基
1	35	W	
2	36	YF	IL
3	37	QR	IL
4	38	Q	H
5	39	K	R
6	40	P	AS
7	41	G	D
8	42	Q	
9	43	SA	PT
10	44	P	
11	45	KQ	ER
12	46	LR	AGPS
13	47	L	
14	48	I	L
15	49	Y	EFNSV

[0161] 表 3 - 轻链可变结构域 FR3 残基

[0162]

轻链 FR3 位置	Kabat 轻链编号位置	组 1 氨基酸残基	组 2 氨基酸残基
1	57	G	A
2	58	V	A
3	59	P	S
4	60	SD	
5	61	R	
6	62	F	LV
7	63	S	I
8	64	G	A
9	65	S	
10	66	G	
11	67	S	
12	68	G	
13	69	T	A
14	70	DE	
15	71	FY	
16	72	ST	R
17	73	FL	
18	74	KT	R
19	75	I	
20	76	SN	
21	77	S	
22	78	LV	
23	79	E	
24	80	PS	A

[0163]

25	81	E	DGIN
26	82	D	
27	82A	VA	GST
28	82B	A	G
29	82C	V	IL
30	83	Y	
31	84	YF	
32	85	C	

[0164] 表 4 - 轻链可变结构域 FR4 残基

[0165]

轻链 FR4 位置	Kabat 轻链编号位置	组 1 氨基酸残基	组 2 氨基酸残基
1	95	F	
2	96	G	S
3	97	A	PQT
4	98	G	E
5	99	T	P
6	100	K	QS
7	101	V	LW
8	102	ED	R
9	103	L	I
10	104	K	

[0166] 表 5 - 重链可变结构域 FR1 残基

[0167]

重链 FR1 位置	Kabat 重链编号位置	组 1 氨基酸残基	组 2 氨基酸残基
1	1	E	DG
2	2	V	EGILM
3	3	Q	AEHKLPRSV
4	4	L	PV
5	5	V	AELM
6	6	E	AQ
7	7	S	FLT
8	8	G	
9	9	G	E
10	10	GD	AENT
11	11	L	QRVW
12	12	V	AIM
13	13	QN	KR
14	14	P	FT
15	15	GT	AE
16	16	GE	A
17	17	ST	P
18	18	L	R
19	19	RT	GKV
20	20	L	IV
21	21	S	Y
22	22	C	
23	23	V	AEIL
24	24	AIV	GST

[0168]

25	25	S	GPT
26	26	G	DRT
27	27	F	DILSTV
28	28	ST	ADILMNPR
29	29	LF	IMV
30	30	ST	DGHIKNRV

[0169] 表 6 - 重链可变结构域 FR2 残基

[0170]

重链 FR2 位置	Kabat 重链编号位置	组 1 氨基酸残基	组 2 氨基酸残基
1	36	W	C
2	37	V	AFIL
3	38	R	
4	39	Q	HL
5	40	A	DGPSTV
6	41	LP	
7	42	G	ELR
8	43	RK	AEGMQ
9	44	G	DERTV
10	45	L	FMP
11	46	EQ	DHLPR
12	47	W	CFLMSY
13	48	V	FIL
14	49	GA	LST

[0171] 表 7 - 重链可变结构域 FR3 残基

[0172]

重链 FR3 位置	Kabat 重链编号位置	组 1 氨基酸残基	组 2 氨基酸残基
1	66	R	Q
2	67	LF	V
3	68	T	AIS
4	69	I	LMTV
5	70	ST	AF
6	71	R	K
7	72	D	EN
8	73	TN	DGIS
9	74	AS	DGPTV
10	75	K	EGMNQR
11	76	SN	DHKR
12	77	T	AIMS
13	78	VL	AIM
14	79	FY	HST
15	80	L	I
16	81	KQ	ADEHR
17	82	M	L
18	82A	HN	DKPRST
19	82B	S	DGNRT
20	82C	L	V
21	83	QR	GIKST
22	84	SA	DGPTV
23	85	E	ADV
24	86	D	

[0173]

25	87	T	AMS
26	88	A	GV
27	89	TV	FIKLMQ
28	90	Y	H
29	91	Y	FH
30	92	C	
31	93	A	CGLMRSTV
32	94	RK	ADEGILMN PQSTV

[0174] 表 8 - 重链可变结构域 FR4 残基

[0175]

重链 FR4 位置	Kabat 重链编号位置	组 1 氨基酸残基	组 2 氨基酸残基
1	103	W	L
2	104	G	AS
3	105	Q	DHPR
4	106	G	
5	107	T	AINS
6	108	SL	PQR
7	109	V	ILP
8	110	T	AFILPSY
9	111	V	A
10	112	S	ACPT
11	113	S	ALP

[0176] 因此,本发明的犬源化抗体不同于例如由衍生自第一物种的完整的可变区和衍生自第二物种的恒定结构域组成的嵌合单克隆抗体,或者不同于 CDR 移植的犬源化抗体,其中重链可变区和轻链可变区的互补性决定区 (CDRs) 包含衍生自供体抗体并被引入衍生自靶抗体或犬生殖系序列的框架区 (FR) 和恒定区 (CR) 的氨基酸残基。

[0177] 优选,犬源化抗体基本上保留了衍生 CDR 的母体(供体)抗体的结合特异性。这意

味着,该犬源化抗体将显示与衍生 CDR 的供体抗体相同或基本上相同的抗原结合亲和性和亲合力。理想的是,该犬源化抗体的亲和性将不小于供体抗体对靶表位亲和性的 10%,更优选不小于约 30%,最优选是不小于该母(供体)抗体的亲和性的 50%。测定抗原结合亲和性的方法是本领域已知的,并且包括半-最大结合测定(half-maximal binding assays)、竞争测定和斯卡查德分析(Scatchard analysis)。

[0178] 如前文所限定的,本发明延及衍生自本发明的犬源化抗体的结合成员或抗原结合片段。这样的抗原结合片段指保留与犬 NGF 特异性结合能力的抗体的一个或多个片段。已经证明,可以通过全长抗体来执行抗体的抗原结合功能。在某些实施方案中,结合成员或抗原结合片段可以是分离的结合成员。本发明的结合成员或抗原结合片段可以包含本发明的抗体的片段,例如完整的犬源化抗体分子的片段,诸如重链或轻链,例如重链和 / 或轻链的可变结构域。在某些实施方案中,结合成员通常包含、组成为或基本组成为:抗体 VH 和 / 或 VL 结构域。还提供了结合成员的 VH 结构域,也作为本发明的一部分。3 个互补性决定区("CDRs"),以及 4 个相关的框架区("FRs") 位于每一 VH 和 / 或 VL 结构域内。VH 结构域通常包含 3 个 HCDR (重链互补性决定区),并且 VL 结构域通常包含 3 个 LCDR (轻链互补性决定区)。因此,结合成员可以包含 VH 结构域,其依次包含 VH CDR1 (或 HCDR1)、CDR2 (HCDR2) 和 CDR3 (HCDR3) 以及多个相关的框架区。结合成员可以额外地或可选地包含 VL 结构域,其依次包含 VLCDR1、CDR2 和 CDR3 以及相关的框架区。VH 或 VL 结构域通常包含四个框架区,FR1、FR2、FR3 和 FR4。如本文所用的,术语“框架区”或“框架序列”指可变区减去 CDR 后剩余的序列。由于可以通过不同的系统(Kabat、Chothia 等)确定 CDR 序列的准确定义,因此框架序列的含义有相应的不同解释。六个 CDR (轻链的 VL-CDR1、CDR2 和 CDR3 和重链的 VH-CDR1、CDR2 和 CDR3)将轻链和重链上的框架区划分为四个子区,即每一链上的 FR1、FR2、FR3 和 FR4。

[0179] 图 6 示出根据本发明抗 NGF 抗体轻链可变结构域的氨基酸序列。用下划线标注 CDR1、CDR2 和 CDR3 区。因此,如图 6 所示,VL-CDR1 位于 FR1 框架区和 FR2 框架区之间,VL-CDR2 位于 FR2 框架区和 FR3 框架区之间,VL-CDR3 位于 FR3 框架区和 FR4 框架区之间。图 7 示出根据本发明抗 NGF 抗体重链可变结构域的氨基酸序列。用下划线标注 CDR1、CDR2 和 CDR3 区。如同图 6 所示的轻链可变结构域,VH-CDR1 位于 FR1 框架区和 FR2 框架区之间,VH-CDR2 位于 FR2 框架区和 FR3 框架区之间,VH-CDR3 位于 FR3 框架区和 FR4 框架区之间。

[0180] 在图 6 和图 7 中,根据 Kabat 等设计的编号系统(Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H., Gottesman, K. and Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242, Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391) 对轻链可变结构域(图6)和重链可变结构域(图7)的残基进行常规编号。Kabat 编号系统指对比抗体或其抗原结合片段的轻链可变结构域和重链可变结构域中的其他氨基酸残基更易变的氨基酸残基进行编号的系统。因此,当提及可变结构域中的残基(大概是轻链的残基 1-104 和重链的残基 1-113)时,通常使用 Kabat 编号系统。在本发明阐明的情况下,可以使用该编号系统。Kabat 残基名称并不总是与本文列举的相关序列中给出的本发明重链可变结构域和轻链可变结构域的氨基酸残基的线性编号直接对应。特别是,与缩短或被插入的结构组成对应的严格 Kabat 编号的氨基酸相比,不论是重链或轻链的基本可变结构域结构的框架区还是互补性决定区(CDR),实际的线

性氨基酸序列可能含有较少的或额外的氨基酸。用应用了 Kabat 编号的标准序列校准抗体序列的残基,来确定任何给定抗体的残基的正确 Kabat 编号。

[0181] 而且,图 7 示出重链可变结构域氨基酸序列。其同样在 SEQ ID NO:2 中示出。然而,在图 7 中,编号考虑到氨基酸残基 80、80A、80B 和 80C,而在 SEQ ID NO:2 中连续编号,依次是 80、81、82 和 83。对图 7 中的 Kabat 残基 100、100A、100B、100C、100D、100E 和 100F,也同样如此。

[0182] 如上文所述,抗体结合片段可以选自但不限于 Fab 片段、Fab' 片段和 scFv(单链可变片段)或者选自拟肽物、双特异抗体或相关的多价衍生物。

[0183] 在某些实施方案中,抗体结合片段是 Fab 或 F(ab')₂ 片段,其由抗体的 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成。在某些实施方案中,VL 结构域具有氨基酸序列 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3,并且 VH 结构域具有氨基酸序列 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4。在某些实施方案中,CL 和 CH1 结构域基于犬免疫球蛋白 CL 和 CH1 结构域的氨基酸序列。

[0184] 用于重组产生 Fab、Fab' 和 F(ab')₂ 片段的方法是本领域技术人员熟知的,并且其包括国际 PCT 专利公开 W092/22324 所公开的方法和 Sawai et al. (“Direct Production of the Fab Fragment Derived From the Sperm Immobilizing Antibody Using Polymerase Chain Reaction and cDNA Expression Vectors”, 1995, AJRI34:26-34) 中所公开的方法。Huston et al. (“Protein Engineering of Single-Chain Fv Analogs and Fusion Proteins”, 单链 Fv 类似物和融合蛋白的蛋白质工程, Methods in Enzymology, vol. 203:46-88 (1991)) 中公开了可以用于产生 scFv (单链 Fv 片段) 的技术的实例。

[0185] 在某些实施方案中,根据 Morimoto (Morimoto et al., “Single-step purification of F(ab')₂ fragments of mouse monoclonal antibodies (immunoglobulins G1) by hydrophobic interaction high performance liquid chromatography using TSKgel Phenyl-5PW” Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)) 的方法,通过蛋白水解消化,可以从全长抗体衍生抗体片段。还可以通过宿主细胞直接产生抗体片段 (Carter et al., “High level Escherichia coli expression and production of a bivalent humanized antibody fragment” Bio/Technology 10:163-167 (1992))。

[0186] 除了提供对犬 NGF 具有结合特异性且抵消犬 NGF 功能的犬源化单克隆抗体之外,本发明进一步延及除了包含基于 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 限定的 VL (轻链可变) 区的氨基酸序列和 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 限定的 VH (重链可变) 区的氨基酸序列的一对结合域之外的结合成员。特别是,本发明延及基于本发明抗体的犬源化抗体的 VL 或 VH 区的单个结合结构域。

[0187] 因此,在本发明的某些另外的实施方案中,提供了结合成员,其包含、组成为或基本组成为:衍生自本发明的人源化抗体的单个结合结构域。在某些实施方案中,单个结合结构域衍生自 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 限定的 VH (重链可变结构域) 的氨基酸序列。这样的结合结构域可以用作犬 NGF 的寻靶剂。

[0188] 在某些实施方案中,可以用另外的工程技术修饰本发明的抗体,例如通过包括可以改变血清半衰期、补体结合、Fc 受体结合和 / 或抗原依赖性细胞毒性的修饰。而且,在某

些实施方案中,可以产生糖基化模式改变的抗体或抗体片段。在某些实施方案中,改变本发明的抗体,以增加或降低该抗体糖基化的程度。多肽的糖基化通常是 N 连接或 O 连接。N 连接指碳水化合物部分与天冬酰胺残基的侧链连接。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸是用于碳水化合物部分与天冬酰胺酶连接的识别序列,其中 X 是除脯氨酸外的任一氨基酸。因此,多肽中的这两个三肽序列任一个的存在产生潜在的糖基化位点。O 连接的糖基化指糖类 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖中的任一种与羟基氨基酸的连接,最常见的是丝氨酸或苏氨酸,但是还可以使用 5-羟脯氨酸或 5-羟赖氨酸。本发明人提供了非糖基化的犬恒定结构域,其在本文中限定为 SEQ ID NO:15、16、17、18、19、20、21 和 22。

[0189] 在某些另外的实施方案中,通过将本发明的抗犬 NGF 抗体与聚乙二醇 (PEG) 反应使其聚乙二醇化 (PEGylated)。

[0190] 在某些实施方案中,可以通过选择影响 (a) 取代区域中多肽主链的结构例如,片层或螺旋构象;(b) 靶位点的分子的电荷或疏水性;或者 (c) 侧链的大部分来完成抗体生物学特性的修饰。根据侧链性质的相似性可以将氨基酸分组 (A. L. Lehninger, in *Biochemistry*, 2nd Ed., 73-75, Worth Publishers, New York (1975)): (1) 非极性的: Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Pro(P)、Phe(F)、Trp(W)、Met(M); (2) 无电荷极性的: Gly(G)、Ser(S)、Thr(T)、Cys(C)、Tyr(Y)、Asn(N)、Gln(Q); (3) 酸性的: Asp(D)、Glu(E); (4) 碱性的: Lys(K)、Arg(R)、His(H)。可选地,基于共同的侧链的性质,可以将天然存在的残基分组: (1) 疏水性的: 正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile; (2) 中性亲水性的: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln; (3) 酸性的: Asp、Glu; (4) 碱性的: His、Lys、Arg; (5) 影响链方向的残基: Gly、Pro; (6) 芳香的: Trp、Tyr、Phe。非保守取代将使得这些类之一的一种取代为另一种。还可以将这类取代的残基引入到保守取代位点或者引入到剩余的(例如,非保守的)位点。

[0191] 在各种另外的方面,本发明延及包含连接至分子伴侣的本发明的抗犬 NGF 抗体或其抗原结合部分的免疫缀合物。在某些实施方案中,这样的抗体-伴侣分子缀合物是通过化学连接体的方式缀合的,例如肽连接体、胍连接体或二硫化物连接体。在某些实施方案中,偶联伴侣是效应分子、标记、药物或载体分子。将本发明的抗体与肽基和非肽基偶联伴侣偶联的合适技术是本领域技术人员已知的。合适的标记的实例包括可检测标记例如放射性标记,或酶标记例如辣根过氧化物酶,或化学部分例如生物素。可选地,标记可以是功能标记,例如蓖麻毒素或能够在抗体结合位点将前药 (prodrugs) 转化为活性药物的前药 (pro-drugs)。

[0192] 在各种另外的方面,本发明延及编码本发明的犬源化抗体、抗体片段和结合成员的多核苷酸,特别是分离的多核苷酸。如本文所限定的,“多核苷酸”包括任何多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸,其可以是未修饰的 RNA 或 DNA,或者修饰的 RNA 或 DNA,包括但不限于单链和双链 RNA 以及单链和双链区的混合物的 RNA。本发明的多核苷酸,例如编码本发明的多肽的多核苷酸,包括其等位基因变体和/或它们的补体,其包括在中等或严格条件下与这类核苷酸序列杂交的多核苷酸。

[0193] 本发明进一步延及基于本发明的犬 NGF 抗体的抗体模拟物,例如域抗体、纳米抗体、单抗体 (unibody)、万能抗体 (versabody) 以及 duocalin。很多抗体模拟技术是本领域技术人员已知的。例如,所谓的域抗体 (Domantis, UK) 是抗体的小的功能结合单元,其对应于人抗体轻链或重链的可变区。用于产生这样的域抗体的说明可以在美国专利第 6291158

号、美国专利第 6582915 号和美国专利第 6593081 号中找到。纳米抗体是抗体来源的治疗蛋白,其含有骆驼 (camelids) 中发现的天然存在的重链抗体的结构特性和功能特性。单抗体是进一步的抗体片段技术,以除去 IgG4 抗体的铰链区为基础。铰链区的缺失导致大小大约为传统 IgG4 抗体的一半且具有单价结合区的分子。单抗体保留了 IgG4 抗体的惰性特性,因此不引起免疫反应。

[0194] 而且,结合分子包括亲和体分子 (US 专利 5,831,012)、DARPin (设计的锚定重复蛋白) (国际 PCT 专利申请公开 W002/20565) 和 anticalins (US 专利 7,250,297 和 W099/16873)。万能抗体是另一种抗体模拟技术。万能抗体 (Amunix, US 专利 2007/0191272) 是 3-5kDa 的称为微蛋白的小蛋白,其半胱氨酸残基大于 15%,这些残基形成取代蛋白质通常显示的疏水核心的高密度二硫键支架。

[0195] Avimer 是另一种抗体模拟物。Avimer 起源于人血清蛋白家族的重组。它们是由调控结合结构域组成的单一蛋白链,每一结合结构域经设计结合特定的靶位点。Avimer 能同时结合单蛋白靶标上的位点和 / 或多蛋白靶标上的位点。被称为多点连接或亲和力,这种结合机制模拟体内细胞和分子相互作用的方式,支持拮抗剂和激动剂的产生,并且导致具有多重功能和强活性的药物。根据通过引用并入本文的 W02004/044011 和且例如 US2005/0053973,可以生产 Avimer 文库。Avimer 文库也可以从 Avidia Inc (Mountain View, California, USA) 商业获得。

[0196] 抗体的产生

[0197] 可以通过化学合成来完全或部分地产生本发明的抗体和结合成员。例如,可以通过本领域技术人员已知的方法来制备本发明的抗体和结合体成员,例如标准液肽合成或固相肽合成方法。可选地,使用液相肽合成方法或者进一步通过液相、固相和溶液化学的组合可以在溶液中制备抗体和结合成员。

[0198] 本发明进一步延及通过在合适的表达系统中表达编码含有本发明抗体的至少一个氨基酸的核酸来产生本发明的抗体或结合体,使得可以编码期望的肽或多肽。例如,可以表达编码氨基酸轻链的核酸和编码氨基酸重链的第二核酸以提供本发明的抗体。

[0199] 因此,在本发明的某些另外的方面,提供了编码形成本发明的抗体或结合成员的氨基酸序列的核酸。

[0200] 通常,可以以分离的或纯化的形式提供编码形成本发明的抗体或结合成员的氨基酸序列的核酸,或者以基本上没有可以与其天然联系的材料的形式,除了一个或多个调控序列之外,提供编码形成本发明的抗体或结合成员的氨基酸序列的核酸。表达本发明的抗体或结合成员的核酸可以是完全或部分合成的,并且其可以包括但不限于 DNA、cDNA 和 RNA。

[0201] 熟练技术人员可以利用本领域技术人员熟知的方法容易地制备编码本发明的抗体或结合体的核酸序列,例如 Sambrook et al. (Molecular Cloning", A laboratory manual (分子克隆:实验室手册), cold Spring Harbor Laboratory Press, Volumes 1-3, 2001 (ISBN-0879695773),) 和 Ausubel et al. (Short Protocols in Molecular Biology (分子生物学中的小方法). John Wiley and Sons, 4th Edition, 1999 (ISBN - 0471250929)) 中描述的方法。所述技术包括 (i) 使用聚合酶链反应 (PCR) 扩增核酸样品, (ii) 化学合成; 或 (iii) 制备 cDNA 序列。可以以本领域技术人员已知的任何合适的方式合成和使用编码本

发明的抗体或结合成员的 DNA, 包括对编码 DNA 取样、确定待表达的部分的任一侧的合适的限制酶识别位点和从 DNA 切离该部分。然后将切离的部分可操作地连接至合适的启动子并在合适的表达系统中表达, 例如可商购获得的表达系统。可选地, 可以通过使用合适的 PCR 引物扩增 DNA 的相关部分。可以通过定点突变对 DNA 序列进行修饰。

[0202] 可以以含有如上所述的至少一个核酸的质粒、载体、转录盒或表达盒形式的构建体, 提供编码本发明的抗体或结合成员的核酸序列。构建体可以包含在包含一个或多个如上的构建体的重组宿主细胞内。可以通过在合适的条件下培养含有合适的核酸序列的重组宿主细胞来便利地实现表达。表达后, 可以使用任何合适的方法将抗体或抗体片段分离和 / 或纯化, 然后视情况使用。

[0203] 用于在各种不同的宿主细胞中克隆和表达多肽的系统是熟知的。合适的宿主细胞包括细菌、哺乳动物细胞、酵母、昆虫和杆状病毒系统。本领域用于表达异源多肽的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢细胞 (CHO)、海拉细胞 (HeLa cells)、仓鼠肾细胞和 NS0 小鼠骨髓瘤细胞。普通的优选细菌宿主是 *E. coli*。在原核细胞例如 *E. coli* 中表达抗体和抗体片段, 在本领域中被良好地建立。作为产生结合成员的选项, 在培养的真核细胞中表达对本领域技术人员而言也是可用的。

[0204] 用于生产抗体的常用技术是本领域人员熟知的, 这样的方法讨论于例如 Kohler and Milstein (1975, *Nature* 256:495-497)、美国专利第 4,376,110 号、Harlow and Lane, *Antibodies: a Laboratory Manual* (抗体: 实验室手册), 1988, Cold Spring Harbor) 中。用于制备重组抗体分子的方法在上述文献中也有描述, 并且在例如欧洲专利 0,368,684 中也有描述。

[0205] 在本发明的某些实施方案中, 使用包含编码抗体或结合成员的重链可变结构域和 / 或轻链可变结构域的插入物的重组核酸。按照定义, 这样的核酸包含编码单链核酸、由所述编码核酸和由其互补核酸组成的双链核酸或者这些互补 (单链) 核酸本身。

[0206] 而且, 编码抗体的重链可变结构域和 / 或轻链可变结构域的核酸可以是酶促或化学合成的具有编码用于天然存在的重链可变结构域和 / 或用于轻链可变结构域或其突变体的真实序列的核酸。

[0207] 本发明的抗体不但通过重组直接产生而且可以作为与异源多肽的融合多肽产生, 异源多肽优选为信号序列或在成熟蛋白或多肽的 N 末端具有特异性切割位点的其他多肽。所选的异源信号序列优选为可被宿主细胞识别和加工的 (即被信号肽酶切割) 序列。对于不识别和加工天然抗体信号序列的原核宿主细胞, 该信号序列被选自例如碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp (复合天然氨基酸) 或热稳定肠毒素 II 前导序列 (heat-stable enterotoxin II leaders) 的原核信号序列取代。

[0208] 当用于提及本发明的犬源化抗体或由其衍生的结合成员或编码其的多肽时, 术语“分离的”指所述抗体、结合成员或核酸 (多核苷酸) 以分离的和 / 或纯化的形式提供的状态, 也就是说将它们从其天然环境中隔离、分离或纯化, 并且它们以基本纯或均质的形式提供, 或者在有核酸或没有或基本上没有除了编码具有所需功能的多肽的序列外的起源的核酸或基因的情况下提供。因此, 这类分离的抗体、结合成员和分离的核酸将没有或基本上没有与其天然联系的材料, 例如当这些制备是在体外或体内通过重组 DNA 技术进行时, 在它们的天然环境或制备环境 (例如细胞培养物) 中找到的其他多肽或核酸。

[0209] 抗体、结合成员和核酸可以与稀释剂或佐剂一起配制并且实际上其仍可以视为以分离的形式提供。例如,如果用于在免疫测定中覆盖微量滴定板,可以将抗体和结合成员与明胶或其他载体混合,或者当用于诊断或治疗时,将抗体和结合成员与药学上可接受的载体或稀释剂混合。可以自然地或通过异源真核细胞(例如,CHO 或 NSO 细胞)使抗体或结合成员糖基化,或者抗体或结合成员(例如,如果通过在原核细胞中表达来生产)也可以不被糖基化(非糖基化)。

[0210] 包含抗犬 NGF 犬源化抗体分子的异源制剂也构成本发明的一部分。例如,这样的制剂可以是具有全长重链的抗体和具有缺少 C 端赖氨酸的重链的抗体和具有不同糖基化程度的抗体和 / 或具有衍生氨基酸(例如 N 端谷氨酸环化以形成焦谷氨酸残基)的抗体的混合物。

[0211] 抗体的纯化

[0212] 犬抗 NGF 单克隆抗体 (MAbs) 同种型 A、B、C 和 D 是等效的。犬 IgG 同种型 A 和 D 可以优选用于本发明中,由于这些同种型期望可不与补体结合。然而,这些同种型并不结合葡萄球菌蛋白 A 或链球菌蛋白 G,并且因此其不能使用这些常规工具来纯化。本发明的发明人确定了可以用于纯化同种型 A 和 / 或 D 的两种可选方法。第一种方法包括阴离子交换层析、疏水作用层析和尺寸排阻层析的组合。第二种方法包括 captoadhere 亲和色谱和阴离子交换层析的组合。

[0213] 药物组合物

[0214] 通常可以将本发明的药物组合物制备成液体制剂、冻干制剂,可以作为液体或气雾制剂重构的冻干制剂。在某些实施方案中,制剂中抗体的浓度为约 0.5mg/ml 至约 250mg/ml,约 0.5mg/ml 至约 45mg/ml,约 0.5mg/ml 至约 100mg/ml,约 100mg/ml 至约 200mg/ml,或者约 50mg/ml 至约 250mg/ml。

[0215] 在某些实施方案中,制剂还包含缓冲剂。通常,制剂的 pH 为约 pH5.5 至约 pH6.5。在某些实施方案中,缓冲剂可以包含约 4mM 至约 60mM 的组氨酸缓冲剂,约 5mM 至约 25mM 的琥珀酸盐缓冲剂,或者约 5mM 至 25mM 的醋酸盐缓冲剂。在某些实施方案中,缓冲剂包含浓度为约 10mM 至 300mM、典型地为约 125mM 的氯化钠,和浓度为约 5mM 至 50mM、典型地为约 25mM 的柠檬酸钠。在某些实施方案中,制剂还可以包含浓度为大于 0% 至约 0.2% 的表面活性剂。在某些实施方案中,表面活性剂选自由以下组成的组,但不限于:聚山梨醇酯-20、聚山梨醇酯-40、聚山梨醇酯-60、聚山梨醇酯-65、聚山梨醇酯-80、聚山梨醇酯-85 以及其组合。在优选的实施方案中,表面活性剂是聚山梨醇酯-20 并且可以进一步包含浓度为 125mM 的氯化钠和浓度为 25mM 的柠檬酸钠。

[0216] 施用

[0217] 本发明的抗体或结合成员可以单独施用,但是优选作为药物组合物施用,药物组合物通常将包含根据既定的给药途径选择的合适的药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。合适的药学载体包括水、甘油、乙醇等。

[0218] 可以将本发明的单克隆抗体或结合成员通过任何合适的途径施用至需要治疗的患病犬中。通常,可以将组合物通过注射或输液肠道外给药。用于肠道外给药的优选的实例包括但不限于:静脉内、心脏内、动脉内、腹膜内、肌肉内、腔内、皮下、跨粘膜、吸入或经皮肤给药。给药途径还可以包括局部给药和肠内给药,例如粘膜(包括肺粘膜)给药、口服给

药、鼻部给药、直肠给药。

[0219] 在组合物作为可注射组合物递送的实施方案中,例如静脉内、皮肤内或皮下的应用中,活性成分可以是无热原的并且具有合适的 pH、等渗性和稳定性的胃肠外可接受的水溶液形式。本领域技术相关人员完全能使用例如等渗媒介例如氯化钠注射液、林格氏注射液(Ringer's injection)或乳酸林格氏注射液(Lactated Ringer's injection)制备合适的溶液。根据需要,可以包括防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其他添加剂。

[0220] 还可以通过微球、脂质体、其他微粒子递送系统或置于某些组织包括血液中的持续释放剂来施用组合物。

[0221] 以上所述的方法和方案(protocols)以及根据本发明可以使用的其他方法和方案的实例可以在 Remington's Pharmaceutical Sciences (霍明顿药理学,第 18 版, Gennaro, A. R., Lippincott Williams & Wilkins)、Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (药物剂型和药物递送系统,第 20 版 ISBN0-912734-04-3) 和 Ansel, H. C. et al. (第 7 版 ISBN0-683305-72-7) 中找到,其全部内容通过引用并入本文。

[0222] 通常将治疗有效量的本发明的抗体和组合物施用至个体,该治疗有效量是对施用了该组合物的个体足以显示益处的量。施用的实际剂量、给药频率(rate)和时长将根据被治疗的病症的性质和严重性、被治疗的病患的诸如年龄、性别和体重的因素以及使用的途径来确定。应当进一步考虑组合物的性质,例如结合活性和或体内血浆寿命、制剂中抗体或结合体的浓度,以及递送的途径、位置和频率。

[0223] 剂量给药方案可以包括本发明的抗体或组合物的单一给药,或者抗体或组合物的多剂量给药。抗体或含有抗体的组合物可以进一步顺序地或单独地与其他治疗剂和药物施用,所述其他疗法和药物用于治疗施用本发明的抗体或结合体以治疗的病症。

[0224] 可以施用至个体的剂量给药方案的实例选自但不限于:1 μ g/kg/天至 20mg/kg/天、1 μ g/kg/天至 10mg/kg/天、10 μ g/kg/天至 1mg/kg/天。在某些实施方案中,剂量是这样的,其使得获得血浆浓度为 1 μ g/ml 至 100 μ g/ml 的抗体。然而,所施用的组合物的实际剂量、频率和时长将取决于被治疗的病症的性质和严重性。治疗的药方例如剂量决定等最终属于兽医从业人员和其他兽医的责任并听凭他们处理,通常考虑待治疗的病症、个别患者的病症、递送的位置、给药方法和从业人员已知的其他因素。

[0225] 定义

[0226] 除非另有限定,本文使用的所有技术术语和科学术语具有本领域技术人员通常理解的含义。术语的含义和范围应当清楚,然而,在发生歧义的情况下,本文给出的定义优先于任何字典或外在的定义。

[0227] 在全文中,除非上下文另有要求,术语“包含(comprise)”或“包括(include)”或其他变体例如“包含(comprises)”或“包含(comprising)”、“包括(includes)”或“包括(including)”应理解为表示包含所述整数或整数组,但并不排除任何其他的整数或整数组。

[0228] 如本文所使用的,除非文中明确要求,诸如“a(一个/种)”、“an(一个/种)”以及“the(该/所述)”的术语包括单数个或复数个参照物。因此,例如,提到“一种活性剂(an active agent)”或“一种药学活性剂”包括一种单一的活性剂和两种或以上不同的活性剂组合,而提到“载体”,其包括两种或以上载体以及单一载体的混合物等。而且,除非文

中另有要求,单数的术语包括复数并且复数的术语也包括单数。

[0229] 如本文所限定的,术语“疼痛”指与实际的或潜在的组织损伤相关的或按照这样的损伤描述的不愉快的感觉和情感体验。

[0230] 关于手术或手术后疼痛,US 动物福利法 (Animal Welfare Act 2002, AWA regulations, CFR, Title 9 (Animals and Animal Products), Chapter 1 (Animal and Plant Health Inspection Service, Department of Agriculture). Subchapter A (Animal Welfare), Parts 1 - 4) 将疼痛的过程规定为合理地预期将引起应用该过程的人类超过轻微或短暂疼痛或悲痛的任何过程,也就是说,超过通过注射或其他小的手术引起的疼痛。因此,如果犬经历疼痛的外科手术,则该动物应该施用术后镇痛剂。

[0231] 在另外的情况下,由于有关的医疗状况例如风湿性关节炎、骨关节炎、炎症或癌或恶性病症,犬可能经历严重的疼痛或慢性痛。

[0232] 术语“伤害性感受”指伤害刺激的感觉。本文限定的“神经病理性疼痛”(也被称为神经痛)指来自有神经信号问题的疼痛。其可能由于影响躯体感觉系统的损害或疾病而发生。存在数种神经疼痛的原因并且其可能与自发发生的、被称为感觉迟钝的感觉异常有关。可选地,其可能与触摸痛有关,当正常不发生疼痛的接触或刺激使得疼痛发生或转坏时,将引起触摸痛。例如,如果有三叉神经痛,则轻微地触碰脸将引发疼痛,或者如果有糖尿病性神经病,则床上用品的压迫可能引发疼痛。神经病理性疼痛也可以由触摸痛造成,其中当正常不发生疼痛的接触或刺激使得疼痛发生或转坏时,将引起疼痛。例如,如果个体患有三叉神经痛,则轻微地触碰脸将引发疼痛。与痛觉有关的神经病理性疼痛指正常只引起轻微的不适的刺激或接触所产生的严重的疼痛,而感觉异常指,即使当没有任何东西与引起疼痛的区域接触时发生的不舒服的或痛苦的感觉,例如四肢发麻。神经病理性疼痛的其他形式包括瘙痒或发痒,其可以与皮肤中的过敏反应或炎症反应以及由组织损伤和修复过程产生的炎性疼痛有关。

[0233] 如本文所限定的,术语“NGF 中和抗体”或类似的术语描述了能够中和 NGF 的生物活化和信号传导的抗体。中和抗体也可以称为拮抗性抗体或阻断抗体,特别是,其优选选择性地结合 NGF 并抑制 NGF 的一种或多种生物活性。例如,中和抗体可以抑制 NGF 与其靶配体的结合,例如细胞膜结合 TrkA 或 p75 受体。

[0234] 如本文所使用的,术语“生物活性”指分子的任何一种或多种内在的生物学特性(不管是体内发现天然存在的还是通过重组方法给予或激活的)。生物学特性包括但不限于受体结合和 / 或激活、诱导细胞信号传导或细胞增殖、抑制细胞生长、诱导细胞因子产生、诱导细胞凋亡和酶活性。

[0235] 如本文使用的,术语“互补性决定区 (CDR)”指一起限定天然免疫球蛋白结合位点的天然 Fv 区的结合亲和性和特异性的氨基酸序列,如同 Kabat et al. (Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H., Gottesman, K. and Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242, 免疫学研究的蛋白质的序列) 中所述的。如本文所使用的,术语“框架区 (FR)”指插入在 CDR 之间的氨基酸序列。抗体的这些部分用来将 CDR 保持在合适的方向(允许 CDR 结合抗原)。

[0236] 如本文所使用的,术语“恒定区 (CR)”指抗体分子赋予效应子功能的部分。在本发明中,恒定区通常指犬的恒定区,也就是说,主题犬源化抗体的恒定区来源于犬免疫球蛋白

白。重链恒定区可以选自四种同种型 A、B、C 或 D 中的任何一种。

[0237] 本文所用的术语“嵌合抗体”指含有衍生自两种不同抗体的序列的抗体,所述不同抗体通常为不同物种的。最典型的是,嵌合抗体包含衍生自供体物种且特异性结合靶表位的可变结构域和从施用该抗体的靶物种获得的抗体衍生的恒定结构域。

[0238] 本文所用的术语“免疫原性”指当施用至接受者时引起免疫反应(体液的或细胞的)的寻靶蛋白或治疗部分的能力的估量。本发明涉及主题犬源化抗体的免疫原性。优选本发明的抗体不具有免疫原性,也就是说,当施用至犬时,将不会产生针对它们的中和抗体,并且进一步,没有通过抗体的 Fc 区介导的效应子功能。

[0239] 本文所用的术语“同一性”或“序列同一性”指在比对的序列中任何特定的氨基酸残基位置处,氨基酸残基在比对的序列间是相同的。本文所用的术语“相似性”或“序列相似性”表示,在比对的序列的任何特定的位置,氨基酸残基在这些序列之间具有相似的类型。例如,亮氨酸可以被异亮氨酸或缬氨酸取代。这可以被称为保守取代。优选地,当本发明的氨基酸序列通过其中包含的任一氨基酸的保守取代来修饰时,与未修饰的抗体相比,这些变化对所产生的抗体的结合特异性或功能活性没有影响。

[0240] 本发明的(天然)多肽及其功能衍生物的序列同一性涉及,在比对序列并且在必要时引入缺口以实现最大百分比同源性且并不将任何保守取代视为序列同一性的一部分之后,候选序列中与对应的天然多肽的残基相同的氨基酸残基的百分比。不管是 N 端或 C 端的延长,还是插入,都不应该解释为降低序列同一性或同源性。用于实施两个或以上氨基酸序列的比对和用于确定它们的序列同一性或同源性的方法和计算机程序,是本领域技术人员熟知的。例如,使用算法例如 BLAST(Altschul et al. 1990)、FASTA(Pearson&Lipman1988) 或 Smith-Waterman algorithm(史密斯-沃特曼算法,Smith&Waterman1981) 可以容易地计算 2 个氨基酸序列的同一性或相似性的百分比。

[0241] 如本文所用的,提到与第二氨基酸残基具有最高同源性的氨基酸残基,指与第二氨基酸残基共有最多的特征和特性的氨基酸残基。在确定氨基酸残基与第二氨基酸残基是否具有最高同源性时,评定通常可以由各种因素组成,例如但不限于电荷、极性、疏水性、侧臂质量和侧臂尺寸。

[0242] 术语“对应的位置”在本文中用来表示存在于第二序列的与第一序列中的特定氨基酸对应的某位置的氨基酸残基,且该术语用于表示,当比对两条序列以允许两条序列之间的最大序列同一性时,与第一序列的位置相同的第二序列中的位置。对应位置处的氨基酸残基具有相同的 Kabat 编号。

[0243] 本文所用的术语“基本上由...组成”或“基本上由...组成”表示,多肽可以含有除所描述的以外的其他要素或元素,条件是这样的要素或元素并不会实质地影响抗体或抗体片段特异性结合犬 NGF 的能力。也就是说,包含多肽的抗体或抗体片段可以具有不干扰抗体或抗体片段结合犬 NGF 的能力和不抵消犬 NGF 功能活性的能力的其他要素或元素。可以将这样的修饰引入氨基酸序列中,从而降低抗体的免疫原性。例如,基本上由特定序列组成的多肽在该序列的一端或两端可以含有一个、两个、三个、四个、五个或以上额外缺失或取代的氨基酸,条件是这些氨基酸并不干扰、抑制、阻断或中断抗体或片段结合犬 NGF 和隔离其生物功能的作用。同样,有助于抵消本发明的抗体的犬 NGF 的多肽分子可以被一个或多个官能团化学修饰,条件是这类官能团不干扰(interfere) 抗体或抗体片段结合犬 NGF 和

抵消其功能的能力。

[0244] 本文所用的术语“有效量”或“治疗有效量”指抑制犬 NGF 结合 p75 和 / 或 TrkA 受体所需的本发明的药物、结合化合物、小分子、融合蛋白或药物筛选化合物 (peptidomimetic) 的量。

[0245] 本文中术语“多肽”、“肽”或“蛋白”可交换地用来表示通过相邻残基的 α 氨基和羰基之间的肽键连接的线性氨基酸残基。氨基酸残基通常是天然的“L”同分异构形式。然而,只要通过多肽保留期望的功能特性,“D”同分异构形式的残基可以取代任何 L- 氨基酸残基。

[0246] 如本文所限定的,“抗体”包含特异性结合目的靶抗原的抗原-结合蛋白,所述靶抗原具有可以被重组制备或通过免疫球蛋白基因编码的一个或多个多肽,在本文中该靶抗原是犬神经生长因子。术语“抗体”包含单克隆抗体和嵌合抗体,特别是犬源化抗体,并且进一步包含多克隆抗体或任何类或子类的抗体。“抗体”进一步延及杂合抗体、双特异性抗体、异种抗体以及其保留抗原结合的功能片段。

[0247] 短语“特异性结合”指抗体与存在于异源蛋白群中的特定蛋白或靶的结合。因此,当存在于免疫测定条件时,抗体结合特定蛋白而并不大量地结合样品中存在的其他蛋白,在本文中该特定蛋白指犬 NGF。

[0248] 如本文所限定的,“犬”还可以指“狗”。犬可以被归类为学名家犬 (*Canis familiaris domesticus*) 或澳洲野犬 (*Canis lupus dingo*) 的亚种。犬包括任何种类的狗,并且包括野生品种和宠物品种,宠物品种还被称为伴侣动物。

[0249] 现将参考以下实施例描述本发明,所提供的实施例用于说明的目的并非意图用于限制本发明。除非另有指明,通常根据本领域熟知的常规方法和如本发明引用和讨论的各种一般文献和详细文献中所描述的方法来实施本发明的方法和技术。

实施例

[0250] 实施例 1- 抗体的生产

[0251] 通过将犬可变结构域序列与 C 末端犬恒定重链或恒定轻链序列组合来产生完整的抗体序列。描述了犬免疫系统中的四种不同的免疫球蛋白 γ (IgG) 重链恒定结构域同型,以及单一的 κ 和 λ 恒定结构域序列 (the canine immune system, Tang L. et al. 2001. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 80. 259-270)。

[0252] 将犬源化 α D11VH 结构域与四种 IgG 重链同种型 A、B、C 和 D 的每一种组合,并且将犬源化 α D11VL 结构域与犬 κ 轻链恒定结构域组合。全长成熟抗体链 (caN) 的序列显示于 SEQ ID No:5 (VL1 和犬 κ 恒定结构域)、6 (VH1 和重链同种型 A)、7 (VH1 和重链同种型 B)、8 (VH1 和重链同种型 C) 和 9 (VH1 和重链同种型 D)。变体抗体 (caN2) 轻链的序列显示于 SEQ ID No:10 (轻链变体 (VL2) 和犬 κ 恒定结构域)。变体抗体 (caN2) 重链的氨基酸序列在 SEQ ID NO:11 (HCA 变体 - VH2 和重链同种型 A)、SEQ ID NO:12 (HCB 变体 - VH2 和重链同种型 B)、SEQ ID NO:13 (HCC 变体 - VH2 和重链同种型 C) 和 SEQ ID NO:14 (HCD 变体 - VH2 和重链同种型 D) 中给出。

[0253] 通过密码子的优选和完整化学基因合成并克隆到哺乳动物细胞表达载体 pcDNA3.1+ 中,将组合的氨基酸序列转化为哺乳动物细胞中可表达的形式。

[0254] 在实施例 2 中,将得到的 cDNA 转染到 CHO 细胞,并且分析来自具有序列 SEQ ID NO:6-9 的重链的上清液。在实施例 11 中,纯化具有轻链序列 SEQ ID NO:10 和重链序列 SEQ ID NO:11 的抗体。

[0255] 实施例 2- 确定抗体与鼠 NGF 和犬 NGF 的结合

[0256] 将犬源化重链 cDNA 和轻链 cDNA 的组合物转染到 CHO 细胞中,收集上清液并以 ELISA 模式使其与犬 NGF 或鼠 NGF 反应。在孵育和清洗步骤后,通过与连接辣根过氧化物酶 (HRP) 的山羊 - 抗犬 IgG 特异性多克隆抗体的反应性来检测结合的犬抗体并使用 TMB 使其显影。在 450nm 下测量所得的产物的光密度,并将其与来自模拟空白载体转染的上清液(图 1 中表示为“模拟”)的光密度进行比较。

[0257] 图 1 的图表示出该结果。示出四种犬源化抗体与小鼠 NGF 的结合。这些抗体的每一种都具有相同的轻链 (caN-kLC-1),即为包含犬 κ 恒定结构域的轻链。每一种抗体都具有不同的重链恒定结构域。因此,将一种特定的重链可变结构域与四种不同的恒定结构域 (caN-HCA、caN-HCB、caN-HCC 或 caN-HCD) 之一组合。在图表的第二部分,示出由 caN-kLC-1 轻链和 caN-HCB 恒定链组成的单个抗体与犬 NGF 的结合。

[0258] 实施例 3- 犬源化抗体的纯化

[0259] 使用蛋白 A 柱纯化从实施例 2 获得的上清液,通过 SDS-PAGE 使其分开,并且测试其与抗犬 IgG 多克隆抗体 HRP 的反应活性。该多克隆抗体优先识别重链。

[0260] 图 2A-D 示出该结果。说明:A-HCA 是包含 caN-HCA 重链和 caN-kLC 轻链的犬源化抗体;HCB 是包含 caN-HCB 重链和 caN-kLC 轻链的犬源化抗体;C-HCC 是包含 caN-HCC 重链和 caN-kLC 轻链的犬源化抗体;D-HCD 是包含 caN-HCA 重链和 caN-kLC 轻链的犬源化抗体。在图 2A-2D 中,L 指加载,W 指洗涤,P 指峰级分,以及 F 指流通 (flow through)。

[0261] 由此可知,蛋白 A 优先结合 HCB 同种型(即包含 caN-HCB 重链的犬源化抗体),但并不保留重要的材料并通过 HCA、HCC 和 HCD 同种型将其从蛋白 A 上洗掉。

[0262] 实施例 4- 使用 SDS-PAGE 分析纯化的犬源化抗体

[0263] 通过 SDS-PAGE 将实施例 2 (图 2A-2D)中示出的来自凝胶的峰值的代表级分,并且用考马斯蓝染色。

[0264] 图 3 示出的凝胶显示了该结果。该凝胶显示,重链和轻链清晰可见。泳道的顺序从左起为:泳道 1 - 尺寸标准,泳道 2-HCA caN-HCA+caN-kLC1,泳道 3-HCB caN-HCB+caN-kLC1,泳道 4-HCCcaN-HCC+caN-kLC1,泳道 5-HCD caN-HCA+caN-kLC。

[0265] 实施例 5- 犬源化抗体抑制 NGF 诱导的 TF-1 细胞增殖

[0266] 在存在 0.3ng/mL NGF 的情况下,孵育来自实施例 2 的连续稀释的 CHO 转染上清液(“拮抗剂”)和 TF-1 细胞。

[0267] 图 4 示出该结果。在计算的 0.75-1.5ng/mL 的单克隆抗体 (MAb) 时,观察到 50% 的抑制。

[0268] 实施例 6- 抗原捕获犬源化抗体诱导的补体沉积

[0269] 用涂有 0.1ng/mL NGF 的板孵育实施例 2 的 CHO 细胞转染上清液,以捕获抗体。洗涤这些板然后用血清孵育,并且通过抗人 C1q 多克隆抗体 HRP 的结合测量结合的补体 C1q,并如上述进行显影。

[0270] 补体结合方法

[0271] 用 100 μ l/ 孔的 5 μ g/ml 小鼠 NGF 涂覆板,并用 5%BSA/PBS 封阻该板。于室温下用细胞培养物上清液将涂覆的孔孵育 1 小时,并且将其在 PBS/1%BSA(100 μ l/ 孔)中稀释,其中该细胞培养物上清液含有重组的犬源化抗 NGF IgG。洗涤该板,并在室温下用在含有 0.5mM MgCl_2 、2mM CaCl_2 、0.05%吐温-20、0.1%明胶和 0.5%BSA 的弗罗那缓冲盐水中 1/100 稀释的 100 μ l/ 孔的人血清孵育该板 1 小时。洗涤后,用 100 μ l 的在 PBS/1%BSA 中 1/800 稀释的绵羊抗-C1q-HRP(抗体)孵育该板。洗涤后,通过加入 100l TMB 底物(Thermo Scientific)使该板显影。通过加入 100 μ l 的 2N H_2SO_4 停止显影并在 450nm 处读出吸光度。

[0272] 图 5 的图表示出该结果。这些结果显示了 C1q 与固定的犬源化 HCB 和 HCC 型抗体的结合,且没有 C1q 与犬源化的 HCA 和 HCD 型抗体结合。因而,该结果出乎意料地表明,不同的犬衍生的重链显示出不同的补体结合和激活特征,并且出乎意料地证明,具有 HCA 和 HCD 型重链的犬源化抗体优选用于抵消犬 NGF。由于 NGF 是可溶的介质,因此鉴别出了不介导补体结合的犬衍生重链,是特别有利的发现。

[0273] 实施例 7- 抗犬 NGF 单克隆抗体与 NGF 结合的比较

[0274] 使用框架 VL1 和 VH1 (SEQ ID NO:1 和 2) 相比可选的框架 VL2 和 VH2 (SEQ ID NO:3 和 4) 来进行抗犬 NGF 单克隆抗体与 NGF 结合的比较。合成编码 SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:11 描述的轻链和重链的 DNA,并将其克隆到分泌信号序列肽的 pcDNA3.1+ 下游。使该 DNA 共转染 CHO 细胞,并且通过 ELISA 比较该上清液和来自 SEQ ID NO:5 加上 SEQ ID NO:7 共表达的 CHO 上清液与小鼠 NGF 的结合。

[0275] 图 13A 示出该结果。泳道 A-D 示出来自 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:7 的上清液(分别是:未稀释的、1/10、1/100、1/1000)。泳道 E-H 示出来自 SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:11 的上清液(分别是:未稀释的、1/10、1/100、1/1000)。泳道 I 示出未稀释的阴性对照上清液。

[0276] 实施例 8-NGF 捕获的犬源化抗体诱导的补体结合

[0277] 使用 C1q ELISA 测定(使用图 5 描述的方法)测试来自实施例 7 的 CHO 细胞转染上清液的募集补体的能力。

[0278] 图 13B 示出该结果。尽管在图板 A 中观察到与 NGF 的结合和与 MAbs (SEQ ID5+7) 中 HCB 型重链的结合是等同的,但是 VL2 (SEQ ID10 中) 和 VH2 框架加上 HCA 型恒定结构域 (SEQ ID11) 的组合在募集补体方面是不活跃的。采用稀释系列 4、2 和 1 μ g/ml 来测试 MAbs。C 是阴性对照。

[0279] 实施例 9- 将具有 HCB 和 HCC 重链同种型的抗犬 NGF 单克隆抗体的 N 糖基化 (N-glycosylated) 变体和非糖基化 (aglycosylated) 变体与 NGF 结合比较

[0280] 将具有 HCB 和 HCC 重链同种型的抗犬 NGF 单克隆抗体的 N 糖基化 (N-glycosylated) 变体和非糖基化 (aglycosylated) 变体与 NGF 的结合进行比较。使编码 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:7 (HCB)、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:16 (HCB*)、SEQ ID NO:5 和 EQ ID NO:8 (HCC)、或 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:17 (HCC*) 描述的轻链和重链对的表达载体共转染到 CHO 细胞,并通过与小鼠 NGF 的结合 ELISA 比较上清液。

[0281] 图 14A 示出该结果。白色框表示未稀释的上清液,阴影框表示 1/100 的稀释液,并且 C 表示未稀释的阴性对照上清液。观察到与 NGF 等同结合。

[0282] 实施例 10-NGF 捕获的犬源化抗体诱导的补体沉积

[0283] 使用 C1qELISA 测定(使用图 5 描述的方法),测试来自实施例 9 的 CHO 细胞转染上

清液募集补体的能力。

[0284] 图 14B 示出该结果。通过除去 B 型重链 (HCB*) 中的 N- 连接糖基化位点, 废除募集补体 C1q 的能力, 并且通过 C 型重链 (HCC*) 中的类似突变削弱该能力。

[0285] 因此, 本文出乎意料地证明, 当本发明的抗体具有 HCA 或 HCD 亚型的犬衍生的重链时, 抗体与犬 NGF 的结合并不引起补体激活或其他下游的效应子功能, 例如 ADCC。因此, 在通过防止犬 NGF 与膜结合 TrkA 或 p75 受体结合抵消犬 NGF 的生物功能活性时, 所述抗体抑制相关的下游细胞内的信号级联。而且, 由于 NGF 表达频繁地发生在神经等的附近, 本发明的 NGF 抵消或中和抗体, 其具有 HCA 或 HCD 亚型的犬衍生的重链, 能够在没有募集更宽泛的免疫反应的情况下隔绝犬 NGF 的生物活性。这样的功能特性是意想不到的, 也是非常期望的。

[0286] 实施例 11- 在 CHO 细胞中表达后抗 NGF 单克隆抗体的纯化

[0287] 由于 HCA 和 HCO 亚型的犬抗 NGF 单克隆抗体期望地不与补体(图 5) 结合, 但却与葡萄球菌蛋白 A (图 2) 较结合, 因此研发了可选的纯化方法。在 CHO 细胞中表达衍生自表达 SEQ ID NO:10 (轻链变体 (VL2) 和犬 κ 恒定结构域) 和 SEQ ID NO:11 (HCA 变体 - VH2 和重链同种型 A) 的表达载体的抗犬 NGF 单克隆抗体, 并且在大量的实验后发现, 通过两种可选的纯化方法可以将犬抗 NGF 抗体分级为高纯度。

[0288] 在第一种方法中, 通过阴离子交换层析、疏水作用层析和尺寸排阻层析(方法 I- 图 15A 和图 15B) 来纯化抗犬 NGF 单克隆抗体。在第二种方法中, 可以通过 Captoproline 亲和层析之后通过阴离子交换层析来纯化抗 NGF 抗体(方法 II- 图 15C 和图 15D)。

[0289] 通过这两种方法中的任一种纯化的抗 NGF 单克隆抗体的主峰对应于约 150kDa 的分子量。利用 SDS-PAGE 和 ELISA (图 16) 进行的比较表明, 方法 I 和方法 II 产生了具有相似纯度和生物活性的抗体制剂。采用 TF-1NGF 中和测定(图 4 中描述) 测试通过这些方法产生的纯化的抗 NGF 单克隆抗体, 并且证明其具有高效能 (IC₅₀ 13pM 抗 NGF 中和的 37pM NGF ; 未示出)。

[0290] 实施例 12- 抗犬 NGF 单克隆抗体能够通过静脉注射安全地施用至犬并且不引起发热

[0291] 在 CHO 细胞中表达衍生自表达 SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:11 (犬 HCA 型重链) 的表达载体的抗犬 NGF 单克隆抗体, 并且通过离子交换层析、疏水作用层析和尺寸排阻层析的组合(方法 I, 图 15A 和图 15B) 使其纯化, 并且将缓冲液更换为磷酸盐缓冲液。通过静脉注射以每千克体重 2mg 将抗体注射入比格犬内, 并且由兽医通过目测来评定毒性体征、体重变化、体温变化和血浆生物化学变化。图 17 示出对体重和温度的测量结果。在所测量的这些或任何血浆生物化学分析物(包括钠、钾、氯化物、钙、磷酸盐、尿素、肌酐、葡萄糖、胆固醇、胆红素、丙氨酸转氨酶、碱性磷酸酶、淀粉酶、脂肪酶、总蛋白或白蛋白; 未示出) 中没有观察到变化。

[0292] 实施例 13- 体内抗犬 NGF 单克隆抗体的药物动力学表明长血清半衰期和缺乏免疫原性

[0293] 在 CHO 细胞中表达衍生自表达 SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:11 (犬 HCA 型重链) 的表达载体的抗犬 NGF 单克隆抗体, 并且通过离子交换层析、疏水作用层析和尺寸排阻层析的组合(方法 I, 图 15A 和图 15B) 使其纯化, 并且将缓冲液更换为磷酸盐缓冲液。通过静

脉注射以每千克体重 2mg 将抗体注射入比格犬内,在其次的 2 周内的不同时间采集血浆样品。通过 ELISA,使用作为靶的 NGF 和抗犬多克隆抗体-辣根过氧化物酶第二试剂,评价稀释的血浆样品的抗犬 NGF 抗体浓度,并如图 1 显影。图 18 示出该结果。测得的血浆浓度与二相动力学一致,具有约 33 小时的组织分布(α)相半衰期和约 9 天的出奇的消除(β)相。

[0294] 在 100 至 300 小时之间抗犬 NGF 抗体血浆浓度没有急剧下降,这表明在狗血液中既没有已有的中和抗体导致的重组抗 NGF 单克隆抗体,注入后也没有生成任何这样的中和抗体。通过比较,在注入后 200 小时时,狗血液中的抗体中和了基于蛋白的重组人免疫球蛋白(Richter et al, Drug Metabolism and Disposition 27:21, 1998)。因此,这些结果表明,本发明的抗犬 NGF 抗体在静脉注射后在体内具有长的血清半衰期(9 天),并且随时间的过去,不存在中和注射的抗 NGF 抗体的已有抗体或新产生的抗体。

[0295] 实施例 14- 抗犬 NGF 单克隆个抗体对降低体内炎性疼痛的影响

[0296] 抗体疗法

[0297] 在 CHO 细胞中表达衍生自表达 SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:11(犬 HCA 型重链)的表达载体的抗犬 NGF 单克隆抗体,并且通过离子交换层析、疏水作用层析和尺寸排阻层析的组合(方法 I)使其纯化,并且将缓冲液更换为磷酸盐缓冲液。

[0298] 有炎症的犬模型:

[0299] 在机构伦理委员会(Institutional Ethics Committee, CRL, 爱尔兰)的预先批准下进行所有的实验。将高岭土(kaolin)注入(-1 天时)比格犬的一条后腿的垫脚中,从而在约 24 小时后开始自身化解炎症,这导致狗暂时性跛足。在该模型中,一旦对高岭土的起初始炎性反应减弱,在约 1-2 周内该狗的跛足程度将稳定地减小,然后全部恢复。

[0300] 通过静脉注射将抗犬 NGF 单克隆抗体以每千克体重 200 μ g 或作为媒介对照的磷酸盐缓冲液注入(0 天时)到 3 只狗的组中。7 天后,通过目测评分方法评价狗的跛足程度:0 分,没有跛足(全负重);1 分,轻微跛足(非全负重但行走正常);2 分,中等跛足(轻微负重且行走不正常);3 分,严重跛足(无负重)。观察者不了解哪只狗接受了注射。

[0301] 图 19 示出了该结果。与对照组相比,注射 3 天后,接受抗 NGF 单克隆个抗体的狗的跛足评分减小,这表明与仅用媒介相比,抗 NGF 单克隆抗体具有降低狗的疼痛的效果。延迟的活性与抗犬 NGF 单克隆个抗体的血浆药物动力学一致,这表明约 30 小时的慢的组织分布相和垫脚区相对差的血管形成。图 19 示出的结果表明,本发明的抗犬 NGF 抗体在降低跛足的同时降低了狗的炎性疼痛。

[0302] 通过引用将本发明提及的所有文献并入本文中。在不背离本发明的范围的情况下,对本发明的实施方案进行各种修饰和变化对本领域技术人员是显而易见的。虽然就具体优选的实施方案进行了描述本发明,但是应该理解,请求保护的本发明不应该不适当地限制为这些具体的实施方案。事实上,本发明意图涵盖对本领域技术人员显而易见的实施本发明的方式的各种修改。

[0001]

序列表

<110> NVIP Pty Ltd

<120> 抗神经生长因子抗体及其制备和使用方法

<130> P119711.W0.02

<150> GB1114858.2

<151> 2011-08-29

<150> US61/483481

<151> 2011-05-06

<150> US61/531439

<151> 2011-09-06

<160> 33

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可变轻链标记 1 (VL1)

<400> 1

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

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可变重链标记 1 (VH1)

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Asn Pro Gly Gly
1 5 10 15Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
20 25 30

[0002]

Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
65 70 75 80

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

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 可变轻链标记 2 (VL2)

<400> 3

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys
100 105

<210> 4
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 可变重链标记 2 (VH2)

<400> 4

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

[0003]

Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
 20 25 30
 Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Gln Met His Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 5
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 完整的轻链-VL1和κ轻链恒定结构域
 <400> 5
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Leu Ser Gln Glu
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys Arg Asn Asp Ala Gln
 100 105 110
 Pro Ala Val Tyr Leu Phe Gln Pro Ser Pro Asp Gln Leu His Thr Gly
 115 120 125
 Ser Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Ser Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
 130 135 140

[0004]

Asn Val Lys Trp Lys Val Asp Gly Val Ile Gln Asp Thr Gly Ile Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Met Ser Ser Thr Glu Tyr Leu Ser His Glu Leu Tyr Ser
 180 185 190
 Cys Glu Ile Thr His Lys Ser Leu Pro Ser Thr Leu Ile Lys Ser Phe
 195 200 205
 Gln Arg Ser Glu Cys Gln Arg Val Asp
 210 215
 <210> 6
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 完整的重链-VH1和HCA
 <400> 6
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Asn Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
 20 25 30
 Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met His Ser Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr
 130 135 140
 Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu His Ser Leu Ser Ser Met Val Thr
 180 185 190

[0005]

Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Val
 195 200 205
 His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Phe Asn Glu Cys
 210 215 220
 Arg Cys Thr Asp Thr Pro Pro Cys Pro Val Pro Glu Pro Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Leu Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Arg Ile
 245 250 255
 Thr Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Leu Asp Leu Gly Arg Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Glu Val His
 275 280 285
 Thr Ala Lys Thr Gln Ser Arg Glu Gln Gln Phe Asn Gly Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln Asp Trp Leu Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu
 325 330 335
 Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Arg Ala His Lys Pro Ser Val Tyr
 340 345 350
 Val Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser Ser Ser Asp Thr Val Ser
 355 360 365
 Ile Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu
 370 375 380
 Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Arg Lys His Arg Met Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asp Pro Phe Thr Cys Ala
 420 425 430
 Val Met His Glu Thr Leu Gln Asn His Tyr Thr Asp Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 His Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 7
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

[0006]

<223> 完整的重链-VH1和HCB

<400> 7

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

Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
20 25 30

Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
65 70 75 80

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

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
115 120 125

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

Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

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

Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala
195 200 205

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

Asn Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Leu Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Leu Asp Pro Glu Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp
275 280 285

[0007]

Gly Lys Gln Met Gln Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 290 295 300
 Asn Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gly His Gln Asp
 305 310 315 320
 Trp Leu Lys Gly Lys Gln Phe Thr Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu
 325 330 335
 Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala His
 340 345 350
 Gln Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Leu Ser Lys
 355 360 365
 Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp
 370 375 380
 Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys
 385 390 395 400
 Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu
 405 410 415
 Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr
 420 425 430
 Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 435 440 445
 Glu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 8
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 完整的重链-VH1和HCC
 <400> 8
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Asn Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
 20 25 30
 Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met His Ser Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

[0008]

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Gln Ser Gly Ser Thr
 130 135 140
 Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Val Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala
 195 200 205
 His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Ala Lys Glu Cys
 210 215 220
 Glu Cys Lys Cys Asn Cys Asn Asn Cys Pro Cys Pro Gly Cys Gly Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile
 245 250 255
 Leu Val Thr Ala Arg Thr Pro Thr Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Asn Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Ser Lys
 275 280 285
 Gln Val Gln Thr Ala Asn Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Ser Asn Gly
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Ser Gly Lys Gln Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser
 325 330 335
 Pro Ile Glu Glu Ile Ile Ser Lys Thr Pro Gly Gln Ala His Gln Pro
 340 345 350
 Asn Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Met Ser Lys Asn Thr
 355 360 365
 Val Thr Leu Thr Cys Leu Val Lys Asp Phe Phe Pro Pro Glu Ile Asp
 370 375 380
 Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg
 385 390 395 400

[0009]

Met Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile
420 425 430

Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Ile Ser
435 440 445

Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 9
<211> 453
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 完整的重链-VH1和HCD

<400> 9

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

Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
20 25 30

Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
65 70 75 80

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

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
115 120 125

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

Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

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

Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Val Thr
180 185 190

[0010]

Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Val
 195 200 205
 His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Pro Lys Glu Ser
 210 215 220
 Thr Cys Lys Cys Ile Ser Pro Cys Pro Val Pro Glu Ser Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Arg Ile
 245 250 255
 Thr Arg Thr Pro Glu Ile Thr Cys Val Val Leu Asp Leu Gly Arg Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Glu Val His
 275 280 285
 Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln Asp Trp Leu Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Gly Leu Pro Ser Pro Ile Glu
 325 330 335
 Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala His Gln Pro Ser Val Tyr
 340 345 350
 Val Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser Ser Ser Asp Thr Val Thr
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Glu Ile Asp Val Glu
 370 375 380
 Trp Gln Ser Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Ser Lys Tyr His Thr Thr
 385 390 395 400
 Ala Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asp Thr Phe Thr Cys Ala
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu Gln Asn His Tyr Thr Asp Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 His Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 10
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> VL2和κ轻链恒定结构域

[0011]

<400> 10

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys Arg Asn Asp Ala Gln
100 105 110

Pro Ala Val Tyr Leu Phe Gln Pro Ser Pro Asp Gln Leu His Thr Gly
115 120 125

Ser Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Ser Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Val Asp Gly Val Ile Gln Asp Thr Gly Ile Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Met Ser Ser Thr Glu Tyr Leu Ser His Glu Leu Tyr Ser
180 185 190

Cys Glu Ile Thr His Lys Ser Leu Pro Ser Thr Leu Ile Lys Ser Phe
195 200 205

Gln Arg Ser Glu Cys Gln Arg Val Asp
210 215

<210> 11

<211> 453

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 完整的重链-VH2和HCA

<400> 11

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

Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
20 25 30

[0012]

```

Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
    35                                40                                45

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
    50                                55                                60

Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
    65                                70                                75                                80

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

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
    100                               105                               110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
    115                               120                               125

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

Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
    145                               150                               155                               160

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

Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu His Ser Leu Ser Ser Met Val Thr
    180                               185                               190

Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Val
    195                               200                               205

His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Phe Asn Glu Cys
    210                               215                               220

Arg Cys Thr Asp Thr Pro Pro Cys Pro Val Pro Glu Pro Leu Gly Gly
    225                               230                               235                               240

Pro Ser Val Leu Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Arg Ile
    245                               250                               255

Thr Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Leu Asp Leu Gly Arg Glu
    260                               265                               270

Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Glu Val His
    275                               280                               285

Thr Ala Lys Thr Gln Ser Arg Glu Gln Gln Phe Asn Gly Thr Tyr Arg
    290                               295                               300

Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln Asp Trp Leu Thr Gly Lys
    305                               310                               315                               320

Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu
    325                               330                               335

```

[0013]

Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Arg Ala His Lys Pro Ser Val Tyr
 340 345 350
 Val Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser Ser Ser Asp Thr Val Ser
 355 360 365
 Ile Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu
 370 375 380
 Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Arg Lys His Arg Met Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asp Pro Phe Thr Cys Ala
 420 425 430
 Val Met His Glu Thr Leu Gln Asn His Tyr Thr Asp Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 His Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 12
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 完整的重链-VH2和HCB
 <400> 12
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Asn Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
 20 25 30
 Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Gln Met His Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr
 130 135 140

[0014]

Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala
 195 200 205
 His Pro Ala Ser Lys Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Pro Lys Arg Glu
 210 215 220
 Asn Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Leu Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 Asp Leu Asp Pro Glu Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp
 275 280 285
 Gly Lys Gln Met Gln Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 290 295 300
 Asn Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gly His Gln Asp
 305 310 315 320
 Trp Leu Lys Gly Lys Gln Phe Thr Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu
 325 330 335
 Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala His
 340 345 350
 Gln Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Leu Ser Lys
 355 360 365
 Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp
 370 375 380
 Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys
 385 390 395 400
 Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu
 405 410 415
 Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr
 420 425 430
 Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 435 440 445

[0015]

Glu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 13
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 完整的重链-VH2和HCC

<400> 13

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

Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
 20 25 30

Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
 65 70 75 80

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

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
 115 120 125

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

Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

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

Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala
 195 200 205

His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Ala Lys Glu Cys
 210 215 220

Glu Cys Lys Cys Asn Cys Asn Asn Cys Pro Cys Pro Gly Cys Gly Leu
 225 230 235 240

[0016]

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile
 245 250 255
 Leu Val Thr Ala Arg Thr Pro Thr Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Asn Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Ser Lys
 275 280 285
 Gln Val Gln Thr Ala Asn Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Ser Asn Gly
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Ser Gly Lys Gln Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser
 325 330 335
 Pro Ile Glu Glu Ile Ile Ser Lys Thr Pro Gly Gln Ala His Gln Pro
 340 345 350
 Asn Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Met Ser Lys Asn Thr
 355 360 365
 Val Thr Leu Thr Cys Leu Val Lys Asp Phe Phe Pro Pro Glu Ile Asp
 370 375 380
 Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg
 385 390 395 400
 Met Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415
 Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile
 420 425 430
 Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Ile Ser
 435 440 445
 Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 14
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 完整的重链-VH2和HCD
 <400> 14
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Asn Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
 20 25 30
 Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

[0017]

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Gln Met His Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr
 130 135 140
 Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Val
 195 200 205
 His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Pro Lys Glu Ser
 210 215 220
 Thr Cys Lys Cys Ile Ser Pro Cys Pro Val Pro Glu Ser Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Arg Ile
 245 250 255
 Thr Arg Thr Pro Glu Ile Thr Cys Val Val Leu Asp Leu Gly Arg Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Glu Val His
 275 280 285
 Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln Asp Trp Leu Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Gly Leu Pro Ser Pro Ile Glu
 325 330 335
 Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala His Gln Pro Ser Val Tyr
 340 345 350

[0018]

Val Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser Ser Ser Asp Thr Val Thr
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Glu Ile Asp Val Glu
 370 375 380
 Trp Gln Ser Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Ser Lys Tyr His Thr Thr
 385 390 395 400
 Ala Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asp Thr Phe Thr Cys Ala
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu Gln Asn His Tyr Thr Asp Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 His Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> I5
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> VH1和非糖基化HCA
 <400> I5
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Asn Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
 20 25 30
 Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met His Ser Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr
 130 135 140

[0019]

Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu His Ser Leu Ser Ser Met Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Val
 195 200 205
 His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Phe Asn Glu Cys
 210 215 220
 Arg Cys Thr Asp Thr Pro Pro Cys Pro Val Pro Glu Pro Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Leu Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Arg Ile
 245 250 255
 Thr Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Leu Asp Leu Gly Arg Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Glu Val His
 275 280 285
 Thr Ala Lys Thr Gln Ser Arg Glu Gln Gln Phe Ala Gly Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln Asp Trp Leu Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu
 325 330 335
 Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Arg Ala His Lys Pro Ser Val Tyr
 340 345 350
 Val Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser Ser Ser Asp Thr Val Ser
 355 360 365
 Ile Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu
 370 375 380
 Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Arg Lys His Arg Met Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asp Pro Phe Thr Cys Ala
 420 425 430
 Val Met His Glu Thr Leu Gln Asn His Tyr Thr Asp Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

[0020]

His Ser Pro Gly Lys
450

<210> 16
<211> 457
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH1和非糖基化HCB

<400> 16

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

Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
20 25 30

Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
65 70 75 80

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

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
115 120 125

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

Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

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

Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala
195 200 205

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

Asn Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

[0021]

Asp Thr Leu Leu Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 Asp Leu Asp Pro Glu Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp
 275 280 285
 Gly Lys Gln Met Gln Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 290 295 300
 Ala Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gly His Gln Asp
 305 310 315 320
 Trp Leu Lys Gly Lys Gln Phe Thr Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu
 325 330 335
 Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala His
 340 345 350
 Gln Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Leu Ser Lys
 355 360 365
 Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp
 370 375 380
 Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys
 385 390 395 400
 Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu
 405 410 415
 Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr
 420 425 430
 Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 435 440 445
 Glu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 17
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> VH1和非糖基化HCC
 <400> 17
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Asn Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
 20 25 30
 Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

[0022]

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met His Ser Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Gln Ser Gly Ser Thr
 130 135 140
 Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Val Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala
 195 200 205
 His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Ala Lys Glu Cys
 210 215 220
 Glu Cys Lys Cys Asn Cys Asn Asn Cys Pro Cys Pro Gly Cys Gly Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile
 245 250 255
 Leu Val Thr Ala Arg Thr Pro Thr Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Asn Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Ser Lys
 275 280 285
 Gln Val Gln Thr Ala Asn Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Ser Ala Gly
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Ser Gly Lys Gln Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser
 325 330 335
 Pro Ile Glu Glu Ile Ile Ser Lys Thr Pro Gly Gln Ala His Gln Pro
 340 345 350

[0023]

Asn Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Met Ser Lys Asn Thr
 355 360 365
 Val Thr Leu Thr Cys Leu Val Lys Asp Phe Phe Pro Pro Glu Ile Asp
 370 375 380
 Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg
 385 390 395 400
 Met Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415
 Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile
 420 425 430
 Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Ile Ser
 435 440 445
 Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 18
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> VH1和非糖基化HCD
 <400> 18
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Asn Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
 20 25 30
 Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met His Ser Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr
 130 135 140
 Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

[0024]

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Val
 195 200 205
 His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Pro Lys Glu Ser
 210 215 220
 Thr Cys Lys Cys Ile Ser Pro Cys Pro Val Pro Glu Ser Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Arg Ile
 245 250 255
 Thr Arg Thr Pro Glu Ile Thr Cys Val Val Leu Asp Leu Gly Arg Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Glu Val His
 275 280 285
 Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Gln Gln Phe Ala Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln Asp Trp Leu Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Gly Leu Pro Ser Pro Ile Glu
 325 330 335
 Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala His Gln Pro Ser Val Tyr
 340 345 350
 Val Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser Ser Ser Asp Thr Val Thr
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Glu Ile Asp Val Glu
 370 375 380
 Trp Gln Ser Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Ser Lys Tyr His Thr Thr
 385 390 395 400
 Ala Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asp Thr Phe Thr Cys Ala
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu Gln Asn His Tyr Thr Asp Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 His Ser Pro Gly Lys
 450

[0025]

<210> 19
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> VH2和非糖基化HCA

 <400> 19
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Asn Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
 20 25 30
 Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Gln Met His Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr
 130 135 140
 Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu His Ser Leu Ser Ser Met Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Val
 195 200 205
 His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Phe Asn Glu Cys
 210 215 220
 Arg Cys Thr Asp Thr Pro Pro Cys Pro Val Pro Glu Pro Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Leu Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Arg Ile
 245 250 255

[0026]

Thr Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Leu Asp Leu Gly Arg Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Glu Val His
 275 280 285
 Thr Ala Lys Thr Gln Ser Arg Glu Gln Gln Phe Ala Gly Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln Asp Trp Leu Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu
 325 330 335
 Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Arg Ala His Lys Pro Ser Val Tyr
 340 345 350
 Val Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser Ser Ser Asp Thr Val Ser
 355 360 365
 Ile Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu
 370 375 380
 Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Arg Lys His Arg Met Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asp Pro Phe Thr Cys Ala
 420 425 430
 Val Met His Glu Thr Leu Gln Asn His Tyr Thr Asp Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 His Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 20
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> VH2和非糖基化HCB
 <400> 20
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Asn Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
 20 25 30
 Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

[0027]

Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Gln Met His Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr
 130 135 140
 Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala
 195 200 205
 His Pro Ala Ser Lys Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Pro Lys Arg Glu
 210 215 220
 Asn Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Leu Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 Asp Leu Asp Pro Glu Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp
 275 280 285
 Gly Lys Gln Met Gln Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 290 295 300
 Ala Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gly His Gln Asp
 305 310 315 320
 Trp Leu Lys Gly Lys Gln Phe Thr Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu
 325 330 335
 Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala His
 340 345 350
 Gln Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Leu Ser Lys
 355 360 365

[0028]

Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp
 370 375 380
 Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys
 385 390 395 400
 Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu
 405 410 415
 Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr
 420 425 430
 Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 435 440 445
 Glu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 21
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> VH2和非糖基化HCC
 <400> 21
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Asn Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
 20 25 30
 Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Gln Met His Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Gln Ser Gly Ser Thr
 130 135 140
 Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

[0029]

Val Ser Trp Asn Ser Val Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala
 195 200 205
 His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Ala Lys Glu Cys
 210 215 220
 Glu Cys Lys Cys Asn Cys Asn Asn Cys Pro Cys Pro Gly Cys Gly Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile
 245 250 255
 Leu Val Thr Ala Arg Thr Pro Thr Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Asn Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Ser Lys
 275 280 285
 Gln Val Gln Thr Ala Asn Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Ser Ala Gly
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Ser Gly Lys Gln Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser
 325 330 335
 Pro Ile Glu Glu Ile Ile Ser Lys Thr Pro Gly Gln Ala His Gln Pro
 340 345 350
 Asn Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Met Ser Lys Asn Thr
 355 360 365
 Val Thr Leu Thr Cys Leu Val Lys Asp Phe Phe Pro Pro Glu Ile Asp
 370 375 380
 Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg
 385 390 395 400
 Met Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415
 Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile
 420 425 430
 Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Ile Ser
 435 440 445
 Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 450 455

[0030]

<210> 22
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> VII2和非糖基化HCD

<400> 22

```

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

Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
20          25          30

Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50          55          60

Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
65          70          75          80

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

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
100         105         110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
115         120         125

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

Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145         150         155         160

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

Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Val Thr
180         185         190

Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Val
195         200         205

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

Thr Cys Lys Cys Ile Ser Pro Cys Pro Val Pro Glu Ser Leu Gly Gly
225         230         235         240

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Arg Ile
245         250         255

Thr Arg Thr Pro Glu Ile Thr Cys Val Val Leu Asp Leu Gly Arg Glu
260         265         270

```

[0031]

Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Glu Val His
 275 280 285
 Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Gln Gln Phe Ala Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln Asp Trp Leu Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Gly Leu Pro Ser Pro Ile Glu
 325 330 335
 Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala His Gln Pro Ser Val Tyr
 340 345 350
 Val Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser Ser Ser Asp Thr Val Thr
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Glu Ile Asp Val Glu
 370 375 380
 Trp Gln Ser Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Ser Lys Tyr His Thr Thr
 385 390 395 400
 Ala Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asp Thr Phe Thr Cys Ala
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu Gln Asn His Tyr Thr Asp Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 His Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 23
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> VL-FR1
 <400> 23
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Leu Ser Gln Glu
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys
 20
 <210> 24
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> VL2-FR1

[0032]

<400> 24

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VL-FR2

<400> 25

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 26

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VL-FR3

<400> 26

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Ser
1 5 10 15

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ser Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 27

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VL2-FR3

<400> 27

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Ser
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VL-FR4

<400> 28

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys
1 5 10

<210> 29

<211> 30

[0033]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH-FR1

<400> 29

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

Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
20 25 30

<210> 30
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH-FR2

<400> 30

Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 5 10

<210> 31
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH-FR3

<400> 31

Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu Lys
1 5 10 15

Met His Ser Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 32
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH2-FR3

<400> 32

Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu Gln
1 5 10 15

Met His Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH-FR4

<400> 33

[0034]

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

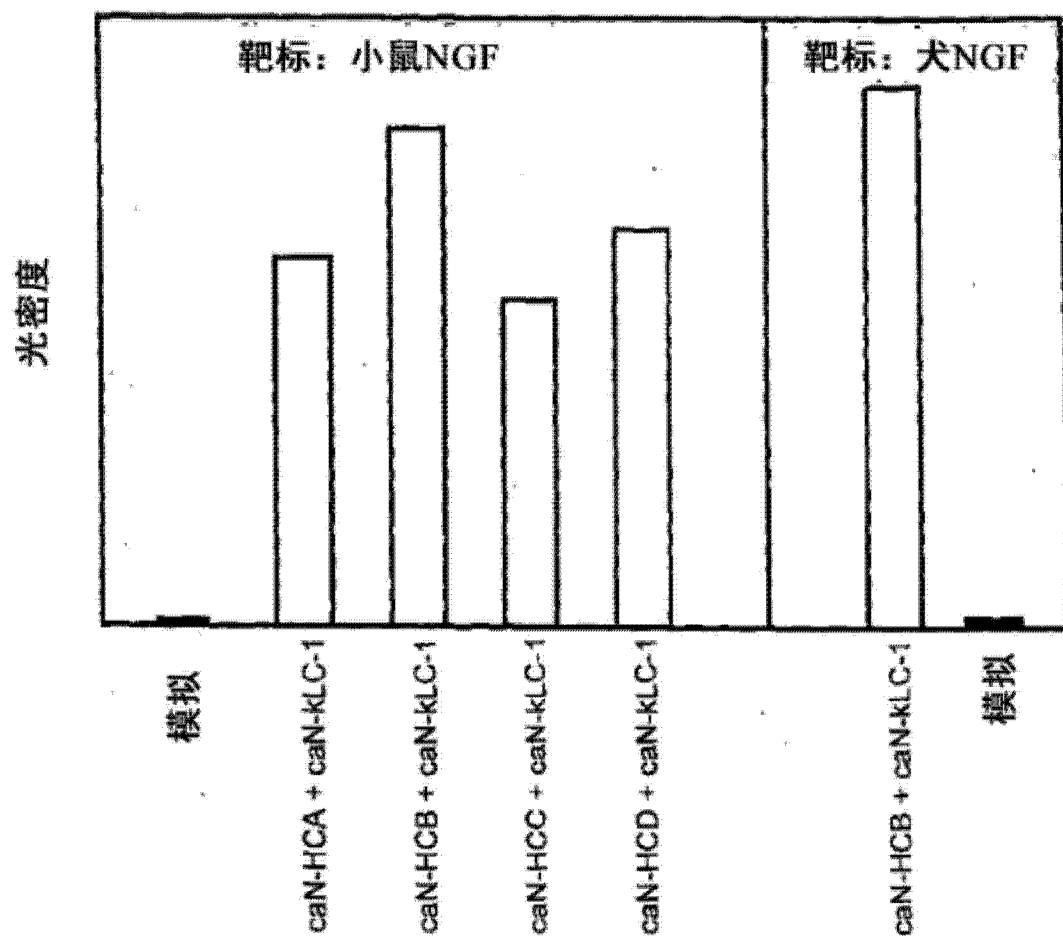


图 1

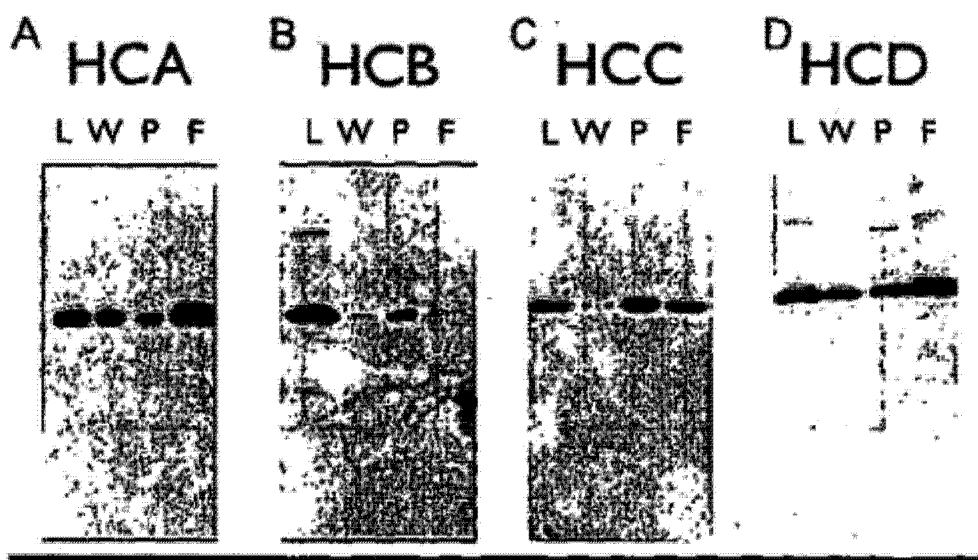


图 2

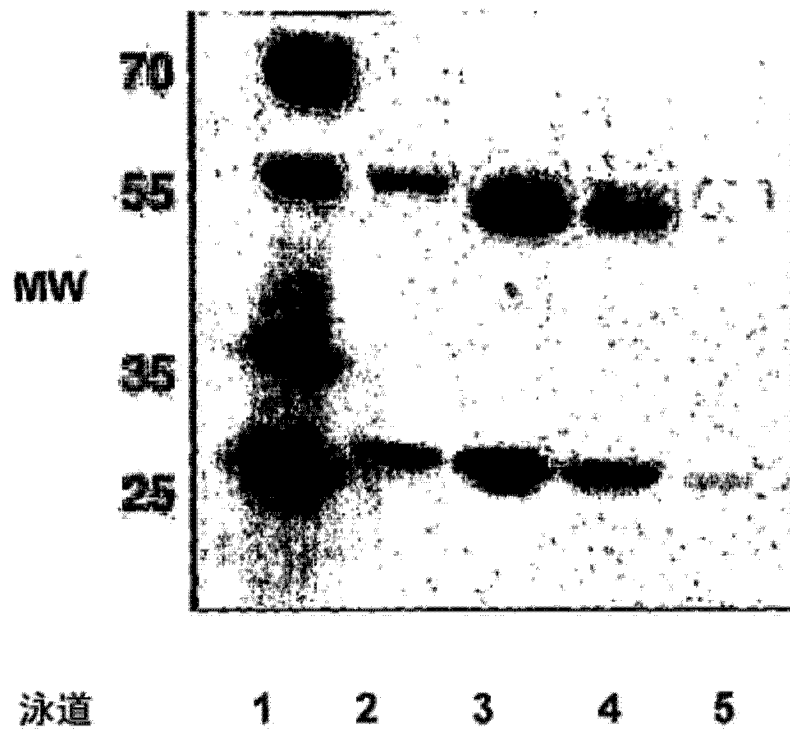


图 3

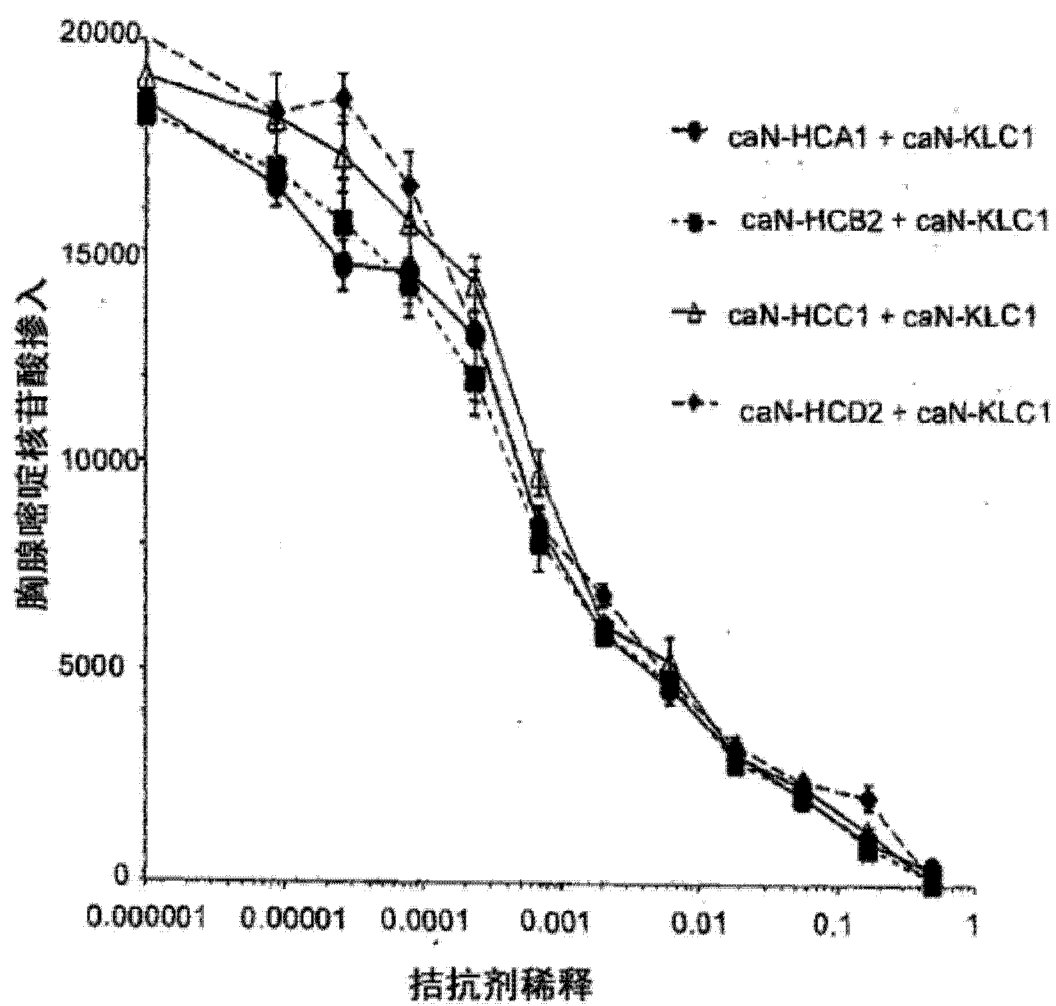


图 4

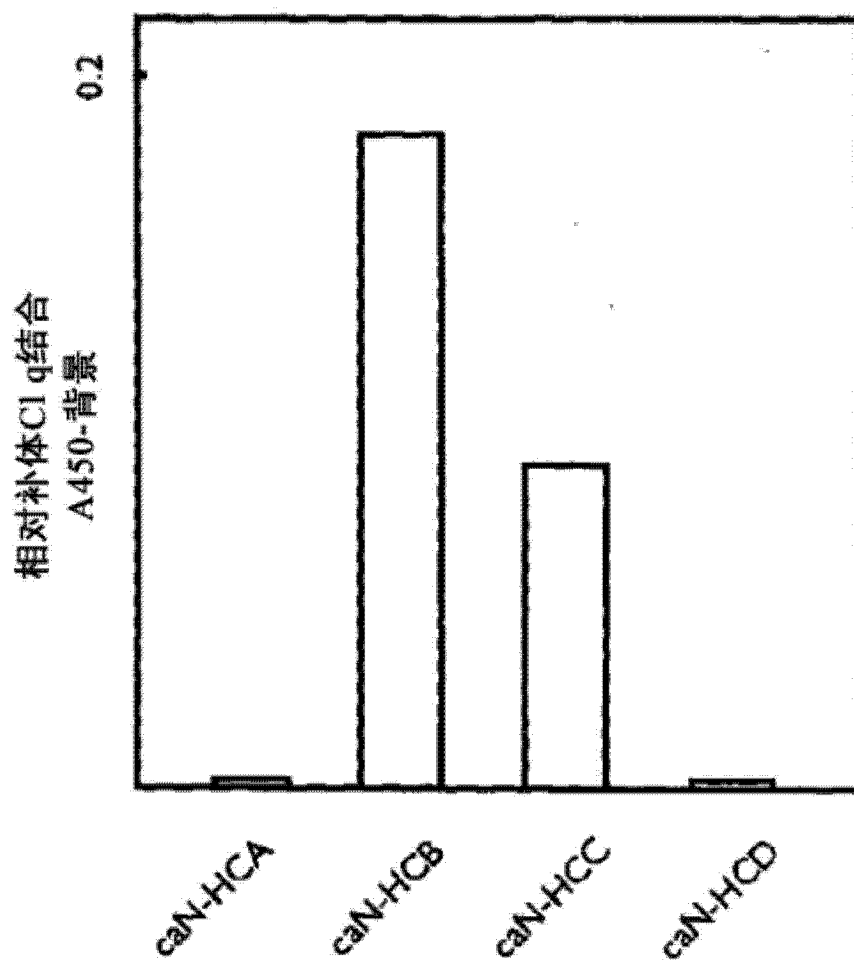


图 5

犬源化 VL 40 DIQMTQSPASLSLSQEEKVTITCRASEDIYNALAWYQOKP

犬源化 VL 80 GQAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSGTEYSLTINSLES

犬源化 VL EDVAVYFCQHYFHYPRTEFGAGTKVELK 107

轻链可变结构域

图 6

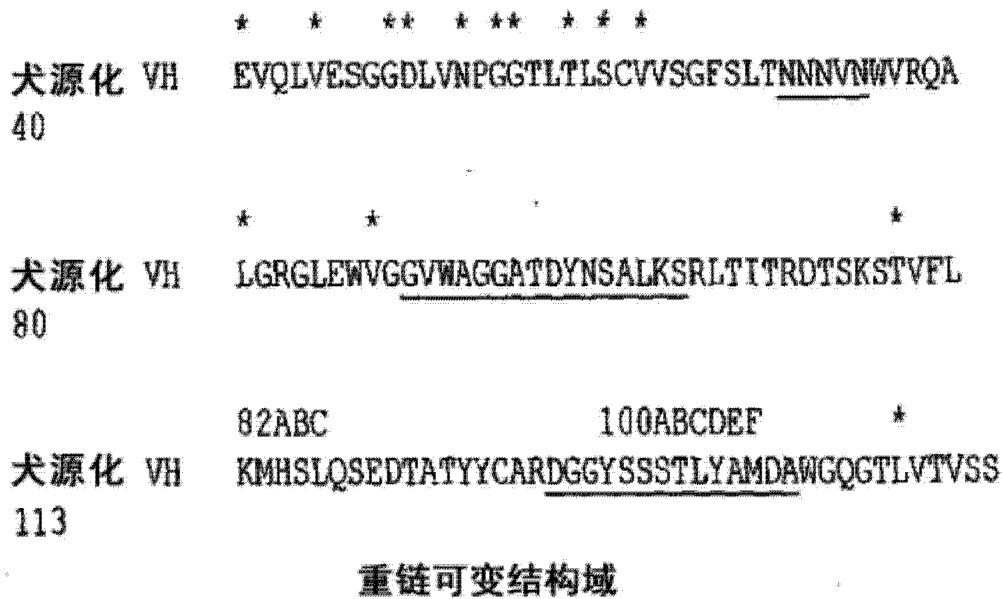


图 7

DIQMTQSPASLSLSQEEKVTITCRASEDIYNALAWYQ
QKPGQAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSGTEYSLTI
NSLESEDVAVYFCQHYPRTFGAGTKVELKRND
QPAVYLFQSPDQLHTGSASVCLLNSFYPKDINVKW
KVDGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYSLSSTLTMSSTEYL
SHELYSCEITHKSLPSTLIKSFRSECQRVD

犬源化抗NGF VL犬κ轻链 (caN-kLC)

图 8

EVQLVESGGDLVNPGGTLTLSCVVSGFSLTNNNVNWVR
QALGRGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRLTITRDTSKS
TVFLKMHS LQSEDTATYYCARDGGYSSSTLYAMDAWG
QGTLVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVS
GYFPEPVT VSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLHSLSSMV
TVPSSRWPSETFTCNVHPASNTKVDKPVFNECRCTDTP
PCPVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILRITRTPEVTCVVDLGR
EDPEVQISW FVDGKEVHTAKTQSREQQFNGTYRVVSVL
PIEHQDWLTGKEFKCRVNHIDLPSP IERTISKARGRAHKP
SVYVLPPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSN
GQEPERKHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQG
DPFTCAVMHETLQNHYTDL SLSHSPGK

犬源化抗NGF VH犬IgG-A重链 (caN-HCA)

图 9

EVQLVESGGDLVNPGGTLTLSCVVSGFSLTNNNVNWVR
QALGRGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRLTITRDTSKS
TVFLKMHS LQSEDTATYYCARDGGYSSSTLYAMDAWG
QGTLVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVS
GYFPEPVT VSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMV
TVPSSRWPSETFTCNVAHPASKTKVDKPVPKRENGRVP
RPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTC
VVVDLDPEDPEVQISW FVDGKQMQTAKTQPREEQFNGT
YRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKA
RGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFYPPDIDV
EWQSN GQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKS
RWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLSHSPGK

犬源化抗NGF VH犬IgG-B重链 (caN-HCB)

图 10

EVQLVESGGDLVNPGGTLTLSCVVSGFSLTNNNVNWVR
QALGRGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRLTITRDTSKS
TVFLKMHS LQSEDTATYYCARDGGYSSSTLYAMDAWG
QGTLVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSQSGSTVALACLVS
GYIPEPVTVSWNSVSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMV
TVPSSRWPSETFTCNVAHPATNTKVDKPVAKECECKCN
CNNCPCPGCGLLGGPSVFIFPPKPKDILVTARTPTVTCVV
VDLDPENPEVQISWFVDSKQVQTANTQPREEQSNGTYR
VVSVLPIGHQDWLSGKQFKCKVNNKALPSPIEEIISKTPG
QAHQPNVYVLPPSRDEM SKNTVTLTCLVKDFFPPEIDVE
WQSNGGQPEPE SKYRMTTPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSR
WQRGDTFICAVMHEALHNHYTQISLSHSPGK

犬源化抗NGF VH犬IgG-C重链 (caN-HCC)

图 11

EVQLVESGGDLVNPGGTLTLSCVVSGFSLTNNNVNWVR
QALGRGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRLTITRDTSKS
TVFLKMHS LQSEDTATYYCARDGGYSSSTLYAMDAWG
QGTLVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVS
GYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSTV
TVPSSRWPSETFTCNV VHPASNTKVDKPVPKESTCKCIS
PCVPESLGGPSVFIFPPKPKDILRITRTPEITCVVLDLGRE
DPEVQISWFVDGKEVHTAKTQPREQQFNSTYRVVSVLPI
EHQDWLTGKEFKCRVNHIGLPSP IERTISKARGQAHQPS
VYVLPPSPKELSSSDTVTLTCLIKDFYPPEIDVEWQSNGQ
PEPE SKYHTTAPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDT
FTCAVMHEALQNHYTDLSLSHSPGK

犬源化抗NGF VH犬IgG-D重链 (caN-HCD)

图 12

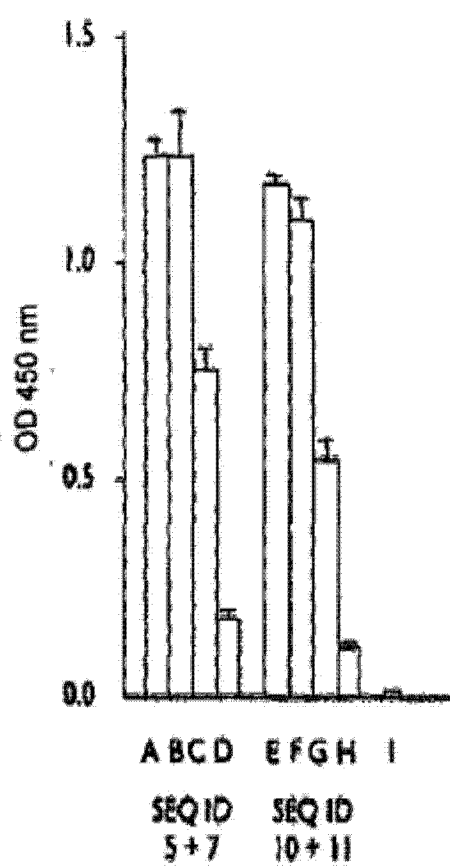


图 13A

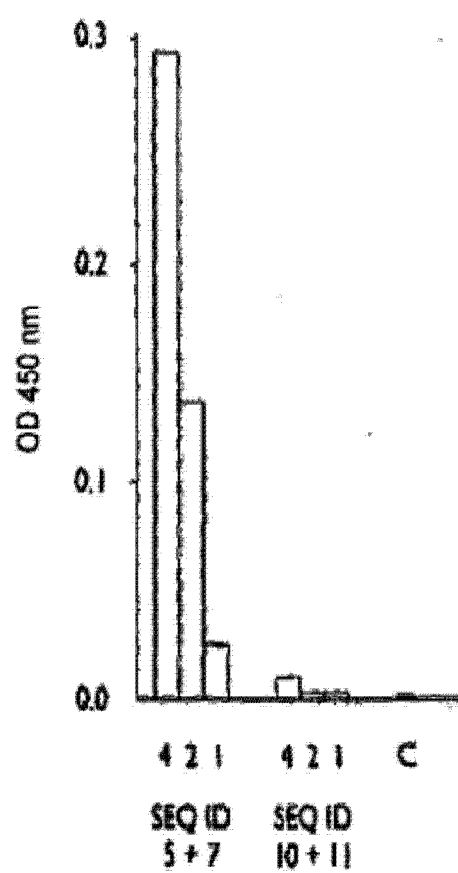


图 13B

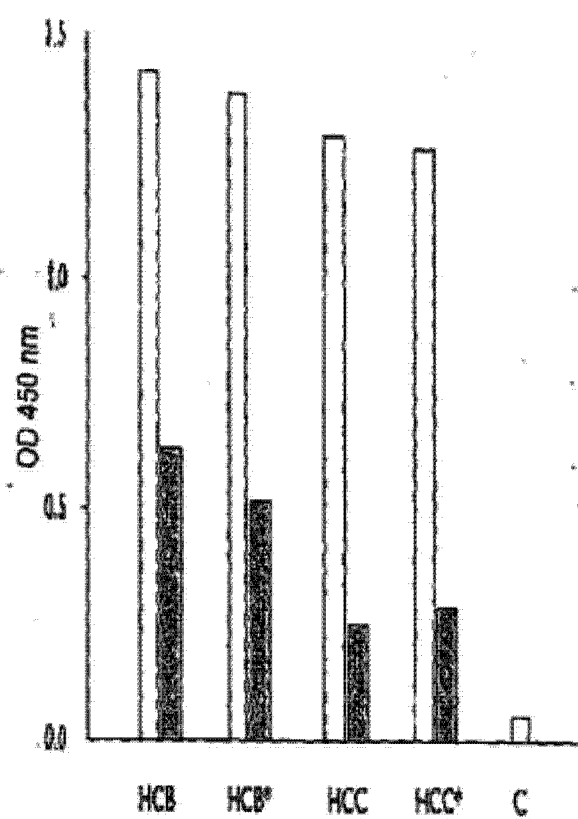


图 14A

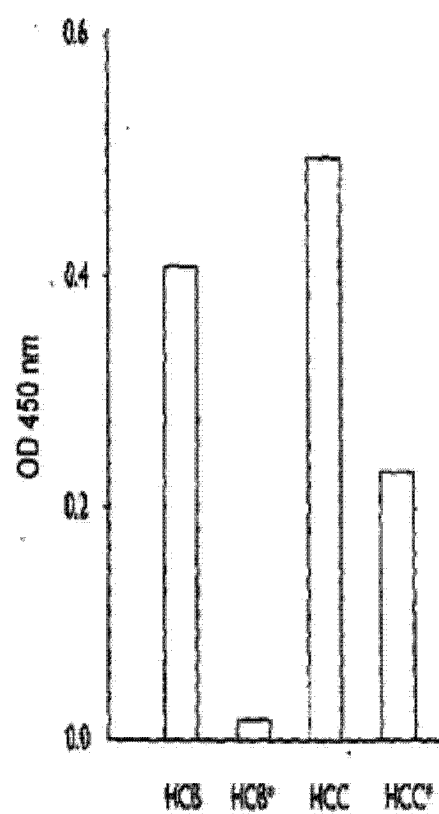


图 14B

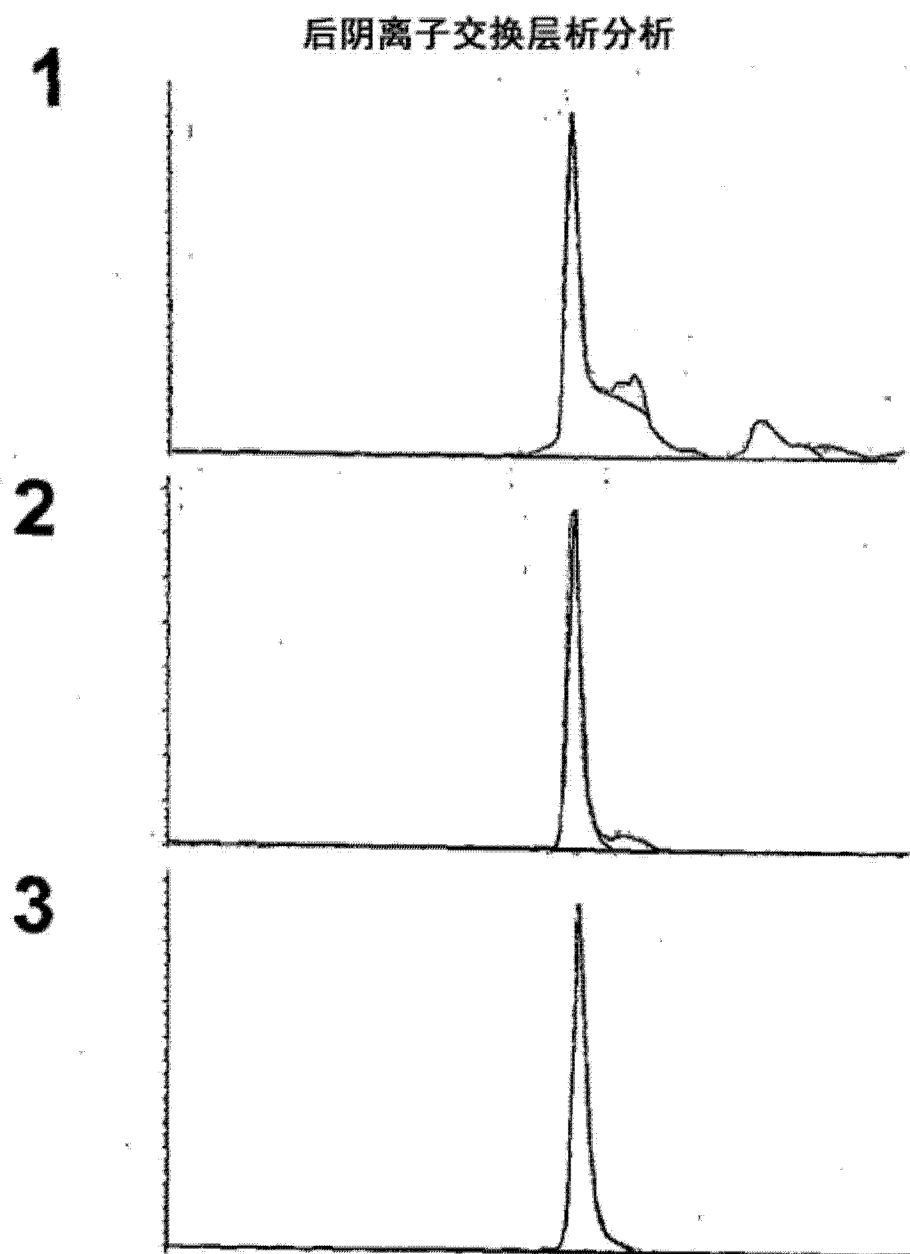


图 15A

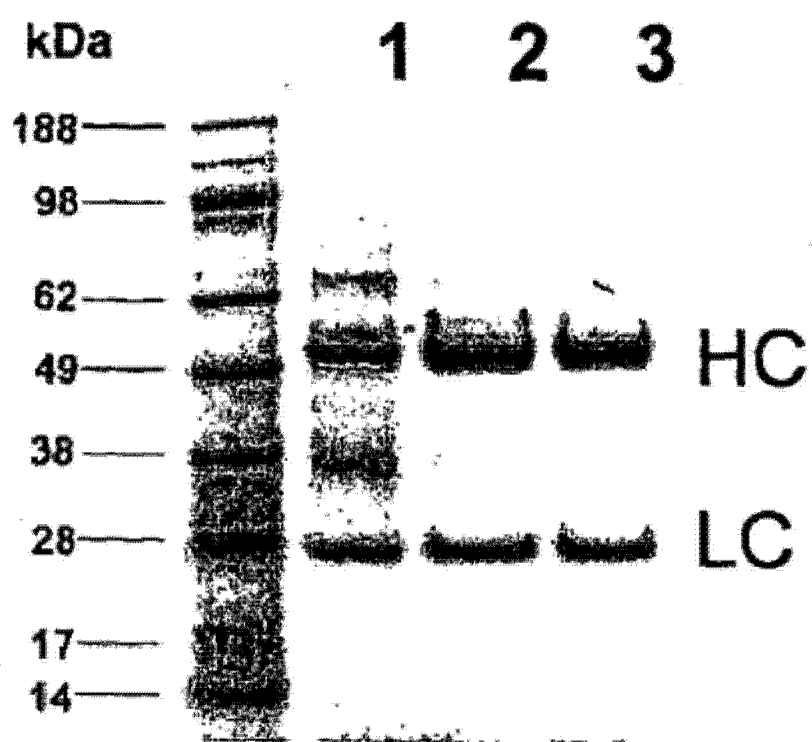


图 15B

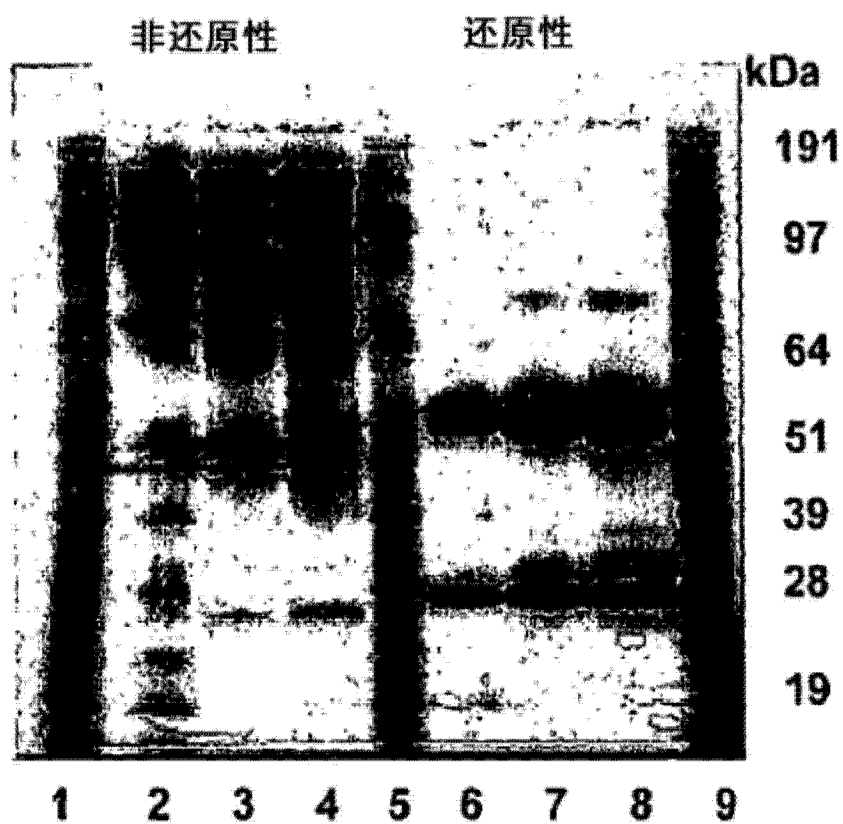
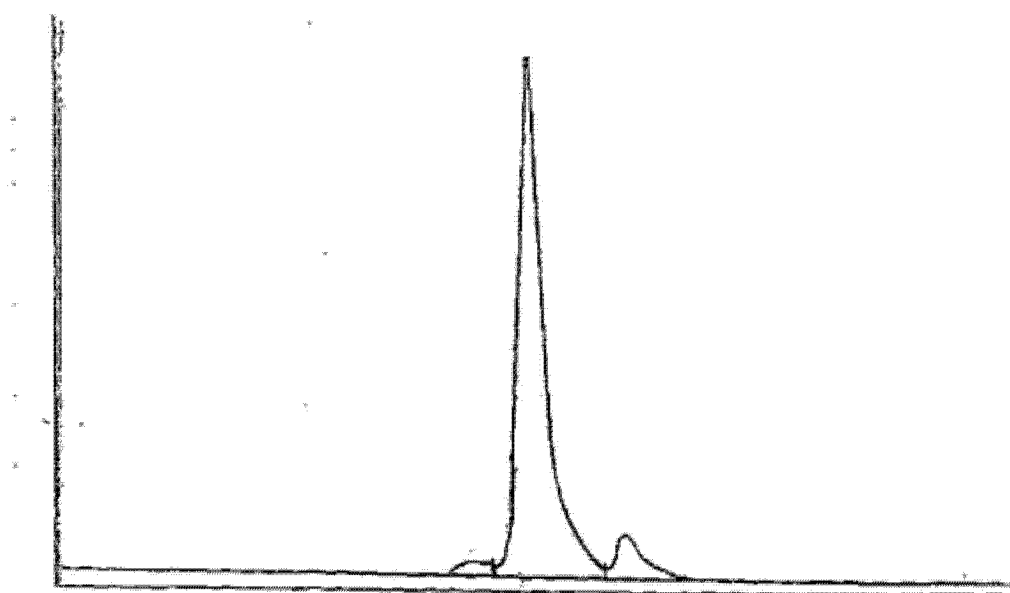
SDS-PAGE

图 15C



峰值保持时间 (Mins)	近似MW (KDa)	%总峰区域
8.05	353	2.6
9.17	156	89.7
11.18	36	7.7

图 15D

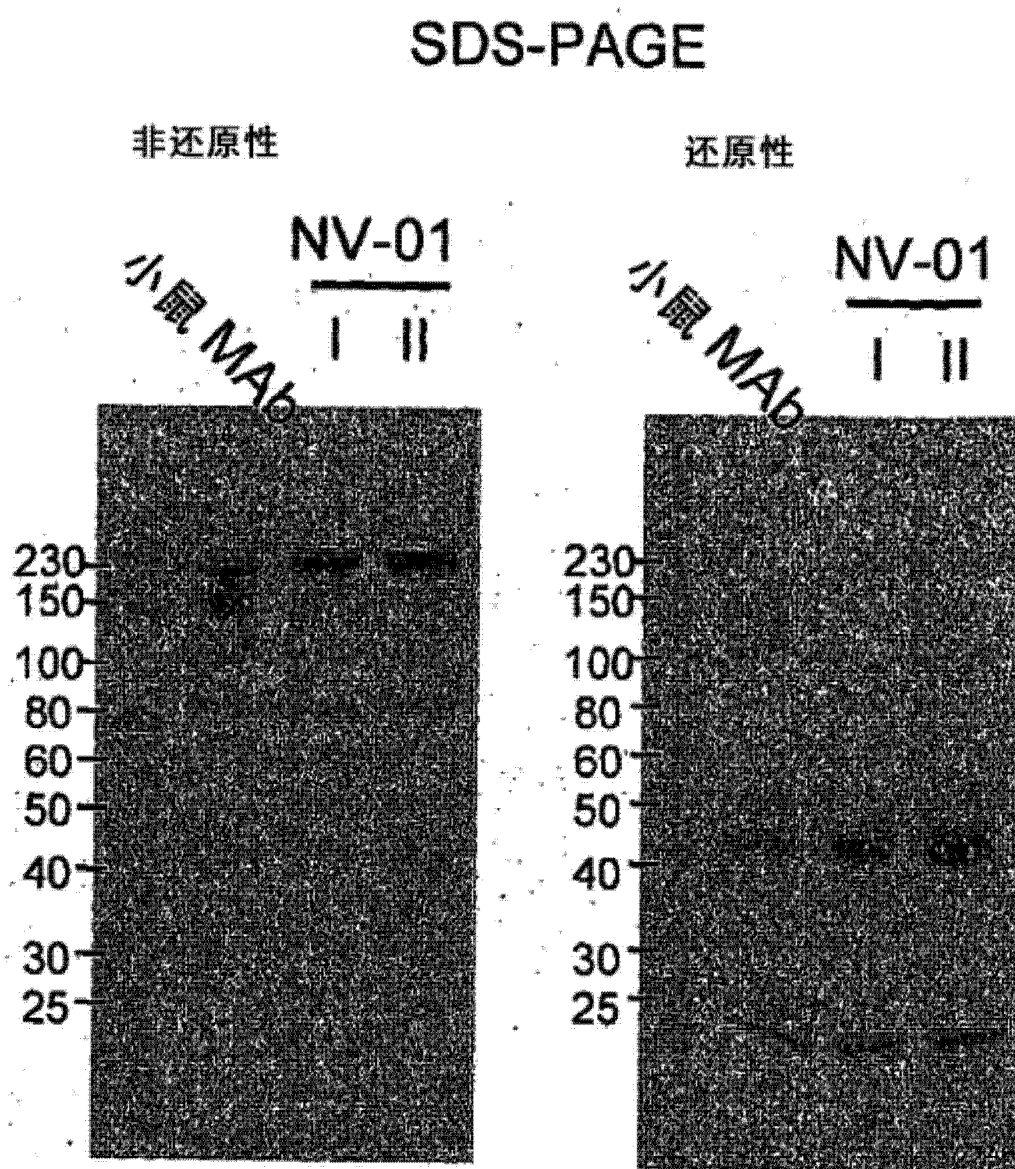


图 16A

NGF ELISA

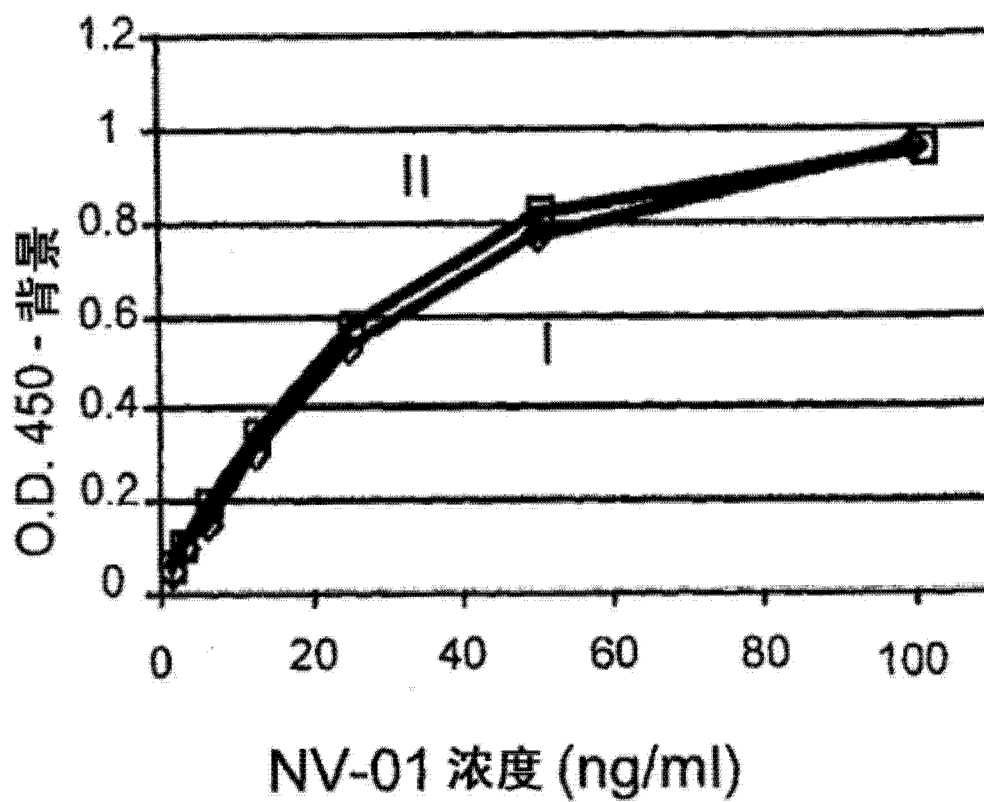


图 16B

研究的天数			-1	1	3	7
动物ID	性别	研究天为0时的寿命				
68305	M	11	9.6	10.0	9.9	10.0
26885	F	19	9.2	9.9	9.5	9.8
32886	F	11	9.4	9.9	9.7	10.0

研究的天数	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
动物ID															
68305	38.2	38.6	38.6	38.5	38.4	38.5	38.4	38.3	38.7	38.2	38.3	38.9	38.4	38.6	38.5
26886	37.8	38.2	38.0	38.2	38.4	37.7	38.1	38.2	38.4	38.2	38.4	38.6	38.5	38.4	38.6
32886	36.8	38.7	38.9	38.8	38.7	38.8	38.7	38.5	38.8	38.7	38.3	39.2	38.7	38.7	38.8

图 17

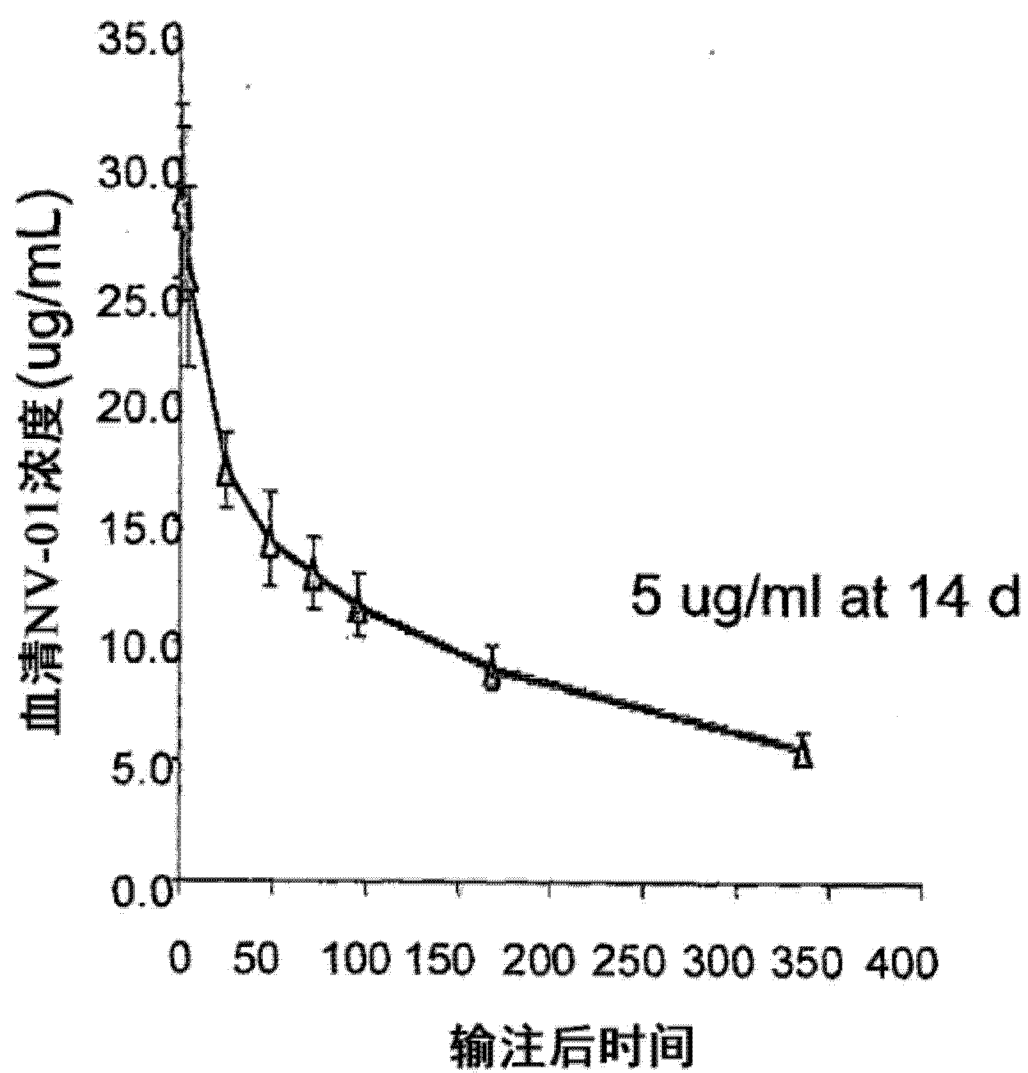


图 18

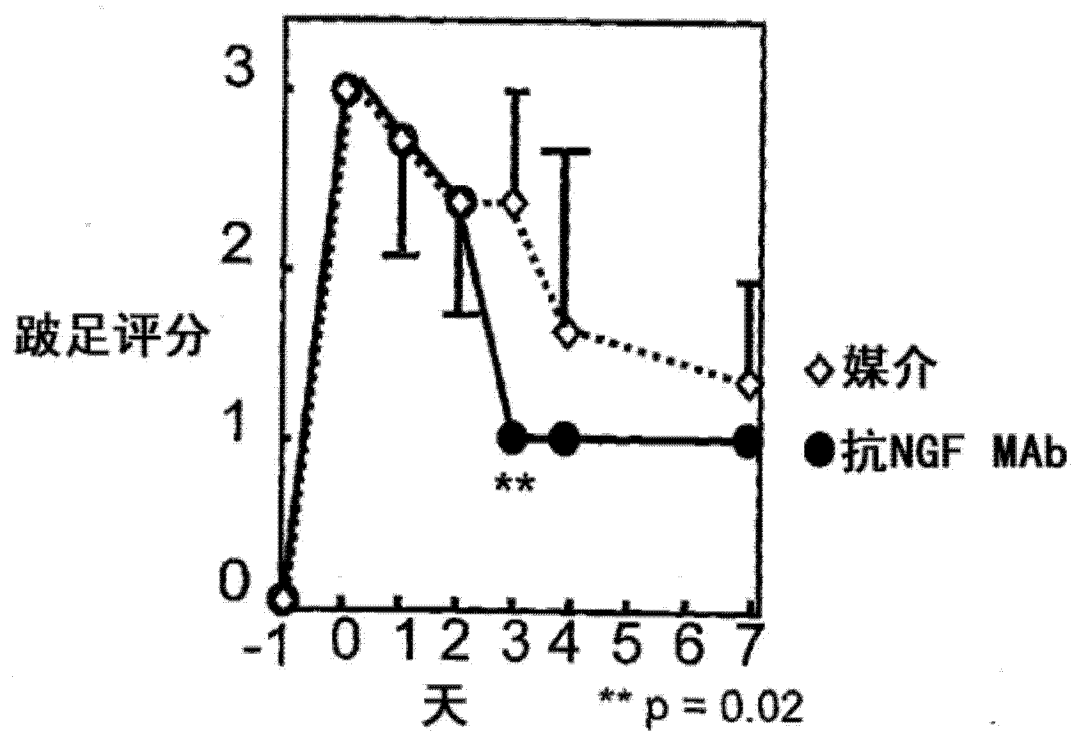


图 19