



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117279942 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 22

(21) 申请号 202180065320.3

(22) 申请日 2021.09.27

(30) 优先权数据

63/084358 2020.09.28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.03.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2021/076524 2021.09.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/064043 EN 2022.03.31

(71) 申请人 免疫医疗有限公司

地址 英国剑桥郡

(72) 发明人 F·威尔士 T·切塞尔 K·谭

T·奥斯滕费尔德 R·詹金斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

专利代理师 罗文锋 彭昶

(51) Int.Cl.

C07K 16/24 (2006.01)

权利要求书5页 说明书61页 附图37页

(54) 发明名称

用于治疗疼痛的化合物和方法

(57) 摘要

本披露提供了用于在治疗或预防疼痛中使用的新型方法和剂量方案,其中结合分子包含NGF拮抗剂结构域和TNF α 拮抗剂结构域,其中该NGF拮抗剂结构域是抗NGF抗体或其抗原结合片段,并且其中该TNF α 拮抗剂结构域包含TNFR的可溶性TNF α 结合片段。

1. 一种减轻或预防有需要的受试者的疼痛的方法,该方法包括向该受试者施用皮下固定剂量的结合分子,其中该结合分子包含NGF拮抗剂结构域和TNF α 拮抗剂结构域,其中该NGF拮抗剂结构域是抗NGF抗体或其抗原结合片段,其中该TNF α 拮抗剂结构域包含TNFR的可溶性TNF α 结合片段,并且其中该方法减轻或预防该受试者的疼痛。

2. 如权利要求1所述的方法,其中该结合分子的皮下固定剂量是约5mg至200mg。

3. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该结合分子的皮下固定剂量是约7.5mg至150mg。

4. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该结合分子的皮下固定剂量是约7.5mg、约25mg、约75mg或约150mg。

5. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该皮下固定剂量相当于30mg该结合分子的静脉内固定剂量。

6. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中至少每两周一次施用该固定剂量。

7. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中将该固定剂量施用至少12周。

8. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该疼痛包含慢性疼痛。

9. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该疼痛包含骨关节炎疼痛。

10. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该疼痛包含膝关节的骨关节炎疼痛。

11. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中在施用该结合分子之前,该受试者已经患有该疼痛3个月或更长的时间。

12. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该疼痛与关节炎症相关。

13. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该受试者患有骨关节炎。

14. 如权利要求13所述的方法,其中该受试者患有单侧膝关节的骨关节炎。

15. 如权利要求13或14所述的方法,其中根据中心读取器的评估,该受试者在0至4级的Kellgren-Lawrence (KL) 分级量表中具有至少2级膝关节的骨关节炎。

16. 如前述权利要求中任一项所述的方法,该方法包括在向该受试者施用该结合分子之前的以下步骤:

a. 向该受试者施用NSAID、强阿片类、弱阿片类、COX-2抑制剂、醋氨酚或其组合,和

b. 确定i) NSAID、强阿片类、弱阿片类、COX-2抑制剂、醋氨酚或其组合不减轻或预防该受试者的疼痛,和/或ii) 确定该受试者不耐受NSAID、强阿片类、弱阿片类、COX-2抑制剂、醋氨酚或其组合。

17. 如权利要求16所述的方法,其中施用该NSAID、强阿片类、弱阿片类、COX-2抑制剂、醋氨酚或其组合至少2周。

18. 如权利要求16所述的方法,其中在施用该结合分子之前,向该受试者施用该NSAID、强阿片类、弱阿片类、COX-2抑制剂、醋氨酚或其组合至少2周。

19. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该受试者不耐受NSAID、强阿片类、弱阿片类、COX-2抑制剂、醋氨酚或其组合。

20. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该方法包括在施用该固定剂量的结合分子之前,测试该受试者的SARS-CoV2感染。

21. 如权利要求20所述的方法,其中测试该受试者的SARS-CoV2感染包括在施用该固定剂量的结合分子之前,测试该受试者的SARS-CoV2基因材料。

22. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中在基线时, 该受试者没有感染SARS-CoV2。

23. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中在基线时, 如使用WOMAC指数的疼痛分量表所测量的, 该受试者在一个关节中具有至少为5的平均西安大略大学和麦克马斯特大学骨关节炎(WOMAC)疼痛得分。

24. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中在基线时, 如在疼痛数值评定量表(NRS)上所测量的, 该受试者在一个关节中具有至少为5的平均疼痛强度得分。

25. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该方法相对于基线降低了该受试者的每日NRS疼痛得分的周平均值。

26. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中每2周一次施用该固定剂量, 持续施用12周, 并且其中该方法相对于基线在至少第12周降低了该受试者的每日NRS疼痛得分的周平均值。

27. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该方法使该受试者的每日NRS疼痛得分的周平均值相对于基线降低了至少30%。

28. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该方法使该受试者的每日NRS疼痛得分的周平均值相对于基线降低了至少50%。

29. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该方法相对于基线降低了该受试者的WOMAC疼痛分量表得分。

30. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中每2周一次施用该固定剂量, 持续施用12周, 并且其中该方法相对于基线在至少第12周降低了该受试者的WOMAC疼痛分量表得分。

31. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该方法使受试者的WOMAC疼痛分量表得分相对于基线降低了至少30%。

32. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该方法使受试者的WOMAC疼痛分量表得分相对于基线降低了至少50%。

33. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该方法使受试者的WOMAC生理分量表得分相对于基线降低了至少30%。

34. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该方法使受试者的WOMAC生理分量表得分相对于基线降低了至少50%。

35. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该方法相对于基线改善了骨关节炎的患者整体评估(PGA)。

36. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中每2周一次施用该固定剂量, 持续施用12周, 并且其中方法相对于基线在至少第12周改善了骨关节炎的PGA。

37. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该方法使骨关节炎的PGA改善了至少2个得分。

38. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中在受试者中单剂量施用该结合分子之后, 观察到了疼痛减轻。

39. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该方法包括向该受试者施用NSAID。

40. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该方法包括向该受试者施用阿片类。

41. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该方法包括向该受试者施用醋氨酚。

42. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该方法包括向该受试者施用COX-2抑制剂。

43. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该抗NGF抗体或其片段可抑制NGF与TrkA、p75NRT、或TrkA和p75NRT二者的结合。

44. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中相比阻断NGF与p75NRT的结合,该抗NGF抗体或其片段优先阻断NGF与TrkA的结合。

45. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该抗NGF抗体或其片段以约0.25-0.44nM的亲合力结合人NGF。

46. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该抗NGF抗体或其片段包含含有一组CDR HCDR1、CDR HCDR2、CDR HCDR3的抗体VH结构域和含有一组CDR LCDR1、CDR LCDR2和CDR LCDR3的抗体VL结构域,其中该HCDR1具有SEQ ID NO:4或具有多达两个氨基酸取代的SEQ ID NO:4的氨基酸序列,该HCDR2具有SEQ ID NO:5或具有多达两个氨基酸取代的SEQ ID NO:5的氨基酸序列,该HCDR3具有SEQ ID NO:6或具有多达两个氨基酸取代的SEQ ID NO:6的氨基酸序列、SSRIYDFNSALISYYDMDV (SEQ ID NO:11) 或SSRIYDMISLQPYDMDV (SEQ ID NO:12),该LCDR1具有SEQ ID NO:8或具有多达两个氨基酸取代的SEQ ID NO:8的氨基酸序列,该LCDR2具有SEQ ID NO:9或具有多达两个氨基酸取代的SEQ ID NO:9的氨基酸序列,并且该LCDR3具有SEQ ID NO:10或具有多达两个氨基酸取代的SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

47. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该抗NGF抗体或其片段包含含有一组CDR HCDR1、CDR HCDR2、CDR HCDR3的抗体VH结构域和含有一组CDR LCDR1、CDR LCDR2和CDR LCDR3的抗体VL结构域,

其中该HCDR1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,

该HCDR2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,

该HCDR3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列、SSRIYDFNSALISYYDMDV (SEQ ID NO:11) 或SSRIYDMISLQPYDMDV (SEQ ID NO:12),

该LCDR1包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,

该LCDR2包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;并且

该LCDR3包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

48. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该抗NGF抗体或其片段包含具有与SEQ ID NO:3或94的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%相同的氨基酸序列的VH。

49. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该抗NGF抗体或其片段包含具有与SEQ ID NO:7或95的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%相同的氨基酸序列的VL。

50. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该抗NGF抗体或其片段是全H₂L₂抗体、Fab片段、Fab' 片段、F(ab)₂片段或单链Fv(scFv)片段。

51. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该抗NGF抗体或其片段是人源化的、嵌合的、灵长类动物化的或全人的。

52. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该抗NGF scFv片段从N-末端到C-末端包含含有与SEQ ID NO:3的氨基酸至少80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%相同的氨

氨基酸序列的VH,15个氨基酸的接头序列(GGGGS)₃(SEQ ID NO:15),和含有与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%相同的氨基酸序列的VL。

53.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该抗NGF scFv片段从N-末端到C-末端包含含有与SEQ ID NO:94的氨基酸至少80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%相同的氨基酸序列的VH,20个氨基酸的接头序列(GGGGS)₄(SEQ ID NO:19),和含有与SEQ ID NO:95的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%相同的氨基酸序列的VL。

54.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该TNFR是TNFR-2。

55.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该TNFR-2片段融合至免疫球蛋白Fc结构域。

56.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该免疫球蛋白Fc结构域是人IgG1 Fc结构域。

57.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该TNF α 拮抗剂包含与SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%相同的氨基酸序列,或其功能片段。

58.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该结合分子包含融合蛋白,该融合蛋白包含通过接头与TNF α 拮抗剂融合的NGF拮抗剂。

59.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该结合分子包含该融合蛋白的同源二聚体。

60.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该结合分子包含融合多肽的同源二聚体,该同源二聚体从N-末端到C-末端包含TNFR-2的TNF α 结合片段,其包含与对应于SEQ ID NO:13的氨基酸1-235的序列至少80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%相同的氨基酸序列;人IgG1Fc结构域;10个氨基酸的接头序列(GGGGS)₂(SEQ ID NO:98);包含与SEQ ID NO 3或94的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%相同的氨基酸序列的VH;15个氨基酸的接头序列(GGGGS)₃(SEQ ID NO:15);和包含与SEQ ID NO:7或95的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%相同的氨基酸序列的VL。

61.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该结合分子包含融合多肽的同源二聚体,该同源二聚体包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%相同的氨基酸序列。

62.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该结合分子包含融合多肽的同源二聚体,该同源二聚体从N-末端到C-末端包含TNFR-2的TNF α 结合75kD片段,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;10个氨基酸的接头序列(GGGGS)₂(SEQ ID NO:98);包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的VH;20个氨基酸的接头序列(GGGGS)₄(SEQ ID NO:19);和包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的VL。

63.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中在与SEQ ID NO:7的位置102、103或104相对应的氨基酸位置处的甘氨酸残基被修饰为半胱氨酸残基,并且其中在与SEQ ID NO:3的位置44相对应的氨基酸位置处的甘氨酸残基被修饰为半胱氨酸残基。

64.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该结合分子包含融合多肽的同源二聚体,该同源二聚体包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

65.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该结合分子包含融合多肽的同源二聚

体,该同源二聚体包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%或99%相同的氨基酸序列。

66.一种结合分子,该结合分子用于在减轻或预防有需要的受试者的疼痛的方法中使用,该方法包括向该受试者施用皮下固定剂量的结合分子,其中该结合分子包含NGF拮抗剂结构域和TNF α 拮抗剂结构域,其中该NGF拮抗剂结构域是抗NGF抗体或其抗原结合片段,其中该TNF α 拮抗剂结构域包含TNFR的可溶性TNF α 结合片段,并且其中该方法减轻或预防该受试者的疼痛。

67.一种结合分子,该结合分子用于在如权利要求1-65中任一项所述的方法中使用。

用于治疗疼痛的化合物和方法

背景技术

[0001] 疼痛是寻求医疗帮助的最常见症状之一,并且是所有去看医师的患者中一半患者的主诉。尽管已有许多疼痛药物存在并被广泛使用,但是疼痛尤其是慢性疼痛的消除一直没有取得成功。因此,社会负担仍然很高。各种研究估计,疼痛导致每年损失5000万个工作日和损失612亿美元的生产力。对于慢性疼痛患者,只有约一半的人能够通过现有的处方治疗选择来控制疼痛。此外,处方疼痛药物市场总额每年大约为250亿美元。

[0002] 疼痛是骨关节炎的主要症状,而骨关节炎是老年人残疾的主要原因和社会成本的来源。随着人口的老龄化和日益肥胖,这种综合征比过去几十年变得更加普遍(Hunter和Bierma-Zeinstral Lancet [柳叶刀], 393:1745-59(2019))。目前骨关节炎疼痛的治疗包括口服低剂量NSAID。然而,由于NSAID与心血管事件导致的死亡率增加有关,NSAID的使用优选地仅限于短期使用(Kolasinski等人,Arthritis Care&Research[关节炎护理与研究], 72(2) 149-162(2020))。正如这些数据所表明的那样,对安全且有效的新型镇痛药仍然有很大的需求。

[0003] 降低分泌的神经生长因子(NGF或 β -NGF)的组织水平或抑制分泌的神经生长因子(NGF或 β -NGF)的的作用的治疗剂正有可能成为此类新型镇痛药。NGF在神经系统的发育中起着众所周知的关键作用;然而,NGF也是一个经充分验证的疼痛靶点,因为它会导致动物和人的疼痛。在成年人中,NGF尤其促进一部分中枢和外周神经元的健康和存活(Huang和Reichardt,Ann.Rev.Neurosci.[神经科学年评]24:677-736(2001))。NGF还有助于调节这些神经元的功能特征,并对称为伤害感受器的疼痛感觉受体的敏感性或兴奋性进行强直控制(Priestley等人,Can.J.Physiol.Pharmacol.[加拿大生理药理学杂志]80:495-505(2002);Bennett,Neuroscientist[神经科学家]7:13-17(2001))。伤害感受器感知各种引起疼痛感知(伤害感受)的有害刺激并将其传输到中枢神经系统。NGF受体位于伤害感受器上。在受伤和发炎的组织中NGF的表达增加,并且在处于人的疼痛状态时,NGF的表达上调。因此,由于NGF在伤害感受中的作用,降低NGF水平的NGF结合剂具有作为镇痛治疗剂的效用。

[0004] 肿瘤坏死因子- α (TNF α),也称为恶病质素,是一种多效性细胞因子,具有广泛的生物活性,包括细胞毒性、免疫细胞增殖、炎症、肿瘤发生和病毒复制。Kim等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]374,1374(2007)。TNF α 首先作为跨膜蛋白(tm TNF α)产生,然后被金属蛋白酶切割成可溶性形式(sTNF α)。Wallis,Lancet Infect.Dis.[柳叶刀传染病]8(10):601(2008)。TNF α (约17kDa)作为刚性同源三聚体分子存在,与细胞表面TNF受体1或TNF受体2结合,诱导了受体寡聚化和信号转导。已知炎症细胞因子(和特别是TNF α)在痛觉过敏的产生中起作用。Leung,L.和Cahill,CM.,J.Neuroinflammation[神经炎症杂志]7:27(2010)。一些初步数据示出,TNF α 抑制剂可能有助于控制神经性疼痛。参见例如,Sommer C等人,J.Peripher.Nerv.Syst.[周围神经系统杂志]6:67-72(2001),Cohen等人,A&A[A&A杂志]2013年2月,116,2,455-462,Genevay等人,Ann Rheum Dis[风湿病年鉴]2004,63,1120-1123。测试TNF α 抑制剂作为治疗神经性疼痛的单一疗法的临床研究结果仍无定论。参见

Leung和Cahill(2010)。

[0005] 先前披露的包含抗NGF抗原结合片段和可溶性TNFR-2部分的结合分子被示出是NGF和TNF α 的有效抑制剂。此外,这种结合分子在疼痛的动物模型中显示出了在减轻疼痛症状方面具有治疗效果。参见例如,美国专利号9,884,911,将其通过引用以其全文并入。鉴于这些结合分子的明确的治疗效用,需要用于结合分子的改善的剂量方案用于治疗例如减轻或预防有需要的受试者的疼痛(例如,骨关节炎疼痛)。

发明内容

[0006] 本披露提供了用于治疗受试者的疼痛(例如用于减轻或预防疼痛)的新型方法和剂量方案,这些方法和剂量方案包括向该受试者施用皮下固定剂量的结合分子,其中该结合分子包含NGF拮抗剂部分和TNF α 拮抗剂部分。在一些实施例中,该施用比单独施用当量的NGF拮抗剂或TNF α 拮抗剂更有效地控制受试者的疼痛。

[0007] 在一些实施例中,本披露提供用于减轻或预防有需要的受试者的疼痛的方法,该方法包括向该受试者施用皮下固定剂量的结合分子,其中该结合分子包含NGF拮抗剂结构域和TNF α 拮抗剂结构域,其中该NGF拮抗剂结构域是抗NGF抗体或其抗原结合片段,其中该TNF α 拮抗剂结构域包含TNFR的可溶性TNF α 结合片段,并且其中该方法减轻或预防受试者的疼痛。在一些实施例中,该结合分子的皮下固定剂量是5-200mg。在一些实施例中,该结合分子的皮下固定剂量是7.5-150mg。在一些实施例中,该结合分子的皮下固定剂量是7.5mg、25mg、75mg或150mg。在一些实施例中,该皮下固定剂量相当于30mg该结合分子的静脉内固定剂量。在一些实施例中,至少每两周一次施用该固定剂量。在一些实施例中,将该固定剂量施用至少12周。在一些实施例中,该疼痛包含慢性疼痛。在一些实施例中,该疼痛包含骨关节炎疼痛。在一些实施例中,该疼痛包含膝关节的骨关节炎疼痛。

[0008] 在一些实施例中,在施用该结合分子之前,该受试者已经患有疼痛3个月或更长的时间。在一些实施例中,该疼痛与关节炎症相关。在一些实施例中,该受试者患有骨关节炎。在一些实施例中,该受试者患有单侧膝关节的骨关节炎。在一些实施例中,根据中心读取器的评估,该受试者在0至4级的Kellgren-Lawrence (KL) 分级量表中具有2级膝关节骨关节炎。

[0009] 在一些实施例中,在向该受试者施用该结合分子之前,该方法包括:a.向该受试者施用NSAID、强阿片类、弱阿片类、COX-2抑制剂、醋氨酚或其组合,和b.确定i) NSAID、强阿片类、弱阿片类、COX-2抑制剂、醋氨酚或其组合不减轻或预防受试者的疼痛,和/或ii) 确定该受试者不耐受NSAID、强阿片类、弱阿片类、COX-2抑制剂、醋氨酚或其组合。在一些实施例中,施用NSAID、强阿片类、弱阿片类、COX-2抑制剂、醋氨酚或其组合至少2周。在一些实施例中,在施用该结合分子之前,向该受试者施用NSAID、强阿片类、弱阿片类、COX-2抑制剂、醋氨酚或其组合至少2周。在一些实施例中,该受试者不耐受NSAID、强阿片类、弱阿片类、COX-2抑制剂、醋氨酚(对乙酰氨基酚)或其组合。

[0010] 在一些实施例中,该方法包括在施用固定剂量的结合分子之前,测试受试者的SARS-CoV2感染。在一些实施例中,测试受试者的SARS-CoV2感染包括在施用固定剂量的结合分子之前,测试受试者的SARS-CoV2基因材料。在一些实施例中,在基线时,该受试者没有感染SARS-CoV2。

[0011] 在一些实施例中,在基线时,如在疼痛数值评定量表(NRS)上所测量的,该受试者在一个关节中具有至少为5的平均疼痛强度得分。在一些实施例中,该方法相对于基线降低了受试者的每日NRS疼痛得分的周平均值。在一些实施例中,每2周一次施用该固定剂量,持续施用12周,并且其中该方法相对于基线在至少第12周降低了受试者的每日NRS疼痛得分的周平均值。在一些实施例中,该方法使受试者的每日NRS疼痛得分的周平均值相对于基线降低了至少30%。在一些实施例中,该方法使受试者的每日NRS疼痛得分的周平均值相对于基线降低了至少50%。

[0012] 在一些实施例中,在基线时,如使用WOMAC指数的疼痛分量表所测量的,该受试者在一个关节中具有至少为5的平均西安大略大学和麦克马斯特大学骨关节炎(WOMAC)疼痛得分。在一些实施例中,该方法相对于基线降低了受试者的WOMAC疼痛分量表得分。在一些实施例中,每2周一次施用该固定剂量,持续施用12周,并且该方法相对于基线在至少第12周降低了受试者的每日WOMAC疼痛得分的周平均值。在一些实施例中,该方法使受试者的WOMAC疼痛分量表得分相对于基线降低了至少30%。在一些实施例中,该方法使受试者的WOMAC疼痛分量表得分相对于基线降低了至少50%。在一些实施例中,该方法使受试者的WOMAC生理分量表得分相对于基线降低了至少30%。在一些实施例中,该方法使受试者的WOMAC生理分量表得分相对于基线降低了至少50%。

[0013] 在一些实施例中,该方法相对于基线改善了骨关节炎的患者整体评估(PGA)。在一些实施例中,每2周一次施用该固定剂量,持续施用12周,并且其中方法相对于基线在至少第12周降低了骨关节炎的PGA。在一些实施例中,该方法使骨关节炎的PGA改善了至少2个得分。

[0014] 在一些实施例中,在受试者中单剂量施用该结合分子之后,观察到了疼痛减轻。在一些实施例中,该方法包括向该受试者施用NSAID。在一些实施例中,该方法包括向该受试者施用阿片类。在一些实施例中,该方法包括向该受试者施用对乙酰氨基酚。在一些实施例中,该方法包括向该受试者施用COX-2抑制剂。

[0015] 在一些实施例中,该抗NGF抗体或其片段可抑制NGF与TrkA、p75NRT、或TrkA和P75NRT二者的结合。在一些实施例中,该抗NGF抗体或其片段,相比阻断NGF与p75NRT的结合,优先阻断NGF与TrkA的结合。在一些实施例中,该抗NGF抗体或其片段以约0.25-0.44nM的亲合力结合人NGF。在一些实施例中,该抗NGF抗体或其片段包含含有一组CDR HCDR1、CDR HCDR2、CDR HCDR3的抗体VH结构域和含有一组CDR LCDR1、CDR LCDR2和CDR LCDR3的抗体VL结构域,其中该HCDR1具有SEQ ID NO:4或具有多达两个氨基酸取代的SEQ ID NO:4的氨基酸序列,该HCDR2具有SEQ ID NO:5或具有多达两个氨基酸取代的SEQ ID NO:5的氨基酸序列,该HCDR3具有SEQ ID NO:6或具有有多达两个氨基酸取代的SEQ ID NO:6的氨基酸序列、SSRIYDFNSALISYYDMDV(SEQ ID NO:11)或SSRIYDMISLQPYDMDV(SEQ ID NO:12),该LCDR1具有SEQ ID NO:8或具有有多达两个氨基酸取代的SEQ ID NO:8的氨基酸序列,该LCDR2具有SEQ ID NO:9或具有有多达两个氨基酸取代的SEQ ID NO:9的氨基酸序列,并且该LCDR3具有SEQ ID NO:10或具有有多达两个氨基酸取代的SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一些实施例中,该抗NGF抗体或其片段包含含有一组CDR HCDR1、CDR HCDR2、CDR HCDR3的抗体VH结构域和含有一组CDR LCDR1、CDR LCDR2和CDR LCDR3的抗体VL结构域,其中该HCDR1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,该HCDR2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,该HCDR3包含SEQ ID NO:6

的氨基酸序列、SSRIYDFNSALISYYDMDV (SEQ ID NO:11) 或SSRIYDMISLQPYDMDV (SEQ ID NO:12), 该LCDR1包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列, 该LCDR2包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列; 并且该LCDR3包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一些实施例中, 该抗NGF抗体或其片段包含具有与SEQ ID NO:3或94的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%相同的氨基酸序列的VH。在一些实施例中, 该抗NGF抗体或其片段包含具有与SEQ ID NO:7或95的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%相同的氨基酸序列的VL。在一些实施例中, 该抗NGF抗体或其片段是全H₂L₂抗体、Fab片段、Fab' 片段、F(ab)₂片段或单链Fv(scFv)片段。在一些实施例中, 该抗NGF抗体或其片段是人源化的、嵌合的、灵长类动物化的或全人的。在一些实施例中, 该抗NGF scFv片段从N-末端到C-末端包含含有与SEQ ID NO:3的氨基酸至少80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%相同的氨基酸序列的VH, 15个氨基酸的接头序列(GGGGS)₃ (SEQ ID NO:15), 和含有与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%相同的氨基酸序列的VL。在一些实施例中, 该抗NGF scFv片段从N-末端到C-末端包含含有与SEQ ID NO:94的氨基酸至少80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%相同的氨基酸序列的VH, 20个氨基酸的接头序列(GGGGS)₄ (SEQ ID NO:19), 和含有与SEQ ID NO:95的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%相同的氨基酸序列的VL。

[0016] 在一些实施例中, 该TNFR是TNFR-2。在一些实施例中, 该TNFR-2片段融合至免疫球蛋白Fc结构域。在一些实施例中, 该免疫球蛋白Fc结构域是人IgG1Fc结构域。在一些实施例中, 该TNF α 拮抗剂结构域包含与SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%相同的氨基酸序列, 或其功能片段。

[0017] 在一些实施例中, 该结合分子包含融合蛋白, 该融合蛋白包含通过接头与TNF α 拮抗剂融合的NGF拮抗剂。在一些实施例中, 该结合分子包含该融合蛋白的同源二聚体。在一些实施例中, 该结合分子包含融合多肽的同源二聚体, 该同源二聚体从N-末端到C-末端包含TNFR-2的TNF α 结合片段, 其包含与对应于SEQ ID NO:13的氨基酸1-235的序列至少80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%相同的氨基酸序列; 人IgG1Fc结构域; 10个氨基酸的接头序列(GGGGS)₂ (SEQ ID NO:98); 包含与SEQ ID NO 3或94的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%相同的氨基酸序列的VH; 15个氨基酸的接头序列(GGGGS)₃ (SEQ ID NO:15); 和包含与SEQ ID NO:7或95的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%相同的氨基酸序列的VL。在一些实施例中, 该结合分子包含融合多肽的同源二聚体, 该同源二聚体包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施例中, 该结合分子包含融合多肽的同源二聚体, 该同源二聚体从N-末端到C-末端包含TNFR-2的TNF α 结合75kD片段, 其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列; 10个氨基酸的接头序列(GGGGS)₂ (SEQ ID NO:98); 包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的VH; 20个氨基酸的接头序列(GGGGS)₄ (SEQ ID NO:19); 和包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的VL。在一些实施例中, 在与SEQ ID NO:7的位置102、103或104相对应的氨基酸位置处的甘氨酸残基被修饰为半胱氨酸残基, 并且其中在与SEQ ID NO:3的位置44相对应的氨基酸位置处的甘氨酸残基被修饰为半胱氨酸残基。在一些实施例中, 该结合分子包含融合多肽的同源二聚体, 该同源二聚体包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施例中, 该结合分子包含融合多肽的同源二聚体, 该同源二聚体包含与SEQ ID NO:17的氨基

酸序列至少80%、85%、90%、95%或99%相同的氨基酸序列。

[0018] 本披露提供了用于在减轻或预防有需要的受试者的疼痛的方法中使用的结合分子,该方法包括向该受试者施用皮下固定剂量的结合分子,其中该结合分子包含NGF拮抗剂结构域和TNF α 拮抗剂结构域,其中该NGF拮抗剂结构域是抗NGF抗体或其抗原结合片段,其中该TNF α 拮抗剂结构域包含TNFR的可溶性TNF α 结合片段,并且其中该方法减轻或预防受试者的疼痛。

附图说明

[0019] 图1:TNFR2-Fc融合蛋白(小图A)、和包含与抗NGF scFv结构域融合的TNFR2-Fc结构域的示例性多特异性结合分子TNFR2-Fc_VH#4(小图B)的示意图。

[0020] 图2A示出了在一批纯化的TNFR2-Fc_VH#4中的聚集体、单体和蛋白质片段化水平的SEC-HPLC分析结果。

[0021] 图2B示出了在还原和非还原条件下纯化的TNFR2-Fc_VH#4和纯化的TNFR2-Fc蛋白的SDS-PAGE分析。凝胶加载顺序:1. TNFR2-Fc_VH#4, 2. TNFR2-Fc_VL-VH(TNFR2-Fc以相反的可变结构域基因取向融合至抗NGF scFv), 3. TNFR2-Fc不相关scFv 1, 4. TNFR2-Fc, 5. TNFR2-Fc不相关scFv 2。

[0022] 图3A示出蛋白A柱纯化后TNFR2-Fc_VH#4的纯度。图3B示出了在SP琼脂糖凝胶柱上进行第二次纯化步骤后TNFR2-Fc_VH#4的纯度。

[0023] 图4示出了使用差示扫描量热法对TNFR2-Fc_VH#4进行的稳定性分析。

[0024] 图5示出了TNFR2-Fc_VH#4与TNF α 和NGF(单独地或一起)结合,如通过ELISA所确定的。图5A示出了与NGF的结合,图5B示出了与TNF α 的结合,并且图5C示出了与TNF α 和NGF的同时结合。

[0025] 图6示出了TNFR2-Fc_VH#4的表面等离子体共振结合测定的传感图。使用BIAcore 2000进行了TNFR2-Fc_VH#4多特异性抗体的并行抗原结合。通过在结合到传感器表面的TNFR2-Fc_VH#4上连续结合TNF α 和NGF来评估同时抗原结合。传感图的第一部分示出了饱和量的TNF α 与多特异性抗体的结合,传感图的第二部分示出了当应用第二抗原时的结合,该第二抗原要么是示出表面已饱和的TNF α ,要么是TNF α 和NGF的等摩尔混合物。共振单位的增加等同于NGF与多特异性分子的结合,并且因此意味着同时抗原参与。还以相反的顺序添加抗原进行了测定,从而证实了这些数据。

[0026] 图7示出了对NGF介导的TF-1细胞增殖的抑制。A.在不添加NGF拮抗剂的情况下NGF介导的增殖。B. TNFR2-Fc_VH#4对人NGF应答的抑制。C. TNFR2-Fc_VH#4对鼠NGF应答的抑制。NGF活性通常表示为RLU-相对荧光单位,并且使用以下公式,将NGF介导的增殖%计算为对单独的NGF配体的应答%: $100 \times (\text{孔RLU} - \text{背景RLU}) / (\text{总RLU} - \text{背景RLU})$,其中背景RLU=培养基对照的平均值,并且总RLU=仅有配体的对照的平均值。D. TNFR2-Fc_VarB和Indimab VarB对人NGF应答的抑制。E. TNFR2-Fc_VarB和Indimab VarB对鼠NGF应答的抑制。

[0027] 图8示出了对U937细胞中TNF α 诱导的半胱天冬酶3活性的抑制。A.在不添加TNF α 拮抗剂的情况下,在U937细胞中TNF α 诱导的半胱天冬酶3活性。B. U937细胞中TNF α 诱导的半胱天冬酶3活性的抑制,示出为在不添加拮抗剂的情况下的应答百分比。TNF活性通常表示为RFU-相对荧光单位,并且使用图7C中的上述公式将TNF介导的半胱天冬酶3释放%计算为对

单独的TNF配体的应答%。C.相关分子TNFR2-Fc_varB和Indimab VarB示出了类似的结果。

[0028] 图9示出了依那西普和MEDI-578组合治疗对部分坐骨神经结扎诱导的机械性痛觉过敏的作用。结果示出为同侧/对侧比率。 $N=9-10$ 只/组。使用双向ANOVA分析来分析数据,其中时间和治疗作为依赖性因素。采用邦弗伦尼事后检验法 (Bonferroni's Post Hoc test) 获得后续的统计学显著性。与0p+CAT-251对照相比,*** $p<0.001$ 。

[0029] 图10A示出了TNFR2-Fc_VH#4对部分坐骨神经结扎诱导的机械性痛觉过敏的作用。结果示出为同侧/对侧比率。 $N=10$ 只/组。使用双向ANOVA分析来分析数据,其中时间和治疗作为依赖性因素。采用邦弗伦尼事后检验法 (Bonferroni's Post Hoc test) 获得后续的统计学显著性。相比于双特异性同种型对照,*** $p<0.001$ 。图10B示出了相关分子TNFR2-Fc_varB的类似结果。

[0030] 图11示出了MEDI-578和依那西普的共同施用对机械性超敏反应的关节疼痛模型中的疼痛减轻的作用。 $N=9-10$ 只/组。使用双向ANOVA分析来分析数据。采用邦弗伦尼事后检验法 (Bonferroni's Post Hoc test) 获得后续的统计学显著性。 $*P>0.05$;相比于CAT-251,*** $P<0.001$ 。

[0031] 图12示出了TNFR2-Fc_VH#4对机械性超敏反应的关节疼痛模型中的疼痛减轻的作用。 $N=9-10$ 只/组。使用双向ANOVA分析来分析数据。采用邦弗伦尼事后检验法 (Bonferroni's Post Hoc test) 获得后续的统计学显著性。相比于双特异性同种型对照,*** $P<0.001$ 。

[0032] 图13示出五种不同剂量的TNFR2-Fc_varB对大鼠模型中CFA诱导的痛觉过敏的作用。

[0033] 图14:示出了来自磷酸化-p38反应的HTRF比率的热图。

[0034] 图15:示出了TNF α 、NGF或TNF α 和NGF的组合对p38磷酸化的作用的剂量应答曲线。

[0035] 图16:示出了来自磷酸化-ERK反应的HTRF比率的热图。

[0036] 图17:示出了TNF α 、NGF或TNF α 和NGF的组合对ERK磷酸化的作用的剂量应答曲线。

[0037] 图18A示出了单次递增剂量 (SAD) 和多次递增剂量 (MAD) 交错研究的简化图解。图18B以表格形式示出了每个队列的研究设计。“RoA”是施用途径,“IV”是静脉内,“SC”是皮下。还提供了预测的平均NGF抑制百分比。

[0038] 图19A示出了一个图,在该图中将TNFR2-Fc_varB的单次静脉内剂量对平均每日疼痛得分的作用相对于时间 (给药后天数) 进行作图。上方的水平红线是所有受试者给药前的平均每日疼痛得分。下方的水平红线是所有接受安慰剂的受试者的平均每日疼痛得分。图19B是一个表格,该表格说明在所列剂量下预测的平均NGF抑制百分比和相对于安慰剂 (PBO) 的峰值NRS变化。

[0039] 图20A是施用TNFR2-Fc_varB后基线调整的平均疼痛WOMAC的图。受试者回答五个特异性针对疼痛的问题 (行走时、爬楼梯时、夜间、静息时和负重时)。在5分量表 (0-4) 上,对每个问题给出一个得分,0代表“没有”而4代表“非常”。得分越高,进行该活动所经历的疼痛越严重 (或感知到的功能缺陷越大)。回答所有五个疼痛问题的受试者可以有20的最高得分,将该得分按比例缩小至10,以便能与疼痛NRS得分相比较。临床要求受试者在基线时 (给药前1天) 和第8、15、22、29天 (第43和56天仅针对250和1000 $\mu\text{g/kg}$ 的队列) 完成问卷。图20B是一个表格,该表格提供了SAD研究中安慰剂相比于不同的TNFR2-Fc_varB剂量的WOMAC得

分的比较的p值。

[0040] 图21是一个表格,该表格示出了三个统计学显著的单剂量TNFR2-Fc_varB、在给药后2周内测得的峰值和平均值的%NGF抑制,而括号中是预测的NGF抑制水平。对于这三种剂量中的每一种,还呈现了与安慰剂相比的峰值WOMAC疼痛分量表变化。请注意,峰值作用对应于分别在50和250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的剂量下测量的游离NGF的46%-55%的抑制。

[0041] 图22示出了由于施用单剂量的TNFR2-Fc_varB而导致的血浆游离NGF的抑制。简要地说,在以下时间点从每个受试者采集血样:在给药前,给药后1、8和24小时,第8、15、22、29天(第43天和第56天仅针对两个最高剂量)。使用Singulex公司的Erenna技术制备和测定血浆样品。计算了游离NGF的抑制并且对在每个浓度下给药后14天的时间内的平均抑制进行了计算。在14天内的游离NGF的平均抑制的范围为0(0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)至约65%(1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。

[0042] 图23是一系列图,这些图绘制了SAD队列1-4(0.3-50 $\mu\text{g}/\text{kg}$)中每个受试者的NGF水平的增加。

[0043] 图24是一个图,该图绘制了每个队列的CXCL-13水平从基线相对于时间的百分比平均变化。

[0044] 图25示出了TNFR2-Fc_varB(表示为MEDI7352)在范围为0.3至1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的单次静脉内剂量和50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的单次皮下剂量下的几何平均血清药代动力学曲线。图25按对数标度展示数据。对于多达50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的剂量,收集样品直至给药后第29天。对于250和1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的剂量,采样延长至给药后第43天和第56天。250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的数据在第29天后未示出,因为队列中所有受试者的值低于第43天和第56天的定量下限。对于1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$,在第43天,仅3名受试者的值高于定量下限,而在第56天,1名受试者的值高于定量下限。LL0Q=定量下限。

[0045] 图26示出了TNFR2-Fc_varB(表示为MEDI7352)在范围为1至450 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的重复静脉内剂量下的几何平均血清药代动力学曲线。图26A按线性标度呈现数据。图26B按对数标度展示数据。1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的数据在给药后第57天后未示出,因为队列中所有受试者的值低于第64天、第71天和第84天的定量下限。在第84天没有示出50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的数据,因为所有受试者具有的浓度都低于定量下限。对于450 $\mu\text{g}/\text{kg}$,在第57天之后没有可用的浓度数据。

[0046] 图27示出了在给药后第43天观察到的TNFR2-Fc_varB的最大血清浓度(C_{max} ;上图)以及在范围为1至450 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的TNFR2-Fc_varB的重复静脉内剂量后WOMAC疼痛得分相对于基线的相关变化(下图)。

[0047] 图28示出了重复剂量的TNFR2-Fc_varB之后的疼痛水平。图28A示出了在接受安慰剂、150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 或450 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TNFR2-Fc_varB的患者中从第0天至第84天的NRS疼痛相对于基线的变化。图28B对重复剂量的TNFR2-Fc_varB与2.5mg他尼珠单抗(tanezumab)、5mg他尼珠单抗、40mg羟考酮或安慰剂的作用进行了比较。图28C示出了由不同剂量的法希奴单抗(fasimumab)、福拉奴单抗、TNFR2-Fc_varB(表示为MEDI7352)和他尼珠单抗诱导的WOMAC疼痛分量表相对于基线的变化确定的疼痛减轻。

[0048] 图29示出了ADA滴度对TNFR2-Fc_varB(表示为MEDI7352)浓度和疼痛缓解的作用,该作用由WOMAC疼痛分量表(上图)或NRS疼痛分量表(下图)的变化确定。

[0049] 图30示出了TNFR2-Fc_varB在范围为0.3至1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的单次静脉内剂量和范围为1至450 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的重复静脉内剂量下的几何平均血清药代动力学曲线,并按ADA滴度水平进行了分类。

[0050] 图31是在4次(每周两次)剂量后TNFR2-Fc_varB清除率相比于体重的散点图。图例说明了MAD队列编号和TNFR2-Fc_varB剂量。从非隔室分析获得了清除率数据。该图示出了具有95%置信界限(虚线)的线性回归分析(实线)。p值为0.61说明清除率和重量之间没有显著的关联。

[0051] 图32示出了皮下固定剂量研究的简化图解。

具体实施方式

[0052] 定义

[0053] 应当注意,术语“一个/种(a或an)”实体是指一个/种或多个/种所述实体。因此,术语“一个/种(a或an)”、“一个/种或多个/种”和“至少一个/种”在本文中可互换地使用。

[0054] 此外,在本文中使用“和/或”应当理解为在有或没有另一者的情况下,两个指定的特征或组分中的每一者的特定披露。因此,如在本文中在诸如“A和/或B”的短语中使用的术语“和/或”旨在包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)、以及“B”(单独)。同样,如在诸如“A、B和/或C”的短语中使用的术语“和/或”旨在涵盖以下方面中的每一个:A、B、和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0055] 应当理解,无论在什么情况下在本文中用语言“包含”描述方面时,还提供了关于“由……组成”和/或“主要由……组成”描述的其他类似方面。

[0056] 术语“约”或“大约”意指在如由本领域普通技术人员所确定的特定值的可接受误差范围内,这将部分取决于如何测量或确定该值,即,测量系统的局限性。例如,根据本领域的实践,“约”可以意指在一个或大于一个标准偏差内。可替代地,“约”可以意指高于或低于给定值多达20%、多达15%、多达10%、多达5%或多达1%的范围。

[0057] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有如本披露所涉及领域的普通技术人员通常理解的相同含义。例如,Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology[简明生物医学和分子生物学词典],Juo,Pei-Show,第2版,2002,CRC Press[CRC出版社];Dictionary of Cell and Molecular Biology[细胞和分子生物学词典],第3版,1999,Academic Press[学术出版社];以及Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology[生物化学和分子生物学牛津词典],修订版,2000,Oxford University Press[牛津大学出版社]为技术人员提供在本披露中使用的术语中的许多术语的通用词典注释。

[0058] 单位、前缀和符号是以它们的国际单位系统(Système International de Unites)(SI)接受的形式表示。数值范围包括限定该范围的数字。除非另外说明,否则氨基酸序列是以氨基至羧基取向从左向右书写。本文所提供的小标题不是本披露的各个方面的限制,可以通过作为一个整体参考本说明书来获得这些方面。因此,通过以其全文参考说明书,更充分地定义了紧接着在下文中定义的术语。

[0059] 如本文所用,术语“结合分子”在其最广泛含义上是指特异性结合抗原决定簇(例如抗原)的分子。结合分子的非限制性实例包括抗体或其片段、可溶性受体融合蛋白或其片段、非免疫球蛋白骨架或其片段,其各自保留了抗原特异性结合。以下提供了示例性可溶性受体融合蛋白和抗体。在某些实施例中,可以将该结合分子工程化以包含此类抗体或其片段、可溶性受体融合蛋白或其片段以及非基于免疫球蛋白的骨架或其片段的组合。

[0060] 该结合分子或该结合分子的识别抗原的任何部分在本文中被称为“结合结构域”。除非确切地提及全尺寸的结合分子如天然存在的抗体,否则术语“结合分子”涵盖但不限于全尺寸的抗体或其他非抗体结合分子,以及这类结合分子的抗原结合片段、变体、类似物或衍生物,例如天然存在的抗体或免疫球蛋白分子或工程化的结合分子或以与全尺寸的结合分子类似的方式结合抗原的片段。

[0061] 在某些实施例中,本披露提供了某些多特异性结合分子(例如,双特异性结合分子、三特异性结合分子、四特异性结合分子等)或其抗原结合片段、变体或衍生物。如本文所用,多特异性结合分子可以包括一个或多个抗体结合结构域、一个或多个非抗体结合结构域或其组合。

[0062] 如本文所用,术语“神经生长因子”(“NGF”)(在文献中也称为 β -神经生长因子)是指在各种神经元的生长和存活中起作用的分泌蛋白。人NGF呈现为基因库登录号NP_002497.2,并且在此处呈现为SEQ ID NO:1。如本文所用,术语NGF不限于人NGF,并且包括人NGF的所有物种直系同源物。术语“NGF”涵盖NGF的前体形式(前体NGF)、全长NGF以及细胞内加工而产生的任何形式的NGF。该术语还涵盖天然存在的NGF的变体,例如,剪接变体、等位基因变体和同种型。NGF可结合两种受体:p75神经生长因子受体(p75(NTR))和TrkA(跨膜酪氨酸激酶)。NGF是一个经充分验证的疼痛靶点,它已知会介导伤害感受器的敏化。

[0063] NGF介导的疼痛尤其适合用如本文所示的结合分子进行安全和有效的治疗,因为外周中的NGF水平响应于有害刺激而增加并且抗体具有低血脑屏障渗透性。可以在本文所述的疗法和组合物中使用的许多抗NGF抗体及其抗原结合片段可见于文献中,参见例如,PCT公开号WO 02/096458和WO 04/032870。

[0064] 术语“MEDI-578”是指特异性结合NGF的抗体,其是国际申请号PCT/GB2006/000238和美国专利申请公开号2008/0107658A1的主题,这两篇文献通过引用以其全文并入本文。MEDI-578重链和轻链序列分别示出于SEQ ID NO:3和7中。

[0065] 术语NGF-NG是指特异性结合NGF的抗体。NGF-NG重链和轻链序列分别示出于SEQ ID NO:24和26中。

[0066] 如本文所用,术语“肿瘤坏死因子 α ”(“TNF α ”)(在文献中也称为恶病质素;APC1蛋白;肿瘤坏死因子;TNF;或肿瘤坏死因子配体超家族成员2)是指特定TNF α 蛋白并且不是TNF配体的超家族。人TNF α 呈现为基因库登录号NP_000585.2,并且呈现为SEQ ID NO:2。如本文所用,术语TNF α 不限于人TNF,并且包括人TNF α 的所有物种直系同源物。术语“TNF α ”涵盖TNF α 的前体形式(前体TNF α)、全长TNF α 以及细胞内加工而产生的任何形式的TNF α 。该术语还涵盖天然存在的和非天然存在的TNF α 的变体,例如,剪接变体、等位基因变体和同种型。TNF α 可结合两种受体,TNFR1(TNF受体1型;CD120a;p55/60)和TNFR2(TNF受体2型;CD120b;p75/80)。TNF α 作为促炎性细胞因子起作用,例如,在神经炎症中起作用。例如,TNF α 被认为在功能上参与神经性疼痛的产生(Leung,L.和Cahill,CM.,J.Neuroinflammation[神经炎症杂志]7:27(2010))。

[0067] “分离的”结合分子、多肽、抗体、多核苷酸、载体、宿主细胞或组合物是指处于非天然存在的形式的结合分子、多肽、抗体、多核苷酸、载体、宿主细胞或组合物。分离的结合分子、多肽、抗体、多核苷酸、载体、宿主细胞或组合物包括已经被改变、调整、组合、重排、工程化或以其他方式操纵至它们不再处于自然界中发现的形式的程度的那些。在一些方面中,

分离的结合分子、抗体、多核苷酸、载体、宿主细胞或组合物是“重组的”。

[0068] 如本文所用,术语“多功能多肽”和“双功能多肽”是指被设计以靶向两个或更多个抗原的非天然存在的结合分子。本文所述的示例性多功能多肽是包含抗NGF抗原结合片段或抗体部分和可溶性TNFR2部分的多功能结合分子。

[0069] 术语“抗体”意指通过免疫球蛋白分子的可变区中的至少一个抗原识别位点识别并特异性结合靶标(诸如蛋白质、多肽、肽、碳水化合物、多核苷酸、脂质或前述的组合)的免疫球蛋白分子。如本文所用,术语“抗体”涵盖完整多克隆抗体,完整单克隆抗体,抗体片段(如Fab、Fab'、F(ab')₂、以及Fv片段),单链Fv(scFv)突变体,产生自至少两个完整抗体的多特异性抗体(如双特异性抗体、三特异性抗体、四特异性抗体等),嵌合抗体,人源化抗体,人抗体,包含抗体的抗原决定部分的融合蛋白,以及包含抗原酶识别位点的任何其他修饰的免疫球蛋白分子,只要这些抗体展现出所希望的生物活性。抗体可以是以下五大类免疫球蛋白中的任一种:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,或其亚类(同种型)(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2),基于它们的重链恒定结构域的特性分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别的免疫球蛋白具有不同的和熟知的亚基结构和三维构型。

[0070] 在一些实施例中,“阻断性”结合分子,例如,阻断性抗体或“拮抗剂”结合分子(例如像拮抗剂抗体或融合蛋白)是抑制或降低与其结合的抗原(例如NGF或TNF α)的生物活性的“阻断性”结合分子。在某些方面中,阻断性抗体或拮抗剂结合分子基本上或完全地抑制抗原的生物活性。例如,生物活性可以降低0.01%、0.1%、0.5%、1%、5%、10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%、95%或甚至100%。

[0071] 如本文所用,“拮抗剂”和“拮抗剂结构域”包括结合其靶标(例如,TNF α 或NGF)从而阻断或抑制靶标与受体的相互作用的多肽或其他分子。因此,NGF和/或TNF α 拮抗剂包括阻断或抑制NGF与trkA或p75神经生长因子相互作用、或TNF α 与TNFR-1或TNFR-2相互作用的分子。NGF和/或TNF α 拮抗剂还包括降低p38磷酸化和/或ERK磷酸化的分子。示例性拮抗剂包括但不限于抗NGF抗体或其抗原结合片段,和靶标特异性、可溶性、非信号传导的TNF- α 受体肽(“诱饵受体”或其配体结合片段)。

[0072] 术语“抗体片段”是指完整抗体的一部分并且是指完整抗体的抗原决定可变区。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、以及Fv片段、线性抗体、单链抗体以及由抗体片段形成的多特异性抗体。本披露还提供了本文其他地方所述的非抗体结合分子的抗原结合片段。

[0073] “单克隆抗体”是指参与单一抗原决定簇或表位的高度特异性识别和结合的同源抗体群。这与典型地包括针对不同抗原决定簇的不同抗体的多克隆抗体相反。术语“单克隆抗体”涵盖完整和全长单克隆抗体以及抗体片段(如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(scFv)突变体、包含抗体部分的融合蛋白和包含抗原识别位点的任何其他修饰的免疫球蛋白分子。此外,“单克隆抗体”是指以任何数目的方式(包括但不限于通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达和转基因动物)制备的此类抗体。

[0074] 术语“人源化抗体”是指非人(例如鼠)抗体的形式,这些形式是含有最少的非人(例如,鼠)序列的特异性免疫球蛋白链、嵌合免疫球蛋白或其片段。典型地,人源化抗体是人免疫球蛋白,其中来自互补决定区(CDR)的残基被来自非人物种(例如,小鼠、大鼠、兔子或仓鼠)的CDR的具有所希望的特异性、亲和力和能力的残基替代(Jone等人,1986,Nature

[自然], 321:522-525; Riechmann等人, 1988, Nature[自然], 332:323-327; Verhoeyen等人, 1988, Science[科学], 239:1534-1536)。在一些情况下, 人免疫球蛋白的Fv框架区 (FR或FW) 残基被来自非人物种的具有所希望的特异性、亲和力和能力的抗体中的相应残基替代。人源化抗体可以通过在Fv框架区和/或替代的非人残基内的另外的残基的取代来进一步修饰, 以改进和优化抗体特异性、亲和力和/或能力。通常, 人源化抗体将包含基本上所有至少一个 (并且典型地两个或三个) 可变结构域, 该可变结构域包含对应于非人免疫球蛋白的所有或基本上所有CDR区, 而所有或基本上所有FR区是人免疫球蛋白共有序列的那些。人源化抗体还可以包含免疫球蛋白恒定区或结构域 (Fc) 的至少一部分, 典型地是人免疫球蛋白的恒定区或结构域。用于产生人源化抗体的方法的实例描述于美国专利5,225,539或5,639,641中。

[0075] 抗体的“可变区”指单独的抗体轻链的可变区或抗体重链的可变区或它们的组合。重链和轻链的这些可变区各自由通过三个互补决定区 (CDR, 又称为高变区) 连接的四个框架区 (FR或FW) 组成。每条链中的CDR由FR紧密靠近地保持在一起, 并且与来自另一条链的CDR促成了抗体的抗原结合位点的形成。存在至少两种用于确定CDR的技术: (1) 一种基于跨物种序列变异性的方法 (即, Kabat等人 Sequences of Proteins of Immunological Interest[免疫学上感兴趣的蛋白质序列], (第5版, 1991, National Institutes of Health[美国国家卫生研究院], 马里兰州贝塞斯达 (Bethesda Md.))); 和 (2) 一种基于抗原抗体复合物的晶体学研究的方法 (Al-lazikani等人 (1997) J.Molec.Biol.[分子生物学杂志] 273:927-948)。另外, 本领域有时使用这两种方法的组合来确定CDR。

[0076] 当提及可变结构域中的残基 (大约轻链的残基1-107和重链的残基1-113) 时, 通常使用Kabat编号系统 (例如, Kabat等人, Sequences of Immunological Interest[免疫学上感兴趣的序列], 第5版Public Health Service[公共卫生服务], National Institutes of Health[美国国家卫生研究院], 马里兰州贝塞斯达 (1991))。

[0077] 在Kabat中的氨基酸位置编号是指在Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest[免疫学上感兴趣的蛋白质序列], 第5版Public Health Service[公共卫生服务], National Institutes of Health[美国国家卫生研究院], 马里兰州贝塞斯达 (1991) 中用于抗体编译的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用这个编号系统, 实际的线性氨基酸序列可以含有更少或另外的氨基酸, 其对应于可变结构域的FR或CDR的截短或插入。例如, 重链可变结构域可以包括在H2的残基52之后的单个氨基酸插入 (根据卡巴特 (Kabat) 的残基52a) 和在重链FR残基82之后的插入的残基 (例如, 根据卡巴特的残基82a、82b和82c等)。可以通过在抗体序列与“标准”卡巴特编号序列的同源性区域进行比对来确定给定抗体的残基的卡巴特编号。相反, 乔西亚 (Chothia) 是指结构环的位置 (Chothia和Lesk J.Mol.Biol.[分子生物学杂志] 196:901-917 (1987))。乔西亚CDR-H1环的末端在利用卡巴特编号惯例编号时在H32与H34之间变化, 这取决于环的长度 (这是因为卡巴特编号方案将插入放在H35A和H35B处; 如果35A和35B都不存在, 那么环端点在32; 如果只存在35A, 那么环端点在33; 如果35A和35B都存在, 那么环端点在34)。AbM高变区表示卡巴特CDR和乔西亚结构环之间的折衷, 并且被牛津分子公司 (Oxford Molecular) 的AbM抗体建模软件使用。下表1中提供了比较。

[0078] 表1: 抗体编号系统的比较

环	卡巴特	AbM	乔西亚
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
[0079] (卡巴特编号)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
(乔西亚编号)			
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0080] 术语“人抗体”意指天然人抗体或具有与使用本领域已知的任何技术制备的与天然人抗体相对应的氨基酸序列的抗体。人抗体的这种定义包括完整或全长抗体、其片段、和/或包含至少一个人重链和/或轻链多肽的抗体,例如像包含鼠轻链和人重链多肽的抗体。

[0081] 术语“嵌合抗体”是指其中免疫球蛋白分子的氨基酸序列衍生自两种或更多种物种的抗体。典型地,轻链和重链的可变区对应于衍生自具有所希望的特异性、亲和力和能力的一种哺乳动物(例如小鼠、大鼠、兔等)物种的抗体的可变区,而恒定区同源于衍生自另一种(通常为人)的抗体中的序列,以避免在该物种中引起免疫应答。多特异性结合分子(例如包括一个或多个抗体结合结构域、一个或多个非抗体结合结构域或其组合,例如本文所提供的TNF α 拮抗剂和/或NGF拮抗剂)可以包含抗体恒定区(例如,Fc区),其中一个或多个恒定区结构域的至少一部分已被缺失或以其他方式改变,以便提供所希望的生物化学特征,如当与包含天然或未改变的恒定区的具有大约相同免疫原性的抗体相比时增加的肿瘤定位或降低的血清半衰期。本文所提供的经修饰的恒定区可以包含对三个重链恒定结构域(CH1、CH2或CH3)中的一个或多个和/或对轻链恒定结构域(CL)的改变或修饰。在一些方面中,一个或多个恒定结构域可以被部分或全部缺失。在一些方面中,该整个CH2结构域可以被缺失(Δ CH2构建体)。参见例如,Oganesyan V等人,2008Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.[晶体学报D卷生物晶体学]64:700-4;Oganesyan V等人,Mol Immunol.[分子免疫学]46:1750-5;Dall'Acqua,W.F.等人,2006.J.Biol.Chem.[生物化学杂志]281:23514-23524;和Dall'Acqua等人,2002.J.Immunol.[免疫学杂志]169:5171-5180。

[0082] 术语“表位”或“抗原决定簇”在本文中可互换地使用并且是指能够被特定抗体识别并特异性结合的抗原部分。当抗原是多肽时,表位可以由连续氨基酸和通过蛋白的三级折叠而并置的非连续氨基酸二者来形成。从连续氨基酸形成的表位典型地在蛋白变性时保留,而由三级折叠形成的表位典型地在蛋白变性时丧失。表位典型地包括处于独特的空间构象中的至少3个和更常见的至少5个、或8-10个氨基酸。如本文所述的表位不需要定义至形成表位的特定氨基酸。在一些方面中,可以通过检查与多肽抗原的肽亚基的结合,或通过检查一组抗原特异性抗体对抗原的结合竞争来鉴定表位。

[0083] “受试者”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”意指希望进行诊断、预后或治疗的任何受试者,尤其是哺乳动物受试者。哺乳动物受试者包括人、家畜、农畜、体育动物和动物园动物,包括例如人、非人灵长类、狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、牛、熊等。

[0084] 术语“组合物”和“药物组合物”是指如下制剂,该制剂处于使得活性成分的生物活性是有效的形式,并且该制剂不含对将施用该组合物的受试者具有不可接受的毒性的另外的组分。此类组合物可以是无菌的。

[0085] 如本文所用,术语“有效量”和“治疗有效量”是指一种或多种有效治疗或控制受试者的疼痛的治疗组合物的量。术语“治疗疼痛”、“控制疼痛”和语法等效词在本文中用于描述对需要疼痛控制的受试者的任何有益或期望的作用。例如,本文所述的一种或多种治疗组合物的有效量可以例如在受试者中预防疼痛、维持疼痛的可耐受水平、改善疼痛、减轻疼痛、最小化疼痛和/或消除疼痛。特别地,术语“治疗疼痛”、“控制疼痛”和语法等效词在本文中用于描述减轻疼痛和/或预防疼痛。

[0086] 如本文所用,术语“施用”是指向受试者施用本文所述的一种或多种治疗组合物,例如包含NGF拮抗剂结构域和TNF α 拮抗剂结构域的双功能多肽。术语“共同施用”是指向受试者施用两种或更多种治疗组合物。如本文所用,共同施用包括但不要求向受试者同时施用两种或更多种治疗组合物。可以向受试者顺序地,例如相隔三十分钟、相隔一小时、相隔两小时、相隔三小时、相隔四小时或相隔五小时或更多个小时施用两种或更多种治疗组合物。如本文所述的共同施用的顺序和时间可以是固定的,或者可以基于医疗保健专业人员的判断而改变。

[0087] 术语“多核苷酸”和“核酸”是指由共价连接的核苷酸残基组成的聚合化合物。多核苷酸可以是DNA、cDNA、RNA、单链或双链载体、质粒、噬菌体或病毒。

[0088] 术语“载体”意指构建体,其能够在宿主细胞中递送和表达一个或多个目的基因或序列。载体的实例包括但不限于:病毒载体、裸DNA或RNA表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子缩合剂缔合的DNA或RNA表达载体、包封在脂质体中的DNA或RNA表达载体,以及某些真核细胞(如生产细胞)。

[0089] 可在本文中互换使用的术语“多肽”、“肽”、和“蛋白质”是指具有任何长度的氨基酸的聚合物。该聚合物可以是线性或支化的,它可以包含修饰的氨基酸,并且它可以被非氨基酸中断。这些术语还涵盖已经被天然修饰或通过干预修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其他操纵或修饰,诸如与标记组分缀合。该定义还包括例如含有一种或多种氨基酸类似物(包括例如,非天然氨基酸等)以及本领域已知的其他修饰的多肽。

[0090] “保守的氨基酸取代”是一个氨基酸残基被具有类似侧链的另一个氨基酸残基替代的氨基酸取代。在本领域中已经定义了具有类似侧链的氨基酸残基家族,包括碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天门冬氨酸、谷氨酸),不带电荷的极性侧链(例如,天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性的侧链(例如,甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β -分支侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)以及芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。例如,苯丙氨酸对于酪氨酸的取代是保守取代。在某些方面中,本文所提供的多肽和抗体的序列中的保守取代没有消除含有该氨基酸序列的多肽的结合或其他功能活性。鉴定不影响功能的核苷酸和氨基酸保守取代的方法是本领域所熟知的(参见例如,Brummell等人,Biochem.[生物化学]32:1180-1 187(1993);Kobayashi等人Protein Eng.[蛋白质工程]12:879-884(1999);和Burks等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]94:

412-417(1997))。

[0091] 包含NGF拮抗剂结构域和TNF α 拮抗剂结构域的结合分子

[0092] 本披露提供了包含NGF拮抗剂结构域和TNF α 拮抗剂结构域的双功能多肽,用于在本文所披露的方法中的任一者(例如,根据本文所披露的剂量方案中的任一者)中使用。在某些方面中,在有需要的受试者中施用有效量的本文所提供的双功能多肽比单独施用当量的NGF拮抗剂或TNF α 拮抗剂可以更有效控制疼痛。本文所提供的双功能多肽可以包括处于任何顺序、结构或构象的NGF拮抗剂结构域和TNF α 拮抗剂结构域。任何合适的NGF拮抗剂或TNF α 拮抗剂可以是本文所提供的双功能多肽的一部分。在本披露中描述了示例性的NGF拮抗剂和TNF α 拮抗剂。

[0093] 在某些方面中,该NGF拮抗剂是抗NGF抗体或其抗原结合片段。在某些方面中,用于在本文所提供的双功能分子(例如多特异性结合分子)中使用的抗NGF拮抗剂(例如,拮抗剂抗体或其片段),相比于阻断NGF与p75NRT的结合,可以优先阻断NGF与TrkA的结合。

[0094] 用于在双功能多肽(例如,本文所披露的多特异性结合分子)中使用的示例性抗体或其片段可获得于美国申请公开号2008/0107658,将其通过引用以其全文并入本文。在某些方面中,该抗NGF抗体或其片段与抗NGF抗体MEDI-578结合相同的表位,可以竞争性抑制抗NGF抗体MEDI-578或可以以比抗NGF抗体MEDI-578更大的亲和力结合NGF。在某些实施例中,该抗NGF抗体或其片段以等于或小于1、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3或0.2nM的亲和力结合人NGF和/或大鼠NGF。例如,该抗NGF抗体或其片段可以以约0.2-0.8、0.2-0.7、0.2-0.6、0.2-0.5和/或0.25-0.44nM的亲和力结合人NGF并且可以以约0.2-0.9、0.2-0.8和/或0.25-0.70nM的亲和力结合大鼠NGF。

[0095] 在某些方面中,该抗NGF抗体或其片段是MEDI-578。在美国申请公开号2008/0107658中MEDI-578被披露为克隆1252A5。在其他方面,该抗NGF抗体或其片段是他尼珠单抗(tanezumab, RN-624),一种人源化的抗NGF mAb(辉瑞公司(Pfizer));描述于Kivitz等人,(2013) PAIN[疼痛], 154, 9, 1603-161;福拉奴单抗(fulranumab),一种全人的抗NGF mAb(安进公司(Amgen));描述于Sanga等人, PAIN[疼痛], 第154卷, 第10期, 2013年10月, 第1910页-第1919页; REGN475/SAR164877, 一种全人的抗NGF mAb(再生元公司(Regeneron)/赛诺菲-安内特(Sanofi-Aventis)); ABT-110 (PG110), 一种人源化的抗NGF mAb(雅培公司(Abbott Laboratories)); 法希奴单抗(fasinumab), 一种人抗NGF mAb(再生元公司(Regeneron)), 在美国申请公开号2009/0041717中披露为克隆REGN475)。双功能多肽(例如, 本文所提供的多特异性结合分子)中包括的抗NGF抗体或其片段可以是例如人源化的、嵌合的、灵长类动物化的或全人的。

[0096] 在某些方面中, 该抗NGF抗体或其片段包含抗体VH结构域, 该抗体VH结构域包含MEDI-578的HCDR1、HCDR2和HCDR3结构域, 具有多达一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸取代(例如, 保守的氨基酸取代)的MEDI-578重链CDR的变体。例如, 该抗NGF抗体或其片段可以包含HCDR1, 该HCDR1具有SEQ ID NO:4的确切氨基酸序列, 或具有有一个或多个(例如, 一个、两个、三个、四个、五个或更多个)氨基酸取代的SEQ ID NO:4的氨基酸序列。类似地, 该抗NGF抗体或其片段可以包含HCDR2, 该HCDR2具有SEQ ID NO:5的确切氨基酸序列, 或具有有一个或多个(例如, 一个、两个、三个、四个、五个或更多个)氨基酸取代的SEQ ID NO:5的氨基酸序列。同样, 该抗NGF抗体或其片段可以包含HCDR3, 该HCDR3具有SEQ ID NO:6的

确切氨基酸序列,或具有有一个或多个(例如,一个、两个、三个、四个、五个或更多个)氨基酸取代的SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在某些方面中,该HCDR3可以包含氨基酸序列SSRIYDFNSALISYYDMDV(SEQ ID NO:11)或SSRIYDMISLQPYDMDV(SEQ ID NO:12)。

[0097] 在某些方面中,该抗NGF抗体或其片段包含抗体VL结构域,该抗体VL结构域包含MEDI-578的LCDR1、LCDR2和LCDR3结构域,具有多达一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸取代(例如,保守的氨基酸取代)的MEDI-578轻链CDR的变体。在某些方面中,该抗NGF抗体或其片段可以包含LCDR1,该LCDR1具有SEQ ID NO:8的确切氨基酸序列,或具有有一个或多个(例如,一个、两个、三个、四个、五个或更多个)氨基酸取代的SEQ ID NO:8的氨基酸序列。类似地,该抗NGF抗体或其片段可以包含LCDR2,该LCDR2具有SEQ ID NO:9的确切氨基酸序列,或具有有一个或多个(例如,一个、两个、三个、四个、五个或更多个)氨基酸取代的SEQ ID NO:9的氨基酸序列。同样,该抗NGF抗体或其片段可以包含LCDR3,该LCDR3具有SEQ ID NO:10的确切氨基酸序列,或具有有一个或多个(例如,一个、两个、三个、四个、五个或更多个)氨基酸取代的SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0098] 在某些方面中,该抗NGF抗体或其片段包含抗体VH结构域,该抗体VH结构域包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的VH氨基酸序列。在一些方面中,该抗NGF抗体或其片段包含含有SEQ ID NO:3的VH氨基酸序列的抗体VH结构域。

[0099] 在某些方面中,该抗NGF抗体或其片段包含抗体VL结构域,该抗体VL结构域包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的VL氨基酸序列。在一些方面中,该抗NGF抗体或其片段包含含有SEQ ID NO:7的VL氨基酸序列的抗体VL结构域。

[0100] 在某些方面中,该抗NGF抗体或其片段包含抗体VH结构域,该抗体VH结构域包含与SEQ ID NO:94的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的VH氨基酸序列。在一些方面中,该抗NGF抗体或其片段包含含有SEQ ID NO:94的VH氨基酸序列的抗体VH结构域。

[0101] 在某些方面中,该抗NGF抗体或其片段包含抗体VL结构域,该抗体VL结构域包含与SEQ ID NO:95的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的VL氨基酸序列。在一些方面中,该抗NGF抗体或其片段包含含有SEQ ID NO:95的VL氨基酸序列的抗体VL结构域。

[0102] 在某些方面中,该抗NGF抗体或其片段包含抗体VH结构域,该抗体VH结构域包含SEQ ID NO:30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86和96中的任一者的HCDR1、HCDR2和HCDR3结构域或具有多达一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸取代(例如,保守的氨基酸取代)的其变体。

[0103] 在某些方面中,该抗NGF抗体或其片段包含抗体VL结构域,该抗体VL结构域包含SEQ ID NO:31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87和97中的任一者的LCDR1、LCDR2和LCDR3结构域或具有多达一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸取代(例如,保守的氨基酸取代)的其变体。

[0104] 在某些方面中,该抗NGF抗体或其片段包含抗体VH结构域,该抗体VH结构域包含与SEQ ID NO:30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、

74、76、78、80、82、84、86和96中任一者的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的VH氨基酸序列。在一些方面中,该抗NGF抗体或其片段包含抗体VH结构域,该抗体VH结构域包含SEQ ID NO:30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86和96中任一者的VH氨基酸序列。

[0105] 在某些方面中,该抗NGF抗体或其片段包含抗体VL结构域,该抗体VL结构域包含与SEQ ID NO:31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87和97中任一者的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的VL氨基酸序列。在一些方面中,该抗NGF抗体或其片段包含抗体VL结构域,该抗体VL结构域包含SEQ ID NO:31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87和97中任一者的VL氨基酸序列。

[0106] 在某些方面中,该抗NGF抗体或其片段包含抗体VH结构域,该抗体VH结构域包含NGF-NG的HCDR1、HCDR2和HCDR3结构域,具有多达一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸取代(例如,保守的氨基酸取代)的NGF-NG重链CDR的变体。例如,该抗NGF抗体或其片段可以包含HCDR1,该HCDR1具有SEQ ID NO:88的确切氨基酸序列,或具有有一个或多个(例如,一个、两个、三个、四个、五个或更多个)氨基酸取代的SEQ ID NO:88的氨基酸序列。类似地,该抗NGF抗体或其片段可以包含HCDR2,该HCDR2具有SEQ ID NO:89的确切氨基酸序列,或具有有一个或多个(例如,一个、两个、三个、四个、五个或更多个)氨基酸取代的SEQ ID NO:89的氨基酸序列。同样,该抗NGF抗体或其片段可以包含HCDR3,该HCDR3具有SEQ ID NO:90的确切氨基酸序列,或具有有一个或多个(例如,一个、两个、三个、四个、五个或更多个)氨基酸取代的SEQ ID NO:90的氨基酸序列。

[0107] 在某些方面中,该抗NGF抗体或其片段包含抗体VL结构域,该抗体VL结构域包含NGF-NG的LCDR1、LCDR2和LCDR3结构域,具有多达一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸取代(例如,保守的氨基酸取代)的NGF-NG轻链CDR的变体。在某些方面中,该抗NGF抗体或其片段可以包含LCDR1,该LCDR1具有SEQ ID NO:91的确切氨基酸序列,或具有有一个或多个(例如,一个、两个、三个、四个、五个或更多个)氨基酸取代的SEQ ID NO:91的氨基酸序列。类似地,该抗NGF抗体或其片段可以包含LCDR2,该LCDR2具有SEQ ID NO:92的确切氨基酸序列,或具有有一个或多个(例如,一个、两个、三个、四个、五个或更多个)氨基酸取代的SEQ ID NO:92的氨基酸序列。同样,该抗NGF抗体或其片段可以包含LCDR3,该LCDR3具有SEQ ID NO:93的确切氨基酸序列,或具有有一个或多个(例如,一个、两个、三个、四个、五个或更多个)氨基酸取代的SEQ ID NO:93的氨基酸序列。

[0108] 在某些方面中,该抗NGF抗体或其片段包含抗体VH结构域,该抗体VH结构域包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的VH氨基酸序列。在一些方面中,该抗NGF抗体或其片段包含含有SEQ ID NO:24的VH氨基酸序列的抗体VH结构域。

[0109] 在某些方面中,该抗NGF抗体或其片段包含抗体VL结构域,该抗体VL结构域包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的VL氨基酸序列。在一些方面中,该抗NGF抗体或其片段包含含有SEQ ID NO:26的VL氨基酸序列的抗体VL结构域。

[0110] 如本披露所提供的多功能多肽(例如,多特异性结合分子)可以包含完整的抗NGF

抗体,即,包含处于 H_2L_2 形式的两条完整重链和两条完整轻链的抗体。在抗NGF抗体是完整抗体的情况下,一个或多个TNF α 拮抗剂结构域可以融合至抗NGF抗体的一条或多条重链的N-末端或C-末端或至抗NGF抗体的一条或多条轻链的N-末端或C-末端。可替代地,如本披露所提供的多功能多肽(例如,多特异性结合分子)可以包含抗NGF抗体的抗原结合片段。在某些方面中,抗NGF抗体片段可以包含抗体的恒定结构域的任何部分或者可以仅仅包含可变结构域。用于包含在双功能多肽(例如,多特异性结合分子)中的示例性抗NGF抗体片段包括但不限于Fab片段、Fab'片段、F(ab)₂片段或单链Fv(scFv)片段。

[0111] 在本文所提供的某些示例性组合中,该抗NGF抗体是scFv片段,例如MEDI-578的scFv片段,或其NGF结合变体。在本文所提供的某些示例性组合中,该抗NGF抗体是scFv片段,例如NGF-NG的scFv片段,或其NGF结合变体。抗NGF scFv多肽可以以任何顺序包含VH和VL结构域,N-VH-VL-C或N-VL-VH-C。ScFv分子典型地被工程化,使得VH和VL结构域经由柔性接头连接。示例性scFv结构(包括各种接头)可见于Dimasi,N.等人,J Mol Biol.[分子生物学杂志]393:672-92(2009)和PCT公开号WO 2013/070565,这两篇文献通过引用以其全文并入本文。如本领域普通技术人员所理解的,scFv抗体片段相对于标准Fab构象中存在的可变结构域可以具有降低的稳定性。在一些方面中,scFv可以通过引入稳定性突变或通过引入一个或多个链间二硫键(例如,SS稳定性的)而在结构上被稳定化。然而,稳定性突变和/或引入的链间二硫键是不要求的,并且在某些方面中,是不存在的。许多本领域公认的方法可用于稳定化scFv多肽。

[0112] 接头可用于连接本文所提供的双功能多肽的结构域/区域。接头可用于连接双功能分子的NGF拮抗剂结构域和TNF α 拮抗剂结构域,并且还可用于互连scFv的可变重链和轻链。接头的示例性非限制性实例是包含至少4个残基的多肽链。此类接头中的部分可以是柔性的、亲水的并且具有很少或没有它们自身(接头部分或柔性接头部分)的二级结构。在双功能多肽分子组装后,至少4个氨基酸的接头可用于连接位置彼此靠近的结构域和/或区域。还可以使用更长的接头。因此,接头可以是约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50个残基。接头还可以是例如从约100-175个残基。当多个接头用于互连双功能多肽分子的部分时,这些接头可以是相同或不同的(例如,相同或不同的长度和/或氨基酸序列)。

[0113] 双功能多肽分子中的一个或多个接头有助于形成所希望的结构。接头可以包含(Gly-Ser)_n残基(其中n是至少一、二和多达例如3、4、5、6、10、20、50、100或更多的整数),整体分散有一些Glu或Lys残基以增加溶解度。可替代地,某些接头不包含任何丝氨酸残基,例如在接头经受O-连接的糖基化的情况下。在一些方面,接头可以含有半胱氨酸残基,例如,如果接头的二聚化用于使双功能多肽的结构域进入其正确折叠的构型。在一些方面中,双功能多肽可以包含至少一个、两个、三个、四个或更多个连接多肽的结构域的多肽接头。

[0114] 在一些方面中,多肽接头可以包含1-50个残基、1-25个残基、25-50个残基、或30-50个残基。在一些方面,该多肽接头可以包含Fc部分的一部分。例如,在一些方面中,该多肽接头可以包含IgG1、IgG2、IgG3和/或IgG4抗体或其变体的免疫球蛋白铰链结构域的一部分。

[0115] 在一些方面中,多肽接头可以包含gly-ser接头或由gly-ser接头组成。如本文所用,术语“gly-ser接头”是指由甘氨酸和丝氨酸残基组成的肽。示例性gly-ser接头包含式

(Gly₄Ser)_n的氨基酸序列,其中n是至少一、二和多达例如3、4、5、6、10、20、50、100或更多的整数。在一些方面中,多肽接头可以包含铰链区(例如,衍生自IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4分子的至少一部分和一系列gly-ser氨基酸残基(例如,gly-ser接头,例如(Gly₄Ser)_n)。

[0116] 当多功能多肽(例如,多特异性结合分子)包含scFv时,柔性接头可以连接scFv的重链和轻链。这种柔性接头通常不包括铰链部分,而是gly-ser接头或其他柔性接头。互连scFv的结构域的柔性接头的长度和氨基酸序列可以容易地选择并且优化。

[0117] 在某些方面中,多功能多肽(例如,多特异性结合分子)可以包含抗NGF scFv片段,该抗NGF scFv片段从N-末端到C-末端包含VH、15个氨基酸的接头序列(GGGGS)₃和VL。在某些实施例中,连接scFv的VH和VL的接头是20个氨基酸的接头序列(GGGGS)₄。在某些方面中,该VH包含SEQ ID NO 3的氨基酸序列。在某些方面中,该VL包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在某些实施例中,该VH包含SEQ ID NO:24、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、94和96中的任一者的氨基酸序列。在某些实施例中,该VL包含SEQ ID NO:26、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、95和97中的任一者的氨基酸序列。在某些方面中,该VH结构域包含与SEQ ID NO:3、24、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、94和96中的任一者的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在某些方面中,该VL结构域包含与SEQ ID NO:7、26、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、95和97中的任一者的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0118] 在其他方面,该多肽的稳定性可以通过将VH和VL结构域内的某些残基修饰为半胱氨酸残基以在VH结构域和VL结构域之间添加链间二硫键来改善。参见例如,Michaelson, J.S.等人(2009)MAbs[单克隆抗体杂志]1,128-41;Brinkmann,U.等人,(1993)Proc Natl Acad Sci U S A[美国国家科学院院刊]90,7538-42;Young,N.M.等人,(1995)FEBS Lett[欧洲生化学会联合会快报]377,135-9。例如,在该VL(例如,SEQ ID NO:7)的位置102、103或104处的甘氨酸残基可以被修饰为半胱氨酸残基并且在该VH(例如,SEQ ID NO:3)的位置44处的甘氨酸残基可以被修饰为半胱氨酸残基。在一些实施例中,在与SEQ ID NO:7的位置102、103或104相对应的氨基酸位置处的甘氨酸残基被修饰为半胱氨酸残基。在一些实施例中,在与SEQ ID NO:3的位置44相对应的氨基酸位置处的甘氨酸残基被修饰为半胱氨酸残基。

[0119] 如本文所提供的多功能多肽(例如,多特异性结合分子)包括TNF α 拮抗剂结构域。在某些方面中,TNF α 拮抗剂结构域可以抑制TNF α 与TNF受体(TNFR)在细胞表面上结合,从而阻断TNF活性。

[0120] 在某些方面中,该TNF α 拮抗剂是TNF受体(例如,TNFR-1或TNFR-2)的TNF α 结合可溶性片段,或其变体或其可溶性片段。在某些方面中,TNFR-1的可溶性片段是55kD片段。在某些实施例中,TNFR-2的可溶性片段是75kD片段。在某些方面中,该TNF受体片段融合至异源多肽,例如免疫球蛋白Fc片段,例如,IgG1Fc结构域。在某些方面中,该TNF α 拮抗剂包含SEQ ID NO:13所示的氨基酸或其TNF α 结合片段。该TNFR-2部分包含SEQ ID NO:13的氨基酸1至235。在某些方面中,TNFR-2的TNF α 结合可溶性片段的变体包含与SEQ ID NO:13的氨基酸1

至235至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在某些方面中,TNFR-2的TNF α 结合可溶性片段的变体包含SEQ ID NO:13的氨基酸1至235,只是有例如1、2、3、4、5、10、20、20、40或50个氨基酸的插入、取代或缺失。该IgG1Fc部分包含SEQ ID NO:13的氨基酸236至467。在某些方面中,TNFR-2的TNF α 结合可溶性片段可以融合至任何人或非人抗体的Fc部分,或融合至会提供稳定性的任何其他蛋白质或非蛋白质物质,例如白蛋白或聚乙二醇。在某些方面中,TNFR-2的TNF α 结合可溶性片段的变体包含与SEQ ID NO:13的氨基酸236至467至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在某些方面中,TNFR-2的TNF α 结合可溶性片段的变体包含SEQ ID NO:13的氨基酸236至467,只是有例如1、2、3、4、5、10、20、20、40或50个氨基酸的插入、取代或缺失。在某些方面中,TNFR-2的TNF α 结合可溶性片段的变体包含与SEQ ID NO:13至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在某些方面中,TNFR-2的TNF α 结合可溶性片段的变体包含SEQ ID NO:13,只是有例如1、2、3、4、5、10、20、20、40或50个氨基酸的插入、取代或缺失。

[0121] 在某些方面中,TNFR-2的TNF α 结合可溶性片段是单链融合蛋白。在某些方面中,TNFR-2的TNF α 结合可溶性片段是两个融合蛋白例如通过两个Fc结构域之间的二硫键缔和的二聚体。

[0122] 如本文所提供的多功能多肽(例如,多特异性结合分子)可以具有各种不同的结构和构象。在一方面中,如本文所提供的多功能多肽包含融合蛋白,其中如上文所述的NGF拮抗剂结构域通过柔性接头融合至如上文所述的TNF α 拮抗剂结构域。接头的实例描述于本文中的其他部分。在某些方面中,该多功能多肽包含融合蛋白的同源二聚体。

[0123] 在示例性方面中,提供了多功能多肽,其中NGF拮抗剂是衍生自例如MEDI-578的抗NGF scFv结构域,并且TNF α 拮抗剂是TNFR-2的可溶性的、TNF α 结合片段,该TNFR-2的可溶性的、TNF α 结合片段在其羧基末端处与免疫球蛋白Fc结构域融合。在一些方面中,该抗NGF scFv可以经由接头融合至免疫球蛋白Fc结构域的羧基末端。在某些方面中,这种多功能多肽的单体与每个亚基形成同源二聚体,该同源二聚体从N-末端到C-末端包含TNFR-2的TNF α 结合75kD片段、人IgG1Fc结构域、10个氨基酸的接头(GGGGS)₂(SEQ ID NO:98)、包含SEQ ID NO 3的氨基酸序列的抗NGF VH、15个氨基酸的接头序列(GGGGS)₃(SEQ ID NO:15)和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的抗NGF VL。在一方面中,该多功能多肽是TNFR2-Fc_VH#4,该TNFR2-Fc_VH#4包含融合多肽的同源二聚体,该同源二聚体包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在一些方面中,该多功能多肽包含融合多肽的同源二聚体,该同源二聚体包含与SEQ ID NO:14至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0124] 在另一示例性方面中,该多功能多肽从N-末端到C-末端包含TNFR-2的TNF α 结合75kD片段、人IgG1Fc结构域、10个氨基酸的接头(GGGGS)₂(SEQ ID NO:98)、包含SEQ ID NO 94的氨基酸序列的抗NGF VH、20个氨基酸的接头序列(GGGGS)₄(SEQ ID NO:19)和包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的抗NGF VL。在一些实施例中,该结合分子从N-末端到C-末端包含TNFR-2的TNF α 结合75kD片段,其包含与SEQ ID NO:13至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;人IgG1Fc结构域;10个氨基酸的接头(GGGGS)₂(SEQ ID NO:98);包含与SEQ ID NO 94的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的抗NGF VH;20个氨基酸的接头序列(GGGGS)₄(SEQ ID NO:

19) ;和包含与SEQ ID NO:95的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的抗NGF VL。在一些方面中,该多功能多肽是TNFR2-Fc_varB,该TNFR2-Fc_varB包含融合多肽的同源二聚体,该同源二聚体包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些方面中,该多功能多肽包含融合多肽的同源二聚体,该同源二聚体包含与SEQ ID NO:17至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%相同的氨基酸序列。

[0125] 多核苷酸、载体和宿主细胞

[0126] 本披露提供了包含编码本文所披露的结合分子中的任一者的多核苷酸的核酸分子,用于在本文所披露的方法(例如,和本文所披露的剂量方案)中的任一者中使用。本披露进一步提供了包含编码单个多肽的多核苷酸的核酸分子,这些单个多肽分别地包含NGF拮抗剂和TNF α 拮抗剂。在某些方面中,此类多核苷酸编码特异性结合NGF或其片段并且还结合TNF α 或其片段的肽结构域。例如,本披露提供了多核苷酸,该多核苷酸编码包含抗NGF抗体或其抗原结合片段的多肽结构域和包含TNF α 拮抗剂(例如抗TNF α 抗体或其抗原结合片段)或TNF受体(例如,TNFR2)的可溶性TNF α 结合部分的多肽结构域。多核苷酸可以处于RNA形式或处于DNA形式。DNA包括cDNA、基因组DNA和合成DNA;并且可以是双链的或单链的,并且如果是单链的话,可以是编码链或非编码(反义)链。

[0127] 在一些实施例中,编码本文所述的多功能多肽的分离的多核苷酸包含SEQ ID NO:16、18或99的核苷酸序列或其片段、或与SEQ ID NO:16、18或99至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的序列或其片段。

[0128] 本文所述的这些分离的多肽可以通过本领域已知的任何合适的方法产生。此类方法范围为从直接蛋白质合成方法到构建编码分离的多肽序列的DNA序列并在合适的转化宿主中表达这些序列。在一些方面中,使用重组技术通过分离或合成编码包含NGF拮抗剂结构域和TNF α 拮抗剂结构域的多功能多肽、或分别地包含NGF拮抗剂结构域和TNF α 拮抗剂结构域的单个多肽的DNA序列来构建DNA序列。因此,本披露提供了编码如上文详细所述的双功能多肽的分离的多核苷酸,该双功能多肽包含NGF拮抗剂结构域和TNF α 拮抗剂结构域。进一步提供了编码单个多肽的分离的多核苷酸,该单个多肽分别地包含NGF拮抗剂结构域和TNF α 拮抗剂结构域。

[0129] 在一些方面中,可以使用寡核苷酸合成仪,通过化学合成构建DNA序列,该DNA序列编码多功能多肽(例如,目的多特异性结合分子)或分别地包含NGF拮抗剂结构域和TNF α 拮抗剂结构域的单个多肽。此类寡核苷酸可以是基于所希望的多功能多肽的氨基酸序列并且基于选择在宿主细胞(其中将产生目的重组多肽)中偏爱的那些密码子来设计。可以应用标准方法来合成编码目的多功能多肽的分离的多核苷酸序列。例如,完整氨基酸序列可以用于构建回译基因。此外,可以合成含有对特定的多功能多肽或单个多肽进行编码的核苷酸序列的DNA寡聚体。例如,可以合成几个编码所希望的多肽的部分的小寡核苷酸并且然后将其连接。单个寡核苷酸典型地含有用于互补组装的5'或3'突出端。

[0130] 在某些方面中,本文所提供的多核苷酸可以包含在相同阅读框中融合至允许例如纯化编码的多肽的标记物序列的成熟多肽的编码序列。例如,在细菌宿主的情况下,该标记物序列可以由pQE-9载体供给的六聚组氨酸标签以便提供对融合至该标记物的成熟多肽的纯化,或者当使用哺乳动物宿主(例如,COS-7细胞)时,该标记物序列可以是来源于流感病毒血凝素蛋白的血球凝集素(HA)标签。

[0131] 本文所提供的多核苷酸可以在编码区、非编码区或两者中进一步含有改变。在一些方面中,这些多核苷酸变体含有产生沉默取代、添加、或缺失而不改变编码的多肽的特性或活性的改变。在一些方面中,核苷酸变体由归因于遗传密码的简并性的沉默取代产生。多核苷酸变体可以因为各种原因而产生,例如,为了优化特定宿主的密码子表达(将人mRNA中的密码子改变成细菌宿主如大肠杆菌优选的那些密码子)。

[0132] 还提供了包含本文所述的多核苷酸的载体和细胞。一旦组装(通过合成、定点诱变或另一种方法),编码特定的目的分离多肽的多核苷酸序列可以被插入至表达载体中并且可操作地连接至适于蛋白质在所希望的宿主中的表达的表达控制序列。本披露提供了此类载体。可以通过核苷酸测序、限制酶切作图以及在合适的宿主中表达生物活性多肽来确认适当的组装。如本领域中所熟知的,为了在宿主中获得高表达水平的转染基因,该基因必须可操作地连接至在选择表达宿主中起作用的转录和翻译表达控制序列。

[0133] 在某些方面中,重组表达载体可以用于扩增和表达DNA,该DNA编码包含NGF拮抗剂结构域和TNF α 拮抗剂结构域的多功能多肽(例如,多特异性结合分子)、或分别地包含NGF拮抗剂结构域和TNF α 拮抗剂结构域的单个多肽。重组表达载体是可复制的DNA构建体,这些DNA构建体具有编码多功能多肽或分别地包含NGF拮抗剂结构域和TNF α 拮抗剂结构域的单个多肽的合成的或cDNA衍生的DNA片段,这些DNA片段可操作地连接至来源于哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因的合适的转录和翻译调控元件。转录单位通常包含以下组件:(1)基因表达中具有调控作用的一个或多个遗传元件,例如转录启动子或增强子,(2)转录成mRNA并翻译成蛋白质的结构序列或编码序列,以及(3)适当的转录和翻译启动和终止序列,如下文详细描述。此类调控元件可以包括控制转录的操纵子序列。可以另外掺入通常赋予在宿主中进行复制的能力的复制起点以及有助于识别转化体的选择基因。当DNA区域在功能上彼此相关时,将它们可操作地连接。例如,将信号肽(分泌性前导子)表达为参与多肽的分泌的前体的话,则该信号肽(分泌性前导子)的DNA可操作地连接至多肽的DNA;如果启动子控制编码序列的转录,则该启动子可操作地连接至该编码序列;或如果核糖体结合位点被定位以允许翻译,则该核糖体结合位点可操作地连接至编码序列。旨在用于在酵母表达系统中使用的结构元件包括前导子序列,它使得宿主细胞可以将翻译的蛋白质分泌到胞外。可替代地,在无需前导子或转运序列表达重组蛋白的情况下,它可以包括N-端甲硫氨酸残基。随后,此残基可以任选地从表达的重组蛋白上裂解下来,以提供终产物。

[0134] 表达控制序列和表达载体的选择将依赖于宿主的选择。可以采用多种多样的表达宿主/载体组合。对于真核宿主有用的表达载体包括例如包含来自SV40、牛乳头瘤病毒、腺病毒、以及巨细胞病毒的表达控制序列的载体。对于细菌宿主有用的表达载体包括已知细菌质粒,诸如来自大肠杆菌的质粒,包括pCR 1、pBR322、pMB9以及其衍生物,更广泛的宿主范围质粒,诸如M13和丝状单链DNA噬菌体。

[0135] 本披露进一步提供了宿主细胞,这些宿主细胞包含编码本文所提供的多肽的多核苷酸。用于表达本文所提供的多肽的合适的宿主细胞包括在适当的启动子控制下的原核细胞、酵母、昆虫、或高等真核细胞。原核细胞包括革兰阴性或革兰阳性生物体,例如大肠杆菌或杆菌。高等真核细胞包括如下文所述的哺乳动物起源的已建立的细胞系。还可以采用无细胞翻译系统。用于细菌、真菌、酵母菌、以及哺乳动物细胞宿主的适当的克隆和表达载体由Pouwels等人(Cloning Vectors:A Laboratory Manual[克隆载体:实验室手册],

Elsevier[爱思唯尔公司],纽约,1985)描述,该文献的相关披露通过引用特此并入。关于蛋白质产生(包括抗体产生)方法的另外的信息可见于例如美国专利公开号2008/0187954、美国专利号6,413,746和6,660,501、以及国际专利公开号W0 04009823,这些专利各自通过引用以其全文特此并入本文。

[0136] 还可以有利地采用各种哺乳动物或昆虫细胞培养系统来表达重组蛋白。可以在哺乳动物细胞中进行重组蛋白的表达,因为此类蛋白质通常被正确地折叠,适当地修饰并且完全起作用。合适的哺乳动物宿主细胞系的实例包括HEK-293和HEK-293T、由Gluzman(Cell[细胞]23:175,1981)描述的猴肾细胞的COS-7系、以及包括例如L细胞、C127、3T3、中国仓鼠卵巢(CHO)、HeLa以及BHK细胞系的其他细胞系。哺乳动物表达载体可以包括非转录元件(如复制起点)、连接至待表达的基因上的合适的启动子和增强子以及其他5'或3'侧翼非转录序列和5'或3'非翻译序列,如必要的核糖体结合位点、聚腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点以及转录终止序列。用于产生昆虫细胞中的异源蛋白质的杆状病毒系统由Luckow和Summers,Bio/Technology[生物/技术]6:47(1988)进行了综述。

[0137] 本披露进一步提供了用于产生如本文所述的多功能多肽、或用于产生分别地包含NGF拮抗剂和TNF α 拮抗剂的单个多肽的方法。该方法需要在促进多功能多肽或单个多肽的表达的条件下培养如上文所述的宿主细胞,并且回收该多功能多肽或单个多肽。

[0138] 为了长期、高产率的产生重组蛋白,稳定表达是适当的。例如,可以工程化稳定表达多功能多肽的细胞系。代替使用含有病毒复制起点的表达载体,宿主细胞可以使用由适当表达控制元件(例如启动子、增强子、序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点等)和可选择标记物来控制的DNA来转化。在引入外源DNA后,可以允许工程化的细胞在富集的培养基中生长1-2天,并且然后切换至选择性培养基。在重组质粒中的可选择标记物赋予对选择的抗性,并且允许细胞将质粒稳定地整合进它们的染色体中并且生长以形成转化灶(foci),进而可以将该转化灶克隆并且扩充成细胞系。这种方法可以用于将表达多功能多肽的细胞系工程化。

[0139] 在某些实施例中,在本文中呈现的多功能多肽被表达于具有多功能多肽的瞬时表达的细胞系中。瞬时转染是引入细胞中的核酸不会整合到该细胞的基因组或染色体DNA中但是在该细胞中维持为染色体外元件例如作为附加体的一个过程。附加体的核酸的转录过程不受影响,并且产生由附加体的核酸编码的蛋白质。

[0140] 稳定或瞬时转染的细胞系被维持在本领域中已知的导致多肽的表达和产生的细胞培养基和条件中。在某些实施例中,哺乳动物细胞培养基是基于可商购的培养基配制品,包括例如DMEM或Ham's F12。在一些实施例中,将细胞培养基进行改良以支持细胞生长和生物蛋白表达两者的增长。如本文所用,术语“细胞培养基”、“培养基”、以及“培养基配制品”是指在一个多细胞生物体或组织以外的一个人工体外环境中用于细胞的维持、生长、繁殖、或扩增的营养液。可以将细胞培养基优化以用于特定的细胞培养用途,包括例如,被配制来促进细胞生长的细胞培养物生长培养基,或者被配制来促进重组蛋白产生的细胞培养物生产培养基。术语营养素、成分、以及组分(component)可以互换使用以指组成细胞培养基的组分(constituent)。

[0141] 在不同的实施例中,使用补料分批法维持细胞系。如本文所用,“补料分批法”是指在首先用基础培养基孵育之后,用另外的营养素供应给补料分批细胞培养物的方法。例如,

一种补料分批法可以包括根据一个所确定的补料时间表在一个给定时期内添加补充培养基。因此,“补料分批细胞培养”是指这样一种细胞培养:其中最初将细胞(典型地为哺乳动物)和培养基供应至培养容器,并且在培养期间,连续地或以不连续增量方式将另外的培养营养素馈送至培养物,在培养终止之前有或没有定期的细胞和/或产物的收获。

[0142] 在一些实施例中,细胞培养基包含基础培养基以及产生改良的基础培养基的至少一种水解产物,例如基于大豆的水解产物、基于酵母的水解产物、或这两种类型的水解产物的组合。另外的营养素有时可以仅包括一种基础培养基如一种浓缩的基础培养基,或者可以仅包含水解产物、或浓缩的水解产物。合适的基础培养基包括但不限于杜尔贝科氏改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)、DME/F12、最低必需培养基(MEM)、伊格尔基础培养基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、 α -最低必需培养基(α -MEM)、格拉斯哥最低必需培养基(Glasgow's Minimal Essential Medium, G-MEM)、PF CHO(参见例如, CHO无蛋白质培养基(西格玛公司(Sigma))或用于无蛋白质的CHO细胞的EX-CELL.TM.325PF CHO无血清培养基(SAFC生物科学公司(SAFC Bioscience)))、以及伊斯科夫改良的杜尔贝科氏培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)。可以用于本文中的技术的基础培养基的其他实例包括BME基础培养基(吉布-英杰公司(Gibco-Invitrogen);杜尔贝科氏改良伊格尔培养基(DMEM, 粉末)(吉布-英杰公司(#31600))。

[0143] 在某些实施例中,基础培养基可以是无血清的,意指该培养基不含血清(例如,胎牛血清(FBS)、马血清、山羊血清、或本领域的技术人员已知的任何其他动物源的血清),或没有动物蛋白的培养基或化学上限定的培养基。

[0144] 可以改良基础培养基以便除去在标准基础培养基中发现的某些非营养组分,如各种无机和有机缓冲液、一种或多种表面活性剂、以及氯化钠。这类组分从基础细胞培养基的除去允许剩余营养组分的浓度增加,并且可以改善总体的细胞生长和蛋白质表达。另外,可以根据细胞培养条件的要求,将省去的组分添加回至含有改良的基础细胞培养基的细胞培养基中。在某些实施例中,细胞培养基包含改良的基础细胞培养基以及至少一种以下营养素:铁源、重组生长因子;缓冲液;表面活性剂;渗透性调节剂;能量源;以及非动物水解产物。另外,改良的基础细胞培养基可以任选地含有氨基酸、维生素、或氨基酸和维生素两者的组合。在一些培养基中,改良的基础培养基进一步含有谷氨酰胺,例如L-谷氨酰胺和/或氨甲蝶呤。

[0145] 在一些实施例中,通过使用本领域已知的补料分批、分批、灌注的生物反应器工艺或连续进料生物反应器方法而大量地进行蛋白质产生。大规模生物反应器具有至少50升的容量,有时约大于500升或1,000至100,000升的容量。这些生物反应器可以使用搅拌叶轮来分布氧和营养素。小规模生物反应器通常是指在不大于大约100升的体积容量中的细胞培养,并且范围可以是从约1升至约100升。可替代地,一次性生物反应器(SUB)可以用于大规模或小规模培养。

[0146] 温度、pH、搅拌、曝气以及接种密度可以取决于所使用的宿主细胞以及有待表达的重组蛋白而不同。例如,重组蛋白细胞培养可以被维持在30°C与45°C之间的一个温度下。可以在培养过程期间监测培养基的pH,以使得pH保持在最佳水平,对于某些宿主细胞来说,该最佳水平可以是在6.0至8.0的pH范围内。叶轮驱动的混合可以用于此类培养方法以用于搅拌。叶轮的转速可以大约是50至200cm/秒的端速,但可以取决于所培养的宿主细胞的类型

而使用本领域中已知的其他气升或其他混合/曝气系统。提供充足的曝气以便在培养物中维持大约20%至80%空气饱和度的溶解氧浓度,这再次取决于所培养的所选择的宿主细胞。可替代地,生物反应器可以直接将空气或氧气喷射至培养基之中。存在其他供氧方法,包括采用中空纤维膜曝气器的无泡曝气系统。

[0147] 蛋白质纯化

[0148] 在一些实施例中,本披露提供了纯化用于在本文所披露的方法中的任一种(例如,本文所披露的剂量方案中的任一者)中使用的本文所披露的结合分子中的任一者的方法。可以根据任何合适的方法对由如上文所述的转化宿主产生的蛋白质进行纯化。此类标准方法包括色谱法(例如,离子交换色谱、亲和色谱以及尺寸分级柱色谱)、离心、差别溶解度,或者通过用于蛋白质纯化的任何其他标准技术。亲和标签如六组氨酸、麦芽糖结合结构域、流感外壳序列以及谷胱甘肽-S-转移酶可以附接至蛋白质,以便允许蛋白质通过适当的亲和柱后较容易地得到纯化。还可以使用如蛋白质水解、核磁共振和x射线结晶等此类技术来在物理上表征分离的蛋白质。

[0149] 例如,可以首先使用可商购的蛋白浓缩过滤器例如艾美康恩(Amicon)或密理博皮里康恩(Millipore Pellicon)超滤单元浓缩来自将重组蛋白分泌到培养基中的系统的上清液。浓缩步骤之后,浓缩物可以应用到合适的纯化基质上。可替代地,可以采用阴离子交换树脂,例如具有侧接的二乙氨基乙基(DEAE)基团的基质或底物。基质可以是丙烯酰胺、琼脂糖、右旋糖酐、纤维素或在蛋白质纯化中常用的其他类型。可替代地,可以采用阳离子交换步骤。合适的阳离子交换剂包括含有磺丙基或羧甲基基团的各种不可溶基质。最后,可以使用采用疏水性RP-HPLC介质(例如,具有侧接甲基或其他脂族基团的硅胶)的一个或多个反相高效液相色谱(RP-HPLC)步骤,以便进一步纯化NGF结合剂。还可以采用不同组合的一些或所有前述纯化步骤以提供均质的重组蛋白。

[0150] 可以例如通过最初从细胞沉淀中提取,随后进行一次或多次浓缩、盐析、水性离子交换或尺寸排阻色谱步骤来分离在细菌培养物中产生的重组蛋白。可以采用高效液相色谱(HPLC)进行最终纯化步骤。用于重组蛋白表达的微生物细胞可以通过任何常规方法来破坏,这些方法包括冻融循环、超声处理、机械破坏或使用细胞溶解剂。

[0151] 用于纯化重组多肽的本领域已知的方法还包括,例如在美国专利公开号2008/0312425、2008/0177048以及2009/0187005中描述的那些,这些专利各自通过引用以其全文特此并入本文。

[0152] 使用方法和药物组合物

[0153] 本披露提供了用于控制或治疗受试者的疼痛(例如减轻和/或预防受试者的疼痛)的方法,这些方法包括施用治疗有效量的如本文所提供的TNF α 和NGF拮抗剂多功能多肽(例如,多特异性结合分子)或包括共同施用TNF α 拮抗剂和NGF拮抗剂。在某些方面中,该受试者是人。

[0154] 本披露进一步提供了包含本文所述的结合分子中的任一者的药物组合物。在某些方面中,这些药物组合物进一步包含药学上可接受的媒介物。这些药物组合物可用于治疗例如减轻或预防疼痛,例如,神经性和炎性(例如,骨关节炎或类风湿性关节炎)疼痛。

[0155] 包含本文所提供的NGF拮抗剂和TNF α 拮抗剂的多功能多肽和组合物可用于各种应用中,这些应用包括但不限于控制或治疗(例如,减轻和/或预防)疼痛,例如神经性疼痛。这

些使用方法可以是体外、离体或体内方法。

[0156] 在某些方面中,用NGF结合剂(例如,抗体或多肽)治疗的疾病、障碍或病症与疼痛相关。在某些方面中,该疼痛与慢性伤害性疼痛、慢性下腰痛、神经性疼痛、癌性疼痛、疱疹后神经痛(PHN)性疼痛或内脏痛病症相关。在某些方面中,该疼痛与关节炎症(例如,膝关节或髋关节炎症)相关。

[0157] 本披露提供了用于控制(例如减轻或预防)受试者的疼痛的方法,该方法包括向需要疼痛控制的受试者施用有效量的神经生长因子(NGF)拮抗剂和肿瘤坏死因子(TNF α)拮抗剂,其中该施用比单独施用当量的NGF拮抗剂或TNF α 拮抗剂可以更有效地控制(例如,减轻或预防)受试者的疼痛。

[0158] 所谓比单独施用这些组分“更有效地”控制疼痛是指,该组合治疗在控制疼痛方面比单个地施用当量的NGF拮抗剂或TNF α 拮抗剂更有效。在某些方面中,并且如下文更详细描述,本文所提供的控制(例如,减轻或预防)疼痛的方法可以提供协同功效,例如,NGF拮抗剂和TNF α 拮抗剂二者的施用的作用可以提供大于累加的作用,或者在单个的NGF拮抗剂或TNF α 拮抗剂无效的情况下可以是有效的。在某些方面中,该组合可以允许剂量节省,例如,当共同施用时,单独的组分的有效剂量可以小于任一组分单独施用时的有效剂量。

[0159] 在某些方面中,本文所提供的控制(例如,减轻或预防)疼痛的方法在控制(例如,减轻或预防)受试者的疼痛方面比单独施用当量的NGF拮抗剂或TNF α 拮抗剂更有效至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。在某些方面中,向受试者共同施用的单个的NGF拮抗剂或TNF α 拮抗剂的剂量或者在施用本文所提供的双功能多肽时提供的相对剂量的NGF拮抗剂或TNF α 拮抗剂的剂量可以比单独施用这些组分所需要的剂量低,例如低5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。

[0160] 在一些实施例中,本披露提供了以特定剂量方案向受试者施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以0.04-0.25mg/kg的剂量向本文所披露的受试者中的任一者施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以0.04-0.15mg/kg的剂量向本文所披露的受试者中的任一者施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以0.04-0.1mg/kg的剂量向本文所披露的受试者中的任一者施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以0.04-0.075mg/kg的剂量向本文所披露的受试者中的任一者施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以0.04-0.06mg/kg的剂量向本文所披露的受试者中的任一者施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以约0.05mg/kg的剂量向本文所披露的受试者中的任一者施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以约0.1mg/kg的剂量向本文所披露的受试者中的任一者施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以约0.15mg/kg的剂量向本文所披露的受试者中的任一者施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以约0.2mg/kg的剂量向本文所披露的受试者中的任一者施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,静脉内施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,皮下施用本文所披露的结合分子中的任一者。

[0161] 在一些实施例中,本披露提供了用于治疗(例如,减轻或预防)有需要的受试者的疼痛的方法,该方法包括向受试者静脉内施用0.04-0.275mg/kg本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,该方法包括向受试者静脉内施用0.04-0.25mg/kg该结合分子。

在一些实施例中,该方法包括向受试者静脉内施用0.04-0.2mg/kg该结合分子。在一些实施例中,该方法包括向受试者静脉内施用0.04-0.15mg/kg该结合分子。在一些实施例中,该方法包括向受试者静脉内施用0.04-0.1mg/kg该结合分子。在一些实施例中,该方法包括向受试者静脉内施用0.04-0.08mg/kg该结合分子。在一些实施例中,该方法包括向受试者静脉内施用0.1-0.275mg/kg该结合分子。在一些实施例中,该方法包括向受试者静脉内施用0.1-0.25mg/kg该结合分子。在一些实施例中,该方法包括向受试者静脉内施用0.15-0.25mg/kg该结合分子。在一些实施例中,该方法包括向受试者静脉内施用约0.05mg/kg该结合分子。在一些实施例中,该方法包括向受试者静脉内施用约0.1mg/kg该结合分子。在一些实施例中,该方法包括向受试者静脉内施用约0.15mg/kg该结合分子。在一些实施例中,该方法包括向受试者静脉内施用约0.2mg/kg该结合分子。

[0162] 在一些实施例中,本披露提供了用于治疗(例如,减轻或预防)有需要的受试者的疼痛的方法,该方法包括向受试者皮下施用0.1-1.2mg/kg本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,本披露提供了用于治疗(例如,减轻或预防)有需要的受试者的疼痛的方法,该方法包括向受试者皮下施用0.1-1.0mg/kg本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,本披露提供了用于治疗(例如,减轻或预防)有需要的受试者的疼痛的方法,该方法包括向受试者皮下施用0.1-0.8mg/kg本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,本披露提供了用于治疗(例如,减轻或预防)有需要的受试者的疼痛的方法,该方法包括向受试者皮下施用0.1-0.6mg/kg本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,本披露提供了用于治疗(例如,减轻或预防)有需要的受试者的疼痛的方法,该方法包括向受试者皮下施用0.1-0.4mg/kg本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,本披露提供了用于治疗(例如,减轻或预防)有需要的受试者的疼痛的方法,该方法包括向受试者皮下施用0.1-0.25mg/kg本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,本披露提供了用于治疗(例如,减轻或预防)有需要的受试者的疼痛的方法,该方法包括向受试者皮下施用0.4-1.0mg/kg本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,本披露提供了用于治疗(例如,减轻或预防)有需要的受试者的疼痛的方法,该方法包括向受试者皮下施用0.6-1.0mg/kg本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,本披露提供了用于治疗(例如,减轻或预防)有需要的受试者的疼痛的方法,该方法包括向受试者皮下施用0.8-1.0mg/kg本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,本披露提供了用于治疗(例如,减轻或预防)有需要的受试者的疼痛的方法,该方法包括向受试者皮下施用0.8-1.2mg/kg本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,本披露提供了用于治疗(例如,减轻或预防)有需要的受试者的疼痛的方法,该方法包括向受试者皮下施用约0.2mg/kg本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,本披露提供了用于治疗(例如,减轻或预防)有需要的受试者的疼痛的方法,该方法包括向受试者皮下施用约0.4mg/kg本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,本披露提供了用于治疗(例如,减轻或预防)有需要的受试者的疼痛的方法,该方法包括向受试者皮下施用约0.6mg/kg本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,本披露提供了用于治疗(例如,减轻或预防)有需要的受试者的疼痛的方法,该方法包括向受试者皮下施用约0.8mg/kg本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,本披露提供了用于治疗(例如,减轻或预防)有需要的受试者的

疼痛的方法,该方法包括向受试者皮下施用约1mg/kg本文所披露的结合分子中的任一者。

[0163] 在一些实施例中,本披露提供了通过以固定的剂量方案向有需要的受试者施用本文所披露的结合分子中的任一者来治疗(例如,减轻或预防)该受试者的疼痛的方法。如本文所用,固定的剂量方案意指给予每个受试者的剂量是固定的并且不取决于该受试者的体重或其他特征。在一些实施例中,以5-200mg的固定剂量向本文所披露的受试者中的任一者施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以7.5-150mg的剂量向本文所披露的受试者中的任一者施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以25-150mg的剂量向本文所披露的受试者中的任一者施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以75-150mg的剂量向本文所披露的受试者中的任一者施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以5mg、7.5mg、25mg、75mg、150mg或200mg的剂量向本文所披露的受试者中的任一者施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以7.5、25、75或150的剂量向本文所披露的受试者中的任一者施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以5mg的剂量向本文所披露的受试者中的任一者施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以7.5mg的剂量向本文所披露的受试者中的任一者施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以25mg的剂量向本文所披露的受试者中的任一者施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以75mg的剂量向本文所披露的受试者中的任一者施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以150mg的剂量向本文所披露的受试者中的任一者施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以200mg的剂量向本文所披露的受试者中的任一者施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以相当于结合分子的静脉内剂量的固定剂量向本文所披露的受试者中的任一者施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,相当于静脉内剂量的固定剂量是如下固定剂量,该固定剂量提供了与该静脉内剂量基本上相同、或相同的血清药代动力学曲线。在一些实施例中,相当于静脉内剂量的固定剂量是如下固定剂量,该固定剂量提供了与该静脉内剂量基本上相同、或相同的药代动力学曲线图中的曲线下几何平均面积。在一些实施例中,以相当于结合分子的静脉内固定剂量的固定剂量向本文所披露的受试者中的任一者施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以相当于30mg结合分子的固定静脉内剂量的固定剂量向本文所披露的受试者中的任一者施用本文所披露的结合分子中的任一者。

[0164] 在一些实施例中,静脉内施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,向本文所披露的受试者中的任一者静脉内施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以固定剂量静脉内施用本文所披露的结合分子中的任一者。

[0165] 在一些实施例中,皮下施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,向本文所披露的受试者中的任一者皮下施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以固定剂量皮下施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以本文所披露的固定剂量中的任一个皮下施用本文所披露的结合分子中的任一者。

[0166] 在一些实施例中,本披露提供了用于治疗(例如,预防或减轻)有需要的受试者的疼痛的方法,该方法包括向该受试者施用皮下固定剂量的本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,该方法包括皮下施用5-200mg固定剂量的本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,该方法包括皮下施用7.5-150mg固定剂量的本文所披露的结合分

子中的任一者。在一些实施例中,该方法包括皮下施用25-150mg固定剂量的本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,该方法包括皮下施用75-150mg固定剂量的本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,该方法包括皮下施用5、7.5、25、75、150或200mg固定剂量的本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,该方法包括皮下施用7.5、25、75或150mg固定剂量的本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以5mg的剂量向本文所披露的受试者中的任一者皮下施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以7.5mg的剂量向本文所披露的受试者中的任一者皮下施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以25mg的剂量向本文所披露的受试者中的任一者皮下施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以75mg的剂量向本文所披露的受试者中的任一者皮下施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以150mg的剂量向本文所披露的受试者中的任一者皮下施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,以200mg的剂量向本文所披露的受试者中的任一者皮下施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,该方法包括皮下施用相当于静脉内固定剂量的结合分子的固定剂量。在一些实施例中,该方法包括皮下施用相当于30mg固定静脉内剂量的结合分子的固定剂量。

[0167] 在一些实施例中,治疗(例如,预防或减轻)疼痛的方法包括根据剂量时间表施用本文所披露的结合分子中的任一者。在一些实施例中,向该受试者施用该结合分子一次。在一些实施例中,向该受试者施用该结合分子多次。在一些实施例中,向该受试者施用固定剂量的结合分子多次。在一些实施例中,向该受试者施用相同固定剂量的结合分子多次。在一些实施例中,至少每周一次、不多于每周一次、至少每两周一次、不多于每两周一次、至少每三周一次、不多于每三周一次、至少每个月一次、不多于每个月一次、至少每个月两次、不多于每个月两次、至少每个月三次、不多于每个月三次、至少每六个周一次、或不多于每六个周一次向该受试者施用该结合分子(例如,固定剂量的结合分子)。在一些实施例中,至少每两周一次向该受试者施用该结合分子(例如,固定剂量的结合分子)。在一些实施例中,不多于每两周一次向该受试者施用该结合分子(例如,固定剂量的结合分子)。在一些实施例中,每两周一次向该受试者施用该结合分子(例如,固定剂量的结合分子)。在一些实施例中,至少每三周一次向该受试者施用该结合分子(例如,固定剂量的结合分子)。在一些实施例中,不多于每三周一次向该受试者施用该结合分子。在一些实施例中,每三周一次向该受试者施用该结合分子(例如,固定剂量的结合分子)。在一些实施例中,至少每个月一次向该受试者施用该结合分子(例如,固定剂量的结合分子)。在一些实施例中,不多于每个月一次向该受试者施用该结合分子(例如,固定剂量的结合分子)。在一些实施例中,每个月一次向该受试者施用该结合分子(例如,固定剂量的结合分子)。

[0168] 本披露提供了治疗(例如,预防或减轻)疼痛的方法,其中用于施用本文所披露的结合分子中的任一者的剂量时间表持续设定的时间段。例如,可以至少每2周一次施用固定剂量的结合分子至少12周。在一些实施例中,施用该结合分子至少4周、至少8周、至少12周或至少16周。在一些实施例中,施用该结合分子至少4周。在一些实施例中,施用该结合分子至少8周。在一些实施例中,施用该结合分子至少12周。在一些实施例中,施用该结合分子至少16周。在一些实施例中,施用该结合分子12周。在一些实施例中,至少每2周一次施用该结合分子至少12周。在一些实施例中,每2周一次施用该结合分子至少12周。在一些实施例中,

每2周一次施用该结合分子,持续施用12周。

[0169] 本文所披露的结合分子中的任一者可以与另外的疼痛治疗组合用于减轻或预防疼痛。另外的疼痛治疗可以与本文所披露的结合分子中的任一者同时施用或者独立于本文所披露的结合分子中的任一者施用。因此,本披露提供了减轻或预防有需要的受试者的疼痛的方法,该方法包括施用本文所披露的结合分子中的任一者并且进一步包括施用另外的疼痛治疗。在一些实施例中,预防或减轻疼痛的方法进一步包括向该受试者施用NSAID。在一些实施例中,该方法进一步包括向该受试者施用阿片类。在一些实施例中,该方法进一步包括向该受试者施用醋氨酚。在一些实施例中,该方法进一步包括向该受试者施用对乙酰氨基酚。在一些实施例中,该方法进一步包括向该受试者施用COX-2抑制剂。

[0170] 需要治疗疼痛的受试者在施用本文所披露的结合分子中的任一者之前,可能已经患有疼痛一段时间。在预防或减轻疼痛的方法的一些实施例中,该受试者在施用该结合分子之前,已经患有疼痛1个月或更长的时间。在一些实施例中,在施用该结合分子之前,该受试者已经患有疼痛3个月或更长的时间。在一些实施例中,在施用该结合分子之前,该受试者已经患有疼痛6个月或更长的时间。

[0171] 在开始用本文所披露的结合分子中的任一者治疗之前,可能已经向该受试者施用了疼痛的替代性治疗。在一些实施例中,预防或减轻疼痛的方法包括在施用本文所披露的结合分子中的任一者之前,向该受试者施用疼痛的替代性治疗,和确定该疼痛的替代性治疗不减轻或预防该受试者的疼痛和/或该受试者不耐受该疼痛的替代性治疗。在一些实施例中,疼痛的替代性治疗是NSAID、强阿片类、弱阿片类、COX-2抑制剂、醋氨酚或其组合。在一些实施例中,在向该受试者施用该结合分子之前,该方法包括以下步骤:a.向该受试者施用NSAID、强阿片类、弱阿片类、COX-2抑制剂、醋氨酚或其组合,和b.确定i) NSAID、强阿片类、弱阿片类、COX-2抑制剂、醋氨酚或其组合不减轻或预防受试者的疼痛,和/或ii) 确定该受试者不耐受NSAID、强阿片类、弱阿片类、COX-2抑制剂、醋氨酚或其组合。在一些实施例中,施用NSAID、强阿片类、弱阿片类、COX-2抑制剂、醋氨酚或其组合至少1周、至少2周、至少3周或至少4周。在一些实施例中,施用NSAID、强阿片类、弱阿片类、COX抑制剂、醋氨酚或其组合至少2周。在一些实施例中,在施用本文所披露的结合分子中的任一者之前,向该受试者施用NSAID、强阿片类、弱阿片类、COX-2抑制剂、醋氨酚或其组合至少1周、至少2周、至少3周或至少4周。在一些实施例中,在施用本文所披露的结合分子中的任一者之前,向该受试者施用NSAID、强阿片类、弱阿片类、COX-2抑制剂、醋氨酚或其组合至少2周。在一些实施例中,该受试者不耐受NSAID、强阿片类、弱阿片类、COX-2抑制剂、醋氨酚或其组合。

[0172] 在开始用本文所披露的结合分子中的任一者治疗之前,可以测试该受试者是否存在感染。在一些实施例中,预防或减轻疼痛的方法包括在施用本文所披露的结合分子中的任一者之前,测试受试者的SARS-CoV2感染。在一些实施例中,该方法包括在向该受试者施用固定剂量的结合分子之前,测试受试者的SARS-CoV2感染。在一些实施例中,测试受试者的SARS-CoV2感染包括在向该受试者施用固定剂量的结合分子之前,测试受试者的SARS-CoV2基因材料。在一些实施例中,在基线时,该受试者没有感染SARS-CoV2。如通过PCR所测试的,在基线时,该受试者可能是SARS-CoV2核糖核酸(RNA)阴性的。该受试者可能没有表现出与COVID-19感染或急性病毒性呼吸道疾患一致的临床体征或症状,例如,发烧、咳嗽、呼吸困难、咽喉痛和/或味觉/嗅觉丧失。该受试者可能是SARS-CoV2阴性的,可能是COVID-19

抗体阴性的。

[0173] 本发明提供了用于控制或治疗(例如,减轻或预防)疼痛的方法。在某些方面中,该疼痛选自慢性伤害性疼痛、慢性下腰痛、神经性疼痛、癌性疼痛、疱疹后神经痛(PHN)性疼痛或内脏痛病症。在某些方面中,该疼痛与关节炎(例如,膝关节或髌关节炎)相关。

[0174] 本文所披露的结合分子尤其可以用于减轻或预防与关节炎相关的疼痛。在预防或减轻疼痛的方法的一些实施例中,该受试者患有骨关节炎。在一些实施例中,该受试者患有单侧膝关节的骨关节炎。在一些实施例中,根据中心读取器的评估,该受试者在0至4级的Kellgren-Lawrence (KL) 分级量表中具有至少2级膝关节骨关节炎。在一些实施例中,根据中心读取器的评估,该受试者在0至4级的KL分级量表中具有2级膝关节骨关节炎(Kohn等人(2016) Clin Orthop Relat Res [临床骨科及相关研究] 474:1886-1893和Altman等人(1986) Arthritis Rheum. [关节炎与风湿病]; 29(8):1039-49)。该KL分级系统是基于膝关节的放射照相评估,其中0级的特征在于没有骨关节炎的放射照相特征,因此表示不存在OA;1级的特征在于可疑的关节间隙变窄;2级的特征在于可能的关节间隙变窄和存在骨赘;3级的特征在于明确的关节间隙变窄和多个骨赘;而4级的特征在于明显的关节间隙变窄、严重的硬化和大骨赘,从而表示严重的OA。

[0175] 疼痛控制的功效可以通过要求患者根据许多不同的量表对所经历的疼痛的特性和强度进行评级来测量。语言疼痛量表使用词语来描述从无疼痛、轻度疼痛、中度疼痛和重度疼痛的范围,对每个指定的评分为0-3。可替代地,可以要求患者根据从0(无疼痛)到10(可能最严重的疼痛)的数字疼痛量表对他们的疼痛进行评级。在视觉模拟量表(VAS)上,垂直或水平线上具有用来描述从无疼痛到可能最严重的疼痛的疼痛的词语,并要求患者在表示他们当前疼痛水平的点上标记该线。麦吉尔疼痛问卷表(McGill pain index)使患者能够通过从一系列短列表中选择最能描述他们的疼痛的词语(例如,重击、灼烧、掐捏)来描述疼痛的特性和强度二者。使用VAS或数字量表时遇到困难的成年人可以使用其他疼痛量表,例如FACES或者非语言患者可以使用,例如行为评级量表(Behavioural rating scale)。功能活动得分涉及当要求患者进行一项与疼痛区域相关的任务时患者的疼痛对他们的阻碍程度。使用这些类型的量表获得的疼痛得分的改善可能说明镇痛药的功效有所改善。

[0176] 可以在向该受试者施用本文所披露的结合分子中的任一者之前确定受试者患有的疼痛的基线水平。在一些实施例中,在基线时,如使用WOMAC指数的疼痛分量表所测量的,该受试者在一个关节中具有至少为5的平均西安大略大学和麦克马斯特大学骨关节炎指数(WOMAC)疼痛得分。

[0177] WOMAC多尺度指数用于评估患有膝关节或髌关节炎的受试者的疼痛、僵硬和关节功能。该WOMAC疼痛分量表是一种广泛使用的、患者报告的结果测量工具,用于评估患有膝关节OA的参与者(Lundgren-Nilsson等人 Patient-reported outcome measures in osteoarthritis: a systematic search and review of their use and psychometric properties [患者报告的骨关节炎结果测量: 对其使用和心理测量特性的系统搜索和审查]. RMD Open [风湿和肌肉骨骼疾病开放获取期刊]. 2018年12月16日; 4(2): e000715), 并且由用于评估受试者因靶膝关节中的OA引起的疼痛的5个问题组成。每个问题都按照NRS量表从0到10来进行评分,并且WOMAC疼痛分量表得分计算为所有5个问题的平均得分,其中得分越高表示疼痛程度越高。WOMAC生理功能分量表由17个问题组成,这些问题用于评估受试

者因靶膝关节中的OA引起的进行日常生活活动的难度。每个问题都按照NRS量表从0到10来进行评分,并且WOMAC疼痛分量表得分计算为所有17个问题的平均得分,其中得分越高表示功能越差。WOMAC僵硬功能分量表由2个问题组成,这2个问题用于评估由靶膝关节中的OA引起的僵硬。僵硬被定义为靶膝关节中活动容易程度降低的感觉。每个问题都按照NRS量表从0到10来进行评分,并且WOMAC疼痛分量表得分计算为2个问题的平均得分,其中得分越高表示僵硬程度越高。如本文所用,基线WOMAC得分被定义为施用结合剂当天的WOMAC得分。

[0178] 在一些实施例中,在基线时,如在疼痛数值评级(NRS)量表上所测量的,该受试者在一个关节中具有至少为5的平均疼痛强度得分。NRS是一种用于评估疼痛的11分李克特量表(11-point Likert scale),其中要求受试者通过确定从0=“无疼痛”到10=“过去24小时内可以想象的最严重的疼痛”中的一个数字描述他们在指标膝关节中的平均疼痛(参见Alghadir等人Test-retest reliability, validity, and minimum detectable change of visual analog, numerical rating, and verbal rating scales for measurement of osteoarthritic knee pain[用于测量骨关节炎膝关节疼痛的视觉模拟、数字评级和语言评级量表的重复试验信度、效度和最小可检测变化]. J Pain Res. [疼痛研究杂志]2018年4月26日;11:851-6)。如本文所用,基线NRS得分定义为在开始用本文所披露的结合分子中的任一者治疗之前从第-7天到第-1天(含该天)记录的每日NRS疼痛得分的平均值。

[0179] 疼痛减轻或预防的功效可以通过比较施用了本文所披露的结合分子中的任一者的受试者的疼痛水平的变化与未施用本文所披露的结合分子中的任一者的对照受试者的疼痛水平的变化来确定。在一些实施例中,如与未施用结合分子的对照受试者(例如,施用了安慰剂的对照受试者)中的西安大略大学和麦克马斯特大学骨关节炎指数(WOMAC)得分相比,在WOMAC量表(如果以1-10的量表来评分的话)上,本文所披露的任一方法或剂量方案使疼痛减轻了至少1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5或6分。在一些实施例中,如与未施用结合分子的对照受试者(例如,施用了安慰剂的对照受试者)中的WOMAC得分相比,在WOMAC量表(如果以0-4的量表来评分的话)上,本文所披露的任一方法或剂量方案使疼痛减轻了至少1、1.5、2、2.5、3、3.5或4分。

[0180] 在一些实施例中,如与未施用结合分子的对照受试者中的NRS得分相比,在疼痛数值评定量表(NRS)(如果以1-10的量表来评分的话)上,本文所披露的任一方法或剂量方案使疼痛减轻了至少1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5或6分。在一些实施例中,在向受试者单剂量施用该结合分子之后,观察到了疼痛减轻。

[0181] 疼痛减轻或预防的功效可以通过比较施用了本文所披露的结合分子中的任一者的受试者的疼痛水平的变化与基线时受试者的疼痛水平来确定。在一些实施例中,本文所披露的任一方法或剂量方案使受试者的WOMAC疼痛分量表相对于基线降低了。在一些实施例中,以固定剂量每2周一次施用本文所披露的结合分子中的任一者,持续施用12周,并且在第一次施用本文所披露的结合分子中的任一者之后,该方法使受试者的WOMAC疼痛分量表得分相比于基线降低了至少12周。在一些实施例中,本文所披露的任一方法或剂量方案使受试者的WOMAC疼痛分量表得分相对于基线降低了至少20%、至少30%、至少40%、或至少50%。在一些实施例中,本文所披露的任一方法或剂量方案使受试者的WOMAC疼痛分量表得分相对于基线降低了至少30%。在一些实施例中,本文所披露的任一方法或剂量方案使受试者的WOMAC疼痛分量表得分相对于基线降低了至少50%。

[0182] 在一些实施例中,本文所披露的任一方法或剂量方案使受试者的WOMAC生理分量表得分相对于基线降低了。在一些实施例中,以固定剂量每2周一次施用本文所披露的结合分子中的任一者,持续施用12周,并且在第一次施用本文所披露的结合分子中的任一者之后,该方法使受试者的WOMAC生理分量表得分相比于基线降低了至少12周。在一些实施例中,本文所披露的任一方法或剂量方案使受试者的WOMAC生理分量表得分相对于基线降低了至少20%、至少30%、至少40%、或至少50%。在一些实施例中,本文所披露的任一方法或剂量方案使受试者的WOMAC生理分量表得分相对于基线降低了至少30%。在一些实施例中,本文所披露的任一方法或剂量方案使受试者的WOMAC生理分量表得分相对于基线降低了至少50%。

[0183] 在一些实施例中,本文所披露的任一方法或剂量方案使受试者的每日NRS疼痛得分的周平均值相对于基线降低了。在一些实施例中,以固定剂量每2周一次施用本文所披露的结合分子中的任一者,持续施用12周,并且该方法使受试者的每日NRS疼痛得分的周平均值相对于基线降低了至少12周。在一些实施例中,本文所披露的任一方法或剂量方案使受试者的每日NRS疼痛得分的周平均值相对于基线降低了至少20%、至少30%、至少40%或至少50%。在一些实施例中,本文所披露的任一方法或剂量方案使受试者的每日NRS疼痛得分的周平均值相对于基线降低了至少30%。在一些实施例中,本文所披露的任一方法或剂量方案使受试者的每日NRS疼痛得分的周平均值相对于基线降低了至少50%。

[0184] 在一些实施例中,本文所披露的任一方法或剂量方案使骨关节炎的患者整体评估(PGA)相对于基线得到改善。如本文所用,基线PGA被定义为施用结合剂当天的PGA得分。PGA是一种用于评估由于膝关节的OA引起的症状和活动障碍的5分李克特量表(参见,例如 Nikiphorou等人(2016) *Arthritis Res Ther* [关节炎研究与治疗] 18:251)。要求患者基于如下问题“考虑到膝关节的OA对您的所有影响,您今天感觉怎么样?”,在从1=非常好(无症状并且正常活动不受限制)到5=非常差(难以忍受的非常严重的症状并且不能进行所有正常活动)之间确定一个数字。在一些实施例中,以固定剂量每2周一次施用本文所披露的结合分子中的任一者,持续施用12周,并且该方法使骨关节炎的PGA相对于基线改善了至少12周。在一些实施例中,本文所披露的任一方法或剂量方案使骨关节炎的PGA改善了至少2分。

[0185] 疼痛减轻或预防的功效可以通过测量受试者中的生物标志物水平的变化来确定。在一些实施例中,如与未施用该结合分子的对照受试者(例如,施用了安慰剂的对照受试者)的NGF活性相比,该预防或减轻疼痛的方法使受试者的NGF活性抑制了至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。在一些实施例中,如与未施用该结合分子的对照受试者的NGF活性相比,该方法使受试者的NGF活性抑制了至少40%。在一些实施例中,在向受试者单剂量施用该结合分子之后,观察到了NGF抑制。在一些实施例中,在向受试者施用多次剂量的该结合分子之后,观察到了NGF抑制。

[0186] 在一些实施例中,如与未施用该结合分子的对照受试者(例如,施用了安慰剂的对照受试者)的CXCL-13水平相比,该预防或减轻疼痛的方法使受试者的CXCL-13水平抑制了至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。在一些实施例中,在向受试者单剂量施用该结合分子之后,观察到了CXCL-13抑制。在一些实施例中,在向受试者施用多次剂量的该结合分子之后,观察到了CXCL-13抑制。

[0187] 在某些方面中,通过将如本文所提供的TNF α 和NGF拮抗剂多功能多肽(例如,多特

异性结合分子)与药学上可接受的媒介物(例如,载剂、赋形剂)组合来制备用于储存和使用的配制品(Remington, The Science and Practice of Pharmacy[雷明顿, 药学科学和实践]第20版Mack Publishing[马克出版公司], 2000)。合适的药学上可接受的媒介物包括但不限于:非毒性缓冲液,例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;盐类,例如氯化钠;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如,十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚,丁醇或苯甲醇;烷基对羟基苯甲酸酯,例如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;以及间甲酚);低分子量多肽(例如,小于约10个氨基酸残基);蛋白质,例如血清白蛋白、明胶、或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;碳水化合物,例如单糖、二糖、葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,例如EDTA;糖类,例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐反离子,例如钠;金属复合物(例如,锌-蛋白复合物);以及非离子表面活性剂,例如TWEEN或聚乙二醇(PEG)。

[0188] 本披露的多功能多肽可以配制成液体、半固体或固体形式,这取决于分子的物理化学特性和递送途径。配制品可以包括赋形剂、或赋形剂的组合,这些赋形剂例如:糖类、氨基酸以及表面活性剂。液体配制品可以包括广泛范围的多肽浓度和pH。固体配制品可以通过例如冷冻干燥、喷雾干燥或通过超临界流体技术干燥来生产。在一些实施例中,本文所述的配制品中的任一者是冻干的配制品。

[0189] 本文所提供的药物组合物可以以任何数目的用于局部或全身治疗的方式施用。施用可以是局部施用(例如至粘膜,包括阴道和直肠递送),例如透皮贴剂、软膏、洗剂、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉末;肺部施用(例如,通过吸入或吹入粉末或气雾剂,包括通过雾化器;气管内、鼻内、表皮和透皮);口服施用;或肠胃外施用,包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌肉内注射或输注;或颅内(例如鞘内或脑室内)施用。

[0190] 如本文所提供的TNF α 和NGF拮抗剂多功能多肽可以在药物组合配制品中或作为组合疗法的给药方案中与具有抗伤害感受特性的第二(或第三)化合物进一步组合。

[0191] 对于疼痛的治疗,如本文所提供的TNF α 和NGF拮抗剂多功能多肽(例如,多特异性结合分子)的适当剂量取决于待治疗的疼痛类型、疼痛的严重程度和病程、疼痛的反应性、多功能多肽是出于治疗目的还是预防目的施用、先前的治疗、患者的临床病史等(所有项都由治疗医师决断)。多功能多肽可以施用一次或在持续几天至几个月的一系列治疗中施用以维持有效的疼痛控制。最佳给药时间表可以根据患者体内药物积累的测量来计算,并且将根据单独抗体或多肽的相对效价而变化。施用医师可以很容易地确定最佳剂量、给药方法和重复率。

[0192] 如本文所提供的多功能多肽(例如,多特异性结合分子)的施用可以提供“协同作用”并且证明是“协同的”,即,当这些活性成分一起使用时所实现的作用大于分开使用这些化合物产生的作用的总和。当活性成分作为单一的多功能融合多肽施用时,可以获得协同作用。

[0193] 疼痛

[0194] 在最广泛的用法中,“疼痛”是指一种体验现象,对经历它的个体具有高度主观性,并受个体心理状态(包括环境和文化背景)的影响。“生理”疼痛通常与对第三方可感知的刺激有关,该刺激是造成实际或潜在组织损伤的原因。从这个意义上讲,根据国际疼痛研究协

会 (IASP), 疼痛可以被视为“与实际或潜在的组织损伤相关的或根据这种损伤进行描述的感觉和情感体验”。然而, 疼痛的一些实例没有可感知的原因。例如, 精神性疼痛, 包括在患有心理障碍的人中由精神性因素导致的先前存在的生理疼痛的急性发作, 或有时持续性、感知性疼痛的综合征, 但是对于疼痛原因没有任何可感知的证据。在本发明的上下文中的“疼痛”可以是或可以包括本文所披露的疼痛类型中的任一者。

[0195] 疼痛的类型

[0196] 在本发明的上下文中, 疼痛包括伤害性疼痛、神经性/神经源性疼痛、爆发性疼痛、异常性疼痛、痛觉过敏、感觉过敏、感觉迟钝、感觉异常、痛觉过度、幻肢痛、精神性疼痛、痛性感觉缺失、神经痛、神经炎。其他分类包括恶性疼痛、心绞痛和/或特发性疼痛、复杂性局部疼痛综合征I、复杂性局部疼痛综合征II。疼痛的类型和症状不需要是互相排斥的。这些术语旨在由IASP定义。

[0197] 伤害性疼痛是由周围神经中专门化的感觉伤害感受器响应于有害刺激引发的, 感觉伤害感受器将有害刺激编码为动作电位。伤害感受器 (通常位于A δ 纤维和 (多觉型) C纤维上) 是自由神经末梢, 终止于皮肤下方、肌腱、关节和身体器官中。背根神经节 (DRG) 神经元提供了周围和脊髓之间的交流位点。信号通过脊髓处理到脑干和丘脑位点, 并且最后到达大脑皮层, 在那里它通常 (但不总是) 引起痛觉。伤害性疼痛可由多种多样的化学、热、生物 (例如炎症) 或机械事件引起, 这些事件有可能刺激或损伤身体组织, 这些事件通常高于在伤害感受器中引起伤害性活性所需的某个最小强度阈值。

[0198] 神经性疼痛通常是周围或中枢神经系统功能异常的结果, 分别引起周围或中枢神经性疼痛。IASP将神经性疼痛定义为由神经系统中的原发性病变或功能障碍引发或引起的疼痛。神经性疼痛常常涉及 (尤其是在慢性病例中) 对神经系统的实际损伤。炎性伤害性疼痛通常是由组织损伤和由此产生的炎症过程导致的。神经性疼痛可以持续到任何可观察到的组织损伤的明显愈合 (例如, 几个月或几年) 后。

[0199] 在神经性疼痛的情况下, 来自受影响区域的感觉处理可能会变得异常, 并且正常情况下不会引起疼痛的无害刺激 (例如, 热、触摸/压力) 可能会引起疼痛 (即, 异常性疼痛), 或者响应于正常的疼痛刺激, 有害刺激可能会引起对疼痛的夸大感知 (即痛觉过敏)。另外, 正常刺激可能会引发类似于电刺痛或电击或“针刺”的感觉 (即感觉异常) 和/或具有令人不快的特性 (即感觉迟钝) 的感觉。爆发性疼痛是先前存在的慢性疼痛的加剧。痛觉过度是由对刺激的异常疼痛反应引起的疼痛综合征。在大多数情况下, 该刺激是重复的, 而疼痛阈值不断增加, 疼痛阈值可以被认为是患者可以识别为疼痛的最低疼痛体验。

[0200] 神经性疼痛的实例包括触觉异常性疼痛型 (例如, 神经损伤后诱导的) 神经痛 (例如, 疱疹后 (或带状疱疹后) 神经痛、三叉神经痛)、反射交感性神经营养不良/灼性神经痛 (神经损伤)、各种癌性疼痛 (例如, 由于癌症本身或相关病症例如炎症引起的疼痛, 或由于治疗例如化疗、手术或放疗引起的疼痛)、幻肢痛、神经嵌压症 (例如, 腕管综合征)、和神经病例如周围神经病 (例如, 由于糖尿病、HIV、慢性酒精施用、暴露于其他毒素 (包括多种化疗)、维生素缺乏症和各种各样的其他医学病症引起的)。神经性疼痛包括由于各种原因例如, 外科手术、受伤、带状疱疹、糖尿病性神经病、腿或手臂的截肢、癌症等引起的神经损伤之后神经系统的病理操作的表现所引起的疼痛。与神经性疼痛相关的医学病症包括创伤性神经损伤、脑卒中、多发性硬化、脊髓空洞症、脊髓损伤和癌症。

[0201] 引起疼痛的刺激常常会引起炎症应答,而炎症应答本身会导致疼痛体验。在一些病症中,疼痛似乎是由伤害性因素和神经性因素的复杂混合引起的。例如,慢性疼痛常常包含炎性伤害性疼痛或神经性疼痛,或二者的混合。最初的神经系统功能障碍或损伤可能引发炎症介质的神经释放和随后的神经性炎症。例如,偏头痛可以表示神经性疼痛和伤害性疼痛的混合。此外,肌筋膜疼痛可能继发于肌肉的伤害性输入,但异常肌肉活动可能是神经性病症的结果。

[0202] 根据本文所提供的控制疼痛(例如,减轻或预防疼痛)的方法,本文所披露的结合分子中的任一者的施用足以在需要疼痛控制的受试者中控制疼痛(例如,减轻或预防疼痛)。在一些实施例中,在向受试者单剂量施用本文所披露的结合分子中的任一者后,观察到了疼痛减轻。在一些实施例中,在向受试者施用多次剂量的本文所披露的结合分子中的任一者之后,观察到了疼痛减轻。在特定的实施例中,本披露提供了用于减轻或预防与骨关节炎相关的疼痛的方法或剂量方案。在一些实施例中,该与骨关节炎相关的疼痛是与骨关节炎相关的膝关节疼痛。

[0203] 在预防或减轻疼痛的方法的一些实施例中,该疼痛是急性疼痛、短期疼痛、持续性或慢性伤害性疼痛、或持续性或慢性神经性疼痛。在一些实施例中,该疼痛包含慢性疼痛。在一些实施例中,该疼痛与关节炎症,例如膝关节或髌关节的炎症相关。在一些实施例中,该疼痛包含骨关节炎疼痛。在一些实施例中,该疼痛包含膝关节的骨关节炎疼痛。

[0204] 包含TNF α 和NGF拮抗剂的试剂盒

[0205] 本披露提供了包含如本文所提供的TNF α 和NGF拮抗剂多功能多肽(例如,多特异性结合分子)的试剂盒,这些试剂盒可以用于进行本文所述的方法。在某些方面中,试剂盒至少包含在一个或多个容器中的包含TNF α 拮抗剂和NGF拮抗剂的多功能融合多肽,例如,包含SEQ ID NO:14或17的氨基酸序列的多肽。本领域的技术人员将易于认识到,本文提供的所披露的TNF α 和NGF拮抗剂可易于与本领域中熟知的已建立的药盒形式中的任一者相结合。

[0206] 实例

[0207] 通过参考以下实例将更容易理解现在在总体上描述的本披露,这些实例仅被包括用于说明本披露的某些方面和实施例的目的,并不旨在限制本披露。

[0208] 实例1-抗NGF scFv/TNFR2-Fc多特异性结合分子的构建和表征

[0209] 如下产生多功能分子,具体地,包含抗NGF抗体结构域和TNFR2-Fc结构域的多特异性结合分子。根据于Dimasi,N.等人,JMol Biol.[分子生物学杂志]393:672-92(2009)和于PCT公开号W0 2013/070565中描述的Bs3Ab形式,将抗NGF抗体scFv片段经由重链CH3结构域融合至TNFR2-Fc融合蛋白(SEQ ID NO:13)的C-末端。图1示出了结构图解。编码TNFR2-Fc多肽和多特异性结合分子的DNA构建体由GeneArt(英杰公司(Invitrogen))合成。对于多特异性结合分子,构建了抗NGF scFv,该抗NGF scFv包含经由15个氨基酸的接头序列(GGGGS)₃(SEQ ID NO:15)连接在一起的MEDI-578的VH(SEQ ID NO:3)和VL(SEQ ID NO:7)结构域。将scFv的N-末端经由10个氨基酸的接头序列(GGGGS)₂融合至SEQ ID NO:13的C-末端。这种多特异性结合分子在本文中被称作TNFR2-Fc_VH#4。将编码多特异性结合分子的DNA构建体工程化以在3'端含有终止密码子和EcoRI限制性位点用于克隆到Bs3Ab表达载体中。将编码TNFR2-Fc_VH#4的DNA序列表示为SEQ ID NO:16并且将其氨基酸序列表示为SEQ ID NO:14。

[0210] 通过多特异性结合分子的MEDI-578scFv部分的VH和VL结构域之间添加链间二

硫键,改善了TNF-NGF多特异性结合分子的热稳定性。这通过在VH结构域(SEQ ID NO:94)的氨基酸44处和VL结构域(SEQ ID NO:95)的氨基酸103处引入G->C突变来完成。这一克隆被命名为TNFR2-Fc_varB。TNFR2-Fc_varB的氨基酸序列被表示为SEQ ID NO:17。编码TNFR2-Fc_varB的DNA序列被表示为SEQ ID NO:18。编码TNFR2-Fc_varB的经密码子优化的DNA序列被表示为SEQ ID NO:99。TNFR2-Fc_varB与TNFR2-Fc_VH#4的进一步的区别在于连接scFv部分的VH和VL的15个氨基酸的接头序列(GGGGS)₃被20个氨基酸的接头(GGGGS)₄(SEQ ID NO:19)替代。使用了差示扫描荧光法(DSF)来测量TNFR2-Fc_VH#4和TNFR2-Fc_varB的T_m。该方法测量荧光染料Sypro Orange(英杰公司(Invitrogen))的结合,该染料与暴露于高温时蛋白质结构域解折叠期间露出的疏水表面结合。在DSF测定中,TNFR2-Fc_VH#4的T_m是62℃,而TNFR2-Fc_varB的T_m是66℃。因此,在多特异性分子的MEDI-578scFv部分中添加链间二硫键使该分子的热稳定性改善了4℃。

[0211] 使用聚乙烯亚胺(PEI)(波利塞斯公司(Polysciences))作为转染试剂,将TNFR2-Fc蛋白和TNFR2-Fc_VH#4在CHO悬浮细胞中瞬时表达。将细胞维持在CD-CHO培养基(生命科技公司(Life Technologies))中。根据制造商的方案(通用电气医疗集团(GE Healthcare)),使用1ml HiTrap MabSelect SuRe™亲和色谱纯化小规模转染的培养收获物,并且随后在1%蔗糖、100mM NaCl、25mM L-精氨酸盐酸盐和25mM磷酸钠(pH 6.3)中进行缓冲液交换。在还原条件下使用SDS-PAGE并使用分析性尺寸排阻色谱分析重组蛋白的纯度(见下文方法),并通过使用理论上确定的消光系数读取280nm处的吸光度来确定浓度。

[0212] TNFR2-Fc融合蛋白和TNF-NGF多特异性构建体TNFR2-Fc_VH#4的小规模瞬时表达和蛋白A柱纯化分别产生了36.6和79.9mg L⁻¹的产率。

[0213] 如下产生了较大批次的TNFR2-Fc_VH#4。使用深度过滤将来自大规模转染的粗培养收获物(多达6L)过滤,并且加载到用缓冲液A(磷酸盐缓冲盐水,pH 7.2)预平衡的1.6x20cm蛋白A琼脂糖柱(通用电气医疗集团(GE Healthcare))上。然后用缓冲液A洗涤柱并且将产物在缓冲液B(50mM醋酸钠,pH<4.0)的分级梯度中洗脱。将产物通过加载到在缓冲液C(50mM醋酸钠缓冲液,pH<5.5)中预平衡的1.6x20cm Poros HS 50柱(应用生物系统公司(Applied Biosystems))上进一步纯化,在缓冲液C中洗涤,并且然后将产物随后在50mM醋酸钠缓冲液(pH<5.5)中的从0到1M NaCl的线性梯度中洗脱。通过尺寸排阻HPLC分析所得的洗脱物。通过A280光谱、以Beckman DU520分光光度计、使用计算的消光系数1.36来确定蛋白质浓度。

[0214] 用于表征TNFR2-Fc_VH#4的方法

[0215] 使用标准方案进行蛋白质印迹分析。根据制造商的说明,使用Xcell SureLock™系统(英杰公司(Invitrogen)),将蛋白质转移到聚偏氟乙烯膜(生命科技公司(Life Technologies))上。将膜用在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的3% (w/v) 脱脂奶粉在室温下封闭1小时。使用标准方案,以HRP缀合的抗人IgG Fc特异性抗体(西格玛公司(Sigma))产生蛋白质印迹。

[0216] 使用Gilson HPLC系统(等度泵-307,UV/Vis-151检测器,液体处理器-215和注射模块-819),以Phenomenex BioSep-SEC-S3000(300x7.8mm)柱(流动相:D-PBS(生命科技公司(Life Technologies)),流速:1ml/min)进行尺寸排阻HPLC。将25μL样品注射到柱上并在A280nm处监测蛋白质种类的分离。

[0217] 根据制造商的方案,使用EDGLY试剂盒(西格玛奥德里奇公司(Sigma Aldrich)),对小规模纯化的TNFR2-Fc_VH#4进行酶法去糖基化。在变性的和天然两种条件下对蛋白质进行去糖基化。对于变性的蛋白质,将30 μ g蛋白质在37 $^{\circ}$ C下用肽N-糖苷酶F(PNGase F)、O-糖苷酶和 α -(2 $\rightarrow$ 3,6,8,9)-神经氨酸酶、 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶和 β -(1 $\rightarrow$ 4)-半乳糖苷酶去糖基化3小时。在天然条件下,将35 μ g蛋白质用如上相同的酶组在37 $^{\circ}$ C下去糖基化3天。通过考马斯(coomassie)染色的SDS-PAGE和蛋白质印迹使用标准测定方案来分析去糖基化的蛋白质。

[0218] TNFR2-Fc_VH#4的N-端氨基酸测序如下进行。使用标准方案在SDS-PAGE凝胶上运行大约2 μ g的TNFR2-Fc_VH#4。根据制造商的说明,使用Xcell SureLockTM系统(英杰公司(Invitrogen)),将蛋白质转移到PVDF膜上。将膜在轨道振荡平台上用0.1% (w/v) 酰胺黑染色大约15分钟,然后用dH₂O洗涤以减少PVDF膜的背景染色。在N-端测序之前将膜风干。切下目的条带,并在Applied Biosystems 494HT测序仪(应用生物系统公司(Applied Biosystems),美国加利福尼亚州旧金山)上,使用Applied Biosystems 140A微型HPLC,以在线乙内酰苯硫脲分析对多特异性结合分子的N-末端进行序列测定。

[0219] 表征结果

[0220] 通过SEC-HPLC表征了纯化的TNFR2-Fc_VH#4和TNFR2-Fc蛋白的聚集体、单体和蛋白质片段化水平(图2A和2B)。包含单体的主峰构成存在的总蛋白的大约90%,剩余的大约10%的蛋白质量具有较低的柱保留时间,这说明存在更高级的种类或聚集体。然而,来自SEC-HPLC的单体峰有两个明显的峰肩,这说明这一峰内的蛋白质不是单一种类。使用考马斯染色的SDS-PAGE分析示出TNFR2-Fc_VH#4的两条不同条带(在大约100和75kD)和类似地,在还原条件下TNFR2-Fc融合蛋白的两条不同条带(在大约70和45kD)(图2B)。在非还原条件下,TNFR2-Fc_VH#4存在三个主要条带(在150和250kD之间),而TNFR2-Fc融合蛋白分别地在大约150和120kD存在一个主要条带和一个次要条带。由于在还原条件下两个条带之间的分子量差大约相当于scFv片段的大小(约26.5kD),因此为了了解生成的多特异性结合分子所处的形式进行了进一步分析。天然条件下的质谱分析证实了SDS-PAGE数据,对于两个单独的纯化蛋白质制剂,纯化的TNFR2-Fc_VH#4制剂中存在三个分子量,大约为125、152和176kD(图2C)。

[0221] 如果通过SDS-PAGE凝胶观察到的条带模式是由于TNFR2-Fc_VH#4的不同糖基化,那么在去糖基化后,这将消退为单一条带。然而,当TNFR2-Fc_VH#4作为天然蛋白质或变性蛋白质去糖基化时,在还原和非还原的两种条件下条带模式均维持(数据未示出)。用多克隆抗人IgG Fc特异性抗体对糖基化和去糖基化的TNFR2-Fc_VH#4二者进行蛋白质印迹染色示出,全长预期的条带和较低分子量条带二者均与抗Fc特异性抗体反应(数据未示出)。

[0222] 截短的产物的最终鉴定是通过蛋白质的N-端氨基酸测序进行的。这显示了截短的蛋白质的N-端的前8个氨基酸是SMAPGAVH,这些氨基酸对应于TNFR2-Fc_VH#4序列(SEQ ID NO:14)的氨基酸176至183。这表示在TNFR2-Fc_VH#4的N-端有175个氨基酸的截短,仅留下TNFR2结构域的42个氨基酸。这使我们能够准确地解释来自SDS-PAGE、质谱和SEC-HPLC分析的质量数据。存在三种可能的TNFR2-Fc_VH#4二聚体组合,并且所有组合都存在于纯化的蛋白质制剂中:(1)全长同源二聚体,(2)全长和截短的种类的异源二聚体,和(3)截短的种类的同源二聚体。为了准确测量体外和体内生物活性二者,通过两步柱色谱法产生了全长同

源二聚体制剂。在第一步骤中,蛋白A纯化后,产物含有80.5%的单体(图3A),并且在第二个柱纯化步骤(SP琼脂糖凝胶)后,单体百分比为97.8%(图3B)。在整个过程中的产率是7.3%。

[0223] 实例2-通过差示扫描量热法(DSC)进行的热稳定性分析

[0224] 使用自动MicroCal VP-Capillary DSC(通用电气医疗集团(GE Healthcare),美国)进行量热测量。在25mM组氨酸/组氨酸-HCl缓冲液(pH 6.0)中,以1mg/mL测试蛋白质样品。使蛋白质样品和缓冲液以每小时95℃的速率进行从25℃至100℃的线性升温。使用Origin 7软件,从蛋白质样品中减去作为参考的缓冲液,并确定热转变。

[0225] TNFR2-Fc_VH#4的热谱图(图4)示出了三个不同的解折叠转变,变性温度(T_m)分别为64℃、67℃和84℃。我们推断64℃的 T_m 对应于TNFR2结构域和抗NGF scFv结构域二者的变性,其中67℃和84℃的 T_m 分别是IgG1CH2和CH3结构域的典型变性 T_m (例如,Dimasi,N.等人,J Mol Biol.[分子生物学杂志]393:672-92(2009),和PCT公开号WO 2013/070565)。尽管不希望受理论束缚,scFv通常比其他抗体结构域具有更低的变性温度,并且它们的解折叠特征在于单一转变事件(Roberge等人,2006,Jung等人,1999,Tischenko等人,1998)。

[0226] 实例3-抗原与TNFR2-Fc_VH#4结合的确证

[0227] A.单一和双抗原结合的ELISA

[0228] 将Nunc Maxisorp孔在4℃下用在PBS(pH 7.4)中稀释至 $5\mu\text{g ml}^{-1}$ 的50 μl 的TNF α (R&D系统公司(R&D Systems))包被过夜。第二天除去包被溶液,并在室温下用150 μl 的封闭缓冲液[3%脱脂乳-PBS]封闭孔1小时。在添加50 μl 的在封闭缓冲液中制备的TNFR2-Fc_VH#4的稀释系列之前,将孔在PBS中冲洗三次。在室温下1小时后,将孔在PBS-吐温20(0.1%v/v; PBS-T)中洗涤三次。然后将五十微升的生物素化的NGF添加到孔中,并在室温下再孵育一个小时,然后如上进行洗涤并添加50 μl 的链霉亲和素-HRP(1:100)。在室温下1小时后,用PBS-T洗涤孔,添加50 μl 的3,3',5,5'-四甲基联苯胺底物并显色。通过添加1M H_2SO_4 来终止反应,并使用微量滴定板读取器测量450nm处的吸光度。使用Prism 5软件(GraphPad公司,加利福尼亚州圣地亚哥)分析所得数据。对于单一抗原结合ELISA,如上将孔用TNF α 或NGF-生物素包被,并用抗人IgG Fc特异性HRP缀合抗体(1:5000)检测抗体结合,并如上进行显色。

[0229] 图5示出了ELISA结果。TNFR2-Fc_VH#4被设计为结合TNF α 和NGF抗原二者。通过首先将一种抗原固定在96孔微量滴定板上,然后添加TNFR2-Fc_VH#4的连续稀释液来进行单一抗原结合。通过使用辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗IgG Fc特异性抗体检测特异性结合。对于双抗原结合ELISA,将第一抗原TNF α 固定在ELISA板上,并且然后添加TNFR2-Fc_VH#4的连续稀释液,然后添加固定浓度的第二生物素化的抗原NGF。然后使用HRP缀合的链霉亲和素检测特异性结合。在单一抗原结合ELISA中,TNFR2-Fc_VH#4与TNF α 和NGF结合(图5A和图5B)。在双抗原结合ELISA中,TNFR2-Fc_VH#4同时与TNF α 和NGF二者结合(图5C)。

[0230] B.同时抗原结合的表面等离子体共振

[0231] 同时抗原结合实验主要如Dimasi,N.等人,J Mol Biol.[分子生物学杂志]393:672-92(2009)所述,使用BIAcore 2000仪器(通用电气医疗集团(GE Healthcare))进行。简言之,CM5传感器芯片用于在100nm下固定大约1500个共振单位的TNFR2-Fc_VH#4。然后将传感器芯片表面用于并行结合TNF α 和NGF。在HBS-EP缓冲液[10mM HEPES(pH 7.4)、150mM NaCl、3mM乙二胺四乙酸(EDTA)、0.005% P20]中制备抗原。在所有结合测量中使用30 μl /

min的流速。为了确定多特异性抗体与TNF α 和NGF的同时结合,将1 μ M的TNF α (分子量,17.5kD)注射到传感器芯片表面,并且在注射完成后,然后注射TNF α 和NGF(分子量,13.5kD)(两者均为1 μ M)的混合物。将TNF α 包括在与NGF的混合物中以防止在NGF结合阶段由于TNF α 解离而导致信号损失。作为对照,进行了类似的结合程序,并且在最后一次注射时仅添加了TNF α ,这一注射的共振单位没有进一步增加说明TNF α 以饱和水平结合。进行了类似的结合和对照实验,其中将TNF α 和NGF的注射顺序颠倒。

[0232] TNFR2-Fc_VH#4的同时抗原结合通过表面等离子体共振来表征。按顺序方式对结合事件进行定性分析。用胺缀合化学,将TNFR2-Fc_VH#4共价固定在传感器芯片表面上。随后,注射第一抗原以给出与TNFR2-Fc_VH#4结合的饱和水平,然后将第二抗原作为与抗原1的等摩尔混合物注射。结合传感图清楚地示出TNFR2-Fc_VH#4同时与TNF α 和NGF结合(图6)。无论抗原注射顺序如何,两种抗原都会同时结合。

[0233] 实例4-NGF诱导的TF-1细胞增殖的抑制

[0234] 将TF-1细胞(ECACC目录号93022307)以 1.5×10^4 个细胞/孔接种在96孔组织培养板(康宁科斯塔公司(Corning Costar))中的50 μ l的无血清培养基中,并在37 $^{\circ}$ C下用5% CO₂孵育18小时。将重组人(西格玛公司(Sigma))或小鼠NGF(R&D系统公司(R&D Systems))与TNFR2-Fc_VH#4、MEDI-578IgG1TM YTE(MEDI-578的一种非结合IgG1TM YTE同种型对照)、或非结合双特异性同种型对照R347Bs3Ab的稀释液在96孔圆底板(格瑞纳公司(Greiner))中在37 $^{\circ}$ C下预孵育30分钟。然后将五十微升的每种样品添加到细胞板并在37 $^{\circ}$ C下孵育48小时。孵育期后,添加100 μ l的细胞TITRE GLO[®]测定缓冲液(普洛麦格(Promega)),并将板在37 $^{\circ}$ C下用5%CO₂孵育10分钟。然后使用标准发光方案测量发光。在没有抗体的情况下,标准NGF诱导的TF-1增殖如图7A所示。

[0235] 使用NGF诱导的TF-1增殖来确定TNFR2-Fc_VH#4的功能活性。TNFR2-Fc_VH#4能够完全抑制人和鼠二者NGF诱导的增殖(分别为图7B和7C)。图7B:TF-1细胞用对应于EC₈₀浓度的重组人NGF进行刺激。将细胞与配体使用抗体的稀释系列一起孵育48小时,然后通过用细胞TITRE GLO[®]测定缓冲液(普洛麦格(Promega))培养10分钟来量化细胞增殖。图7C:将TF-1细胞用对应于EC₈₀浓度的重组鼠NGF刺激。将细胞与配体使用抗体的稀释系列一起孵育48小时,然后通过用细胞TITRE GLO[®]测定缓冲液(普洛麦格(Promega))培养10分钟来量化细胞增殖。这些数据表明,TNFR2-Fc_VH#4的NGF抑制部分具有生物活性并抑制NGF诱导的增殖,与作为IgG1TM的MEDI-578具有类似的效力。在TNFR2-Fc_varB和另一种TNF-NGF多特异性结合分子ndimab var B中也观察到了类似的数据(图7D和图7E)。ndimab varB包含完整的抗TNF α 抗体,即,包含处于H₂L₂形式的两条完整重链和两条完整轻链的抗体,其中MEDI-578scFv融合到抗TNF α 抗体重链的C-末端。ndimab varB的轻链在SEQ ID NO:20中描述,并且ndimab varB的重链在SEQ ID NO:22中描述。

[0236] 实例5-TNF α 诱导的U937细胞凋亡的抑制

[0237] 将U937细胞(ECACC目录号85011440)以 8×10^5 个细胞/孔的浓度接种在黑色壁96孔组织培养板(康宁科斯塔公司(Corning Costar))中的50 μ l培养基中。U937细胞用对应于EC₈₀浓度的重组人TNF α 刺激。将细胞与配体使用抗体的稀释系列一起孵育2小时,然后通过用半胱天冬酶3测定反应缓冲液培养2小时来量化半胱天冬酶3的活性。TNFR2-Fc_VH#4、非结合双特异性同种型对照R347Bs3Ab和依那西普与细胞在37 $^{\circ}$ C下预孵育30分钟。然后添加

50 μ l重组人TNF α (R&D系统公司 (R&D Systems)) 以获得20ng/ml的最终测定浓度,并且随后在37 $^{\circ}$ C下孵育2小时。孵育期后,添加50 μ l的半胱天冬酶3测定反应缓冲液(0.2% w/v CHAPS、0.5% v/v Igepal CA-630、200mM NaCl、50mM HEPES、20 μ M DEVD-R110底物(英杰公司 (Invitrogen))),并将细胞在37 $^{\circ}$ C下孵育2.5小时。通过在475nm处激发并在512nm处发射来测量荧光。图8A示出了不存在TNF α 拮抗剂时的半胱天冬酶活性。

[0238] 使用TNF α 诱导的半胱天冬酶3活性测定来确定TNFR2-Fc_VH#4在U937细胞中的功能活性。TNFR2-Fc_VH#4与依那西普一样完全抑制了TNF α 诱导的半胱天冬酶3活性(图8B)。这清楚地说明了TNFR2-Fc_VH#4的TNF α 抑制部分具有生物活性并且具有与依那西普类似的效力。对于TNFR2-Fc_varB和Indimab varB,也观察到了类似的数据(见图8C)。

[0239] 实例6-体内测定

[0240] 所有体内程序都按照英国内政部动物(科学程序)法案(UK Home Office Animals Act) (1986年)进行并得到当地伦理委员会的批准。整个过程使用雌性C57Bl/6小鼠(查尔斯河公司(Charles River),英国)。将小鼠以每笼5/6只为一组,在12小时光/暗周期(07:00-19:00开灯)下,饲养在单独通风的笼(IVC)中(可自由获取食物和水)。将饲养室和操作室维持在24 $^{\circ}$ C下,并通过常规无线电台的方式维持恒定的背景噪音。在每次研究开始前至少5天,出于鉴定目的,所有小鼠都在麻醉(氧气中的3%异氟烷)下接受转调器的插入。

[0241] A. 神经性疼痛的Seltzer模型

[0242] 使用analgysemeter(乌戈巴西莱公司(Ugo Basile))确定机械痛觉过敏(Randall LO, Selitto JJ, Arch Int Pharmacodyn Ther. [国际药效学与治疗文献] 111:409-19 (1957))。对每个后爪的背侧面轮流应用逐渐增加的力直至观察到缩回应答。在这个点上停止力的应用,并记录以克计的重量。对于同侧和对侧爪子,将数据表示为以克计的缩回阈值。在建立基线读数后,将小鼠分成2组,同侧/对侧比率大约相等并接受手术。将小鼠用3%异氟烷麻醉。在此之后,通过在大腿中部水平切开由钝性分离暴露大约1cm左侧坐骨神经。然后,将手术缝合线(10/0维珍丝线(Virgin Silk),爱惜康公司(Ethicon))穿过背部第三神经并绑紧。使用黏合剂闭合切口,并在测试开始之前允许小鼠恢复至少七天。假手术小鼠经历相同的方案,但是在神经暴露后将伤口黏合并允许其恢复。在手术后7天和10天,测试小鼠的痛觉过敏。在第10天测试后,将手术小鼠进一步细分成组,各组分别接受CAT251IgG1同种型对照(0.03mg/kg s.c.)、依那西普(0.01mg/kg s.c.)、MEDI-578(0.03mg/kg s.c.)或依那西普(0.01mg/kg s.c.)和MEDI-578(0.03mg/kg s.c.)的组合。假手术小鼠都接受CAT251(0.03mg/kg s.c.)。在给药后4小时、1、2、3、4和7天,测量机械痛觉过敏。

[0243] 在机械痛觉过敏模型中共同施用依那西普和MEDI-578表现为,与假手术对照相比时,在手术后第10天同侧/对侧比率显著的降低(图9)。施用单剂量的依那西普(0.01mg/kg s.c.)或MEDI-578(0.03mg/kg s.c.)未能显著地逆转这种痛觉过敏。共同施用依那西普(0.01mg/kg s.c.)与MEDI-578(0.03mg/kg s.c.)显著地逆转了给药后4小时的机械痛觉过敏,并且该作用维持至给药后7天。

[0244] 在第二项研究中,评估了TNFR2-Fc_VH#4的作用。在建立机械痛觉过敏后,在手术后第13天,向小鼠给药R347Bs3Ab同种型对照(0.03mg/kg s.c.)、依那西普(0.01mg/kg s.c.)、MEDI-578(0.03mg/kg s.c.)或TNFR2-Fc_VH#4(0.01mg/kg或0.03mg/kg s.c.)。假准备的动物接受R347Bs3Ab同种型对照(0.03mg/kg s.c.)。如上所述,在给药后4小时和给药

后第1、2、4和7天测试小鼠的机械痛觉过敏。

[0245] 与假手术对照相比时,施用TNFR2-Fc_VH#4在手术后第10天产生了同侧/对侧比率的显著降低(图10A)。施用依那西普(0.01mg/kg s.c.)或MEDI-578(0.03mg/kg s.c.)未能显著地逆转该机械痛觉过敏。然而,施用TNFR2-Fc_VH#4(0.01和0.03mg/kg s.c.)在给药后4小时产生了机械痛觉过敏的显著逆转,这种作用维持到给药后6天。施用R347对照Bs3Ab后未见作用。当施用TNFR2-Fc_varB时,观察到了类似的数据(见图10B)。这些数据表明TNFR2-Fc_VH#4可以在非常低的剂量下显著逆转疼痛,而相当的剂量的单独的MEDI-578或依那西普已显示出无效或最低限度有效。

[0246] B. 慢性关节疼痛模型

[0247] 使用小鼠失能测试仪(林顿仪器公司(Linton Instrumentation))确定机械超敏反应。将小鼠置于仪器中,将它们的后爪放在分开的传感器上,并在4秒的时间内计算体重分布。数据表示为以克为单位的同侧和对侧负重的比率。

[0248] 在建立基线读数后,将小鼠分成2组,其同侧/对侧比率大约相等。使用以下技术进行关节内注射:使用氧气中的3%异氟烷将动物麻醉,并将左膝剃毛和清洁。使用安装在100 μ l的Hamilton注射器上的25号针头,向每只小鼠的膝关节注射10 μ l的弗氏完全佐剂(FCA)(10mg/ml)或媒介物(轻质矿物油)。注射液直接进入膝关节的滑膜空间。如上所述,使小鼠恢复并在注射后第7天和第10天重新测试机械超敏反应的变化。在第10天测试后,将FCA处理的小鼠进一步随机分组,并在第13天,向小鼠给药依那西普(0.01mg/kg i.p.)或媒介物,然后这些小鼠接受一剂量的MEDI-578(0.03mg/kg i.v.)或CAT251同种型对照(0.03mg/kg i.v.)。如上所述,在给药后4小时和给药后第1、2、4和7天测试小鼠的机械超敏反应。

[0249] 使用炎性疼痛的关节内FCA模型,评估共同施用依那西普和MEDI-578的作用。关节内施用FCA引起机械超敏反应,该机械超敏反应表现为,与媒介物对照相比,在第7天和第10天同侧/对侧比率显著的降低(图11)。与治疗前基线水平相比,在假治疗组中未观察到同侧/对侧比率的降低。施用依那西普(0.01mg/kg i.p.)+CAT251(0.03mg/kg i.v.)或PBS(10ml/kg i.p.)+MEDI-578(0.03mg/kg i.v.)在给药后4小时和第1、2、4和7天导致FCA诱导的机械超敏反应的轻微逆转,但未能达到统计学显著性。然而,施用依那西普(0.01mg/kg i.p.)+MEDI-578(0.03mg/kg i.v.)在给药后测试的所有时间都导致FCA诱导的机械超敏反应的显著逆转。

[0250] 在第二项研究中,评估了TNFR2-Fc_VH#4的作用。在建立FCA诱导的机械超敏反应后,在FCA后第13天对小鼠给药:R347Bs3Ab同种型对照(0.01mg/kg s.c.)、依那西普(0.01mg/kg s.c.)、MEDI-578(0.01mg/kg s.c.)或TNFR2-Fc_VH#4(0.003mg/kg或0.01mg/kg s.c.)。如上所述,在给药后4小时和给药后第1、2、4和7天,再次测试小鼠的机械超敏反应。

[0251] 图12中示出了与单独的依那西普和MEDI-578的作用相比的TNFR2-Fc_VH#4(“双特异性”)的作用。在给药后的任何时间点,依那西普(0.01mg/kg s.c.)和MEDI-578(0.01mg/kg s.c.)均未显著地逆转FCA诱导的机械超敏反应。然而,施用TNFR2-Fc_VH#4导致FCA诱导的机械超敏反应的显著逆转。较高剂量的TNFR2-Fc_VH#4(0.01mg/kg s.c.)在研究期间示出了显著的活性,而较低剂量(0.003mg/kg s.c.)在给药后第1天达到显著的水平并且在研究期间维持与较高剂量相似的水平。

[0252] C.在大鼠中建立的FCA诱导的机械超敏反应模型

[0253] 足底注射弗氏完全佐剂(FCA)引起炎症反应,该炎症反应导致超敏反应和水肿,并模拟临床炎症疼痛的某些方面。通过使用设备来测量负重可以研究这些作用。使用负重方法,评估TNFR2-Fc_VH#4在FCA诱导的超敏反应中的潜在的抗痛觉过敏特性。初试大鼠在两只后爪之间平均分配体重。然而,当注射的(左)后爪发炎和/或疼痛时,重量被重新分配,使得受影响的爪的负重更小(受伤的爪的负重降低)。使用大鼠失能测试仪(林顿仪器公司(Linton Instruments),英国)测量了通过每个后肢的负重。将大鼠置于失能测试仪中,将其后爪放在分开的传感器上,并在4秒的时间内记录两个后肢施加的平均力。

[0254] 针对本研究,使初试大鼠(雄性,斯普拉格-道利大鼠(Sprague Dawley Rats)(哈伦(Harlan),英国),198-258g)适应它们生活的笼中的操作室,可自由获取食物和水。在几天的时间里,对失能测试仪进行了熟悉。在诱导损伤之前,进行基线负重记录。通过足底注射FCA(可从西格玛公司(Sigma)获得,100 μ l的1mg/ml溶液)到左后爪来诱导炎症超敏反应。在FCA后23小时,进行治疗前负重测量以评估超敏反应。

[0255] 然后将动物进行排序并且根据拉丁方设计中的负重FCA窗口随机分配到治疗组。在FCA注射后24小时,将动物用以下来治疗:TNFR2-Fc_VH#4(“双特异性”)(i.v.给予,0.003、0.01、0.03、0.3和3mg/kg),阴性对照抗体NIP228(针对结合半抗原硝基苯酚产生的抗体)(i.v.给予,3mg/kg),媒介物(1%甲基纤维素)(p.o.给予,2ml/kg)或吲哚美辛(10mg/kg,p.o.给予)。

[0256] 在抗体/药物治疗后4和24小时,评估负重。在每个时间点上通过将治疗组与媒介物对照组进行比较来分析数据。统计分析包括重复量度ANOVA,随后使用InVivoStat(invivostat.co.uk)进行计划比较测试,($p < 0.05$ 认为是显著的)。结果示出于图13中。使用吲哚美辛(10mg/kg)在4小时和24小时观察到了超敏反应的显著逆转。以0.3和3mg/kg给药的TNFR2-Fc_VH#4在4小时和24小时均示出了超敏反应的显著逆转,以0.003和0.03mg/kg给药的TNFR2-Fc_VH#4也示出了超敏反应的显著逆转,但仅在24小时处是如此。同种型对照NIP228在任何时间点对FCA应答都没有显著的作用。

[0257] 实例7-通过TNF α 和NGF进行的p38磷酸化

[0258] 文献表明,p38磷酸化在神经性疼痛的发展中起着重要作用。例如,p38抑制剂治疗已示出可以预防保留神经损伤模型(Wen YR等人,Anesthesiology[麻醉学]2007,107:312-321)和坐骨炎性神经病模型(Milligan ED等人,J Neurosci[神经科学杂志]2003,23:1026-1040)中神经性疼痛症状的发展。在本实验中,在细胞培养测定中研究了TNF α 、NGF以及TNF α 和NGF的组合对p38磷酸化的作用。简言之,将Neuroscreen-1细胞(PC-12大鼠神经内分泌细胞的亚克隆)与增加量的TNF α 、NGF或TNF α 和NGF的组合一起孵育。在20分钟的孵育期后,使用均相时间分辨荧光(HTRF)测定(Cisbio公司(Cisbio))对磷酸化-p38进行量化。

[0259] HTRF测定:在用TNF α 、NGF或TNF α 和NGF的组合刺激后,快速除去细胞上清液并在裂解缓冲液中裂解细胞。使用两种不同的特异性抗体(与钋穴状化合物(供体荧光团)缀合的抗磷酸化-p38抗体和与d2(受体荧光团)缀合的抗p38(总)抗体),以夹心测定形式,在裂解物中检测磷酸化-p38MAPK(Thr180/Tyr182)。抗体与细胞裂解物一起孵育,并且根据在665nm和620nm处的荧光测量(使用EnVision多标记板读取器(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))进行)计算HTRF比率。

[0260] 数据表示为HTRF比率,该比率计算为665nm处的发射与620nm处的发射之间的比率。图14示出了热图,该热图示出了来自磷酸化-p38反应的HTRF比率。图15示出了剂量应答曲线,该剂量应答曲线示出TNF α 、NGF或TNF α 和NGF的组合作用。如从图15可以看出,较高浓度的TNF α 和NGF对磷酸化-p38的组合作用大于由任一因子单独诱导的磷酸化-p38信号的预测总和。这些数据表明,TNF α 和NGF可能共同作用以诱导p38磷酸化,并且这两种途径可能与导致疼痛的分子信号传导有关。

[0261] 实例8-通过TNF α 和NGF进行的ERK磷酸化

[0262] 和p38一样,在神经性疼痛的发展期间,ERK也被活化(Zhuang ZY等人,Pain[疼痛] 2005,114:149-159)。在本实验中,在细胞培养测定中研究了TNF α 、NGF以及TNF α 和NGF的组合对ERK磷酸化的作用。简言之,将Neuroscreen-1细胞(PC-12大鼠神经内分泌细胞的亚克隆)与增加量的TNF α 、NGF或TNF α 和NGF的组合一起孵育。在20分钟的孵育期后,使用HTRF测定(Cisbio公司(Cisbio))对磷酸化-ERK进行量化。

[0263] HTRF测定:刺激后,将细胞上清液迅速除去并且将细胞在裂解缓冲液中裂解。使用两种不同的特异性抗体(与钕穴状化合物(供体荧光团)缀合的抗磷酸化-ERK抗体和与d2(受体荧光团)缀合的抗ERK(总)抗体),以夹心测定形式,在裂解物中检测磷酸化-ERK MAPK (Thr202/Tyr204)。抗体与细胞裂解物一起孵育,并且根据在665nm和620nm处的荧光测量(使用EnVision多标记板读取器(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer)进行)计算HTRF比率。

[0264] 数据表示为HTRF比率,该比率计算为665nm处的发射与620nm处的发射之间的比率。图16示出了热图,该热图示出了来自磷酸化-ERK反应的HTRF比率。图17示出了剂量应答曲线,该剂量应答曲线示出TNF α 、NGF或TNF α 和NGF的组合作用。如从图17中可以看出,低量的单独的TNF α 不会诱导磷酸化-ERK,但是更高的量增强了NGF诱导的磷酸化-ERK。这些数据表明,TNF α 和NGF可能共同作用以诱导p38磷酸化,并且这两种途径可能与导致疼痛的分子信号传导有关。

[0265] 实例9-不同剂量的TNFR2-Fc_varB在患有膝关节的疼痛性骨关节炎的人中的作用

[0266] 针对18至80岁的患有膝关节的疼痛性骨关节炎的受试者,设计了一项多中心、随机、双盲、安慰剂对照的、单次递增剂量(SAD)和多次递增剂量(MAD)交错的研究。SAD队列1包括三名接受TNFR2-Fc_varB的患者和2名接受安慰剂的患者。SAD队列2-7各包括8名患者,每个队列中有六名患者接受TNFR2-Fc_varB并且每个队列中有2名患者接受安慰剂。MAD队列8和9各包括18名患者,每个队列中有12名患者接受TNFR2-Fc_varB并且每个队列中有6名患者接受安慰剂。MAD队列10和11各包括12名患者,每个队列中有9名患者接受TNFR2-Fc_varB并且每个队列中有3名患者接受安慰剂。图18A和图18B中提供了研究设计的简化布局。

[0267] SAD队列中的受试者以双盲方式接受TNFR2-Fc_varB或安慰剂的单次输注。出院后,受试者被指示在每天早上的大约同一时间在11分NRS(0-10)上记录疼痛,以反映24小时的回忆,直到随访期结束。

[0268] 令人惊讶的是,相比于安慰剂,剂量范围为2至1000 μ g/kg的单次静脉内剂量的TNFR2-Fc_varB似乎使每日平均疼痛得分(在峰值作用处)逆转了0.69至3.45分(图19A-图19B)。在50、250和1000 μ g/kg的剂量下,这种作用是统计学显著的($p < 0.01$)。与TNFR2-Fc_varB的半衰期(3-4天)相比,这种作用的持续时间令人惊讶地持续了10天以上。那些接受安慰剂的受试者的疼痛得分的降低似乎是大约0.5分。这种安慰剂作用相对较低并且似乎是

稳定的。

[0269] 西安大略大学和麦克马斯特大学骨关节炎指数 (WOMAC) 是一种基于问卷的工具, 用于测量患有 OA 的受试者因慢性疼痛而导致的功能障碍。令人惊讶的是, 以 0.3 至 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的剂量范围单次施用 TNFR2-Fc_varB, 在 10+ 天的时间段内, 使平均 WOMAC 疼痛分量表得分显著降低了多达约 3 分 (图 20A-图 20B)。在 50、250 和 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的剂量下, 疼痛分量表得分的峰值逆转范围为 2.0-2.9, 并且是统计学显著的, p 值为 0.06 或更小。如与疼痛 NRS 终点一样, 单次给药后作用持续时间 (约 10+ 天) 比对半衰期为 3-4 天的分子所预期的更长。峰值作用对应于分别在 50 和 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的剂量下测量的游离 NGF 的 46% - 55% 的抑制 (图 21)。

[0270] 使用 Singulex 公司的 Erenna 测定来确定 TNFR2-Fc_varB 对外周中的游离 NGF 水平的作用。简言之, 在给药前, 给药后 1、8 和 24 小时, 第 8、15、22、29 天 (第 43 天和第 56 天仅针对两个最高剂量) 的时间点, 从每个受试者采集血样。按照以下步骤制备和测定血浆样品: (1) 将样品与抗 NGF mAb 包被的磁珠混合, (2) 将捕获的 NGF 磁珠复合物与荧光标记的抗人 NGF 抗体混合, (3) 将珠复合物洗脱以释放荧光标记, (4) 在 Erenna 荧光读取器中读取荧光信号。计算了游离 NGF 的抑制, 并且对在 TNFR2-Fc_varB 的每个浓度下给药后 14 天的时间内的平均抑制进行计算并作图 (图 22)。在 14 天内的游离 NGF 的平均抑制的范围为 0 (0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 至约 65% (1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。

[0271] 使用由 Q2Solutions 公司开发的 LC-MS/MS 测定来确定 TNFR2-Fc_varB 对外周中的总 NGF 水平的作用。简言之, 在给药前, 给药后 1、8 和 24 小时, 第 8、15、22、29 天 (第 43 天和第 56 天仅针对两个最高剂量) 的时间点, 从每个受试者采集血样。以在 Neubert 等人, 2013, Anal.Chem. [分析化学], 85:1719-1726 中描述的类似方式制备和测定血清样品。对 SAD 队列 1-4 (0.3-50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 中每个受试者的总 NGF 水平的增加进行计算并作图, 并计算了队列 1-7 中的每一个队列的平均总 NGF 水平。在增加剂量的 TNFR2-Fc_varB 单次施用后, 观察到了总 NGF 水平的明显增加 (图 23; 表 2)。不希望受理论束缚, 该增加可能是由于 NGF 的半衰期与它当前结合的 TNFR2-Fc_varB 的半衰期同步增加。

[0272] 表 2: 用 TNFR2-Fc_varB 治疗后, 外周中的总 NGF 的平均水平

队列	N	RoA	剂量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	观察到的平均 %NGF 抑制	平均总 NGF (pg/mL)
1	3	IV	0.3	3	65.2
2	6	IV	2	27	98.1
3	6	IV	10	29	228.0
4	6	IV	50	35	334.0
5	6	IV	250	59	539.0
6	6	IV	1000	68	199.0*
7	6	SC	50	37	206.0

[0274] *只有 1 名受试者的数据可用。RoA 施用途径, IV = 静脉内, SC = 皮下

[0275] 应该注意的是, 对于每个队列中的两名受试者, 总 NGF 没有明显增加。由于该研究

在本申请提交时仍处于盲态,因此预测这些是安慰剂样品。对于队列3和4,观察到了抗药物抗体对总NGF水平的明显作用。这种作用可能是由于TNFR2-Fc_varB暴露的减少和作用持续时间的相应缩短所致。

[0276] 作为测量TNF α 水平的代替物,可以使用Simoa平台技术测量CXCL-13水平。CXCL-13基因表达受淋巴毒素 α 途径调控。TNFR2-Fc_varB结合TNF α 和淋巴毒素 α ,并且因此假设对CXCL-13表达水平有作用。在给药前,给药后1、8和24小时,第8、15、22、29天(第43天和第56天仅针对两个最高剂量)的时间点,从每个受试者采集血样。制备血清样品并且然后在Simoa CXCL-13测定中进行测定。在施用增加的单剂量TNFR2-Fc_varB后,观察到了明显的剂量应答,观察到增加的CXCL-13水平抑制(图24)。

[0277] 在单次递增剂量后,以不同时间间隔测定静脉内施用的TNFR2-Fc_varB的血清水平。观察到的TNFR2-Fc_varB的血清药代动力学说明,所有队列都有暴露,并且暴露平均地以剂量依赖性方式增加(图25)。图25示出皮下施用提供了超过10天的相对稳定的TNFR2-Fc_varB血清水平。

[0278] 如表3所示,通过比较TNFR2-Fc_varB的50 μ g/kg单剂量皮下施用相比于50 μ g/kg静脉内施用的曲线下面积(AUC)的几何平均值($n=6$),计算经由皮下施用的绝对生物利用度。发现皮下施用TNFR2-Fc_varB的生物利用度令人惊讶地低并且估计为21%。如表3a所示,估计的绝对生物利用度值的90%置信区间为0.1627至0.2781。

[0279] 表3: TNFR2-Fc_varB静脉内和皮下施用的药代动力学初步分析

[0280]

参数 (单位)	统计信息	TNFR2-Fc_varB 剂量 (途径)	
		50 µg/kg (iv)	50 µg/kg (sc)
$C_{\max}$ (ng/mL)	N	6	6
	几何平均值	1082	78.53
	CV (%)	14.04	32.1
$t_{\max}$ (天)	N	6	6
	中值	0.04	7.07
	最小, 最大	0.04, 0.04	7.01, 8.09
$t_{\text{最终}}$ (天)	N	6	6
	中值	10.473	17.622
	最小, 最大	6.95, 27.90	14.01, 29.10
$AUC_{\text{最终}}$ (天.ng/mL)	N	6	6
	几何平均值	3766	801
	CV (%)	26.87	25.16
$AUC_{0-\infty}$ (天.ng/mL)	N	6	1
	几何平均值	4267	NC
	CV (%)	17.89	NC
$t_{1/2}$ (天)	N	6	1
	算术平均值	3.304	NC
	SD	0.5104	NC
V_{ss} (L) ^a	N	6	1
	算术平均值	4.473	NC
	SD	0.3705	NC
CL (L/天) ^a	N	6	1
	算术平均值	0.9649	NC
	SD	0.1582	NC

[0281] 如果 $N < 3$, 则不计算汇总统计信息。[0282] $AUC_{0-\infty}$ 从零到无穷大的浓度时间曲线下面积; $AUC_{\text{最终}}$ 从零到最后一个可量化时间点

的浓度-时间曲线下面积;CL清除率; C_{max} 最大观察浓度;CV变异系数(几何);iv静脉内;Max最大值;min最小值;N受试者数;sc皮下;NC不可计算;SD标准偏差; $t_{1/2}$ 半衰期; $t_{最终}$ 最后观察到的可量化浓度的时间; t_{max} 到 C_{max} 的时间; V_{ss} 稳态分布容积。

[0283] 表3a:经由皮下施用的TNFR2-Fc_varB的绝对生物利用度分析

	参数 (单位)	施用的剂量和途径	n	几何LS平均值	SC和IV施用的比较(几何LS平均值的比率)	
					比率 (SC:IV)	90% CI
[0284]	C_{max} (ng/mL)	50 µg/kg SC	6	78.53	0.0725	0.0563, 0.0935
		50 µg/kg IV	6	1082.47		
	AUC _{最终} (天.ng/mL)	50 µg/kg SC	6	801.17	0.2127	0.1627, 0.2781
		50 µg/kg IV	6	3766.28		

[0285] AUC_{最终}从零到最后一个可量化时间点的浓度-时间曲线下面积; C_{max} 最大观察浓度;IV静脉内;LS最小二乘;n分析中包括的受试者数;PK药代动力学;SC皮下。

[0286] MAD队列中的受试者每2周一次以双盲方式接受范围为1至450µg/kg的TNFR2-Fc_varB重复静脉内输注(总共4次剂量)或安慰剂。观察到的TNFR2-Fc_varB的血清药代动力学说明,所有队列都有暴露,并且暴露平均地以剂量依赖性方式增加(图26)。暴露-应答分析表明,在150-450µg/kg静脉内剂量范围内达到了最大疼痛减轻功效(图27;表4)。

[0287] 表4:用TNFR2-Fc_varB治疗的受试者的NGF和疼痛应答

	队列	N	RoA	剂量 (µg/kg)	观察到的平均 %NGF抑制	在第8周时的 WOMAC (CFB)	在第8周时的 WOMAC (CFP)
[0288]	8	12	IV	1	16	0.2	1.3
	9	11	IV	5	18	-0.8	0.4
[0289]	10	9	IV	50	33	-1.4	-0.3
	11	11	IV	150	37	-2.4	-1.2
	12	7	IV	450	47	-2.3	-1.1

[0290] RoA施用途径;相对于基线的变化(CFB);相对于安慰剂的变化(CFP)。

[0291] 出院后,受试者被指示在每天早上的大约同一时间在11分NRS(0-10)上记录疼痛,以反映24小时的回忆,直到随访期结束。与安慰剂治疗的对照相比,重复注射150µg/kg TNFR2-Fc_varB或450µg/kg TNFR2-Fc_varB使疼痛明显减轻(图28A)。相比于40mg剂量的阿片类羟考酮、2.5mg剂量的抗NGF抗体他尼珠单抗或5mg他尼珠单抗,这两种剂量也导致疼痛的更大程度的减轻(图28B)并且相比于法希奴单抗、福拉奴单抗或他尼珠单抗所实现的疼痛减轻的最大值,这两种剂量在减轻疼痛方面更有效(图28C)。

[0292] 通过免疫原性评估测量了抗药抗体(ADA)水平(Food and Drug Administration

[美国食品药品监督管理局].Guidance for industry[行业指南].Immunogenicity assessment for therapeutic protein products[治疗性蛋白质产品的免疫原性评估].2014年8月.可获得自:<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm338856.pdf>.2018年7月27日访问)。总体而言,接受重复剂量的TNFR2-Fc_varB的受试者的ADA检出率为70%(50名受试者中的35名)。ADA检出率定义为在任何时间(基线和/或基线后)ADA阳性受试者的比例。TNFR2-Fc_varB剂量水平与ADA检出率之间没有明显关系,尽管一小部分患者具有高ADA滴度,如下表5所示。为了确定高ADA滴度是否影响对TNFR2-Fc_varB的暴露和功效,在用150µg/kg TNFR2-Fc_varB治疗的个体受试者中测量了对TNFR2-Fc_varB的暴露、ADA滴度和疼痛减轻。令人惊讶的是,尽管ADA滴度高,还是观察到了显著的对TNFR2-Fc_varB的暴露并且疼痛减轻功效维持>50天(图29)。另外,在具有较低ADA滴度的受试者中,TNFR2-Fc_varB的半衰期更长,并且用450µg/kg TNFR2-Fc_varB治疗的患者中没有具有高ADA滴度(图30)。重要的是,ADA与不良事件之间没有关联。

[0293] 表5:初步分析后剂量组间ADA的检出率。

[0294]	剂量	%ADA+ (治疗的受试者)	最大滴度 (最小-中位数-最大)	< 1000	1000-10,000	> 10,000
	1 µg/kg iv	41.7% (5/12)	120-960-3840	3 (60%)	2 (40%)	0 (0%)
	5 µg/kg iv	72.7% (8/11)	120-1920-15360	3 (37.5%)	4 (50%)	1 (12.5%)
	50 µg/kg iv	88.9% (8/9)	480-3840-61440	2 (25%)	5 (62.5%)	1 (12.5%)
	150 µg/kg iv	81.8% (9/11)	60-1920-30720	2 (22.2%)	5 (55.6%)	2 (22.2%)
	450 µg/kg iv	71.4% (5/7)	30-480-1920	4 (80%)	1 (20%)	0 (0%)
	总计	70.0% (35/50)	30-1920-61440	14 (40%)	17 (48.6%)	4 (11.4%)

[0295] 令人惊讶的是,使用来自试验的MAD阶段的数据,诸位发明人还发现体重不是暴露的临床显著协变量($p=0.61$;图31)。

[0296] 实例10-固定皮下剂量的TNFR2-Fc_varB在患有膝关节的疼痛性骨关节炎的人中的作用

[0297] 基于体重不是暴露于TNFR2-Fc_varB的临床显著协变量的发现,诸位发明人假设TNFR2-Fc_varB的固定给药策略对治疗人类疼痛有效。因此,针对18至80岁的患有膝关节的疼痛性骨关节炎的受试者设计了一项多中心、随机、双盲、安慰剂对照的临床试验。大约300名符合条件的受试者将被随机分配到TNFR2-Fc_varB治疗组或安慰剂组,以确保大约255名

受试者完成治疗期。受试者将在12周期间内每2周一次(Q2W)接受TNFR2-Fc_varB的4个固定皮下剂量(7.5mg、25mg、75mg和150mg)中的一个或安慰剂。预测这些固定皮下剂量的TNFR2-Fc_varB提供分别与静脉内剂量15、50、150和300 μ g/kg的TNFR2-Fc_varB类似的作用,并根据对皮下施用TNFR2-Fc_varB观察到的生物利用度和OA患者的体重分布进行计算。在治疗期中,每位受试者总共将接受6次剂量的TNFR2-Fc_varB或安慰剂。图32中提供了研究设计的简化布局。

[0298] 在开始治疗前14天开始,将指导受试者在每天早上的大约同一时间在11分NRS(0-10)上记录疼痛,以反映24小时的回忆,直到最后一次施用TNFR2-Fc_varB或安慰剂后至少6周。

[0299] 将指导受试者在特定时间点完成WOMAC问卷,从治疗开始前开始,并且在最后一次施用TNFR2-Fc_varB或安慰剂后至少6周时结束。

[0300] 将指导受试者在特定时间点完成患者整体评估(PGA),从治疗开始前开始,并且在最后一次施用TNFR2-Fc_varB或安慰剂后至少6周时结束。PGA是一种用于评估由于膝关节的OA引起的症状和活动障碍的5分李克特量表。要求患者基于如下问题“考虑到膝关节的OA对您的所有影响,您今天感觉怎么样?”,在从1=非常好(无症状并且正常活动不受限制)到5=非常差(难以忍受的非常严重的症状并且不能进行所有正常活动)之间确定一个数字。

[0301] 可以测量TNFR2-Fc_varB对外周中的游离NGF水平的作用。例如,可以在施用后1天开始每周一次测量外周中的游离NGF,直至第12周,并且然后在第18周和第28周再次测量。

[0302] 可以测量TNFR2-Fc_varB对外周中的总NGF水平的作用。例如,可以在施用后1天开始每周一次测量外周中的总NGF直至第12周,并且然后在第18周和第28周再次测量。

[0303] 作为测量TNF α 水平的代替物,可以测量CXCL-13水平。例如,可以在施用后1天开始每周一次测量CXCL-13水平直至第12周,并且然后在第18周和第28周再次测量。

[0304] 序列表

SEQ ID NO: 1 NP_002497.2|β-神经生长因子前体[智人]

1 MSMLFYTLIT AFLIGIQAEF HSESNVPAGH TIPQAHWTKL QHSLDTALRR ARSAPAAAIA
61 ARVAGQTRNI TVDPRLFKKR RLRSFRLVFS TQPPREAADT QDLDFEVGGA APFNRTHRSK
121 RSSSHPIFHR GEFSVCDSVS VWVGDKTTAT DIKGKEVMVL GEVNINNSVF KQYFFETKCR
181 DPNPVDSGCR GIDSKHWNSY CTTHTFTVKA LTMDGKQAAW RFIRIDTACV CVLSRKAVRR
241 A

SEQ ID NO: 2 NP_000585.2|肿瘤坏死因子[智人]

1 MSTESMIRDV ELAEEALPKK TGGPQGSRRRC LFLSLFSFLI VAGATTFLFCL LHFGVIGPQR
61 EEFPRLSLI SPLAQAVRSS SRTPSDKPVA HVVANPQAEQ QLQWLNRRAN ALLANGVELR
121 DNQLVVPSEG LYLIYSQVLF KGQGCPSHV LLTHTISRIA VSYQTKVNL SAIKSPCQRE
181 TPEGAEAKPW YEPIYLGGVF QLEKGDRLSA EINRPDYLDF AESGQVYFGI IAL

SEQ ID NO: 3 MEDI-578 VH (1256A5 VH)

1 QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGGTFS TYGISWVRQA PGQGLEWMGG IIPIFDTGNS
61 AQSFGGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSS RIYDLNPSLT AYYDMDVWGQ
121 GTMVTVSS

SEQ ID NO: 4 MEDI-578 VHCDR1

1 TYGIS

SEQ ID NO: 5 MEDI-578 VHCDR2

1 GIIPIFDTGN SAQSFGQ

[0305]

SEQ ID NO: 6 MEDI-578 VHCDR3

1 SSRIYDLNPS LTAYYDMDV

SEQ ID NO: 7 MEDI-578 VL (1256A5 VL)

1 QSVLTQPPSV SAAPGQKVTI SCSGSSSNIG NNYVSWYQQL PGTAPKLLIY DNNKRPSGIP
61 DRFSGSKSGT SATLGITGLQ TGDEADYYCG TWDSSLSAWV FGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 8 MEDI-578 VLCDR1

1 SGSSSNIGNN YVS

SEQ ID NO: 9 MEDI-578 VLCDR2

1 DNNKRPS

SEQ ID NO: 10 MEDI-578 VLCDR3

1 GTWDSSLSAW V

SEQ ID NO: 11

1 SSRIYDFNSA LISYYDMDV

SEQ ID NO: 12

1 SSRIYDMISS LQPYDMDV

SEQ ID NO: 13 可溶性 TNFR2 氨基酸序列

```

1 LPAQVAFTPY APEPGSTCRL REYYDQTAQM CCSKCSPPGQH AKVFCTKTS D TVCDSCEDST
61 YTQLWNWVPE CLSCGSRCS DQVETQACTR EQNRICTRP GWYCALSKQE GCRLCAPLRK
121 CRPGFGVARP GTETSDVVCK PCAPGTFSNT TSSTDICRPH QICNVVAIPG NASMDAVCTS
181 TSPTRSMAPG AVHLPQPVST RSQHTQPTPE PSTAPSTSFL LPMGPPSPAE GSTGDEPKSC
241 DKHTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
301 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
361 GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPFPVLDS
421 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK

```

SEQ ID NO: 14 TNFR2-Fc_VH#4 - 氨基酸序列

```

1 LPAQVAFTPY APEPGSTCRL REYYDQTAQM CCSKCSPPGQH AKVFCTKTS D TVCDSCEDST
61 YTQLWNWVPE CLSCGSRCS DQVETQACTR EQNRICTRP GWYCALSKQE GCRLCAPLRK
121 CRPGFGVARP GTETSDVVCK PCAPGTFSNT TSSTDICRPH QICNVVAIPG NASMDAVCTS
181 TSPTRSMAPG AVHLPQPVST RSQHTQPTPE PSTAPSTSFL LPMGPPSPAE GSTGDEPKSC
241 DKHTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
301 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
361 GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPFPVLDS
421 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG GSGGGGSQVQ
481 LVQSGAEVKK PGSSVKVSCK ASGGTFSTYG ISWVRQAPGQ GLEWMGGIIP IFDTGNSAQ S
541 FQGRVTITAD ESTSTAYMEL SSLRSED TAV YYCARSSRIY DLNPSLTAYY DMDVWVGQTM
601 VTVSSGGGGG GGGGGGGGGG AQS VLTQPPS VSAAPGQKVT ISCSGSSSNI GNNYVSWYQQ
661 LPGAAPKLLI YDNNKRPSGI PDRFSGSKSG TSATLGITGL QTGDEADYYC GTWDSLSLAW
721 VFGGGTKLTV L

```

SEQ ID NO: 15 (Gly₄Ser)₃ 15aa 接头序列

```

1 GGGGSGGGGS GGGGS

```

[0306]

SEQ ID NO: 16 TNFR2-Fc_VH#4 - 核苷酸序列

```

1 CTGCCCCGCC AGGTGGCCTT TACCCCTTAT GCCCCGAGC CCGGCAGCAC CTGTCGGCTG
61 AGAGAGTACT ACGACCAGAC CGCCCAGATG TGCTGCAGCA AGTGCTCTCC TGGCCAGCAT
121 GCCAAGGTGT TCTGCACCAA GACCAGCGAC ACCGTGTGCG ACAGCTGCGA GGACAGCACC
181 TACACCCAGC TGTGGAAC TGCGCCGAG TGCCCTGAGCT GCGGCAGCAG ATGCAGCAGC
241 GACCAGGTGG AAACCCAGGC CTGCACCAGA GAGCAGAACC GGATCTGCAC CTGTAGACCC
301 GGCTGGTACT GCGCCCTGAG CAAGCAGGAA GGCTGCAGAC TCTGCGCCCC TCTGCGGAAG
361 TGCAGACCCG GCTTTGGCGT GGCCAGACCC GGCACCGAGA CAAGCGACGT GGTCTGTAAG
421 CCCTGCGCTC CTGGCACCTT CAGCAACACC ACCAGCAGCA CCGACATCTG CAGACCCAC
481 CAGATCTGCA ACGTGGTGGC CATCCCCGGC AACGCCAGCA TGGATGCCGT CTGCACCAGC
541 ACTAGCCCCA CCAGAAGTAT GGCCCCCTGGC GCCGTGCATC TGCCCCAGCC TGTGTCCACC
601 AGAAGCCAGC ACACCCAGCC CACCCCTGAG CCTAGCACCG CCCCCTCCAC CAGCTTTCTG
661 CTGCCATATG GCCCTAGCCC TCCAGCCGAG GGAAGCACAG GCGACGAGCC CAAGAGCTGC
721 GACAAGACCC ACACCTGTCC CCCCTGCCCT GCCCTGAAC TGCTGGGCGG ACCCAGCGTG
781 TTCCTGTTCC CCCCAGGCC CAAGGACACC CTGATGATCA GCCGACCCC CGAAGTGACC
841 TGCGTGGTGG TGGACGTGTC CCACGAGGAC CCTGAAGTGA AGTTCAATTG GTACGTGGAC
901 GCGGTGGAAG TGCACAACGC CAAGACCAAG CCCAGAGAGG AACAGTACAA CTCCACCTAC
961 CGGGTGGTGT CCGTGTCTGAC CGTGTCTGAC CAGGACTGGC TGAACGGCAA AGAGTACAAG
1021 TGCAAGGTCT CCAACAAGGC CCTGCCTGCC CCCATCGAGA AAACCATCAG CAAGGCCAAG
1081 GGCCAGCCCC GCGAGCCTCA GGTGTACACA CTGCCCCCCA GCCGGAAGA GATGACCAAG
1141 AACCAGGTGT CCCTGACCTG CCTGGTCAA GGCTTCTACC CCAGCGATAT CGCCGTGGAA
1201 TGGGAGAGCA ATGGCCAGCC CGAGAACAAC TACAAGACCA CCCCCCTGT GCTGGACAGC
1261 GACGGCTCAT TCTTCTGTGA CAGCAAGCTG ACCGTGGACA AGAGCCGGTG GCAGCAGGGC
1321 AACGTGTTCA GCTGCAGCGT GATGCACGAG GCCCTGCACA ACCACTACAC CCAGAAGTCC
1381 CTGAGCCTGA GCCCCGAAA GGGCGGTGGC GGATCCGGAG GTGGGGGATC TCAGGTGCAG
1441 CTGGTGCAGT CTGGCGCCGA AGTGAAGAAA CCCGGCTCTA GCGTGAAGGT GTCCTGCAAG
1501 GCCAGCGGCG GCACCTTCTC CACCTACGGC ATCAGCTGGG TCCGCCAGGC CCCTGGACAG
1561 GGCCTGGAAT GGATGGGCGG CATCATCCCC ATCTTCGACA CCGGCAACAG CGCCAGAGC
1621 TTCCAGGGCA GAGTGACCAT CACCGCCGAC GAGAGCACCT CCACCGCCTA CATGGAAGT

```

```

1681 AGCAGCCTGC GGAGCGAGGA CACCGCCGTG TACTACTGCG CCAGAAGCAG CCGGATCTAC
1741 GACCTGAACC CCAGCCTGAC CGCCTACTAC GACATGGACG TGTGGGGCCA GGGCACCATG
1801 GTCACAGTGT CTAGCGGAGG CGGCGGATCT GGC GGCGGAG GAAGTGGCGG GGGAGGATCT
1861 GCCCAGAGCG TGCTGACCCA GCCCCCTTCT GTGTCTGCCG CCCCTGGCCA GAAAGTGACC
1921 ATCTCCTGCA GCGGCAGCAG CAGCAACATC GGCAACAAC ACCTGTCTCTG GTATCAGCAG
1981 CTGCCCCGCA CCGCCCCCTAA GCTGCTGATC TACGACAACA ACAAGCGGCC CAGCGGCATC
2041 CCCGACCGGT TTAGCGGCAG CAAGAGCGGG ACTTCTGCTA CACTGGGCAT CACAGGCCTG
2101 CAGACCGGCG ACGAGGCCGA CTACTACTGC GGCACCTGGG ACAGCAGCCT GAGCGCTTGG
2161 GTGTTCCGCG GAGGCACCAA GCTGACAGTG CTG

```

SEQ ID NO: 17 - TNFR2-Fc_varB - 氨基酸序列

```

1 LPAQVAFTPY APEPGSTCRL REYYDQTAQM CCSKCSPGQH AKVFCTKTS D TVCDSCEDST
61 YTQLWNWVPE CLSCGSRCS DQVETQACTR EQNRICTCRP GWYCALSKQE GCRLCAPLRK
121 CRPGFGVARP GTETSDVVC PCAPGTFSNT TSSTDICRPH QICNVVAIPG NASMDAVCTS
181 TSPTRSMAPG AVHLPQPVST RSQHTQPTPE PSTAPSTSFL LPMGPPSPAE GSTGDEPKSC
241 DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
301 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTIKAK
361 GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
421 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG GSGGGGSQVQ
481 LVQSGAEVKK PGSSVKVSCK ASGGTFSTYG ISWVRQAPGQ CLEWMGGIIP IFDTGNSAQ S
541 FQGRVTITAD ESTSTAYMEL SSLRSEDTAV YYCARSSRIY DLNPSLTAYY DMDVWGQGT M
601 VTVSSGGGGG GGGGSGGGGS GGGGSQSVLT QPPSVSAAPG QKVTISCSGS SSNIGNNYVS
661 WYQQQLPGTAP KLLIYDNNKR PSGIPDRFSG SKSGTSATLG ITGLQTGDEA DYYCGTWDSS
721 LSAWVFGCGT KLTVL

```

SEQ ID NO: 18 - TNFR2-Fc_varB - 核苷酸序列

[0307]

```

1 CTGCCCCGCC AGGTGGCCTT TACCCCTTAT GCCCCGAGC CCGGCAGCAC CTGTGCGCTG
61 AGAGAGTACT ACGACCAGAC CGCCAGATG TGCTGCAGCA AGTGCTCTCC TGGCCAGCAT
121 GCCAAGGTGT TCTGCACCAA GACCAGCGAC ACCGTGTGCG ACAGCTGCGA GGACAGCACC
181 TACACCCAGC TGTGGAAGTG GGTGCCCGAG TGCCTGAGCT GCGGCAGCAG ATGCAGCAGC
241 GACCAGGTGG AAACCCAGGC CTGCACCAGA GAGCAGAACC GGATCTGCAC CTGTAGACCC
301 GGCTGGTACT GCGCCCTGAG CAAGCAGGAA GGCTGCAGAC TCTGCGCCCC TCTGCGGAAG
361 TGCAGACCCG GCTTTGGCGT GGCCAGACCC GGCACCGAGA CAAGCAGCGT GGTCTGCAAG
421 CCCTGCGCTC CTGGCACCTT CAGCAACACC ACCAGCAGCA CCGACATCTG CAGACCCAC
481 CAGATCTGCA ACGTGCTGGC CATCCCCGGC AACGCCAGCA TGGATGCCGT GTGCACCAGC
541 ACCAGCCCCA CCAGAAGTAT GGCCCTGGC GCCGTGCATC TGCCCCAGCC TGTGTCCACC
601 AGAAGCCAGC ACACCCAGCC CACCCCTGAG CCTAGCACCG CCCCCTCCAC CAGCTTTCTG
661 CTGCCTATGG GCCCTAGCCC TCCAGCCGAG GGAAGCACAG GCGACGAGCC CAAGAGCTGC
721 GACAAGACCC ACACCTGTCC CCCCTGCCCT GCCCTGAAC TGCTGGGCGG ACCCAGCGTG
781 TTCCTGTTC CCCCAGGCC CAAGGACACC CTGATGATCA GCCGGACCCC CGAAGTGACC
841 TGCGTGGTGG TGGACGTGTC CCACGAGGAC CCTGAAGTGA AGTTCAATTG GTACGTGGAC
901 GGCGTGGAAG TGCACAACGC CAAGACCAAG CCCAGAGAGG AACAGTACAA CTCCACCTAC
961 CGGGTGGTGT CCGTGCTGAC CGTGCTGCAC CAGGACTGGC TGAACGGCAA AGAGTACAAG
1021 TGCAAAGTCT CCAACAAGGC CCTGCCTGCC CCCATCGAGA AAACATCAG CAAGGCCAAG
1081 GGCCAGCCCC GCGAGCCTCA gGTGTACACA CTGCCCCCA GCCGGGAAGA GATGACCAAG
1141 AACCAGGTGT CCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTACC CCAGCGATAT CGCCGTGGAA
1201 TGGGAGAGCA ACGGCCAGCC CGAGAACAAC TACAAGACCA CCCCCCTGT GCTGGACAGC
1261 GACGGCTCAT TCTTCTGTG CAGCAAGCTG ACCGTGGACA AGAGCCGGTG GCAGCAGGGC
1321 AATGTCTTCA GCTGTAGCGT GATGCACGAG GCCCTGCACA ACCACTACAC CCAGAAGTCC
1381 CTGAGCCTGA GCCCCGAAA GGGCGGAGGC GGATCCGGAG GTGGGGGATC TCAGGTGCAG
1441 CTGGTGCACT CTGGCGCCGA AGTGAAGAAA CCCGGCTCTA GCGTGAAGGT GTCCTGCAAG
1501 GCCAGCGGCG GCACCTTCTC CACCTACGGC ATCAGCTGGG TCCGCCAGGC CCCTGGACAG
1561 TGTCTGGAAT GGATGGGCGG CATCATCCCC ATCTTCGACA CCGCAACAG CGCCAGAGC
1621 TTCCAGGGCA GAGTGACCAT CACCGCCGAC GAGAGCACCT CCACCGCTA CATGGAAGT
1681 AGCAGCCTGC GGAGCGAGGA CACCGCCGTG TACTACTGCG CCAGAAGCAG CCGGATCTAC
1741 GACCTGAACC CCAGCCTGAC CGCCTACTAC GACATGGACG TGTGGGGCCA GGGCACCATG
1801 GTCACAGTGT CTAGCGGAGG CGGAGGCAGC GGAGGTGGTG GATCTGGTGG CGGAGGAAGT
1861 GCGGCGGAG GCTCTCAGAG CGTGCTGACC CAGCCCCCTT CTGTGTCTGC CGCCCTGGC
1921 CAGAAAGTGA CCATCTCCTG CAGCGGCAGC AGCAGCAACA TCGGCAACAA CTACGTGTCC

```

```

1981 TGGTATCAGC AGCTGCCCCG CACCGCCCCT AAGCTGCTGA TCTACGACAA CAACAAGCGG
2041 CCCAGCGGCA TCCCCGACCG GTTTAGCGGC AGCAAGAGCG GGACTTCTGC TACACTGGGC
2101 ATCACAGGCC TGCAGACCGG CGACGAGGCC GACTACTACT GCGGCACCTG GGACAGCAGC
2161 CTGAGCGCTT GGGTGTTCGG CTGCGGCACC AAGCTGACAG TGCTG

```

SEQ ID NO: 19 - (Gly₄Ser)₄ 20aa 接头序列

```

1 GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS

```

SEQ ID NO: 20 - ndimab varB - L 链氨基酸序列

```

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVY SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRAIGIPA
61 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPFTFG PGTKVDIKRT VAAPSVFIFP
121 PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL
181 TLSKADYEKH KVIACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC

```

SEQ ID NO: 21 - ndimab varB - L 链核苷酸序列

```

1 GAAATCGTGC TGACCCAGAG CCCC GCCACC CTGTCTCTGA GCCCTGGCGA GAGAGCCACC
61 CTGAGCTGCA GAGCCAGCCA GAGCGTGTAC TCCTACCTGG CTTGGTATCA GCAGAAGCCC
121 GGCCAGGCCC CCAGACTGCT GATCTACGAC GCCAGCAACC GGGCCATCGG CATCCCTGCC
181 AGATTTTCTG GCAGCGGCAG CGGCACCGAC TTCACCCTGA CCATCAGCAG CCTGGAACCC
241 GAGGACTTCG CCGTGTACTA CTGCCAGCAG CGGAGCAACT GGCCCCCTT CACCTTCGGC
301 CCTGGCACCA AGGTGGACAT CAAGCGTACG GTGGCTGCAC CATCTGTCTT CATCTTCCC
361 CCATCTGATG AGCAGTTGAA ATCTGGAAC GCCTCTGTTG TGTGCCTGCT GAATAACTTC
421 TATCCAGAG AGGCCAAAGT ACAGTGGAAG GTGGATAACG CCCTCCAATC GGGTAACTCC
481 CAGGAGAGTG TCACAGAGCA GGACAGCAAG GACAGCACCT ACAGCCTCAG CAGCACCTG
541 ACGCTGAGCA AAGCAGACTA CGAGAAACAC AAAGTCTACG CCTGCGAAGT CACCCATCAG
601 GGCCTGAGCT CGCCCGTCAC AAAGAGCTTC AACAGGGGAG AGTGT

```

[0308]

SEQ ID NO: 22 - ndimab varB - H 链氨基酸序列

```

1 QVQLVESGGG VVQPRSLRL SCAASGFIFS SYAMHWVRQA PNGLEWVAF MSYDGSNKKY
61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDR GISAGGNYYY YGMDVWGQGT
121 TVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP
181 AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKRVEPKSCD KTHTCPPCPA
241 PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
301 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL
361 PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPLVLDSD GSFFLYSKLT
421 VDKSRWQQGN VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL SLSPGKGGGG SGGGGSQVQL VQSGAEVKKP
481 GSSVKVSCA SGGTFSTYGI SWVRQAPGQC LEWMGGIIPI FDTGNSAQSF QGRVTITADE
541 STSTAYMELS SLRSEDVAVY YCARSSRIYD LNPSLTAYYD MDVWGQGTMTV TVSSGGGGSG
601 GGGSGGGGSG GGGSQSVLTQ PPSVSAAPGQ KVTISCSGSS SNIGNNYVSW YQQLPGTAPK
661 LLIYDNNKRP SGIPDRFSGS KSGTSATLGI TGLQTGDEAD YYCGTWDSSL SAWVFGCGTK
721 LTVL

```

SEQ ID NO: 23 - ndimab varB - H 链核苷酸序列

```

1 CAGGTGCAGC TGGTGGAAG CGGCGGAGGC GTGGTGCAGC CCGGCAGAAG CCTGAGACTG
61 AGCTGCGCTG CCAGCGGCTT CATCTTCAGC AGCTACGCCA TGCACTGGGT CCGCCAGGCC
121 CCTGGCAACG GACTGGAATG GGTGGCCTTC ATGAGCTACG ACGGCAGCAA CAAGAAGTAC
181 GCCGACAGCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC AGCCGGGACA ACAGCAAGAA CACCCTGTAC
241 CTGCAGATGA ACAGCCTGCG GGCTGAGGAC ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CAGAGACCGA
301 GGCATCAGTG CTGGCGGCAA CTACTACTAC TACGGCATGG ACGTGTGGGG CCAGGGCACC
361 ACCGTGACCG TGTCTAGCGC GTCGACCAAG GGCCCATCCG TCTTCCCCCT GGCACCCTCC
421 TCCAAGAGCA CCTCTGGGGG CACAGCGGCC CTGGGCTGCC TGGTCAAGGA CTACTTCCCC
481 GAACCGGTGA CGGTGTCCTG GAACTCAGGC GCTCTGACCA GCGGCGTGCA CACCTTCCCC
541 GCTGTCTTAC AGTCCTCAGG ACTCTACTCC CTCAGCAGCG TGGTGACCGT GCCCTCCAGC
601 AGCTTGGGCA CCCAGACCTA CATCTGCAAC GTGAATCACA AGCCAGCAA CACCAAGGTG
661 GACAAGAGAG TTGAGCCCAA ATCTTGTGAC AAAACTCACA CATGCCACC GTGCCAGCA

```

```

721 CCTGAACTCC TGGGGGGACC GTCAGTCTTC CTCTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC
781 ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTACATGTC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT
841 GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG
901 CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG TCCTCACCCT CCTGCACCAG
961 GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC
1021 ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT CTACACCCTG
1081 CCCCCATCCC GGGAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTACAGC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC
1141 TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACCTAC
1201 AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTATAG CAAGCTCACC
1261 GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT
1321 CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC CGGGTAAAGG CGGAGGGGGA
1381 TCCGGCGGAG GGGGCTCTCA GGTGCAGCTG GTGCAGTCTG GCGCCGAAGT GAAGAAACCC
1441 GGCTCTAGCG TGAAGGTGTC CTGCAAGGCC AGCGGCGGCA CTTTCTCCAC CTACGGCATC
1501 AGCTGGGTCC GCCAGGCCCC TGGACAGTGT CTGGAATGGA TGGGCGGCAT CATCCCCATC
1561 TTCGACACCG GCAACAGCGC CCAGAGCTTC CAGGGCAGAG TGACCATCAC CGCCGACGAG
1621 AGCACCTCCA CCGCTACAT GGAAGTGAAG AGCCTGCGGA GCGAGGACAC CGCCGTGTAC
1681 TACTGCGCCA GAAGCAGCCG GATCTACGAC CTGAACCCCA GCCTGACCGC CTACTACGAC
1741 ATGGACGTGT GGGGCCAGGG CACCATGGTC ACAGTGTCTA GCGGAGGCGG AGGCAGCGGA
1801 GGTGGTGGAT CTGGTGGCGG AGGAAGTGGC GCGGAGGCT CTCAGAGCGT GCTGACCCAG
1861 CCCCCTTCTG TGTCTGCCGC CCCTGGCCAG AAAGTGACCA TCTCCTGCAG CGGCAGCAGC
1921 AGCAACATCG GCAACAATA CGTGTCTCTG TATCAGCAGC TGCCCGGCAC CGCCCTAAG
1981 CTGCTGATCT ACGACAACAA CAAGCGGCCC AGCGGCATCC CCGACCGGTT TAGCGGCAGC
2041 AAGAGCGGGA CTTCTGCTAC ACTGGGCATC ACAGGCCTGC AGACCGGCGA CGAGGCCGAC
2101 TACTACTGCG GCACCTGGGA CAGCAGCCTG AGCGCTTGGG TGTTCTGGCTG CGGCACCAAG
2161 CTGACAGTGC TG

```

SEQ ID NO: 24 - NGF-NG VH 氨基酸序列

[0309]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFWFGAFTWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGLTNLAQNFQGRVTITADES
TSTVYMEISSLRSEDYAVYYCARSSRIYDLNPSLTAYYDMVWGQGMVTVSS

SEQ ID NO: 25 - NGF-NG VH 核苷酸序列

```

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc      60
tcttgaagc cctctggagg caccttcttg ttcggcgcggt tcacctgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag gacttgagtg gatgggaggg attattccta tcttcggggt gacgaacttg      180
gcacagaact tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagtctac      240
atggagctga gcagcttgag atctgaagac acggccgtat attattgtgc acgttcaagt      300
cgtatctacg atctgaaccc gtccctgacc gcctactacg atatggatgt ctggggccag      360
gggacaatgg tcaccgtctc gagt                                384

```

SEQ ID NO: 26 - NGF-NG VL 氨基酸序列

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSDIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 27 - NGF-NG VL 核苷酸序列

```

cagtctgtgc tgactcagcc gccatcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc      60
tctgctctg gaagcagctc cgacattggg aataattatg tatcgtggta ccagcagctc      120
ccaggaacag ccccaaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct      180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcagc tcagccaccc tgggcatcac cggactccag      240
actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gcagcctgag tgcttggggtg      300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta                                330

```

SEQ ID NO: 28 - ndimab VH 氨基酸序列

1 QVQLVESGGG VVQPGSLRL SCAASGFIFS SYAMHWVRQA PNGLEWVAF MSYDGSNKKY
61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDR GISAGGNYYY YGMDVWGQGT
121 TVTVSS

SEQ ID NO: 29 - ndimab VL 氨基酸序列

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVY SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRAIGIPA
61 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPFTFG PGTKVDIK

SEQ ID NO: 30 - 1126F1 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDANRQAVPYDMDVWGQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 31 - 1126F1 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSVSTPPGQMVTISCSGSSSDIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 32 - 1126G5 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDFTSGLAPYYDMDVWGQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 33 - 1126G5 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPPGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSTWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 34 - 1126H5 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDAGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAHMEVSSLRSED TAVYYCASSSRIYDHHIQKGGYYDMDVWGQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 35 - 1126H5 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 36 - 1127D9 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDYHTIAYYD

SEQ ID NO: 37 - 1127D9 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 38 - 1127F9 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMKVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDIIPGMRPYDMDVWGQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 39 - 1127F9 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSVSTPPGQKVTISCSGNSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSRSGTLATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 40 - 1131D7 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDFNSSLIAYYDMDVWGQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 41 - 1131D7 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDETDYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

[0310]

SEQ ID NO: 42 - 1131H2 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGSTVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDGTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMVWGQGTMTVSS

SEQ ID NO: 43 - 1131H2 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGTSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 44 - 132A9 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDFEPLIYYDMVWGQGTMTVSS

SEQ ID NO: 45 - 132A9 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 46 - 1132H9 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDGTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMVWGQGTMTVSS

SEQ ID NO: 47 - 1132H9 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSDIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPTGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 48 - 1133C11 VH 氨基酸序列

[0311]

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDGTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMVWGQGTMTVSS

SEQ ID NO: 49 - 1133C11 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 50 - 1134D9 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDGTGNSAQSFQGRVAITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMVWGQGTMTVSS

SEQ ID NO: 51 - 1134D9 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 52 - 1145D1 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDTSNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDFRTLYSTYYDMVWGQGTMTVSS

SEQ ID NO: 53 - 1145D1 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGISDRFSGSKSGTSATLG
IAGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 54 - 1146D7 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDGTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMVWGQGTMTVSS

SEQ ID NO: 55 - 1146D7 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSSVSTPPGQEVITISCSGSSSTNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTDSSLSAWVFVGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 56 - 1147D2 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGSSVRISCKASGGTFSTYGVSWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDGTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGTMTVSS

SEQ ID NO: 57 - 1147D2 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTDSSLSAWVFVGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 58 - 1147G9 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGVSWVRQAPGQGLEWIGGIIPFNTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGTMTV

SEQ ID NO: 59 - 1147G9 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTVSCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTDSSLSAWVFVGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 60 - 1150F1 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGVSWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDGTGNSAQSFQDRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGHTMTVSS

SEQ ID NO: 61 - 1150F1 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTDSSLSAWVFVGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 62 - 1152H5 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGVSWVRQAPGQGLVWIGGIIPFDGTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDMISSLQPYDMDVWGQGTMTVSS

SEQ ID NO: 63 - 1152H5 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSSVSTPPGQKATISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTDSSLSAWVFVGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 64 - 1155H1 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGVSWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDGTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDFHLANKGYDMDVWGQGTMTVSS

SEQ ID NO: 65 - 1155H1 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSSVSTPPGQKATISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLD
ITGLQTGDEADYYCGTDSSLSAWVFVGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 66 - 1158A1 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGVSWVRQAPGQGLEWIGGIIPFGTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDHHNHVGGYYDMDVWGQGTMTVSS

SEQ ID NO: 67 - 1158A1 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYASWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTDGSLAWVFVGGGTKLTVL

[0312]

SEQ ID NO: 68 - 1160E3 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGSSAKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 69 - 1160E3 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSNSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 70 - 1165D4 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 71 - 1165D4 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSNSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 72 - 1175H8 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDATTGLTPYYDMDVWGQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 73 - 1175H8 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSNSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLRTGDEADYYCGTDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 74 - 1211G10 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVRKPGSSSVKVSCKAYGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWVGIIPIFDTRNAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDMVSTLIPYYDMDVWGQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 75 - 1211G10 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSNSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 76 - 1214A1 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDAHLQAYYDMDVWGQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 77 - 1214A1 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSNSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPPGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTRDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 78 - 1214D10 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEAKKPGSSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGRGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVAITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDAHLNHHGYDMDVWGQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 79 - 1214D10 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSNSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQAGDEADYYCGTDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 80 - 1218H5 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAVVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGSSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGTMTVTVSS

[0313]

SEQ ID NO: 81 - 1218H5 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQQLSGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 82 - 1230H7 VH 氨基酸序列

EMQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDFNSALISYYDMDVWGQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 83 - 1230H7 VL 氨基酸序列

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 84 - 1083H4 VH 氨基酸序列

QMQLVQSGAEVKKGTGSSSVKVSCKASGYTFAYHYLHWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTTNYAQRFDQDRVTITADES
TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASADYVWGSYRPDWFYFDLWGRGTMVTVSS

SEQ ID NO: 85 - 1083H4 VL 氨基酸序列

QSVLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSSSNIGSNTVNWYQRLPGAAPQLLIYNNDQRPSGIPDRFSGSKSGTSGSLV
ISGLQSEDEADYYCASWDDSLNGRVFVGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 86 - 1227H8 VH 氨基酸序列

QMQLVQSGAEVKKGTGSSSVKVSCKASGHTFAYHYLHWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTTNYAQRFDQDRVTITADES
TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASADYAWESYQPPQINGVWGRGTMVTVSS

SEQ ID NO: 87 - 1227H8 VL 氨基酸序列

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTITCSGSTSNIGNNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVS KRPSGVPDRFSGSKSGNSASLD
ISGLQSEDEADYYCAAWDDSLSEFFFGTGKLTVL

[0314]

SEQ ID NO: 88 - NGF-NG HCDR1

FGAFT

SEQ ID NO: 89 - NGF-NG HCDR2

GIIPIFGLTNLAQNFQG

SEQ ID NO: 90 - NGF-NG HCDR3

SSRIYDLNPSLTAYYDMDV

SEQ ID NO: 91 - NGF-NG LCDR1

SGSSSDIGNNYVS

SEQ ID NO: 92 - NGF-NG LCDR2

DNNKRPS

SEQ ID NO: 93 - NGF-NG LCDR3

GTWDSSLSAWV

SEQ ID NO: 94 - 具有 G->C 的 MEDI-578 VH 氨基酸序列

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGGTFS TYGISWVRQA PGQCLEWMGG IIPIDFTGNS
AQSFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSS RIYDLNPSLT AYYDMDVWGQ
GTMVTVSS

SEQ ID NO: 95 - 具有 G->C 的 MEDI-578 VL 氨基酸序列

QSVLTQPPSV SAAPGQKVTI SCSGSSSNIG NNYVSWYQQL PGTAPKLLIY DNNKRPSGIP
DRFSGSKSGT SATLGITGLQ TGDEADYYCG TWDSSLSAWV FGCCTKLTVL

SEQ ID NO: 96 - 1230D8 VH 氨基酸序列

QMQLVQSGAEVKKTGSSSVKVSCKASGYTFPHYHLHWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTTNYAQRFDRTITADES
TSTAYMEFSSLRSEDTAVYYCASADYVWESYHPATSLSLWGRGTMVTSS

SEQ ID NO: 97 - 1230D8 VL 氨基酸序列

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCPGSTSNIGNNYVSWYQQRPGKAPKLMIDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNSASLD
ISELQSEDEADYYCAAWDDSLSEFLFGTGTCLTVL

SEQ ID NO: 98

GGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 99 - TNFR2-Fc_varB - 经密码子优化的核苷酸序列

[0315]

1	CTGCCCCGCC	AGGTGGCCTT	TACCCCTTAT	GCTCCTGAGC	CCGGCTCTAC	CTGCCGGCTG
61	AGAGAGTACT	ACGACCAGAC	CGCCAGATG	TGCTGCTCCA	AGTGCTCTCC	TGGCCAGCAC
121	GCCAAGGTGT	TCTGCACCAA	GACCTCCGAT	ACCGTGTGCG	ACTCCTGCGA	GGACTCCACC
181	TACACCCAGC	TGTGGAACGT	GGTGCCCGAG	TGCCTGTCCT	GCGGCTCCAG	ATGTTCCCTC
241	GACCAGGTGG	AAACCCAGGC	CTGCACCAGA	GAGCAGAACC	GGATCTGCAC	CTGTCGGCCT
301	GGCTGGTACT	GCGCCCTGTC	TAAGCAGGAA	GGCTGCAGAC	TGTGCGCCCC	TCTGCGGAAG
361	TGTAGACCTG	GCTTTGGCGT	GGCCAGACCC	GGCACCAGAG	CATCTGATGT	CGTGTGCAAG
421	CCTTGCGCCC	CTGGCACCTT	CTCCAACACC	ACCTCCTCCA	CCGACATCTG	CCGGCCTCAC
481	CAGATCTGCA	ACGTGGTGGC	CATCCCTGGC	AACGCCTCTA	TGGACGCCGT	GTGCACCTCT
541	ACCTCCCCCA	CCAGAAGTAT	GGCCCTGGC	GCTGTGCATC	TGCCCCAGCC	TGTGTCTACC
601	AGATCCAGC	ACACCCAGCC	CACCCCTGAG	CCTTCTACCG	CCCCCTCTAC	CAGCTTCCTG
661	CTGCCTATGG	GCCCTAGCCC	TCCTGCTGAG	GGATCTACAG	GCGACGAGCC	CAAGTCCTGC
721	GACAAGACCC	ACACCTGTCC	CCCTTGCTCT	GCCCCCTGAAC	TGCTGGGCGG	ACCTTCCGTG
781	TTCCTGTTCC	CCCCAAAGCC	CAAGGACACC	CTGATGATCA	GCCGGACCCC	TGAAGTGACC
841	TGCGTGGTGG	TGGATGTGTC	CCACGAGGAT	CCCGAAGTGA	AGTTCAATTG	GTACGTGGAC
901	GGCGTGGAAG	TGCACAACGC	CAAGACCAAG	CCCAGAGAGG	AACAGTACAA	CTCCACCTAC
961	CGGGTGGTGT	CCGTGCTGAC	CGTGCTGCAC	CAGGATTGGC	TGAACGGCAA	AGAGTACAAG
1021	TGCAAGGTGT	CCAACAAGGC	CCTGCCTGCC	CCCATCGAAA	AGACCATCTC	CAAGGCCAAG
1081	GGCCAGCCCC	GGGAACCCCA	GGTGTACACA	CTGCCCCCTA	GCCGGGAAGA	GATGACCAAG
1141	AACCAGGTGT	CCCTGACCTG	TCTCGTGAAG	GGCTTCTACC	CCTCCGATAT	CGCCGTGGAA
1201	TGGGAGTCCA	ACGGCCAGCC	TGAGAACAAC	TACAAGACCA	CCCCCCTGT	GCTGGACTCC
1261	GACGGCTCAT	TCTTCCTGTA	CTCCAAGCTG	ACAGTGGACA	AGTCCCGGTG	GCAGCAGGGC
1321	AACGTGTTCT	CCTGCTCCGT	GATGCACGAG	GCCCTGCACA	ACCACTACAC	CCAGAAGTCC
1381	CTGTCCCTGA	GCCCTGGAAA	AGGCGCGGGA	GGATCTGGCG	GAGGCGGATC	TCAGGTGCAG
1441	CTGGTGCAGT	CTGGCGCTGA	AGTGAAGAAA	CCCGGCTCCT	CCGTGAAGGT	GTCCTGCAAG
1501	GCTTCTGGCG	GCACCTTCTC	TACCTACGGC	ATCTCCTGGG	TGCGACAGGC	CCCTGGCCAG
1561	TGCCTGGAAT	GGATGGGCGG	CATCATCCCC	ATCTTCGACA	CCGGCAACTC	CGCCAGAGC
1621	TTCCAGGGCA	GAGTGACCAT	CACCGCCGAC	GAGTCTACCT	CCACCGCCTA	CATGGAAGT
1681	TCCTCCCTGC	GGAGCGAGGA	CACCGCCGTG	TACTACTGCG	CCGGTCCCTC	TCGGATCTAC
1741	GACCTGAACC	CTTCCCTGAC	CGCCTACTAC	GACATGGACG	TGTGGGGGCG	GGGCACAATG
1801	GTCACCGTGT	CATCTGGTGG	TGGCGGCTCT	GGTGGCGGAG	GAAGTGGGGG	AGGGGGTTCT
1861	GGGGGGGGAG	GATCTCAGTC	TGTGCTGACC	CAGCCTCCTT	CCGTGTCTGC	TGCCCCAGGC
1921	CAGAAAGTGA	CAATCTCCTG	CAGCGGCTCC	AGCTCCAACA	TCGGCAACAA	CTACGTGTCC
1981	TGGTATCAGC	AGCTGCCCGG	CACCGCTCCC	AAACTGCTGA	TCTACGATAA	CAACAAGCGG
2041	CCCTCCGGCA	TCCCCGACAG	ATTCTCCGGC	TCTAAGTCCG	GCACCTCTGC	CACCTGGGGC
2101	ATCACCGGAC	TGCAGACAGG	CGACGAGGCC	GACTACTACT	GTGGCACCTG	GGACTCCTCC
2161	CTGTCCGCTT	GGGTGTTCCG	CTGCGGCACC	AAACTGACTG	TGCTG	

[0316] 本披露范围不受所描述的具体方面的限制,这些方面旨在作为本披露的单独方面的简单说明,并且在功能上等效的任何组合物或方法均处于本披露的范围内。事实上,除了本文示出和描述的那些修改以外,本披露的各种修改通过前述说明书和附图对于本领域技

术人员来说将变得清楚。此类修改旨在落入所附权利要求书的范围内。

[0317] 本说明书中所提及的所有公开和专利申请均通过引用并入本文,达到如同每一个单独的公开或专利申请被专门地并且单独地指示通过引用并入的相同的程度。

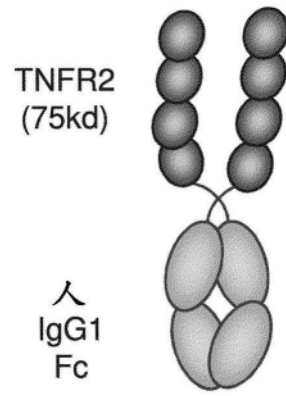


图1A

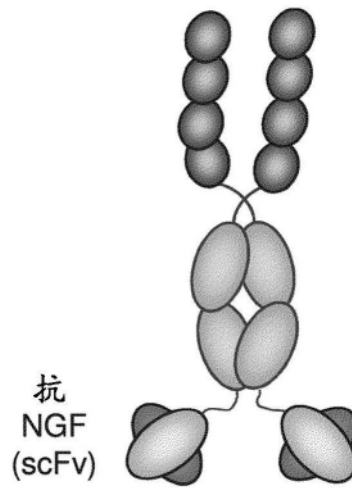


图1B

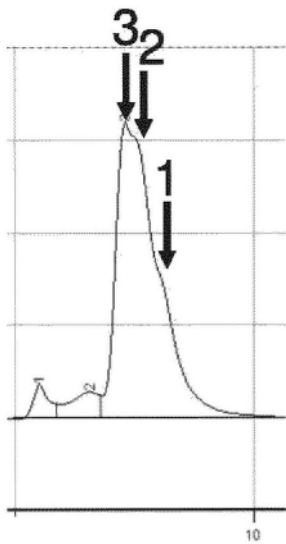


图2A

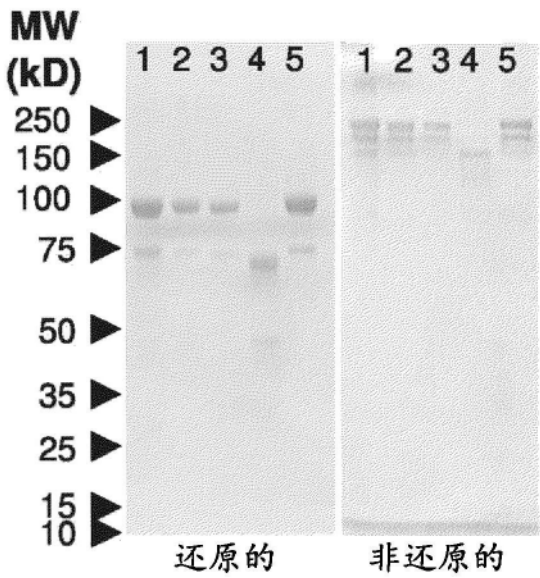


图2B

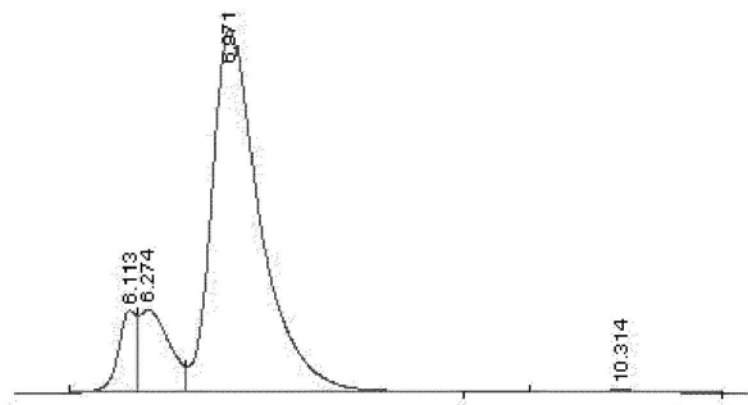


图3A

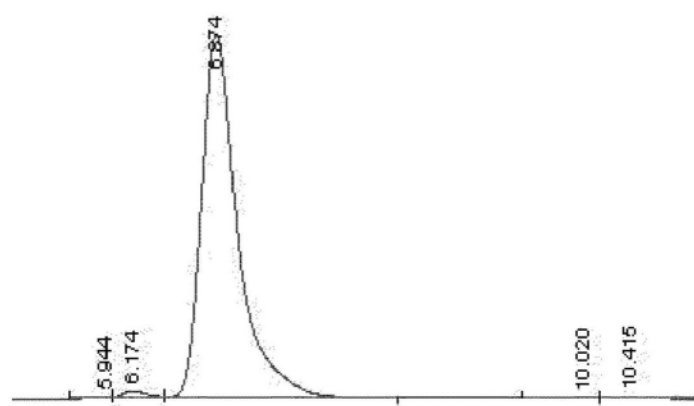


图3B

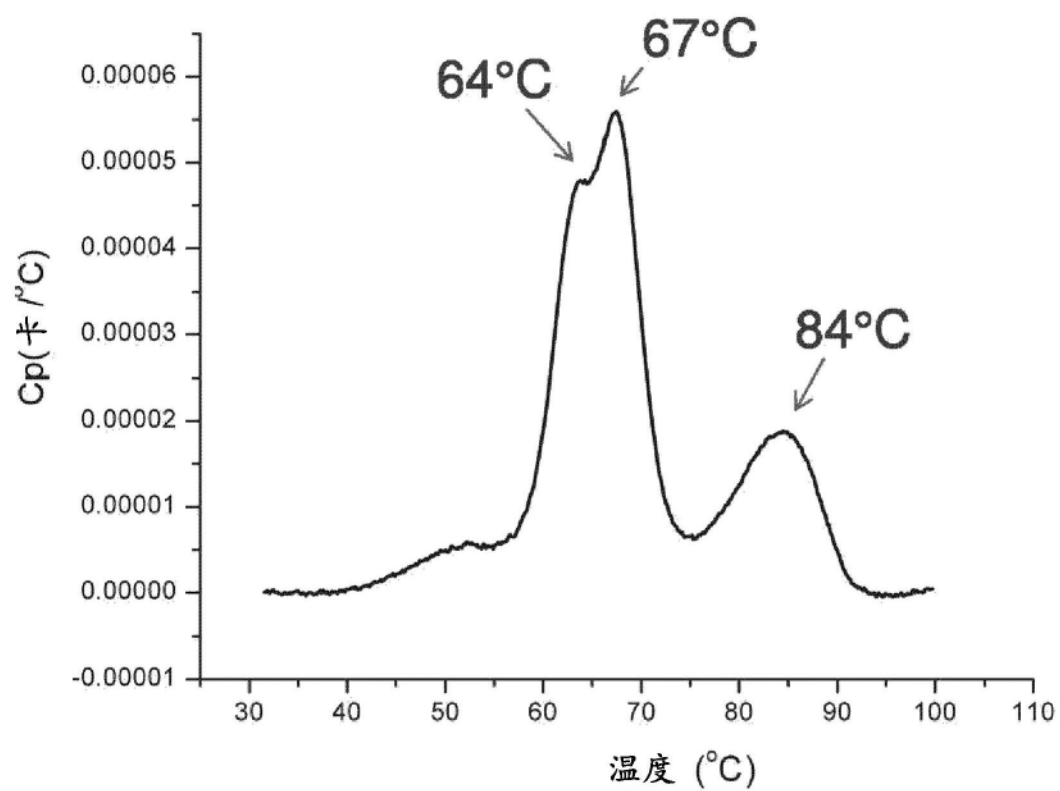


图4

图 5A

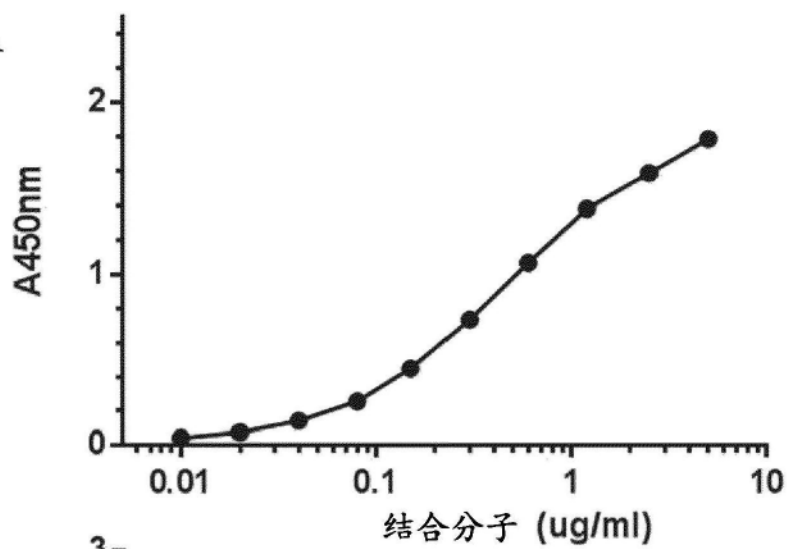
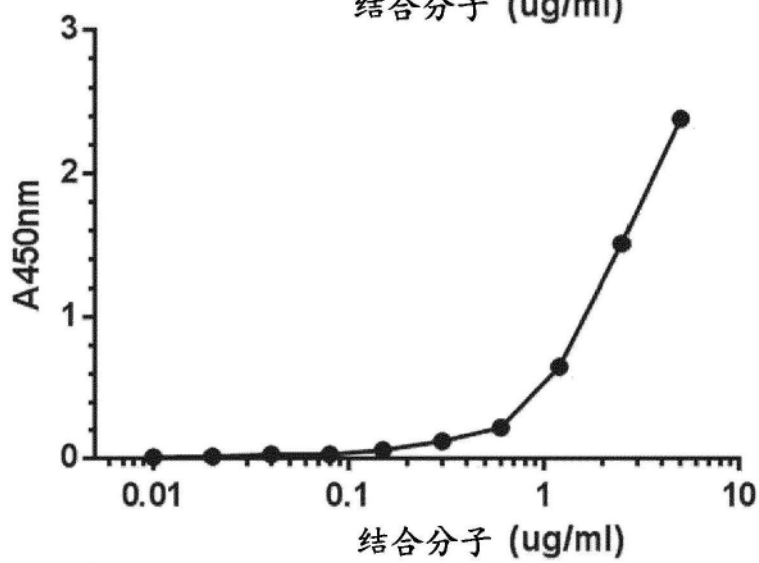


图 5B



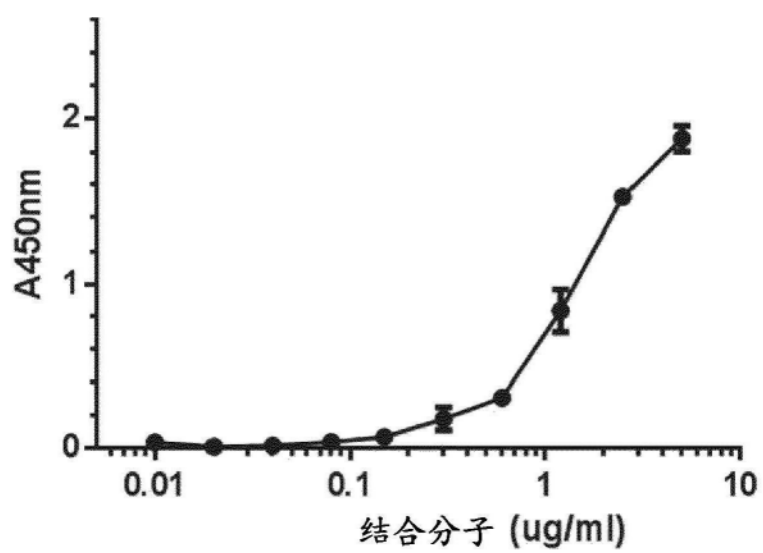


图5C

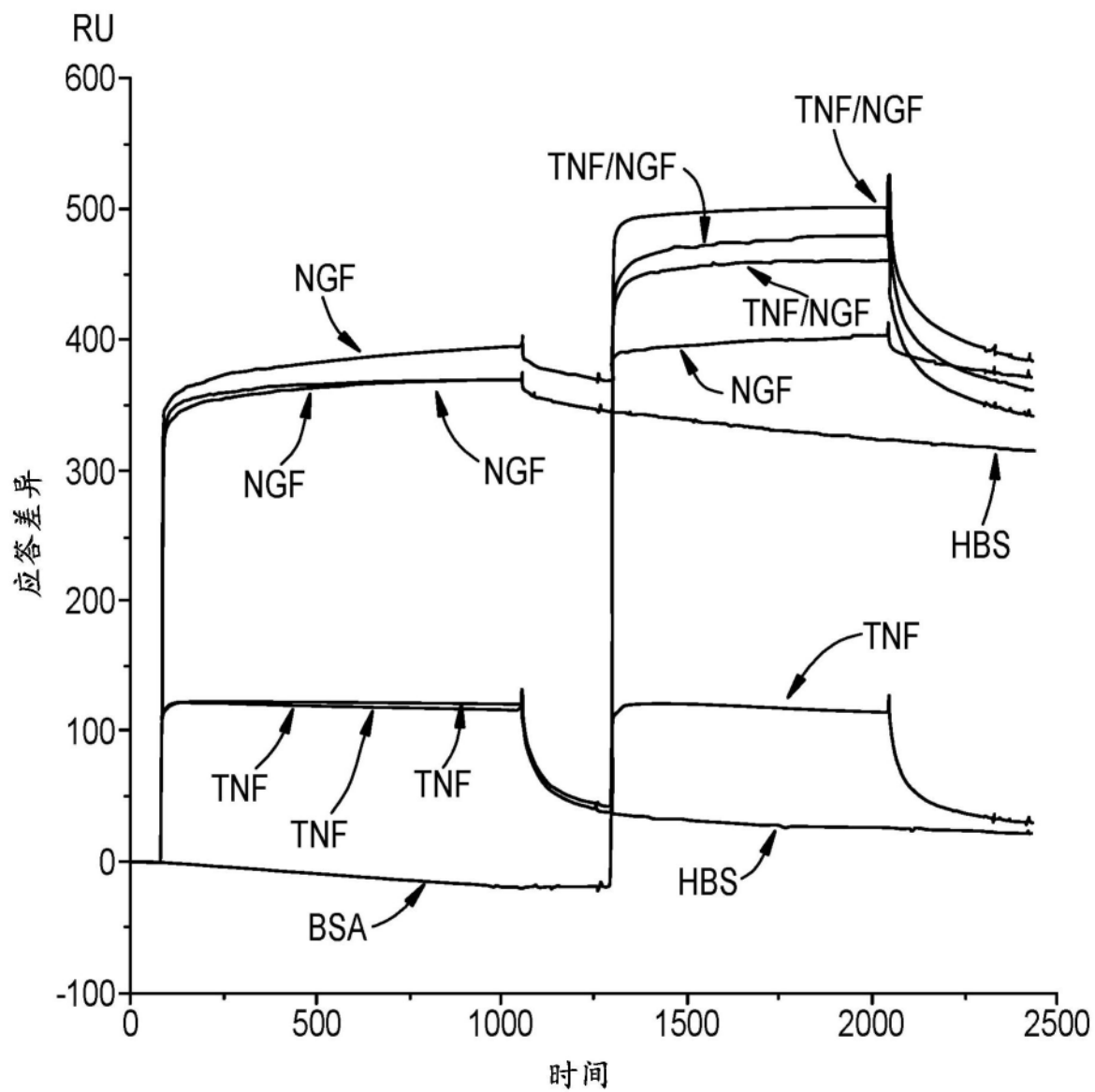


图6

图 7A

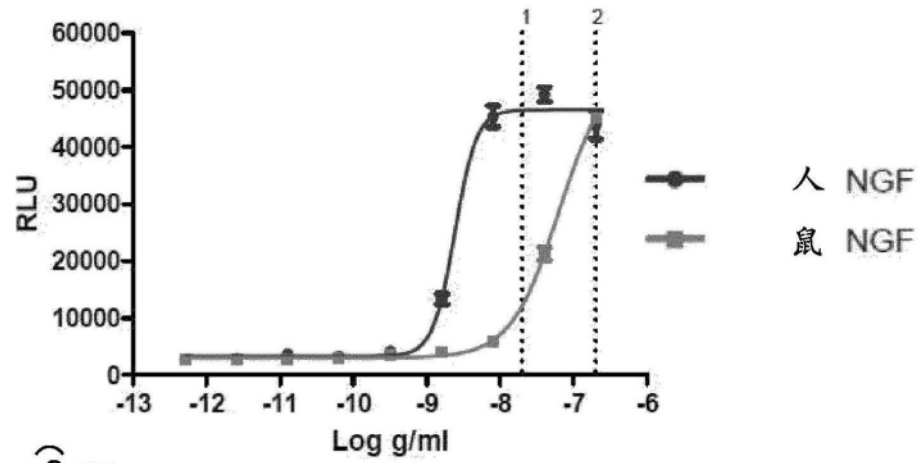


图 7B

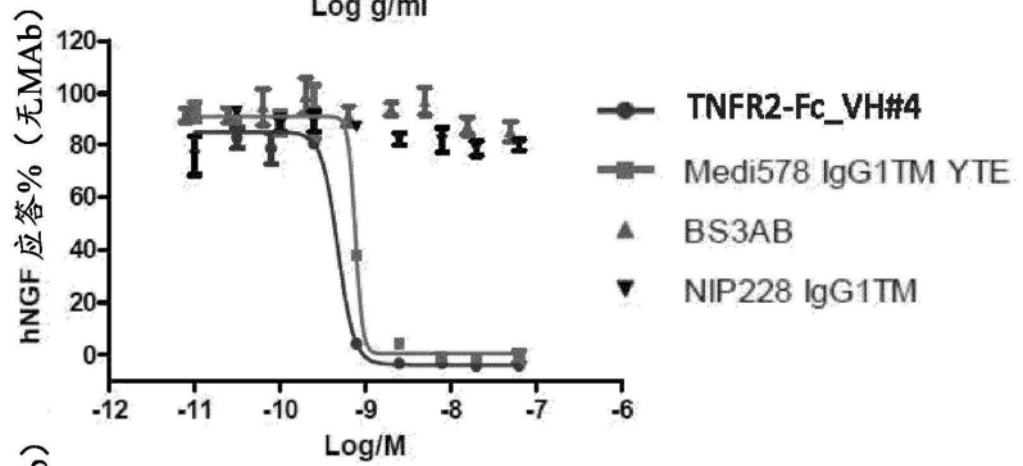
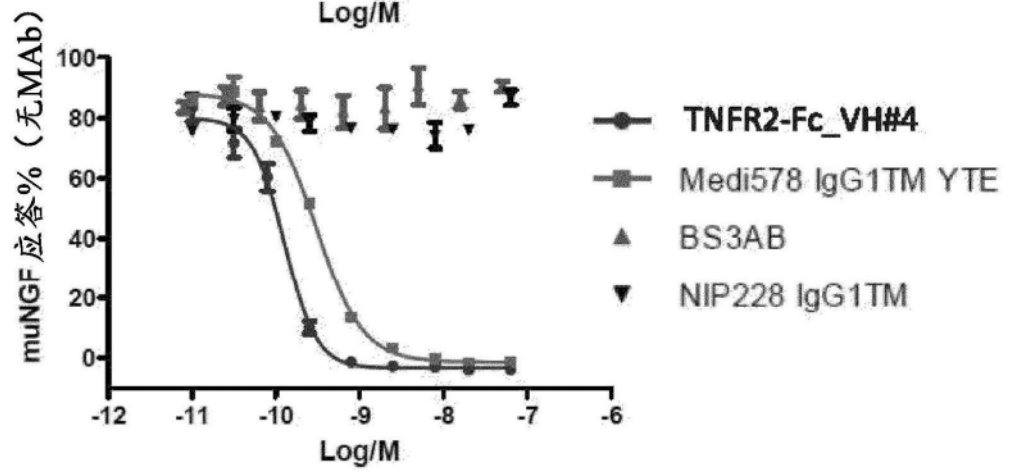
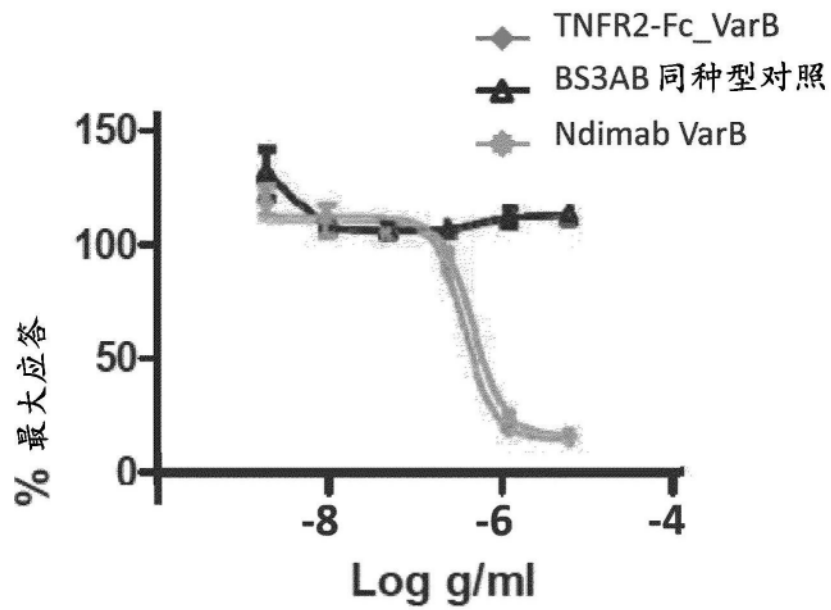


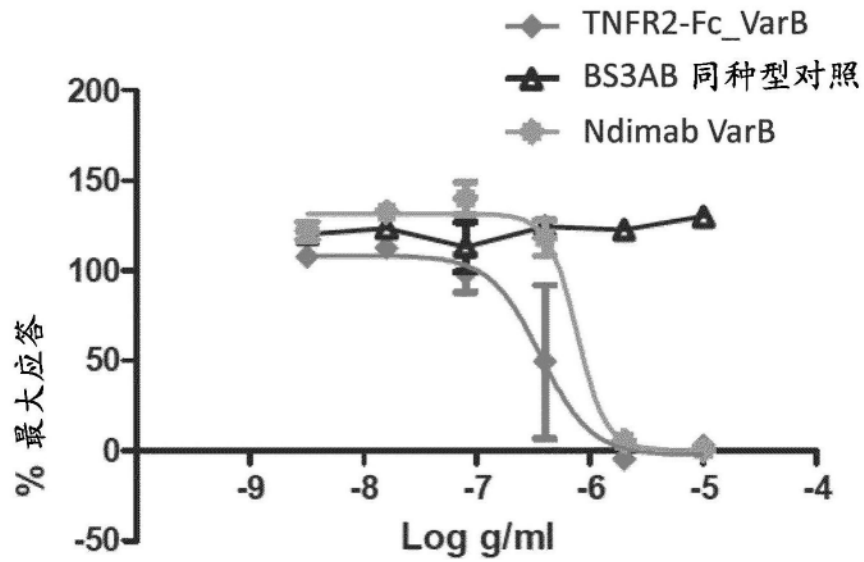
图 7C





	TNFR2-Fc_VarB	ndimab VarB
IC50	3.134e-007	3.934e-007

图7D



	TNFR2-Fc_VarB	ndimab VarB
IC50	3.642e-007	7.602e-007

图7E

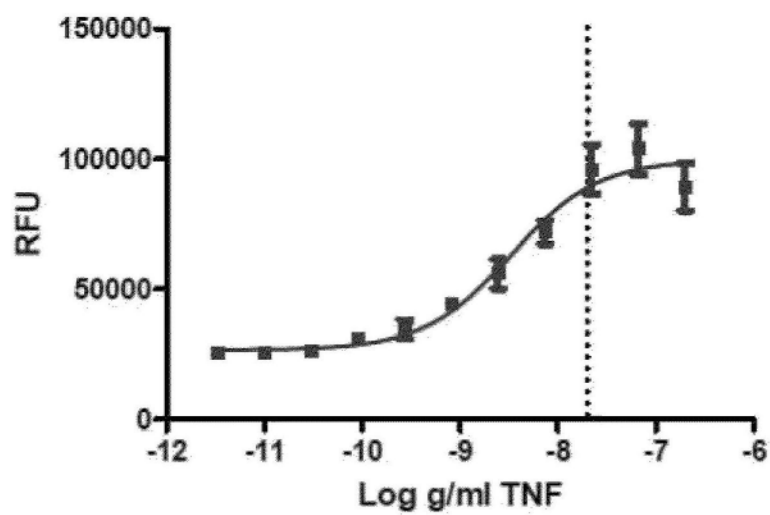


图8A

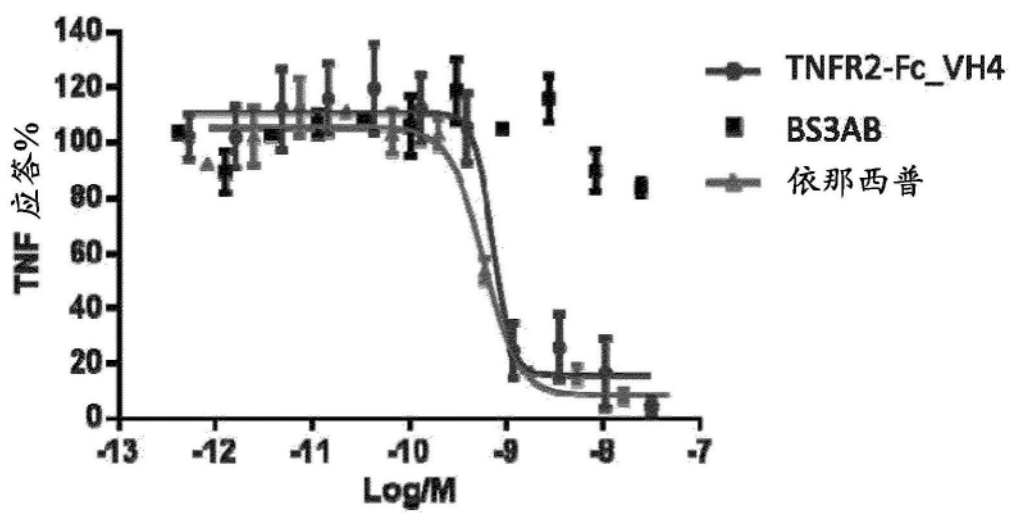


图8B

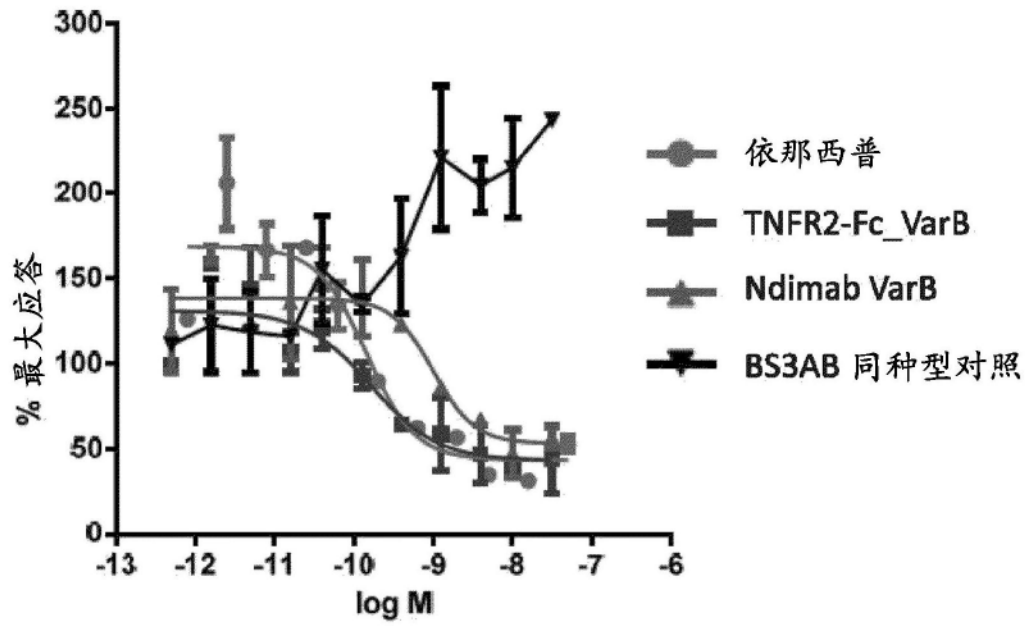
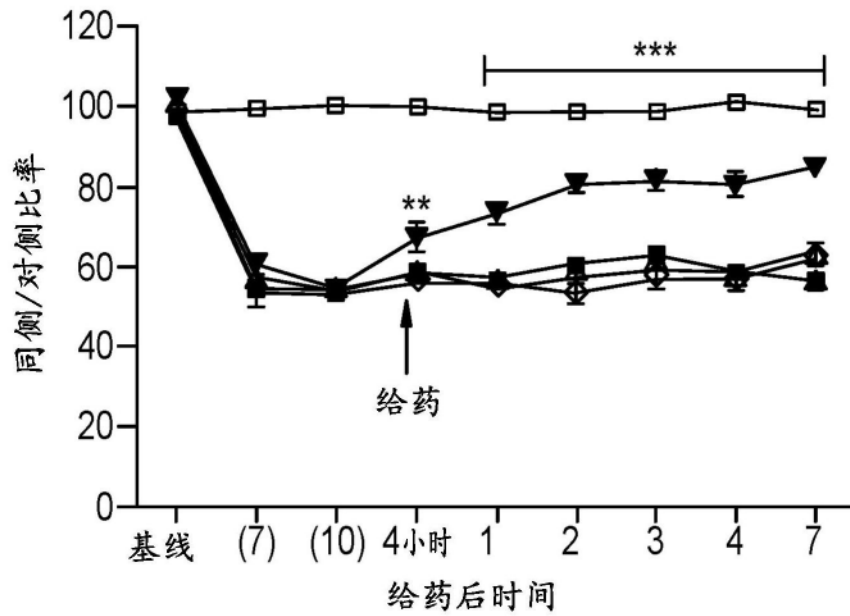


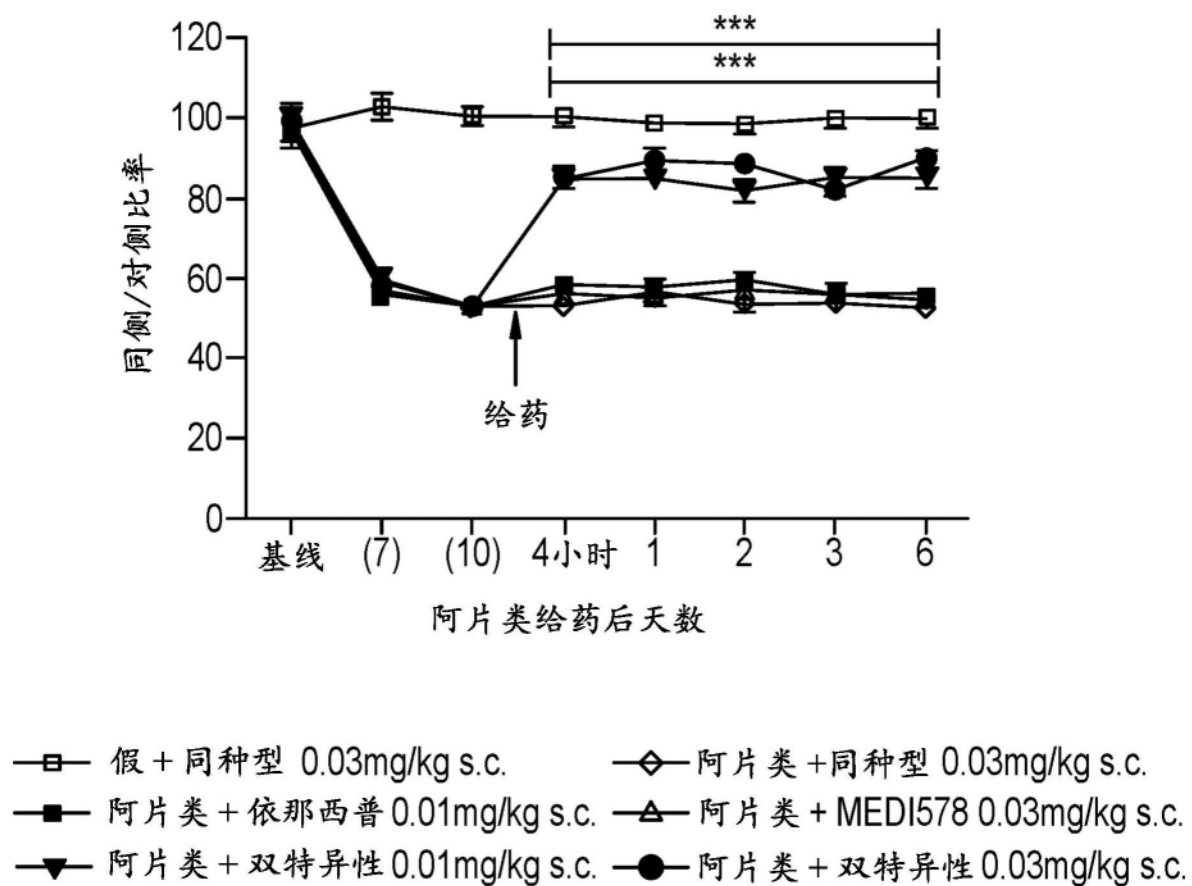
图8C



- 假 + CAT251 0.03mg/kg s.c. —◇— 阿片类 + CAT251 0.03mg/kg s.g.
 —■— 阿片类 + 依那西普 0.01mg/kg s.g. —▲— 阿片类 + MEDI578 0.03mg/kg s.g.
 —▼— 阿片类 + 依那西普 + MEDI578

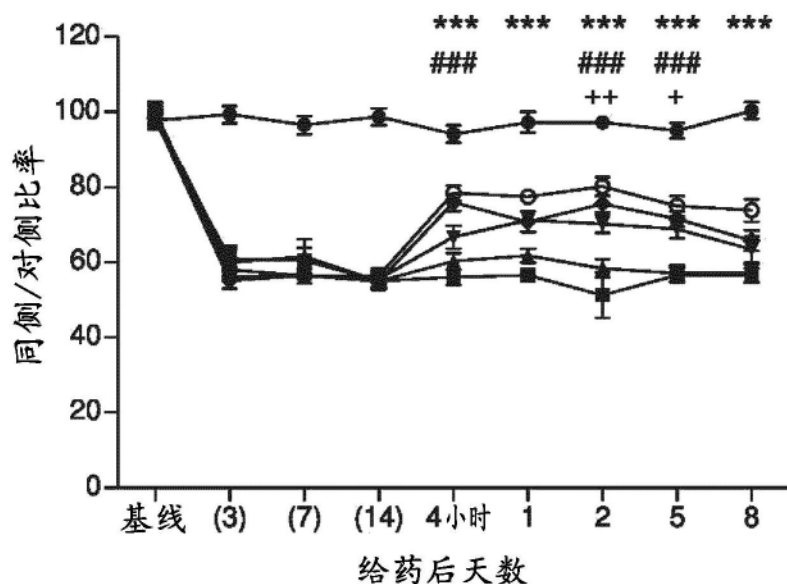
N = 9-10只/组。使用双向ANOVA来分析数据，
 其中时间和治疗作为依赖性因素。采用邦弗伦
 尼事后检验法获得后续的统计学显著性，
 与阿片类 + CAT251对照相比，*** $p < 0.001$

图9



N = 10只/组。使用双向ANOVA来分析数据，其中时间和治疗作为依赖性因素。采用邦弗伦尼事后检验法获得后续的统计学显著性。与双特异性同种型相比，*** $p < 0.001$ (0.03 mg/kg s.c.)

图10A

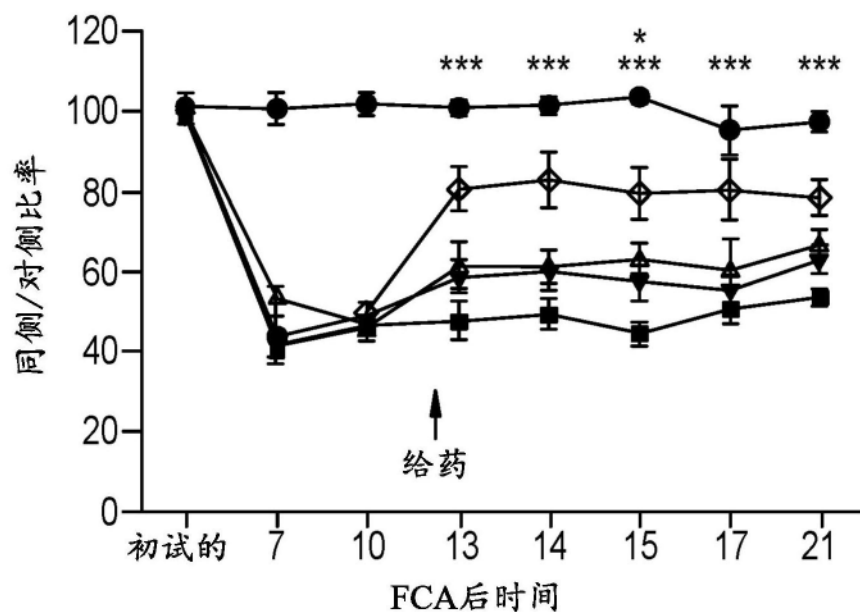


- 假 + PBS 10ml/kg s.c. ■ 阿片类 + PBS 10ml/kg s.c.
 ▲ 阿片类 + Bs3Ab 0.3mg/kg s.c. ▼ 阿片类 + 双特异性 0.03mg/kg s.c.
 ◆ 阿片类 + 双特异性 0.1mg/kg s.c. ○ 阿片类 + 双特异性 0.3mg/kg s.c.

使用双向方差分析来分析数据，随后在适当时，通过邦弗伦尼事后检验法分析数据。

+ P < 0.05; ++ P < 0.01 PNL + 双特异性 (0.03 mg/kg sc) ; ### P < 0.01 PNL + 双特异性 (0.1 mg/kg sc) ; *** p < 0.001 PNL + 双特异性 (0.3 mg/kg sc) , 所有均为相对于PNL + R347而言

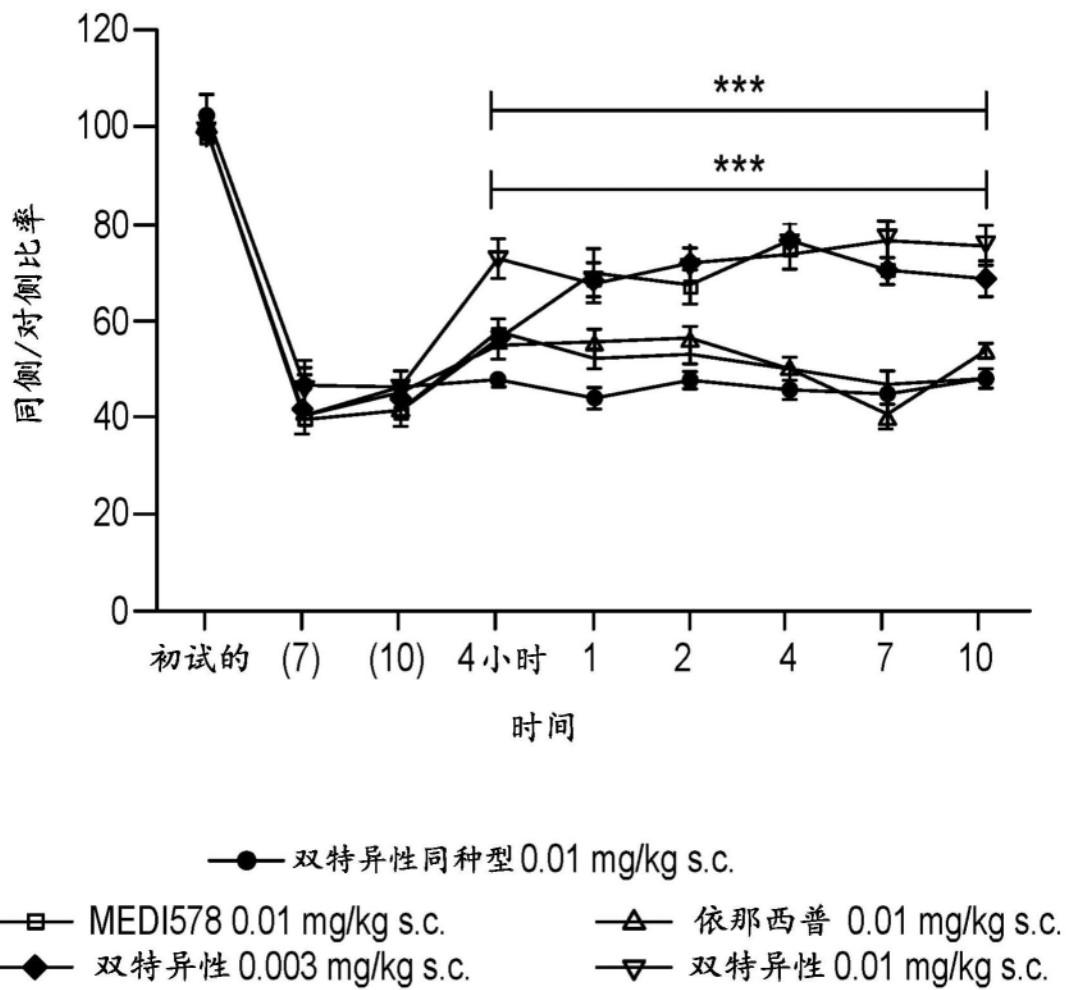
图10B



- 媒介物 - CAT251 (0.03 mg/kg i.v.) + PBS (10 ml/kg i.p.)
- △— FCA - MEDI 578 (0.03 mg/kg i.v.) + PBS (10 ml/kg i.p.)
- FCA - CAT251 (0.03 mg/kg i.v.) + PBS (10 ml/kg i.p.)
- ▼— FCA - CAT251 (0.03 mg/kg i.v.) + 依那西普 (0.01 mg/kg i.p.)
- ◇— FCA - MEDI 578 (0.03 mg/kg i.v.) + 依那西普 (0.01 mg/kg i.p.)

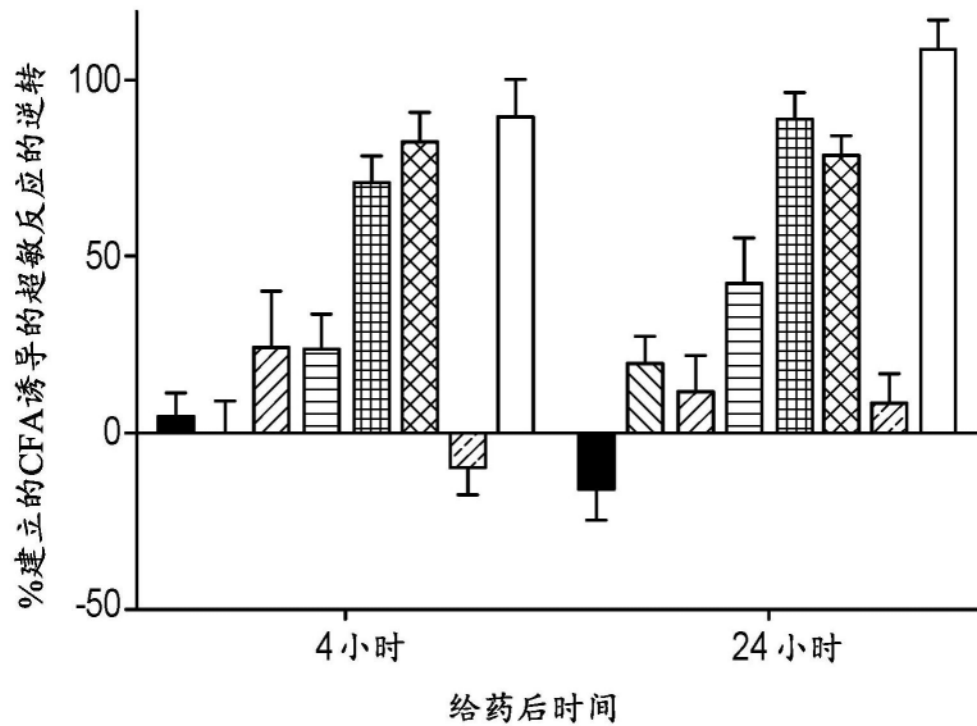
N = 9/10只/组。使用双向ANOVA来分析数据，随后通过邦弗伦尼事后检验法分析数据。* $P > 0.05$, *** $P < 0.001$ 相比于媒介物-CAT-251 (0.03 mg/kg i.v.) + PBS (10 ml/kg i.p.)

图11



使用双向ANOVA来分析数据，其中时间和治疗作为依赖性因素。采用邦弗伦尼事后检验法获得后续的统计学显著性，***P < 0.001相比于双特异性同种型 (0.01 mg/kg s.c.) n = 9-10

图12



统计分析 - 重复量度ANOVA, 随后使用inivistat
进行计划比较测试。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

当在每个时间点与媒介物比较时, 痛觉过敏出现显著逆转。

- 媒介物
- ▧ 0.003mg/kg 双特异性
- ▨ 0.01mg/kg 双特异性
- ▩ 0.03mg/kg 双特异性
- 0.3mg/kg 双特异性
- 3mg/kg 双特异性
- ▬ 3mg/kg NIP228
- 吲哚美辛 10mg/kg

图13

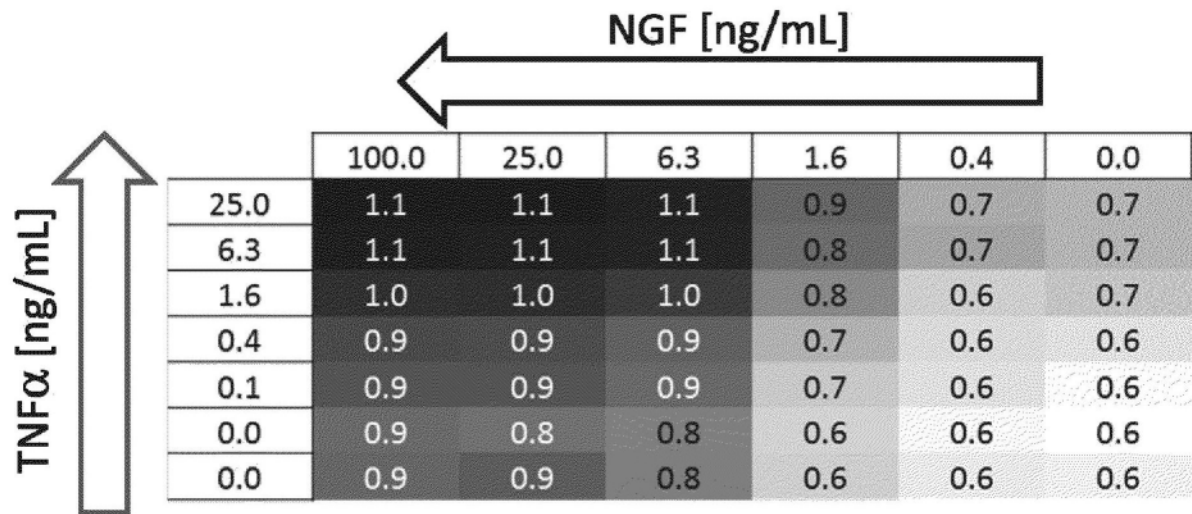


图14

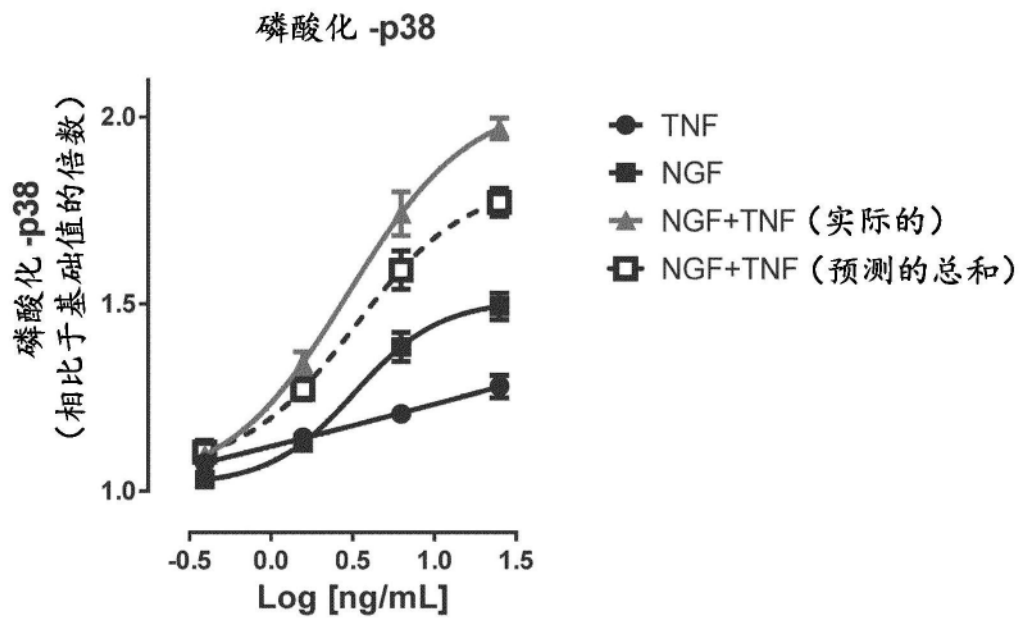


图15

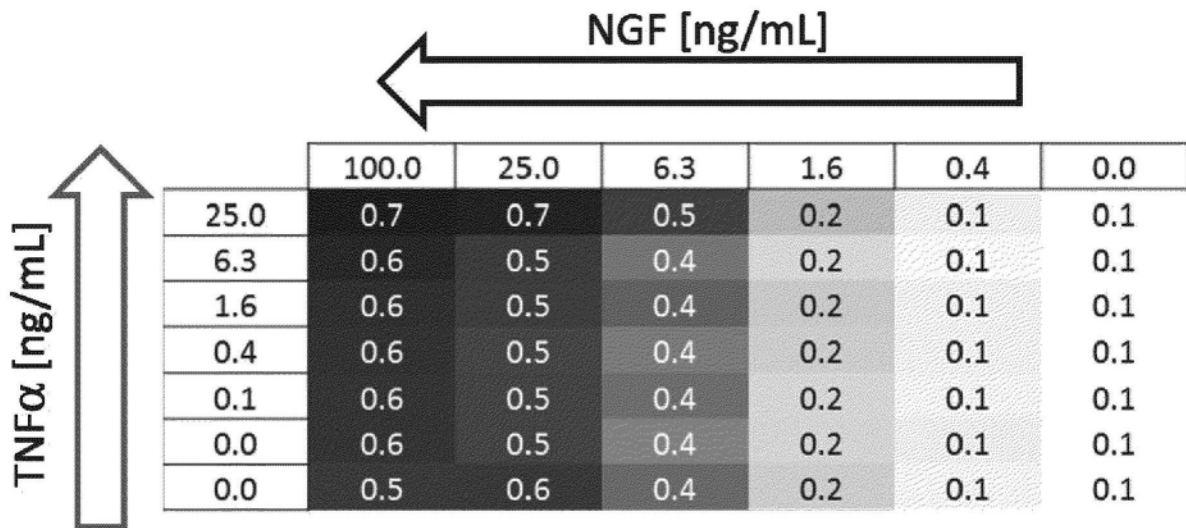


图16

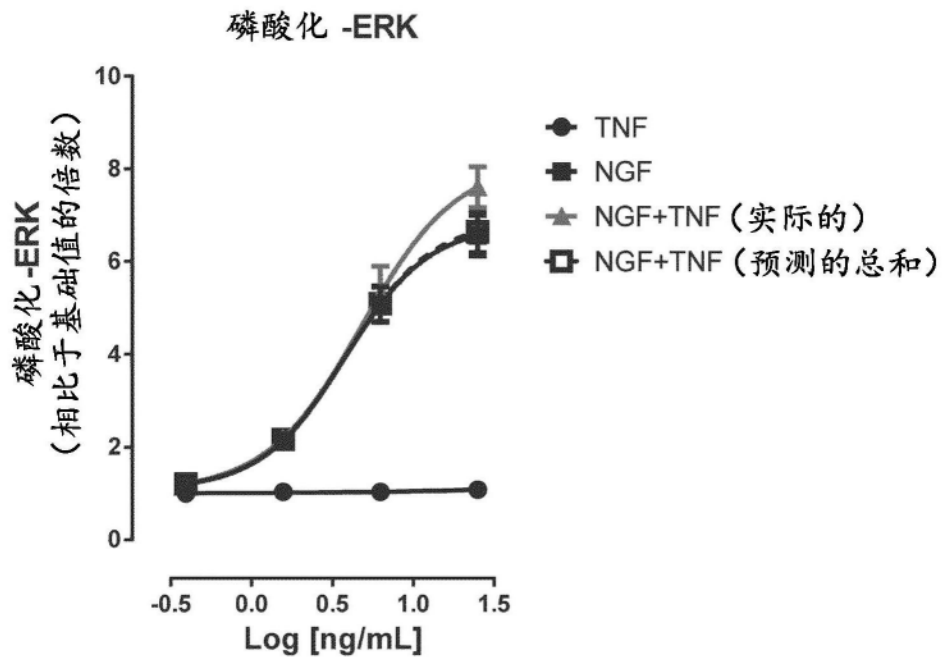


图17

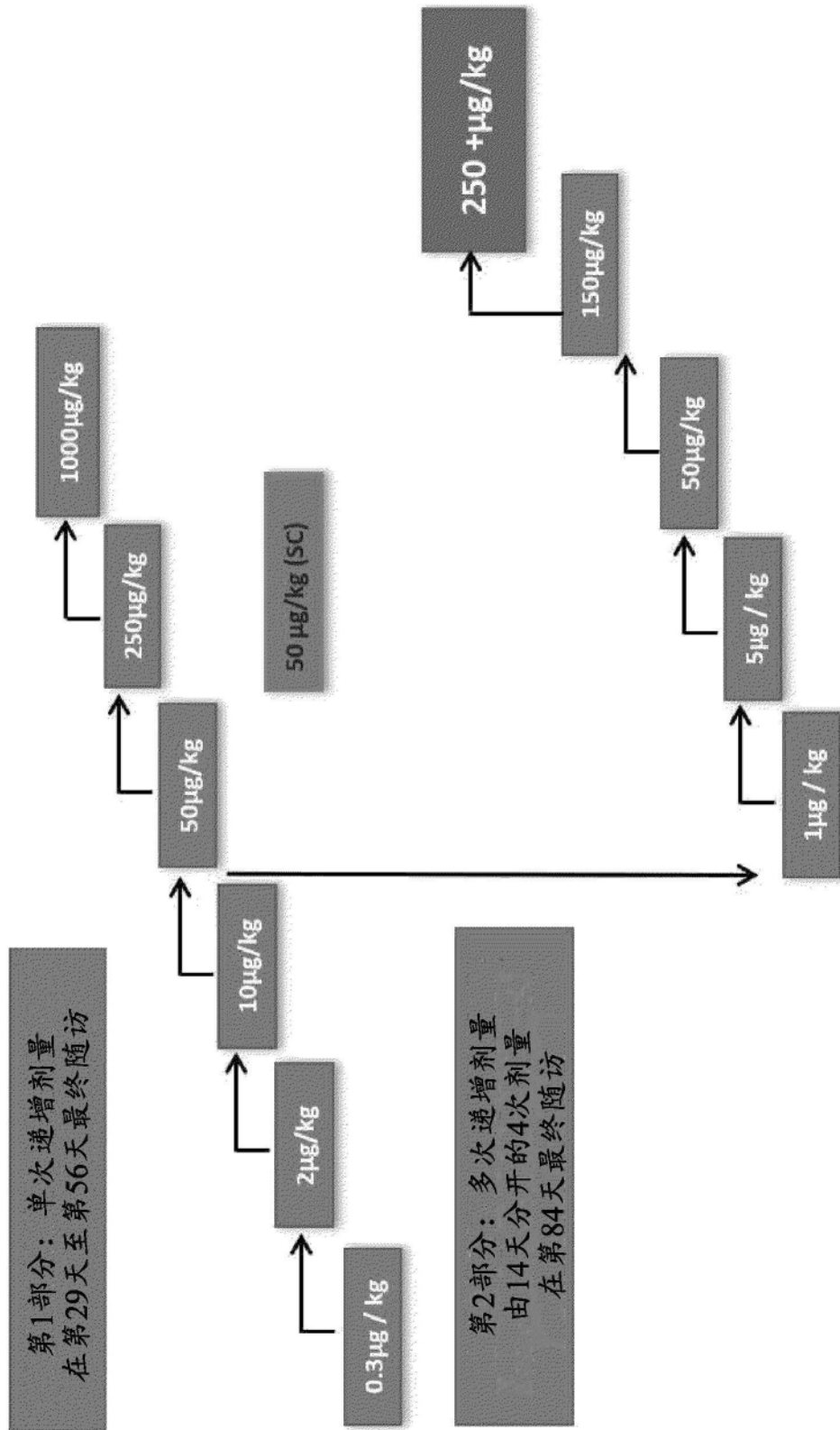


图18A

队列	RoA	剂量 ($\mu\text{g/kg}$)	预测的av %NGFsuppre
第I部分 - SAD			
1	IV	0.3	10
2	IV	2	27
3	IV	10	38
4	IV	50	53
5	IV	250	71
6	IV	1000	82
7	SC	50	20
第II部分 - MAD			
8	IV	1	21
9	IV	5	34
10	IV	50	51
11	IV	150	69

图18B

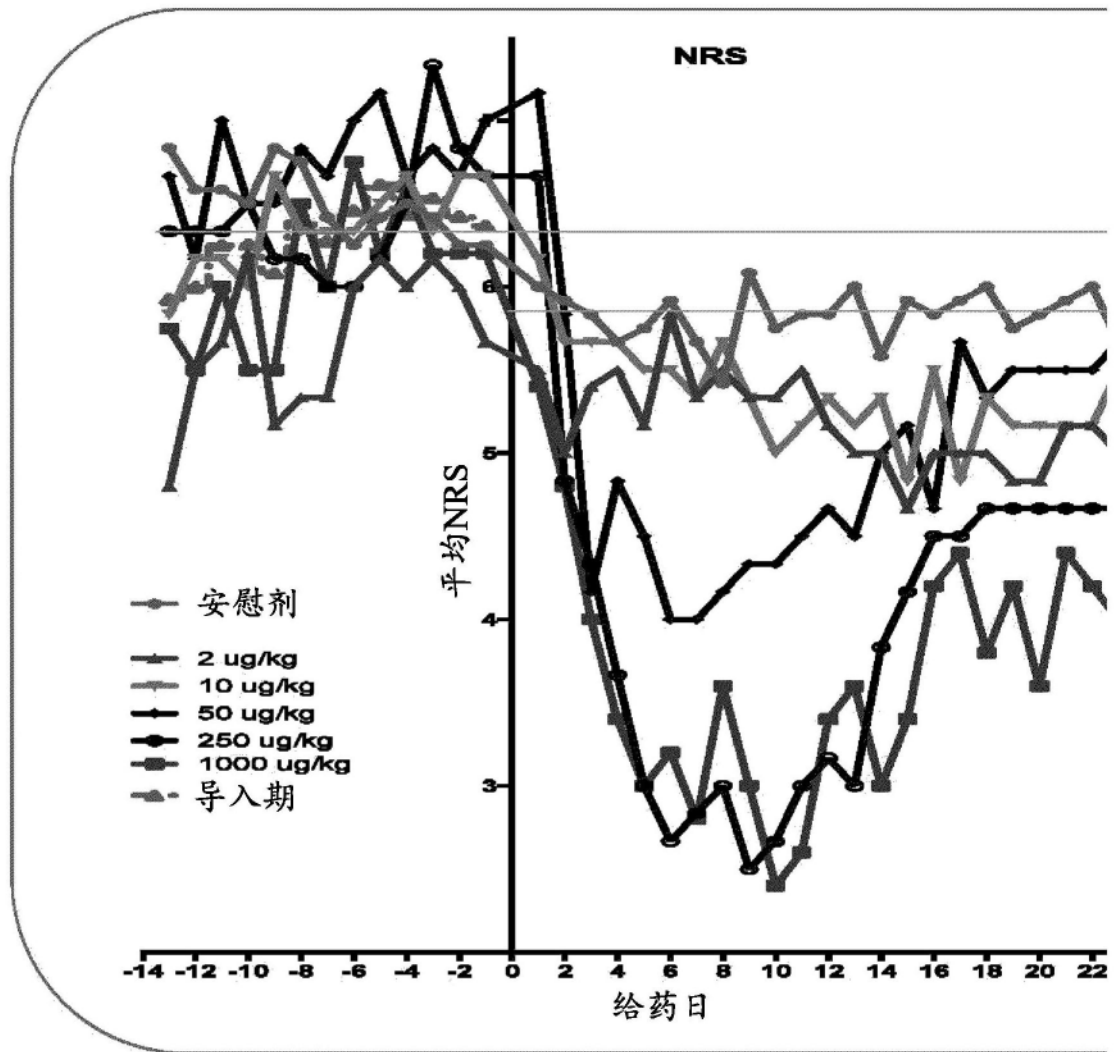


图19A

SAD 队列剂量 ($\mu\text{g} / \text{kg}$)	预测的平均NGF抑制 (%)	峰值NRS变化相比于 PBO
2	27	- 0.69
10	38	- 0.85
50	53	- 1.85
250	71	- 3.35
1000	83	- 3.45

图19B

基线调整的平均疼痛WOMAC，将该得分按比例调整至 0-10 (1

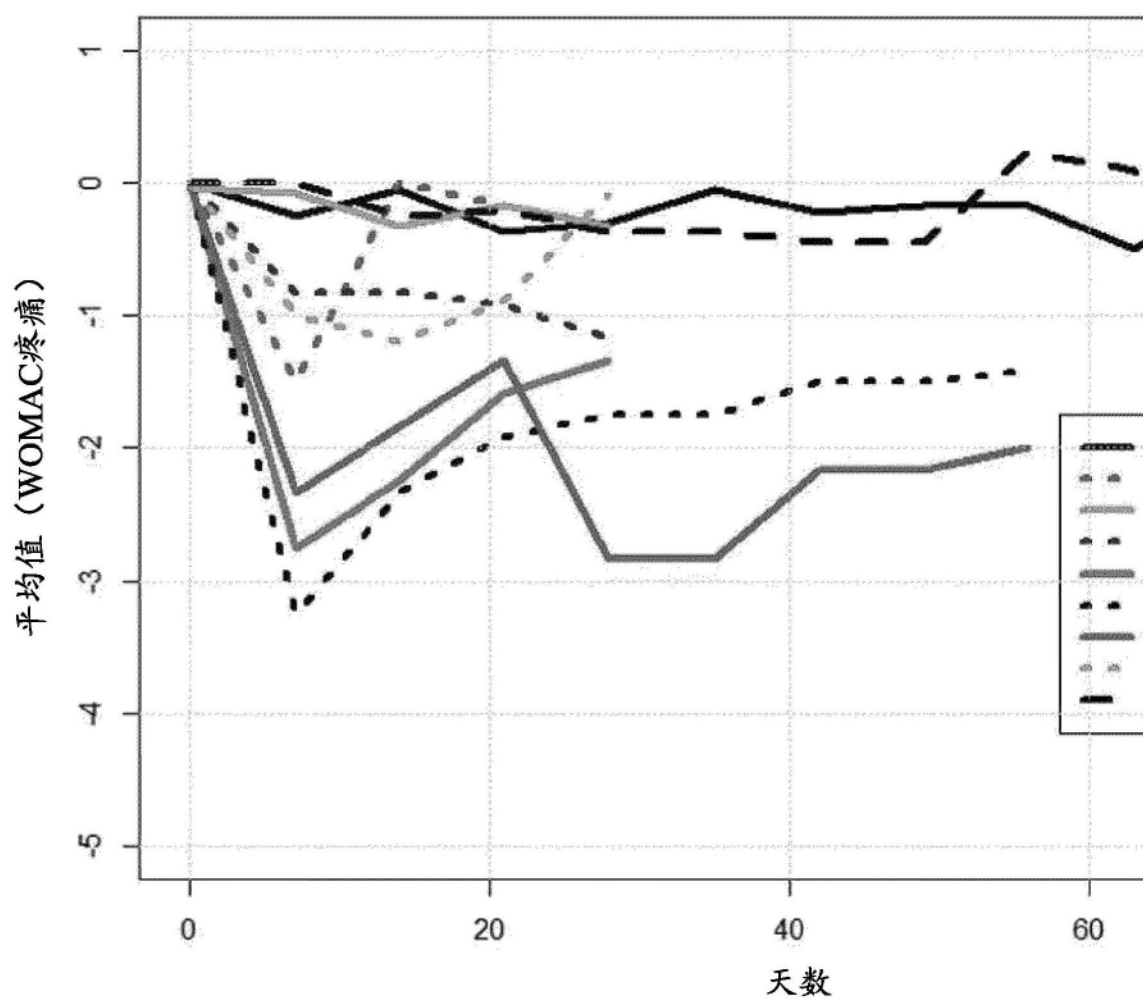


图20A

	在一周内测试
安慰剂相比于	TNFR2-Fc_varB 0.3 ug/kg IV SAD
安慰剂相比于	TNFR2-Fc_varB 2 ug/kg IV SAD
安慰剂相比于	TNFR2-Fc_varB 10 ug/kg IV SAD
安慰剂相比于	TNFR2-Fc_varB 50 ug/kg IV SAD
安慰剂相比于	TNFR2-Fc_varB 250 ug/kg IV SAD
安慰剂相比于	TNFR2-Fc_varB 1000 ug/kg IV SAD
安慰剂相比于	TNFR2-Fc_varB 50 ug/kg SC SAD

图20B

MEDI7352 剂量 (μg/kg)	测量的% NGF抑制 (相比于预测的)		峰值WOMAC疼痛分量表变化 相比于安慰剂 MEDI7352
	峰值	平均值	
50 (SAD)	92 (99)	46 (53)	-2.4
250 (SAD)	90 (100)	55 (71)	-2.9
1000 (SAD)	tbid (100)	tbid (82)	-2.0

图21

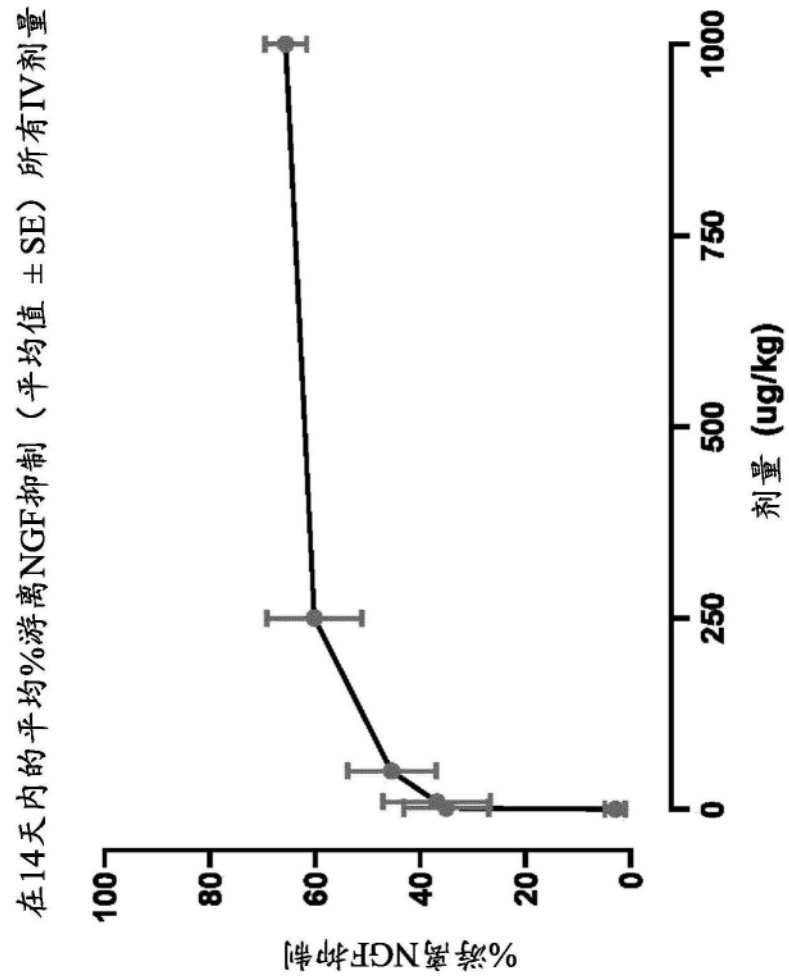


图22

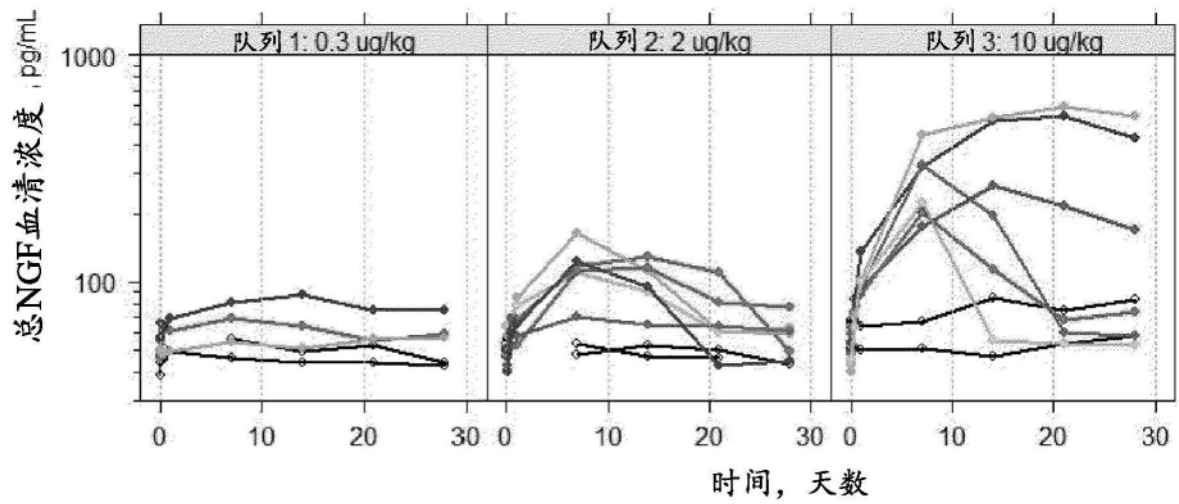


图23

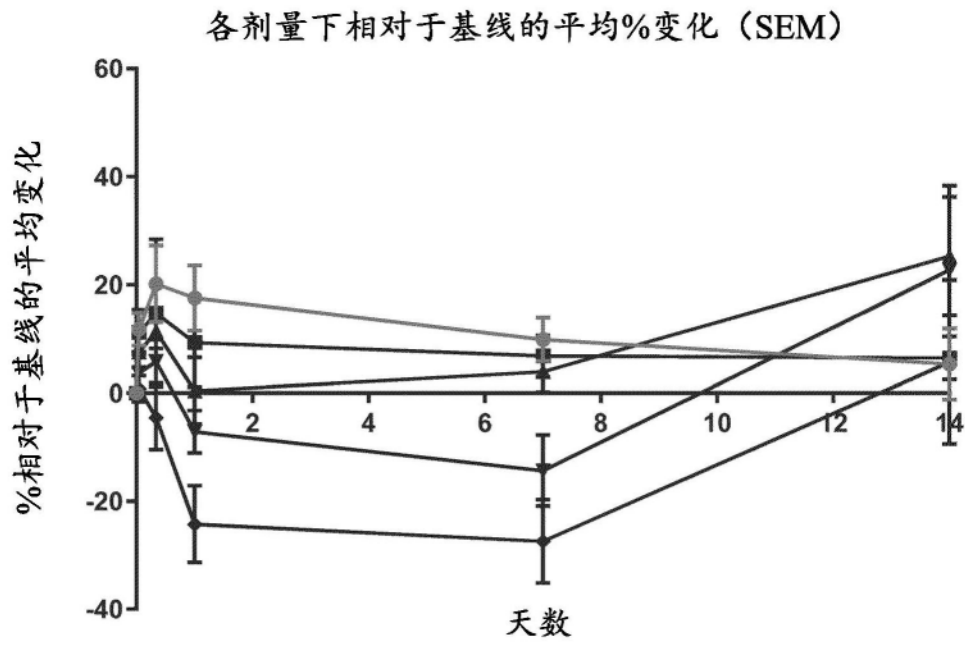


图24

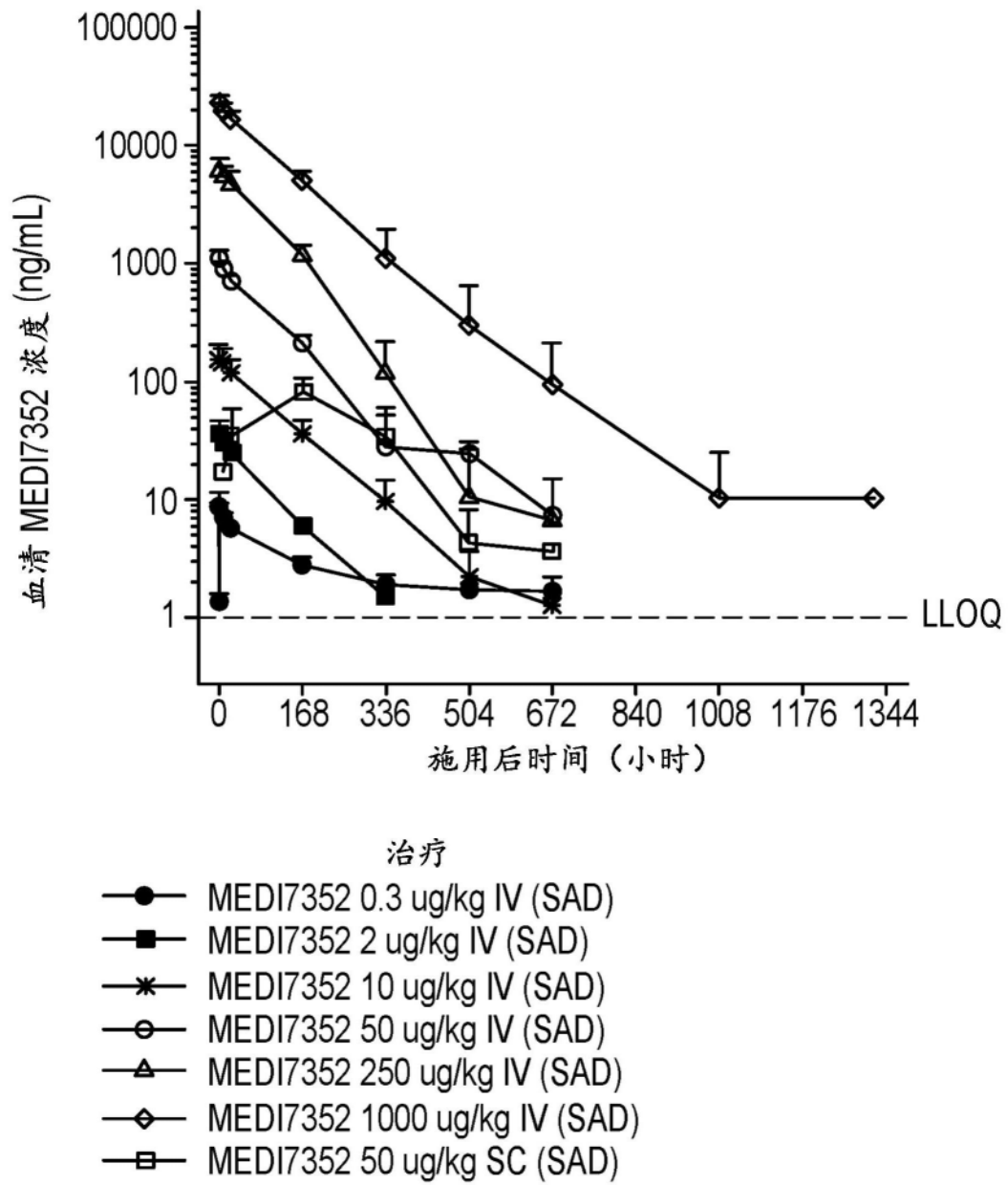


图25

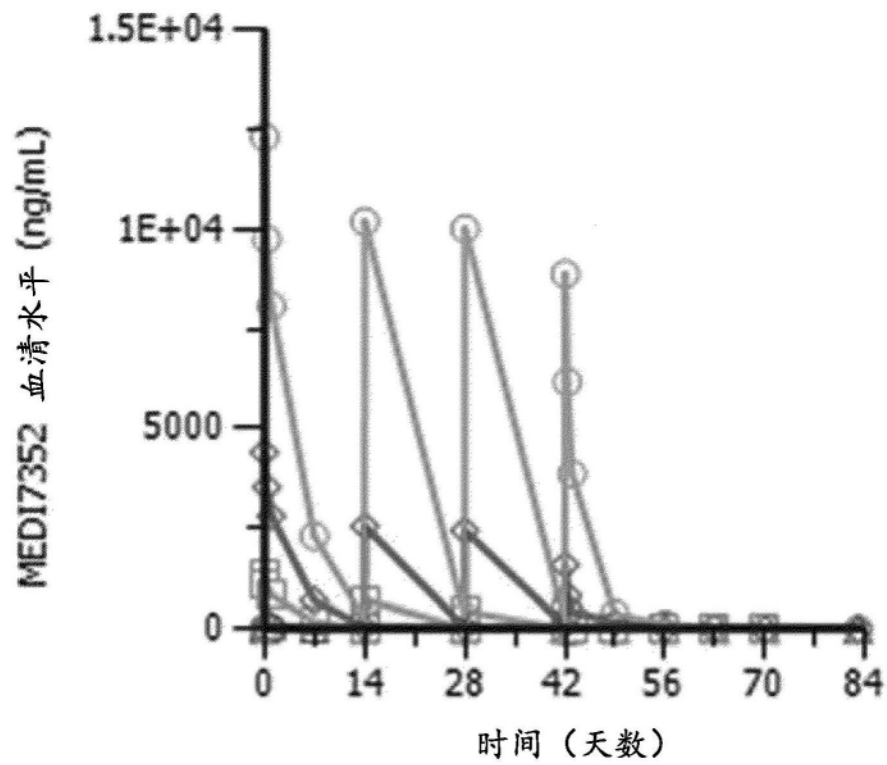


图26A

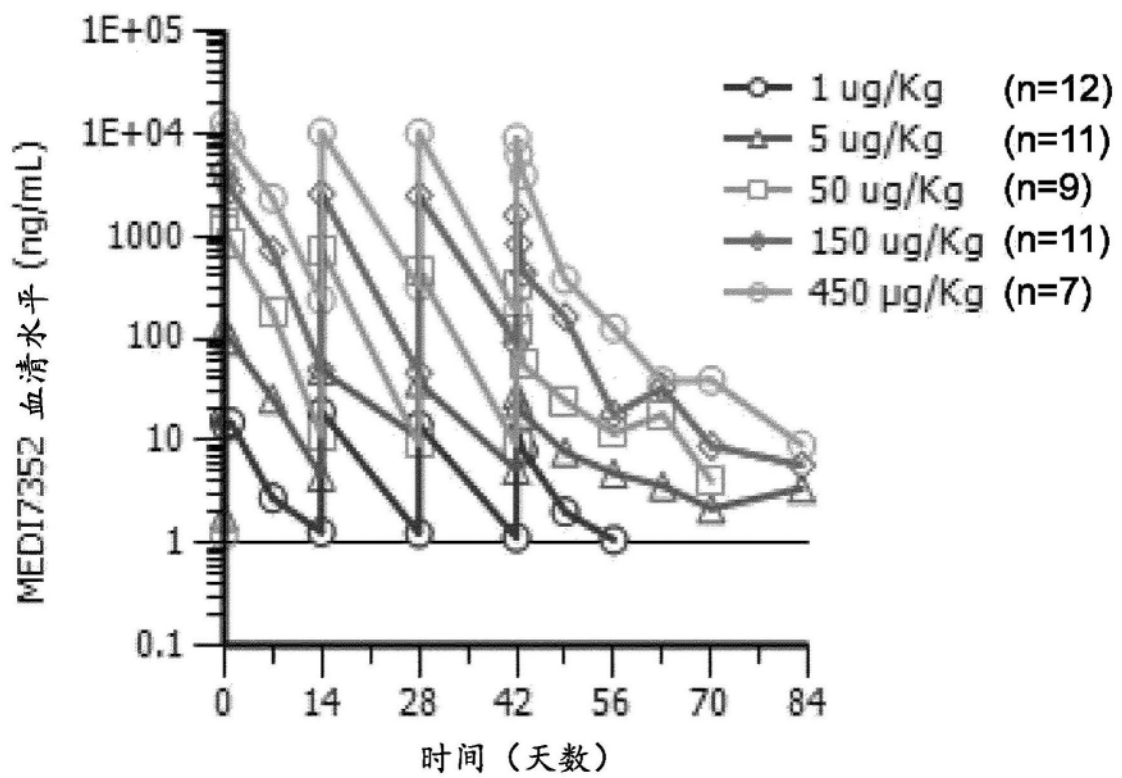


图26B

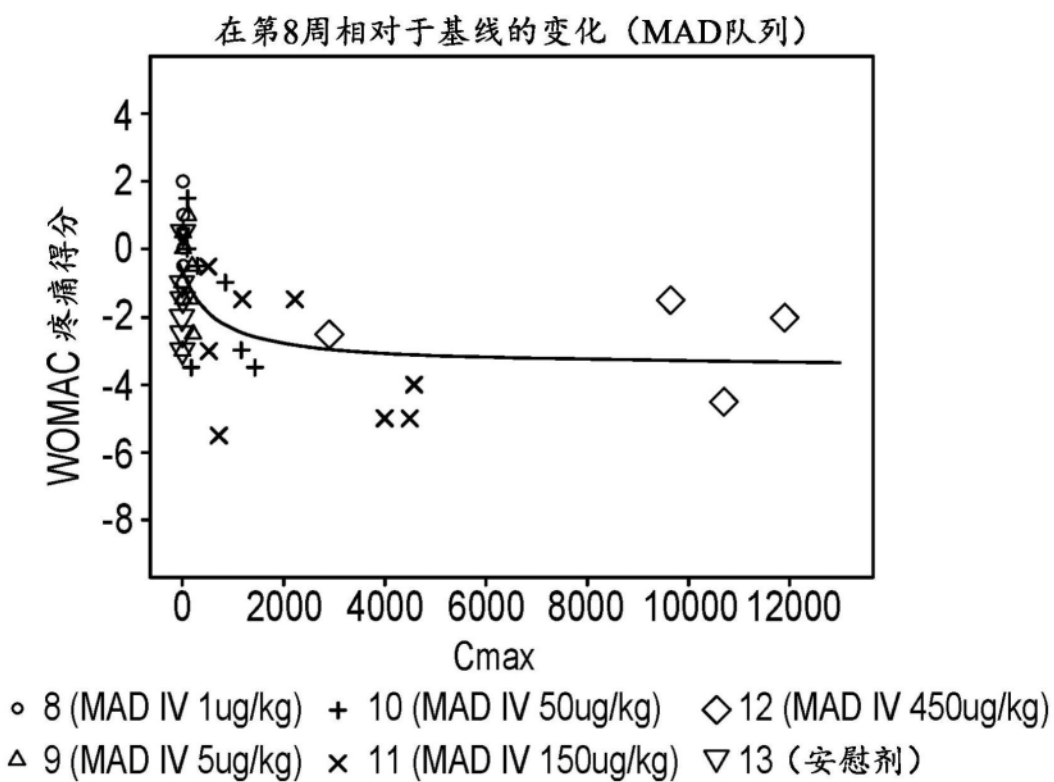
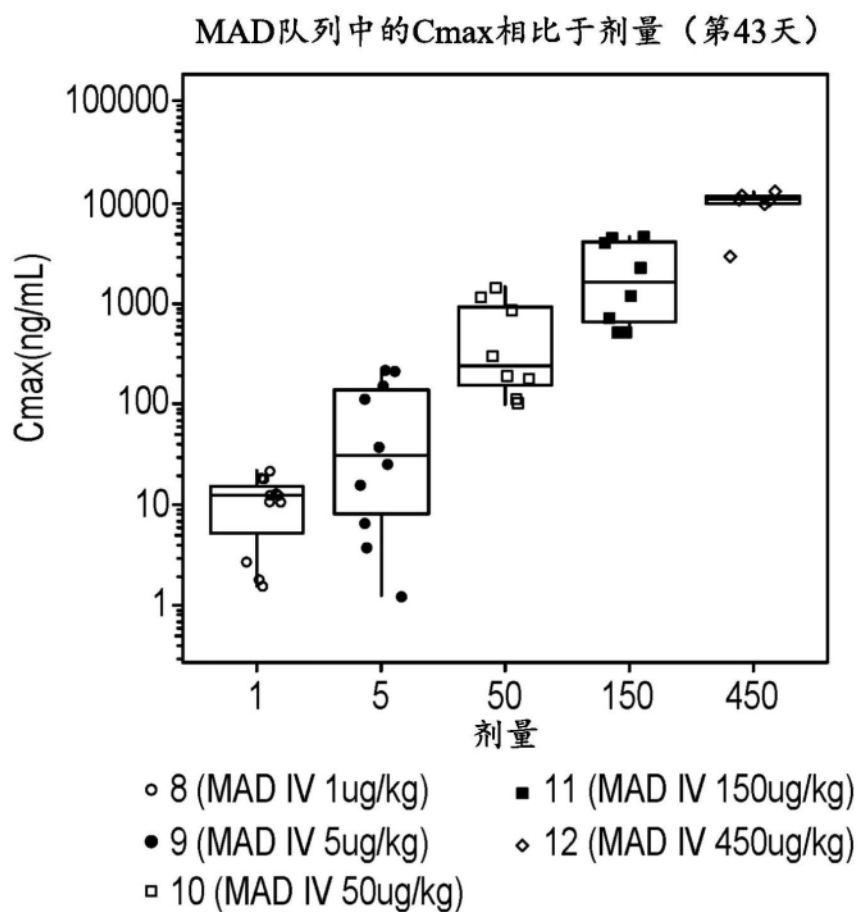


图27

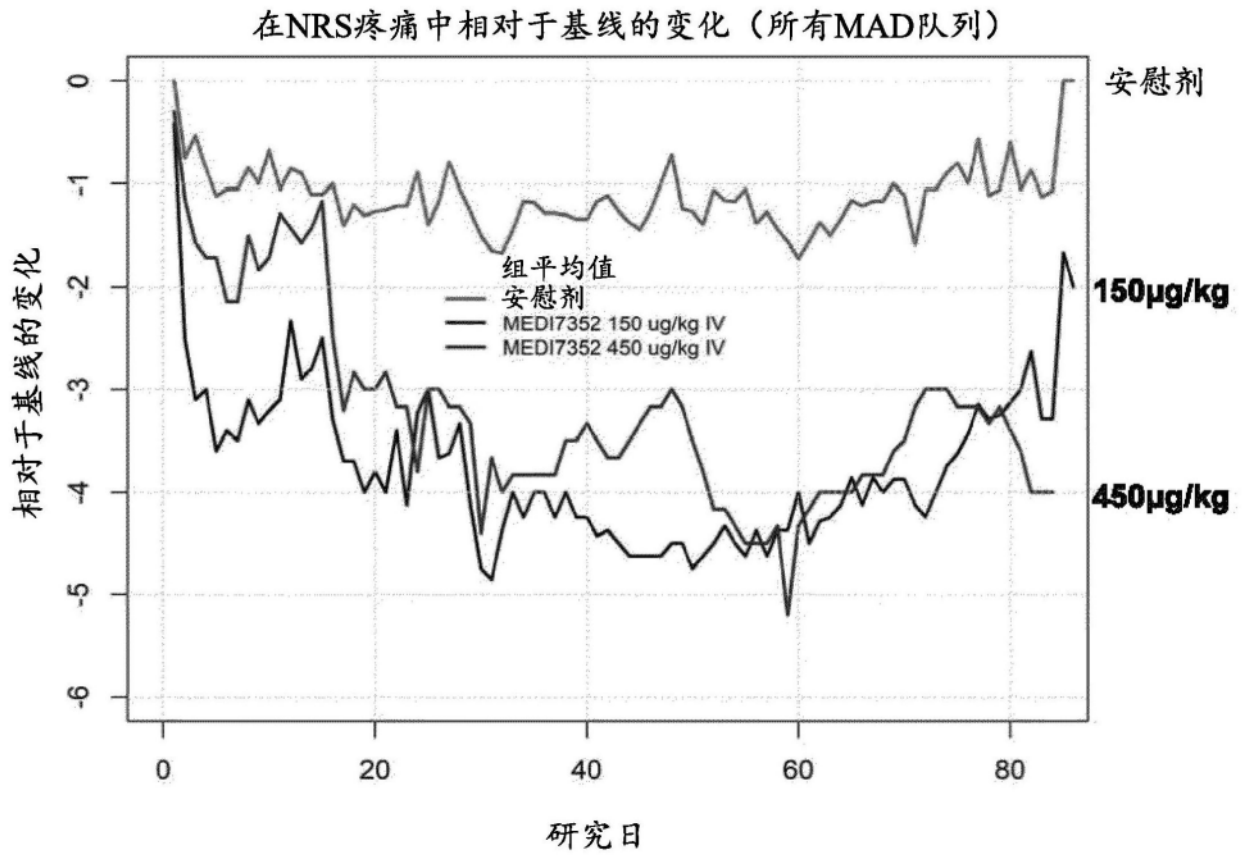


图28A

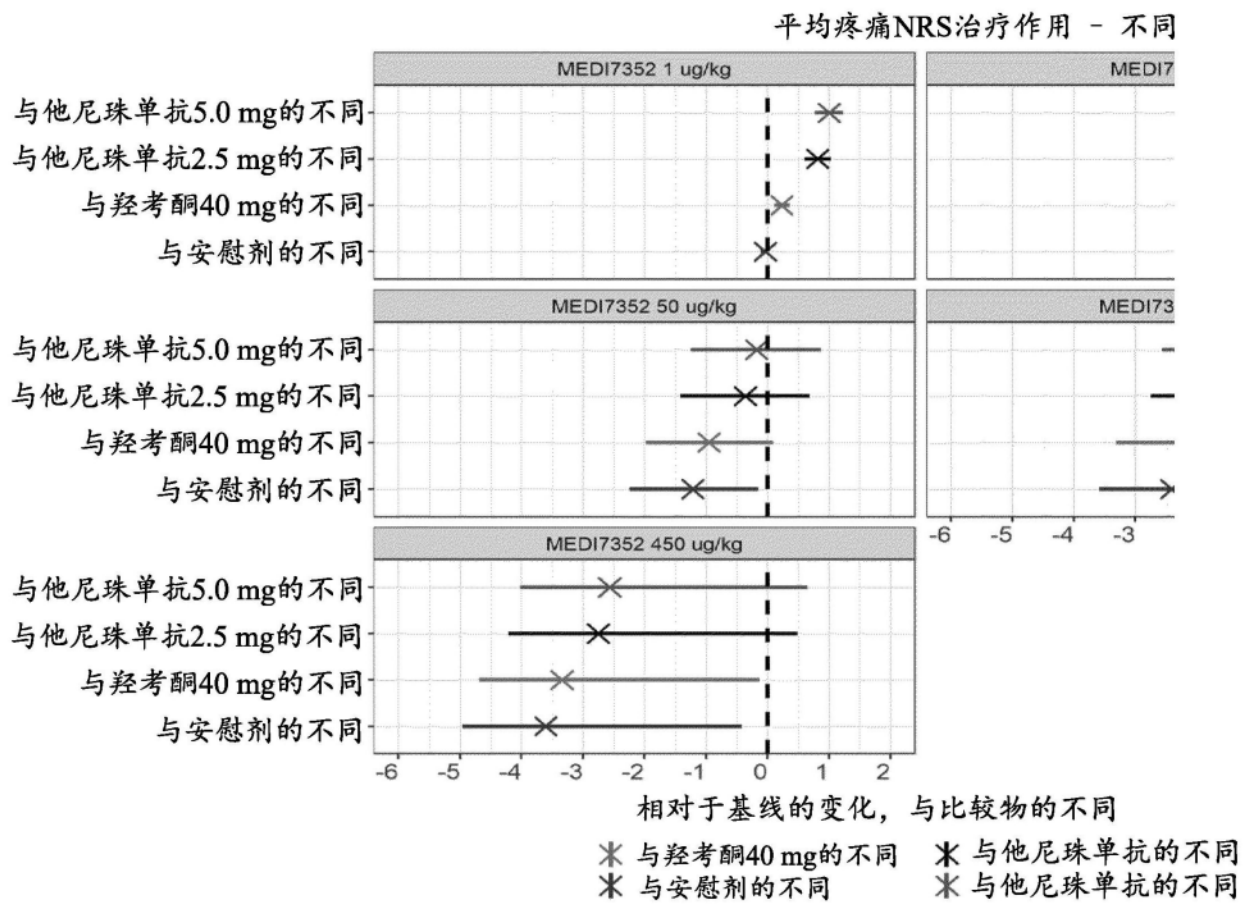


图28B

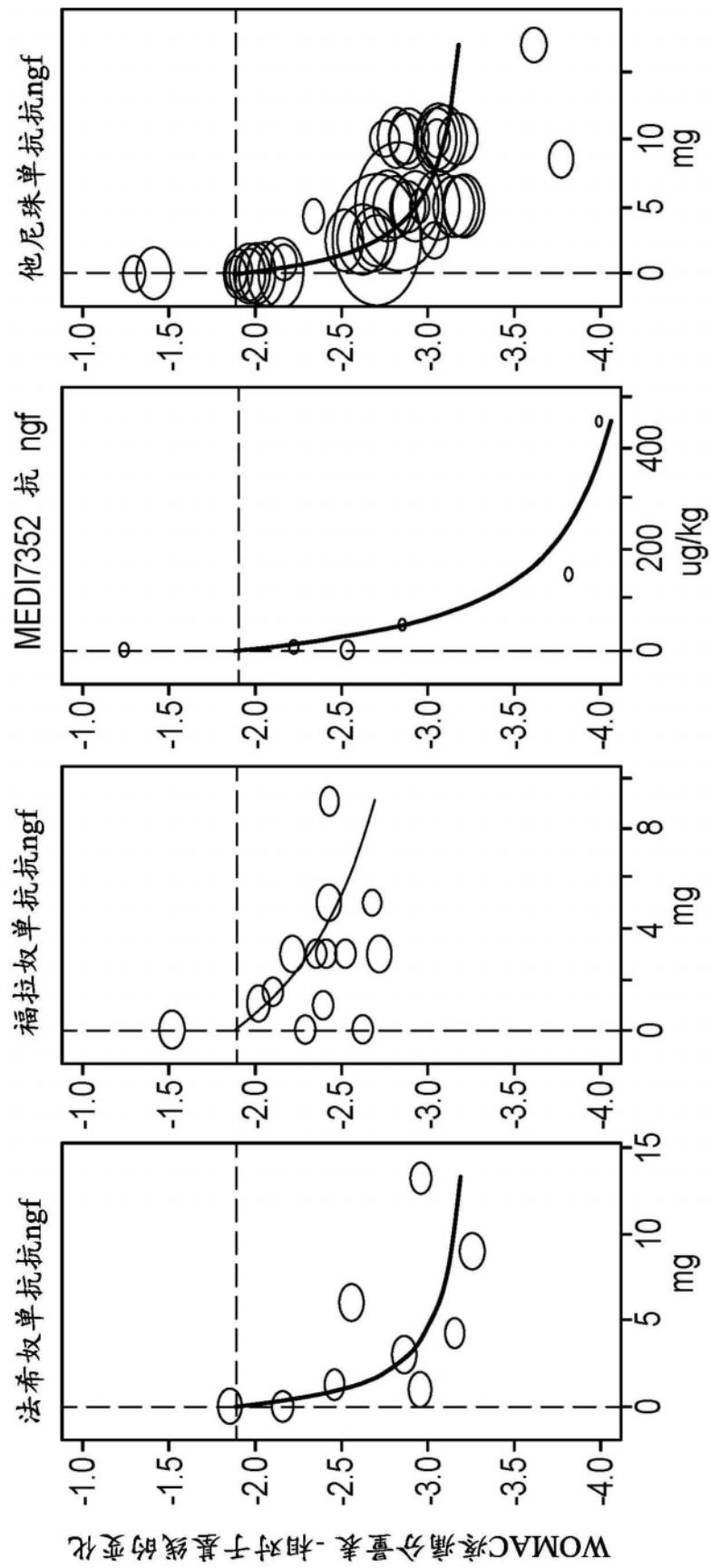


图28C

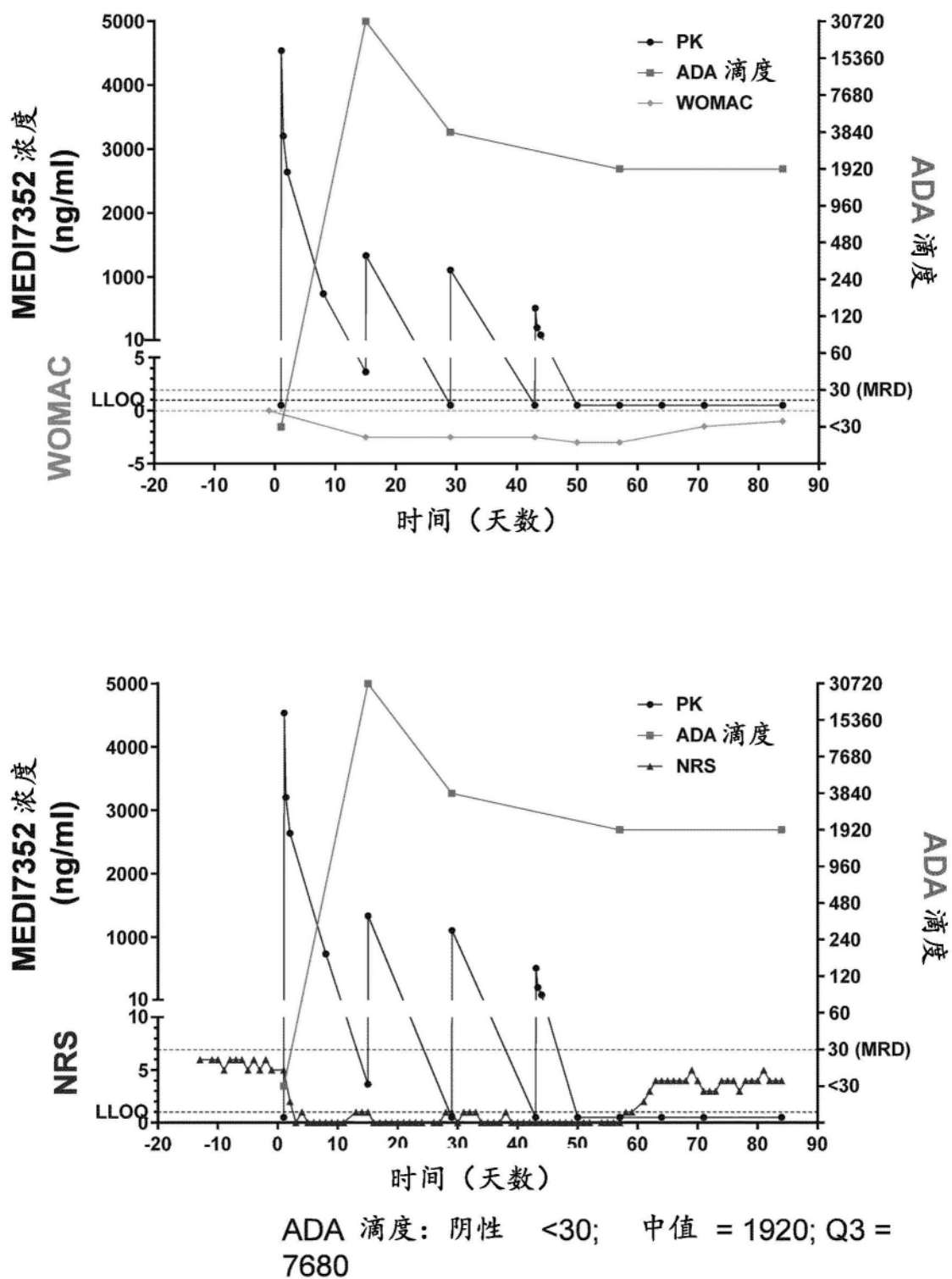


图29

PK浓度中位值曲线相比于ADA滴度

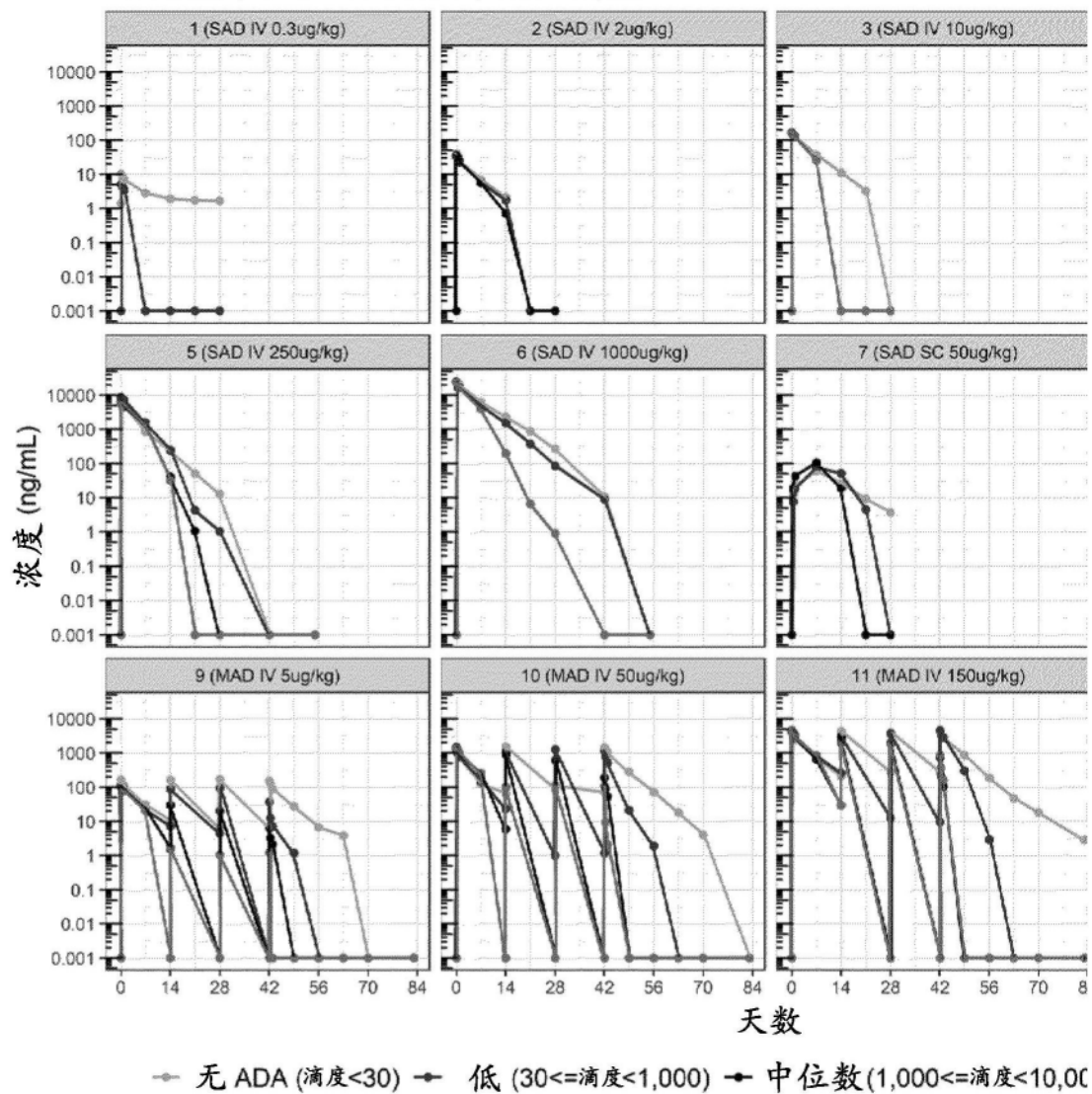


图30

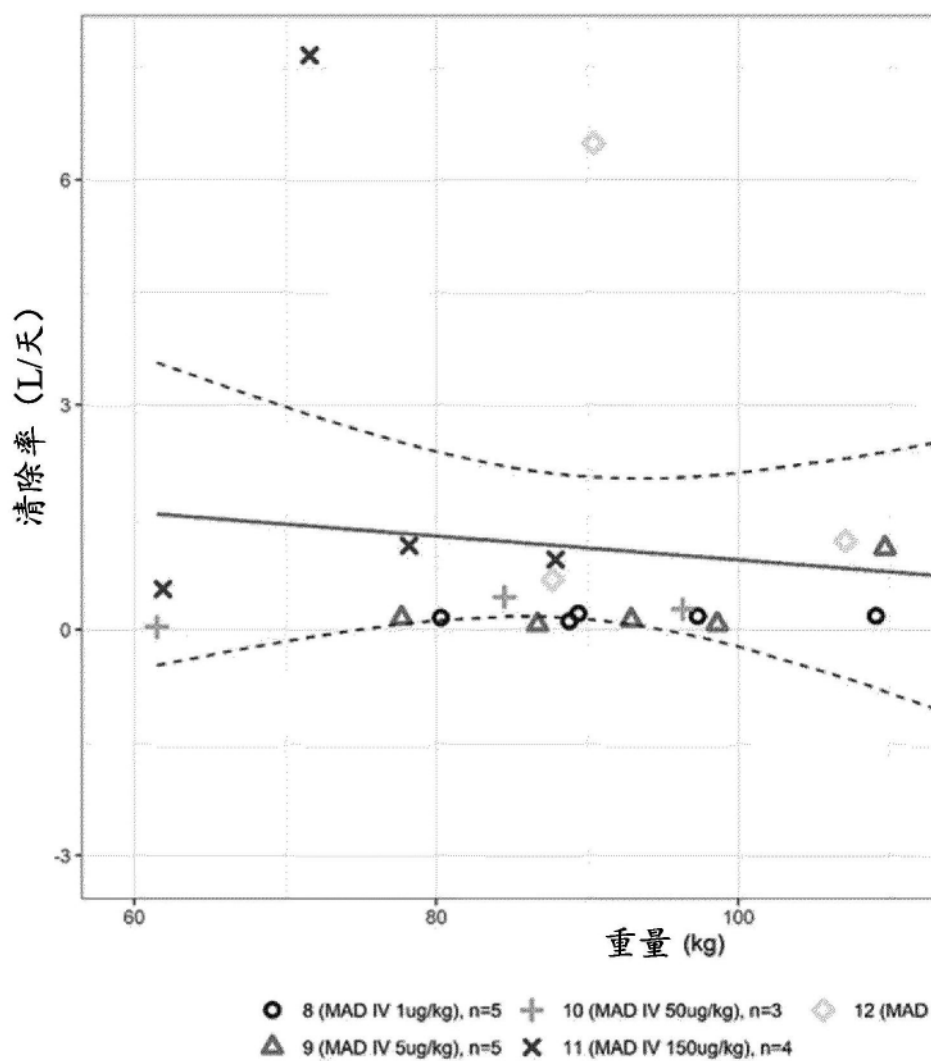


图31

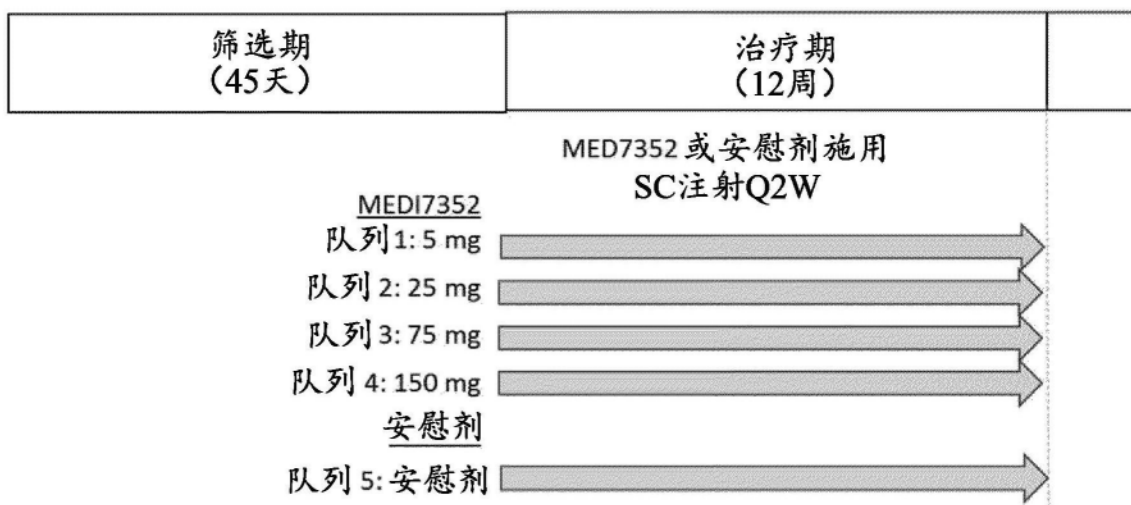


图32