



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103732620 B

(45)授权公告日 2017.02.22

(21)申请号 201280033531.X

(22)申请日 2012.05.08

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103732620 A

(43)申请公布日 2014.04.16

(30)优先权数据
1114858.2 2011.08.29 GB
61/483,481 2011.05.06 US
61/531,439 2011.09.06 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.01.06

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2012/051008 2012.05.08

(87)PCT国际申请的公布数据
W02012/153126 EN 2012.11.15

(73)专利权人 内克斯威特澳大利亚私人有限公司
地址 澳大利亚维多利亚州

(72)发明人 大卫·吉尔芮

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002
代理人 王朋飞 刘成春

(51)Int.Cl.
C07K 16/22(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)

(56)对比文件
WO 0177332 A2, 2001.10.18,
WO 2010117448 A2, 2010.10.14,
WO 2010110838 A2, 2010.09.30,
审查员 毛舒燕

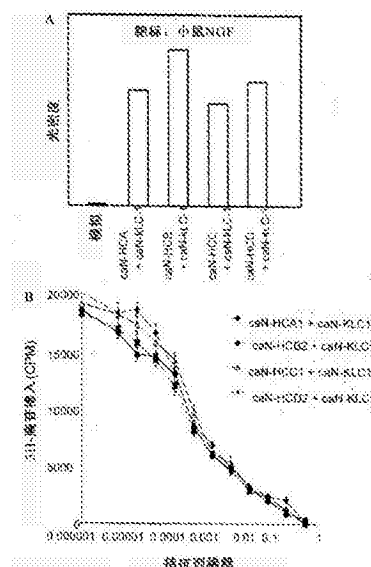
权利要求书1页 说明书19页
序列表21页 附图13页

(54)发明名称

治疗性犬免疫球蛋白及其使用方法

(57)摘要

本发明提供了制备适用于治疗犬的犬抗体的方法。特别是,提供了可以对其结合靶抗原时是否介导下游补体介导的免疫激活的特性进行选择免疫球蛋白。本发明提供了包含特定重链同种型的犬衍生抗体。本发明延伸至本发明的免疫球蛋白在治疗犬的诸如疼痛、炎症病症和癌症病症的方法中的用途。



1. 抗体、其抗原结合片段或融合蛋白在制备用于治疗犬疾病的药物中的用途, 在所述犬疾病的治疗中不存在下游免疫系统效应子功能的激活的情况下, 选择用于中和的靶抗原, 其中所述抗体、其抗原结合片段或融合蛋白包含氨基酸序列为SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:11的重链恒定结构域, 其中当所述抗体、其抗原结合片段或融合蛋白结合所述靶抗原时, 所述重链的氨基酸序列使下游免疫系统效应子功能的激活最小化。

2. 如权利要求1所述的用途, 其中所述犬的治疗涉及疼痛或炎症的治疗。

3. 如权利要求2所述的用途, 其中所述疼痛选自神经病理性疼痛、肿瘤疼痛、由风湿性关节炎导致的疼痛、由骨关节炎导致的疼痛、由炎症导致的疼痛以及由瘙痒导致的疼痛。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的用途, 其中所述下游免疫系统效应子功能选自补体依赖性细胞毒性、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性和抗体依赖性细胞病理。

5. 如权利要求1所述的用途, 其中所述靶抗原选自细胞因子、趋化因子、生长因子、细胞表面受体、病毒和补体级联的组分。

治疗性犬免疫球蛋白及其使用方法

发明领域

[0001] 本发明涉及用作可溶性细胞外介质和/或细胞表面受体拮抗剂的犬抗体或犬衍生抗体,其具有特定的重链恒定结构域。本发明延伸至所述抗体或其片段在用于选择性治疗犬个体的诸如炎症、疼痛、癌症或感染等病症的方法中的治疗用途。

[0002] 发明背景

[0003] 使用免疫球蛋白的恒定结构域片段(constant domain fragment)构建的重组免疫球蛋白和融合蛋白用于治疗许多人类疾病,包括炎性疾病(例如风湿性关节炎、银屑病、炎性肠病)、过敏(例如哮喘)、癌症(例如淋巴瘤、乳腺癌、肠癌)、感染性疾病(例如RSV感染)、疼痛(例如骨关节炎疼痛、癌性疼痛、下背痛)和眼病(例如老年性黄斑变性)。

[0004] 用于治疗的分靶标包括细胞因子和趋化因子(例如白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-5(IL-5)、粒细胞集落刺激因子(GCSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子)、生长因子(例如神经生长因子(NGF)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、肿瘤坏死因子(TNF))、细胞表面受体(例如HER-2、VEGFR、EGFR、CD20)、细胞表面结合生长因子(例如未加工的肿瘤坏死因子)、病毒(例如RSV)和补体级联成分(例如C5)。有证据表明参与疾病过程的许多其它靶标是已知的(例如,如2011年12月14日的1.3.1版IMGT/MAb-DB数据库中所述(URL:www.imgt.org/mAb-DB/query),其内容通过引用并入本文)。

[0005] 天然免疫球蛋白产生不同的主要亚型,包括免疫球蛋白G(IgG)、免疫球蛋白A(IgA)、免疫球蛋白M(IgM)或免疫球蛋白E(IgE),为了应对感染,这些免疫球蛋白在通过结合靶抗原的病原体识别、中和、破坏和消除中起到各种作用。免疫球蛋白G产生几种不同的同种型(也称为亚型),例如(在人类中)IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。这些抗体同种型在结构上、尤其在恒定结构域的氨基酸序列方面有差异,特别是在C1域和C2域之间的恒定结构域(Fc)的铰链区附近有差异。

[0006] 不同的抗体同种型在抗体介导的下游效应子功能方面也存在不同。例如,抗体的恒定区序列可以在抗体的例如效应子功能(ADCC,补体募集固定和激活)、药代动力学和物理性质的特性上介导强大的影响。具有不同同种型的抗体在结合免疫细胞上的IgG Fc受体的能力上也存在不同。对于人类来说,IgG1和IgG3积极参与募集补体以通过血液补体酶的级联来帮助靶标破坏(CDC:补体依赖性细胞毒性作用),类似地,IgG1和IgG3结合以结合抗原作为靶标的免疫细胞上的Fc受体,通过抗体介导细胞毒性作用(ADCC)破坏结合抗原。相比之下,IgG2和IgG4不募集补体或激活ADCC介导的攻击,仅以高亲和力简单地结合到抗原以抑制或抵消其活性。

[0007] 当考虑用于疾病干预的靶标时,设计重组免疫球蛋白及由其制成的融合蛋白以考虑Fc同种型的活性。例如,当考虑旨在使用靶向杀死人癌细胞的抗体的治疗途径时,优选由IgG1或IgG3同种型Fc域构建重组免疫球蛋白,因为这些同种型的使用会驱动免疫介导破坏机制,例如CDC和ADCC。相比之下,当将敏感人体组织情况下的可溶性介质作为靶标时,Fc域被省略(例如,在人老年性黄斑变性的治疗中,优选靶向VEGF的Fab片段),或者使用IgG2或IgG4Fc域进行构建(例如,靶向神经病理性疼痛或炎症性疼痛情况下的神经生长因子,或肾

炎、银屑病或风湿性关节炎病症下的补体C5)。这些考虑也适用于免疫球蛋白融合蛋白,例如基于人IgG1Fc疗法,在例如风湿性关节炎的病症的治疗中的可溶性TNF受体Fc融合蛋白。

[0008] 在犬和例如鼠和马的其它物种中,免疫球蛋白亚型同样存在,但相互之间不具有足够的同源性以通过推理确定哪条序列在引发例如CDC或ADCC的下游效应子功能方面是活跃的或不活跃的。而且,免疫球蛋白的数量随物种的不同而变化(例如,犬中有四个IgG免疫球蛋白,为 caIgG-A、caIgG-B、caIgG-C和caIgG-D(Tang et al., 2001)。在马中有七个IgG同种型(Wagner, 2006))。

[0009] 单独由序列分析或序列同源性不可能确定非人类物种的特定免疫球蛋白同种型在介导受体结合和下游效应子功能方面是否为活跃或不活跃。但是,如果这些是已知的,将具有极大的价值,由于为了提供抗体或基于疗法的抗体的疗效,例如抗体结合片段或融合蛋白,用于抗体产生的同种型恒定结构域的选择可能是关键因素。

[0010] 发明概述

[0011] 经过大量实验,本发明人出人意料地发现,犬IgG免疫球蛋白的同种型具有在人IgG抗体中观察到的特性,即某些IgG抗体同种型在激活免疫效应子功能方面是活跃的,而其它的IgG抗体同种型不激活免疫效应子功能,因而是活跃的。此外,对于四种已知的犬重链免疫球蛋白(被称为HCA(caIgG-A)、HCB(caIgG-B)、HCC(caIgG-C)和HCD(caIgG-D)),发明人出人意料地发现,当构建为靶向不同药靶的各种重组形式时,该四种犬重链免疫球蛋白中的两种(caIgG-B和caIgG-C)的重链恒定结构域令人吃惊地与补体结合,而其它两种(caIgG-A和caIgG-D)没有。

[0012] 因此,本发明限定了某些重组犬免疫球蛋白或由其制成的融合蛋白,其可用于期望靶标破坏的犬治疗中(例如癌症或传染病的治疗);以及某些其它同种型,其可以优选用于只为靶标中和(target neutralisation)而非靶标破坏的犬类治疗中(例如疼痛治疗)。

[0013] 由此,本发明提供了重组犬免疫球蛋白,基于它们的重链恒定结构域的同种型,其可通过结合补体级联的第一组分的能力或其它而区分。因此,首次不管出于通过补体介导细胞毒性效应(CDC;例如用于杀死活体中的犬肿瘤)选择用于免疫介导破坏的预定靶标,还是出于在不存在不希望的免疫介导破坏(例如,在神经附近或在眼中)的情况下仅选择用于中和的靶标,重组犬免疫球蛋白都可以根据它们在犬疾病治疗中的预期用途来选择。

[0014] 本发明的第一个方面提供了用于犬治疗的抗体、融合蛋白或其结合片段,其中所述抗体、融合蛋白或结合片段具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13的重链恒定结构域,其中当所述抗体、融合蛋白或结合片段结合其靶抗原时,所述重链的氨基酸序列使下游免疫系统效应子功能的激活最小化。

[0015] 在某些实施方式中,所述犬的治疗涉及疼痛或炎症或与其相关病症的治疗,例如关节炎或关节炎病症。

[0016] 本发明的另一个方面提供了包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13的重链恒定结构域的抗体、融合蛋白或其结合片段在制备用于治疗犬个体中疼痛或炎症或与其相关的病症例如关节炎或关节炎病症的药物中的用途,当所述抗体、融合蛋白或结合片段结合其靶抗原时,所述重链的氨基酸序列使下游免疫系统效应子功能的激活最小化。

[0017] 本发明的再一个方面提供了用于治疗、抑制或减轻需要其的犬个体中的疼痛或炎

症或与其相关的病症例如关节炎或关节炎病症的方法,所述方法包括下列步骤:

[0018] 提供特异性结合在治疗或预防疼痛或炎症中具有特定功能的靶抗原的抗体、融合蛋白或其结合片段,其中所述抗体、融合蛋白或其结合片段具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13的重链恒定结构域,且其中所述抗体、融合蛋白或其结合片段不激活下游免疫系统效应子功能;以及

[0019] 将治疗有效量的所述抗体、融合蛋白或其结合片段施用至犬个体。

[0020] 本发明的再一个方面提供了具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13的重链恒定结构域的犬衍生抗体、融合蛋白或其结合片段,用于制备治疗、抑制或减轻犬个体的疼痛或炎症的药物。

[0021] 在某些实施方式中,所述疼痛为神经病理性疼痛。特别是,所述疼痛可以为围术期疼痛、术后(post-operative)疼痛或外科治疗后(post-surgical)疼痛。术后(post-operative)疼痛会导致下列任何手术过程,在犬中可以包括但不限于,矫形外科手术、软组织外科手术、卵巢子宫切除术或阉割手术等。在某些另外的实施方式中,所述疼痛为与癌症或癌性疾病状相关的慢性痛(肿瘤痛)。在某些另外的实施方式中,所述疼痛与风湿性关节炎、骨关节炎、发炎或瘙痒相关或由其导致。

[0022] 本发明的再一个方面提供了治疗犬个体中关节炎或关节炎病症的方法,所述方法包括下列步骤:

[0023] 提供特异性结合在治疗或预防疼痛或炎症中具有特定功能的靶抗原的抗体、融合蛋白或其结合片段,其中所述抗体、融合蛋白或其结合片段具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13的重链恒定结构域,且其中所述抗体、融合蛋白或其结合片段不激活下游免疫系统效应子功能;以及

[0024] 将治疗有效量的所述抗体、融合蛋白或其结合片段施用至有需要的犬个体。

[0025] 在某些实施方式中,本发明的前述方法进一步包括:共同施用至少另一种可以增强和/或补助本发明抗体效力的药剂的步骤。例如,所述抗体或其抗原结合片段可以与至少一种镇痛剂、NSAID(非甾体抗炎药)、阿片类药物、皮质类固醇或类固醇共同施用。合适的镇痛剂的实例包括但不限于,布托啡诺(butorphanol)、10丁丙诺啡(buprenorphine)、芬太尼(fentanyl)、氟胺烟酸葡胺(flunixin meglumine)、莫哌啉(merpidine)、吗啡(morphine)、纳布啡(nalbuphine)和它们的衍生物。合适的NSAID包括但不限于,醋氨酚(acetaminophen)、乙酰水杨酸(acetylsalicylic acid)、卡洛芬(carprofen)、依托度酸(etodolac)、酮基布洛芬(ketoprofen)、美洛昔康(meloxicam)、非罗考昔(firocoxib)、罗本纳考昔(robenacoxib)和德拉考昔(deracoxib)等。

[0026] 在某些实施方式中,前述方法可以伴随至少一种其它药剂的施用。所述药剂可以是治疗活性剂,其可以是选自以下的一种或多种:抗生素、抗真菌剂、抗原虫剂、抗病毒剂或类似的治疗剂。此外,所述至少一种其它药剂可以是炎症介质抑制剂,例如PGE受体拮抗剂;免疫抑制剂,例如环孢素;抗炎性糖皮质激素。在某些另外的方面,所述至少一种其它药剂可以是用于治疗认知紊乱或损伤,例如老龄犬中日益普遍的失忆或相关病症的药剂。此外,所述至少一种其它药剂可以是用于治疗心血管功能紊乱,例如治疗高血压、心肌缺氧和充血性心脏衰竭等的抗高血压药物或其它化合物。另外,所述至少一种其它药剂可以是利尿剂、血管扩张剂、 β -肾上腺素受体拮抗剂、血管紧张素-II转化酶抑制剂、钙通道阻滞剂和

HMG-CoA还原酶抑制剂。

[0027] 在本发明前述方面的某些实施方式中,所述下游免疫系统效应子功能选自:补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、和抗体依赖细胞病理(ADCP)。在具体的实施方式中,所述重链恒定结构域的氨基酸序列抑制重链结合C1q,这防止引起补体级联和补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0028] 在某些实施方式中,所述靶抗原是可溶性介质。在某些实施方式中,所述靶抗原是神经生长因子(NGF)。在某些实施方式中,所述抗体特异性结合并抵消介导疼痛或炎症的受体。在某些其它实施方式中,所述靶抗原可以选自细胞因子或趋化因子(例如,白细胞介素-1和相关的白细胞介素IL-2至IL-35、粒细胞集落刺激因子、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、红细胞生成素、促血小板生成素(thrombopoietin)、白血病抑制因子、睫状神经营养因子、抑癌蛋白M)、生长因子(例如,神经生长因子(NGF)、脑衍生神经营养因子(BDNF)、神经营养因子-3、神经营养因子-4、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、肿瘤坏死因子(TNF))、细胞表面受体(例如,HER-2、VEGFR、EGFR、CD20)、细胞表面结合生长因子(例如,未加工的肿瘤坏死因子)、病毒(例如,RSV)和补体级联的组分(例如,C5、C5a),但不限于此。

[0029] 本发明的另外方面,提供了用于治疗犬的抗体、融合蛋白或其结合片段,其中所述抗体、融合蛋白或结合片段具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:14的重链恒定结构域,其中当所述抗体、融合蛋白或结合片段结合其靶抗原上时,所述重链的氨基酸序列介导下游免疫系统效应子功能的激活。

[0030] 在某些实施方式中,所述犬的治疗涉及癌性或恶性病症的治疗。

[0031] 本发明的其他方面提供了包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:14的重链恒定结构域的抗体、融合蛋白或其结合片段在制备用于治疗犬个体中癌性或恶性病症的药物中的用途,其中当所述抗体、融合蛋白或结合片段结合其靶抗原时,所述重链的氨基酸序列介导下游免疫系统效应子功能的激活。

[0032] 本发明的其他方面提供了用于治疗或预防犬个体中癌性或恶性病症的方法,所述方法包括下列步骤:

[0033] 提供特异性结合在治疗或预防癌性或恶性病症中具有特定功能的靶抗原的抗体、融合蛋白或其结合片段,其中所述抗体、融合蛋白或其结合片段具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:14的重链恒定结构域,且其中所述抗体、融合蛋白或其结合片段不激活下游免疫系统效应子功能;以及

[0034] 将治疗有效量的所述抗体、融合蛋白或其结合片段施用至有需要的犬个体。

[0035] 在某些实施方式中,本发明的前述方法进一步包括:共同施用至少另一种可以增强和/或补助本发明抗体效力的药剂的步骤。

[0036] 本发明的其他方面提供了犬衍生抗体、融合蛋白或其结合片段在制备用于治疗犬个体的癌性或恶性病症的药物中的用途,所述抗体、融合蛋白或其结合片段具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:14的重链恒定结构域。

[0037] 在本发明前述方面的某些实施方式中,所述下游免疫系统效应子功能选自:补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞病理(ADCP)。在具体的实施方式中,所述重链恒定结构域的氨基酸序列提供了重链与C1q的结合,这防止引发补体级联和补体依赖性细胞毒性(CDC)。在某些实施方式中,所述重链恒定

结构域提供了与Fc受体的结合,其反过来可以介导ADCP和/或 ADCC免疫反应。

[0038] 在某些实施方式中,所述靶抗原是癌特异性抗原。在本发明的某些另外的实施方式中,所述靶抗原可以选自在犬肿瘤细胞上表达的膜结合蛋白。在本发明的另外的实施方式中,所述膜结合犬肿瘤蛋白可以选自包括CD2、CD4、CD8、CD20、EGFR、VEGFR和HER2等的蛋白质的组。在某些另外的实施方式中,所述靶抗原可以选自但不限于:细胞因子和趋化因子(例如白细胞介素-1(IL-1)、IL-2、IL-3和从数字上直至IL-35的白细胞介素、粒细胞集落刺激因子、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、红细胞生成素、促血小板生成素(thrombopoetin)、白血病抑制因子、睫状神经营养因子、抑癌蛋白M)、生长因子(例如,神经生长因子(NGF)、脑衍生神经营养因子(BDNF)、神经营养因子-3、神经营养因子-4、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、肿瘤坏死因子(TNF))、细胞表面受体(例如,HER-2、VEGFR、EGFR、CD20)、细胞表面结合生长因子(例如,未加工的肿瘤坏死因子)、病毒(例如,RSV)和补体级联的组分(例如,C5、C5a)。

[0039] 本发明的另外的方面提供了用于治疗犬的病症的抗体、融合蛋白或其结合片段,其中所述抗体、融合蛋白或结合片段具有当所述抗体、融合蛋白或结合片段结合其靶抗原时不结合C1q的重链恒定结构域,且其中所述抗体、融合蛋白或结合片段可以用蛋白质A层析纯化。

[0040] 在某些实施方式中,所述抗体、融合蛋白或结合片段具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的重链恒定结构域。在某些实施方式中,所述抗体、融合蛋白或结合片段具有选自SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:15的重链恒定结构域。

[0041] 本发明的另外的方面提供了包含重链恒定结构域的抗体、融合蛋白或结合片段在制备用于治疗与犬的疼痛和/或炎症相关病症的药物中的用途,当所述抗体、融合蛋白或结合片段结合其靶抗原时,所述重链恒定结构域不结合C1q,且其中所述抗体、融合蛋白或结合片段可以用蛋白质A层析纯化。

[0042] 在某些实施方式中,所述抗体、融合蛋白或结合片段具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的重链恒定结构域。在某些实施方式中,所述抗体、融合蛋白或结合片段具有选自SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:15组成的组的重链恒定结构域。

[0043] 本发明的另外的方面提供了用于治疗、抑制或减轻需要其的犬个体的疼痛或炎症或与此相关的病症例如关节炎或关节炎病症的方法,所述方法包括下列步骤:

[0044] 提供包含重链恒定结构域的抗体、融合蛋白或结合片段,当所述抗体结合其靶抗原时,所述重链恒定结构域不结合C1q,且其中所述抗体可以用蛋白质A层析纯化;以及

[0045] 将治疗有效量的所述抗体、融合蛋白或其结合片段施用至所述犬个体。

[0046] 在某些实施方式中,所述抗体、融合蛋白或结合片段具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的重链恒定结构域。在某些实施方式中,所述抗体、融合蛋白或结合片段具有选自SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:15的重链恒定结构域。

[0047] 在各种其他方面中,本发明延伸至:(i)编码本发明任何前述抗体、融合蛋白或结合片段的核酸,(ii)携带所述核酸的载体,(iii)携带所述载体的宿主细胞。本发明进一步延伸至用于产生本发明前述中限定的抗体和融合蛋白的方法。在另外的方面中,本发明延伸至包含本发明的抗体或融合蛋白以及至少一种载体、稀释剂或赋形剂的药物组合物。

[0048] 本发明的另一方面提供了重组抗体、融合蛋白或其结合片段,其可在治疗上施用

于犬以特异性结合靶抗原并且进一步介导免疫反应,所述免疫反应的特征在于C1q补体结合所述抗体、融合蛋白或其结合片段和相关的补体依赖性细胞毒性,其中所述抗体、融合蛋白或其结合片段的重链包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:9的犬免疫球蛋白重链恒定结构域同种型B(HCB,caIgG-B)、具有氨基酸序列SEQ ID NO:10的犬免疫球蛋白重链恒定结构域同种型C(HCC,caIgG-C)或具有氨基酸序列SEQ ID NO:14的无糖基犬免疫球蛋白重链恒定结构域同种型C(HCC,caIgG-C)。

[0049] 本发明的另一方面提供了包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:9的犬免疫球蛋白重链恒定结构域同种型B(HCB,caIgG-B)、具有氨基酸序列SEQ ID NO:10的犬免疫球蛋白重链恒定结构域同种型C(HCC,caIgG-C)或具有氨基酸序列SEQ ID NO:14的无糖基犬免疫球蛋白重链恒定结构域同种型C(HCC,caIgG-C)的抗体、融合蛋白或其结合片段,在制备用于治疗需要特异性结合靶抗原且期望发生免疫反应的病症的药物中的用途,所述免疫反应的特征在于C1q补体结合所述抗体、融合蛋白或其结合片段和相关的补体依赖性细胞毒性。

[0050] 本发明的另一方面提供了治疗犬个体中的癌性状况的方法,所述方法包括以下步骤:

[0051] 提供对肿瘤特异性抗原具有结合特异性且进一步包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:9的犬免疫球蛋白重链恒定结构域同种型B(HCB,caIgG-B)、具有氨基酸序列SEQ ID NO:10的犬免疫球蛋白重链恒定结构域同种型C(HCC,caIgG-C)或具有氨基酸序列SEQ ID NO:14的无糖基犬免疫球蛋白重链恒定结构域同种型C(HCC,caIgG-C)的免疫球蛋白、融合蛋白或其结合片段;以及

[0052] 将治疗有效量所述免疫球蛋白、融合蛋白或结合片段施用至需要其的犬个体。

[0053] 在各种另外的方面中,本发明延伸至结合期望的靶抗原且包含不结合C1q的重链恒定结构域且因此不介导包括补体依赖性细胞毒性的免疫反应的抗体或融合蛋白。

[0054] 因此,在本发明的另一方面提供了可以在治疗上施用于犬以特异性结合靶抗原的重组抗体、融合蛋白或其结合片段,其中所述抗体或融合蛋白的恒定结构域不结合C1q补体,且其中所述恒定结构域的重链包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:8的犬免疫球蛋白重链恒定结构域同种型A(HCA,caIgG-A)、具有氨基酸序列SEQ ID NO:11的犬免疫球蛋白重链恒定结构域同种型D(HCD,caIgG-D)或具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的无糖基犬免疫球蛋白重链恒定结构域同种型B(HCB*,caIgG-B)。

[0055] 本发明的另一方面提供了包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:8的犬免疫球蛋白重链恒定结构域同种型A(HCA,caIgG-A)、具有氨基酸序列SEQ ID NO:11的犬免疫球蛋白重链恒定结构域同种型D(HCD,caIgG-D)或具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的无糖基犬免疫球蛋白重链恒定结构域同种型B(HCB*,caIgG-B)的抗体、融合蛋白或其结合片段,在制备用于治疗需要特异性结合靶抗原且不希望发生免疫反应的病症的药物中的用途,所述免疫反应的特征在于C1q补体结合所述抗体、融合蛋白或其结合片段和相关的补体依赖性细胞毒性。

[0056] 本发明的另一方面提供了用于治疗犬个体中病症的方法,所述方法包括下列步骤:

[0057] 提供对肿瘤特异性抗原具有结合特异性且进一步包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:8的犬免疫球蛋白重链恒定结构域同种型A(HCA,caIgG-A)、具有氨基酸序列SEQ ID NO:11的犬免疫球蛋白重链恒定结构域同种型D(HCD,caIgG-D)或具有氨基酸序列SEQ ID NO:

13的无糖基犬免疫球蛋白重链恒定结构域同种型B(HCB*,caIgG-B)的免疫球蛋白、融合蛋白或其结合片段;以及

[0058] 将治疗有效量所述免疫球蛋白、融合蛋白或结合片段施用至需要其的犬个体。

[0059] 在某些实施方式中,设计用于在没有CDC活性时进行抗体构建的非糖基化恒定结构域是丙氨酸取代的具有氨基酸序列SEQ ID NO:6的非糖基化重链HCB(表示为HCB*)。在本发明的各种其他方面中,包含HCA、HCB或HCD的重链HCA、HCD或CDC不活跃非糖基化形式(HCA*、HCB*或HCD*:SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15)的抗体涉及犬生长因子、荷尔蒙、细胞因子、趋化因子或其它可溶性介质,例如补体级联的组分。在某些实施方式中,包含重链HCA、HCD或HCB*的抗体涉及用于抵消犬中的犬NGF生物活性而不引起CDC的的犬神经生长因子(NGF)。

[0060] 在本发明前述方面的某些实施方式中,所述抗体是单克隆抗体。在某些另外的实施方式中,所述抗体是嵌合抗体。在一些实施方式中,所述抗体是犬源化抗体,即,该抗体具有已去免疫的氨基酸序列,使得当施用于犬个体时,不会产生针对其的中和抗体。通常,所述抗体的重链恒定结构域通过氨基酸取代或缺失的方式选择或修饰,使得所述恒定结构域不介导下游效应子功能。在某些实施方式中,所述抗体可以缀合于至少一个受体分子。

[0061] 在某些另外的实施方式中,可以取代或缺失本发明前述方面的抗体或融合蛋白的恒定结构域中的至少一个残基,以防止该残基的糖基化。在本发明的另一方面中,所述犬免疫球蛋白重链恒定结构域可以全部或部分融合细胞因子或趋化因子受体或其它跨膜蛋白质(例如TNF受体)的胞外域,使得在期望所述犬胞外域-免疫球蛋白重链融合蛋白不激活CDC的情况下(例如,其中TNF受体Fc融合蛋白被设计用于中和可溶性TNF的情况),所述犬免疫球蛋白恒定结构域的全部或片段选自组HCA、HCD或HCB*;或反之,在期望所述犬胞外域-免疫球蛋白重链融合蛋白激活的情况下,(例如,TNF受体Fc融合蛋白被设计以杀死具有炎性细胞的膜相关TNF的情况)所述犬免疫球蛋白恒定结构域选自组HCB、HCC或HCC*。

[0062] 在本发明的另外的方面中,所述犬受体-Fc融合蛋白可以选自在融合到犬免疫球蛋白结构域重链Fc区的犬细胞上发现的膜结合受体的胞外结构域。在本发明的另外的方面中,包含重链HCB、HCC或HCC*的抗体涉及CD20,以通过这些抗体与犬CD20表达细胞例如犬淋巴瘤细胞表面上的CD20结合引起所述细胞的CDC的。

[0063] 此外,优选的是,所述犬源化的抗体不与犬中存在的任何其它表位交叉反应,而且当施用于犬时,并不产生针对本发明的抗体的中和抗体。

[0064] 在某些另外的实施方式中,可对本发明的抗体或融合蛋白进行所述重链恒定结构域的氨基酸序列的修饰。所述修饰可以包括添加、取代或缺失一个或多个氨基酸残基。通常进行上述氨基酸变化修饰是为了修饰所述抗体的功能特性。例如,可以进行氨基酸修饰,例如通过阻止所述抗体结合Fc受体的能力、激活补体或诱导ADCC,以阻止抗体恒定结构域介导的下游效应子功能。此外,可以对所述重链恒定结构域的铰链区的氨基酸残基进行修饰,以在施用于犬时调节抗体的循环半衰期。

[0065] 在一些实施方式中,本发明提供了包含以不同的结合特异性缀合或结合其他抗体的本发明的抗体或结合片段的多重特异性或多价抗体,以用于联合治疗。多重特异性抗体包含针对第一表位的至少一个抗体或结合片段,以及针对存在于该抗原上的另一个表位或另一抗原的至少一个结合位点。多价抗体包含对相同表位具有结合特异性的抗体或抗体结

合片段。因此,在某些实施方式中,本发明延伸至包含四个或更多个本发明抗体的Fv区或Fab区的抗体融合蛋白。在某些另外的实施方式中,本发明延伸至双特异性抗体,其中本发明的抗体或其结合片段连接到对第二靶标具有结合特异性的第二抗体或其结合片段,所述靶标不是第一抗原。这种多价抗体、双特异性抗体或多重特异性抗体可以通过为本领域技术人员熟知的多种重组方法制得。

[0066] 在某些实施方式中,将所述抗体、融合蛋白或抗原结合片段以约0.01mg/kg体重至10mg/kg体重、特别是约0.03mg/kg体重至3mg/kg体重的剂量范围施用于犬,作为前述方法的一部分。

[0067] 在各种其他的方面中,本发明延伸至包含本发明任何前述方面的抗体、融合蛋白或其结合片段的组合物。在某些实施方式中,所述组合物进一步包含至少一种药学上可接受的载体。在某些实施方式中,所述组合物可以进一步包含至少一种镇痛剂、NSAID、阿片类药物、皮质类固醇或类固醇。

[0068] 在各种其他的方面中,本发明延伸至编码本发明抗体、融合蛋白或抗体结合片段的分离的核酸。因此,本发明的另一方面提供了编码本发明任何前述方面的抗体、融合蛋白或抗原结合片段的分离的核酸。在某些实施方式中,所述分离的核酸还编码与其可操作地连接的一个或多个调控序列。

[0069] 本发明的另一方面提供了包含编码本发明的重链可变结构域和/或轻链可变结构域或重链恒定结构域和/或轻链恒定结构域的多核苷酸的表达载体。在某些实施方式中,所述表达载体进一步包含一个或多个调控序列。在某些实施方式中,所述载体是质粒或逆转录病毒载体。本发明的另一方面提供了合并本发明前述方面的表达载体的宿主细胞。本发明的另一方面提供了产生本发明任何前述方面的抗体的宿主细胞。

[0070] 本发明的又一方面提供了用于产生本发明的抗体或融合蛋白的方法,所述方法包括培养本发明前述方面的宿主细胞以允许该细胞表达抗体的步骤。本发明的又一方面提供了产生本发明的抗体或融合蛋白的方法,所述方法包括下列步骤:在合适的宿主细胞中表达本发明前述方面的一个或多个多核苷酸/核酸或载体,其表达本发明的抗体的轻链和/或重链;回收(recovering)表达的多肽,其可在一个宿主细胞中共同表达,或在不同的宿主细胞中分别表达;以及分离抗体。本发明的又一方面提供了用于治疗、减轻或抑制犬疼痛的方法,所述方法包括将有效量的编码具有含氨基酸序列SEQ ID NO:8-SEQ ID NO:11的重链恒定结构域的抗体或融合蛋白的多核苷酸施用于犬的步骤。

[0071] 犬抗体纯化

[0072] 在没有不需要的免疫效应子活性而期望靶标中和的犬抗体中,本发明人出人意料地发现,缺乏CDC活性的犬重链的原生同种型也非常弱地结合葡萄球菌蛋白A,如果确是如此,则这种纯化抗体的常用方法不能用于其制备。本发明人提出三种方法来克服这一限制,通过使用替代的纯化策略并通过重链的突变来阻止生产过程中的糖基化。通过这些方法制备的纯化抗体由本发明人制得,并显示出在狗体内具有期望的安全性和有效性,而没有不想要的免疫原性。

[0073] 本发明的再一方面提供了用于从源混合物纯化犬衍生免疫球蛋白或免疫球蛋白或融合蛋白的方法,其包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:8的同种型A(HCA,caIgG-A)的犬重链恒定结构域或具有氨基酸序列SEQ ID NO:11的同种型D(HCD,caIgG-D)的犬免疫球蛋白

重链恒定结构域,所述方法包括下列步骤:

[0074] (i) 提供包含靶免疫球蛋白或融合蛋白的源混合物;

[0075] (ii) 对所述源混合物进行阴离子交换层析;

[0076] (iii) 对所述源混合物进行疏水作用层析;以及

[0077] (iv) 对所述源混合物进行尺寸排阻层析。

[0078] 在某些实施方式中,所述方法包括将缓冲液更换为磷酸盐缓冲液中的步骤。典型地,所述方法产生出分级为高纯度和高生物活性的纯化抗体。

[0079] 本发明的另一方面提供了产生非糖基化犬抗体的方法,所述非糖基化抗体可以通过蛋白质A层析纯化。

[0080] 在本发明的各种其他的方面中,提供了根据本文限定的任何方法产生的犬抗体或犬衍生抗体或融合蛋白,用于犬的治疗。在各种其他的方面中,提供了抗犬NGF抗体在制备用于治疗犬中免疫介导病症或与疼痛相关的病症的药物中的用途。

[0081] 本发明的另一方面提供了用于从源混合物纯化犬衍生免疫球蛋白或免疫球蛋白或融合蛋白的方法,其包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:8的同种型A(HCA,caIgG-A)的犬重链恒定结构域或具有氨基酸序列SEQ ID NO:11的同种型D(HCD,caIgG-D)的犬免疫球蛋白重链恒定结构域,所述方法包括下列步骤:

[0082] (i) 提供包含靶免疫球蛋白的源混合物;

[0083] (ii) 对所述源混合物进行captoadhere亲和层析;以及

[0084] (iii) 对所述源混合物进行阴离子交换层析。

[0085] 本发明的另一方面延伸至由本发明前述方面的纯化方法产生的抗体或融合蛋白,用于犬的治疗。

附图说明

[0086] 图1A通过ELISA显示了使用犬重链的四种不同的同种型(HCA、HCB、HCC、HCD)构建的抗NGF抗体(表示为转染CHO细胞的上清液)对鼠NGF的等效结合;以及图1B显示了TF-1细胞的NGF增殖的等效抑制。

[0087] 图2显示了以抗C1q ELISA测量的补体对NGF-结合抗犬NGF抗体同种型的差别结合。

[0088] 图3a和3b显示了以抗C1q ELISA测量的NGF捕获的糖基化的和非糖基化的犬源化抗NGF单克隆抗体对补体的结合。

[0089] 图4显示了通过抗C1q ELISA测量的NGF捕获的犬源化抗NGF单克隆抗体(MAb)、抗犬VEGF MAb和抗人CD20/犬HCB嵌合MAb对补体的结合。特别是,图4A、4B和4C显示了补体对使用各种犬重链同种型构建的抗体的结合。犬源化单克隆抗体(MAb)在CHO细胞中表达,并测试其结合补体C1q的能力。板A-犬源化抗NGF抗体(caN-HCB、caN-HCC)与人源化抗体同种型(huN-G1、huN-G4)相比较;板B-用犬HCA(caV-HCA)和HCB(caV-HCB)同种型构建的抗VEGF抗体;板C-使用HCB同种型(muB-HCA)构建的抗CD20抗体与小鼠IgG2a同种型(muB-2a)相比较。

[0090] 图5显示了通过蛋白质A纯化并使用抗犬多克隆免疫球蛋白通过蛋白质印迹检测的抗NGF抗体同种型的相对回收。使来自图1的上清液经过蛋白质A柱并特异性结合洗脱材

料。使等体积的洗脱液经历SDS-PAGE。犬同种型HCA、HCC和HCD弱结合蛋白质A,如洗涤和流通分级(wash and flow through fractions)中所示。图A-D显示了通过蛋白质A相对回收犬抗体同种型HCA、HCB、HCC和HCD:L,加载(load);W,洗涤(wash);P,纯化(purified);F,流通(flow through)。来自图1中抗NGF抗体上清液用于此实验。

[0091] 图6A和6B显示了使用三步法(方法I)定量纯化抗犬NGF抗体(HCA同种型),该三步法(方法I)包括(1)阴离子交换层析、(2)疏水作用层析和(3)尺寸排阻层析。图6A显示了通过尺寸排阻HPLC的分级结果。图6B显示了每一步骤后级分的还原性SDS-PAGE凝胶。图6C和6D显示了使用两步法(方法II)定量纯化本发明的抗犬NGF抗体,该两步法(方法II)包括Captopadhere层析和阴离子交换层析。图6C显示了在非还原和还原条件下的SDS-PAGE分析。在图6C中,泳道1是MWS,泳道2是2 μ g/mL抗犬NGF抗体和0 μ l还原剂,泳道3是4 μ g/mL抗犬NGF抗体和0 μ l还原剂,泳道4是抗6 μ g/mL犬NGF抗体和0 μ l还原剂,泳道5是MWS,泳道6是2 μ g/mL抗犬NGF抗体和3 μ l还原剂,泳道7是4 μ g/mL抗犬NGF抗体和3 μ l还原剂,泳道8是6 μ g/mL抗犬NGF抗体和3 μ l还原剂,以及泳道9是MWS。图6D:纯化的抗犬NGF抗体的尺寸排阻层析。

[0092] 图7显示了通过方法I和II纯化的抗犬NGF抗体(HCA同种型)的对比。图7A:通过非还原和还原SDS-PAGE的对比。图7B:通过抗NGF ELISA的对比。

[0093] 图8显示了对狗静脉给药抗犬NGF抗体(HCA同种型,通过方法I纯化)后体重(上表)和温度(下表)保持稳定。

[0094] 图9显示了对狗静脉注射后血浆抗犬NGF单克隆抗体浓度的动力学分析。以2mg/kg将抗NGF抗体静脉注射入比格犬,在指示的时间采集血浆样品且用NGF ELISA检测抗NGF单克隆抗体。该抗犬NGF单克隆抗体具有约9天的出奇长的消除(β)相半衰期。

[0095] 图10显示了抗犬NGF单克隆抗体(HCA同种型,通过方法I纯化)减轻了狗的炎性疼痛。在-1天时将高岭土注射入比格犬的垫脚中,在0天进行抗体或媒介对照,并通过目测评分量表判断跛足程度。

[0096] 发明详述

[0097] 经过大量实验,本发明人使用不同的重量恒定结构域同种型设计并构建了几种犬单克隆抗体,且令人惊奇地显示出,有益的性质从它们介导下游效应子功能的能力(或其它方面)、特别是从它们结合补体的能力可以推断出有益的特性。因此,本发明人已鉴定出不同的犬免疫球蛋白同种型介导的不同的生物效应。对于补体结合犬抗体同种型,这种有益的特性在于体内补体调控细胞毒性(CDC)的相同抗体结合的调控(directing)细胞中。需要这种功能特性的一个实例是在犬癌症治疗中,其中针对肿瘤抗原的抗体随后会引导补体系统靶向已被该抗体结合的细胞,用于破坏。

[0098] 相比之下,在不需要补体活性的情况下,例如在神经附近、在眼中或在已发炎的组织中,或仅仅出于降低抗体无法预料的副作用风险的考虑,优选不结合补体从而不导致CDC的抗体同种型。

[0099] 因此,预测哪种犬同种型适合于设计并适合使用犬抗体治疗能力,无疑是非常需要和有用的。

[0100] 已经描述了四种不同的犬免疫球蛋白G同种型(caIgG-A(犬免疫球蛋白G同种型A)、caIgG-B、caIgG-C和caIgG-D-Tang et al.,2001)。为简单起见(以允许不同抗体构建上的区别并来自轻链组分),该重链恒定结构域被称为HCA(caIgG-A)、HCB(caIgG-B)、HCC

(caIgG-C)和HCD(caIgG-D)。

[0101] 抗体的纯化

[0102] 本发明人在纯化期望的抗NGF抗体的HCA和HCD同种型的过程中意外地发现,以蛋白质A亲和柱层析的形式用于工业生产规模以生产大规模纯化治疗用蛋白质的配体也不结合蛋白质A。图5显示了通过蛋白质A亲和层析小规模地相对回收抗NGF抗体的HCA、HCB、HCC和HCD同种型。因此,需要其它方法来纯化HCA或HCD同种型,因为这些不能通过蛋白质A亲和层析进行纯化。经过大量实验,发明者令人惊奇地发现了可以用于纯化caN-HCA-kLC抗体构建或具有HCA或HCD重链同种型的其它犬抗体的两种替代方法(这里称为方法I和方法II)。

[0103] 第一种方法包括阴离子交换层析、疏水作用层析和排阻层析的组合。第二种方法包括captopadhere亲和层析和阴离子交换层析的组合。图6说明了通过两种方法的每一种纯化含有抗NGF抗体的HCA。通过每种方法都获得了高纯度的材料,且通过NGF ELISA显示两种方法产生了具有相似生物活性的材料(图7)。由于HCA和HCD同种型相互之间比与HCB和HCC同种型更为类似,上述方法可用于该两种同种型。

[0104] 在对抗体纯化的进一步探索中,本发明人意外地发现非糖基化HCB*同种型抗NGF抗体,如HCB同种型,仍然能够结合蛋白质A,因此具有缺乏CDC活性并且通过蛋白质A层析纯化的期望特性。

[0105] 犬安全性试验

[0106] 为了说明被设计成没有不想要的CDC活性的本发明的抗体对狗是安全的,将高度纯化的抗NGF的HCA同种型抗体通过静脉注射注入三只狗中(following prior approval by the Institutional Animal Ethics Committee-CRL,Ireland,经过公共动物伦理委员会-CRL事先批准后)。图8显示了除了由兽医观察到的没有行为变化之外,这三只狗在注射HCA同种型抗体(单只2mg/kg的剂量)之后没有显示出体重变化或发热。

[0107] 这三只狗的HCA同种型抗体的血浆动力学与包括约9天的长beta半衰期的两相分布和消除相符合(图9)。在14天的追踪期间内快速清除的缺少与它们对于犬抗体的无抗体反应相符合。相比之下,人类免疫球蛋白重链恒定结构域在狗中产生免疫性,且在注入后8或9天从血浆中快速清除(Richter1999,Drug Met.Disp.27,21-25)。

[0108] 炎症犬模型

[0109] 在社会伦理委员会(Institutional Ethics Committee,CRL,爱尔兰)的预先批准下进行所有的实验。将高岭土(kaolin)注入(-1天时)比格犬的一条后腿的垫脚中,从而在约24小时后开始自身化解炎症,这导致狗暂时性跛足。在该模型中,一旦对高岭土的初始炎症反应减弱,在约1-2周内该狗的跛足程度将稳定地减小,然后全部恢复。

[0110] 通过静脉注射将抗犬NGF单克隆抗体以每千克体重200μg或作为媒介对照的磷酸盐缓冲液注入(0天时)到3只狗的组中。7天后,通过目测评分方法评价狗的跛足程度:0分,没有跛足(全负重);1分,轻微跛足(非全负重但行走正常);2分,中等跛足(轻微负重且行走不正常);3分,严重跛足(无负重)。观察者不了解哪只狗接受了注射。

[0111] 图10示出了该结果。与媒介对照组相比,注射3天后,接受抗NGF单克隆抗体的狗的跛足评分减小,这表明与仅用媒介相比,抗NGF单克隆抗体具有降低狗的疼痛的效果。延迟的活性与抗犬NGF单克隆抗体的血浆药物动力学一致,这表明约30小时的慢的组织分布相和垫脚区相对差的血管形成。图10示出的结果表明,本发明的抗犬NGF抗体在降低跛足的

同时降低了狗的炎性疼痛。

[0112] 本发明人描述的所有结果共同表明,使用CDC不活跃HCA同种型构建的纯化的犬抗体对于犬是安全和有效的,且具有令人满意的长半衰期。

[0113] 通过引用将本发明提及的所有文献并入本文中。在不背离本发明的范围的情况下,对本发明的实施方案进行各种修饰和变化对本领域技术人员是显而易见的。虽然就具体优选的实施方案进行了描述本发明,但是应该理解,请求保护的本发明不应该不适当地限制为这些具体的实施方案。事实上,本发明意图涵盖对本领域技术人员显而易见的实施本发明的方式的各种修改。

[0114] 定义

[0115] 除非另有限定,本文使用的所有技术术语和科学术语具有本领域技术人员通常理解的含义。术语的含义和范围应当清楚,然而,在发生歧义的情况下,本文给出的定义优先于任何字典或外在的定义。

[0116] 在全文中,除非上下文另有要求,术语“包含(comprise)”或“包括(include)”或其他变体例如“包含(comprises)”或“包含(comprising)”、“包括(includes)”“包括(including)”应理解为表示包含所述整数或整数组,但并不排除任何其他的整数或整数组。

[0117] 如本文所使用的,除非文中明确要求,诸如“a(一个/种)”、“an(一个/种)”以及“the(该/所述)”的术语包括单数个或复数个参照物。因此,例如,提到“一种活性剂(an active agent)”或“一种药理学活性剂”包括一种单一的活性剂和两种或以上不同的活性剂组合,而提到“载体”,其包括两种或以上载体以及单一载体的混合物等。而且,除非文中另有要求,单数的术语包括复数并且复数的术语也包括单数。

[0118] 如本文所限定的,术语“疼痛”指与实际的或潜在的组织损伤相关的或按照这样的损伤描述的不愉快的感觉和情感体验。

[0119] 关于手术或手术后疼痛,US动物福利法(Animal Welfare Act2002.AWA regulations,CFR,Title9(Animals and Animal Products),Chapter1(Animal and Plant Health Inspection Service,Department of Agriculture).Subchapter A(Animal Welfare),Parts1-4)将疼痛的过程规定为合理地预期将引起应用该过程的人类超过轻微或短暂疼痛或悲痛的任何过程,也就是说,超过通过注射或其他小的手术引起的疼痛。因此,如果犬经历疼痛的外科手术,则该动物应该施用术后镇痛剂。

[0120] 在另外的情况下,由于有关的医疗状况例如风湿性关节炎、骨关节炎、炎性或癌性或恶性病症,犬可能经历严重的疼痛或慢性痛。

[0121] 术语“伤害性感受”指伤害刺激的感觉。本文限定的“神经病理性疼痛”(也被称为神经痛)指来自有神经信号问题的疼痛。其可能由于影响躯体感觉系统的损害或疾病而发生。存在数种神经疼痛的原因并且其可能与自发发生的、被称为感觉迟钝的感觉异常有关。可选地,其可能与触摸痛有关,当正常不发生疼痛的接触或刺激使得疼痛发生或转坏时,将引起触摸痛。例如,如果有三叉神经痛,则轻微地触碰脸将引发疼痛,或者如果有糖尿病性神经病,则床上用品的压迫可能引发疼痛。神经病理性疼痛也可以由触摸痛导致,其中当正常不发生疼痛的接触或刺激使得疼痛发生或转坏时,将引起疼痛。例如,如果个体患有三叉神经痛,则轻微地触碰脸将引发疼痛。与痛觉有关的神经病理性疼痛指正常只引起轻微的

不适的刺激或接触所产生的严重的疼痛,而感觉异常指,即使当没有任何东西与引起疼痛的区域接触时发生的不舒服的或痛苦的感觉,例如四肢发麻。神经病理性疼痛的其他形式包括瘙痒或发痒,其可以与皮肤中的过敏反应或炎症反应以及由组织损伤和募集过程产生的炎性痛有关。

[0122] 如本文所限定的,术语“NGF中和抗体”或类似的术语描述了能够中和NGF的生物激活和信号传导的抗体。中和抗体也可以称为拮抗性抗体或阻断抗体,其特异性优选选择性地结合NGF并抑制NGF的一种或多种生物活性。例如,中和抗体可以抑制NGF与其靶配体的结合,例如细胞膜结合TrkA或p75受体。

[0123] 如本文所使用的,术语“生物活性”指分子的任何一种或多种内在的生物学特性(不管是体内发现天然存在的还是通过重组方法给予或激活的)。生物学特性包括但不限于受体结合和/或激活、诱导细胞信号传导或细胞增殖、抑制细胞生长、诱导细胞因子或趋化因子产生、诱导细胞凋亡和酶活性。

[0124] 如本文使用的,术语“互补性决定区(CDR)”指一起限定天然免疫球蛋白结合位点的天然Fv区的结合亲和性和特异性的氨基酸序列,如同Kabat et al. (Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H., Gottesman, K. and Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242, 免疫学研究的蛋白质的序列)中所述的。如本文所使用的,术语“框架区(FR)”指插入在CDR之间的氨基酸序列。抗体的这些部分用来将CDR保持在合适的方向(允许CDR结合抗原)。

[0125] 如本文所使用的,术语“恒定区(CR)”指抗体分子赋予效应子功能的部分。在本发明中,恒定区通常指犬的恒定区,也就是说,主题犬源化抗体的恒定区来源于犬免疫球蛋白。

[0126] 本文所用的术语“嵌合抗体”指含有衍生自两种不同抗体的序列的抗体,所述不同抗体通常为不同物种的。最典型的是,嵌合抗体包含衍生自供体物种且特异性结合靶表位的可变结构域和从施用该抗体的靶物种获得的抗体衍生的恒定结构域。

[0127] 本文所用的术语“免疫原性”指当施用至接受者时引起免疫反应(体液的或细胞的)的寻靶蛋白或治疗部分的能力的估量。本发明涉及主题犬源化抗体的免疫原性。优选本发明的抗体不具有免疫原性,也就是说,当施用至犬时,将不会产生针对它们的中和抗体,并且进一步,没有通过抗体的Fc区介导的效应子功能。

[0128] 本文所用的术语“同一性”或“序列同一性”指在比对的序列中任何特定的氨基酸残基位置处,氨基酸残基在比对的序列间是相同的。本文所用的术语“相似性”或“序列相似性”表示,在比对的序列的任何特定的位置,氨基酸残基在这些序列之间具有相似的类型。例如,亮氨酸可以被异亮氨酸或缬氨酸取代。这可以被称为保守取代。优选地,当本发明的氨基酸序列通过其中包含的任一氨基酸的保守取代来修饰时,与未修饰的抗体相比,这些变化对所产生的抗体的结合特异性或功能活性没有影响。

[0129] 本发明的(天然)多肽及其功能衍生物的序列同一性涉及,在比对序列并且在必要时引入缺口以实现最大百分比同源性且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分之后,候选序列中与对应的天然多肽的残基相同的氨基酸残基的百分比。不管是N端或C端的延长,还是插入,都不应该解释为降低序列同一性或同源性。用于实施两个或以上氨基酸序列的比对和用于确定它们的序列同一性或同源性的方法和计算机程序,是本领域技术人员熟

知的。例如,使用算法例如BLAST (Altschul et al.1990)、FASTA (Pearson&Lipman1988)或Smith-Waterman algorithm (史密斯-沃特曼算法,Smith&Waterman1981)可以容易地计算2个氨基酸序列的同一性或相似性的百分比。

[0130] 如本文所用的,提到与第二氨基酸残基具有最高同源性的氨基酸残基,指与第二氨基酸残基共有最多的特征和特性的氨基酸残基。在确定氨基酸残基与第二氨基酸残基是否具有最高同源性时,评定通常可以由各种因素组成,例如但不限于电荷、极性、疏水性、侧臂质量和侧臂尺寸。

[0131] 术语“对应的位置”在本文中用来表示存在于第二序列的与第一序列中的特定氨基酸对应的某位置的氨基酸残基,且该术语用于表示,当比对两条序列以允许两条序列之间的最大序列同一性时,与第一序列的位置相同的第二序列中的位置。对应位置处的氨基酸残基具有相同的Kabat编号。

[0132] 本文所用的术语“基本上由…组成”或“基本上由…组成”表示,多肽 可以含有除所描述的以外的其他要素或元素,条件是这样的要素或元素并不会实质地影响抗体或抗体片段特异性结合犬NGF的能力。也就是说,包含多肽的抗体或抗体片段可以具有不干扰抗体或抗体片段结合犬NGF的能力和抵消犬NGF功能活性的能力的其他要素或元素。可以将这样的修饰引入氨基酸序列中,从而降低抗体的免疫原性。例如,基本上由特定序列组成的多肽在该序列的一端或两端可以含有一个、两个、三个、四个、五个或以上额外缺失或取代的氨基酸,条件是这些氨基酸并不干扰、抑制、阻断或干扰抗体或片段结合犬NGF和隔离其生物功能的作用。同样,有助于抵消本发明的抗体的犬NGF的多肽分子可以被一个或多个官能团化学修饰,条件是这类官能团不干扰抗体或抗体片段结合犬NGF和抵消其功能的能力。

[0133] 本文所用的术语“有效量”或“治疗有效量”指实现治疗效果所需的本发明的药物、结合化合物、小分子、融合蛋白或药物筛选化合物(peptidomimetic)的量。

[0134] 本文中术语“多肽”、“肽”或“蛋白”可交换地用来表示通过相邻残基的 α 氨基和羧基之间的肽键连接的线性氨基酸残基。氨基酸残基通常是天然的“L”同分异构形式。然而,只要通过多肽保留期望的功能特性,“D”同分异构形式的残基可以取代任何L-氨基酸残基。

[0135] 如本文所限定的,“抗体”包含特异性结合目的靶抗原的抗原-结合蛋白,所述靶抗原具有可以被重组制备或通过免疫球蛋白基因编码的一个或多个多肽,在本文中该靶抗原 是犬神经生长因子。术语“抗体”包含单克隆抗体和嵌合抗体,特别是犬源化抗体,并且进一步包含多克隆抗体或任何类或子类的抗体。“抗体”进一步延伸至杂合抗体、双特异性抗体、异种抗体以及其保留抗原结合的功能片段。

[0136] 短语“特异性结合”指抗体与存在于异源蛋白群中的特定蛋白或靶的结合。因此,当存在于免疫测定条件时,抗体结合特定蛋白而并不大量地结合样品中存在的其他蛋白,在本文中该特定蛋白指犬NGF。

[0137] 如本文所限定的,“犬”还可以指“狗”。犬可以被归类为学名家犬 (*Canis familiaris domesticus*)或澳洲野犬 (*Canis lupus dingo*)的亚种。犬包括任何种类的狗,并且包括野生品种和宠物品种,宠物品种还被称为伴侣动物。

[0138] 现将参考以下实施例描述本发明,所提供的实施例用于说明的目的并非意图用于限制本发明。除非另有指明,通常根据本领域熟知的常规方法和如本发明引用和讨论的各种一般文献和详细文献中所描述的方法来实施本发明的方法和技术。

[0139] 神经病理性疼痛神经病理性疼痛神经病理性疼痛神经病理性疼痛导致神经病理性疼痛

具体实施方式

[0140] 实施例1—设计并产生具有不同犬同种型的抗犬NGF抗体

[0141] 使用连接至选自HCA (SEQ ID NO:1)、HCB (SEQ ID NO:2)、HCC (SEQ ID NO:3) 或HCD (SEQ ID NO:4) 的重链恒定结构域(CH2和CH3)的相同的可变重链结构域(VH),设计并构建针对犬NGF的抗体(称为caN抗体)。可变轻链(VL)连接至犬κ恒定结构域(SEQ ID NO:5)。通过密码子优选和完整的化学基因合成将该组合的氨基酸序列转换为哺乳动物细胞中的可表达形式并克隆入哺乳动物细胞表达载体pcDNA3.1+。具体而言,所设计的氨基酸序列被构建成合成的cDNA-可表达形式并被克隆入哺乳动物细胞表达载体pcDNA3.1 (+) 中。通过组合犬源化可变结构域序列和C-端犬恒定重链序列或恒定轻链序列来产生完整的抗体序列。该犬源化的aD11VH结构域与四个重链同种型HCA、HCB、HCC和HCD (SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:4) 中的每一个结合,以及该犬源化的aD11VL结构域与犬κ轻链恒定结构域(SEQ ID NO:5) 结合。通过密码子优选和完整的化学基因合成并克隆入哺乳动物细胞表达载体pcDNA3.1+,将所组合的氨基酸序列换为哺乳动物细胞中的可表达形式。

[0142] 使犬源化的重链cDNA质粒和轻链cDNA质粒的组合 (caN-HCA-kLC使用SEQ ID NO:5加SEQ ID NO:1 (HCA); caN-HCB-kLC使用SEQ ID NO:5加SEQ ID NO:2 (HCB); caN-HCC-kLC使用SEQ ID NO:5加SEQ ID NO:3 (HCC) 以及caN-HCD-kLC使用SEQ ID NO:5加SEQ ID NO:4 (HCD)) 转染入CHO细胞,收集上清液并以ELISA模式使其与与NGF进行反应。在孵育和清洗步骤后,通过与连接辣根过氧化物酶(HRP)的山羊-抗犬IgG特异性多克隆抗体的反应性来检测结合的犬抗体并使用TMB使其显影。在450nm下测量所得的产物的光密度,并将其与来自模拟空白载体转染的上清液(图1中表示为“模拟”)的光密度进行比较。图1显示四种犬源化抗体同种型结合NGF的结果。这些抗体的每一种都具有相同的轻链(caN-kLC-1),即为包含犬κ恒定结构域的轻链。每一种抗体都具有不同的重链恒定结构域。因此,将一种特定的重链可变结构域与四种不同的恒定结构域(caN-HCA、caN-HCB、caN-HCC或caN-HCD)之一组合。观察每一种犬重链同种型对NGF的等效结合。

[0143] 通过ELISA试验测试抗体上清液对NGF的结合(图1A),并通过TF-1细胞增殖抑制试验测试NGF中和(图1B)。由图1中可见,在这些试验中,四种同种型相互之间具有相当的活性,即它们都特异性结合犬NGF。

[0144] 实施例2:NGF捕获的犬源化抗体诱导的补体沉积

[0145] 然后当使用补体C1q ELISA结合NGF时,评价含有四种抗体的上清液结合补体的能力。用100μl/孔的5μg/ml小鼠NGF涂覆板,并用5%BSA/PBS封阻该板。于室温下用细胞培养物上清液将涂覆的孔孵育1小时,并且将其在PBS/1%BSA (100μl/孔) 中稀释,其中该细胞培养物上清液含有重组的犬源化抗NGF IgG。洗涤该板,并在室温下用在含有0.5mM MgCl₂、2mM CaCl₂、0.05%吐温-20、0.1%明胶和0.5%BSA的弗罗那缓冲盐水中1/100稀释的100μl/孔的人血清孵育该板1小时。洗涤后,用100μl的在PBS/1%BSA中1/800稀释的绵羊抗-C1q-HRP (抗体) 孵育该板。洗涤后,通过加入100l TMB底物(Thermo Scientific) 使该板显影。所有补体C1q的结合表示为A450—热灭活补体的背景。通过加入100μl的2N H₂SO₄停止显影并在450nm

处读出吸光度。

[0146] 图2示出该结果。这些结果显示了C1q与固定的犬源化HCB和HCC型抗体的结合,且没有C1q与犬源化的HCA和HCD型抗体结合。因而,该结果出乎意料地表明,不同的犬衍生的重链显示出不同的补体结合和激活特征,并且出乎意料地证明,具有HCA和HCD型重链的犬源化抗体优选用于抵消犬NGF。由于特异性结合NGF且在表达NGF的细胞附近介导免疫反应的抗体是非常不期望的,因此,产生特异性结合犬NGF且不介导CDC的抗体的能力是非常有利的。

[0147] 实施例3:用HCB和HCC重链同种型比较抗犬NGF单克隆抗体的N糖基化(N-glycosylated)变体和非糖基化(aglycosylated)变体与NGF结合

[0148] 将具有HCB和HCC重链同种型的抗犬NGF单克隆抗体的N糖基化(N-glycosylated)变体和非糖基化(aglycosylated)变体与NGF的结合进行比较。使编码SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:7(HCB)、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:16(HCB*)、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:8(HCC)、或SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:17(HCC*)描述的轻链和重链对的表达载体共转染到CHO细胞,并通过与小鼠NGF的结合ELISA比较上清液。结果显示于图3中。左边的图表显示了通过ELISA检测用HCB重链(HCB)、无糖基HCB重链(HCB*)、HCC重链(HCC)或无糖基HCC重链(HCC*)构建的抗NGF MAbs的表达的一空白框显示未稀释的上清液,阴影框显示1/10稀释的上清液,以及C显示未稀释的阴性对照上清液。观察到与NGF等效结合。

[0149] 类似地,将设计为除去HCB和HCC的恒定结构域N-连接的糖基化位点的抗体(被称为HCB*(SEQ ID NO:6)和HCC*(SEQ ID NO:7))与轻链共表达,并评价补体活性(图3)以试图消除其补体结合。令人惊奇地,非糖基化的HCB*不能结合补体,但是非糖基化的HCC*仍然能够结合补体。由于NGF是涉及伤害感受的可溶性介质,因此,对不介导补体募集结合的犬衍生糖基化的和非糖基化的重链的识别是特别有利的发现。

[0150] 使用实施例2描述C1qELISA试验测试CHO细胞转染上清液募集补体的能力。

[0151] 图3-右栏示出该结果。通过除去B型重链(HCB*)中的N-连接糖基化位点,废除募集补体C1q的能力,并且通过C型重链(HCC*)中的类似突变削弱该能力。

[0152] 因此,本文出乎意料地证明,当本发明的抗体具有HCA或HCD亚型或非糖基化HCB*亚型时的犬衍生的重链时,抗体与犬NGF的结合并不引起补体激活(以及其他下游的效应子功能,例如ADCC)。因此,在通过防止犬NGF与膜结合TrkA或p75受体的结合抵消靶标例如犬NGF的生物功能活性时,所述抗体抑制相关的下游细胞内的信号级联。而且,由于NGF表达频繁地发生在神经等的附近,本发明的NGF抵消或中和抗体,其具有HCA或HCD亚型或HCB*亚型的犬衍生重链,能够在没有募集更宽泛的免疫反应的情况下隔绝犬NGF的生物活性。因此,该结果出人意料地表明,不同的犬衍生重链展示出不同的补体结合和激活特性,且具有HCA和HCD型重链的犬源化抗体已出人意料地显示出优选用于抵消犬NGF。由于NGF是可溶性介质,因此,对不介导补体结合的犬衍生重链的识别是非常有利的发现。这样的功能特性是意想不到的,也是非常期望的。

[0153] 实施例4:针对其它抗原VEGF和CD20的具有犬重链恒定结构域的抗体的产生以及其与补体的结合

[0154] 考虑到令人惊讶的结果,即不同的犬重链同种型具有对补体的有差别的结合,使用以CHO细胞表达的犬重链恒定结构域并用如实施例1中描述的相同的方法类似地构建抗

VEGF和抗CD20抗体。图4示出由这些抗体上清液在补体ELISA中得到的试验结果。将这些结果与上面描述的抗NGF抗体在结合它们的同源抗原之后募集补体的能力进行比较。

[0155] 这些结果显示于图4中。图表A显示了将使用犬重链同种型B和C构建的犬源化抗NGF MAbs和使用人重链同种型IgG1和IgG4构建的人源化抗体捕获到NGF涂覆板上,用人血清培养,并使用缀合于HRP的抗C1q多克隆抗体通过ELISA检测结合的C1q。图表B显示了补体C1q结合使用犬重链同种型A和B(SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9)构建的VEGF捕获的犬源化抗VEGF MAbs的结果。图表C显示了补体C1q结合huCD20胞外域肽上捕获的抗CD20MAbs(muB-2a:鼠抗人CD20MAbs以及muB-HCB:鼠抗人CD20MAbs,表示为具有犬重链同种型B(SEQ ID NO:9)的嵌合融合蛋白)的结果。所有补体C1q的结合表示为A450—热灭活补体背景。

[0156] 所有这些数据共同表明了使用HCB但非HCA犬重链恒定结构域构建的抗VEGF抗体可以募集补体,且使用犬HCB构建的抗CD20抗体可以结合补体,因此与上面描述的抗NGF抗体同种型对补体的有差别的结合类似。总的来说,这些数据支持了所述的令人惊奇的发现,即以HCB和HCC同种型构建的抗原捕获的抗体结合补体,而HCA和HCD则不是这样。HCB和HCC同种型结合补体的这种识别对于杀灭肿瘤细胞例如VEGF表达的或CD20表达的的肿瘤细胞是非常有利的。

[0157] 这些实验的结果支持了实施例1中所述的出人意料的发现,即包含犬重链恒定结构域HCA、HCD和非糖基化的HCB(HCB*)同种型的抗体导致了不介导CDC活性的免疫球蛋白。因此,发明者已首次识别出,这种犬衍生重链在用于治疗方法的免疫球蛋白中具有效用(utility),该治疗方法中不期望CDC介导的免疫反应。这种应用的实例可以在通过细胞因子或趋化因子、生长因子、荷尔蒙和其它细胞外介质,包括体内或例如疼痛、黄斑变性或炎症的疾病中的补体自身的犬免疫球蛋白的抑制中发现。

[0158] 既然HCA、HCD和HCB*同种型在CDC非活性抗体的设计中是最有用的,发明者也令人惊奇地识别出,HCB(caIgG-B)和HCC(caIgG-C)同种型的犬抗体在CDC活性抗体的设计中是有用的。这种抗体例如在癌症治疗中,在将细胞作为靶标进行破坏时是有用的。有许多人肿瘤抗原通过使用CDC活性抗体、包括CD20、HER2和EGFR而被作为靶标,因此使用HCB和HCC同种型构建的犬抗体会在犬类中有类似的用途。

[0159] 实施例5:在CHO细胞中表达后抗NGF单克隆抗体的纯化

[0160] 由于HCA和HCD同种型的犬抗NGF单克隆抗体具有期望的不结合补体的特性(图2),但对葡萄球菌蛋白质A弱结合(图5),从而发明了纯化的替代方法(图6)。抗犬NGF单克隆抗体(使用重链同种型HCA构建)在CHO细胞中表达,并在经大量实验后,令人惊奇地发现,犬抗NGF抗体通过两种可替换的纯化方法可被分级为高纯度(>89%单体IgG峰值,如图6A、6D所示)。

[0161] 在第一种方法中,抗犬NGF单克隆抗体通过阴离子交换层析、疏水作用层析和排阻层析(方法I—图6A和B)进行纯化。在第二种方法中,抗犬NGF抗体可以通过Captoradhere亲和层析,以及随后的阴离子交换层析(方法II—图6C和D)进行纯化。

[0162] 通过任何一种方法纯化的抗NGF单克隆抗体的主峰对应于约150kDa的分子量。通过SDS-PAGE和ELISA的对比(图7)说明,方法I和方法II产生了具有类似的纯度和生物活性的抗体制剂。通过这些方法产生的纯化的抗NGF单克隆抗体在TF-1NGF中和试验中进行测试(如图1中所述),并显示出具有高效能(IC₅₀13pM抗-NGF中和的37pMNGF,未示出)。

[0163] 实施例6:抗犬NGF单克隆抗体可通过静脉注射安全地施用于犬,且不会导致发热

[0164] 将来源于含有犬HCA型重链的表达载体的抗犬NGF单克隆抗体在CHO细胞中表达,并通过离子交换层析、疏水作用层析和尺寸排阻层析(方法I,图6A和B)的组合进行纯化,且缓冲液更换为磷酸盐缓冲液。将该抗体以2mg/kg体重静脉注射入比格犬,并由兽医通过目测观察评价毒性体征、体重变化、体温以及血浆生化。图8示出了体重和温度的测量。在测量的这些和任何血浆生化分析物(包括钠、钾、氯化物、钙、磷酸盐、尿素、肌酸酐、葡萄糖、胆固醇、胆红素、丙氨酸转氨酶、碱性磷酸酶、淀粉酶、脂肪酶、总蛋白质或白蛋白:未显示)中没有观察到变化。

[0165] 实施例7:体内抗犬(HCA同种型)NGF单克隆抗体的血浆药代动力学证明了长的血清半排出期且没有免疫原性

[0166] 将来源于表达犬HCA型重链的表达载体的抗犬NGF单克隆抗体在CHO细胞中表达,并通过离子交换层析、疏水作用层析和尺寸排阻层析的组合进行纯化,并将缓冲液更换为磷酸盐缓冲液(方法I,图6A和B)。

[0167] 通过静脉注射以每千克体重2mg将抗体注射入比格犬内,在其次的2周内的不同时间采集血浆样品。通过ELISA,使用作为靶的NGF和抗犬多克隆抗体-辣根过氧化物酶第二试剂,评价稀释的血浆样品的抗犬NGF抗体浓度,并如图1显影。图18示出该结果。测得的血浆浓度与二相动力学一致,具有约33小时的组织分布(α)相半衰期和约9天的出奇长的消除(β)相。

[0168] 在100-300小时之间抗犬NGF抗体血浆浓度没有急剧下降,这表明在狗血液中既没有已有的中和抗体导致的重组抗NGF单克隆抗体,注入后也没有生成任何这样的中和抗体。通过比较,在注入后200小时时,狗血液中的抗体中和了基于蛋白的重组人免疫球蛋白(Richter et al, Drug Metabolism and Disposition 27:21, 1998)。因此,这些结果表明,本发明的抗犬NGF抗体在静脉注射后在体内具有长的血清半衰期(9天),并且随时间的过去,不存在中和注射的抗NGF抗体的已有抗体或新产生的抗体。

[0169] 实施例14-抗犬NGF单克隆个抗体对降低体内炎症性疼痛的影响

[0170] 抗体疗法

[0171] 在CHO细胞中表达衍生自表达SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11(犬HCA型重链)的表达载体的抗犬NGF单克隆抗体,并且通过离子交换层析、疏水作用层析和尺寸排阻层析的组合(方法I)使其纯化,并且将缓冲液更换为磷酸盐缓冲液。

[0172] 有炎症的犬模型:

[0173] 在机构伦理委员会(Institutional Ethics Committee, CRL, 爱尔兰)的预先批准下进行所有的实验。将高岭土(kaolin)注入(-1天时)比格犬的一条后腿的垫脚中,从而在约24小时后开始自身化解炎症,这导致狗暂时性跛足。在该模型中,一旦对高岭土的起初始炎症反应减弱,在约1-2周内该狗的跛足程度将稳定地减小,然后全部恢复。

[0174] 通过静脉注射将抗犬NGF单克隆抗体以每千克体重200 μ g或作为媒介对照的磷酸盐缓冲液注入(0天时)到3只狗的组中。7天后,通过目测评分方法评价狗的跛足程度:0分,没有跛足(全负重);1分,轻微跛足(非全负重但行走正常);2分,中等跛足(轻微负重且行走不正常);3分,严重跛足(无负重)。观察者不了解哪只狗接受了注射。

[0175] 图19示出了该结果。与对照组相比,注射3天后,接受抗NGF单克隆个抗体的狗的跛

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

[0176] 通过引用将本发明提及的所有文献并入本文中。在不背离本发明的范围的情况下,对本发明的实施方案进行各种修饰和变化对本领域技术人员是显而易见的。虽然就具体优选的实施方案进行了描述本发明,但是应该理解,请求保护的本发明不应该不适当地限制为这些具体的实施方案。事实上,本发明意图涵盖对本领域技术人员显而易见的实施本发明的方式的各种修改。

序列表

<110> NVIP私人有限公司 (NVIP Pty Ltd)

<120> 治疗性犬免疫球蛋白及其使用方法

<130> P122572, WO, 01

<150> GB1114858.2

<151> 2011-08-29

<150> US61/483481

<151> 2011-05-06

<150> US61/531439

<151> 2011-09-06

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 453

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 犬源化抗NGF VH犬IgG-A重链 (caN-HCA)

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu His Ser Leu Ser Ser Met Val Thr

[0001]

	180	185	190
	Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Val	195	200
	His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Phe Asn Glu Cys	210	220
	Arg Cys Thr Asp Thr Pro Pro Cys Pro Val Pro Glu Pro Leu Gly Gly	225	230
	Pro Ser Val Leu Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Arg Ile	245	250
	Thr Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Leu Asp Leu Gly Arg Glu	260	265
	Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Glu Val His	275	280
	Thr Ala Lys Thr Gln Ser Arg Glu Gln Gln Phe Asn Gly Thr Tyr Arg	290	295
	Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln Asp Trp Leu Thr Gly Lys	305	310
	Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu	325	330
[0002]	Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Arg Ala His Lys Pro Ser Val Tyr	340	345
	Val Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser Ser Ser Asp Thr Val Ser	355	360
	Ile Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu	370	375
	Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Arg Lys His Arg Met Thr	385	390
	Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu	405	410
	Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asp Pro Phe Thr Cys Ala	420	425
	Val Met His Glu Thr Leu Gln Asn His Tyr Thr Asp Leu Ser Leu Ser	435	440
	His Ser Pro Gly Lys	450	
	<210> 2		
	<211> 457		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		

<220>

<223> 犬源化抗NGF VH犬IgG-B重链 (caN-HCB)

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

[0003]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys Gln Met Gln Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 290 295 300
 Asn Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gly His Gln Asp
 305 310 315 320
 Trp Leu Lys Gly Lys Gln Phe Thr Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu
 325 330 335
 Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala His
 340 345 350
 Gln Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Leu Ser Lys
 355 360 365
 Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp
 370 375 380
 Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys
 385 390 395 400
 Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu
 405 410 415
 Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr
 420 425 430
 Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 435 440 445
 Glu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 3
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 犬源化抗NGF VH犬IgG-C重链 (caN-HCC)
 <400> 3
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Asn Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
 20 25 30
 Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met His Ser Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

[0004]

	85	90	95
	Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp		
	100	105	110
	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro		
	115	120	125
	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Gln Ser Gly Ser Thr		
	130	135	140
	Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Pro Val Thr		
	145	150	155
	Val Ser Trp Asn Ser Val Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
	165	170	175
	Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr		
	180	185	190
	Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala		
	195	200	205
	His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Ala Lys Glu Cys		
	210	215	220
	Glu Cys Lys Cys Asn Cys Asn Asn Cys Pro Cys Pro Gly Cys Gly Leu		
	225	230	235
[0005]	Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile		
	245	250	255
	Leu Val Thr Ala Arg Thr Pro Thr Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu		
	260	265	270
	Asp Pro Glu Asn Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Ser Lys		
	275	280	285
	Gln Val Gln Thr Ala Asn Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Ser Asn Gly		
	290	295	300
	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu		
	305	310	315
	Ser Gly Lys Gln Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser		
	325	330	335
	Pro Ile Glu Glu Ile Ile Ser Lys Thr Pro Gly Gln Ala His Gln Pro		
	340	345	350
	Asn Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Met Ser Lys Asn Thr		
	355	360	365
	Val Thr Leu Thr Cys Leu Val Lys Asp Phe Phe Pro Pro Glu Ile Asp		
	370	375	380
	Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg		

385 390 395 400
 Met Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415
 Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile
 420 425 430
 Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Ile Ser
 435 440 445
 Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 4
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 犬源化抗NGF VH犬IgG-D重链 (caN-HCD)

<400> 4

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

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

[0006]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala His Gln Pro Ser Val Tyr
340 345 350

Val Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser Ser Ser Asp Thr Val Thr
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Glu Ile Asp Val Glu
370 375 380

Trp Gln Ser Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Ser Lys Tyr His Thr Thr
385 390 395 400

Ala Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asp Thr Phe Thr Cys Ala
420 425 430

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

His Ser Pro Gly Lys
450

<210> 5

<211> 217

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 犬源化抗NGF VL犬kappa轻链 (caN-KLC)

<400> 5

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80

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

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

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

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

[0008]

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

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

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

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

Gln Arg Ser Glu Cys Gln Arg Val Asp
210 215

<210> 6

<211> 457

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 犬源化抗NGF VH无糖基犬免疫球蛋白重链B型 (caN-HCB*)

<400> 6

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

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

Asn	Val	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Leu	Gly	Arg	Gly	Leu	Trp	Val	
	35						40					45			
Gly	Gly	Val	Trp	Ala	Gly	Gly	Ala	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys
	50					55					60				
Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Val	Phe	Leu
65					70					75					80
Lys	Met	His	Ser	Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	
Arg	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ser	Ser	Ser	Thr	Leu	Tyr	Ala	Met	Asp	Ala	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Thr	Ala	Pro
		115					120					125			
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Cys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Thr
	130					135					140				
Val	Ala	Leu	Ala	Cys	Leu	Val	Ser	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
145					150					155					160
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
				165					170					175	
Ser	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Met	Val	Thr
		180						185					190		
Val	Pro	Ser	Ser	Arg	Trp	Pro	Ser	Glu	Thr	Phe	Thr	Cys	Asn	Val	Ala
		195					200					205			
His	Pro	Ala	Ser	Lys	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Pro	Val	Pro	Lys	Arg	Glu
	210					215					220				
Asn	Gly	Arg	Val	Pro	Arg	Pro	Pro	Asp	Cys	Pro	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro
225					230					235					240
Glu	Met	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
			245						250					255	
Asp	Thr	Leu	Leu	Ile	Ala	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
			260					265					270		
Asp	Leu	Asp	Pro	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asp
		275					280					285			
Gly	Lys	Gln	Met	Gln	Thr	Ala	Lys	Thr	Gln	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe
	290					295					300				
Ala	Gly	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Pro	Ile	Gly	His	Gln	Asp
305					310					315					320
Trp	Leu	Lys	Gly	Lys	Gln	Phe	Thr	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Ala	Leu
			325						330					335	

Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala His
 340 345 350
 Gln Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Leu Ser Lys
 355 360 365
 Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp
 370 375 380
 Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys
 385 390 395 400
 Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu
 405 410 415
 Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr
 420 425 430
 Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 435 440 445
 Glu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 7
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 [0010] <220>
 <223> 犬源化抗NGF VH无糖基犬免疫球蛋白重链C型 (caN-HCC*)
 <400> 7
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Asn Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
 20 25 30
 Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met His Ser Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Gln Ser Gly Ser Thr

[0011]

130	135	140
Val Ala Leu Ala Cys	Leu Val Ser Gly Tyr Ile	Pro Glu Pro Val Thr
145	150	155
Val Ser Trp Asn Ser	Val Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro	
	165	170
Ser Val Leu Gln Ser	Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr	
	180	185
Val Pro Ser Ser Arg Trp	Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala	
	195	200
His Pro Ala Thr Asn Thr	Lys Val Asp Lys Pro Val Ala Lys Glu Cys	
	210	215
Glu Cys Lys Cys Asn	Cys Asn Asn Cys Pro Cys Pro Gly Cys Gly Leu	
	225	230
Leu Gly Gly Pro Ser	Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile	
	245	250
Leu Val Thr Ala Arg Thr	Pro Thr Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu	
	260	265
Asp Pro Glu Asn Pro Glu	Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Ser Lys	
	275	280
Gln Val Gln Thr Ala Asn	Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Ser Ala Gly	
	290	295
Thr Tyr Arg Val Val	Ser Val Leu Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu	
	305	310
Ser Gly Lys Gln Phe	Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser	
	325	330
Pro Ile Glu Glu Ile	Ile Ser Lys Thr Pro Gly Gln Ala His Gln Pro	
	340	345
Asn Val Tyr Val Leu	Pro Pro Ser Arg Asp Glu Met Ser Lys Asn Thr	
	355	360
Val Thr Leu Thr Cys	Leu Val Lys Asp Phe Phe Pro Pro Glu Ile Asp	
	370	375
Val Glu Trp Gln Ser	Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg	
	385	390
Met Thr Pro Pro Gln	Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser	
	405	410
Lys Leu Ser Val Asp	Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile	
	420	425
Cys Ala Val Met His	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Ile Ser	

	435	440	445
	Leu Ser His Ser Pro Gly Lys		
	450	455	
	<210> 8		
	<211> 331		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 犬免疫球蛋白重链A型Fc结构域 (HCA)		
	<400> 8		
	Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly		
	1 5 10 15		
	Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr		
	20 25 30		
	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser		
	35 40 45		
	Gly Val His Thr Phe Pro Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu His Ser		
	50 55 60		
	Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr		
	65 70 75 80		
[0012]	Phe Thr Cys Asn Val Val His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
	85 90 95		
	Pro Val Phe Asn Glu Cys Arg Cys Thr Asp Thr Pro Pro Cys Pro Val		
	100 105 110		
	Pro Glu Pro Leu Gly Gly Pro Ser Val Leu Ile Phe Pro Pro Lys Pro		
	115 120 125		
	Lys Asp Ile Leu Arg Ile Thr Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
	130 135 140		
	Leu Asp Leu Gly Arg Glu Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val		
	145 150 155 160		
	Asp Gly Lys Glu Val His Thr Ala Lys Thr Gln Ser Arg Glu Gln Gln		
	165 170 175		
	Phe Asn Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln		
	180 185 190		
	Asp Trp Leu Thr Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Asp		
	195 200 205		
	Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Arg Ala		
	210 215 220		
	His Lys Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser		
	225 230 235 240		

Ser Ser Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro
 245 250 255
 Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu
 260 265 270
 Arg Lys His Arg Met Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr
 275 280 285
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 290 295 300
 Asp Pro Phe Thr Cys Ala Val Met His Glu Thr Leu Gln Asn His Tyr
 305 310 315 320
 Thr Asp Leu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 9
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 犬免疫球蛋白重链B型Fc结构域 (HCB)
 <400> 9
 Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr
 65 70 75 80
 Phe Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Lys Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Pro Val Pro Lys Arg Glu Asn Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp Cys
 100 105 110
 Pro Lys Cys Pro Ala Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile
 115 120 125
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Leu Ile Ala Arg Thr Pro Glu
 130 135 140
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu Asp Pro Glu Asp Pro Glu Val Gln
 145 150 155 160
 Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Gln Met Gln Thr Ala Lys Thr Gln

[0013]

	165	170	175
	Pro Arg Glu Gln Gln Phe Asn Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
	180	185	190
	Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Gln Phe Thr Cys Lys		
	195	200	205
	Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys		
	210	215	220
	Ala Arg Gly Gln Ala His Gln Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser		
	225	230	235
	Arg Glu Glu Leu Ser Lys Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Ile Lys		
	245	250	255
	Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln		
	260	265	270
	Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu		
	275	280	285
	Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg		
	290	295	300
	Trp Glu Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu		
	305	310	315
[0014]	His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys		
	325	330	335
	<210> 10		
	<211> 333		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 犬免疫球蛋白重链C型Fc结构域 (HCC)		
	<400> 10		
	Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly		
	1	5	10
	Ser Gln Ser Gly Ser Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr		
	20	25	30
	Ile Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Val Ser Leu Thr Ser		
	35	40	45
	Gly Val His Thr Phe Pro Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
	50	55	60
	Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr		
	65	70	75
	Phe Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys		
	85	90	95

[0015]

Pro Val Ala Lys Glu Cys Glu Cys Lys Cys Asn Cys Asn Asn Cys Pro
 100 105 110
 Cys Pro Gly Cys Gly Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 115 120 125
 Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Val Thr Ala Arg Thr Pro Thr Val Thr
 130 135 140
 Cys Val Val Val Asp Leu Asp Pro Glu Asn Pro Glu Val Gln Ile Ser
 145 150 155 160
 Trp Phe Val Asp Ser Lys Gln Val Gln Thr Ala Asn Thr Gln Pro Arg
 165 170 175
 Glu Glu Gln Ser Asn Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile
 180 185 190
 Gly His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Gln Phe Lys Cys Lys Val Asn
 195 200 205
 Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Glu Ile Ile Ser Lys Thr Pro
 210 215 220
 Gly Gln Ala His Gln Pro Asn Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 225 230 235 240
 Glu Met Ser Lys Asn Thr Val Thr Leu Thr Cys Leu Val Lys Asp Phe
 245 250 255
 Phe Pro Pro Glu Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu
 260 265 270
 Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Met Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly
 275 280 285
 Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 290 295 300
 Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 305 310 315 320
 His Tyr Thr Gln Ile Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> II
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 犬免疫球蛋白重链D型Fc结构域 (HCD)
 <400> II
 Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr

[0016]

	20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser	35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser	50	55	60
Leu Ser Ser Thr Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr	65	70	80
Phe Thr Cys Asn Val Val His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	85	90	95
Pro Val Pro Lys Glu Ser Thr Cys Lys Cys Ile Ser Pro Cys Pro Val	100	105	110
Pro Glu Ser Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro	115	120	125
Lys Asp Ile Leu Arg Ile Thr Arg Thr Pro Glu Ile Thr Cys Val Val	130	135	140
Leu Asp Leu Gly Arg Glu Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val	145	150	155
Asp Gly Lys Glu Val His Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Gln Gln	165	170	175
Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln	180	185	190
Asp Trp Leu Thr Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Gly	195	200	205
Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala	210	215	220
His Gln Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser	225	230	235
Ser Ser Asp Thr Val Thr Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro	245	250	255
Pro Glu Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu	260	265	270
Ser Lys Tyr His Thr Thr Ala Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr	275	280	285
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly	290	295	300
Asp Thr Phe Thr Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu Gln Asn His Tyr	305	310	315
Thr Asp Leu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys			

325 330

<210> 12
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 无糖基犬免疫球蛋白重链A型Fc结构域 (HCA*)

<400> 12

Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu His Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr
 65 70 75 80

Phe Thr Cys Asn Val Val His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

[0017] Pro Val Phe Asn Glu Cys Arg Cys Thr Asp Thr Pro Pro Cys Pro Val
 100 105 110

Pro Glu Pro Leu Gly Gly Pro Ser Val Leu Ile Phe Pro Pro Lys Pro
 115 120 125

Lys Asp Ile Leu Arg Ile Thr Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 130 135 140

Leu Asp Leu Gly Arg Glu Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val
 145 150 155 160

Asp Gly Lys Glu Val His Thr Ala Lys Thr Gln Ser Arg Glu Gln Gln
 165 170 175

Phe Ala Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln
 180 185 190

Asp Trp Leu Thr Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Asp
 195 200 205

Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Arg Ala
 210 215 220

His Lys Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser
 225 230 235 240

Ser Ser Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro
 245 250 255

Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu
260 265 270

Arg Lys His Arg Met Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr
275 280 285

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
290 295 300

Asp Pro Phe Thr Cys Ala Val Met His Glu Thr Leu Gln Asn His Tyr
305 310 315 320

Thr Asp Leu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 13

<211> 335

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 无糖基犬免疫球蛋白重链B型Fc结构域 (HCB*)

<400> 13

Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr
20 25 30

[0018]

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr
65 70 75 80

Phe Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Lys Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Pro Val Pro Lys Arg Glu Asn Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp Cys
100 105 110

Pro Lys Cys Pro Ala Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile
115 120 125

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Leu Ile Ala Arg Thr Pro Glu
130 135 140

Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu Asp Pro Glu Asp Pro Glu Val Gln
145 150 155 160

Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Gln Met Gln Thr Ala Lys Thr Gln
165 170 175

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Ala Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

	180	185	190
Pro Ile Gly His Gln Asp Trp	Leu Lys Gly Lys Gln Phe Thr Cys Lys		
195	200	205	
Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys			
210	215	220	
Ala Arg Gly Gln Ala His Gln Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser			
225	230	235	240
Arg Glu Glu Leu Ser Lys Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Ile Lys			
245	250	255	
Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln			
260	265	270	
Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu			
275	280	285	
Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg			
290	295	300	
Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu			
305	310	315	320
His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys			
325	330	335	

[0019]

<210> 14
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 无糖基犬免疫球蛋白重链C型Fc结构域 (HCC*)
 <400> 14

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

Cys Pro Gly Cys Gly Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 115 120 125
 Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Val Thr Ala Arg Thr Pro Thr Val Thr
 130 135 140
 Cys Val Val Val Asp Leu Asp Pro Glu Asn Pro Glu Val Gln Ile Ser
 145 150 155 160
 Trp Phe Val Asp Ser Lys Gln Val Gln Thr Ala Asn Thr Gln Pro Arg
 165 170 175
 Glu Glu Gln Ser Ala Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile
 180 185 190
 Gly His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Gln Phe Lys Cys Lys Val Asn
 195 200 205
 Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Glu Ile Ile Ser Lys Thr Pro
 210 215 220
 Gly Gln Ala His Gln Pro Asn Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 225 230 235 240
 Glu Met Ser Lys Asn Thr Val Thr Leu Thr Cys Leu Val Lys Asp Phe
 245 250 255
 [0020] Phe Pro Pro Glu Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu
 260 265 270
 Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Met Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly
 275 280 285
 Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 290 295 300
 Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 305 310 315 320
 His Tyr Thr Gln Ile Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 15
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 犬免疫球蛋白重链D型Fc结构域 (HCD*)
 <400> 15
 Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser

	35	40	45
	Gly Val His Thr Phe Pro Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser 50 55 60		
	Leu Ser Ser Thr Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr 65 70 75 80		
	Phe Thr Cys Asn Val Val His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys 85 90 95		
	Pro Val Pro Lys Glu Ser Thr Cys Lys Cys Ile Ser Pro Cys Pro Val 100 105 110		
	Pro Glu Ser Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro 115 120 125		
	Lys Asp Ile Leu Arg Ile Thr Arg Thr Pro Glu Ile Thr Cys Val Val 130 135 140		
	Leu Asp Leu Gly Arg Glu Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val 145 150 155 160		
	Asp Gly Lys Glu Val His Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Gln Gln 165 170 175		
[0021]	Phe Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln 180 185 190		
	Asp Trp Leu Thr Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Gly 195 200 205		
	Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala 210 215 220		
	His Gln Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser 225 230 235 240		
	Ser Ser Asp Thr Val Thr Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro 245 250 255		
	Pro Glu Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu 260 265 270		
	Ser Lys Tyr His Thr Thr Ala Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr 275 280 285		
	Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly 290 295 300		
	Asp Thr Phe Thr Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu Gln Asn His Tyr 305 310 315 320		
	Thr Asp Leu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys 325 330		

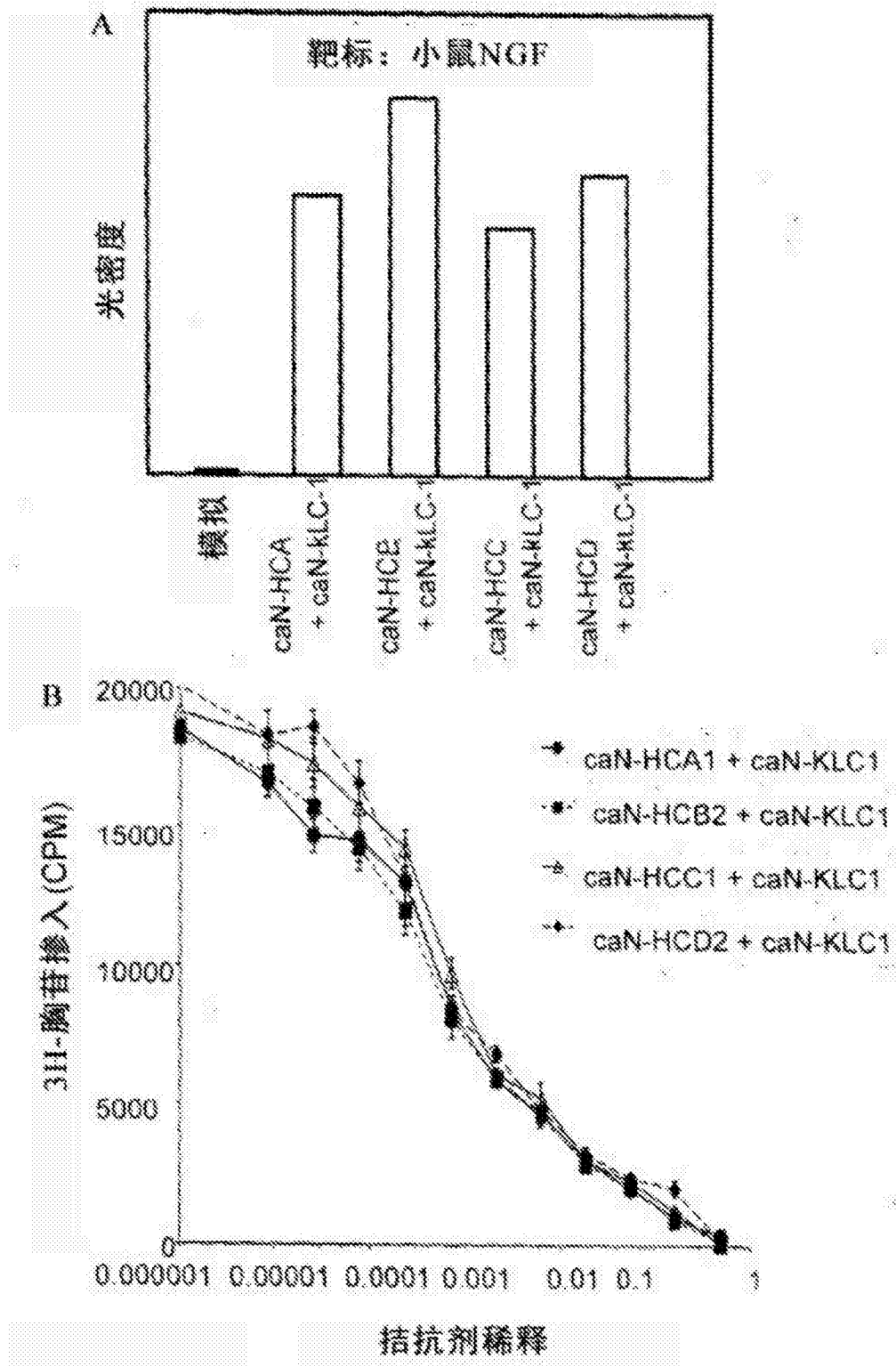


图1

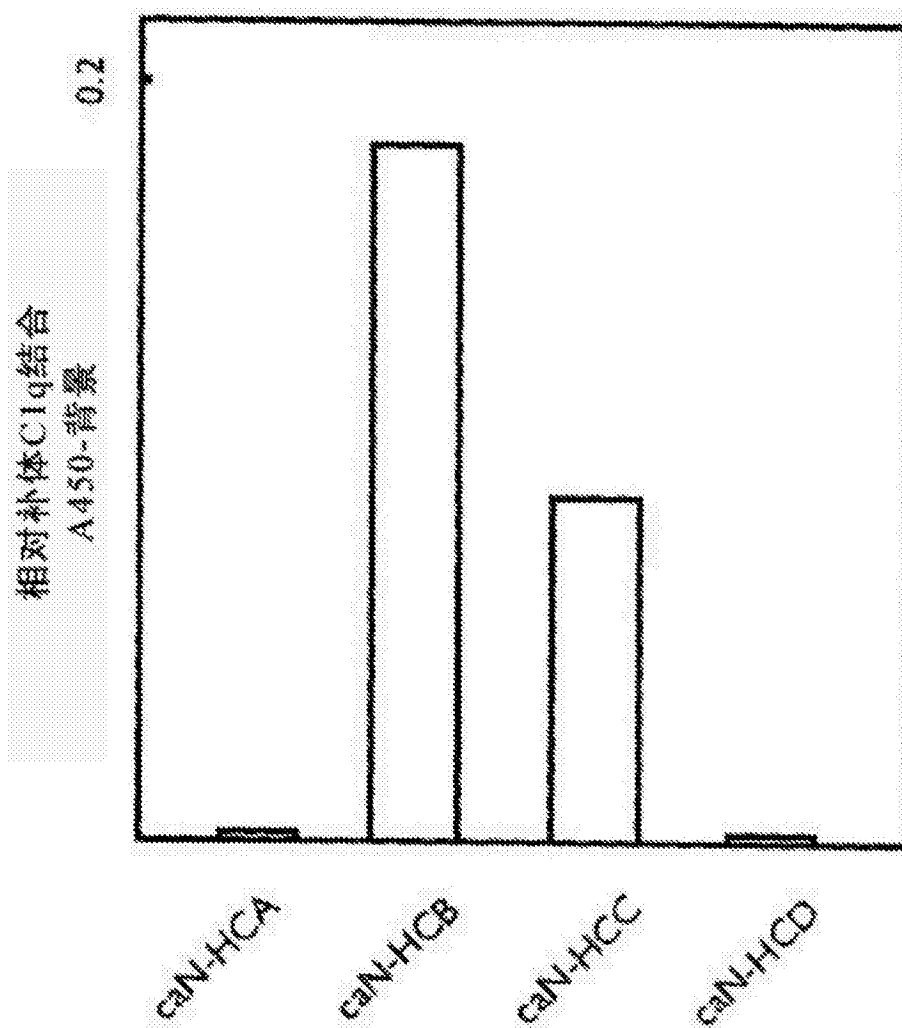


图2

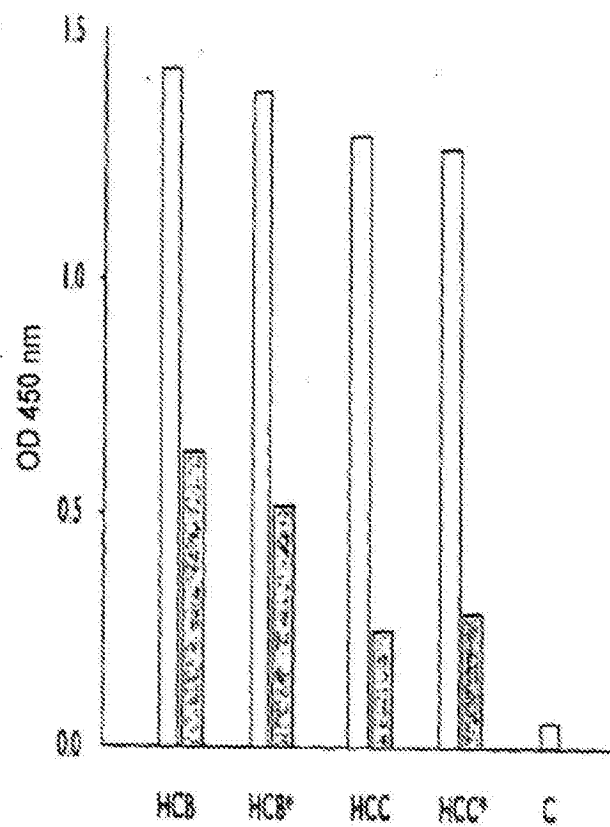


图3a

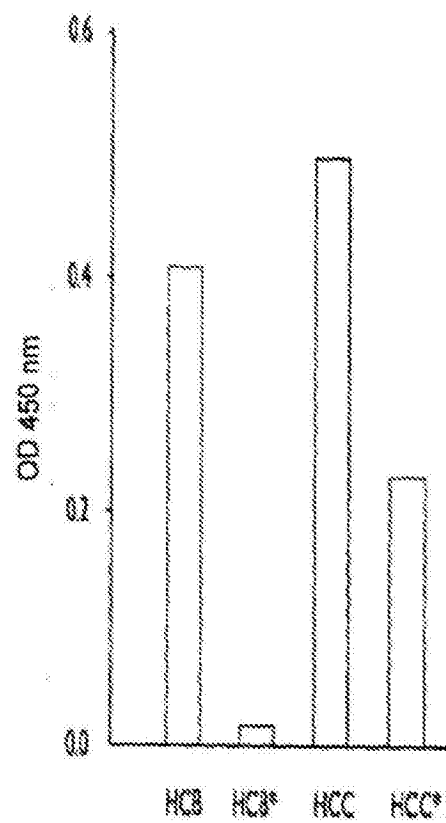


图3b

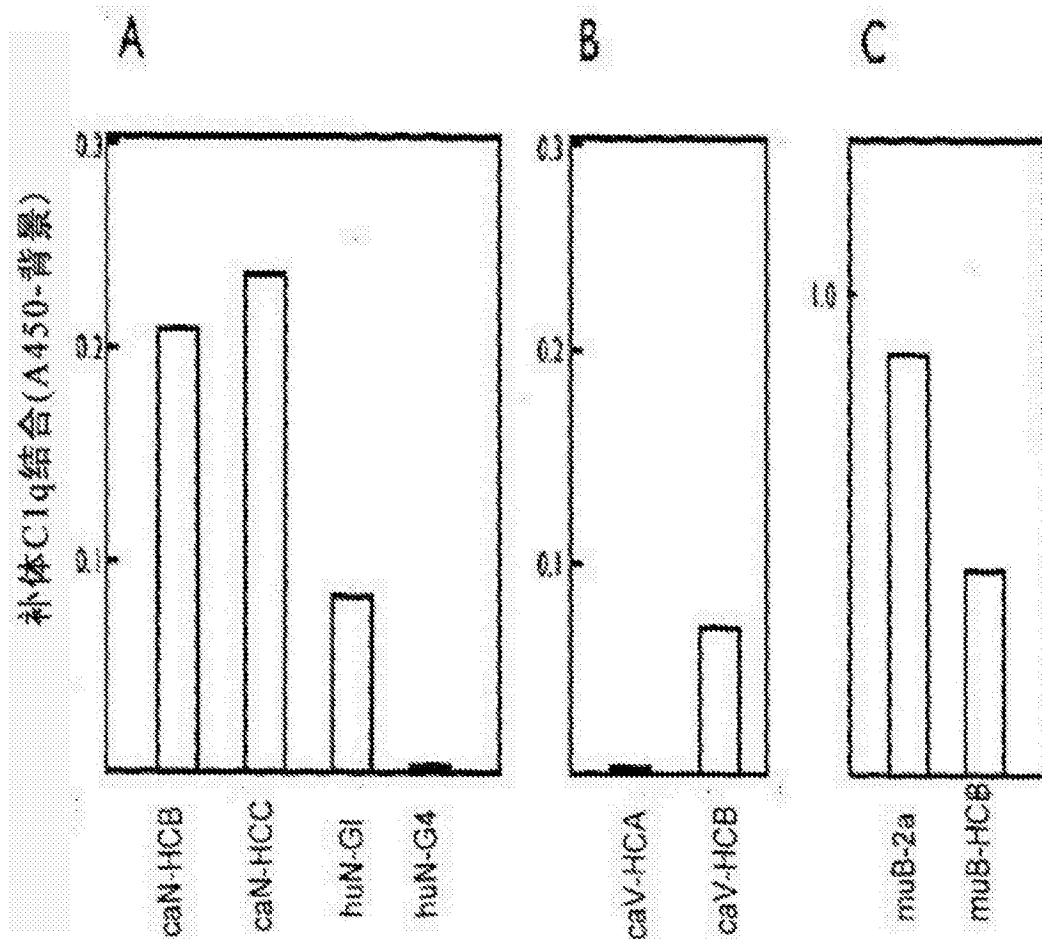


图4

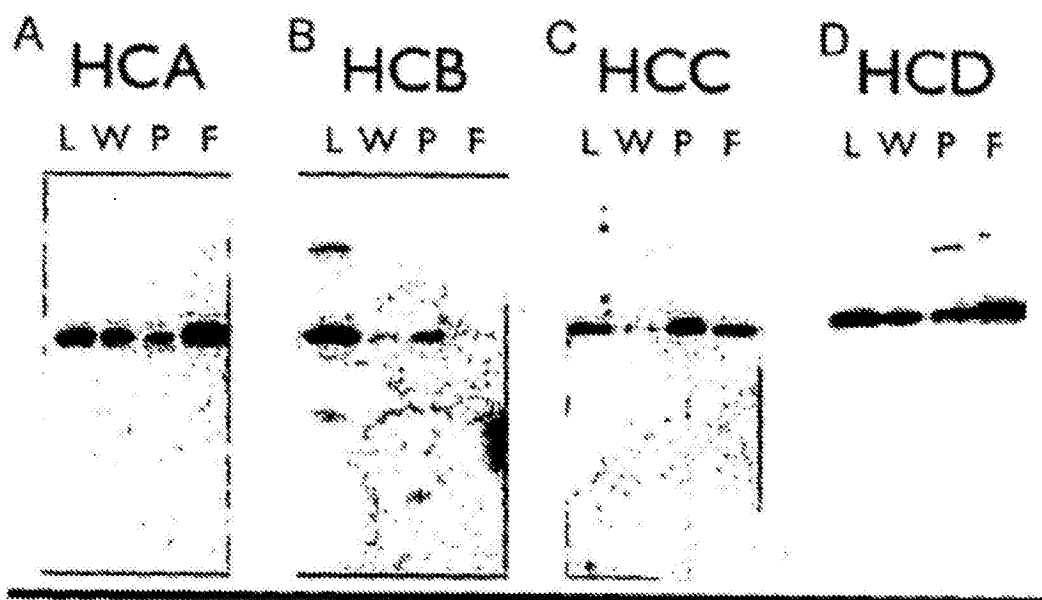


图5

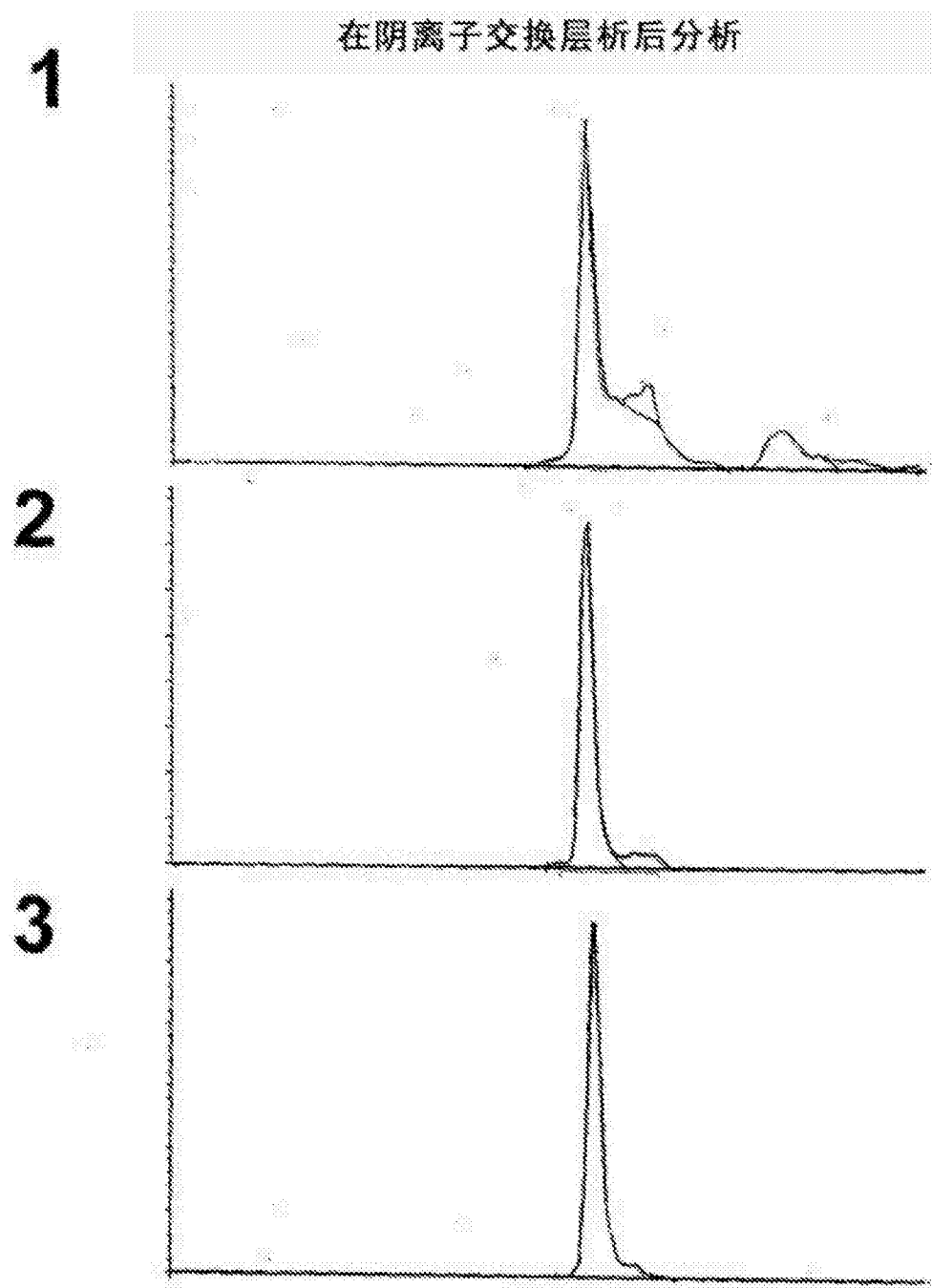


图6A

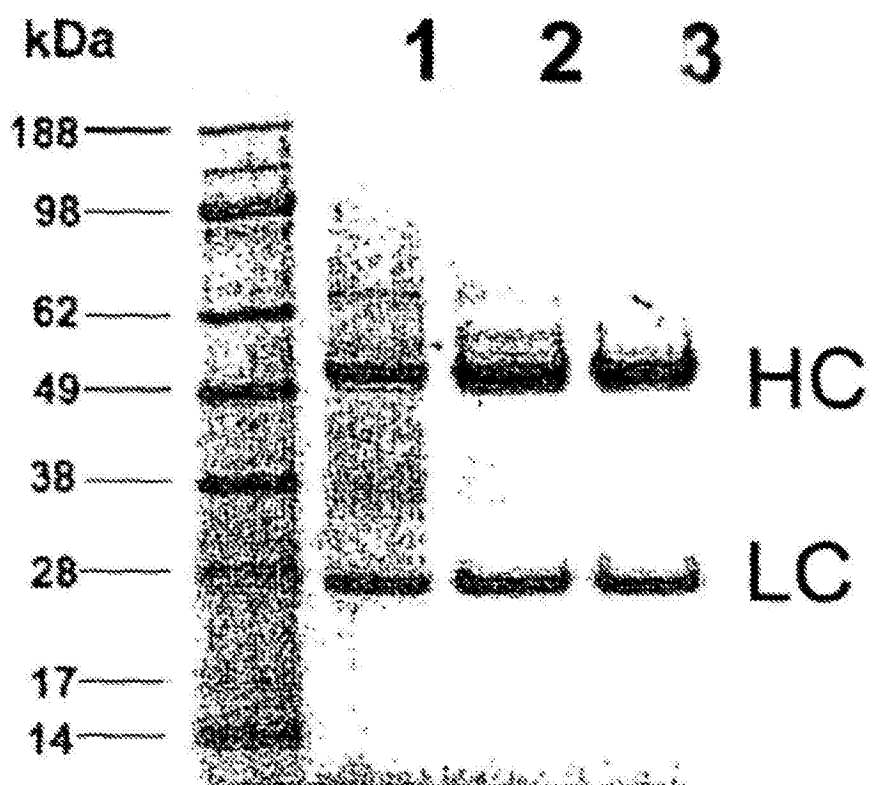


图6B

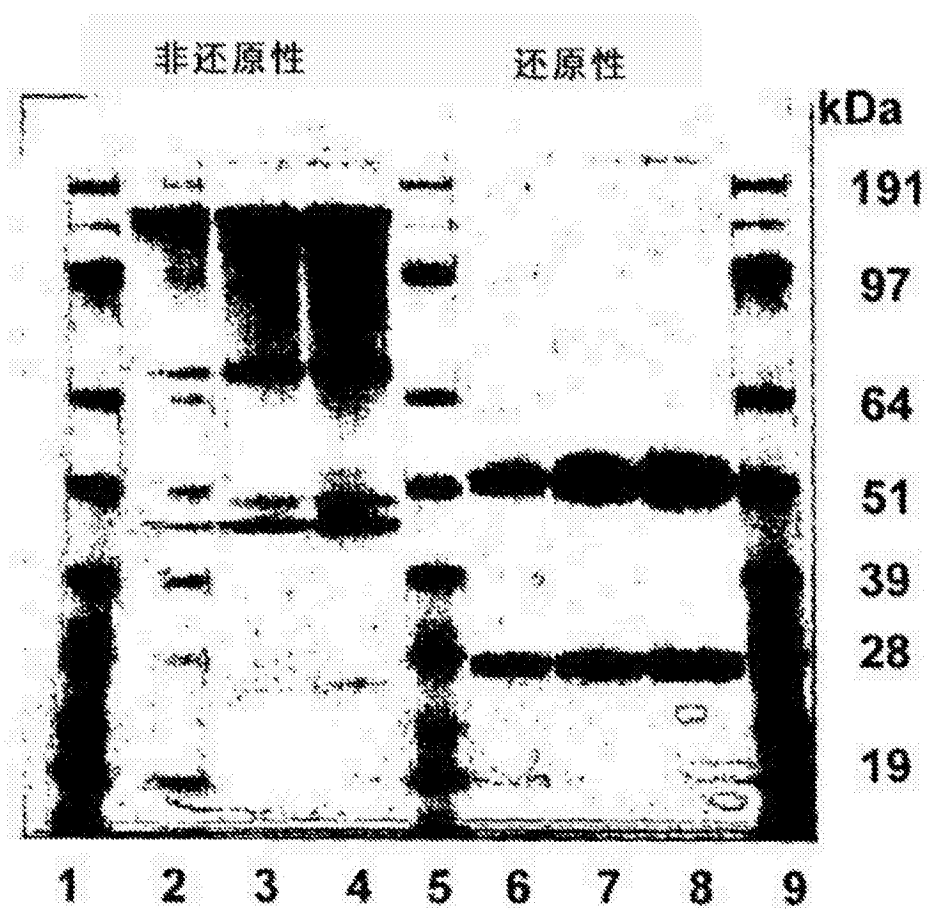
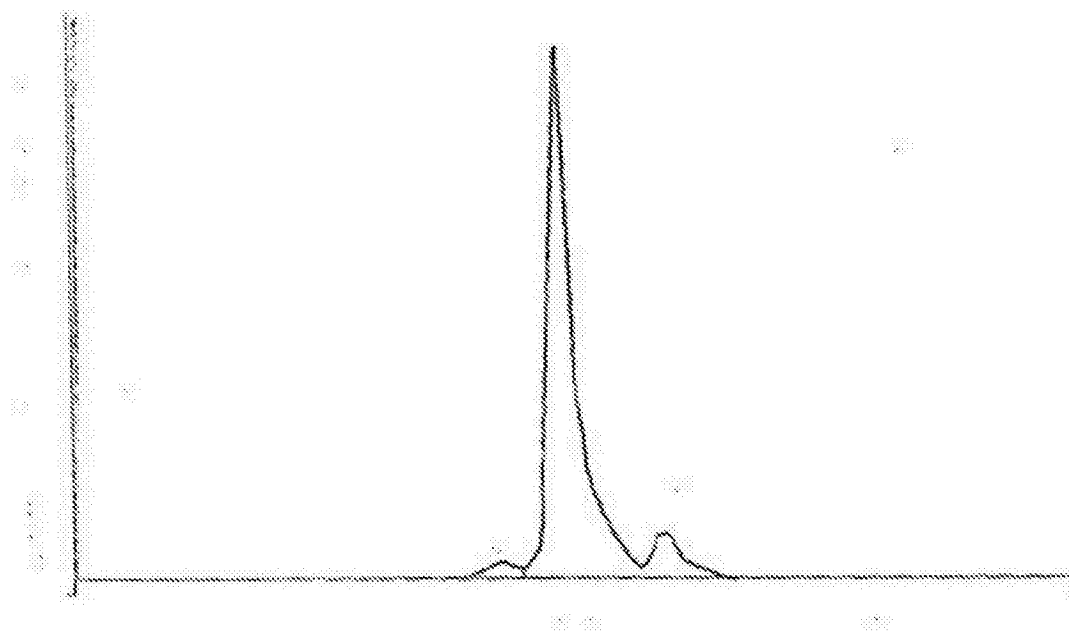
SDS-PAGE

图6C



峰保留时间 (分钟)	近似MW (KDa)	%总峰面积
8.05	353	2.6
9.17	156	89.7
11.18	36	7.7

图6D

SDS-PAGE

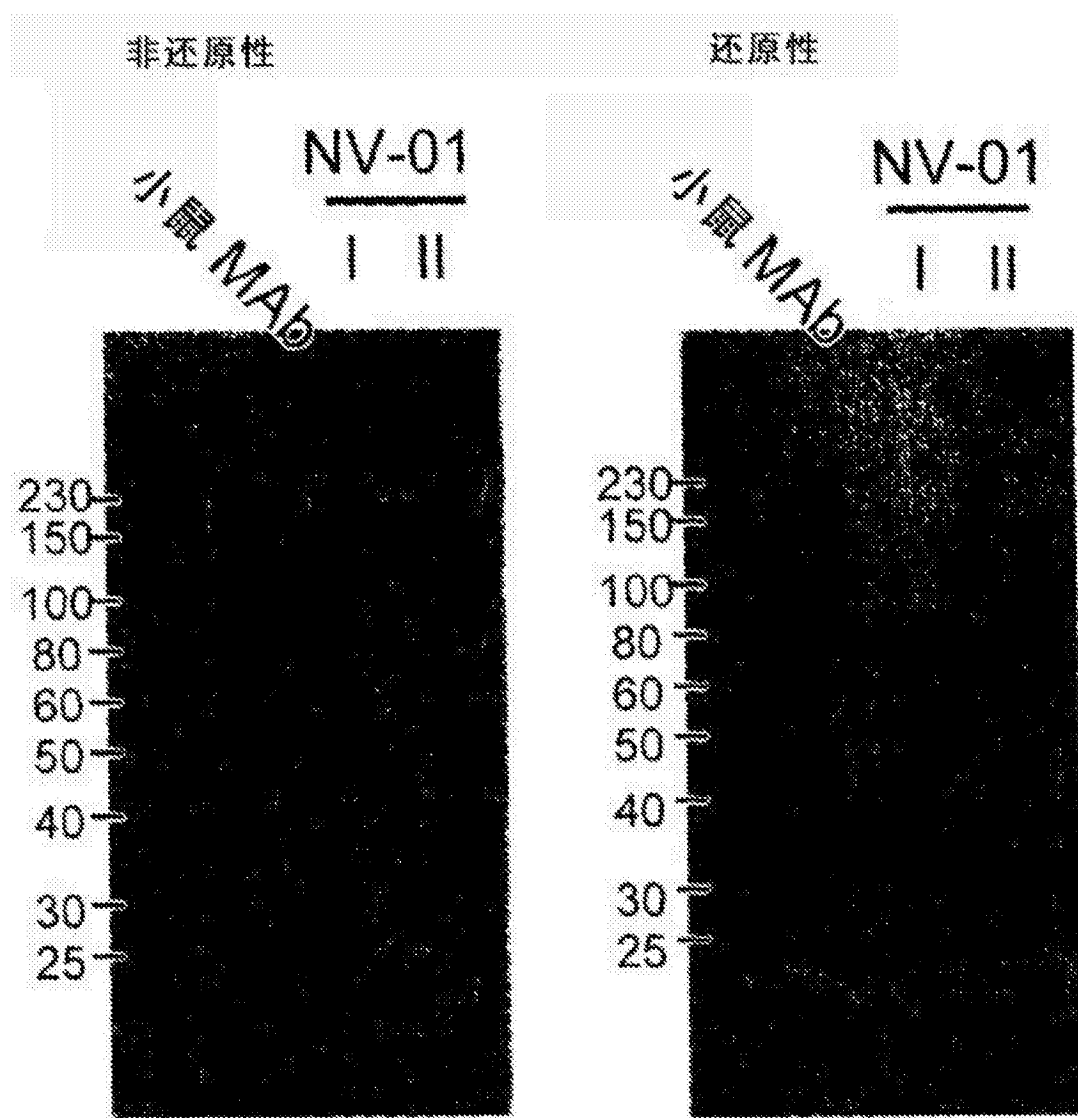


图7A

NGF ELISA

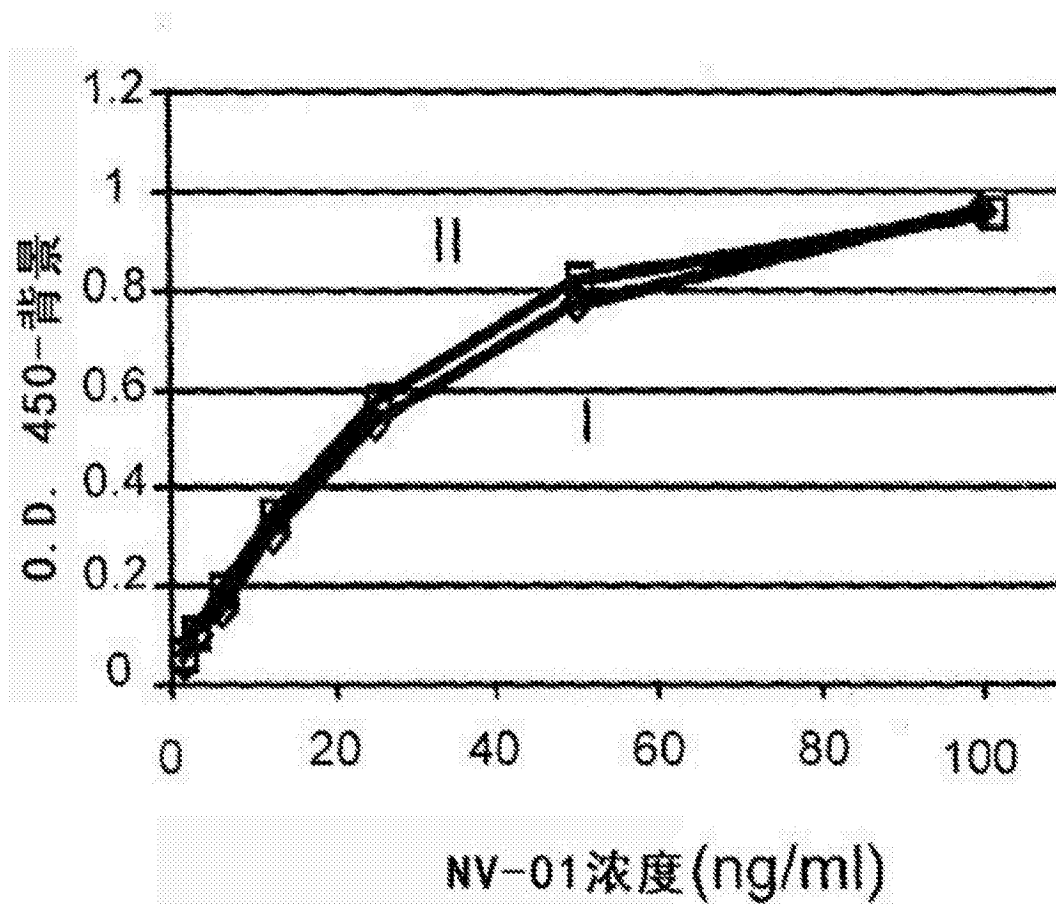


图7B

研究日			-1	1	3	7
动物编号	性别	在研究日0的年龄(月)				
68305	M	11	9.6	10.0	9.9	10.0
26885	F	19	9.2	9.9	9.5	9.8
32886	F	11	9.4	9.9	9.7	10.0

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

图8

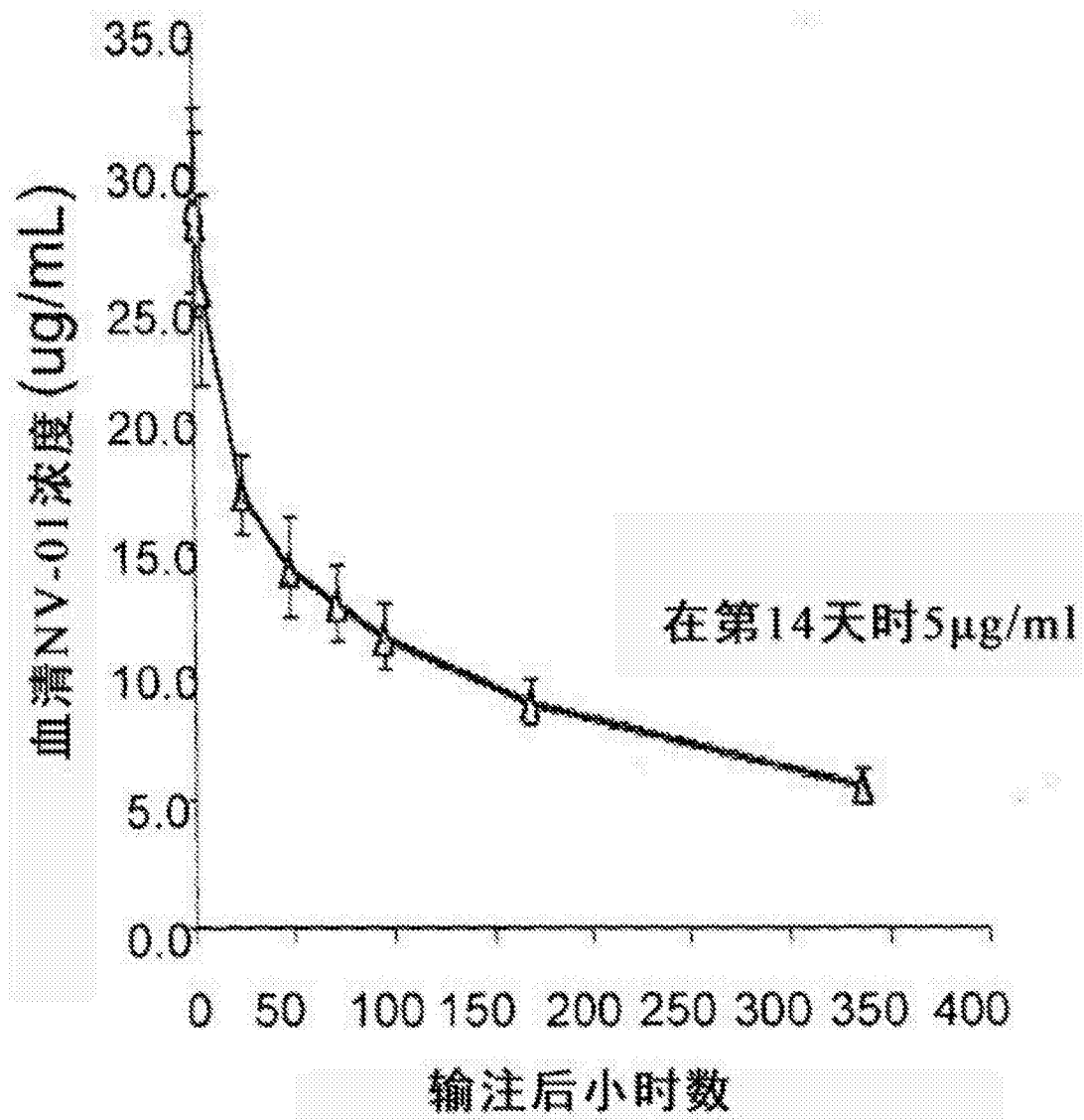


图9

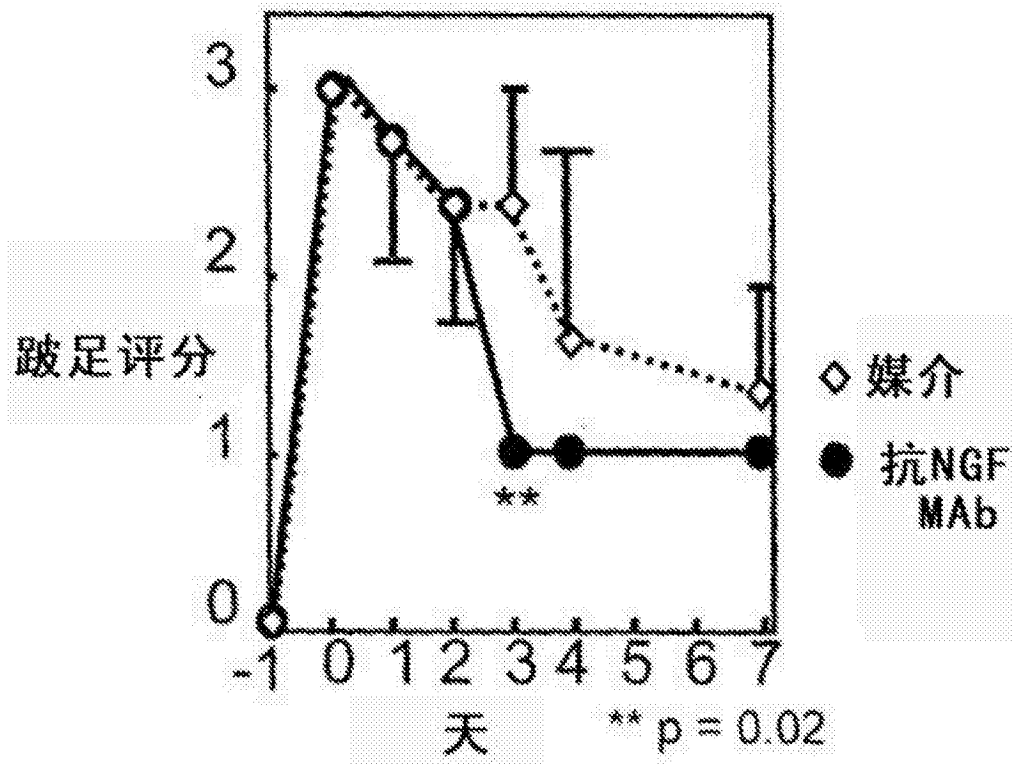


图10