

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910171008.3

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 2 月 24 日

[11] 公开号 CN 101653604A

[22] 申请日 2002.5.9

[21] 申请号 200910171008.3

分案原申请号 02814992.0

[30] 优先权

[32] 2001.5.30 [33] US [31] 60/294,392

[71] 申请人 基因技术股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 D·L·谢尔顿

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 岑晓东

权利要求书 1 页 说明书 33 页 附图 29 页

[54] 发明名称

抗 NGF 抗体用于治疗各种疾病

[57] 摘要

本发明涉及抗 NGF 抗体用于治疗各种疾病。
本发明一般涉及用抗 NGF 抗体治疗各种 NGF 相关疾病的方法，所述疾病包括哮喘、关节炎和银屑病。所述方法有效治疗患者中的这些疾病，且对患者的免疫系统没有明显的副作用。

1. 在人患者中控制 NGF 相关疾病的方法，其特征在于，所述方法包括对所述患者施用有效量的抗人 NGF (抗-hNGF) 单克隆抗体，这种抗体能够以纳摩尔范围的亲和力结合 hNGF，并在体内抑制 hNGF 与人 TrkA (hTrkA) 的结合，其中所述抗体对所述患者的免疫系统没有显著的副作用。

2. 一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物含有嵌合抗体、人源化抗体或人抗人 NGF (抗 hNGF) 单克隆抗体与药学上可接受的载体联合，所述抗体能够以纳摩尔范围的亲和力结合 hNGF 并在体内抑制 hNGF 与人 TrkA (hTrkA) 的结合，其中所述抗体对患者的免疫系统没有显著的副作用。

3. 一种制造产品，其特征在于，所述制造产品包括：容器；权利要求 2 所述的药物组合物；和将物质的组合物用于控制人患者中 NGF 相关疾病的说明书。

抗 NGF 抗体用于治疗各种疾病

本申请是申请日为 2002 年 5 月 9 日、申请号为 02814992.0、发明名称为“抗 NGF 抗体用于治疗各种疾病”的发明申请的分案申请。

发明背景

发明领域

本发明一般涉及用抗 NGF 抗体治疗各种 NGF 相关疾病的方法，所述疾病包括哮喘、关节炎和银屑病。所述方法对于治疗患者的这些疾病非常有效，且对患者的免疫系统没有明显的副作用。

相关技术的描述

神经生长因子(NGF)

神经生长因子(NGF)是首先被鉴定的神经营养蛋白，并且良好鉴定了它在外周神经元和中央神经元发育和存活中的作用。已表明 NGF 是外周交感神经元和胚胎感觉神经元以及基部前脑胆碱能神经元发育的重要的存活和维持因子(Smeyne 等, *Nature* 368:246-249(1994); Crowley 等, *Cell* 76:1001-1011(1994))。NGF 正调节神经肽在感觉神经元中的表达(Lindsay 和 Harmer, *Nature* 337:362-364(1989))，其活性由两种不同的膜结合受体介导。TrkA 酪氨酸激酶受体介导高亲和结合，p75 受体，其结构与肿瘤坏死因子受体家族的其它成员相关，介导低亲和结合(Chao 等, *Science* 232:518-521(1986))。

除了其对神经系统的作用，NGF 越来越与神经系统外围的处理有关。例如，已表明 NGF 可增强血管渗透性(Otten 等, *Eur. J. Pharmacol.* 106:199-201(1984))，增强 T- 和 B- 细胞的免疫应答(Otten 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86:10059-10063(1989))，诱导淋巴细胞分化和肥大细胞增殖，并可使可溶性生物信号从肥大细胞中释放(Matsuda 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:6508-6512(1988); Pearce 等, *J. Physiol.* 372:379-393(1986); Bischoff 等, *Blood* 79:2662-2669(1992) ; Horigome 等, *J. Biol. Chem.* 268:14881-14887(1993))。

NGF 由多种细胞类型产生，包括肥大细胞(LEON 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

U. S. A. 91:3739-3743(1994)), B-淋巴细胞(Torcia 等, *Cell* 85:345-356(1996), 角质形成细胞(Di Marco 等, *J. Biol. Chem.* 268:22838-22846))和平滑肌细胞(Ueyama 等, *J. Hypertens.* 11:1061-1065(1993))。已在神经系统外的多种细胞类型上发现了 NGF 受体。例如, 在人单核细胞、T-和 B-淋巴细胞以及肥大细胞上发现了 TrkA。

与 NGF 的非神经元作用一致, 在人患者以及一些动物模型中观察到增加的 NGF 水平和各种炎性疾患之间的关系。其中包括系统性红斑狼疮(Bracci-Laudiero 等, *Neuroreport* 4:563-565(1993)), 多发性硬化(Bracci-Laudiero 等, *Neurosci. Lett.* 147:9-12(1992)), 银屑病(Raychaudhuri 等, *Acta Derm. Venereol.* 78:84-86(1998)), 关节炎(Falcini 等, *Ann. Rheum. Dis.* 55:745-748(1996))和哮喘(Braun 等, *Eur. J. Immunol.* 28:3240-3251(1998))。这些慢性炎性疾患是显著的公众健康问题。例如, 估计仅在美国就有 3790 万人受到关节炎的困扰。目前对这些疾患的治疗非常有限。了解 NGF 在这些疾病中的作用可为治疗提供新的方法。

已经观察到应激和银屑病之间的相互关系。基于这种相互关系以及与其相对称的这种疾病带来的皮肤损害, 人们提出了与神经系统之间的关系(Raychaudhuri 等, *Acta Derm. Venerol.* 78:84-86(1998))。尤其提出了神经肽在银屑病发病机制中的作用。研究者报道了末梢皮肤神经数量的增加以及一种或多种神经肽如 P 物质(SP)、血管活性肠肽(VIP)和 CGRP 的正调节作用。NGF 在调节皮肤中的神经支配中起作用, 还已知正调节神经肽, 这说明升高的 NGF 水平可能是神经肽的正调节和在银屑病中发现的升高的皮肤神经支配的原因。实际上, 在银屑病的角质形成细胞中观察到增加的 NGF 表达(Raychaudhuri 等, *Acta Derm. Venercol.* 78:84-86(1998))。这说明, 由于 NGF 通常作为角质形成细胞的存活因子, 因此 NGF 的过表达会防止正常的细胞死亡, 从而导致银屑病(Pincelli 等, *J. derm. sci.* 22:71-79(2000))。

大量研究表明, 神经肽如 P 物质(SP)和肥大细胞释放出的生物活性物质如组胺也在人关节炎的自然发生中起作用, 同时, 在动物模型中试验性地诱导关节炎(参见, 例如, Levine J., *Science* 226:547-549(1984))。已表明 NGF 会影响肥大细胞脱粒(Bruni 等, *FEBS Lett.* 138:190-193(1982))和 P 物质释放(Donnerer 等, *Neurosci.* 49:693-698(1992)), 这说明它参与关节炎的发病机制。

因此, 外周组织中 NGF 水平升高与痛觉过敏和炎症有关, 且在许多形式的关节炎中观察到。类风湿性关节炎患者的滑膜表达高水平的 NGF, 而在非炎性滑膜中据报道 NGF 是不可检测的(Aloe 等, *Arch. Rheum.* 35:351-355(1992))。在试验性诱导

类风湿性关节炎的大鼠中观察到类似的结果(Aloe 等, *Clin. Exp. Rheumatol.* 10:203-204(1992))。据报道,在转基因关节炎小鼠中有升高的 NGF 水平,同时肥大细胞的数量也增加(Aloe 等, *Int. J. Tissue Reactions. Exp. Clin. Aspects* 15:139-143(1993))。然而,注射进正常大鼠关节滑膜中的纯化的 NGF 不会诱导致膝关节炎症,这说明 NGF 不是关节炎的病因(Aloe 等, *Growth Factors* 9:149-155(1993))。

高 NGF 水平与过敏性炎症有关,且已提出这与肥大细胞脱粒有关(Bonini 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:10955-10960(1996))。

在过敏性和非过敏性哮喘中也观察到升高的 NGF 水平(Bonini 等, 同上)。肥大细胞、嗜伊红细胞和 T-淋巴细胞被认为在这种炎性疾病中发挥作用,且 NGF 血清水平和总 IgE 抗体滴度之间的相互关系说明 NGF 对这种炎性免疫应答有作用。在小鼠和人中,变应原诱导的呼吸道炎症都与增加 NGF 的局部产生有关(Braun 等, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118:163-165(1999))。

已表明 NGF 可调节升高的呼吸道活动过度反应的发展,呼吸道活动过度反应是支气管哮喘的一个特点(braun 等, *Eur. J. Immunol.* 28:3240-3251(1998))。实际上,在一项研究中,用抗 NGF 抗体治疗变应原致敏的小鼠可防止局部变应原攻击后的呼吸道反应过度性的发展(Braun 等, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118:163-165(1999))。

尽管在小鼠中获得了期望的结果,所报道的中和抗 NGF 抗体对免疫系统的副作用也带来了有关在人患者中将抗 NGF 抗体用于预防或治疗哮喘或其它疾病的严重问题。尤其是, Torcia 等在 *Cell* 85:345-356(1996)中鉴定 NGF 是记忆 B 淋巴细胞的自分泌存活因子,并证明在小鼠体内施用中和抗 NGF 抗体会减少记忆 B 细胞并取消二次抗原特异性免疫应答。Garaci 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:14013-14018(1999)报道, NGF 是一种自分泌存活因子,它可拯救人的单核细胞/巨噬细胞避免 HIV 感染造成的细胞病变效应。这一报道以及 Torcia 等的发现(同上)都说明抗 NGF 抗体有可能危及受治疗者的免疫系统。

发明概述

本发明是基于一意外发现,即体内施用治疗有效量的抗-MGF 单克隆抗体(抗体 911)对实验用变态反应小鼠模型的免疫系统没有副作用。因此,这种抗体和相关抗体很有希望用于治疗人患者的 NGF 相关疾病,包括哮喘。

一方面,本发明涉及通过对患者施用有效量的抗人 NGF(抗-hNGF)单克隆抗体

而在人患者中控制 NGF 相关疾病的方法，这种抗体能够以纳摩尔范围的亲和力结合 hNGF，并在体内抑制 hNGF 与人 TrkA(hTrkA)的结合，其中所述抗体对患者的免疫系统没有显著的副作用。

在一个实施方案中，所述抗体与 hNGF 的结合亲和力优选为约 0.10 至约 0.80 nM，更优选为约 0.15 至约 0.75 nM，最优选为约 0.18 至约 0.72 nM。

在另一个实施方案中，所述抗体结合与选自 MAb 911、MAb 912 和 MAb 938 的抗体实质上相同的 hNGF 表位，更优选为与 MAb 911 相同的表位。

在再一个实施方案中，所述抗体能够与鼠 NGF(muNGF)交叉反应。

所述抗体也可以是抗体片段，优选为选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 片段、双体分子(diabodies)、单链抗体分子和由抗体片段形成的多特异性抗体的抗体片段，最优选为单链 Fv(scFv)分子。

在另一个实施方案中，所述抗体是嵌合抗体。它还可被人源化或是人的。

在再一个实施方案中，所述抗体是双特异性的。所述双特异性抗体可具有抗-IgE 的特异性。

被控制的 NGF 相关疾病优选与 NGF 对神经系统的作用无关。

在一个实施方案中，所述 NGF 相关疾病是炎性疾患，优选选自哮喘，关节炎，多发性硬化，红斑狼疮和银屑病。

在优选的实施方案中，所述疾患是哮喘。在另一个实施方案中，所述疾患是关节炎，优选是类风湿性关节炎。在再一个实施方案中，所述疾患是银屑病。

在再一个实施方案中，所述抗体与其它用来治疗炎性疾患的治疗剂联合施用。因此，所述抗体可以和另一种治疗哮喘的治疗剂联合施用。在一个实施方案中，所述抗体和一种皮质类固醇一起施用，优选为丙酸倍氯米松(beclomethasone dipropionate)(BDP)。在另一个实施方案中，所述抗体与抗 IgE 抗体一起施用，如 rhuMAb-E25 或 rhuMAb-E26。为治疗类风湿性关节炎，所述抗体可以和抗 TNF 抗体或一种抗体或特异性结合 TNF 受体的免疫粘附素联合施用。

另一方面，本发明涉及一种含有嵌合抗体、人源化抗体或人抗人 NGF 单克隆抗体以及与药学上可接受的载体联合的药物组合物，所述抗体能够以纳摩尔范围的亲和力结合 hNGF 并在体内抑制 hNGF 与人 TrkA(hTrkA)的结合，其中所述抗体对患者的免疫系统没有显著的副作用。所述药物组合物中的抗体可以是抗体片段，优选为选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 片段、双体分子、单链抗体分子和由抗体片段形成的多特异性抗体的抗体片段。

在一个实施方案中，所述抗体是双特异性抗体。所述双特异性抗体能够与天然

的人 IgE 或天然的人 TNF 或天然的人 TNF 受体特异性结合。

在另一个实施方案中,所述药物组合物还包括其它药物活性成分,如适合治疗炎性疾患的成分。所述炎性疾患优先选自哮喘,多发性硬化,关节炎,红斑狼疮和银屑病。在一个实施方案中,所述炎性疾患是哮喘。在另一个实施方案中,所述炎性疾患是关节炎,优选为 od 风湿性关节炎。在再一个实施方案中,所述炎性疾患是银屑病。

另一方面,本发明涉及一种制造产品,它包括容器,含有嵌合抗体、人源化抗体或人抗人 NGF 单克隆抗体以及与药学上可接受的载体联合的药物组合物,以及用组合物来控制人患者中 NGF 相关疾病的装置,所述抗体能够以纳摩尔范围的亲和力结合 hNGF 并在体内抑制 hNGF 与人 TrkA(hTrkA)的结合,其中所述抗体对患者的免疫系统没有显著的副作用。

在一个实施方案中,所述制造产品还包括其它药物活性成分,优选适合治疗炎性疾患。所述炎性疾患优先选自哮喘,多发性硬化,关节炎,红斑狼疮和银屑病。

本发明涉及以下各项:

1. 在人患者中控制 NGF 相关疾病的方法,其特征在于,所述方法包括对所述患者施用有效量的抗人 NGF(抗-hNGF)单克隆抗体,这种抗体能够以纳摩尔范围的亲和力结合 hNGF,并在体内抑制 hNGF 与人 TrkA(hTrkA)的结合,其中所述抗体对所述患者的免疫系统没有显著的副作用。

2. 如项 1 所述方法,其特征在于,所述抗体与 hNGF 的结合亲和性为约 0.10 至约 0.80 nM。

3. 如项 2 所述方法,其特征在于,所述抗体与 hNGF 的结合亲和性为约 0.15 至约 0.75 nM。

4. 如项 2 所述方法,其特征在于,所述抗体与 hNGF 的结合亲和性为约 0.18 至约 0.72 nM。

5. 如项 1 所述方法,其特征在于,所述抗体实质上结合相同的 hNGF 表位,作为选自 MAb 911, MAb 912 和 MAb 938 的抗体。

6. 如项 5 所述方法,其特征在于,所述抗体实质上结合相同的 hNGF 表位,作为抗体 MAb 911。

7. 如项 1 所述方法,其特征在于,所述抗体还能结合鼠 NGF(muNGF)。

8. 如项 1 所述方法,其特征在于,所述抗体是抗体片段。

9. 如项 8 所述方法,其特征在于,所述抗体片段选自 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 片段,双体分子,单链抗体分子,以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

10. 如项 9 所述方法, 其特征在于, 所述单链抗体分子是单链 Fv(scFV) 分子。
11. 如项 1 所述方法, 其特征在于, 所述抗体是嵌合抗体。
12. 如项 1 所述方法, 其特征在于, 所述抗体是人源化抗体。
13. 如项 1 所述方法, 其特征在于, 所述抗体是人抗体。
14. 如项 1 所述方法, 其特征在于, 所述抗体是双特异性抗体。
15. 如项 14 所述方法, 其特征在于, 所述双特异性抗体具有抗 IgE 特异性。
16. 如项 1 所述方法, 其特征在于, 所述 NGF 相关疾病不是和 NGF 对神经元系统的作用有关的病症。
17. 如项 16 所述方法, 其特征在于, 所述 NGF 相关疾病是炎性疾患。
18. 如项 17 所述方法, 其特征在于, 所述炎性疾患选自哮喘, 多发性硬化, 关节炎, 红斑狼疮和银屑病。
19. 如项 18 所述方法, 其特征在于, 所述疾患是哮喘。
20. 如项 18 所述方法, 其特征在于, 所述疾患是关节炎。
21. 如项 20 所述方法, 其特征在于, 所述关节炎是类风湿性关节炎。
22. 如项 18 所述方法, 其特征在于, 所述疾患是银屑病。
23. 如项 17 所述方法, 其特征在于, 所述抗体和用来治疗所述炎性疾患的其它治疗剂联合施用。
24. 如项 19 所述方法, 其特征在于, 所述抗体和皮质类固醇联合施用。
25. 如项 24 所述方法, 其特征在于, 所述皮质类固醇是丙酸倍氯米松(BDP)。
26. 如项 19 所述方法, 其特征在于, 所述抗体和抗 IgE 抗体联合施用。
27. 如项 26 所述方法, 其特征在于, 所述抗 IGE 抗体是 rhuMAb-E25 或 rhuMAb-E26。
28. 如项 21 所述方法, 其特征在于, 所述抗体与用来治疗类风湿性关节炎的其它治疗剂联合施用。
29. 如项 28 所述方法, 其特征在于, 所述其它治疗剂是抗 TNF 抗体或抗体或特异性结合 TNF 受体的免疫粘附素。
30. 一种药物组合物, 其特征在于, 所述药物组合物含有嵌合抗体、人源化抗体或人抗人 NGF(抗 hNGF)单克隆抗体与药学上可接受的载体联合, 所述抗体能够以纳摩尔范围的亲和力结合 hNGF 并在体内抑制 hNGF 与人 TrkA(hTrkA)的结合, 其中所述抗体对患者的免疫系统没有显著的副作用。
31. 如项 30 所述药物组合物, 其特征在于, 所述抗体是抗体片段。

32. 如项 31 所述药物组合物，其特征在于，所述抗体片段选自 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 片段，双体分子，单链抗体分子，以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

33. 如项 30 所述药物组合物，其特征在于，所述抗体是双特异性抗体。

34. 如项 33 所述药物组合物，其特征在于，所述双特异性抗体能够特异性结合天然人 IgE。

35. 如项 33 所述药物组合物，其特征在于，所述双特异性抗体能够特异性结合天然人 TNF 或天然人 TNF 受体。

36. 如项 30 所述药物组合物，其特征在于，还含有其它药物活性成分。

37. 如项 36 所述药物组合物，其特征在于，所述其它药物活性成分适合治疗炎性疾患。

38. 如项 37 所述药物组合物，其特征在于，所述炎性疾患选自哮喘，多发性硬化，关节炎，红斑狼疮和银屑病。

39. 如项 38 所述药物组合物，其特征在于，所述炎性疾患是哮喘。

40. 如项 38 所述药物组合物，其特征在于，所述炎性疾患是关节炎。

41. 如项 40 所述药物组合物，其特征在于，所述关节炎是类风湿性关节炎。

42. 如项 41 所述药物组合物，其特征在于，所述炎性疾患是银屑病。

43. 一种制造产品，其特征在于，所述制造产品包括：容器；项 30 所述的药物组合物；和将物质的组合物用于控制人患者中 NGF 相关疾病的说明书。

44. 如项 43 所述制造产品，其特征在于，含有第二种药物活性成分。

45. 如项 43 所述制造产品，其特征在于，所述第二种药物活性成分适合治疗炎性疾患。

46. 如项 45 所述制造产品，其特征在于，所述炎性疾患选自哮喘，多发性硬化，关节炎，红斑狼疮和银屑病。

47. 如项 43 所述制造产品，其特征在于，还包括其中含有组合物的第二个容器，其中所述组合物包含结合 NGF 受体并阻断配体活化的第二抗体。

附图简述

图 1 总结了 6 种抗 NGF MAb(单克隆抗体)与 NGF/NT-3 嵌合突变体结合的能力。将各种 MAb 与 NGF/NT3 突变体的相对结合与野生型 hNGF 的结合进行比较：(-)，< 10%；(+)，10-30%；(++)，30-60%；(+++)，60-100%。各种 MAb 与 hNGF 结合的

EC₅₀ 值为:MAb 908, 1.8×10^{-10} M ; MAb 911, 3.7×10^{-10} M; MAb 912, 1.8×10^{-10} M; MAb 938, 7.4×10^{-10} M; MAb 14.14, 5.9×10^{-10} M。

图 2A-2F 显示了 MAb 和野生型以及突变型 hNGF 的结合。将在 2-5 独立 ELISA 中获得的各种突变体的平均 EC₅₀ 值与用野生型 NGF 结合获得的 EC₅₀ 值进行比较。EC₅₀ 值是用 Kaleidagraph 软件程序(Abelbeck 软件)通过线性回归分析(未加权)确定的。条状图表示, 突变型使 MAb 结合至少降低了两倍, 并标出了起作用的残基。

图 2A 显示了 MAb 908 与野生型和突变型 NGF 的结合。

图 2B 显示了 MAb 909 与野生型和突变型 NGF 的结合。

图 2C 显示了 MAb 911 与野生型和突变型 NGF 的结合。

图 2D 显示了 MAb 912 与野生型和突变型 NGF 的结合。

图 2E 显示了 MAb 938 与野生型和突变型 NGF 的结合。

图 2F 显示了 MAb 14.14 与野生型和突变型 NGF 的结合。

图 3A-3F 分别表示了 NGF 上抗 NGF MAbs 908, 909, 911, 912, 938 和 14.14 的 MAb 表位的分子模型。浅色和中灰色表示各个不同的 NGF 单体, 通过 ELISA 确定影响 MAb 结合的残基用黑色表示。在图 3A 中标出了各可变区。

图 4A 和 4B 显示了抗 NGF MAb 与未还原的 hNGF(A)和还原的 hNGF(B)结合的免疫印迹分析。第一泳道为分子量标记。泳道 2 和 3 分别显示了缓冲液和阴性对照抗体。在未还原条件下, 纯化的 hNGF 走出了三条带, 这似乎相应于单体, 二体和部分加工的二体 hNGF。

图 5 总结了 MAb 表位作图结果。

图 6 显示了抗 NGF MAb 抑制 hNGF 与 TrkA-IgG 受体免疫粘附素的结合。

图 7 显示了抗 NGF MAb 抑制 hNGF 与 p75-IgG 免疫粘附素结合的能力。

图 8 显示了抗 NGF MAb 抑制 hNGF 与转染的 CHO 细胞上表达的 TrkA 胞外域结合的能力。采用抗磷酸酪氨酸 MAb, 通过 ELISA 测量了酪氨酸磷酸化的抑制作用。

图 9 显示了抗 NGF MAb 抑制 hNGF 在胚胎大鼠背根神经节神经元上存活作用的能力。最大存活是基于单用 NGF 获得的信号, 用加入饱和浓度的可溶性 TrkA-IgG 获得的信号确定了最大抑制。

图 10 证明用抗 NGF MAb 911 处理非显著地增加了对卵清蛋白的免疫应答。

图 11 显示了用鸡 γ -球蛋白免疫后用抗 NGF MAb 911 处理非显著地降低了免疫应答。

图 12 显示了用抗 NGF MAb 911 处理阻止了 NGF 诱导的热痛觉过敏。

图 13 显示了在致敏的 C57/BL6 小鼠(SN)中, 用抗 NGF MAb 911 处理可抑制用

吸入的尘螨抗原攻击后的呼吸道过度反应性。

图 14A-14C 显示, 在致敏的 C57/BL6 小鼠 (SN) 中, 用抗 NGF MAb 处理可降低吸入的尘螨抗原攻击后的白血细胞、淋巴细胞和嗜伊红细胞渗透进 BAL 中。

图 15 显示了尽管在抗 NGF MAb 处理的致敏小鼠中减少了白细胞渗透进 BAL 中, 但嗜伊红细胞的比值仍高。

图 16 显示了用抗 NGF MAb 911 处理削弱了抗原攻击后 BAL 中 IL-13 的增加。

图 17 证明了尽管降低对变应原的炎性反应, 但用抗 NGF MAb 处理不会降低体液免疫应答, 体液免疫应答是用总血清免疫球蛋白滴定与尘螨 (dust mite) 的比值测定的。

图 18 显示了用抗 NGF MAb 处理也不会降低 IgE 的总血清水平。

图 19 显示了用 NGF 处理增加了三叉神经神经节中 CGRP 的水平, 而用抗 NGF MAb 处理使 CGRP 水平降低。

优选实施方案的详细描述

A. 定义

除非另有说明, 这里使用的技术和科学术语和精通本发明所属技术领域的一般技术人员的通常理解有着相同的含义。参见, 例如 Singleton 等, 《微生物和分子生物学词典》(*Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*), 第二版, J. Wiley & Sons (纽约, 纽约州, 1994); Sambrook 等, 《分子克隆实验手册》(*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*), Cold Springs Harbor Press (冷泉港, 纽约州 1989)。精通此领域的技术人员将了解许多与这里所述方法和材料类似或相同的方法和材料, 它们可用来实践本发明。实际上, 本发明并不限于所描述的方法和材料。出于本发明的目的, 定义了以下术语。

当用在这里时, 术语“神经生长因子”和“NGF”定义为所有哺乳动物种类, 包括人的天然序列 NGF。

“NGF 受体”是指被 NGF 结合或被 NGF 活化的多肽。NGF 受体包括任何哺乳动物种类, 包括人的 TrkA 受体和 p75 受体。

术语“天然序列”与 NGF 或任何其它多肽结合, 是指与天然来源的相应多肽有相同氨基酸序列的多肽, 与其制备模式无关。可从自然界中分离这种天然序列的多肽或可通过重组和/或合成方法或这些方法的任何组合产生这种天然序列的多肽。术语“天然序列”特别包括天然产生的截短形式或分泌形式 (例如胞外域序列), 天然产生的变体形式 (如另路剪接形式) 和天然产生的全长多肽的等位基因变体。

“抗体”(Abs)和“免疫球蛋白”(Igs)是具有相同结构特征的糖蛋白。抗体显示对特异性抗原的结合专一性,而免疫球蛋白包括抗体和缺乏抗原特异性的其它抗体样分子。后一种的多肽,例如,由淋巴系统以低水平产生和由骨髓瘤以提高的水平产生。

“天然抗体”和“天然免疫球蛋白”通常是具有约 150,000 道尔顿的异源四聚(heterotetrameric)糖蛋白,由两个相同的轻(L)链和两个相同的重(H)链组成。每个轻链通过一个共价二硫键与重链连接,而二硫键的数量在不同的免疫球蛋白同种型的重链之间不同。每个重链和轻链通常还有规律地具有分隔的链内二硫桥。每个重链一端具有一个可变区(VH)接着是一些恒定区。每个轻链一端具有一个可变区(VL),另一端具有一个恒定区;轻链恒定区与重链的第一恒定区相匹配,轻链可变区与重链可变区相匹配。据认为特定的氨基酸残基形成轻链和重链可变区之间的界面(Chothia 等, *J. Mol. Biol.* 186:651[1995]; Novotny 和 Haber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82:4592[1985]; Chothia 等, *Nature* 342:877-883[1989])。

术语“可变的”指抗体中可变区的某些部分序列上存在着广泛不同,并用于各特定抗体对其特定抗原的结合和特异性这一事实。然而,可变性并不均匀分布于抗体的整个可变区。它集中于轻链和重链的可变区内,被称为互补决定区(CDR)或高变区的三个区段中。可变区的较高保守性部分被称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变区各含 4 个 FR 区,大部分采取 β -片层构型,由三个 CDR 连接,形成环状连接,在有些情况下形成部分的 β -片层结构。每个链中的 CDR 与来自另一链的 CDR 由于 FR 而密切靠近在一起,形成抗体的抗原结合位点(见 Kabat 等, (1991), 同上)。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但显示各种效应物功能,例如抗体参与的抗体依赖性细胞毒性。

抗体经木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段,称作“Fab”片段,每个片段具有单一抗原结合位点,和一个残余的“Fc”片段,其名称反映了其易结晶的能力。木瓜蛋白酶处理产生一个 $F(ab')_2$ 片段,它具有两个抗原结合位点并仍能交联抗原。

“Fv”是含有完整抗原-识别和抗原结合位点的最小抗体片段。在双链 Fv 中,该区域由一个重链和一个轻链可变区以紧密的、非-共价结合的二聚体组成。在单链 Fv 中,重链和轻链可变区可通过柔性肽接头共价连接,这样轻链和重链就可以连接成类似于双链 Fv 中的“二聚”结构。就是在这种构型中,每个可变区域的三个 CDR 相互作用,在 VH-VL 二聚体的表面上限定了抗原结合位点。总起来说,6 个 CDR 赋予了抗体的抗原结合特异性。然而,即使是一个可变区(或仅含有对抗原

特异的 3 个 CDR 的一半 Fv) 也具有识别和结合抗原的能力, 尽管亲和力比完整结合位点低。

Fab 片段还含有轻链恒定区和重链第一恒定区(CH1)。Fab'片段不同于 Fab 片段的是其重链 CH1 区的羧基末端添加了几个残基, 包括来自抗体绞链区的一种或多种半胱氨酸。本文 Fab'-SH 指 Fab', 其中恒定区的半胱氨酸残基具有一个游离的巯基。F(ab')₂ 抗体片段起源于作为链间具有铰链半胱氨酸的 Fab'片段对产生的。还已知其它化学偶联的抗体片段。

任何种类脊椎动物的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可分为两种明显不同的类型之一, 根据它们恒定区氨基酸序列称作 kappa(κ)和 lambda(λ)。

根据重链恒定区的氨基酸序列, 免疫球蛋白可分为不同的类。这里有 5 个主要的免疫球蛋白类别:IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM, 这些类别中的几类可进一步分为亚类(同种型), 例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄, IgA₁和 IgA₂。对应于不同类免疫球蛋白的重链恒定区分别被称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是熟知的。

本文术语“抗体”具体包括单克隆抗体, 包括抗体片段克隆。

“抗体片段”含有完整抗体的一部分、通常是完整抗体的原结合区或可变区。抗体片段的例子包括 Fab、Fab'、F(ab')₂和 Fv 片段; 双体分子; 单链抗体分子, 包括单链 Fv(scFv)分子; 和由抗体片段形成的多特异性抗体, 如双特异性抗体。

本文使用的术语“单克隆抗体”指从基本上同源的抗体群中获得的抗体(或抗体片段), 即该群所含的各个抗体是相同的, 除了可能以很少量存在的天然产生的突变外。单克隆抗体是高度特异性的, 针对一个抗原位点。而且, 与常规的(多克隆)抗体制剂相反, 该制剂通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体, 每一个单克隆抗体针对抗原上的一种决定簇。除它们的特异性以外, 单克隆抗体的优点在于它们是通过杂交瘤培养合成的, 且不被其它免疫球蛋白的污染。修饰词“单克隆的”表示不把从基本上同种群的抗体中获得的抗体特征认作需要通过任何特定的方法生产抗体。例如, 本发明所用的单克隆抗体可通过 Kohler 等, *Nature* 256:495(1975)首先描述的杂交瘤方法制备, 或用重组 DNA 方法制备(见例如, 美国专利号 4, 816, 567)。例如用 Clackson 等, *Nature* 352:624-628(1991)和 Marks 等, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597(1991)描述的方法从噬菌体抗体文库中分离的“单克隆抗体”还包括含有抗体片段。(Fv 克隆)的抗原识别和结合位点的克隆。

本文中的单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白)及其片段, 其中重

链和/或轻链的一部分与衍生自具体种的体中的相应序列相同或同源，或属于特定的抗体类别或亚类，而链的剩余部分与衍生自另一种物种的抗体中的相应序列相同或同源，或属于另一抗体类别或亚类，只要它们显示所需的生物活性(Cabilly等，美国专利号 4,816,567；和 Morrison 等，Pro.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855(1984))。

非人(例如小鼠)抗体的“人源化”形式是含有衍生自非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂)或抗体的其它抗原结合序列。在很大程度上，人源化抗体是人的免疫球蛋白(受体抗体)，其中受体的互补决定区(CDR)残基被非人物种(供体抗体)如小鼠、大鼠、或家兔具有所需特异性、亲和力和能力的非人物种的 CDR 的残基所取代。在一些例子中，人免疫球蛋白的 Fv 框架区(FR)残基被相应的非人残基所取代。而且人源化抗体可包含既不在受体抗体又不在输入的 CDR 或框架序列发现的残基。进行这些修饰以进一步改进和最优化抗体的性能。通常，人源化抗体实质上包括全部至少一个、通常两个可变区，其中所有或基本上所有的 CDR 区对应于非人免疫球蛋白的 CDR 区，并且所有的或基本上所有的 FR 区是人免疫球蛋白序列的 FR 区。人源化抗体还任选地包括免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分，通常是人免疫球蛋白恒定区的一部分。对于进一步详细描述，见 Jones 等，*Nature* 321:522-525(1986)；Reichmann 等，*Nature* 332:323-329(1988)和 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-598(1992)；和 Clark, Immunol. Today 21:397-402(2000)。人源化抗体包括 Primatized™ 抗体，其中抗体的抗原结合区衍生自感兴趣的抗原免疫猕猴产生的抗体。

“单链 Fv”或“ScFv”抗体片段含有抗体的 VH 和 VL 区域，其中这些区域以一条多肽链存在。通常，ScFv 多肽在 VH 和 VL 区域之间还含有一个多肽接头，它能够使 ScFv 形成抗原结合所需的结构。ScFv 的综述见 Pluckthun, 《单克隆抗体的药理学》(*The Pharmacology of Monoclonal antibody*), 113 卷, Rosenberg 和 Moore 编, Springer-Verlag, 纽约, 269-315 页(1994), Dall' Acigua 和 Carter, Curr. Opin. Struct. Biol. 8:443-450 (1998), 和 Hndson, Curr. Opin. Immunol. 11:548-557(1999)。

术语“双体分子”指具有两个抗原结合位点的小抗体片段，这些片段含有与相同多肽链(VH-VL)中轻链可变区(VL)相连的重链可变区(VH)。通过采用一个短得而不能使同一链上的两个区域间配对的接头，迫使该区域与另一链的互补区域配

对且产生两个抗原结合位点。例如双体分子在 EP 404.097; WO 93/11161; 和 Hollinger 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448(1993) 中有更全面的描述。

“分离的”抗体是已经鉴定且与其天然环境的成分相分离和/或回收的抗体。其天然抗体环境的污染成分是可能会干扰该抗体的诊断或治疗应用的物质, 可包括酶, 激素以及其它蛋白质或非蛋白质溶质。在优选实施例中, 可提纯该抗体至 (1) 纯度用 Lowry 方法测定抗体 95% 以上 (按重量计), 最好 99% 以上 (按重量计), (2) 提纯至足够获得 N-末端或内部氨基酸序列的至少 15 个残基的程度 (使用转杯式测序仪), 或 (3) 用考马斯蓝, 或优选银染色在还原或非还原条件下, 用 SDS-PAGE 测定为均一性。由于没有抗体天然环境的至少一种成分, 分离的抗体包括重组细胞内原位产生的抗体。然而一般情况下, 分离的抗体将通过至少一个纯化步骤制备。

“中和性抗体”指一种抗体分子, 该抗体分子能阻断或显著降低其所结合的靶抗原的效应物功能。因此, “中和性”抗 IFN 抗体能阻断或显著降低效应物功能, 如 IFN 的受体结合和/或细胞反应的引发。“显著”降低指降低靶抗原 (如 NCTF) 的效应物功能至少 60%, 优选至少约 70%, 较佳至少约 75%, 更佳至少约 80%, 再佳至少约 85%, 最佳至少约 90%。

当抗体能够使配体与受体的结合能力发生客观可测的降低时, 则该抗体能够“抑制”配体与受体的“结合”。

术语“表位”用来指 (单克隆或多克隆) 抗体在蛋白质抗原上的结合位点。

与特定表位结合的抗体可通过“表位作图”确定。在这一领域中已知有很多方法用来作图并表征抗原表位在蛋白质上的位置, 包括解释抗体-抗原复合体的晶体结构, 竞争性测定, 基因片段表达测定, 以及以合成肽为基础的测定, 这些方法描述在 (例如) Harlow 和 Lane 的《抗体使用实验手册》(Using Antibodies, a Laboratory Manual) 的第 11 章中, 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, 纽约州, 1999。以下讨论竞争性测定。根据基因片段表达测定, 编码蛋白质的开放阅读框被随意分割或被特定的遗传构建分割, 同时确定了表达的蛋白质片段与要测试的抗体的反应性。(例如) 基因片段可以通过 PCR 产生, 然后在体外在放射性氨基酸存在下将其转录并翻译到蛋白质中。然后通过免疫沉淀和凝胶电泳确定抗体与放射性标记的蛋白质片段的结合。使用呈现在噬菌体颗粒 (噬菌体文库) 表面上的随机肽序列的大型文库还可以鉴别某些抗原表位。或者, 可以测试确定的重叠肽片段的文库以便在简单的结合测定中与测试抗体结合。后面一种方法适用于确定约 5-15 个

氨基酸的线性抗原表位。

当两个抗体识别相同的或空间上重叠的抗原表位时，抗体结合“基本上一样的抗原表位”作为参考抗体。最广泛使用且快速确定两个抗原表位是否与相同的或空间上重叠的抗原表位结合的方法是竞争性测定，采用标记的抗原或标记的抗体，这种方法适用于所有不同的形式。通常，抗原被固定在 96 孔的平板上，用放射性标记或酶标记测定未标记的抗体阻断标记的抗体结合的能力。

本文使用的术语：氨基酸或氨基酸残基是指如下面所描述的天然存在的 L 氨基酸或 D 氨基酸以及它们相应的变体。这里使用了常用的一个或三个字母的缩写来代表氨基酸(Bruce Alberts 等,《细胞的分子生物学》(Molecular Biology of the Cell), Garland Publishing 公司, 纽约(第三版, 1994)。

“变体”是在某些方面与天然抗体不同但保持了相同的生物活性的抗体。作为插入、缺失、修饰和/或取代天然序列中一个或多个氨基酸残基的结果，变体可以有不同于天然抗体的氨基酸序列。变体可以有不同于天然抗体的糖基化模式。此外，变体也可以是经过共价修饰的天然抗体。

“疾病”是指任何受益于按本发明方法进行治疗的疾患。“疾病”和“疾患”在这里可互换使用，包括慢性和急性病症或疾病，包括那些容易使哺乳动物患病的病理疾患。这里将治疗的疾病的非限制性例子包括红斑狼疮、接触性皮炎、湿疹、带状疱疹、带状疱疹后神经痛、痛觉过敏、慢性疼痛、刺激性肠病、克罗恩氏病、结肠炎、膀胱炎、多发性硬化、哮喘、银屑病和关节炎，包括慢性关节炎和类风湿性关节炎。优先的用本发明方法进行治疗的疾病是炎性疾患，如哮喘、多发性硬化、关节炎、红斑狼疮和银屑病。

“炎性疾患”是一种疾患，其特征为一处或多处疼痛、发热、发红、肿胀和功能丧失，并且和组织损伤、感染、刺激或破损有关。

术语“疾病状态”指细胞或整个哺乳动物的一种生理状态，该状态中发生了细胞或身体功能系统或器官功能的中断、停止或失调。

术语“有效量”或“治疗有效量”指治疗和/或预防哺乳动物的疾病，紊乱或有害生理状态的药物有效量。在本发明中，“有效量”的抗 IFN 抗体可以防止降低、减缓或延迟自身免疫失调症如狼疮、多发性硬化、哮喘、银屑病或关节炎的发作；降低、防止或抑制(即，某种程度的减缓和优选停止)自身免疫失调症如狼疮、多发性硬化、哮喘、银屑病或关节炎的发生；和/或某种程度上减轻一种或多种与这种疾病有关的症状。

在本发明的方法中，“对照”及其字石的变化是用来指预防、部分或完全抑制、降低、延迟或减缓不希望的事件，如生理状况，如与哮喘等疾病有关的炎症反应。

“治疗”是指治疗处理和预防或预防性措施。需要治疗的个体包括那些已经患病的个体以及易患病的个体，或那些要预防疾病的个体。为了本发明的目的，有益或所需的临床结果包括(但不限于)减轻症状、缩小疾病的范围、稳定(即，不再恶化)疾病的状态，延迟或减缓疾病的进展、改善或减轻疾病的状态、和缓解症状(无论部分或全部)，无论是可检测或是不可检测的。“治疗”也可以指与期望的存活期相比(如果未接受治疗)，延长存活期。由此，需要治疗的对象包括那些已经患病的个体以及易患病的个体，或那些要预防疾病的个体。

对免疫系统的“显著副作用”是危及免疫系统的作用和/或抑制对抗原攻击产生正常免疫反应的作用。对免疫系统的显著副作用的例子或许是降低的体液免疫反应。

“药学上可接受的”载体、赋形剂或稳定剂是指那些在使用剂量和浓度下对暴露于其中的细胞或哺乳动物无毒的物质。通常，生理上可接受的载体是 pH 缓冲水溶液。生理上可接受的载体的例子包括缓冲剂，如磷酸、柠檬酸和其它有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸；低分子量(小于约 10 个残基)多肽类；蛋白质类，如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水聚合物，如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸类，如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸；单糖、双糖和包括葡萄糖、甘露糖或糊精在内的其它碳水化合物；螯合剂，如 EDTA；糖醇类，如甘露糖醇、或山梨糖醇；形成盐的反荷离子，如钠离子；和/或非离子表面活性剂，如 TWEEN、聚乙二醇(PEG)和 PLURONIC (普朗尼友，聚丙二醇与环氧乙烷的加聚物)。

“脂质体”是由各种类型的脂质、磷脂和/或表面活性剂构成的小载体，它可有效地将药物(如这里所述的抗 NGF 抗体和任选的化学治疗剂)输送给哺乳动物。脂质体的组分通常排成双层结构，与生物膜的脂质排列类似。

术语“药品说明书”是指通常包括在治疗产品的商业包装内的说明书，它包括关于适应症、用法、剂量、用药方法、禁忌症的信息和/或与此类治疗产品的警告。

出于治疗的目的，“哺乳动物”是指归类于哺乳动物的任何动物，包括人、家畜和农畜、以及动物园的动物、运动动物或宠物，比如狗类、马类、猫类、牛类等。优选的哺乳动物是人。

B. 实施本发明的方法

下面将更详细的描述在哮喘小鼠模型中施用抗 NGF 单克隆抗体 911 可减轻呼吸道过度反应性和炎症,但不会降低对吸入抗原的体液免疫反应(用总血清免疫球蛋白水平和血清 IgE 水平测量)。

抗 NGF 抗体是此领域已知的。用于本发明的抗 NGF 抗体包括多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、双特异性抗体、异缀合抗体(heteroconjugate antibody)和抗体片段,以及修饰的抗体,包括抗体的糖基化变体,抗体的氨基酸序列变体和共价修饰的抗体。所述抗体可用此领域已知的任何方法制备。

因此,可使用 Kohler 等, Nature, 256:495(1975)第一次描述的杂交瘤方法制备单克隆抗体,或可使用重组 DNA 方法制备(美国专利 4,816,567 号)。

在杂交瘤方法中,对小鼠或其它适当的宿主动物,例如仓鼠或猕猴,如本文上述方法进行免疫以诱导产生或能够产生与免疫所用蛋白质特异性结合的抗体的淋巴细胞。或者,可体外免疫淋巴细胞。然后,采用合适的融合剂(例如聚乙二醇)使淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,以形成杂交瘤细胞(Goding,《单克隆抗体:原理和实践》(*Monoclonal Antibody:Principles and Practice*), 55-103 页, [Academic Press, 1986])。在合适的培养基中接种和培育这样制备的杂交瘤细胞,该培养基优选含有一种或多种能抑制未融合细胞、亲代骨髓瘤细胞生长和存活物质。例如,如果亲代骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT 或 HPRT),杂交瘤的培养基一般包括次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸苷(HAT 培养基),阻止了缺乏 HGPRT 的细胞的生长。优选的骨髓瘤细胞系是小鼠骨髓瘤细胞系,例如购自美国加利福尼亚州圣迭戈索克研究所细胞分配中心的 MOP-21 和 M.C.-11 小鼠肿瘤细胞衍生的细胞,和购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, Rockville, 美国马里兰州)的 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞。对于人单克隆抗体的生产还报道了人骨髓瘤和小鼠-人异骨髓瘤细胞系(Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001(1984); Brodeur 等, 单克隆抗体的生产技术和应用《(*Monoclonal Antibody*) Production Techniques and Applications), 51-63 页, Marcel Dekker 公司, 纽约, [1987])。测试培育杂交瘤细胞的培养基产生针对抗原的单克隆抗体。较佳地,杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性可通过免疫沉淀法或体外结合试验,例如放射免疫试验(RIA)或酶联免疫吸附试验(ELISA)测定。例如,单克隆抗体的结合亲和力可,通过 Munson 等, *Anal. Biochem.*, 107:220(1980)的

Scatchard 分析测定。鉴定到产生具有所需特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,可将该细胞通过有限稀释步骤亚克隆和用标准方法培育(Goding,《单克隆抗体:原理和实践》(*Monoclonal Antibody:Principles and Practice*),59-103 页(Academic Press,1986))。通过常规免疫球蛋白纯化方法,例如蛋白质 A-琼脂糖凝胶、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析,可合适地从培养基、腹水液或血清分离得到亚克隆分泌的单克隆抗体。

抗体的重组生产需要分离编码抗体或抗体链的 DNA。

容易地分离编码单克隆抗体的 DNA 并用常规方法测序(例如采用能够与编码单克隆抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。杂交瘤细胞可用作这种 DNA 的优选来源。一旦分离,可将该 DNA 放入表达载体中,然后转染入宿主细胞,如大肠杆菌细胞、猿猴 COS 细胞,中华仓鼠卵巢(CHO)细胞或不另外产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞,以在重组宿主细胞中获得合成的单克隆抗体。还可修饰此 DNA,例如,以人重链和轻链恒定区的编码序列取代同源的小鼠序列,Morrison 等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851(1984),或将非-免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列与免疫球蛋白编码序列共价结合。以这种方式,制备了与这里的抗-NGF 单克隆抗体特异性结合的“嵌合”或“杂交”抗体。

通常用这种非免疫球蛋白多肽取代本发明抗体的恒定区,或用它们取代本发明抗体的一个抗原结合位点的可变区以产生含有一个对天然 NGF 多肽有特异性的抗原结合位点和另一个对不同靶(如高亲和 IgE 受体或 TNF 受体)有特异性的抗原结合位点的嵌合二价抗体。还可以采用在合成蛋白质化学中已知的方法,包括那些与交联剂有关的方法,在体外制备嵌合抗体或杂交抗体。例如,可以彩二硫化物交换反应或通过形成硫醚键来构建免疫毒素。用于此目的的合适的试剂例子包括亚氨基硫醇盐和甲基-4-巯基丁酰亚胺酸盐。

非人抗体(如鼠抗体)可被人源化。通常,人源化抗体中有一个或多个非人源的氨基酸残基被引入。这些非人的氨基酸残基通常被称为“输入”残基,它们通常取自“输入”可变区。可以按照 Winter 和同事的方法[Jones 等,Nature,321:522-525(1986); Riechmann 等,Nature,332:323-327(1988); Verhoeyen 等,Science,239:1534-1536(1988)],通过用啮齿动物的 CDR 或 CDR 序列取代人抗体的相应序列,从而实质性地进行人源化。

重要的是,被人源化的抗体保持对抗原的高度亲和力和其它良好的生物学性质。为达到这个目的,根据优选的方法,人源化抗体是用亲本和人源化序列的三

维模型，通过测定亲本序列和各种概念上的人源化产物的方法制备的。三维免疫球蛋白模型一般可得到，且它们对于这一领域中的技术人员是熟悉的。图示并显示经过选择的候选免疫球蛋白序列可能的三维构象结构的计算机程序是可以获得的。对这些显示的检查使得能够分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中所起的可能的作用，即分析残基对候选免疫球蛋白与其抗原结合能力的影响。用这种方法，可从共有序列和输入序列中选择并结合 FR 残基，从而获得所需的抗体特性，如提高了对靶抗原的亲合力。通常，CDR 残基直接并最主要地参与影响抗原结合。为了解进一步的细节可以参阅美国专利 5,821,337 号。

本发明还包括人抗 NGF 抗体。如上所述，这种人抗体可通过杂交瘤方法制备，用人骨髓瘤和小鼠-人异骨髓瘤细胞系来生产人单克隆抗体(例如参见 Kozbor, *J. Immunol.* 133, 3001(1984)，和 Brodeur 等, 《单克隆抗体生产技术和应用》 (Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications), 51-63 页 (Marcel Dekker 公司, 纽约, (1987))。此外，还能够生产转基因动物(例如小鼠)，该转基因动物免疫后能够产生人抗体库而不产生内源性免疫球蛋白。例如，已描述了嵌合性小鼠和种系突变小鼠中抗体重链接合区(J_H)基因的纯合缺失导致内源性抗体产生的完全抑制。在这种种系突变小鼠中，人种系免疫球蛋白基因阵列的转移将导致抗原攻击后人抗体的生产。见例如 Jakobovits 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551-255(1993); Jakobovits 等, 对于此技术的改进方案也可参见 *Nature* 362, 255-258(1993)。Mendez 等 (*Nature Genetics* 15:146-156(1997))。

另外，可采用噬菌体展示技术(McCafferty 等, *Nature* 348:552-553(1990)，从未免疫的供体获得的免疫球蛋白可变(V)区的基因库，体外生产人抗体和抗体片段。根据这一技术，可将抗体 V 区基因框内克隆入丝状噬菌体，例如 M13 或 fd 的大或小外被蛋白基因中，并在噬菌体颗粒表面上作为功能性抗体片段展示。因为丝状噬菌体颗粒含有噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝，基于抗体功能特性的选择还导致编码显示那些特性的抗体的基因的选择。因此，噬菌体模拟了 B-细胞的一些特性。噬菌体展示可以多种形式进行；对于它们的评论见，如 Johnson, Kevin S. 和 Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571(1993)。几种来源的 V-基因节段可用于噬菌体展示。Clackson 等, *Nature* 352: 624-628(1991)从衍生自免疫小鼠脾的小的随机组合的 V 基因文库分离得到了抗-唑酮抗体的多样性阵列。可构建未免疫人供体的 V 基因库，可基本上依照

Marks 等, J.Mol.Biol. 222:581-597(1991), 或 Griffith 等, EMBO J. 12:725-734(1993)描述的技术分离针对抗原(包括自身抗原)多样性阵列的抗体。在天然免疫应答反应中,抗体基因以高速累积突变(体细胞高突变)。引入一些变化将赋予较高的亲和力,显示高亲和性表面免疫球蛋白的 B-细胞在随后的抗原攻击中优先复制和分化。通过采用称为“链改组”的技术可模拟这一自然过程(Marks 等, Bio/Technol. 10:779-783[1992])。在该方法中,噬菌体展示获得的“初级”人抗体的亲和力可通过用从未免疫供体获得的 V 区基因天然产生的变体(文库)取代重链和轻链 V 区基因而得以改进。这一技术得以产生具有亲和力 nM 范围的抗体和抗体片段。制备非常大的噬菌体抗体库[也称作“所有文库的母体”(the mother-of-all libraries)]的方法已由 Waterhouse 等, Nucl.Acids Res. 21:2265-2266(1993)描述,从这种大的噬菌体文库直接分离高亲和力的人抗体由 Griffith 等, EMBO J. 13:3245-3260(1994)报道。

基因改组也可用于从啮齿动物抗体产生人抗体,其中人抗体具有与起始的啮齿动物抗体相似的亲和性和特异性。根据这种也称作“表位印记”的方法,用噬菌体展示技术获得啮齿动物抗体的重链或轻链 V 区基因用人 V 区基因库取代,产生啮齿动物-人嵌合体。抗原选择导致能够恢复功能性抗原结合位点的人可变区的分离,即,表位控制(印记)配偶体的选择。为了取代余下的啮齿动物 V 区重复这一过程时,获得了人的抗体(见 PCT 专利申请 WO 93/06213, 发表于 1993 年 4 月 1 日)。与传统的通过 CDR 移植人源化啮齿动物抗体不同,此技术提供完全的人抗体,它不具有啮齿动物来源的构架和 CDR 残基。

本发明还特别地包括双特异性抗体。通常,双特异性抗体的重组生产基于两种免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,这里的两条重链有不同的特异性(Millstein 和 Cuello, Nature 305, 537-539(1983))。根据一个不同且更优选的方法,有所需结合特异性的抗体可变区(抗体-抗原结合位点)被融合到免疫球蛋白恒定区序列上。最好是和含有至少部分铰链区、CH2 和 CH3 区的免疫球蛋白重链恒定区融合。优选在至少一个融合体中存在含有轻链结合所必需的位点的第一个重链恒定区(CH1)。编码免疫球蛋白重链融合体的 DNA,如果需要的话,免疫球蛋白轻链被插入独立表达的载体并共转染入合适的宿主生物中。当用于构建比例不等的三种多肽链提供了最佳产量时,这为调节实施例中的三种多肽片段的相互比例提供了很大的灵活性。然而,当至少两种多肽链以等比例表达导致高产量,或当这些比例不是特别重要时,也可以在一种表达载体中插入两种或三种多肽链的编码序列。

对于产生双特异性抗体的进一步细节，可以参阅，例如，Suresh 等，Methods in Enzymology 121, 210(1986)。

异缀合抗体也包括在本发明的范围之内。异缀合抗体由两个共价结合的抗体组成。建议这种抗体(例如)将免疫系统的细胞靶向不想要的细胞(美国专利 4,676,980 号)以及治疗 HIV 感染(PCT 申请公布第 WO 91/00360 和 WO 92/200373 号；欧洲专利 03089 号)。可以用任何方便的交联法制备异缀合抗体。合适的交联法在本领域中是已知的，且在美国专利 4,676,980 号中公开了许多交联技术。

抗体片段通常是通过蛋白酶解消化完整的抗体得到的(参阅，例如，Morimoto 等，*J. Biochem. Biophys. Methods* 24:107-117(1992) 和 Brennan 等，*Science* 229:81(1985))。然而，现在可以直接通过重组宿主细胞生产这些片段。例如，Fab'-SH 片段可以从大肠杆菌中直接回收并化学偶联形成 F(ab')₂ 片段(Carter 等，*Biol/Technology* 10:163-167(1992))。另一实施例中，F(ab')₂ 片段是用亮氨酸拉链 GCN4 促进 F(ab')₂ 分子的组装而形成的。根据另一种方法，可以从重组宿主细胞培养物中直接分离 Fv、Fab 或 F(ab')₂ 片段。其它生产抗体片段的方法对于熟练的技术人员是显见的。

在本发明的某些实施例中可能需要修饰抗体片段以增加其血清半衰期。例如，这可以通过将补救受体结合的抗原表位掺入到抗体片段中实现(例如，通过突变抗体片段中合适的区域，或在肽标记物中掺入抗原表位，然后再(例如)通过 DNA 或肽合成，将标记物融合到抗体片段的任一端或中间)。参见公布于 1996 年 10 月 17 日的 WO 96/32478。

补救受体结合的抗原表位通常含有一个区域，其中 Fc 域的一个或两个环上的任何一个或多个氨基酸残基被转移到抗体片段的类似位置上。更优选的是，Fc 域的一个或两个环上的三个或更多的残基被转移。再优选的是，抗原表位取自 Fc 区(如来自 IgG)的 CH2 域并被转移到抗体的 CH1、CH3 或 V_H 区或多个这种区域。或者，抗原表位取自 Fc 区的 CH2 域并被转移到抗体的 C_L 区或 V_L 区，或这两个区。

通过编码 DNA 中引入合适的核苷酸改变或通过肽合成制备抗 NGF 抗体的氨基酸序列变体，包括取代、插入和/或缺失变体。制造这些变体的方法在此领域是熟知的，包括，例如，Cunningham 和 Wells 在 *Science*, 244:1081-1085(1989) 中所描述的“丙氨酸扫描诱变”。特定类型的抗体的氨基酸变体可改变该抗体的原始糖基化模式。改变意味着删除该抗体中发现的一个或多个糖类部分，和/或加入一个或多个该抗体中不存在的糖基化位点。

筛选具有所需特性的抗体

用于本发明的抗体可中和 NGF 的活性。因此,例如,本发明的中和抗 NGF 抗体可通过将候选抗体和 NGF 一起培养并监测结合和 NGF 的生物活性的中和作用来鉴定。结合测定可用纯化的 NGF 多肽进行,或用天然表达 NGF 多肽或转染表达 NGF 多肽的细胞进行。在一个实施方案中,结合测定是竞争性结合测定,其中评价了候选抗体与已知的抗 NGF 抗体竞争结合 NGF 的能力。该测定可用各种方式进行,包括 ELISA。

候选抗体中和 NGF 的生物活性的能力可通过,例如,监测候选抗体抑制 NGF 介导的胚胎大鼠背根神经节存活生物测定中存活的能力来进行,这一过程如 Hongo 等所述(Hybridoma 19:215-227(2000))。

为筛选与 NGF(由感兴趣的抗体结合)上的表位结合的抗体,进行了常规的交叉封闭测定(cross-blocking assay),这一方法描述在《抗体实验室手册》(*Antibodies, A Laboratory Manual*), Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow 和 David Lane 编(1988)。或者,或此外,还可使用此领域已知的方法进行表位作图。例如,可通过 Fendly 等在 *Cancer Research* 50:1550-1558(1990)中描述的竞争性结合分析法来确定被本发明的单克隆抗体结合的 NGF 表位。交叉封闭研究可在完整细胞上通过直接荧光进行,用 PANDEX™筛选机来量化荧光。在该方法中用已经建立的方法(Wofsy 等,《细胞免疫的选择方法》(*Selected Methods in Cellular Immunology*)第 287 页, Mishel 和 Schiigi 编,旧金山, W. J. Freeman 公司(1980))使单克隆抗体与异硫氰酸荧光素(FITC)偶联。将悬液中的 NGF 表达细胞和纯化的单克隆抗体加到 PANDEX™平板的孔中并培育,并用 PANDEX™量化荧光。与不相关的单克隆抗体对照相比,如果每个单克隆抗体以 50%或更大比例阻止其它抗体的结合,则单克隆抗体被认为共享这一表位。

也可用组合文库来鉴定用于本发明的抗 NGF 抗体以筛选具有所需活性的合成抗体克隆。这种方法是此领域熟知的。简言之,可用含有噬菌体的筛选噬菌体文库来选择合成的抗体克隆以展示融合到噬菌体外被蛋白上的抗体可变区(Fv)的各种片段(如 Fab、F(ab')₂等)。这种噬菌体文库用抗所需抗原的亲合层析显示。能够结合所需抗原的表达 Fv 片段的克隆被吸附到抗原上,因此从文库中未结合的克隆中分离。然后将结合的克隆从抗原中洗脱,并可通过额外的抗原吸附/洗脱循环进一步富集。为得到用于本发明的合适的抗 NGF 抗体,可设计合适的抗原筛选程序以选择感兴趣的噬菌体克隆,然后用来自感兴趣的噬菌体克隆的 Fv 序列和合适

的恒定区(Fc)序列构建全长的抗 NGF 抗体。

在基于细胞的生物测定中获得结果然后可在动物(如鼠类)模型和人临床试验中试验。重要的话,具有所需特性的鼠单克隆抗体可被转化成嵌合抗体,或用此领域熟知的技术将其转化成人源化抗体,包括美国专利 5,821,337 中所述的“基因转化诱变”方法。

C. 药物制剂

用于本发明抗体的治疗制剂是为储存制备的,方法是將有所需纯度的抗体和任选的药學上可接受的载体、赋形剂或稳定剂《Remington 制药科学》第 16 版, Osol, A. 编(1980))混合,制成冻干制剂或水溶液的形式。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在用药剂量和浓度对受体是无毒的,并且包括像磷酸盐、柠檬酸盐和其它无机盐之类的缓冲液;抗氧化剂包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化己烷双胺;苯扎氯、氯化苄乙氧铵;酚、丁基或苄基醇;烷基对羟基苯甲酸酯类,如甲基或丙基对羟基苯甲酸酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇和间甲酚);低分子量(小于约 10 个残基)多肽类;蛋白质类,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸类,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、双糖和包括葡萄糖、甘露糖或糊精在内的其它碳水化合物;螯合剂,如 EDTA;糖类,如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨醇;形成盐的反荷离子,如钠离子;金属复合物(例如,锌-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂,如 TWEEN、普朗尼克或聚乙二醇(PEG)。

本发明方法中使用的中和抗 NGF 抗体还可以制成免疫脂质体。含有抗体的脂质体是用这一领域中已知的方法制备的,比如在 Epstein 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688(1985); Hwang 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4030(1980); 和美国专利 4,485,045 和 4,544,545 号中描述的方法。具有提高循环时间的脂质体公开在美国专利 5,013,556 号中。

特别有用的脂质体可以和含有磷酸酰胆碱、胆固醇和 PEG 衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质成分用反相蒸发法产生。脂质体是通过有规定孔径的滤膜挤出以产生具有所需直径的脂质体。如 Marin 等, *J. Biol. Chem.* 257:286-288(1982)中所描述的,本发明抗体的 Fab' 片段通过二硫化物交换反应可以和脂质体偶联。脂质体中任选地含有一种化学治疗剂(比如阿霉素)。参阅 Gabizon 等, *J. National Cancer Inst.* 81(19):1484(1989)。

这种活性成分可以包载在微胶囊中,例如,可以通过凝聚技术或通过界面聚合作用制备微胶囊,例如,胶体药物传递系统(例如,脂质体、白蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)或大乳剂中分别有羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚(甲基异丁烯酸脂)微胶囊。此类技术描述在《Remington 制药科学》第16版,Osol, A. 编(1980)中。

可以制备缓释制剂。缓释制剂的合适的例子包括含有抗体的固态疏水聚合物的半透基质,这些基质呈成型物体的形式,如薄膜或微胶囊。缓释基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如,聚(2-羟乙基-异丁烯酸脂)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利 3,773,919 号)、L-谷氨酸和乙基-L-谷氨酸盐的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物如 Lupron Depot™(由乳酸-乙醇酸共聚物和乙酸亮丙瑞林组成的可注射的微球体)以及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

这里的制剂还可含有一种以上的活性成分,这种活性成分是特定的治疗适应症所必需的,优选相互之间没有副作用的具有互补活性的化合物。

例如,还可提供与 NGF 的不同表位或一种制剂中的 NGF 受体结合的抗体。或者,或此外,所述组合物还可含有其它生物活性化合物,如消炎剂。这种分子以适当的对所需目的有效的量组合存在。

用于体内用药的制剂必须是无菌的。这可简单地通过,例如,通过无菌滤膜过滤实现。

用于治疗的抗 NGF 抗体组合物通常被置于具有无菌出口的容器中,例如,静脉溶液袋(intravenous solution bag)或小瓶,它具有一个可被皮下注射针头穿过的塞子。

D. 用抗 NGF 抗体治疗

根据本发明,估计可以用抗 NGF 抗体来治疗各种疾病或病症。这些疾患或疾病的例子包括哮喘、银屑病和关节炎。所述抗 NGF 抗体可用来预防疾病状态的发生,治疗目前出现的症状和治疗处于潜伏期的疾病。

尽管对控制过敏反应和改进治疗的细胞和分子机制有了更深的了解,过敏性疾病,尤其是哮喘的发生率近年来急剧增加(Beasley 等, *J. Allergy Clin. Immunol.* 105:466-472(2000); Peat 和 Li, *J. Allergy Clin. Immunol.* 103:1-10(1999))。例如可以用基于变应原的疫苗接种来治疗过敏性疾病,其中,变应原的注射剂量逐年增加。大多数患者通常可通过吸入相对较低剂量的皮质类固醇来控制轻度哮喘,而中度哮喘通常需要再吸入长效 β -拮抗剂或白三烯抑制剂。然而,治疗严重

哮喘仍是严重的医学问题。尽管目前正在等待 FDA 批准的抗 IgE 抗体(rhuMAb-E25, XOLAIR™, 由 Genentech 公司、Tanox 公司和 Novartis 医药公司合作开发)有希望用于早期介入治疗导致过敏性哮喘和季节性过敏性鼻炎症状的病症,但仍需要开发其它控制过敏性疾病,如哮喘的治疗方法和治疗剂。

本发明的抗 NGF 抗体可用于治疗哮喘和其它与呼吸道过度反应性有关的病症,这些病症通常以咳嗽、哮喘、胸闷的发作和/或呼吸问题为特征。

本发明的抗 NGF 抗体还可用于控制其它炎性疾患,如多发性硬化、结肠炎、炎性肠病、膀胱炎、湿疹、接触性皮炎、关节炎(包括慢性关节炎和类风湿性关节炎)、克罗恩氏病和银屑病。

此外,抗 NGF 抗体还可用于治疗其它可能与升高的 NGF 水平有关的疾病,例如包括红斑狼疮、带状疱疹、带状疱疹后神经痛、痛觉过敏和慢性疼痛。

所述抗 NGF 抗体施用于哺乳动物,优选是人患者,按照已知的方法,如静脉注射,例如推注或在一段时期内连续灌输;通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑液内、鞘内、口服或局部途径施用。也可通过吸入给予抗 NGF 抗体。市场上可买到的雾化器用于液体制剂,包括喷雾式雾化器和超声雾化器来给药。液体制剂可被直接雾化,冻干粉末可在重建后雾化。或者,可用氟碳制剂和定量吸入器将抗 NGF 抗体分散雾化,或将其作为冻干并研磨的粉末吸入。

为治疗哮喘和其它以呼吸道过度反应性为特征的疾患,优选的施用途径是吸入。

在施用抗 NGF 抗体时可联合使用其它治疗方案。联合用药包括使用单独制剂或单一药物制剂的共施用(co-administration),和连续施用,连续施用可以任何顺序进行,其中优选在一段时间内两种(或所有)活性剂同时发挥其生物活性。为治疗哮喘,将这里的抗体和抗 IgE 抗体,尤其是 rhuMAb-E25(Xolair™),或者和第二代抗体分子 rhuMAb-E26(Genentech 公司)联合使用特别有利。rhuMAb-E25 抗体是一种重组型人源化抗 IgE 单克隆抗体,它被用于过敏早期干涉过敏性过程。联合使用还包括以下可能性,即在一种药物制剂中使用两种抗体,或使用具有抗 NGF 和抗 IgE 特异性的双特异性抗体。在另一个优选的实施方案中,将这里的抗 NGF 抗体和吸入的皮质类固醇(如丙酸倍氯米松(BDP))治疗联合施用。为治疗类风湿性关节炎或克罗恩氏病,本发明的抗体可以和其它已知治疗这些疾患的治疗方案联合施用。例如,这里的抗 NGF 抗体可以和 Remicade®(Infliximab, Centocor)或 Enbrel®(Etanercept, Wyeth-Ayerst)联合施用。本发明还包括靶向这些疾病的

双特异性抗体。例如，双特异性抗体可包括与本文所述抗体的 NGF 结合能力结合的抗 TNF 特异性。

任何上述共施用试剂的合适剂量就是目前使用的剂量，并且由于试剂和抗 NGF 抗体的联合作用(协同作用)且剂量可以略低。

为预防或治疗疾病，抗 NGF 抗体的适当剂量取决于所用的抗 NGF 抗体、待治疗的疾病类型、该疾病的严重程度和过程，无论所述抗体是出于预防或治疗目的而施用的，以前的治疗、病从的临床史和对抗体的反应以及主治医生的判断。通常，临床医生会给予抗 NGF 抗体直到能获得所需结果的剂量。

所述抗 NGF 抗体是同时或在一系列治疗时适当地给予患者的。

根据疾病的类型和严重程度，给予患者的初始备选剂量约为 2 mg/kg 抗体，例如，可以一次给予或多次单独给予，或给予连续剂量或重复剂量。常规的日剂量约为 1 g/kg - 100 mg/kg 或更多，这取决于上述因素。为在数天或更长时间内重复给药，根据疾患，所述治疗可持续直至疾病症状得到所需的控制。优选的剂量方案包括最初给予的抗 NGF 抗体的剂量约为 2 mg/kg，然后每周给予维持剂量约 1 mg/kg 的抗 NGF 抗体。然而，其它剂量方案也是有效的，这取决于医生所希望达到的药代动力学衰变模式。这种治疗进展容易通过常规的技术和测定方法监控。

E. 制造产品

在本发明的另一个实施方案中，提供了一种制造产品，它含有用于治疗上述病症的物质。所述制造产品包括容器以及位于容器上或与容器相连的标签或药品说明书。合适的容器包括，例如，瓶子、小瓶、针筒等。所述容器可由各种材料制成，如玻璃或塑料。所述容器中装有一种可有效治疗上述疾患的组合物，并具有一无菌出口(例如，所述容器可以是静脉溶液袋或小瓶，它具有一个可被皮下注射针头穿过的盖子)。

所述组合物中至少一种活性剂是抗 NGF 抗体。所述容器中还可有第二种药物活性剂。第二种药剂优选适合治疗炎性疾病，如哮喘，多发性硬化，关节炎，红斑狼疮和银屑病。

标签或药品说明书指出所述组合物是用来治疗特定疾患的，如炎性疾患。在一个实施方案中，标签或药品说明书指出所述含有结合 NGF 的抗体的组合物用来治疗选自哮喘，多发性硬化，关节炎，红斑狼疮和银屑病的炎性疾患。此外，所述标签或药品说明书可指出被治疗的患者患有哮喘，银屑病，关节炎或其它疾病或病症。此外，所述制造产品可包括，(a)其中含有组合物的第一个容器，其中

所述组合物可包含结合 NGF 并抑制其生物活性的第一抗体；和(b)其中含有组合物的第二个容器，其中所述组合物包含结合 NGF 受体并阻断配体活化的第二抗体。本发明实施例中的制造产品还可包括药品说明书，它指明第一种和第二种组合物可用来治疗哮喘，银屑病，关节炎或其它疾病或病症。或者，或此外，所述制造产品还可包含第二个(或第三个)容器，其中含有药学上可接受的缓冲液，如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸缓冲盐溶液、林格溶液或葡萄糖溶液。还可包含从商业和用户角度所需的其它物质，包括其它缓冲液、稀释剂、滤器、针头和针筒。

在以下非限制性实施方案中将进一步说明本发明的细节。

实施例

除非另有说明，实施例中提到的市售的试剂按制造商的说明书使用。细胞的来源在以下实施例中确定，在整个说明书中 ATCC 登记号是指位于弗吉尼亚州马纳萨斯的美国模式培养物保藏中心。

实施例 1

抗 NGF 单克隆抗体的生产和鉴定

A. 抗 NGF 单克隆抗体的生产

该实施例描述了可特异性结合人 NGF (hNGF) 的单克隆抗体的制备。

生产单克隆抗体的技术是此领域熟知的，例如，它描述在 Kohler 和 Milstein, *Nature* 256:495-497(1975)。实施例 1 和 2 所描述的试验也描述在 Hongo 等, *Hybridoma* 19:215-227。

用与 Hongo 等在 *Hybridoma* 14:253-260 中描述的方法类似的方法建立一组由 23 只小鼠组成的抗 hNGF 单克隆抗体。简言之，用溶于 Ribi 佐剂(Ribi Immunochem Research 公司, Hamilton, MO)的人 NGF 免疫 Balb/c 小鼠(Charles River 实验室, Wilmington, DE)。小鼠的脾细胞证实了抗体对固定化 NGF 的最高滴度，将它们与小鼠的骨髓瘤细胞融合(X63. Ag8. 653; 美国模式培养物保藏中心，洛克维尔，马里兰州)。10-14 天后，收获上清液并通过酶联免疫吸附测定(ELISA)筛选抗体。将第二轮克隆后显示最高免疫活性的克隆注射到降植烷致敏的小鼠(Hoogenraad 等, *J. Immunol. Methods* 6:317-320(1983))以在体内生产 MAbs。收集腹水液并用建立的方法(Moks 等, *Eur. J. Biochem.* 85:1205-1210(1986))在葡萄球菌蛋白 A(Pharmacia)上通过亲和层析(Pharmacia fast protein liquid chromatography; Pharmacia, Uppsala, Sweden)纯化。纯化的抗体制品通过无菌过滤并于 4℃ 在磷

酸缓冲盐溶液(PBS)中保存。

B. 用结构域交换突变体进行表位作图

最初通过评价 MAb 对通过同源物扫描诱变产生的 NGF/神经营养蛋白-3 (NT-3) 嵌合蛋白的结合来确定抗 NGF MAb 表位特异性。用这种结构域交换突变体明显优于缺失突变体。域的缺失可能会破坏蛋白质的二级结构,而在域交换突变体中,用来自相关蛋白质的大小类似且氨基酸序列大致相似的相应域替代某一域则可能保留二级结构。

用导向寡核苷酸的诱变产生 8 个 hNGF/hNT-3 嵌合突变体,所述突变体在 hNGF 相应的可变区中包含 3-7 个人 NT-3 (hNT-3) 的残基取代(图 1)。所述嵌合突变体在人 293 细胞中短暂表达,并通过酶联免疫吸附测定(ELISA)评价抗 hNGF MAb 与突变型 NGF 的结合,如下所述,将纯化的 MAb 作为捕获抗体并用与 HRP 偶联的亲合纯化的兔抗 hNGF 多克隆抗体进行检测。进行 2-4 独立的定量 ELISA 以测定抗 hNGF MAb 与各种 NGF 突变体的结合,并将其与野生型 NGF 的结合进行比较。

简言之,用每孔 100 μ L 1 μ g/ml 羊抗鼠 IgG (Boehringer-Mannheim, 印第安纳波利斯, 印第安纳州) 涂布微量滴定板 (Nunc Maxisorb, VWR Scientific, 旧金山, 加利福尼亚州), 在 4 $^{\circ}$ C 过夜, 洗涤, 并用含有 0.05% Tween 20 和 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA, Intergen, 圣迭戈, 加利福尼亚州; PBS/BSA/T20) 的 PBS 封闭多余的结合位点。在适当的孔中加入 MAb (在 PBS/BSA/T20 中稀释至 1 μ g/mL) 并在室温下培育 1-2 小时。洗涤平板, 加入 100 μ L 野生型或突变型 hNGF (在 PBS/BSA/T20 中稀释至 60 ng/mL 7.8 ng/mL), 在室温下培育 1-2 小时并再次洗涤。加入与辣根过氧化物酶 (HRP; 1:10,000, 存在于 PBS/BSA/T20) 偶联的纯化的兔抗 hNGF 多克隆抗体 (100 μ L/孔) 并培育 1 小时。这样就建立了平板, 在双波长上阅读。在相同的条件下 MAb 与 hNGF 突变体的结合与野生型 hNGF 结合比较 (设定为 100%)。

6 种人抗 NGF 单克隆抗体 (MAb 908, 909, 911, 912, 938 和 14.14) 证明对 hNGF 具有高亲和力 (MAb 908, MAb 909, MAb 911, MAb 912, MAb 938 和 MAb 14.14 的 EC₅₀ 分别为 0.18 nM, 0.18 nM, 0.37 nM, 0.18 nM, 0.74 nM 和 0.59 nM), 并选择与各种嵌合突变体的结合降低了 60-90% 以上的单克隆抗体 (图 1) 作进一步的分析。如图 1 所示, 3 种 MAb (908, 909 和 14.14) 显示了明显的区域结合特异性, 其特征为与单个可变区的最大结合损失了 60-95% (图 1)。在 MAb 911、912 和 938 上观察到了可变区突变的较少的惊人的作用, 有多个 NGF 可变区有助于这些抗体的结合表位。然而, 包含这些表位的可变区在三维结构内靠近 (图 3A)。

C. 用定点诱变进行表位作图

为进一步确定对所选 6 种抗 NGF MAb 的表位特异性, 产生了代表一个、两个或三个氨基酸点突变的 NGF 突变体, 表达和表征了这些突变体, 特别关注上述区域中在 TrkA 和 p75 结合和生物功能中发挥作用的残基(Shih 等, *J. Biol. Chem.*, 269(44):27679-27686(1994))。用上述 ELISA 鉴定这些突变对抗 NGF MAb 结合的作用。用 ELISA 结合曲线计算抗 NGF MAb 与各个突变体结合的平均 EC_{50} 值, 并将该值与用野生型 NGF 结合所得 EC_{50} 值进行比较(图 2A-F)。

用所有 6 种 MAb, hNGF 点突变体的结合特异性通常与以前鉴别的区域有关, 这些区域是通过与特异性 NGF 嵌合突变体的结合损失鉴定的。然而, NGF 点突变体对 MAb 911 和 938 结合的作用相对于在其它 MAb 上观察到的作用并不显著(图 2A-F)。所述突变作用的区域特异性与 NGF 嵌合突变体中发生交换的可变区内或该区域附近的残基有关, 这导致 MAb 911 或 938 的最大结合损失了 50-60%以上。对 MAb 911, 这些突变包括 K32A+K34A+E35A, Y79A+T81K, H84A+K88A 和 R103A。在突变 E11A, Y52A 和 L112A+S113A 附近观察到了其它结合的损失(图 2C)。这说明 MAb 911 的表位跨越了 7 个 hNGF 可变区中的 4 个(图 3C)。

D. 用 MAb 结合表位的结构依赖性

为确定抗 NGF MAb 与 hNGF 的结合是否取决于 hNGF 上表位的结构构象, 评价了抗 NGF MAb 与非还原形式和还原形式 hNGF 的结合。将未处理的 hNGF 和用巯基乙醇处理还原的 hNGF 进行凝胶电泳并转移到硝化纤维印迹上以进行免疫印迹分析。为检测 hNGF, 洗涤硝化纤维印迹并将其和第一抗体和第二抗体一起培育, 室温下与鲁米诺底物(Amersham International, Amersham, U.K.)边搅拌边暴露 1 分钟, 然后对 x-射线胶片(Eastman Kodak, Rochester, NY)曝光 10-45 秒钟。在图 4 中可以看到, 一些单克隆抗 NGF 抗体对还原形式的 hNGF 有最小结合。这些抗体包括 MAb 938, 908, 911 和 912, 这说明它们结合的 hNGF 上的表位在结构上受到电荷改变和还原作用的影响。

E. 抗 NGF 单克隆抗体上表位的分子建模

鉴定的抗 NGF MAb 表位的分子建模表示法(图 3A-F)是用 MidasPlus 程序(加州大学旧金山分校, 旧金山, 加利福尼亚州)产生的, 并基于上述鼠 NGF 的三维结构坐标(McDonald 等, *Nature*, 354:411-414(1991))。

图 5 总结了 MAb 的表位作图结果。

修改到此处

实施例 2

确定抗 NGF 单克隆抗体的中和活性

观察到一些定位于上述区域的表位在 NGF 和 TrkA 和/或 p75 相互反应时的重要性, 这说明相应的 MAb 可能还会阻断这些相互反应之一或这两者。

A. ^{125}I -hNGF 结合测定

为评价一种或多种抗 NGF MAb 阻断 NGF 与 TrkA 和/或 p75 结合的可能性, 在抗 NGF 单克隆抗体存在时测量了 ^{125}I -hNGF 与 TrkA IgG 受体免疫粘附素的结合。

简言之, ^{125}I -hNGF 是用改进的可溶性乳过氧化物酶方法制备的, 该方法最初由 Marchalonis 描述(Marchalonis, *Biochem J.*, 113:299-305(1969))。将最终的反应混合物在 pD-10 Sephadex G-25 尺寸排阻柱(Pharmacia, Uppsala, Sweden)上分级分离并于 4°C 保存。用纯化的兔抗人 IgG-Fc 特异多克隆抗体(在碳酸盐缓冲液中稀释至 2 g/ml)涂布微量滴定板(Nunc, Maxisorb), 在 4°C 过夜, 用 PBS 洗涤并用 150 L PBS/0.5% BSA(PBS/BSA)封闭。加入溶于 PBS/BSA 的人 TrkA IgG 或 p75-IgG 免疫粘附素(由 Robert Pitti 惠赠)(20 ng/mL)(100 L)并在室温下培育 1 小时。然后加入稀释于 PBS/BSA 的 hNGF(最终浓度为 150 pM)(100 L)并在室温下培育 1 小时。平行加入 hNGF(最终浓度为 150 pM)并按上述方法培育, 所述 hNGF 已在 4°C 和抗 NGF 单克隆抗体(667 nM 0.58 nM)或不针对 NGF 的非相关单克隆抗体一起预培育过夜。用含有 0.05% T20 的 PBS 洗涤平板, 在 γ -计数器(Packard Cobra 5010 型, Downers Grove, IL)上对每个孔计数 1 分钟。

如图 6 所见, 所述抗 NGF 单克隆抗体抑制 hNGF 与 TrkA-IgG 受体免疫粘附素结合, 如与 TrkA-IgG 结合的 ^{125}I 标记的 hNGF 水平所测。在最高测试浓度时(667nM)所有 MAb 都显示阻断能力, 但在低浓度时阻断能力之间有差别。MAb 911, 912 和 938 显示相同的阻断效能(IC_{50} 约 0.5-2 nM), 在 10 nM MAb 或更高浓度时看到 80-90% 的抑制。

在上述结合测定中, 用 p75-IgG 评价了 MAb 抑制 hNGF 与低亲和性 p75 受体结合的能力。如图 7 所示, 采用 ^{125}I 标记的 hNGF 可见, 抗 hNGF MAb 抑制 hNGF 与 p75-IgG 受体免疫粘附素结合。少于 1 nM 的 MAb 存在时观察到 MAb 911, 912 和 938 有使结合减少 75-90% 的最高抑制活性。MAb 909 也显示了强的阻断能力(10 nM MAb 时 > 90% 抑制), 而 MAb 908 和 14.14 的阻断活性明显不太强(图 7)。

B. 激酶诱导的受体活化(KIRA)测定

用激酶诱导的受体活化(KIRA)测定来测量转染细胞中响应配体(如 hNGF)和/

或激动剂单克隆抗体刺激的依赖于 NGF 的 TrkA 的自身磷酸化 (Sadick 等, *Exp. Cell Res.* 234:354-361 (1997))。评价抗 NGF MAb 抑制 hNGF 与 CHO 转染细胞上表达的 TrkA 胞外域结合的能力以及随后 TrkA 上酪氨酸残基的磷酸化 (图 8)。用抗磷酸酪氨酸 MAb 通过 ELISA 测量酪氨酸残基的磷酸化。

用 1×10^5 个表达 TrkA 受体胞外域的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞和单纯性疱疹病毒糖蛋白 D 片段 (gD) (这是一种作为表位标记的由 26 个氨基酸构成的多肽) 涂布微量滴定板 (Costar, Cambridge, MA)。将仅有 hNGF (150 pM) 的样品 (作为阳性对照) 或 hNGF (终浓度为 150 pM) 样品在 4°C 和各个抗 NGF MAb (终浓度为 667 nM 0.31 nM) 一起预培育过夜, 然后将其加到含有表达 TrkA 的 CHO 细胞的孔中 (每孔 50 L) 并在 37°C 培育 25 分钟。将不抗 NGF 的非相关单克隆抗体作为阴性对照。然后用裂解缓冲液处理 hNGF-刺激的细胞, 在 gD-MAb-涂布的微量滴定板上处理裂解物, 以类似于 Sadick 等描述的方法 (Sadick 等, *Anal. Biochem.*, 235:207-214 (1996)) 通过 ELISA 检测含有 TrkA 的磷酸酪氨酸。将 100 I 生物素化的 4G10 (单克隆抗磷酸酪氨酸, 来自 Upstate Biologicals 公司 (UBI, Lake Placid, NY)) 用稀释缓冲液 (PBS, 含有 0.5% BSA、0.05% Tween 20、5 mM EDTA 和 0.01% 硫汞撒) 稀释至 0.2 mg/mL, 将其加到各个孔中。在室温下培育 2 小时后, 洗涤平板并在每个孔中加入 100 I 用稀释缓冲液按 1:50000 稀释的 HRP-偶联的链霉抗生物素蛋白 (Zymed 实验室, S. 旧金山, 加利福尼亚州)。将平板在室温下轻微搅拌培育 30 分钟。将游离的抗生物素蛋白偶联物洗去并在各个孔中加入 100 I 新鲜制备的底物溶液 (四甲基联苯胺, TMB, 二组分底物试剂盒, Kirkegard 和 Perry, Gaithersburg, MD)。反应进行 10 分钟, 然后在每个孔中加入 100 I 1.0 M H_3PO_4 以终止显色。用 Vmax 平板阅读器 (Molecular Devices, Palo Alto, 加利福尼亚州) 在 650nm 的参考波长读取 450nm 处的吸收值 ($A_{450/650}$), 该阅读器由 Macintosh Centris 650 (Apple Computers, Cupertino, 加利福尼亚州) 和 DELTASOFT 软件 (BioMetallics 公司, Princeton, 新泽西州) 控制。

如图 8 所示, 所有选择的抗 NGF 单克隆抗体都抑制 hNGF 与 CHO 转染细胞上表达的 TrkA 胞外域的结合和 TrkA 受体的酪氨酸残基的磷酸化。在最低测试浓度 (0.3 nM), 用 MAb 911, 912 和 938 预培育 hNGF 使酪氨酸磷酸化与对照 MAb 相比最大抑制约为 60-80%。MAb 908, 909 和 14.14 不太有效。

C. 胚胎大鼠背根神经节存活生物测定

另一项用来确定抗 NGF 单克隆抗体对 NGF-依赖性过程的效果的测定是胚胎大

鼠 E14 背根神经节 (DRG) 存活生物测定。评价抗 NGF 单克隆抗体抑制胚胎大鼠背根神经节 (DRG) 神经元上 hNGF 存活效果的能力。(图 9)。

将获自 E15 大鼠 (6-8 个胚胎) 的背根神经节 (DRG) 神经元培养在 F12 培养基中, 其中含有添加物 (McMahon 等, *Nat. Med.* 8:774-780 (1995)) 和 3 ng/mL hNGF, 有或没有抗 NGF 单克隆抗体。在 37°C 培养 72 小时后细胞用甲醛固定并对存活的神经元进行计数。

图 9 显示了抗 NGF 单克隆抗体对 DRG 神经元存活的抑制。MAb 908, 909 和 14.14 在最高浓度时 (67 nM; 10 g/ml) 使存活率仅降低了 20-30%, 而 MAb 911 和 912 抑制了 90% 以上的存活, 这是较低浓度 (0.8-2.4 nM; 0.12-0.37 g/ml) 的约 30-80 倍。MAb 938 也能以 90% 抑制存活活性, 但比 MAb 911 和 912 的效力低了 10-30 倍。

MAb 911 是 NGF/TrkA 反应最有效的阻断剂。MAb 911 识别一表位, 其中包含重叠 NGF-TrkA 和 p75 结合区-回转 A'-A'' (V-1) 和占优势的 TrkA 结合区 (图 3D)。第二种最强的 NGF/TrkA 抑制剂 MAb 912 识别残基 K32, K34 和 K35, 这是上面提到的对 NGF/p75 相互反应的重要区域。MAb 938, TrkA 和 p75 结合的另一个有效的阻断剂也识别对 TrkA 或 p75 结合的重要区域, N-末端和 C-末端。

所观察到的抗体阻断特异性的差异不是由于 MAb 和 hNGF 之间相对亲和力, 而是因为这三者中两个最有效的阻断抗体 (911 和 938) 对 NGF 的亲和力比较弱的阻断 MAb 要低。

对 MAb 911 和 912 结合重要的 NGF 区域与鉴定为对 TrkA 和 p75 结合的重要区域重叠。MAb 911 和 912 是 NGF 诱导活性的有效阻断剂, 这说明它们或许是体内活性的特异性拮抗剂, 如炎症痛觉过敏。

实施例 3

抗 NGF 对免疫应答的作用

在第 0 天用 10g 卵清蛋白通过皮下接种免疫小鼠, 然后使其愈合。在第 40 天再通过腹膜内 (IP) 对经过免疫的动物注射 10 mg/kg 抗 NGF 抗体 911 或对照物, 该对照物为同种型匹配的抗体。两天后对动物注射卵清蛋白。在第 47 天采集的血清样品上进行 ELISA 以测定免疫应答。如图 10 所示, 接受抗 NGF 抗体 911 的动物和接受对照抗体的动物在免疫应答上没有显著 ($p > 0.05$) 差异。然而, 在用抗 NGF 单克隆抗体处理的动物中有免疫应答增加的趋势, 但不明显。

相反, 图 11 显示用鸡 γ -球蛋白免疫接种后, 用抗 NGF 处理产生不明显的免

疫应答降低的趋势。在第 0 天用 10 g 鸡 γ -球蛋白免疫动物，并在第 40 天用抗 NGF 抗体 911 或对照物同种型匹配的抗体 (10 mg/kg IP) 处理。在第 42 天对动物注射 γ -球蛋白并在第 47 天取出血清样品并用 ELISA 进行分析。两组之间的免疫应答没有显著 ($p>0.05$) 差异。然而，在用抗 NGF 单克隆抗体 911 处理的动物中有免疫应答降低的趋势。

实施例 4

抗 NGF 单克隆抗体对痛觉过敏的作用

研究了抗 NGF 抗体对 NGF 诱导的热痛觉过敏的作用。简言之，在处理前用 Hargreave 试验训练成年 Fischer 雌性大鼠，每天两次，至少两天。当熟悉设备和方法后，将动物随机分成对照组和实验组。测试每组的基线响应，然后在异氟烷麻醉下通过足底内注射给予一只爪子 50 μ l 体积。各组的注射物中含有 1.25% 角叉胶和 90 μ g 抗 NGF 抗体或无关紧要的同种型匹配的对照抗体联合。

在注射后第 0、2、4、6 和 24 小时用 Hargreave 试验测量热缩回潜伏时间 (thermal withdrawal latency)。如图 12 所示，在处理第 4 和 6 小时，注射角叉胶后，热痛觉过敏在用抗 NGF 单克隆抗体 911 处理的动物中明显低于对照动物。

实施例 5

抗 NGF 单克隆抗体对变应原响应的作用

用单克隆抗 NGF 抗体 911 ($n=16$) 或同种型匹配的抗 gD 对照抗体 (1766 克隆; $n=16$) 处理雄性 C57/BL (Jackson 实验室)。在第 1 天，用 20 mg/kg 抗体处理动物，在第 6、13、20 和 22 天用 10 mg/kg 抗体处理它们。所有抗体处理是通过皮下注射进颈背。

在第 0 天和第 14 天将每组中一半的小鼠通过腹膜内注射 30 AU 尘螨抗原 (DMA; 用 Dulbecco's PBS 稀释，然后用 ALUM 作为佐剂以 1:2 稀释，使最终浓度为 300 AU/ml) 致敏 (SN)。非致敏小鼠 (NS) 接受等体积 Dulbecco's PBS，并用 ALUM 按 1:2 稀释作为对照。

然后在第 21 和 22 天用吸入的尘螨抗原 (DMA) 攻击小鼠。用 Dulbecco's PBS 加 0.01% Tween-20 将尘螨稀释至 6000 AU/ml 以供雾化。在 Plexiglas 饼式暴露室 (pie exposure chamber) 中施用所有吸入攻击。用 PARI IS-2 雾化器在 22 PSI 下驱动将 DMA 气雾化。雾化器中装有 3 ml 液体并在 30 分钟内输送完毕。输送到

肺部的总沉积剂量/暴露量约为 6.5AU DMA。

评定小鼠的呼吸道过度反应性、进入支气管肺泡灌洗(BAL)液的细胞浸润、BAL 中的细胞因子水平和抗尘螨的血清滴度以及血清 IgE 水平。简言之,在最后一次攻击后第 24, 48 小时将小鼠麻醉,将导管插入颈静脉并切开气管。然后用 0.28 mg/kg 泮库溴铵使小鼠瘫痪并加到 Plexiglas 流式体积描记器(flow plethysmograph)上测量胸膨胀和呼吸道压力。用 100%氧气以 170 bpm 的频率给小鼠通风, V_t 等于 9 l/g。用 Buxco XA 数据获取程序连续监控呼吸机制(肺阻力和动力顺应性)。给小鼠一定的体积规律(volume history)(5 次呼吸,以 $2.5 \times V_t$),使其稳定 2 分钟,然后测量基线,然后用 Harvard 注射泵和注射应用软件以按体重调节的流速一次给予 5 秒钟剂量的激动剂。

控制血液(血清)、BAL 和肺部。测定血清的总 IgE 和 IgG 以及特异性 IgE 和 IgG。通过三次注射相同等份的 NaCl 以获得 BAL,并通过 ELISA 测定总 IgE。由 BAL 细胞得到白血细胞总数和细胞微分。

用抗 NGF 单克隆抗体治疗使呼吸通过度反应性显著降低(图 13),以及通过进入 BAL 的细胞浸润测定炎症(图 14)。然而,在用抗 NGF 处理的动物中,BAL 中嗜伊红细胞的比例仍很高(图 15)。抗 NGF 抗体处理还降低了 BAL 中 Th2 细胞因子 IL-13 的水平(图 16)。

尽管降低对变应原的炎性反应的能力,抗 NGF 抗体处理没有降低对尘螨的体液免疫应答,这是用总血清免疫球蛋白滴度与尘螨的比值测得的(图 17)或用 IgE 的血清水平测得的(图 18)。这说明抗体会阻断 NGF 的生物效应,但不会影响 B-淋巴细胞存活或功能。

为证实抗 NGF 抗体 911 对 NGF 有明显的功能效应,进行了平行试验,其中在第 1 天和第 8 天在小鼠颈背皮下注射 0.1, 1 或 10 mg/kg 抗 NGF 单克隆抗体 911,或第 1、3、6 和 8 天注射 0.1, 1 或 10mg/kg NGF。在第 9 天杀死动物并测定三叉神经节中神经肽 CGRP 的水平。用 1 或 10 mg/kg NGF 处理使 CGRP 增加,这证明这种肽受 NGF 水平调节(图 19)。用 1 或 10 mg/kg 抗 NGF 单克隆抗体 911 处理使神经节中 CGRP 含量减少(图 19),这证明,在上述试验中,当免疫应答发生时,此剂量明显地在功能上封阻内源 NGF。

用同系物扫描诱变鉴定Mab结合区

突变体名称 ^a	引入的NGF→NT3突变 ^b	突变的区域 ^c	908 ^d	909	911	912	938	14.14
野生型	没有	N-末端	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
6	SIY, S2A, S3E, P5K, I6S, F7S		(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(++)	(-)
20	V18E, V20L, G23T	Pre-V-1 (β-片层 A)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(+++)
19	T26S, T27S, T29L, K32R, K34H, E35Q	V-1 (β-发夹转角 A'-A'')	(+/++)	(+++)	(++)	(+/++)	(++)	(+++)
12	V42I, N43K, I44T, N45G, V48P, F49V	V-2 (β-发夹转角 A'''-B)	(-)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
7	R59K, D60E, P61A, N62R, D65K, S66N	V-3 (β-回折 B-C)	(+++)	(-)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
16	Y79Q, T81K, T83S, H84Q, F86Y, K88R	V-4 (β-片层 C)	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	(+++)
8	M92S, D93E, G94N, +N94/95, Q96L, A97V, A98G	V-5 (β-发夹转角 C-D)	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)
23	A116I, V117G, R119T, R120(-)	C-末端	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+)	(+++)
表位区			V-2	V-3	V-1, V-4	V-1, V-5	C-末端	N-末端

^a 以制备的顺序确定突变体名称。^b 用hNT3的非同源残基代替hNGF的残基。基于残基(一个字母符号和位置数)的突变被紧接在指明的位置数后的残基代替。^c 突变hNGF的各个可变区以确定各个Mab的结合特异性。^d 6个Mab中的各个Mab对NGF/NT3同系物扫描突变体的相对结合与对野生型hNGF结合的Mab比较: (-), <10%; (+), 10-30%; (++) , 30-60%; (+++) , 60-100%。各个Mab对hNGF结合的 EC_{50} 是: Mab 908, 1.8×10^{-10} M; Mab 909, 1.8×10^{-10} M; Mab 911, 3.7×10^{-10} M; Mab 912, 1.8×10^{-10} M; Mab 938, 7.4×10^{-10} M; Mab 14.14, 5.9×10^{-10} M。

1

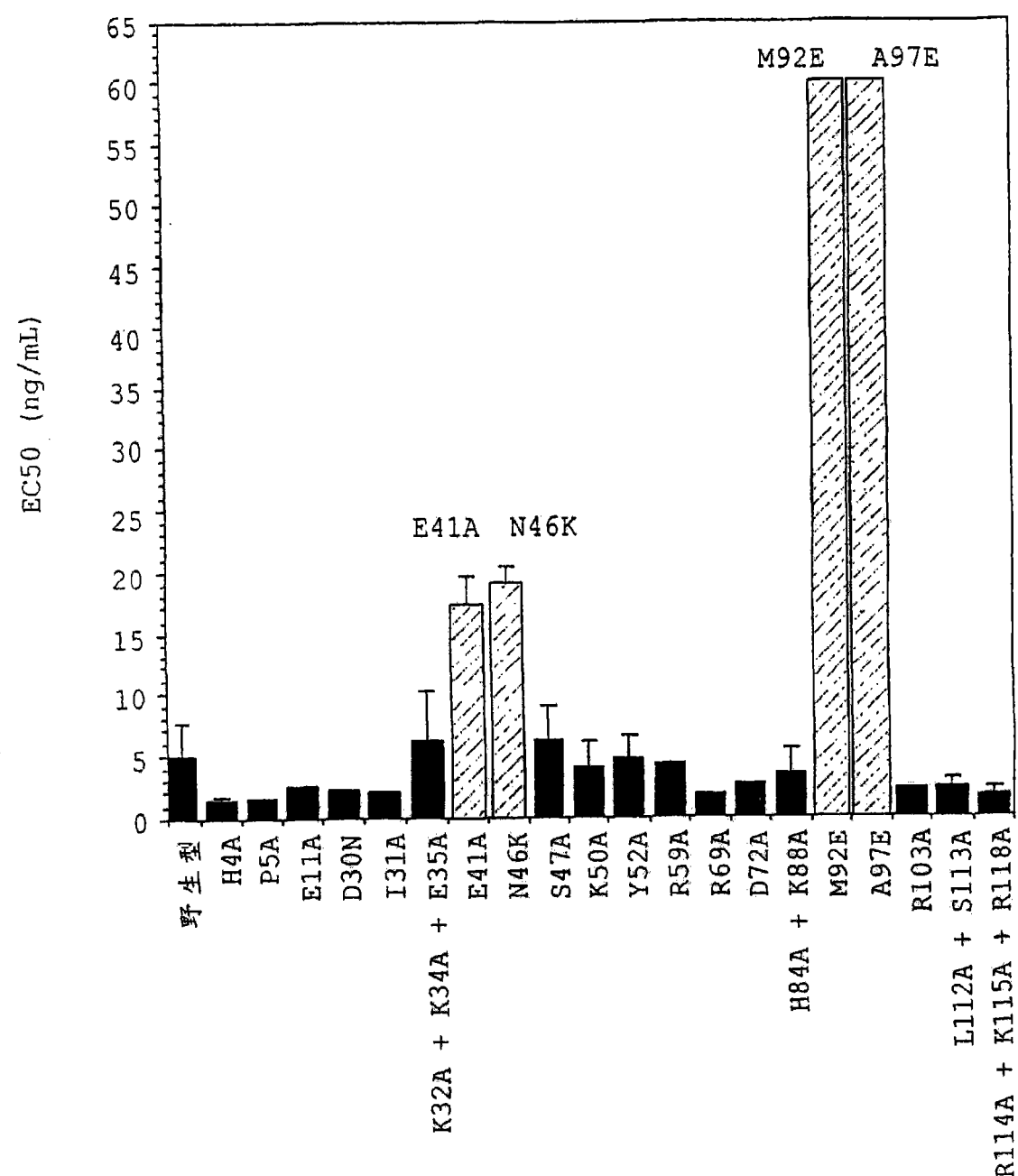


图 2A

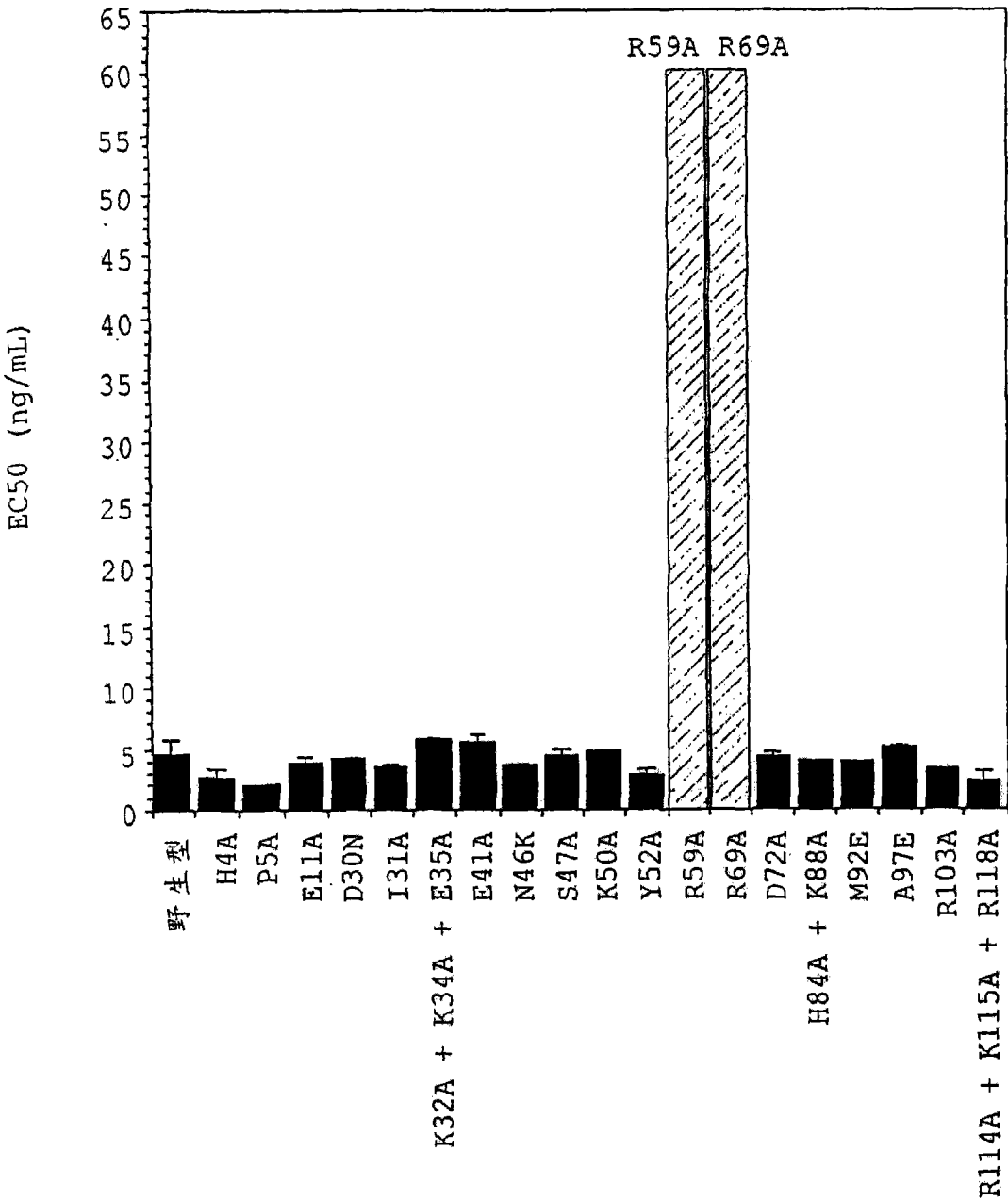


图 2B

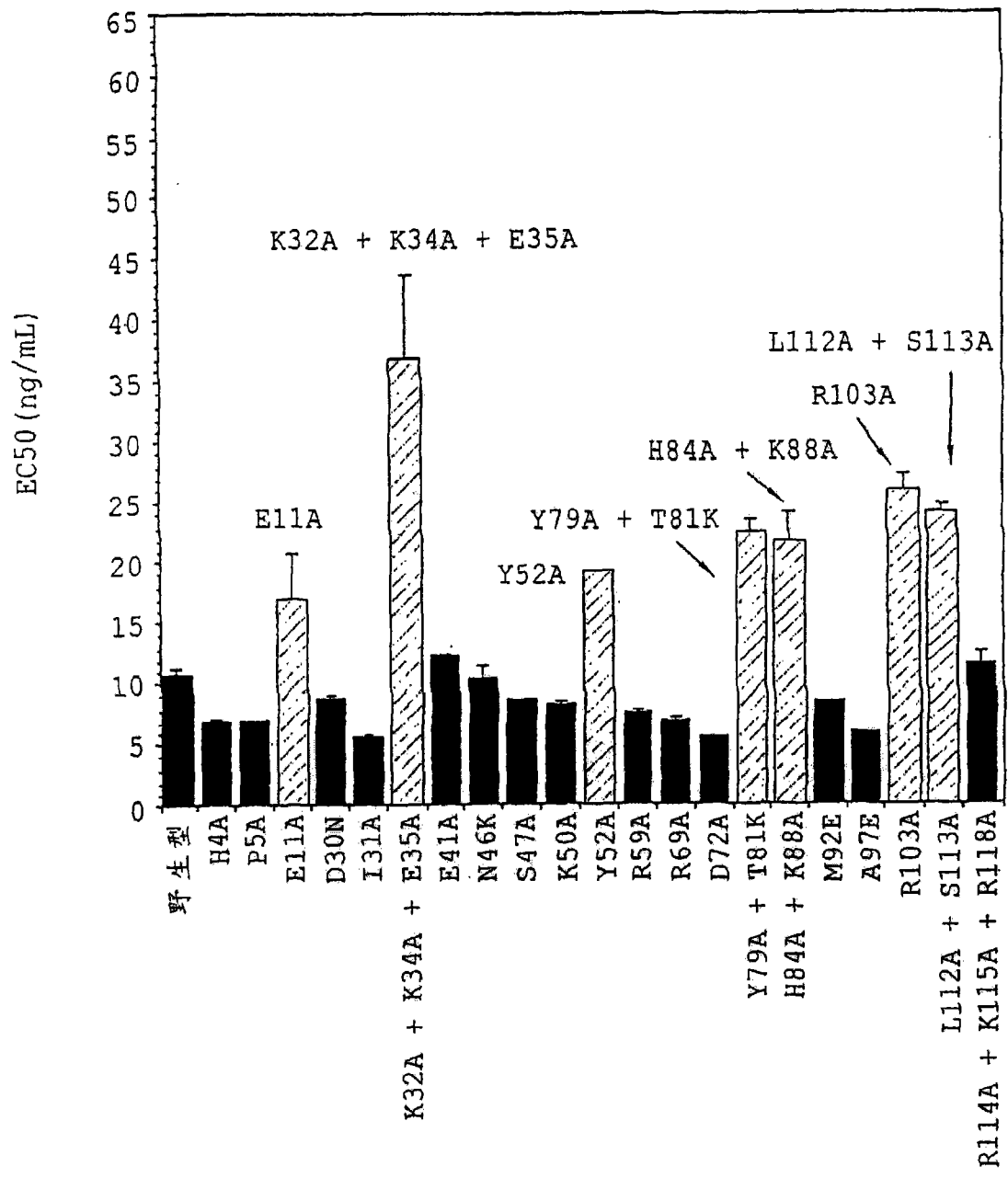


图 2C

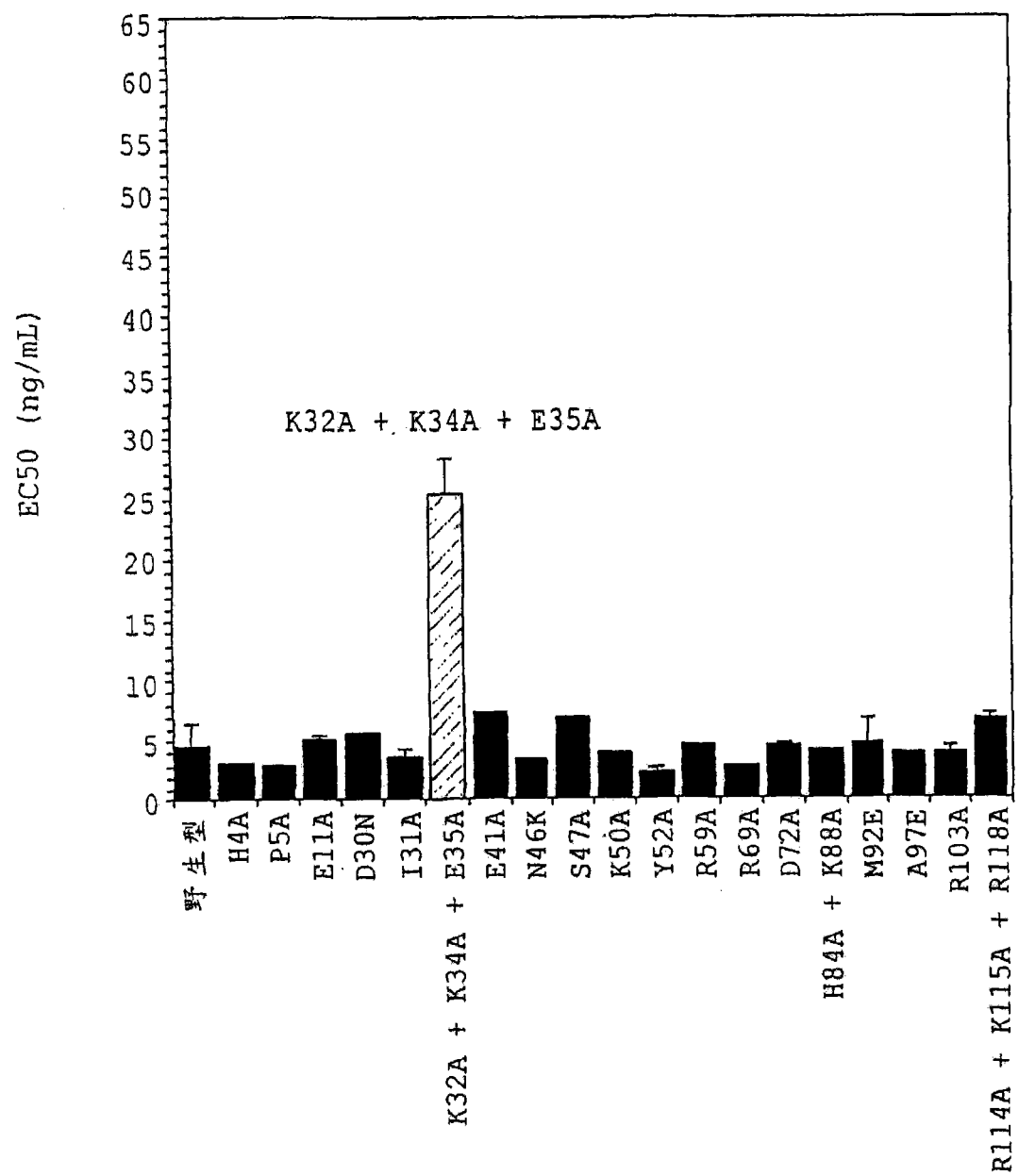


图 2D

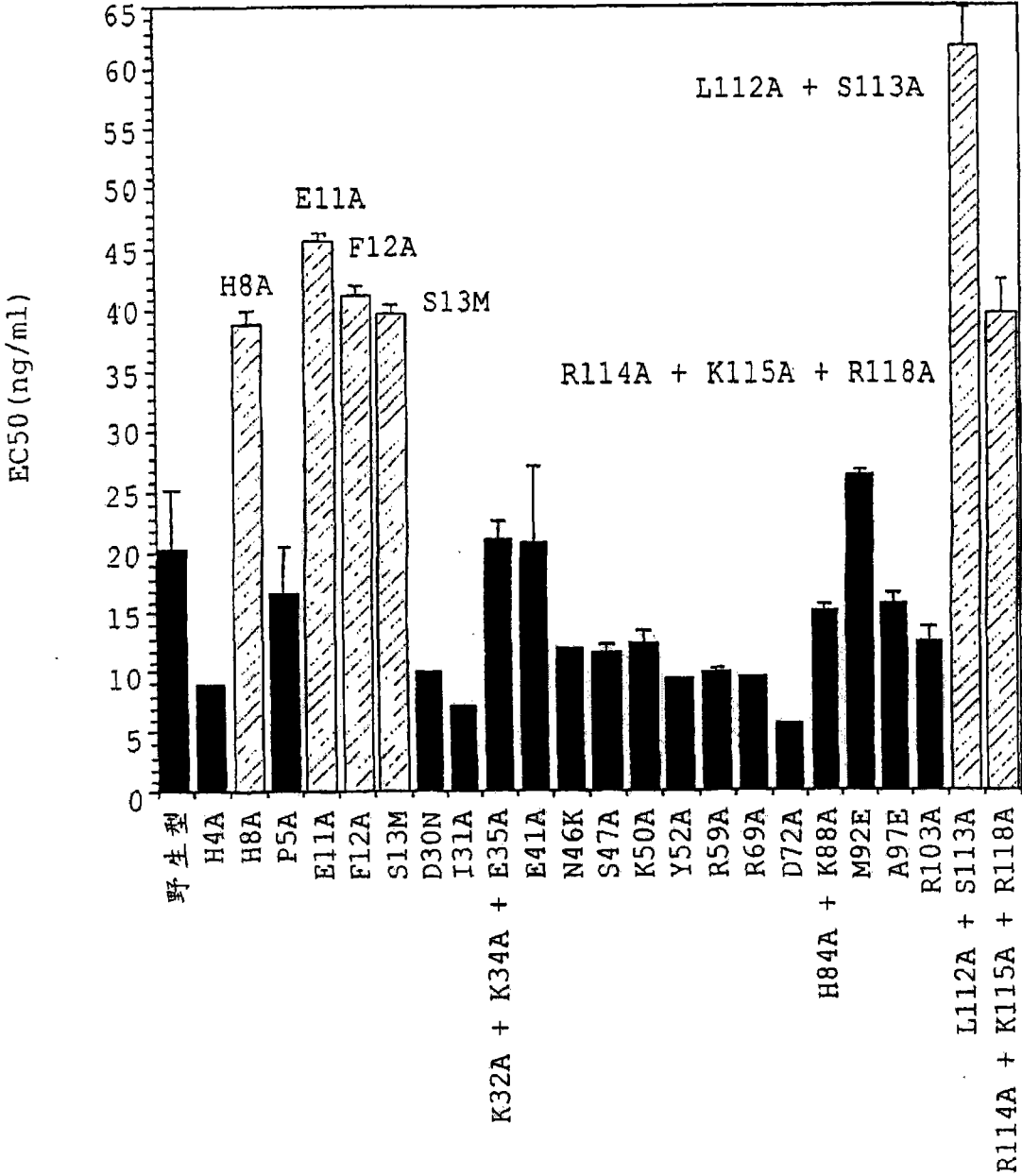


图 2E

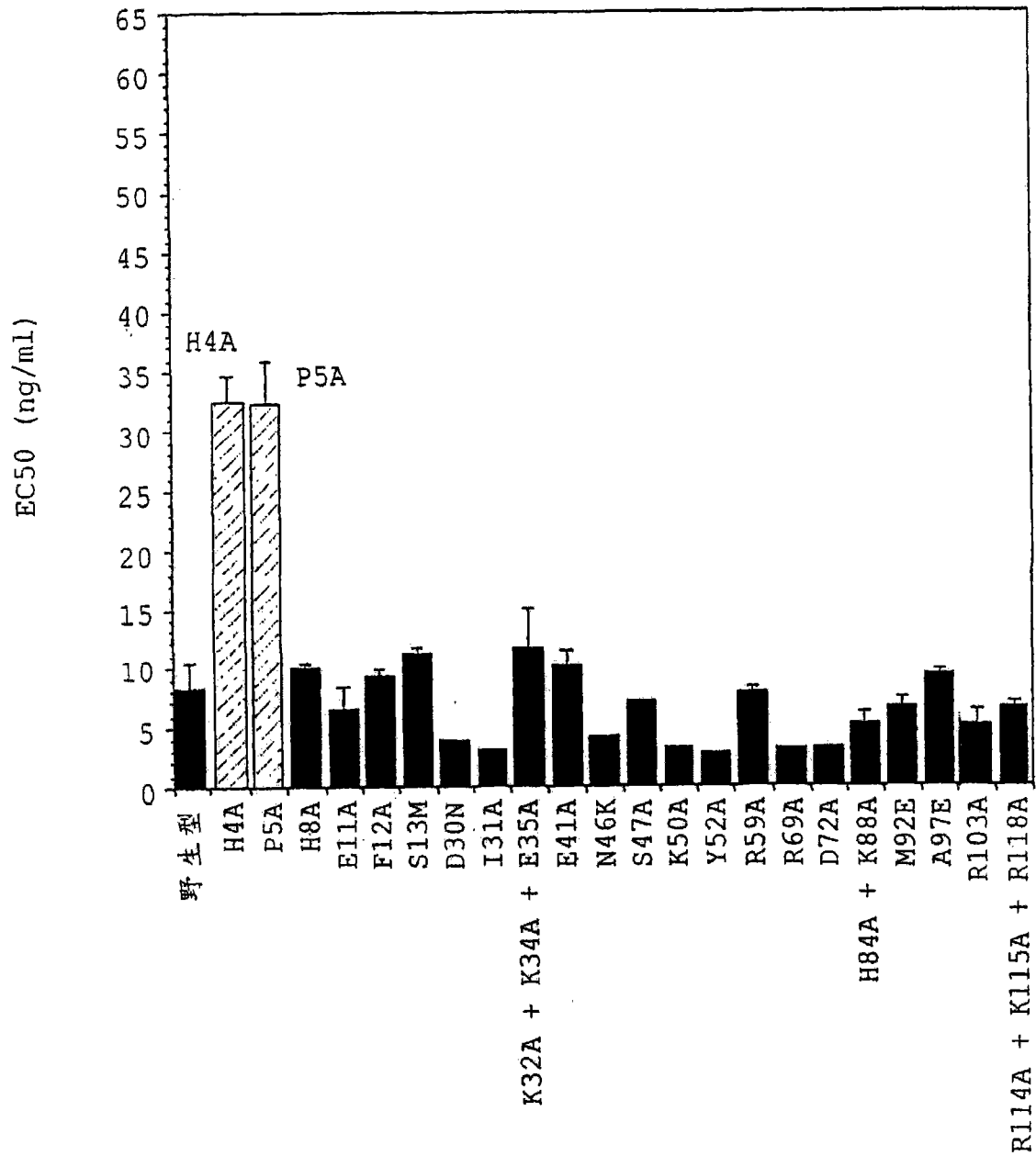


图 2F

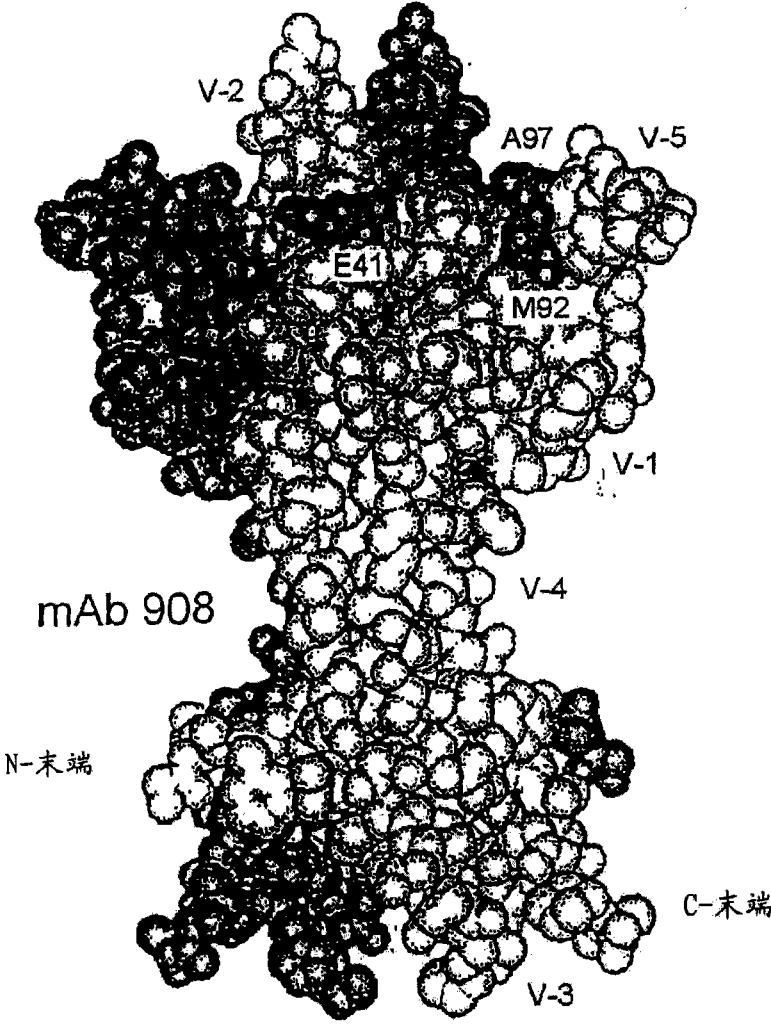


图 3A

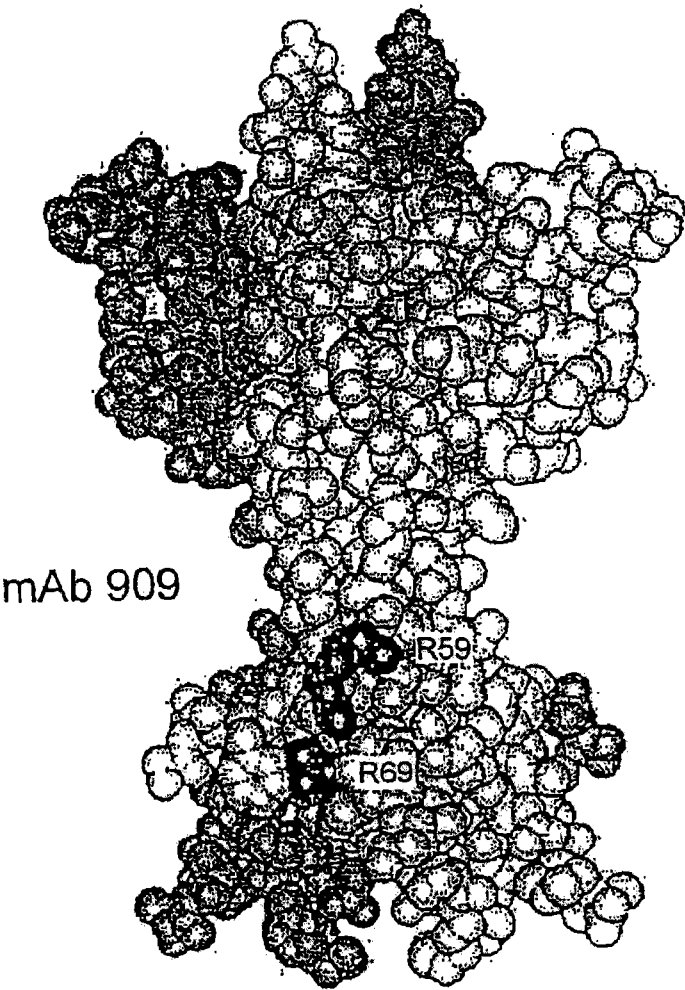


图 3B

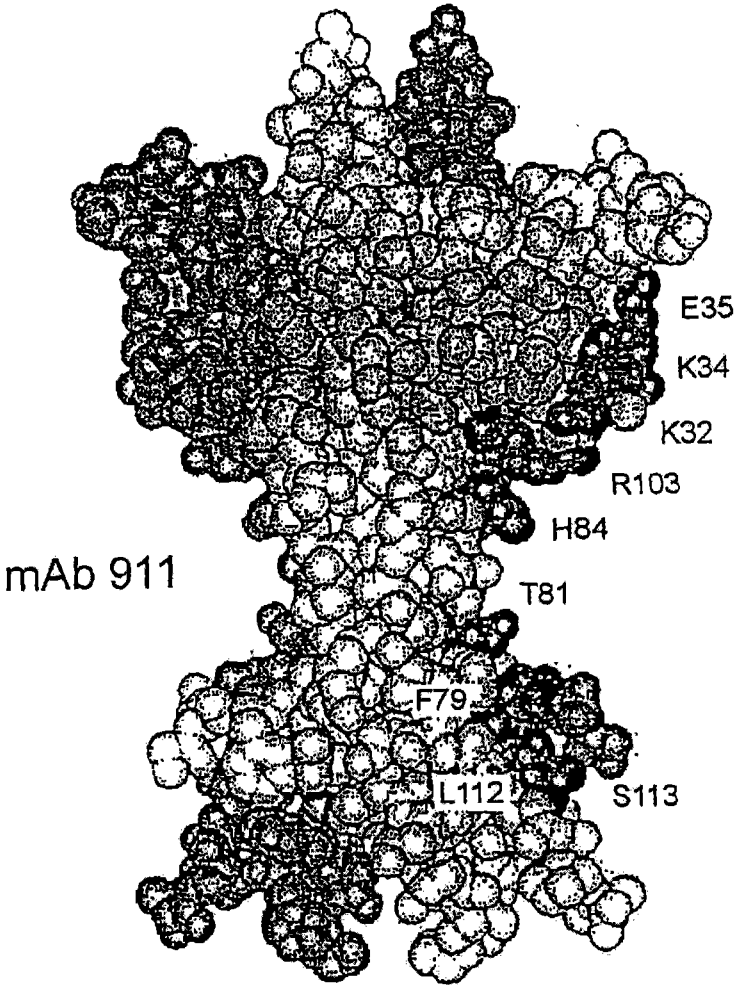


图 3C

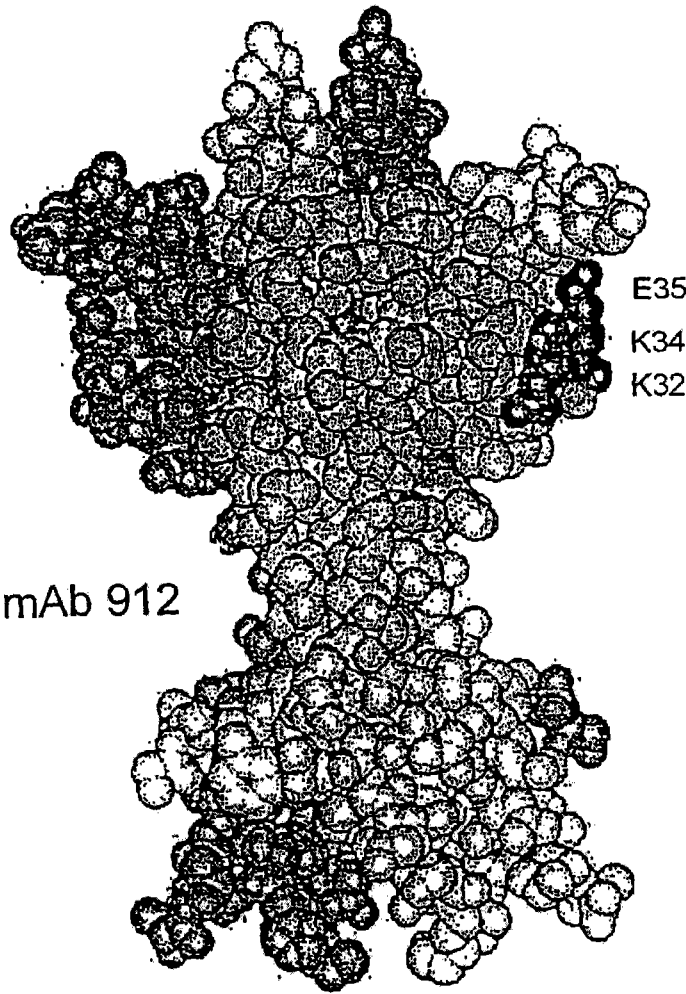


图 3D

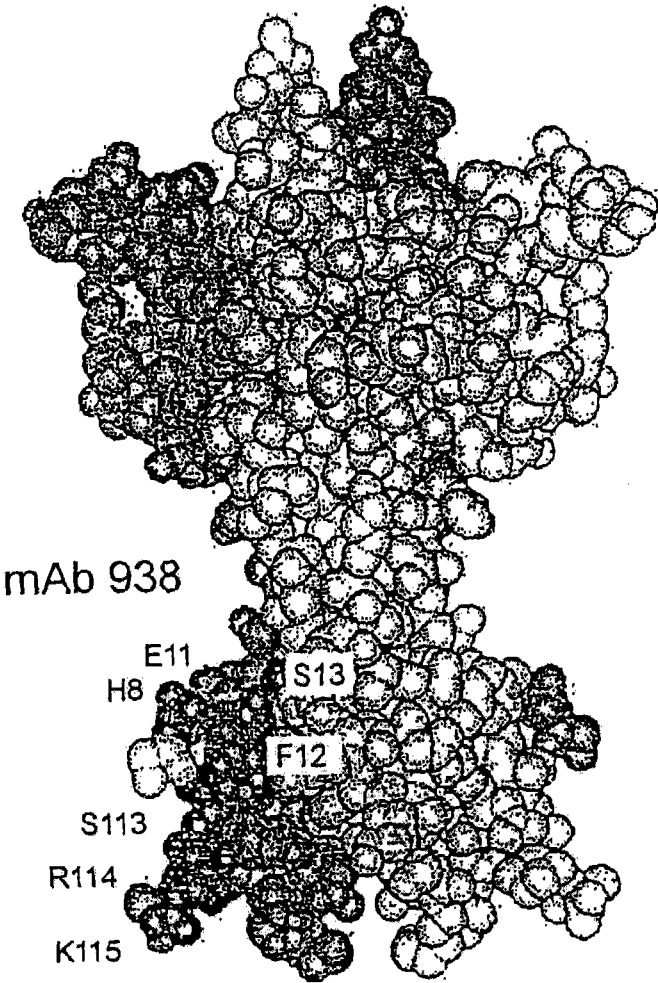


图 3E

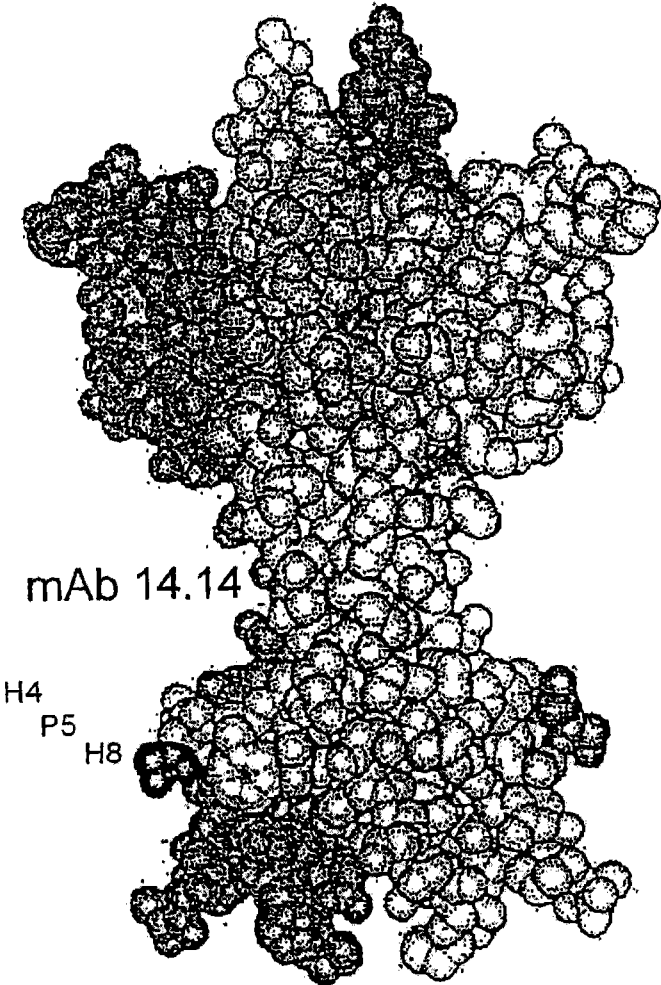


图 3F

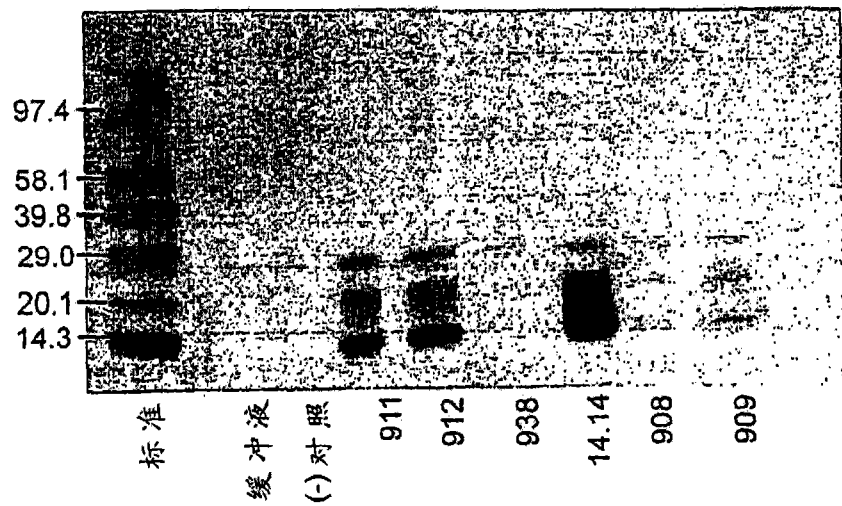


图 4A

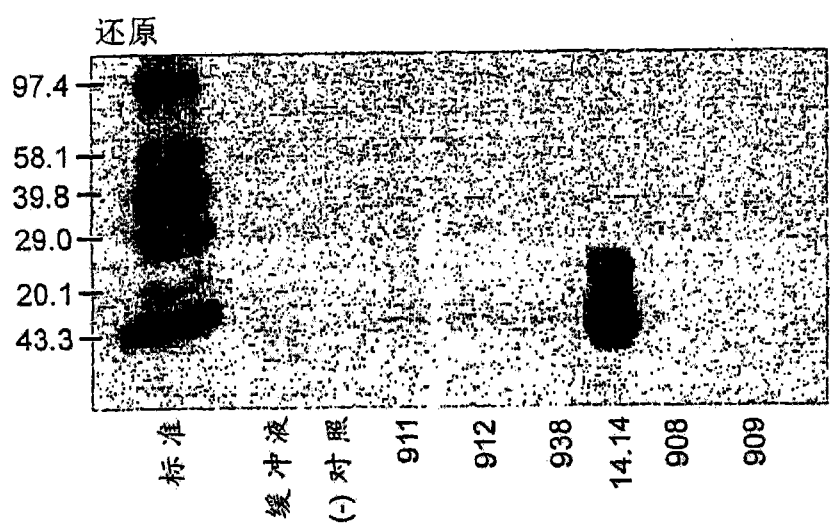


图 4B

MAb表位作图结果的摘要

MAb	NGF结合区点突变	TrKA结合位点 NGF/TrKA 结构 ^a	p75结合位点 NGF-3 诱变 ^b	TrKA阻断活性	p75阻断活性
908	M92, M97, E41, N46	不是	不是	(+/-)	(+/-)
909	R59, R69	不是	是	(-)	(++)
911	各种	是	是	(++)	(++)
912	各种	不是	是	(++)	(++)
938	L112/S113	是	是	(++)	(+)
14.14	H4, P5	是	不是	(+/-)	(-)

图 5

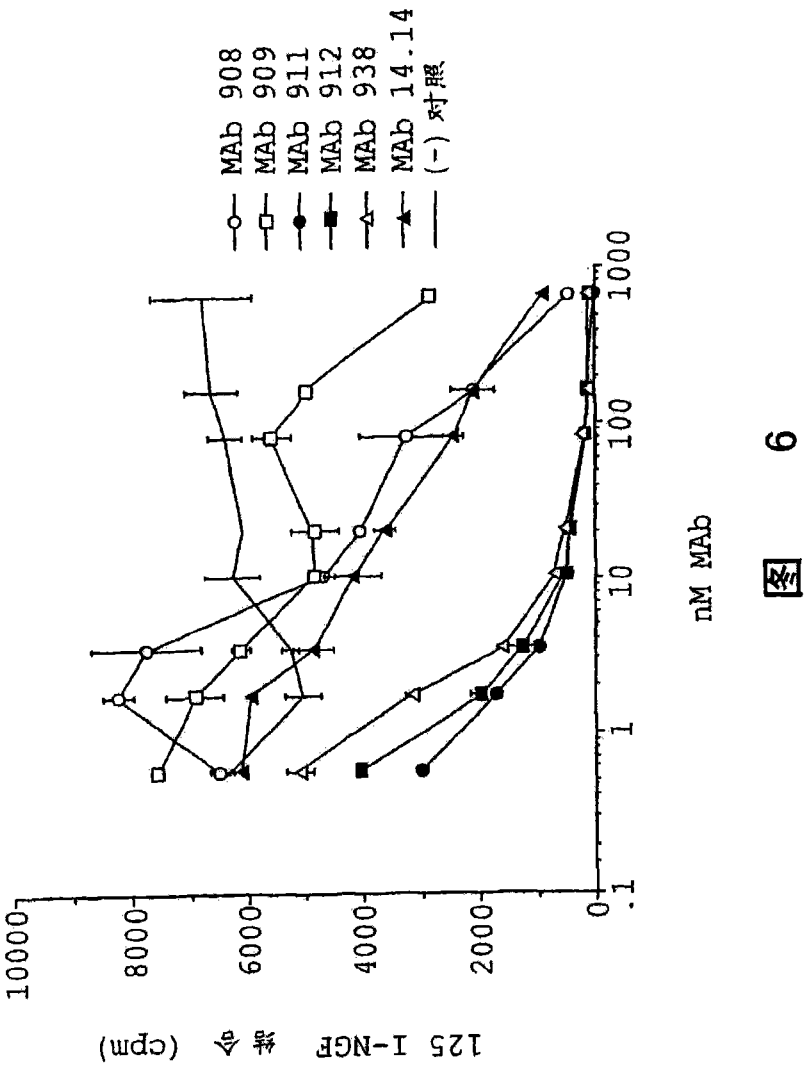


图 6

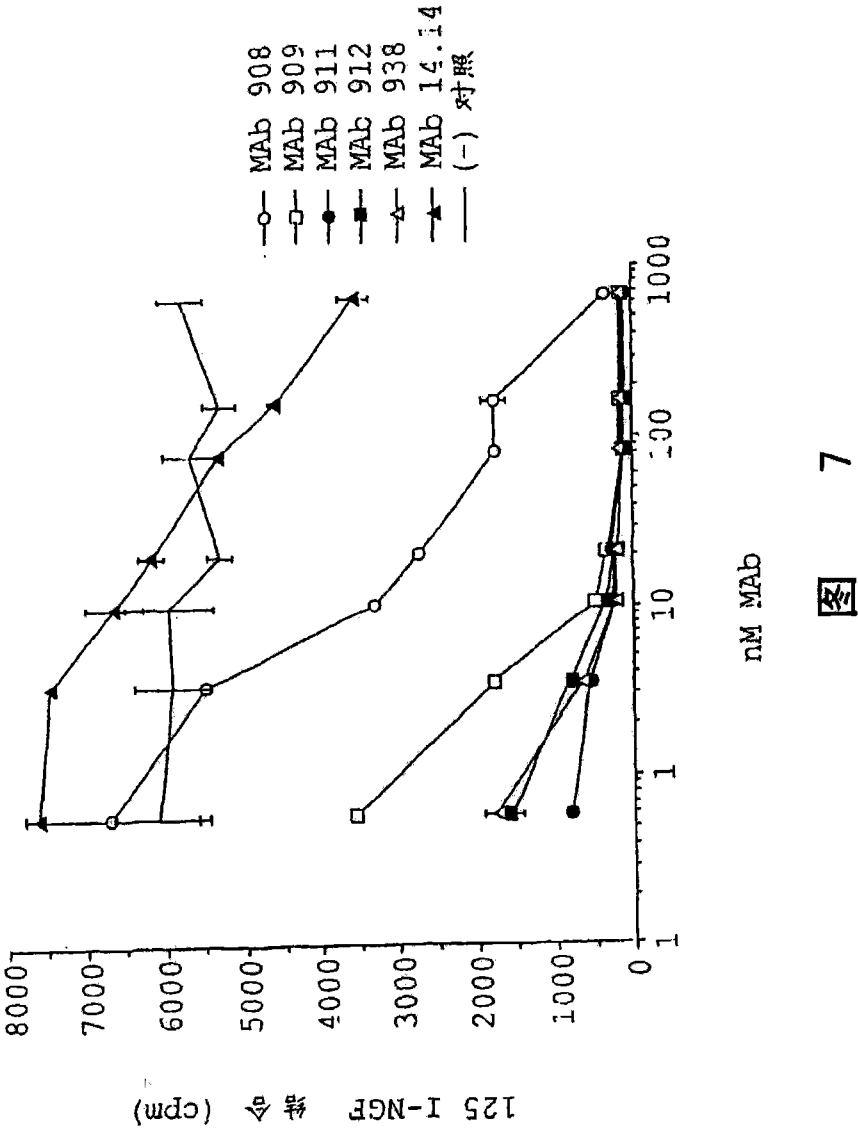


图 7

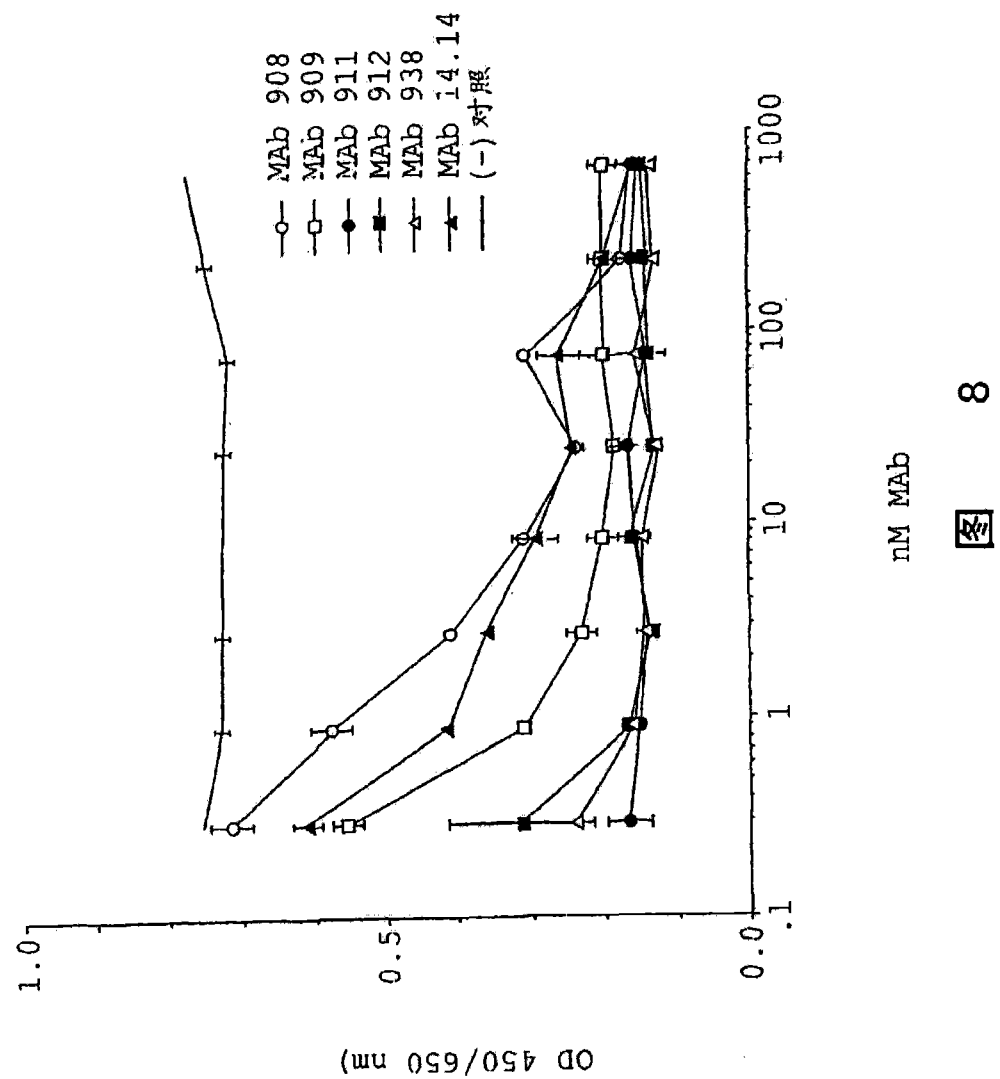


图 8

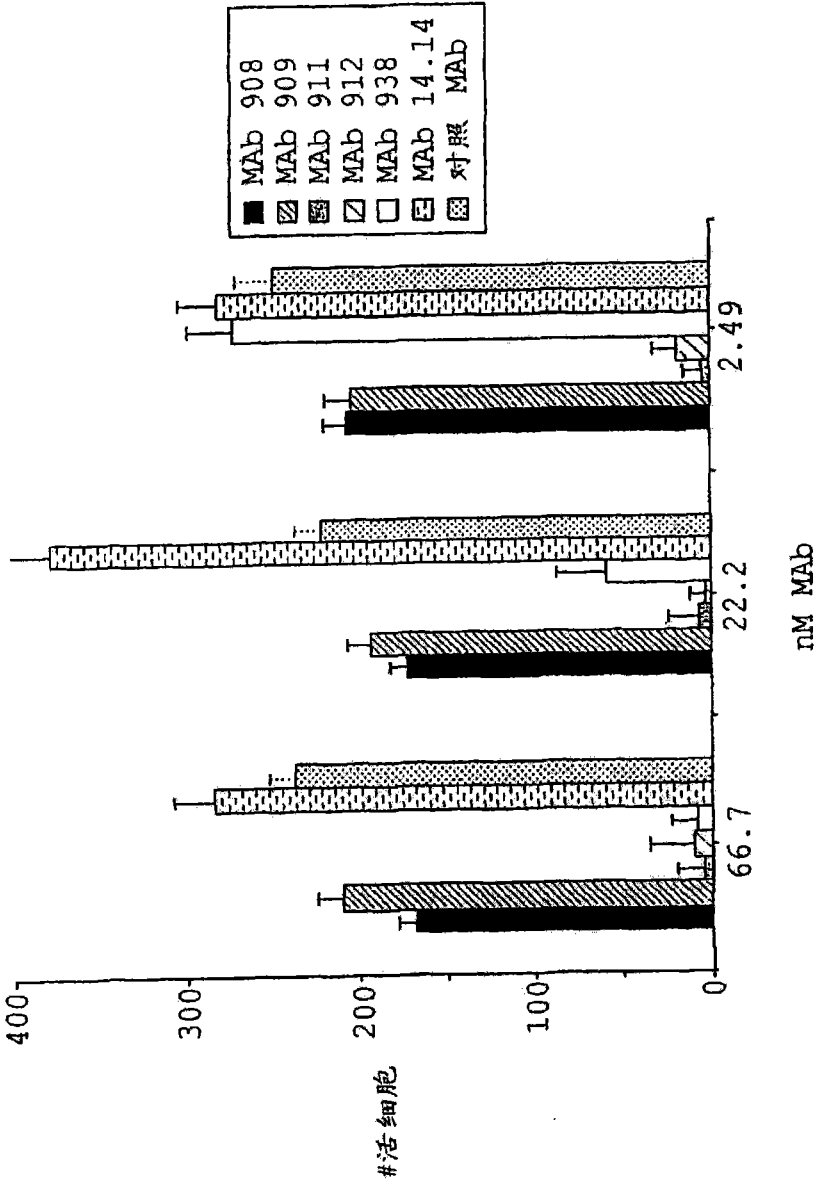


图 9

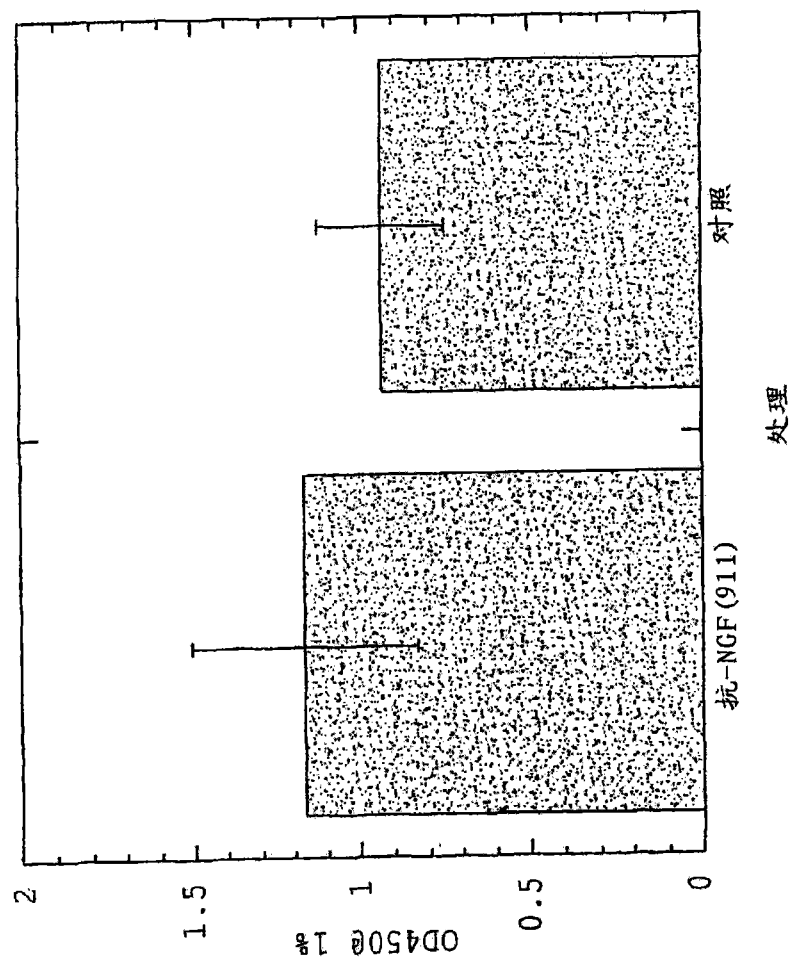


图 10

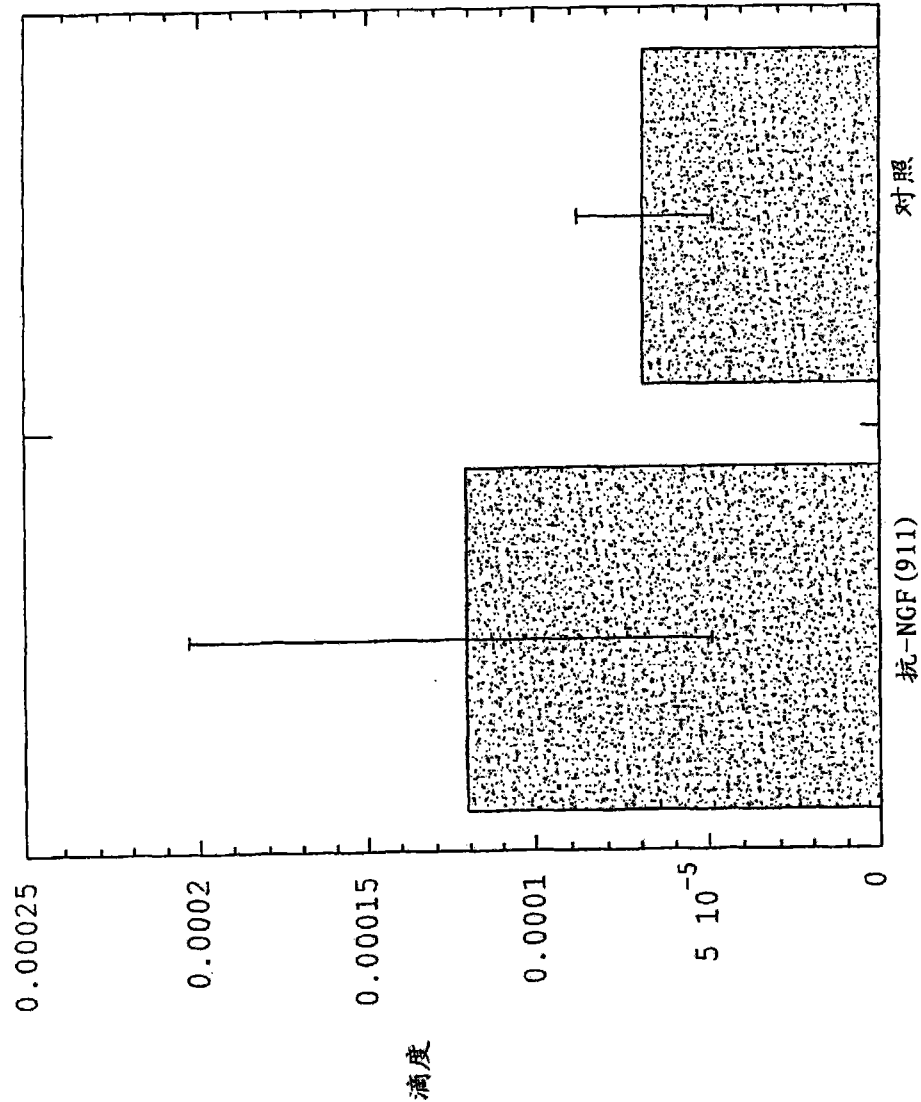


图 11

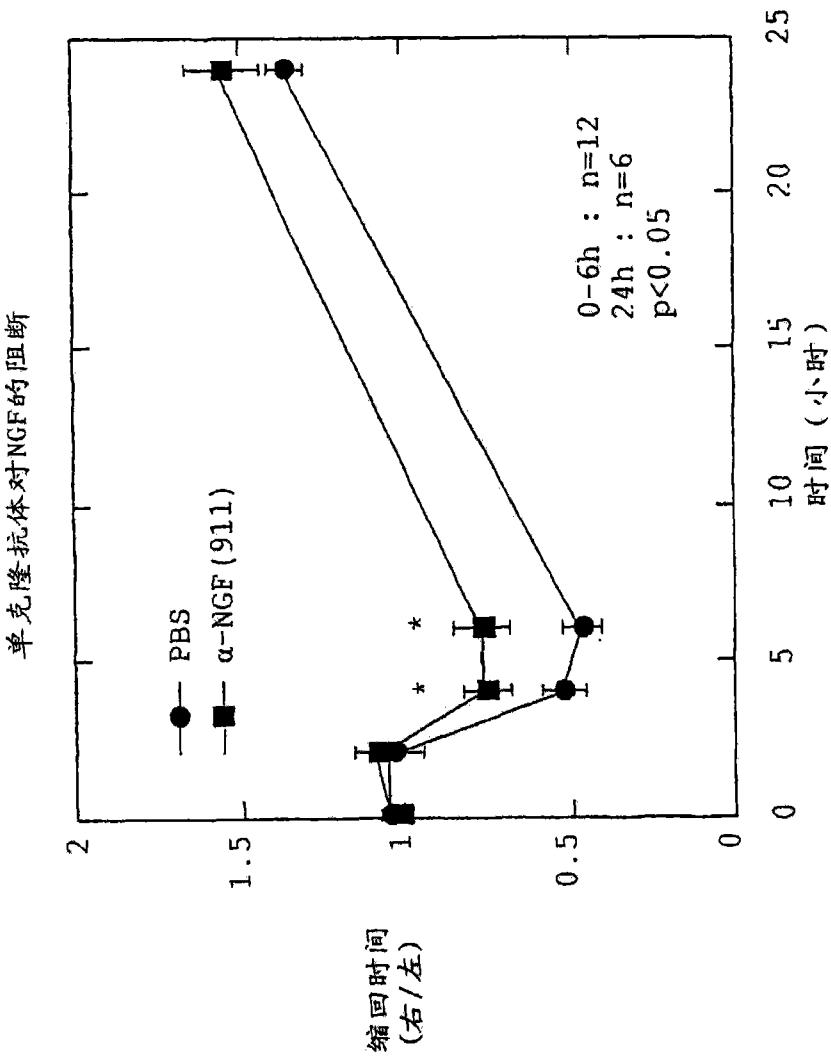


图 12

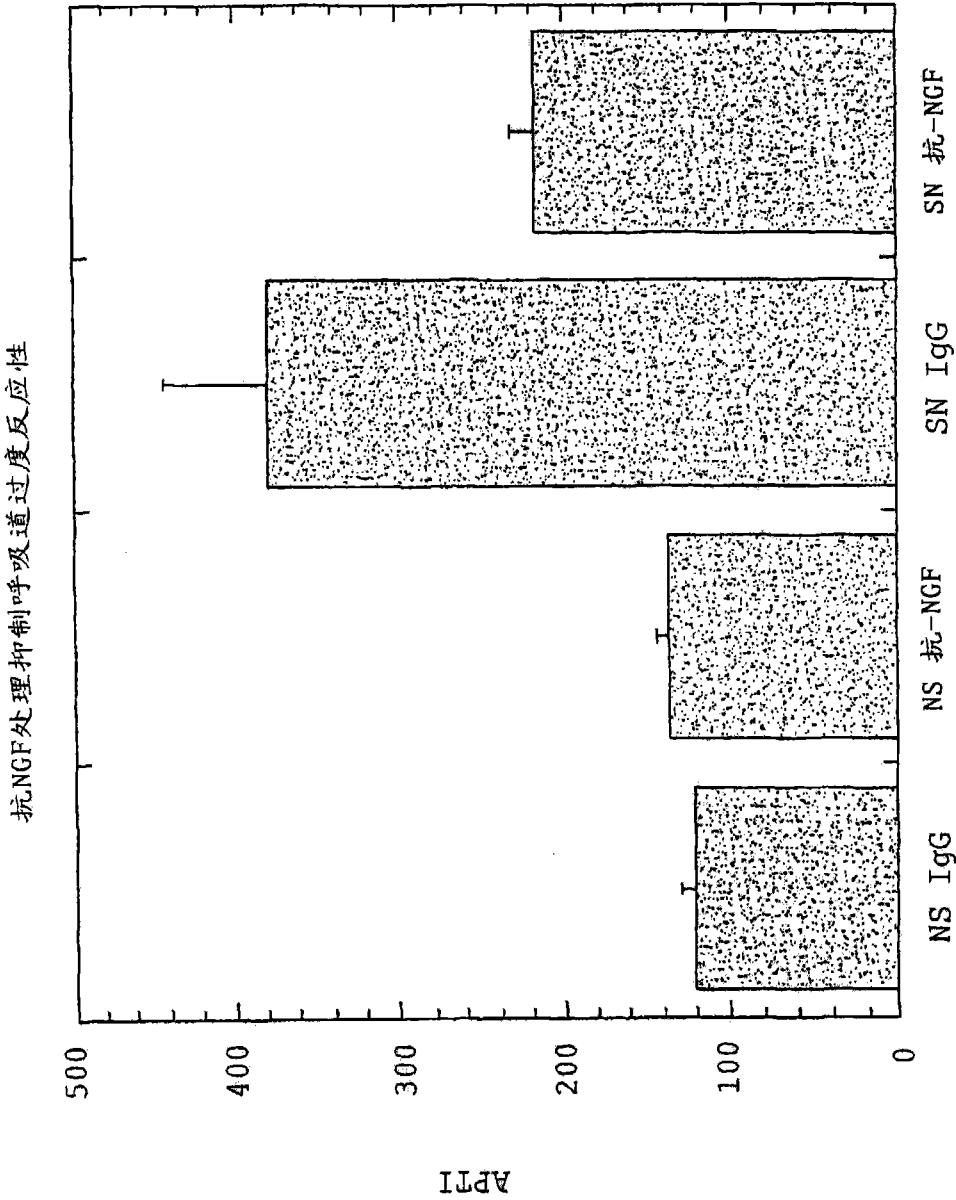
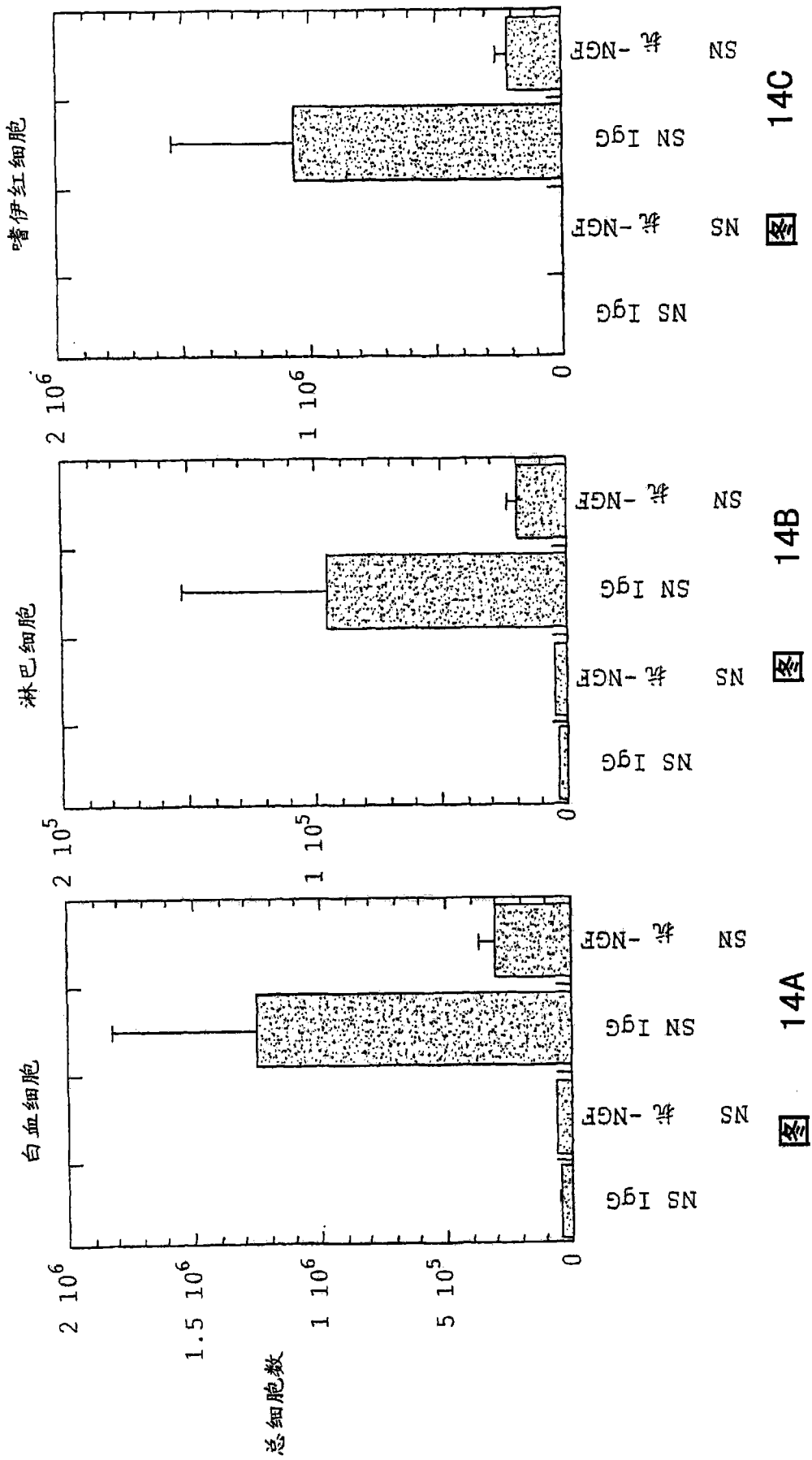


图 13

用抗NGF处理减少细胞在BAL中的浸润



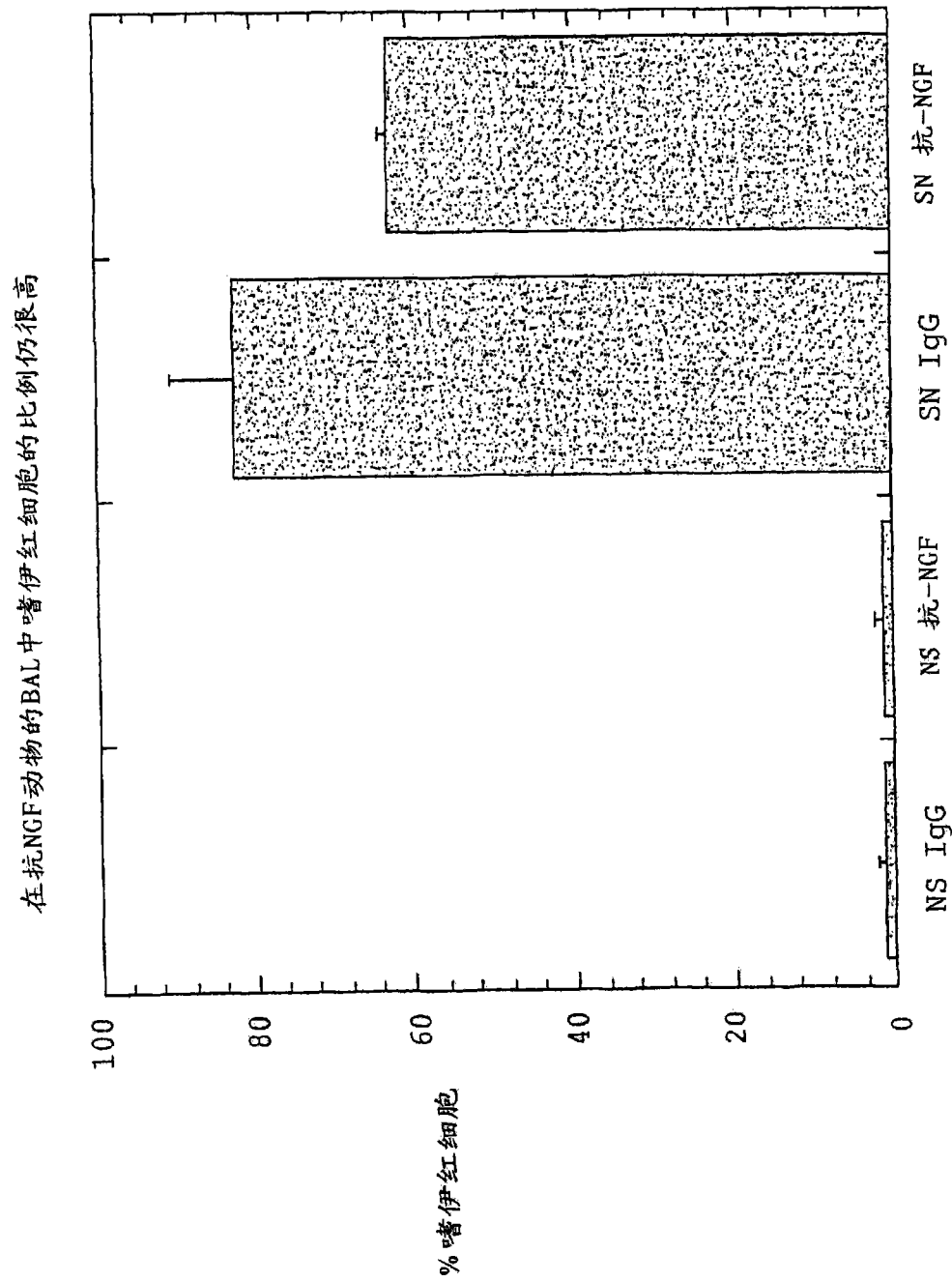


图 15

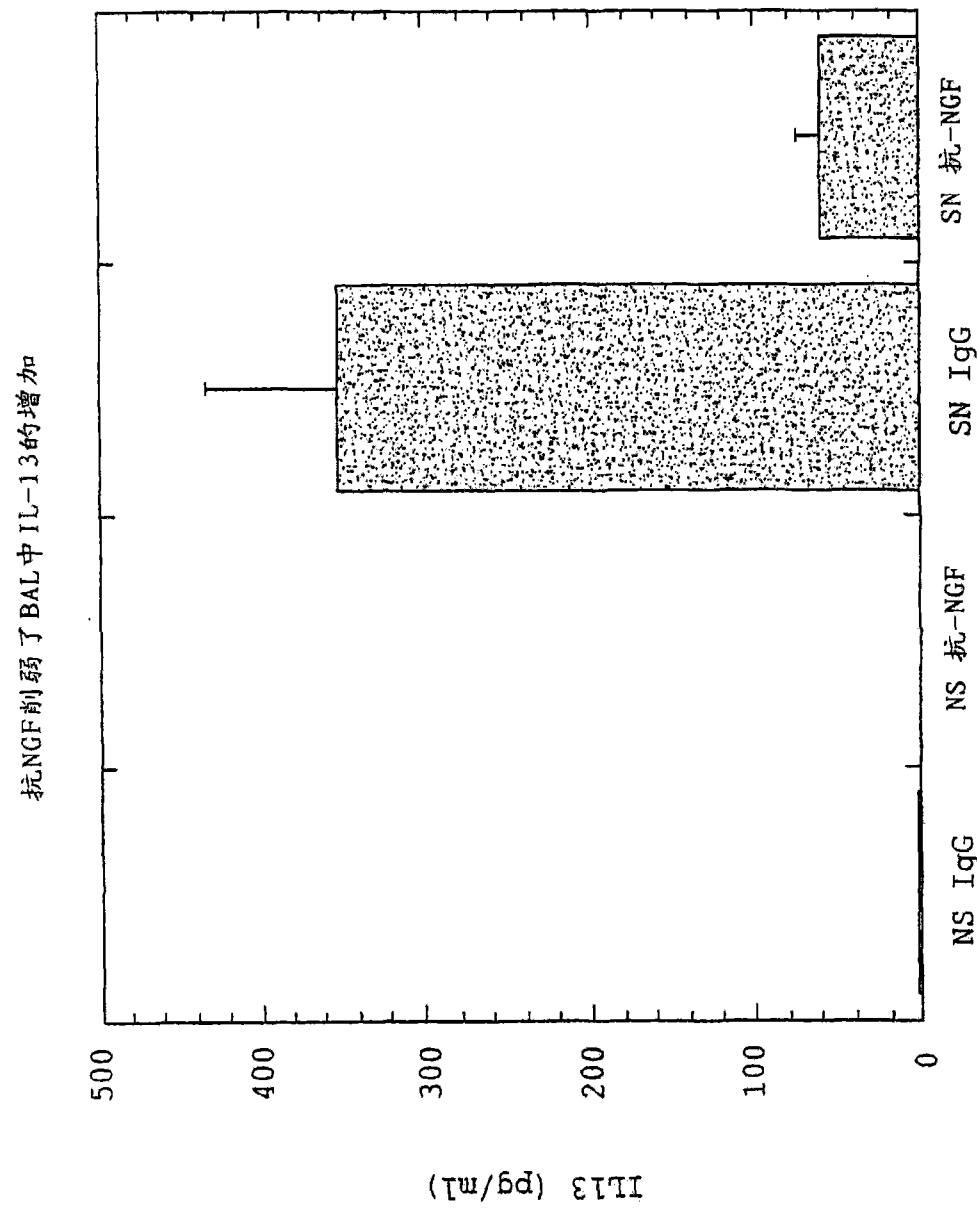


图 16

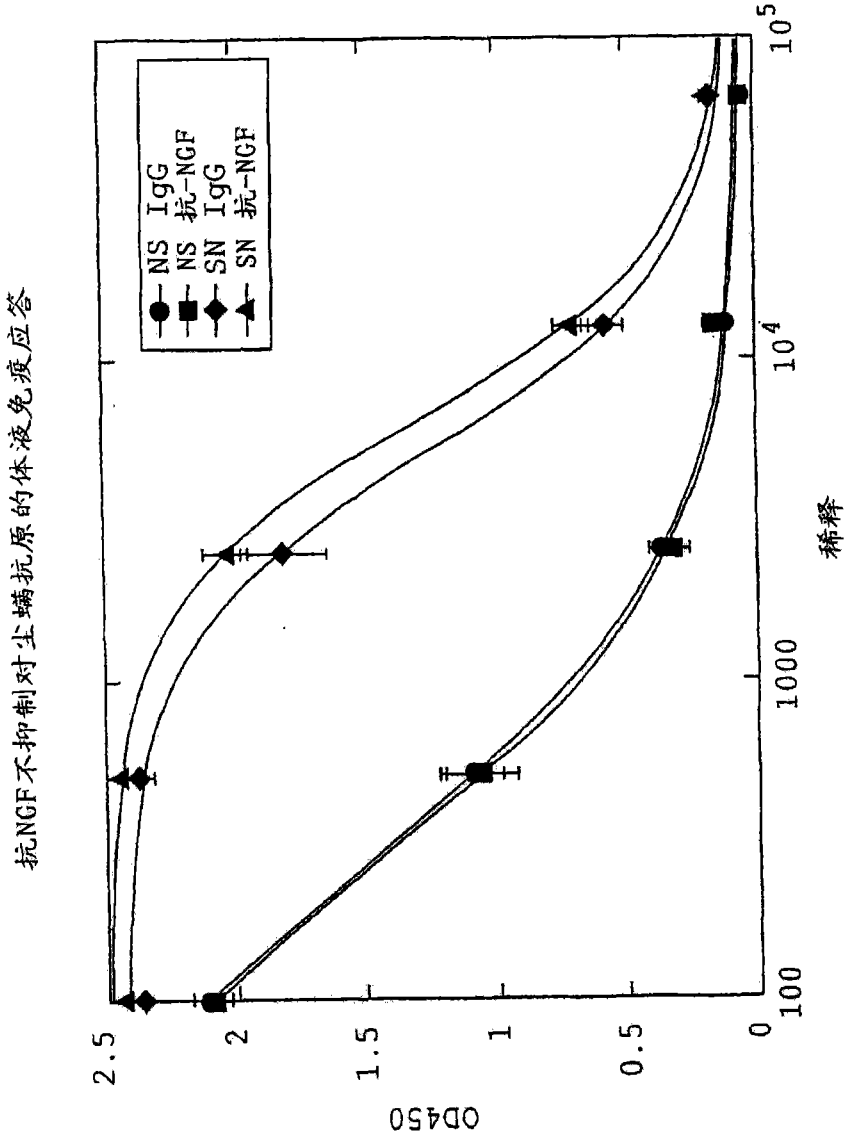


图 17

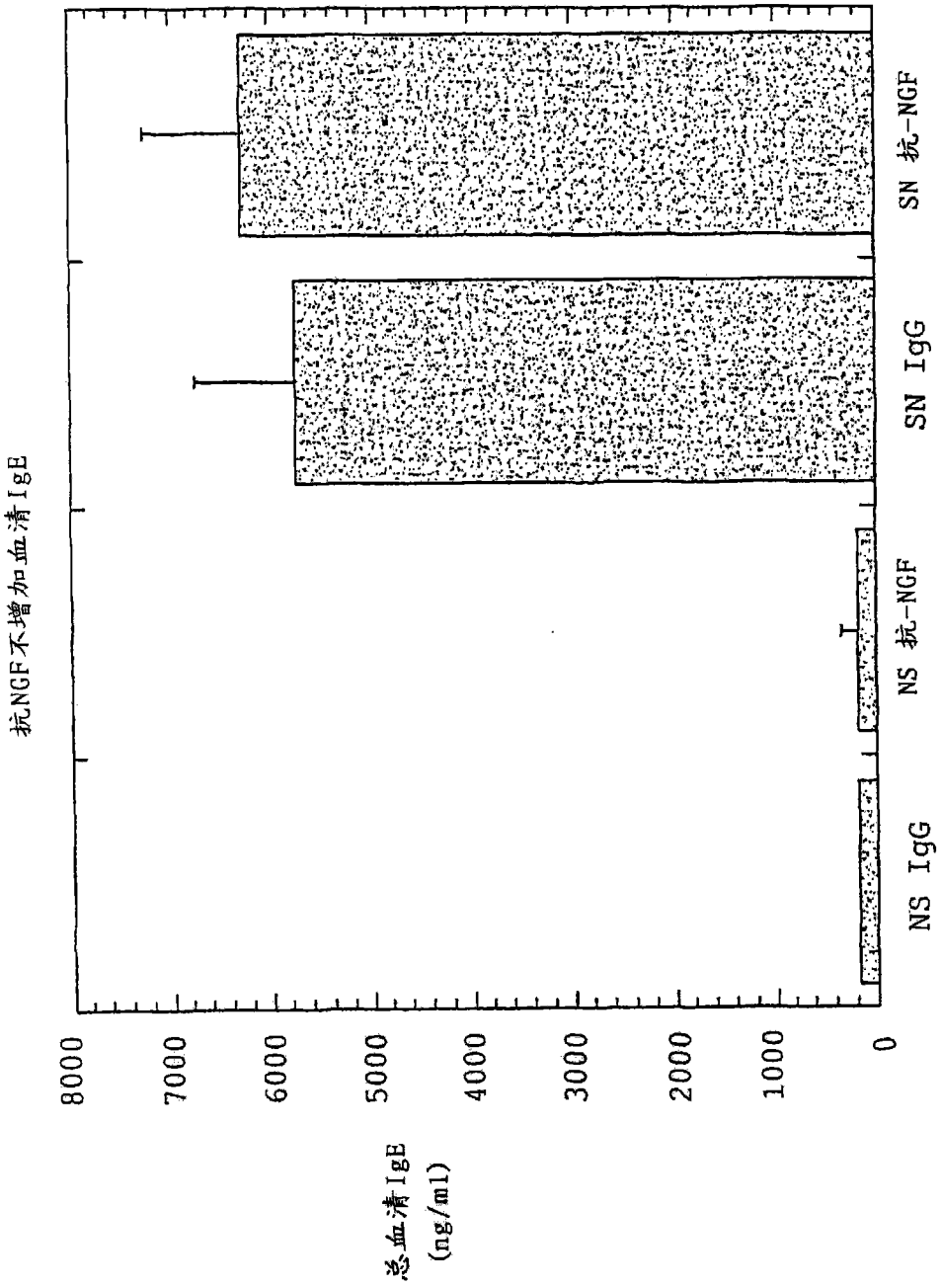


图 18

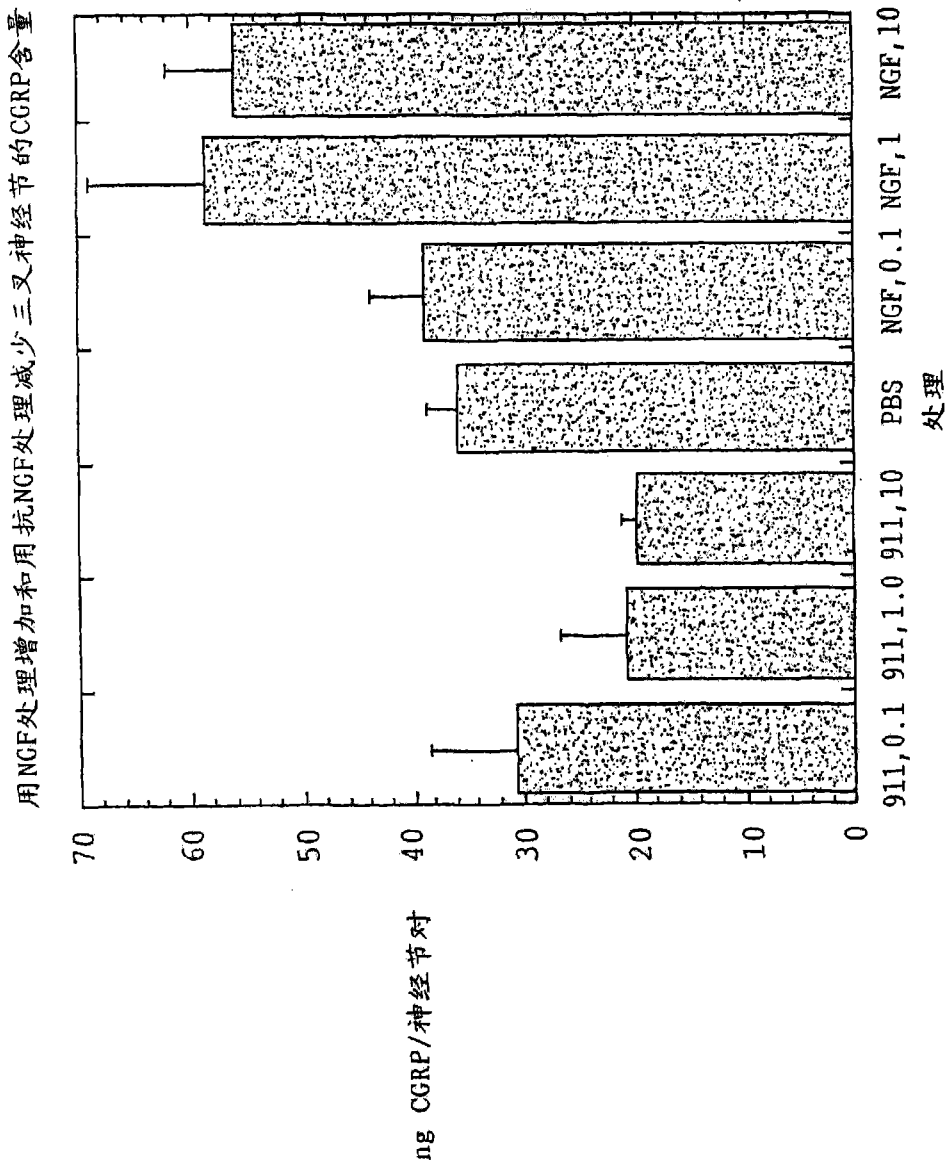


图 19