



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101277718 B

(45) 授权公告日 2011.12.21

(21) 申请号 200680028876.0

(22) 申请日 2006.06.07

(30) 优先权数据

RM2005A000290 2005.06.07 IT

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008.02.04

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IT2006/000426 2006.06.07

(87) PCT申请的公布数据

W02006/131951 EN 2006.12.14

(73) 专利权人 阿博特研究私人有限责任公司

地址 荷兰兹沃勒

(72) 发明人 F·帕沃内 S·马丁内利

A·卡塔内奥 G·乌戈利尼

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 林晓红

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

(56) 对比文件

W0 2005019266 A2, 2005.03.03, 见全文.

Molly A. Anti-NGF therapy profoundly reduces bone cancer pain and the accompanying increase in markers of peripheral and central sensitization. 《pain》. 2005, 第 115 卷 128-133.

审查员 吴希哲

权利要求书 1 页 说明书 14 页 附图 5 页

(54) 发明名称

作为长效止痛剂的能抑制 NGF 与 TrkA 受体的结合的分子

(57) 摘要

本发明涉及能抑制 NGF 与 TrkA 之间的结合、能阻断 TrkA 的生物学活性的抗 -NGF 抗体在制备治疗和 / 或预防慢性疼痛的药物中的应用。

1. 能抑制 NGF 与 TrkA 之间的结合的人或人源化抗-NGF 抗体在制备治疗和 / 或预防慢性疼痛的药物中的应用, 其中所述抗体是 IgG4 同种型抗体且所述抗体轻链可变区包含三个互补性决定区域 (CDR), 所述互补性决定区域由 SEQ ID No. 1 的第 24-34 位氨基酸、SEQ IDNo. 1 的第 50-56 位氨基酸以及 SEQ ID No. 1 的第 89-97 位氨基酸的序列组成, 并且所述抗体重链可变区包含三个互补性决定区域 (CDR), 所述互补性决定区域由 SEQ ID No. 2 的第 26-35 位氨基酸、SEQ ID No. 2 的第 50-65 位氨基酸以及 SEQ ED No. 2 的第 98-111 位氨基酸的序列组成。

2. 权利要求 1 的应用, 其中所述抗体包含两个轻链和两个重链。

3. 权利要求 1 的应用, 其中所述轻链可变区由 SEQ ID No. 3 所示序列组成。

4. 权利要求 1 的应用, 其中所述重链可变区由 SEQ ID No. 4 所示序列组成。

5. 权利要求 1 的应用, 其中所述轻链由 SEQ ID No. 8 所示序列组成。

6. 权利要求 1 的应用, 其中所述重链由 SEQ ID No. 7 的序列组成。

7. 权利要求 1 的应用, 其中所述轻链由 SEQ ID No. 8 所示序列组成以及所述重链由 SEQ ID No. 7 所示序列组成。

8. 权利要求 1 的应用, 其中所述疼痛是慢性炎症型疼痛。

9. 权利要求 8 的应用, 其中所述慢性疼痛是由于如下疾病所致: 胰腺炎, 肾结石, 头痛, 痛经, 肌肉骨骼痛, 扭伤, 内脏痛, 卵巢囊肿, 前列腺炎, 膀胱炎, 间质性膀胱炎, 术后痛, 偏头痛, 三叉神经痛, 烧伤和 / 或创伤疼痛, 外伤相关疼痛, 神经病性疼痛, 与肌肉骨骼疾病相关疼痛, 类风湿性关节炎, 骨关节炎, 强直性脊柱炎, 关节周围病变, 肿瘤性疼痛, 骨转移疼痛, HIV 疼痛。

10. 权利要求 9 的应用, 其中所述疼痛是神经病性疼痛。

11. 权利要求 9 的应用, 其中所述疼痛是肿瘤性疼痛。

12. 权利要求 1 的应用, 其中所述抗体具有长期作用。

13. 一种试剂盒, 其包含权利要求 1 中限定的抗体以及用于指导给予需要治疗慢性疼痛的对象所述组合物从而治疗所述对象的慢性疼痛的说明书。

作为长效止痛剂的能抑制 NGF 与 TrkA 受体的结合的分子

[0001] 发明背景

[0002] 本发明涉及能抑制 NGF 与其受体 TrkA 之间的结合的分子的应用。特别地,本发明涉及这两种分子之一的抗体,所述抗体通过阻断 NGF 的生物学活性而具有长期止痛作用。由于其长期止痛作用,它们可有利地用于治疗持续性疼痛(也称作慢性疼痛),例如但不限于神经病性疼痛或肿瘤性疼痛。

现有技术

[0003] 伤害信号传入脊髓是通过 A δ 和 C 纤维进行的,其胞体(初级感觉神经元)位于脊髓脊神经节(dorsal ganglia, DRG)。初级感觉神经元释放谷氨酸和 ATP 作为兴奋性神经递质,并释放许多其它物质如 P 物质和 CGRP(降钙素基因相关肽)(Hunt and Mantyh, 2001)。这些兴奋性神经递质的释放由传入末梢上存在的多种类型的受体控制,包括对辣椒素敏感的受体(香草素受体, VR1)、由 GABA 激活的受体、由 ATP 自身激活的受体及由大麻素激活的受体(CB1)(Sivilotti and Nistri, 1991; Hunt and Mantyh, 2001; Khakh, 2001; Morisset et al., 2001)。发生慢性疼痛的一种病理学机制是触摸痛(allodynia),即正常不疼痛的刺激转化为疼痛感觉。这种现象涉及多种离子电流及因此的多种“配体-门控”型通道,包括辣椒素受体 VR1 及 ATP 的离子型受体(Khakh, 2001)。脊髓伤害中间神经元上 VR1 受体和 ATP 受体的同时激活产生兴奋性突触信号的大量积聚,增强了疼痛刺激的传递(Nakatsuka et al., 2002)。基于此,因此明了 ATP 受体(特别是属于 P2X3 型的那些受体)在痛觉通路中发挥主要作用(Burnstock, 2001)。这些受体存在于由疼痛刺激激活的外周神经末梢、DRG 中的神经元胞体及其突触前末梢,以及在脊髓突触后末梢上天然存在(Khakh, 2001)。有大量证据表明由神经生长因子(NGF)及其高亲和性受体 TrkA(Levi-Montalcini, 1987; Levi-Montalcini et al., 1996; Frade and Barde, 1998; Kaplan, 1998)组成的系统在主要形式的“持续”疼痛的分子过程中发挥主要作用。这表明阻断 NGF/TrkA 系统的抗体的一种主要治疗区域(疼痛之一,特别是“紧张性”疼痛)(Levine, 1998)。感觉伤害神经元的研究进展主要依赖于 NGF,并且成人伤害性感受器的应答是由该因子调节的(Julius and Basbaum, 2001)。特别地,NGF 发挥敏化辣椒素疼痛刺激的作用(Shu and Mendell, 1999)。从功能观点出发,在慢性炎症之后的伤害神经元的动作电位的频率和持续时间发生变化。这些现象通过阻断内源性 NGF 以使得慢性疼痛状态典型具备的超兴奋性明显减弱而复原(Djouhri et al., 2001)。在成人伤害性感受器中限定疼痛阈值的 NGF 作用是由 TrkA 受体介导的,也是通过伤害性末梢存在的 VR1 受体介导的应答调节的。据认为 VR1 应答的 TrkA-依赖性增强作用是通过 γ 形式磷脂酶 C 的胞内转导途径而发生(PLC γ , Chuang et al., 2001)。外周 NGF 的水平在炎症过程中增高,而外源给予 NGF 对大鼠具有痛觉过敏作用及在人体中产生肌肉疼痛。另外,NGF 在人体和哺乳动物中通常对热刺激产生超敏作用。NGF 在发生炎症的外周部位由肥大细胞、成纤维细胞及其它类型细胞释放。特别地,看起来肥大细胞发挥主要作用(Woolf et al., 1996)。由于这些细胞产生 NGF 同时在其表面表达功能性 TrkA 受体(Nilsson et al., 1997),因此它们在存在溶血磷脂酰丝氨酸的情况下中能应

答 NGF 自身 (Horigome et al., 1993; Kawamoto et al., 2002)。结果, 看起来 NGF/TrkA 系统通过使得疼痛炎症信号局部放大的正反馈自分泌机制介导肥大细胞激活。在神经元中也发现高水平的 NGF, 在此这种神经营养蛋白显然与疼痛相关的神经纤维的修饰相关 (Harpf et al., 2002)。在某些形式的癌症中, 过量的 NGF 促进神经纤维的生长和浸润而诱导癌症性疼痛 (Zhu et al., 1999)。近来的实验研究表明通过阻断 NGF 可以明显减少与神经病性疼痛 (neuropathic pain) 相关的神经瘤的形成, 而不破坏受损的神经元胞体 (Kryger et al., 2001)。这些结果大大激发了对基于降低 NGF 的作用而治疗慢性疼痛的治疗方法的兴趣 (Saragovi and Gehring, 2000)。近年来, 基于遗传学也论证了 NGF/TrkA 系统参与疼痛传导的分子过程。特别地, TrkA 基因的突变 (位于染色体 1q21-q22 上的突变) 与已知称作 CIPA (先天性痛不敏感症合并无汗症) 的常染色体隐性遗传综合征相关, 该 CIPA 特征在于周期性短暂发热、无汗、对导致疼痛的刺激无反应、智力迟钝及自残倾向 (Indo et al., 1996; Saragovi and Gehring, 2000; Indo, 2001; hido et al., 2001)。最近通过抗 NGF 转基因小鼠 (AD11) 的表型特征的研究结果进一步证实 NGF 参与伤害性应答。在这些动物中, 抗 NGF 抗体 α D11 的异位表达在成人中导致 NGF 功能阻断。这种阻断以一致方式转变为对伤害性热刺激的应答的潜伏期的增加 (Capsoni et al., 2000; Ruberti et al., 2000)。通过阻断配体或受体而能中和 NGF/TrkA 系统的生物学活性的抗体可以是疼痛治疗中的一种重要手段, 特别是在治疗持续疼痛中。在本文中, 最近的出版物表明在小鼠肿瘤性疼痛模型中用中和抗 NGF 抗体进行治疗疼痛显著减轻 (Sevcik et al., 2005)。然而, 在 Sevcik 等使用的给药方案中, 最后一次注射抗 NGF 与观察到的结果之间的最大时延不超过 4 天, 因此其不是长期作用。

[0004] 长期作用是指在最后一次给予抗体之后明显持续至少 1-2 周的作用, 提示所述作用与抗体自身的血流浓度之间非必需相关。长期作用可能需要新的基因表达, 可能代表原始病理生理学状态的持续或延长的修饰。在许多情况中, 能产生长期作用的药物可称作“疾病调节 (disease-modifying)”有效成分, 即能深入改变疾病过程, 与仅显示对症状的简单药理学作用的产品不同。

[0005] 本发明人研究了通过 TrkA 配体介导的能阻断 NGF 的生物学作用的一组抗体 (针对 NGF 配体的抗体)。特别感兴趣两种试剂: α D11 (抗 -NGF) 和 MNAC13 (抗 -TrkA)。两种抗体 (一种是针对配体的抗体, 另一种是针对受体的抗体) 之间的对比也特别感兴趣, 因为 NGF 配体的抑制与 TrkA 受体的抑制不是功能等价的。事实上必须考虑到三点:

[0006] i) 化学计算原因, 在相同系统中, 配体和受体的可用性随着时间的推移而可以显著变化并以不同方式变化;

[0007] ii) 由所有神经营养蛋白共有的并介导与 TrkA 不同的生物学功能的 NGF 的第二种受体 (p75) 的存在 (Hempstead, 2002);

[0008] iii) “不成熟”形式的 NGF (前 - 原 - NGF) 的天然存在, 其特征在于在生物学活性方面具有独特的性质及优先结合 p75 受体 (Lee et al., 2001)。

[0009] α D11 是针对小鼠 NGF 的大鼠单克隆抗体 (但也能识别大鼠和人 NGF)。其与 NGF 的相互作用抑制其与 TrkA 的结合, 阻断其生理学作用 (Cattaneo et al., 1988)。 α D11 还抑制 NGF 与 p75 受体的结合。这种抗 -NGF 抗体在其结合其抗原的特异性方面是绝对独特的 (与所有其它神经营养蛋白对比), 特征在于与所述抗原的结合亲和性 (皮摩尔) 及在

体外和体内均示出的中和特点 (Cattaneo et al., 1988; Berardi et al., 1994; Molnar et al., 1997; Molnar et al., 1998)。α D11 表位位于暴露于分子外部及在空间上彼此紧密靠近的 NGF 环 I 和 / 或 NGF 环 II 水平面。另外, 不同物种中 α D11 的保守反应性与表位排布 (epitope assignment) 一致, 因为这两个环的氨基酸残基高度保守。α D11 的强力中和活性示出被识别的表位非常靠近 NGF 受体结合位点。另外, α D11 与神经营养蛋白家族的其它成员无交叉反应性提示: i) 所述表位位于与其它神经营养蛋白非共有的 NGF 区域, ii) 所述表位自身可参与介导 NGF-TrkA 识别的“特异性途径”。通过测试抗体与大范围的 NGF 突变体的结合活性鉴别 NGF 分子上 α D11 抗体识别的表位。基于这种系统筛选, 鉴别 NGF 分子的一个区域 (第 41-49 位氨基酸, 环 I) 在 NGF 分子的上部高度表达及与该抗体与其抗原的结合相关 (尽管非唯一相关) (Gonfloni, 1995)。事实上, NGF 的第 23-35 位氨基酸区域 (环 II) 也有助于结合。

[0010] 抗体 MNAC13 是针对人 TrkA 受体的小鼠单克隆抗体 (Cattaneo et al., 1999; Pesavento et al., 2000), 其在体外和体内抑制 NGF 对 TrkA 的激活过程及下游的生物学功能中特别有效 (Cattaneo et al., 1999; Pesavento et al., 2000)。所述抗体特征在于其结构 (Covaceuszach et al., 2001) 以及与 TrkA 受体的分子相互作用 (Covaceuszach et al., 2005)。

[0011] 基于通过创新方法对于结构的这种深入了解, 产生了 α D11 和 MNAC13 两种抗体的人源化形式 (Hu-α D11 和 Hu-MNAC13), 显示与亲代相同的抗原结合特征 (专利申请 WO 05/061540)。

[0012] 已经发现目前可用于治疗神经病性疼痛 (由原发性损害导致或者由神经系统功能失调导致, 例如脊髓损伤相关的疼痛)、肿瘤性疼痛、及众多其它形式持续疼痛 (炎症性质) 的治疗方法效力有限。因此, 显然需要鉴别和揭示具有止痛活性及通过与常用的止痛药物不同的作用机制起作用的新分子, 以解决副作用相关问题。国际专利申请 WO02/20479 揭示了抑制 TrkA 受体及具有潜在的止痛活性的小的合成分子。然而, 这些分子对某些疼痛模型的作用还未论证。另外, 与抗体相比, 所述小分子具有更可能穿过血脑屏障而可能导致严重副作用的缺点。事实上, 基底前脑的胆碱能神经元 (受多种形式的进行性神经退化包括阿尔茨海默氏症影响的一群神经元 (Saper et al., 1985)) 表达 TrkA 受体并依赖于 NGF 以正确发挥功能 (Holtzman et al., 1992)。国际专利申请 WO 01/78698 提议使用 NGF 拮抗剂以预防或治疗持续内脏痛, 但是不用于神经病性疼痛或肿瘤性疼痛。即使该申请声称所述拮抗剂可既结合 NGF 也结合 TrkA 受体, 但是其未论证在所述拮抗剂与 TrkA 受体结合时, 所述受体被功能性阻断。基于 MNAC13 和 α D11 两种抗体阻断 NGF/TrkA 的生物学活性的能力, 在持续疼痛的多种 (啮齿动物) 动物模型中对两种抗体 MNAC13 和 α D11 及其各自的人源化形式进行测试, 特别是在 CCI 模型 (慢性压迫性损伤, 坐骨神经的慢性压迫性损伤) 中进行测试, 所述 CCI 模型是可用于评价慢性神经病性疼痛的模型之一 (Bennett and Xie, 1988)。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明的目的是能抑制 NGF 与 TrkA 结合的抗 -NGF 抗体在制备治疗慢性疼痛的药物中的应用。

[0015] 阻断 TrkA 的生物学活性的抗 -NGF 分子被定义为作为 NGF 与 TrkA 受体结合的拮

抗剂的分子,并且包含合成的分子或者单克隆抗体或者其生物学 / 合成衍生物,其:

[0016] i) 结合 TrkA;

[0017] ii) 抑制 NGF 与在活细胞表面上表达的“天然”TrkA 受体结合(“天然”是指“体内天然构象”);及

[0018] iii) 阻断衍生自与相同 TrkA 受体结合的 NGF 的生物学活性。

[0019] 术语“阻断生物学活性”非仅仅是指阻断受体的激活,即阻断受体自身转变为“活性”状态的过程,而且还指这个激活过程下游的生物学结果即第二信使、新的基因表达、表型和功能改变的功能性中和作用。所述分子不仅能在体外测试(在 PC12 细胞中的神经生长测试)中阻断 TrkA,而且在体内也阻断 TrkA(功能性阻断基底前脑的胆碱能神经元及在经典“加热板(hot plate)”测试中阻断伤害感受)。

[0020] 本发明的一个目的是能抑制 NGF 与 TrkA 结合的抗-NGF 抗体在制备治疗和 / 或预防慢性疼痛的药物中的应用。优选地,所述抗体能识别并结合含有人或大鼠 NGF 的第 41-49 位氨基酸区域 EVNINNSVF(SEQ ID No. 9) 的 NGF 分子结构域,更优选含有第 23-35 位氨基酸区域 GDKTTATDIKGKE(SEQ ID NO. 10) 的结构域。更优选地,所述抗体能阻断 TrkA 的生物学活性。

[0021] 本发明另一方面提供了治疗和 / 或预防对象中慢性疼痛的方法,包括给予所述对象有效量的抗-NGF 抗体,从而治疗和 / 或预防所述对象中慢性疼痛。本发明还提供了一种试剂盒,其包含含有抗-NGF 抗体的组合物和用于指导给予需要治疗和 / 或预防慢性疼痛的对象所述组合物从而治疗或 / 或预防所述对象中的慢性疼痛的说明书。

[0022] 在一个优选方面,抗体轻链的可变区包含至少一个、更优选两个、最优选三个互补性决定区域(CDR),所述互补性决定区域具有选自 SEQ ID No. 1 的第 24-34 位氨基酸、SEQ ID No. 1 的第 50-56 位氨基酸、SEQ ID No. 1 的第 89-97 位氨基酸的序列。

[0023] 在另一优选方面,所述抗体轻链的可变区基本上包含 SEQ ID No. 1 的序列。

[0024] (VL, SEQ ED No. 1):

[0025] L CDR1 L CDR2

[0026] DIQMTQSPASLSASLGETVTIECRASEDIYNALAWYQQKPGKSPQLLIYNTDTLHTGVP

[0027] L CDR3

[0028] SRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDVASYFCQHYFHYPRTFGGGTKLELK

[0029] 在一个优选方面,抗体重链可变区包含至少一个、更优选两个、最优选三个互补性决定区域(CDR),所述互补性决定区域具有选自 SEQ ID No. 2 的第 26-35 位氨基酸、SEQ ID No. 2 的第 50-65 位氨基酸、SEQ ID No. 2 的第 98-111 位氨基酸的序列。

[0030] 在另一优选方面,所述抗体重链可变区基本上包含 SEQ ED No. 2 的序列。

[0031] (VH, SEQ ID NO 2):

[0032] H CDR1 H CDR2

[0033] QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTNNNNWVRQATGRGLEWMGGVWAGGATDY

[0034] H CDR3

[0035] NSALKSRLTITRDTSKQVFLKMHSLSQSEDATYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGT

[0036] TVSA

[0037] 所述抗体可以是单链形式,并包含通过接头连接的轻链可变区和重链可变区。

[0038] 或者,所述抗体可包含两个轻链和两个重链。

[0039] 在本发明一个优选方面中,所述抗-NGF 抗体是人抗体或人源化抗体。本领域技术人员应选择合适的入源化方法以设计抗体,优选的方法是 WO 2005/061540 所揭示的方法。

[0040] 简而言之,抗体可变区的“人源化”变体是通过将大鼠抗体的互补性决定区域(CDR)嫁接至人免疫球蛋白构架而上获得。得自关于 α D11 抗体的 Fab 片段的 X 线衍射研究的完整结构信息被用于选择人来源的受体构架。采用两种不同的标准使得大鼠 α D11 抗体与受体人抗体之间的结构差异最小化:i) 一级结构同源性水平,ii) 三维结构相似性水平。在选择构架后,将大鼠对应部分对人残基的置换降低至最小限度,以降低所得人源化抗体的潜在免疫原性。

[0041] 举例性的人源化抗体包含一个轻链可变区,其是 SEQ ID No.:1(源于大鼠的序列)的人源化衍生物。举例性的人源化抗体包含一个重链可变区,其是 SEQ ID No.:2(源于大鼠的序列)的人源化衍生物。

[0042] 在本发明的一个优选方面中,人源化抗体轻链的可变区基本上包含 SEQ ID No. 3 所示序列。

[0043] SEQ ID NO.:3(VL, Hu- α D11 的轻链可变区):

[0044] L CDR1 L CDR2

[0045] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNNTDTLHTGVP

[0046] L CDR3

[0047] SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGTKVEIK

[0048] 在本发明的一个优选方面中,人源化抗体重链的可变区基本上包含 SEQ ID No. 4 所示序列。

[0049] SEQ ID No. 4(VH, Hu- α D11 的重链可变区):

[0050] H CDR1 H CDR2

[0051] EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDY

[0052] H CDR3

[0053] NSALKSRFTISRDNKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGLV

[0054] 上述人源化可变区被克隆进合适的表达载体中成为人 IgG1 或 IgG4 同种型形式,并转染进哺乳动物细胞系中以进行表达、纯化和药物学鉴定。

[0055] 最后产生 Hu- α D11 的不同变体(完全 IgG:重链+轻链)(由于不同的恒定区而不同)。

[0056] 在本发明的一个优选方面中,所述人源化抗体轻链基本上具有 SEQ ID No. 8 所示序列。

[0057] SEQ ID NO 8, Hu- α D11Vk 人 Ck

[0058] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNNTDTLHTGVP

[0059] SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF

[0060] PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSS

[0061] TLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0062] (斜体字=可变区;黑体字=人源化过程中大鼠序列中的突变;下划线处=CDR)。

[0063] 在一个优选的实施方案中,所述人源化抗-NGF 抗体重链基本上具有如下三个序

列之一：

- [0064] SEQ ID NO 5, Hu- 抗 NGF (VH) 人 IgG1
- [0065] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNNWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDY
- [0066] NSALKSRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGT
- [0067] TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
- [0068] VLQSSGLYSLSSVTVPSDDLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPA
- [0069] PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
- [0070] PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
- [0071] TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS
- [0072] KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0073] SEQ ID NO :6, Hu- α D11 (VH) 人 IgG1* (具有 N297A 突变的 IgG1, 如 Bolt et al., 1993 所述)
- [0074] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNNWNRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDY
- [0075] NSALKSRFTISRDNSKNTAYLOMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGT
- [0076] TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
- [0077] VLQSSGLYSLSSVTVPSDDLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPA
- [0078] PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
- [0079] PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
- [0080] TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS
- [0081] KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0082] SEQ ID NO :7, Hu- α D11 (VH) 人 IgG4
- [0083] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNNWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDY
- [0084] NSALKSRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGT
- [0085] TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
- [0086] VLQSSGLYSLSSVTVPSDDLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEF
- [0087] LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
- [0088] EQFNSTYRWWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
- [0089] PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT
- [0090] VDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0091] (斜体字=可变区;黑体字=在人源化过程中大鼠序列中的突变;下划线处=CDR;N297A 突变消除糖基化位点)。

[0092] 在一个优选方面中,本发明的分子用于制备治疗慢性炎症性类型疼痛的药物,所述疼痛优选由于如下疾病所致:胰腺炎,肾结石,头痛,痛经,肌肉骨骼疼痛,扭伤,内脏疼痛,卵巢囊肿,前列腺炎,膀胱炎,间质性膀胱炎,术后痛,偏头痛,三叉神经痛,烧伤和/或创伤疼痛,外伤相关疼痛,神经病性疼痛,肌肉骨骼疾病相关疼痛,类风湿性关节炎,骨关节炎,强直性脊髓炎,关节周围病变,肿瘤性疼痛,骨转移性疼痛,HIV 疼痛。

[0093] 或者,所述疼痛是神经病性疼痛或者肿瘤性疼痛。

[0094] 根据国际疼痛研究协会(International Association for the Study of Pain, IASP, www.iasp-pain.org)所述,疼痛通常解释作“与实际或潜在的组织损害相关的不愉快

的感觉和情绪体验,或者描述为这种损伤的不愉快的感觉和情绪体验,或这两者”。所有形式疼痛中的基本因素是特化的高阈值受体的激活和神经纤维警告生物体存在潜在的组织损害。炎症细胞和过程的参与在许多疼痛状态中是普遍因素。术语“急性疼痛”是指立即的、通常高阈值的、由于伤害如切割伤、压伤、烧伤或者由化学刺激所致的疼痛。如本文所用术语“慢性疼痛”是指除了急性疼痛之外的疼痛。应理解慢性疼痛通常持续时间较长,例如几个月或几年,可以是持续或间断的。

[0095] 抗-NGF 抗体合适地是全身性给予。抗-NGF 抗体的全身性给予可以通过注射例如持续静脉内注入、静脉内推注、皮下或肌内注射进行。或者,也可以使用其它给予方式(例如口服、经粘膜给予、吸入、舌下给予等)。局部给予所述抗体可以例如在受影响的组织附近通过关节内注射或者皮下、肌内注射进行。

[0096] 所述抗-NGF 抗体适当地配制为适于指定的给予途径的药物组合物。注射溶液适当地还有溶解或分散于含有合适的缓冲液和摩尔浓度调节剂例如磷酸盐、盐和/或葡萄糖的液体介质(例如注射用水)中的所述抗体。

[0097] 治疗方案即剂量、时间选择和重复可以通过选择的给药途径一次或重复给予(例如注射)。给予剂量的间隔可以根据临床反映的程度和持续时间以及特定个体和个体临床病史加以改变。适当地,所述抗-NGF 抗体具有较长的作用持续时间。特别地,根据动物研究确定所述抗体的临床效应在给予后持续 21 天。另外,初步数据提示所述抗-NGF 抗体较给药后可以在相关生物学基质如血清或血浆中检测到其存在的情况中呈现持续时间更长的临床益处。

[0098] 根据指定的作用持续时间长度(即适当地持续至少一周或者优选至少两周例如至少三周或至少四周),所述抗体适当地可以不超过每周一次例如不超过每两周一次或者每三周一次或者每四周一次的频率给予对象。

[0099] 抗-NGF 抗体的合适剂量典型在 0.1mg/kg 至 10mg/kg 体重的范围。

[0100] 新的抗体及含有其的组合物是本发明的一方面。

[0101] 现在特别参考以下附图揭示本发明的非限制性实施方案。

[0102] 图 1: α D11 抗-NGF 抗体与小鼠 NGF (m-NGF) 及重组小鼠 proNGF (rm-proNGF) 的结合的 BIAcore 分析。将 α D11 抗-NGF 抗体固定在流动池 (flow cell) 2 上,而流动池 1 为空白。每条曲线是在池 2 中测定的信号减去背景信号(在池 1 中测定)而获得。表面等离子共振信号给出每个阶段的表面结合的的成分的量,以共振单位 (RU) 表示。

[0103] 对于 m-NGF 结合,在实验组 A 中固定的抗体为 3000 共振单位 (RU),在实验组 B 中为 6000RU。m-NGF 的注射浓度在每条曲线的上方标示。从对所述数据的完全分析中,评价了亲和性参数,结果如下: $K_A = 3.55 \cdot 10^{11} \text{ l/M}$; $K_D = 2.81 \cdot 10^{-12} \text{ M}$ (χ^2 值 0.123)。

[0104] 对于 rm-proNGF 结合(组 C),固定的抗体为 3000RU。rm-proNGF 的注射浓度在每条曲线的上方标示。对所述数据进行动力学分析可以评价如下参数: $K_A = 1.2 \cdot 10^9 \text{ l/M}$; $K_D = 1.9 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ (χ^2 值 0.09)。

[0105] 图 2: Fab α D11 (α D11) 和 Fab Hu- α D11 (Hu- α D11) 抗-NGF 抗体对甲醛引起的疼痛的作用(甲醛测试的第 2 阶段:15-40 分钟。第 2 阶段相当于炎症相关疼痛)。在小鼠右后爪背部皮下注射 5% 甲醛。

[0106] 处理包括进行抗体注射 45 分钟 (Fab α D11 或者 Fab Hu- α D11 对模拟 Fab 或

盐水)(在与注射甲醛相同的爪注射),之后进行甲醛注射并测试(每种抗体注射一次:12.5 μ g)。每个实验组包括至少8只动物。对数据进行统计学分析示出抗-NGF处理的显著止痛作用(所述抗体的亲代和人源化形式均如此),显然特异于疼痛应答的第二阶段(炎症)(舔舐时间)。对于盐水组(** $p < 0.01$)或模拟Fab处理组(# $p < 0.05$),抗-NGF抗体(亲代及人源化形式)的作用在统计学上存在差异(ANOVA)。

[0107] 图3:抗-TrkA单克隆抗体MNAC13(1.4mg/kg)和抗-NGF单克隆抗体 α D11(1.4mg/kg)对神经病性疼痛的作用:通过脚底动态触觉计测定的机械性触摸痛;将CD1小鼠进行坐骨神经的慢性压迫,在坐骨神经损伤后第3、4、5、6天注射所述抗体。观察期为第3天至第14天。使用盐水(sal)和小鼠免疫球蛋白(IgG,1.4mg/kg)作为阴性对照。结果以与损伤同侧的后爪的压力阈值的绝对值(克)表示。利用重复测定的方差分析(ANOVA)对数据进行统计学分析,其中“处理”因素和重复测定(天)有统计学意义, $p < 0.01$ 。在第4天至第14天,用抗-TrkA或抗-NGF处理的动物与对照组显著不同。

[0108] 图4:抗-TrkA单克隆抗体MNAC13(1.4mg/kg)和抗-NGF α D11抗体(1.4mg/kg)对神经病性疼痛的作用:通过脚底动态触觉计测定机械性触摸痛。将CD1小鼠进行坐骨神经的慢性压迫,在坐骨神经损伤后第3、4、5、6天LP.注射所述抗体。观察期为第3天至第14天。使用盐水(sal)和小鼠免疫球蛋白(IgG,1.4mg/kg)作为阴性对照。结果以百分比%表示(与损伤同侧的后爪与相应于对侧后爪的阈值压力比率)。利用重复测定的方差分析(ANOVA)对相应的绝对值进行统计学分析,其中“处理”因素和重复测定(天)有统计学意义, $p < 0.01$ (至少)。在第4天至第14天,用抗-TrkA或抗-NGF处理的动物与对照组显著不同。

[0109] 图5:抗-TrkA单克隆抗体MNAC13(2剂:0.9和2mg/kg)和抗-NGF单克隆抗体 α D11(2mg/kg剂量)对神经病性疼痛的作用的对比:通过脚底动态触觉计测定机械性触摸痛。将CD1小鼠进行坐骨神经的慢性压迫,在坐骨神经损伤后第3、4、5、6、7、8、9、10天I.P.注射所述抗体。观察期为第3天至第31天。使用小鼠免疫球蛋白(IgG,2mg/kg)作为阴性对照。结果以百分比%表示(与损伤同侧的后爪与相应于对侧后爪的阈值压力比率)。利用重复测定的方差分析(ANOVA)对相应的绝对值进行统计学分析,其中“处理”因素和重复测定(天)有统计学意义, $p < 0.01$ (至少)。从第5天(较高剂量的MNAC13)或者从第7天(较低剂量的MNAC13)直至观察最后一天(第31天),用MNAC13处理的动物与对照组显著不同。从第4天至第14天及从第21天至第31天直至观察最后一天(第31天),用 α D11处理的动物与对照组显著不同。

[0110] 图6:亲代(α D11)和人源化形式(Hu- α D11,人IgG4形式)抗-NGF中和抗体(测试1剂:2mg/Kg)对神经病性疼痛的作用对比:通过脚底动态触觉计测定机械性触摸痛;将CD1小鼠进行坐骨神经的CCI(慢性压迫性损伤),在坐骨神经损伤后第3、4、5、6、7、8、9、10天I.P.注射所述抗体。观察期为第3天至第31天。使用大鼠免疫球蛋白(IgG,2mg/kg)作为阴性对照。结果以百分比%表示(与损伤同侧的后爪与相应于对侧后爪的阈值压力比率)。利用重复测定的方差分析(ANOVA)对相应的绝对值进行统计学分析,其中“处理”因素和重复测定(天)有统计学意义, $p < 0.01$ (至少)。从第4天至第14天及从第21天至第31天直至观察最后一天(第31天),用 α D11或Hu- α D11处理的动物与对照组显著不同。

[0111] 方法

[0112] 单克隆抗体的产生

[0113] 根据上文揭示的标准方法,从杂交瘤上清中产生单克隆抗体 MNAC13 和 α D11 (Galfre and Milstein, 1981; Cattaneo et al., 1988; Cattaneo et al., 1999)。将含有每种抗体的所述上清进行沉淀 (29% 硫酸铵), 随后用 PBS IX (Spectra-Por 12/14K 膜, Spectrum) 进行透析并在琼脂糖蛋白 G 层析柱 (4-Fast Flow, Amersham Biosciences) 上进行亲和性层析。利用低 pH 溶液 (HCl, 5mM) 进行洗脱, 收集时进行中和。浓缩最终的洗脱物 (Amicon Ultra-15, 50K, Millipore) 以获得纯化的抗体制备物, 浓度为 1-5mg/ml。

[0114] 如先前所述 (专利申请 W0 05/061540, Covaceuszach et al., 2004) 产生 α D11 抗体的 Fab (抗原结合片段)。简而言之, 通过木瓜蛋白酶进行蛋白酶解, 随后进行离子交换层析纯化步骤及浓缩在流经液中收集的所述 Fab 片段, 从相应的全部单克隆抗体 (IgG 形式) 获得 Fab 片段。为了从仍存在的非常少量的未裂解的 IgG 中分离出 Fab 片段, 使用 FPLC 系统 (Pharmacia) 在 Superdex G75 层析柱 (Pharmacia) 上进行大小排阻层析, 随后进行最后的浓缩步骤。

[0115] 就两种抗体 (Hu- α D11 和 Hu-MNAC13) 的人源化形式 (IgG1/IgG1*/IgG4) 的而言, 它们也是如上述纯化的, 从每种抗体的重链 (pVH/CMVexpress) 和轻链 (pVL/CMVexpress) 的稳定共转染体的稳定转染的细胞系上清开始。所用载体在先前已经揭示 (专利申请 W005/061540)。通过用 G418 和霉酚酸双重选择获得稳定共转染的克隆。为了产生 Hu- α D11 的 IgG4 变体, 由于 pVH/CMVexpress 载体包含人 IgG1 的恒定部分, 将其用相应的 IgG4 的 Fc 区域置换 (从人淋巴细胞 RNA 中通过 RT-PCR 克隆)。IgG1* 变体 (= 具有 N297A 突变的 IgG1, 如 Bolt et al., 1993 所述) 通过位点定向诱变而产生。

[0116] 表面等离子共振研究

[0117] 使用 BIAcore 2000 仪器, 在具有氨基偶联的 CM5 芯片上进行试验。使用购自 BIAcore 的特定试剂盒进行偶联, 根据厂商指导进行偶联反应。

[0118] 将抗 -NGF 抗体固定在芯片上, 以渐减浓度注射小鼠 NGF (m-NGF, Alomone) 或者重组小鼠 proNGF (rm-proNGF), 获得结合曲线。

[0119] 除非特别指出, 则实验中使用的流速为 30 μ l / 分钟。在所有情况中均用 10mM 甘氨酸 pH 1.5 (10 μ L) 脉冲再生所述芯片。使用 PackageBIAevaluation 3.0 分析收集的数据。表观平衡常数 K_D 定义为 k_a/k_d 比率。

[0120] 在小鼠疼痛模型中的实验

[0121] 根据关于使用动物进行研究的 IASP 伦理委员会和意大利国内法 (DL 116/92, application of European Direction 86/609/EEC) 的指导方针, 对动物进行处理和操作。进行每种必需的尝试以使得动物的痛楚最小化, 并使用产生可靠科学数据所需的最少量的动物。

[0122] 甲醛测试

[0123] 对于初步的甲醛测试 (Porro and Cavazzuti, 1993), 使用 CD1 雄性小鼠 (Charles River Labs, Como, Italy), 在实验开始时体重为 35-40g。在其到达实验室后 (实验前至少 2 周), 将小鼠在恒温 (22 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C) 和相对湿度为 60% 下圈养在标准的透明塑料笼子中 (每笼 4 只), 定期光照 / 黑暗 (光照时间为 7 点至 19 点)。食物和水不加限制。在 9 点至 14 点之

间进行实验。为了进行甲醛测试,将一只动物置于透明的树脂玻璃笼子中(30×12×13cm),使其自由活动 30 分钟之后开始检测。在此适应阶段之后,将 20 μ l 甲醛溶液(于盐水中 5%)使用具备 26 号针头的微量注射器皮下(sc)注入小鼠右后爪的背面,并开始观察。将一面镜子置于笼子后面,在笼子前面放置一台摄像机,以可以不受阻碍地观察动物后爪。采用舔舐行为,即动物用于舔舐和/或咬扯注射的脚爪的时间总量,作为疼痛指数。连续记录 40 分钟舔舐行为,并在连续 5 分钟模块中计算(第 2 阶段相应于第 15-40 分钟模块,可以鉴定为与炎症相关疼痛)。另外,为了评价注射甲醛对自发行行为的作用,在甲醛测试期间还连续记录 40 分钟一般行为(在步行、直立和倚靠期间探索环境消耗的时间)及自己理毛行为(清洁面部和身体消耗的时间)。对于这些参数,在用抗 -NGF 抗体处理后未观察到明显差异。在该系列实验中,给予 Fab 抗体(抗原结合片段,每种抗体给予一次:12.5 μ g/动物)。

[0124] 在测试之前 45 分钟在每只小鼠右后爪的背面皮下(sc)注射抗 -NGF 抗体(亲代或人源化抗体)或者无关的 Fab,使用具备 26 号针头的微量注射器注射(注射体积=20 μ l)。每只动物仅进行一次处理。对每个对象所属的处理组进行盲试。通过 one-way ANOVA 单独分析甲醛测试特有的两个阶段。

[0125] 坐骨神经手术

[0126] 对体重为大约 35g 的雄性 CD1 小鼠进行麻醉(腹膜内注射 500mg/kg 水合氯醛),暴露右后腿的坐骨神经,根据 Bennett and Xie(1988)揭示的坐骨神经的慢性压迫损伤模型(CCI),利用缝线进行松散结扎。在坐骨神经的大腿骨上方水平的松散结扎诱导周围单一神经病变,特征在于热/机械性触摸痛和痛觉过敏。通过在 3 个不同但接近的位点结扎神经,在这种损伤后 3 天充分产生神经病变并持续 2-3 个月。

[0127] 药理学处理

[0128] 从损害后的第 3 天开始,给予完整形式(Mab)的在盐水溶液(载体)中稀释的抗 -NGF(α D11)阻断抗体或者抗 -TrkA(MNAC13)抗体,如表 1 所示。使用与所述阻断抗体相同剂量的小鼠或大鼠不相关的免疫球蛋白(IgG)(如果使用 2 剂,则使用较高剂量)或者盐水溶液作为对照。每个实验组包括 N = 10 只动物(除非另外明确指出)。

[0129] 表 1:给药方案和机械性触摸痛的测定

[0130]

抗体	剂量	给药 i. p.	触摸痛测量
MNAC13 α D11	50 μ g/ 小鼠 = 1.4mg/kg	4 次,在损伤后第 3、4、5、6 天	第 3-14 天
MNAC13 α D11	70 μ g/ 小鼠 = 2mg/kg	8 次,在损伤后第 3、4、5、6、7、8、 9、10 天	第 3-31 天
MNAC13	30 μ g/ 小鼠 = 0.9mg/kg		

[0131] 利用脚底动态触觉计(Ugo Basile)测定机械性触摸痛,如表 1 所示。认为第 3 天为基线。

[0132] 使用相同的方案评价两种抗体 MNAC13 和 α D11 的人源化形式的止痛作用。

[0133] 结果的统计学分析 (CCI 实验)

[0134] 以两种不同方式表示结果,均是足以使得动物缩回损伤同侧的后腿的阈值压力值(克)的绝对值,或者以后腿(同侧/对侧)的绝对值之间的比率的百分比表示。利用重复测定方差分析(ANOVA)对所得数值进行统计学分析,其中“处理”因素和重复测定(天)均有统计学意义, $p < 0.01$ 。

[0135] 结果

[0136] 结合

[0137] 进行 BIACORE 研究,目的是进一步鉴定 α D11 抗-NGF 抗体(及其人源化变体)的结合性质,这通过评估这种抗体与小鼠 NGF 和重组小鼠 pro-NGF 的结合亲和性而鉴定。图 1 示出这些实验的结果: α D11 抗体与 NGF 和 proNGF 的结合具有不同的反应动力学。用 Hu- α D11 也获得相似结果。

[0138] NGF 的极小解离常数代表所述抗体与其抗原非常紧密的结合,在抗体结合动力学中是非常独特的实例。通过对比抗-NGF 抗体与 NGF 及与 proNGF 的结合,可以评定在后者情况中所述亲和性几乎低 3 个数量级(纳摩尔,而不是皮摩尔)。认为 proNGF 与 NGF 的不同之处是一段额外的短氨基酸序列,结合亲和性中的这种不同完全是意外的并令人惊奇的。

[0139] 由于 proNGF 优选结合 p75(Lee, 2001),而成熟 NGF 对 TrkA 受体具有较高亲和性,因此可以认为 α D11 和 Hu α D11 是 TrkA-介导的途径的新的选择性抑制剂,与抗-NGF 中和抗体的临床应用特别相关。

[0140] 炎症性疼痛

[0141] 在小鼠中进行的关于甲醛引起的疼痛(炎症性疼痛)的第一系列体内实验表明:

[0142] (i) 与不相关的 Fab 相比, α D11 抗-NGF 抗体(Fab 形式)能明

[0143] 显降低疼痛应答(甲醛测试:第 2 阶段);

[0144] (ii) 通过用人源化变体(Hu- α D11,图 2)替代 α D11 可以获得相同结果。

[0145] 这意味着在相关的炎症性疼痛模型中,Hu- α D11 显示与 α D11 同样强力的止痛性质。

[0146] 神经病性疼痛

[0147] CCI 模型的结果示出两种阻断抗体 MNAC13 和 α D11(图 3 和图 4)具有显著的止痛作用。特别地,在 1.4mg/kg 剂量观察到两种抗体的相似结果。如图 3 和图 4 示出,这两种抗体从给予的第 2 天(第 4 天)开始具有止痛作用,在大约第 6 天达到最大作用,在全部观察期间直至第 14 天基本保持相同的止痛效力。如图 4 所示,以百分比表示结果(损伤同侧的后爪与相应于对侧后爪的阈值压力之间的比率),可以表明对于这两种阻断抗体的每一种而言最大百分比数值为大约 60%,对照组(IgG 和盐水)为大约 40%。

[0148] 当对动物观察 4 周直至第 31 天时,阻断 NGF-TrkA 系统的抗体的给予(图 5 和图 6)表明两个阶段作用。止痛效力第一阶段(从第 3 天至第 17 天,即直至在最后一次注射后一周)通过在大致第 11-12 天的最大作用而鉴定。在作用降低之后(直至第 17 天),观察到直至第 31 天的第二阶段止痛作用增加。因此可以区分 NGF/TrkA 阻断抗体的止痛作用的两个阶段:第一阶段(药理学作用),包括处理期间及最后一次注射抗体之后第一周(在此期间所述作用降低的那周,与抗体的血浓度一致);第二阶段为长期作用,可能需要新的基因表达,这种作用使得这些抗体具有“调节疾病”有效成分的独有特点(在神经病性疼痛领

域),即能深度调节疾病进程,与这种治疗中常用的产品的对症状的简单药理学作用不同。在图 5 中,对比 2 剂 MNAC13 抗-TrkA(2 和 0.9mg/Kg)与 α D11(2mg/kg)的止痛作用。结果以百分比表示。 α D11 效力的时间模式与 MNAC13 相似,尽管在第 17 天用 α D11 处理的动物与对照组(IgG)不可区分,而用 MNAC13 处理的那些动物仍明显不同($p < 0.01$)。从第 21 天开始, α D11 恢复止痛作用,在第 31 天达到与 MNAC13 相似的最终水平(大于 60%,与对照组 40%相比)。

[0149] 当不用 α D11 抗体而用其人源化形式变体(Hu- α D11)时,获得与上述基本相同的结果(每种抗体所用剂量为 2mg/kg),证实抗体的人源化形式与其亲代形式具有相同的止痛作用。所述抗体是用 W02005/061540 所述方法在轻链(SEQ ID No. 3)和重链(SEQ ID No. 4)可变区进行人源化的。为了构建完全人源化抗体,利用如上所述不同的恒定区(SEQ ID No. 5-8)。

[0150] 作为亲代和人源化抗体的止痛活性(CCI)的等价物的典型实例,图 6 示出了 α D11 与 Hu- α D11(IgG4 形式)之间的对比。

[0151] 基于此,可以说明 Hu- α D11 具有与其亲代形式相同的长期作用。

[0152] 参考文献

[0153] Bennett GJ,Xie YK(1988).Pain 33 :87-107.

[0154] Berardi N,Cellerino A,Domenici L,Fagiolini M,Pizzorusso T,Cattaneo A, Maffei L(1994)Proc Natl Acad Sci USA 91 :684-688.

[0155] Bolt S,Routledge E,Lloyd I,Chatenoud L,Pope H,Gorman SD,Clark M, Waldmann H(1993)Eur J Immunol 23 :403-411.

[0156] Burnstock G(2001)Trends Pharmacol Sci 22 :182-188.

[0157] Capsoni S,Ugolini G,Comparini A,Ruberti F,Berardi N,Cattaneo A(2000) Proc Natl Acad Sci USA 97 :6826-6831.

[0158] Cattaneo A,Rapposelli B,Calissano P(1988)J Neurochem 50 :1003-1010.

[0159] Cattaneo A,Capsoni S,Margotti E,Righi M,Kontsekova E,Pavlik P,Filipcik P,Novak M(1999)J Neurosci 19 :9687-9697.

[0160] Chuang HH,Prescott ED,Kong H,Shields S,Jordt SE,Basbaum AI,Chao MV, Julius D(2001)Nature 411 :957-962.

[0161] Covaceuszach S,Cattaneo A,Lamba D(2001) Acta Crystallogr D BiolCrystallogr 57 :1307-1309.

[0162] Covaceuszach S,Cassetta, A., Cattaneo A, Lamba D(2004)Acta Crystallogr DBiol Crystallogr 60 :1323-1327.

[0163] Covaceuszach S,Cattaneo A,Lamba D(2005)Proteins 58 :717-727.

[0164] Djouhri L,Dawbam D,Robertson A,Newton R,Lawson SN(2001)J Neurosci21 : 8722-8733.

[0165] Frade JM,Barde YA(1998)Bioessays 20 :137-145.

[0166] Galfre G,Milstein C(1981)Methods Enzymol 73 :3-46.

[0167] Gonfloni S(1995)Recombinant antibodies as structural probes for neurotrophins. SISSA PhD Thesis.

- [0168] Harpf C, Dabernig J, Humpel C(2002)Muscle Nerve 25 :612-615.
- [0169] Hempstead BL(2002)Curr Opin Neurobiol 12 :260-267.
- [0170] Holtzman DM, Li Y, Parada LF, Kinsman S, Chen CK, Valletta JS, Zhou J, LongJB, Mobley WC(1992)Neuron 9 :465-478.
- [0171] Horigonie K, Pryor JC, Bullock ED3 Johnson EM, Jr. (1993)J Biol Chem268 : 14881-14887.
- [0172] Hunt SP, Mantyh PW(2001)Nat Rev Neurosci 2 :83-91.
- [0173] Indo Y(2001)Hum Mutat 18 :462-471.
- [0174] Indo Y, Tsuruta M, Hayashida Y, Karim MA, Ohta K, Kawano T, Mitsubuchi H, Tonoki H, Awaya Y, Matsuda I(1996)Nat Genet 13 :485-488.
- [0175] Indo Y, Mardy S, Miura Y, Moosa A, Ismail EA, Toscano E, Andria G, Pavone V, Brown DL, Brooks A, Endo F, Matsuda I(2001)Hum Mutat 18 :308-318.
- [0176] Julius D, Basbaum AI(2001)Nature 413 :203-210.
- [0177] Kaplan DR(1998)Prog Brain Res 117 :35-46.
- [0178] Kawamoto K, AoId J3 Tanaka A3 Itakura A, Hosono H, Arai H, Kiso Y, MatsudaH(2002)J Immunol 168 :6412-6419.
- [0179] Khakh BS(2001)Nat Rev Neurosci 2 :165-174.
- [0180] Kryger GS, Kryger Z, Zhang F, Shelton DL, Lineaweaver WC, Buncke HJ(2001) J Hand Surg[Am]26 :635-644.
- [0181] Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL(2001)Science 294 :1945-1948.
- [0182] Levi-Montalcini R(1987)Science 237 :1154-1162.
- [0183] Levi-Montalcini R, Skaper SD, Dal Toso R, Petrelli L, Leon A(1996) TrendsNeurosci 19 :514-520.
- [0184] Levine JD(1998)Neuron 20 :649-654.
- [0185] Molnar M, Ruberti F, Cozzari C, Domenici L, Cattaneo A(1997)Neuroreport8 : 575-579.
- [0186] Molnar M, Tongiorgi E, Avignone E, Gonfloni S, Ruberti F, Domenici L, Cattaneo A(1998)Eur J Neurosci10 :3127-3140.
- [0187] Morisset V, Ahluwalia J, Nagy I, Urban L(2001)Eur J Pharmacol 429 :93-100.
- [0188] Nakatsuka T, Fume H, Yoshimura M, Gu JG(2002)J Neurosci 22 :1228-1237.
- [0189] Nilsson G, Forsberg-Nilsson K, Xiang Z, Hallbook F, Nilsson K, Metcalfe DD(1997)Eur J Immunol 27 :2295-2301.
- [0190] Porro CA, Cavazzuti M(1993)Spatial and temporal aspects of spinal cord andbrainstem activation in the formalin pain model.Prog Neurobiol 41 :565-607.
- [0191] Pesavento E, Margotti E, Righi M, Cattaneo A, Domenici L(2000)Neuron25 : 165-175.
- [0192] Ruberti F, Capsoni S, Comparmi A, Di Daniel E, Franzot J, Gonfloni S, Rossi G, Berardi N, Cattaneo A(2000)J Neurosci 20 :2589-2601.
- [0193] Saper CB, German DC, White CL, 3rd(1985)Neurology 35 :1089-1095.

- [0194] Saragovi HU, Gehring K(2000)Trends Pharmacol Sci 21 :93-98.
- [0195] Sevcik MA, Ghilardi JR, Peters CM, Lindsay TH, Halvorson KG, Jonas BM, Kubota K, Kuskowski MA, Boustany L, Shelton DL, Mantyh PW(2005)Pain115 :128-141.
- [0196] Shu X, Mendell LM(1999)Neurosci Lett 274 :159-162.
- [0197] Sivilotti L, Nistri A(1991)Prog Neurobiol 36 :35-92.
- [0198] Woolf CJ, Ma QP, Allchorne A, Poole S(1996)J Neurosci 16 :2716-2723.
- [0199] Zhu Z, Friess H, diMola FF, Zimmermann A, Graber HU, Korc M, Buchler MW(1999)J Clin Oncol 17 :2419-2428.

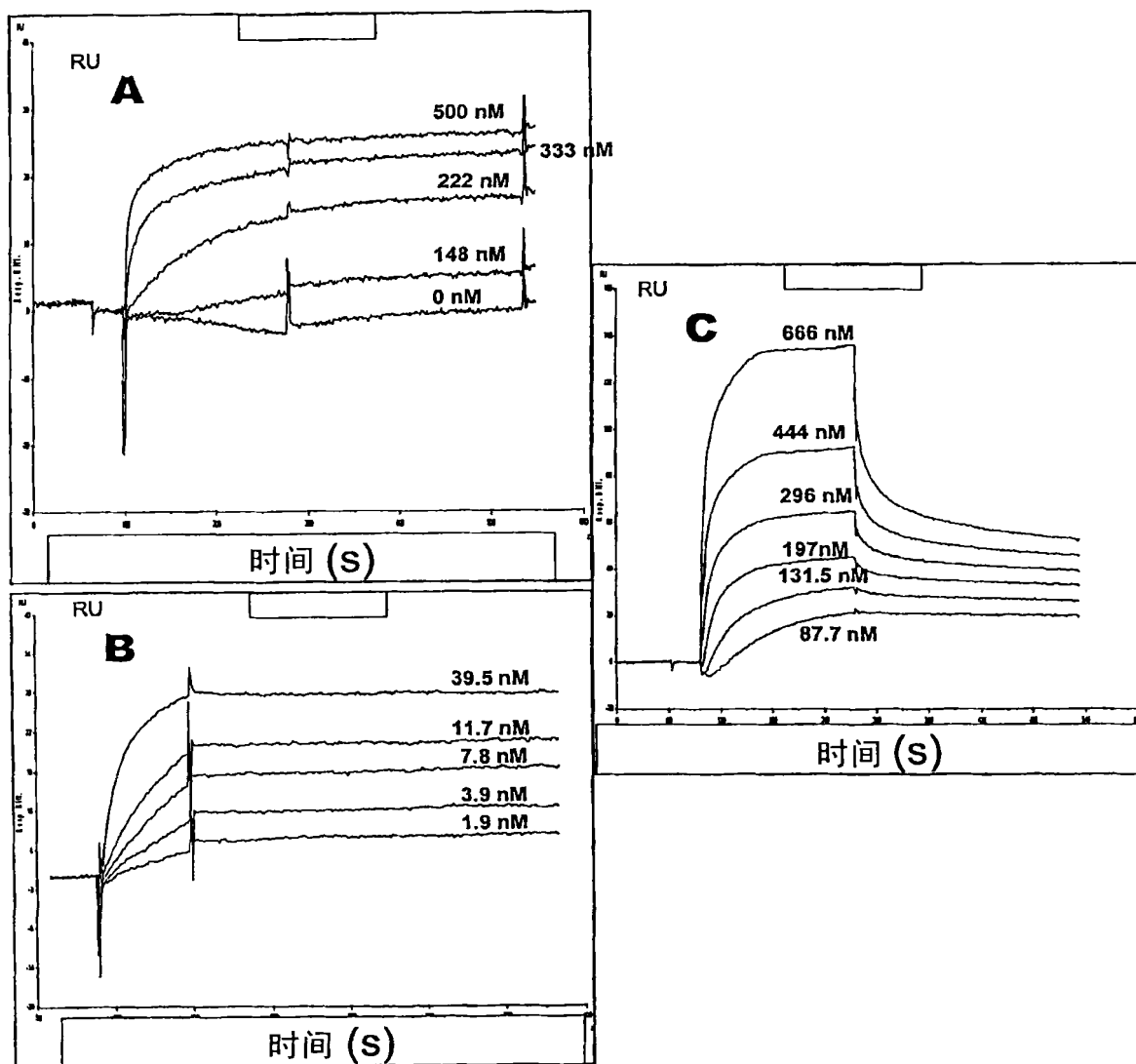


图1

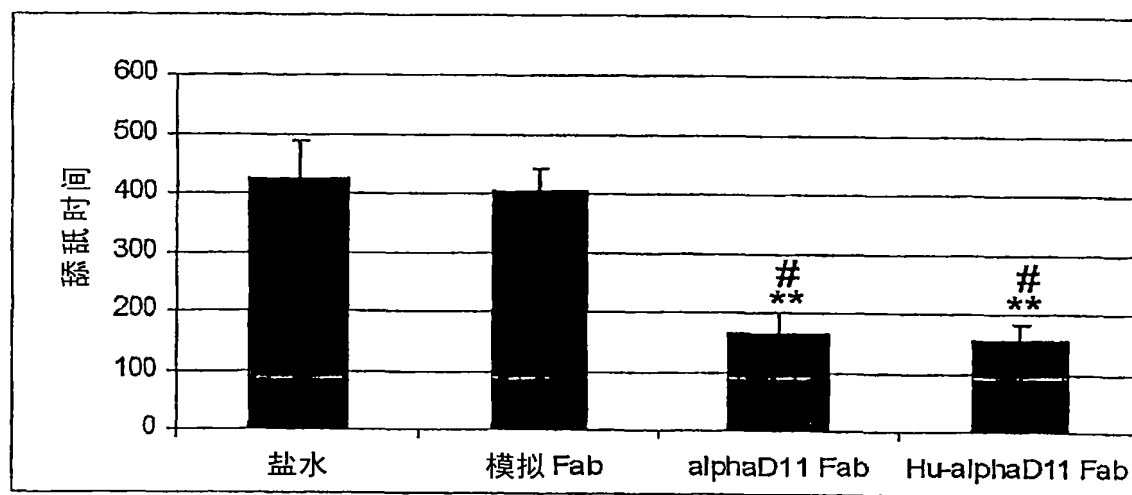


图2

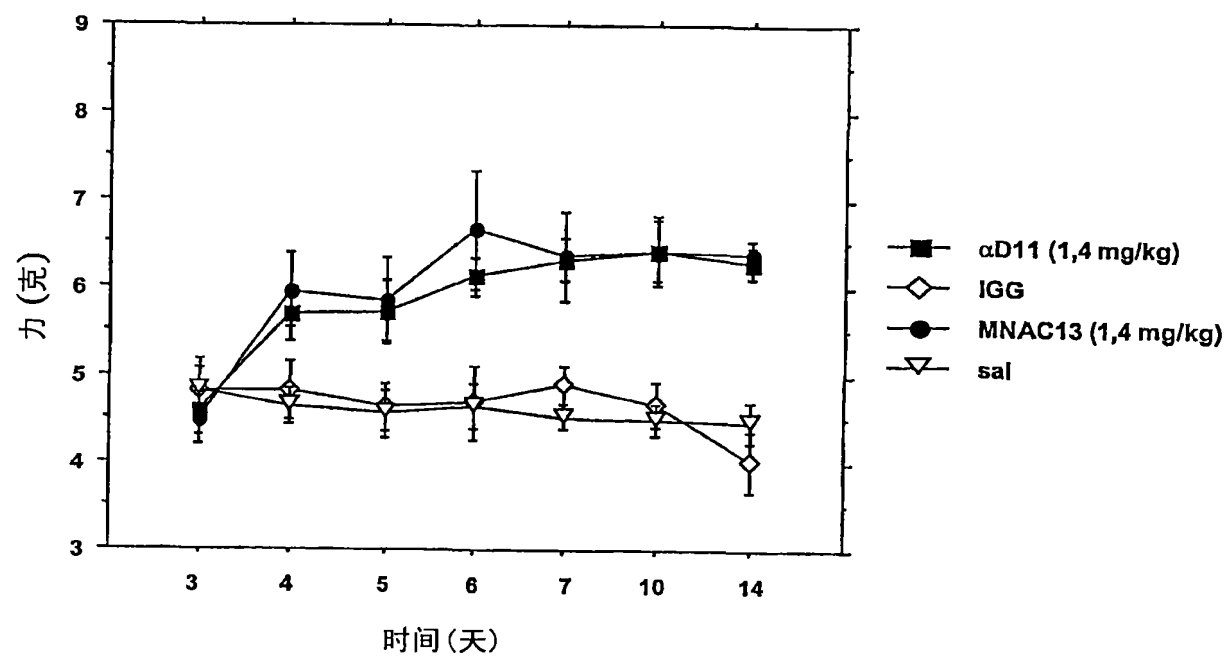


图3

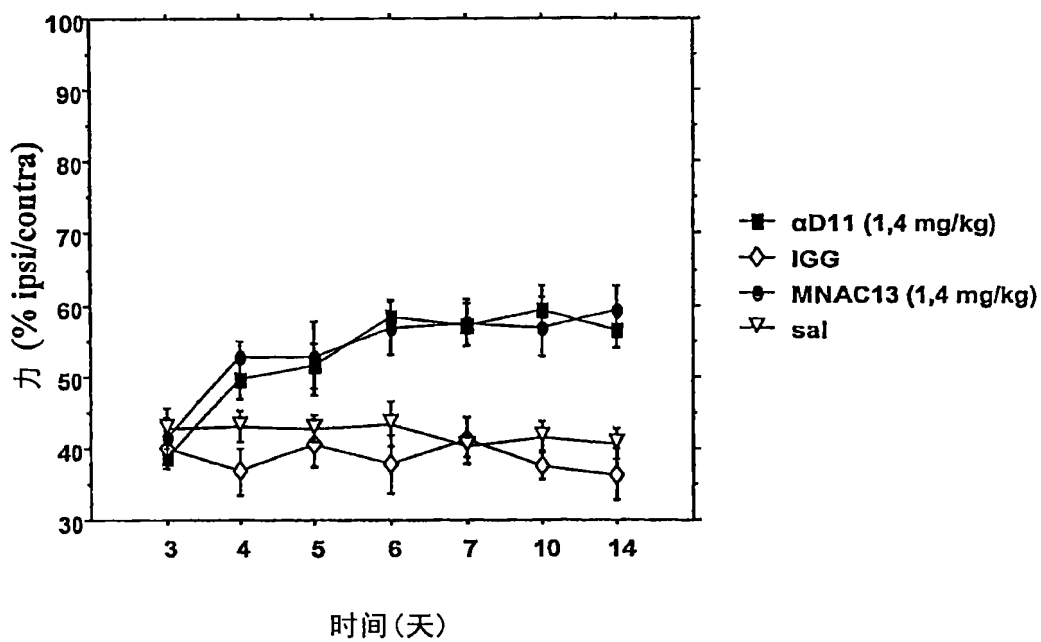


图4

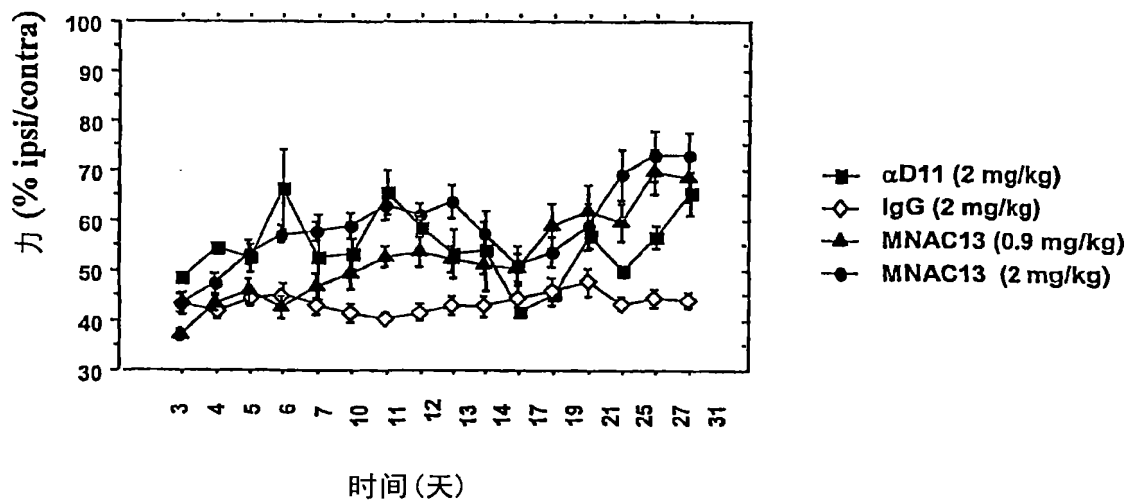


图5

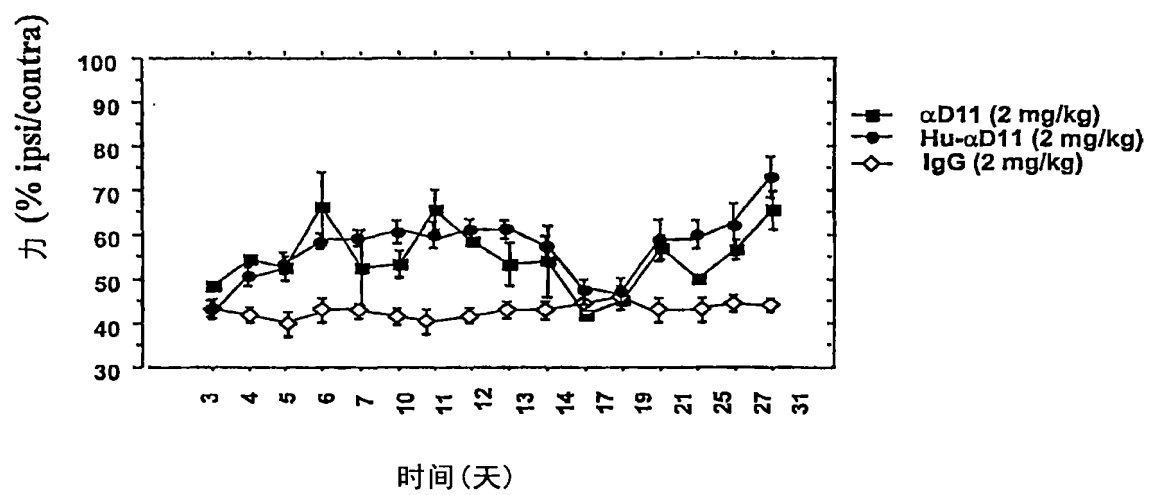


图6