



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108014335 A

(43)申请公布日 2018.05.11

(21)申请号 201711112956.0

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2009.12.21

A61K 39/395(2006.01)

(30)优先权数据

A61P 29/00(2006.01)

61/139,687 2008.12.22 US

A61P 19/02(2006.01)

61/164,491 2009.03.30 US

A61P 19/08(2006.01)

(62)分案原申请数据

200980151639.7 2009.12.21

(71)申请人 墨尔本大学

地址 澳大利亚维多利亚

(72)发明人 约翰·艾伦·汉密尔顿

安德鲁·大卫·库克

(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限

责任公司 11287

代理人 李琳

权利要求书1页 说明书25页

序列表13页 附图3页

(54)发明名称

粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的拮抗剂的
用途

(57)摘要

本发明总体上涉及粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的拮抗剂的用途。具体是涉及该拮抗剂在制备用于在个体中治疗疼痛的药物中的用途，其中所述拮抗剂是对GM-CSF特异性的抗体或是对所述GM-CSF受体特异性的抗体，以及其中所述疼痛选自由骨关节炎疼痛、类风湿性关节炎疼痛和炎性疼痛组成的群组。依照本发明，提出了GM-CSF的拮抗剂在疼痛的治疗中是有效的。GM-CSF的拮抗剂包括，但不局限于，对GM-CSF或GM-CSF受体特异性的抗体。本发明还提供了用于在某些疾病模型中试验拮抗剂的转基因动物，比如GM-CSF敲除的小鼠。

1. 一种GM-CSF的拮抗剂在制备用于在个体中治疗疼痛的药物中的用途,其中所述拮抗剂是对GM-CSF特异性的抗体或是对所述GM-CSF受体特异性的抗体,以及其中所述疼痛选自由骨关节炎疼痛、类风湿性关节炎疼痛和炎性疼痛组成的群组。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述个体是人。
3. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述疼痛是类风湿性关节炎疼痛。
4. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述疼痛是骨关节炎疼痛。
5. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述疼痛是炎性疼痛。
6. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述拮抗剂是对所述GM-CSF受体特异性的抗体。
7. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述拮抗剂是对GM-CSF特异性的抗体。
8. 根据权利要求7所述的用途,其中所述抗体包含与SEQ ID NO.:3所示氨基酸序列具有至少90%同源性的重链可变区和与SEQ ID NO.:4所示氨基酸序列具有至少90%同源性的轻链可变区。
9. 根据权利要求7所述的用途,其中所述抗体包含与SEQ ID NO.:3所示氨基酸序列具有至少95%同源性的重链可变区和与SEQ ID NO.:4所示氨基酸序列具有至少95%同源性的轻链可变区。
10. 根据权利要求7所述的用途,其中所述抗体包含SEQ ID NO.:3所示的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO.:4所示的轻链可变区氨基酸序列。
11. 一种包含GM-CSF的拮抗剂的组合物在制备用于在个体中治疗疼痛的药物中的用途,其中所述拮抗剂是对GM-CSF特异性的抗体或是对所述GM-CSF受体特异性的抗体,以及其中所述疼痛选自由骨关节炎疼痛、类风湿性关节炎疼痛和炎性疼痛组成的群组,以及其中所述组合物进一步包含一种或多种药学上可接受的载体和/或稀释剂。
12. 根据权利要求11所述组合物的用途,其中所述抗体包含与SEQ ID NO.:3所示氨基酸序列具有至少90%同源性的重链可变区和与SEQ ID NO.:4所示氨基酸序列具有至少90%同源性的轻链可变区。
13. 根据权利要求11所述组合物的用途,其中所述抗体包含与SEQ ID NO.:3所示氨基酸序列具有至少95%同源性的重链可变区和与SEQ ID NO.:4所示氨基酸序列具有至少95%同源性的轻链可变区。
14. 根据权利要求11所述组合物的用途,其中所述抗体包含SEQ ID NO.:3所示的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO.:4所示的轻链可变区氨基酸序列。

粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的拮抗剂的用途

[0001] 本申请是申请日为2009年12月21日、申请号为200980151639.7、发明名称为“疼痛治疗”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 本申请要求于2008年12月22日提交的美国临时专利申请第61/139,687号、和于2009年3月30日提交的美国临时专利申请第61/164,491号的权益,这两项申请在此以其整体通过引用并入。

发明领域

[0003] 本发明总体上涉及疼痛的治疗和预防的方法。依照本发明,提出了GM-CSF的拮抗剂在疼痛的治疗中是有效的。GM-CSF的拮抗剂包括,但不局限于,对GM-CSF或GM-CSF受体特异性的抗体。本发明还提供了用于在某些疾病模型中试验拮抗剂的转基因动物,比如GM-CSF敲除的小鼠。

[0004] 发明背景

[0005] 疼痛

[0006] 任何类型的疼痛在美国是医师咨询的最常见原因,其促使每年一半的美国人寻求医疗护理。其是许多医疗病症中的主要症状,严重干扰了人的生活质量和一般机能。根据持续时间、强度、类型(钝痛、灼痛或刺痛)、来源或体内部位,诊断以用多种方式来表征疼痛为基础。通常不进行治疗而疼痛停止或疼痛对诸如休息或服用止痛药的简单措施响应,则其被称作急性疼痛。但其还可变为难治的并可发展至称作慢性疼痛的病症,其中疼痛不再被认为是症状而其本身被认为是疾病。

[0007] 可根据许多方案和状况对疼痛进行分类。有两种基本的疼痛类型:急性的和慢性的。急性疼痛发生持续短期时间并与暂时疾患相关。然而,其常为警报信号:某些可能出错了。慢性疼痛是持续的且是复发的。其与慢性疾病相关并是它们的症状之一。疼痛强度不仅取决于引起疼痛的刺激源的类型,还取决于疼痛的主观感觉。除了广泛的主观感觉之外,一些疼痛类型已根据以下被分类:

[0008] • 引起疼痛的刺激源

[0009] • 疼痛的持续时间

[0010] • 疼痛的特征(强度、部位等)

[0011] 另一个分类系统如下:

[0012] • 咬痛。以恒定强度持续。其通常由于运动而恶化。

[0013] • 搏动性疼痛。典型的是偏头痛。其是由大脑血管的扩张和收缩引起的。

[0014] • 刺痛。强烈的且严重的。其是由机械刺激源引起的。

[0015] • 灼痛。恒定的、如灼烧一样的感觉,例如由胃灼热引起的疼痛的类型。

[0016] • 压痛。由血管或肌肉的收缩引起的。

[0017] 还存在疼痛的具体类型:

[0018] • 肌肉痛。也称作肌痛,这种疼痛涉及肌肉并且在过度用力后或炎症期间发生。

[0019] • 绞痛。由某些器官的肌肉收缩引起,比如月经期过程中的子宫。通常自然循环。

[0020] • 牵涉痛。当在除疼痛实际发生的部位之外的部位感觉到疼痛的感觉时发生,取决于大脑如何解析其从机体接收的信息。

[0021] • 手术后(Post-surgical or Post-operative)疼痛。在手术后发生且由于手术过程的损伤而引起。

[0022] • 骨癌疼痛。某些类型的癌症可进展为疼痛的骨疾患,被称为转移性骨疾病,所述癌症例如前列腺癌、乳腺癌或其他软组织肿瘤。

[0023] 疼痛治疗的标准护理

[0024] 有多种方式治疗疼痛。治疗根据疼痛的起因而不同。主要的治疗选择如下:

[0025] 醋氨酚(Aacetaminophen):泰诺(Tylenol, Acetaminophen)被用来治疗疼痛。与一些其它用于疼痛的药物不同,泰诺没有抗炎作用。然而通常,在慢性疼痛的情况下,在疼痛的部位处没有炎症,且因此泰诺可作为合适的治疗选择。当适当使用的时候泰诺是安全的,但当过量使用时可能是危险的。并且,当与某些其它药物一起使用时,泰诺可导致不想要的效应。

[0026] 非甾体抗炎药物(NSAID):在急性疼痛或患有慢性疼痛的患者突然发作的情况下,NSAID(比如布洛芬(Ibuprofen)、摩特林(Motrin)、萘普生钠(Aleve)等)是最有益的。NSAID也擅于治疗炎症病症,所述炎症包括腱炎、滑囊炎和关节炎。通常,因为考虑到发展到肠胃问题,对于患有慢性疼痛的患者,NSAID使用是受限制的。而较新型的,所谓的COX-2抑制物,比如西乐葆(Celebrex),其被设计为避免这种并发症,当使用这些药物较长时间时仍要加以注意。

[0027] 皮质类固醇:如NSAID一样,皮质类固醇是有效的抗炎药物,且最适用于急性疼痛或慢性炎症问题的突然发作。皮质类固醇可口服(比如美卓乐(Medrol),强的松(Prednisone)),或可注射到软组织或关节中(可的松(cortisone)注射液)。

[0028] 麻醉药:如果疼痛不能以其它方式被控制,则应考虑麻醉药。许多麻醉药可能是危险的且是成瘾的。虽然麻醉药对于急性疼痛是有用的,但它们仍具有明显的副作用。短效类型的这些药物可导致过量使用并形成耐药性。长效类型具有较少的副作用,并且对慢性疼痛具有更好的控制。当使用麻醉药较长时间而不逐渐减少剂量时或如果为除了疼痛以外的原因服用药物,麻醉药可成瘾。

[0029] 抗惊厥药:抗惊厥药物是起减轻疼痛作用的药物类别。这些药物改变神经功能和传递到脑的信号。用于神经疼痛的最常见的处方抗惊厥药物叫做加巴喷丁(Neurontin/Gabapentin)。新近出现的另一种特别用于治疗纤维肌痛的选择,叫做乐瑞卡(Lyrica)(普瑞巴林(Pregabalin))。

[0030] 局部麻醉药:局部麻醉药能够向一个区域提供暂时性的疼痛缓解。当在慢性疼痛下使用时,局部麻醉药常用作疼痛区域的局部贴片。Lidoderm是施用于皮肤并降低该区域的敏感性的贴片。

[0031] 以上所述的所有治疗选择都具有缺点、副作用或局限于某种疼痛类型的使用。因此,对于疼痛的治疗仍有高度未满足的医疗需求。

[0032] GM-CSF

[0033] 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)是作为白细胞生长因子行使功能的细胞因子。GM-CSF刺激干细胞产生粒细胞(中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞)和单核

细胞。单核细胞离开循环并迁移到组织中,然后它们开始成熟为巨噬细胞。因此,通过天然免疫/炎症级联反应中的部分,少量的巨噬细胞的激活能够快速地导致它们数量的增加,这是抵抗感染的关键过程。发现GM-CSF的活性形式在胞外作为同源二聚体。尤其是,GM-CSF已被鉴定为如类风湿性关节炎(RA)的自身免疫疾患中的炎性调节物,导致促炎性细胞因子、趋化因子和蛋白酶产生的增加,并且因此最终导致关节破坏。

[0034] GM-CSF是参与人体和动物体中多种过程的细胞因子。并且,诸如炎性疾病的某些疾病和病状近来与GM-CSF相关,而且GM-CSF作为干预的潜在点而被提出。

[0035] 发明概述

[0036] 本发明首次公开了GM-CSF还是用于疼痛治疗的有效靶标。本发明首次证实了GM-CSF是用于疼痛治疗的有效靶标。该发现是新的,且现有技术没有教导、提出或提供对疼痛治疗中这样的干预点的任何合理解释。因此本发明提供了,例如,用于治疗受治疗者中的疼痛的方法,所述方法包括向所述受治疗者施用有效量的GM-CSF拮抗剂的步骤。

[0037] 在另一方面,本发明涵盖了用于预防受治疗者中的疼痛的方法,所述方法包括向所述受治疗者施用有效量的GM-CSF拮抗剂的步骤。

[0038] 在另一方面,本发明涉及包括GM-CSF拮抗剂的组合物,所述GM-CSF拮抗剂能够在患有疼痛或怀疑患有疼痛的受治疗者中拮抗GM-CSF的激活、增殖、诱导细胞生长和/或细胞存活的能力,所述组合物还包含一种或多种药学上可接受的载体和/或稀释剂。

[0039] 在另一方面,本发明涉及包含用于疼痛治疗的GM-CSF拮抗剂的组合物,所述组合物还包含一种或多种药学上可接受的载体和/或稀释剂。

[0040] 在本发明的具体的方面,GM-CSF拮抗剂是对GM-CSF特异性的抗体。

[0041] 在本发明的可选的方面,GM-CSF拮抗剂是对GM-CSF受体特异性的抗体。

[0042] 在其它方面,本发明涉及GM-CSF拮抗剂在制备疼痛治疗药物中的用途。

[0043] 在其它的方面,本发明提供了用于疼痛治疗的GM-CSF拮抗剂。

[0044] 在本发明的具体方面,所述疼痛是手术后疼痛。在本发明的可选方面,所述疼痛是骨癌疼痛。在本发明的又一些可选方面,GM-CSF拮抗剂具有止痛作用。

[0045] 在本发明的具体方面,所述疼痛是炎性疼痛。

[0046] 在另一方面,本发明提供了具有GM-CSF-/-基因型的基因工程哺乳动物。在具体的方面所述哺乳动物是小鼠。

[0047] 贯穿本说明书,除非上下文另外要求,词语“包含”、“具有”和“包括”和它们相应的变化形式,比如“包含(comprises/comprising)”,“具有(has/having)”,“包括(includes/including)”,将被理解为表示包含指定的要素或整数或要素或整数的组,但并不排除任何其它的要素或整数或要素或整数的组。

[0048] 附图简述

[0049] 图1显示了在OA的小鼠模型中利用GM-CSF抗体的治疗性处理的膝关节组织学评分。Lat.=外侧。Med.=内侧。结果表示为平均值±SEM。对于所有区域,除股骨内侧外,在利用抗GM-CSF抗体处理的小鼠中与对照小鼠相比观察到较少的疾病。

[0050] 图2显示了评估双足平衡测痛仪(incapacitance meter.)中后肢重量分布的实验的结果。从OA诱导以后第27天开始,数据具有显著性(非配对t检验),如图中所示。

[0051] 图3显示了证明GM-CSF拮抗剂在炎性疾病(由mBSA/IL1诱导的单关节炎)的治疗中

的效力的实验的结果。描绘了治疗后第7天时膝关节的临床评分。实心条显示了对于C57BL/6小鼠所记录的结果,空心条是对于GM-CSF敲除小鼠的结果。左侧:利用吲哚美辛(indomethacin)处理的小鼠。右侧:未接受吲哚美辛处理的小鼠。

[0052] 图4显示了证明GM-CSF拮抗剂在炎性疼痛(由mBSA/IL1诱导的单关节炎)的治疗中的效力的实验的结果。所显示的是双足平衡测痛仪中所测量的重量分布,其在患有mBSA/IL1诱导的单关节炎的小鼠中作为疼痛的量度。结果表示为注射肢体/对照肢体*100。

[0053] 图5显示了证明GM-CSF拮抗剂在炎性疼痛治疗中的效力的实验的结果。所显示的是将CFA注射到左(L)足垫中之后按爪的厚度的变化所测量的炎症的水平。右(R)足垫是正常的。在每次读数前1小时利用吲哚美辛(1mg/kg)腹膜内处理“+吲哚美辛”组。N=12只小鼠/组。

[0054] 图6显示了证明GM-CSF拮抗剂在炎性疼痛治疗中的效力的实验的结果。所显示的是在双足平衡测痛仪中测量的作为将CFA注射到左足垫中之后的疼痛量度的重量分布。右足垫是正常的。在每次读数前1小时利用吲哚美辛(1mg/kg)腹膜内处理+吲哚美辛组。结果表示为注射肢体/对照肢体×100。N=12只小鼠/组。

[0055] **发明详述**

[0056] 本发明证明了GM-CSF是用于疼痛治疗的有效靶标。在这方面,本发明在一方面提供了使用GM-CSF拮抗剂在疼痛领域产生预防性或治疗性益处的方法。

[0057] 本发明提供了治疗性方法,所述方法包括向需要这种治疗的受治疗者施用治疗有效量的GM-CSF拮抗剂。如本文所用的“治疗有效量”或“有效量”指引起期望的生物反应所需要的GM-CSF拮抗剂的量。依照本发明,治疗有效量是治疗和/或预防疼痛所需要的GM-CSF拮抗剂的量。

[0058] 在某些方面,本发明提供了用于手术后疼痛的治疗的方法。在另外的方面,本发明提供了用于骨癌疼痛的治疗的方法。在又一些方面,本发明提供了具有镇痛作用的GM-CSF拮抗剂。在另一些方面,本发明提供了用于类风湿性关节炎的治疗的方法。GM-CSF拮抗剂能够抑制或阻遏与类风湿性关节炎相关的疼痛。在另外的方面,本发明提供了用于在受治疗者中降低类风湿性关节炎疼痛的发生率、改善类风湿性关节炎疼痛、抑制类风湿性关节炎疼痛、减轻类风湿性关节炎疼痛,和/或延迟类风湿性关节炎疼痛的发生、发展或进展的方法,所述方法包括向受治疗者施用有效量的GM-CSF拮抗剂。在其它的方面,本发明提供了通过向个体施用有效量的GM-CSF拮抗剂而在个体中用于预防或治疗骨关节炎疼痛的方法。在另一方面,本发明提供了在个体中用于治疗与类风湿性关节炎相关的炎性恶病质(重量减少)的方法,所述方法包括施用有效量的GM-CSF拮抗剂。在另一方面,本发明提供了用于在个体中降低骨关节炎疼痛的发生率、改善骨关节炎疼痛、抑制骨关节炎疼痛、减轻骨关节炎疼痛,和/或延迟骨关节炎疼痛的发生、发展或进展的方法,所述方法包括向个体施用有效量的GM-CSF拮抗剂。

[0059] “减轻”疼痛(比如类风湿性关节炎疼痛或骨关节炎疼痛)或疼痛的一种或多种症状意思是在利用根据本发明的GM-CSF拮抗剂治疗的个体或个体的集合中减少手术后疼痛的一种或多种不希望的临床表现的程度。

[0060] 在某些方面,在施用GM-CSF拮抗剂后约24小时内疼痛缓解。在其它的方面,在施用GM-CSF拮抗剂后约4天内疼痛缓解。

[0061] 如本文所用的“GM-CSF拮抗剂”包括广义的GM-CSF拮抗剂；包括抑制GM-CSF的活性或功能或通过任何其它方式对GM-CSF发挥治疗作用的任何分子。术语GM-CSF拮抗剂包括，但不局限于，与GM-CSF特异性结合的抗体、对GM-CSF特异性的抑制性核酸或对GM-CSF特异性的有机分子。还在术语GM-CSF拮抗剂的含义内的是与GM-CSF受体特异性结合的抗体、对GM-CSF受体特异性的抑制性核酸或对GM-CSF受体特异性的有机分子。

[0062] 抑制性核酸包括，但不局限于，反义DNA、三链结构寡核苷酸、外部指导序列、siRNA和微小RNA。有用的抑制性核酸包括使编码GM-CSF的RNA的表达与对照相比降低至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%的那些。抑制性核酸和产生它们的方法是本领域中熟知的。siRNA设计软件是可得到的。

[0063] 对GM-CSF或GM-CSF受体特异性的有机分子(SMOL)可通过天然产物筛选或化学文库筛选来鉴定。典型地，SMOL的分子量在500道尔顿以下，更典型地从160至480道尔顿。SMOL的其它典型性质是以下所列的一种或多种：

[0064] • 分配系数 $\log P$ 在从-0.4到+5.6的范围

[0065] • 摩尔折射率为从40到130

[0066] • 原子的数目为从20到70

[0067] 关于综述，参见Ghose等人，J Combin Chem:1:55-68,1999和Lipinski等人，Adv Drug Del Rev:23:3-25,1997。

[0068] 优选地，用于本发明的GM-CSF拮抗剂是对GM-CSF特异性或对GM-CSF受体特异性的抗体。这样的抗体可以是任何类型，比如小鼠抗体、大鼠抗体、嵌合抗体、人源化抗体或人类抗体。本文的“人类”抗体或功能性的抗体片段被定义为非嵌合的（例如，非“人源化的”）且非（全部地或部分地）来自非人类物种的抗体。人类抗体或功能性的抗体片段可来源于人类或可以是合成的人类抗体。本文中的“合成人类抗体”被定义为具有全部地或部分地从基于分析已知的人类抗体序列的合成序列计算机模拟衍生的序列的抗体。人类抗体序列或其片段的计算机模拟设计可通过诸如分析人类抗体或抗体片段序列的数据库并利用所获得的数据设计多肽序列来实现。人类抗体或功能性的抗体片段的另一实例是由从人类来源的抗体序列的文库（即，基于取自人类天然来源的抗体的这种文库）中分离的核酸所编码的一种。

[0069] “人源化抗体”或功能性的抗体片段在本文定义为以下抗体：(i) 来源于非人类来源（例如，具有异源免疫系统的转基因小鼠），该抗体基于人类种系序列；或(ii) 嵌合的，其中可变区来源于非人类来源且恒定区来源于人类来源，或(iii) CDR移植的，其中可变区的CDR来自非人类来源，而可变区的一个或多个构架是人类来源的且恒定区（如果有的话）是人类来源的。

[0070] 术语“嵌合的抗体”或功能性的嵌合抗体片段在本文被定义为具有来源于，或对应于在一种物种中得到的序列的抗体恒定区，和来源于另外的物种的抗体可变区的抗体分子。优选地，抗体恒定区来源于，或对应于，在人类中得到的序列，例如，在人类种系或体细胞中得到的序列，且抗体可变区（例如，VH、VL、CDR或FR区）来源于在非人类动物中得到的序列，所述非人类动物例如，小鼠、大鼠、兔或仓鼠。

[0071] 如本文所用的，如果抗体能够在抗原（此处为GM-CSF，或可选地，GM-CSF受体）和一种或多种参照抗原之间进行区别，则这种抗体“特异性结合（binds specifically to/

specifically binds to)"这种抗原、是对这种抗原“特异性”的或“特异性识别”这种抗原，因为结合特异性不是绝对的，而是相对的性质。参照抗原可以是一种或多种密切相关的抗原，其被用作参照点，例如，IL3、IL5、IL-4、IL13或M-CSF。以其最普遍的形式（且当没有提及确定的参照时），“特异性结合”指按照例如根据以下的方法之一所测定的，抗体在感兴趣的抗原和无关的抗原之间进行区别的能力。这样的方法包括，但不局限于，蛋白质印迹（Western blots）、ELISA检验、RIA检验、ECL检验、IRMA检验和肽扫描。例如，可进行标准ELISA分析。可通过标准显色（例如，以辣根过氧化物对第二抗体进行显色和以过氧化氢对四甲基联苯胺进行显色）来进行评分。通过光密度（例如，在450nm处）对某些孔中的反应进行评分。典型的背景（=阴性反应）可为0.10D；典型的阳性反应可为10D。这意为阳性/阴性差异可为10倍以上。通常，并不利用单一参照抗原，而是利用一组约3至5个诸如奶粉、BSA、转铁蛋白或类似物的无关抗原，来进行结合特异性的测定。此外，“特异性结合”可涉及抗体在其靶抗原的不同部分之间进行区别的能力，例如，GM-CSF或GM-CSF受体的不同结构域或区域之间，或GM-CSF或GM-CSF受体的一个或多个关键氨基酸残基或氨基酸残基的片段之间。

[0072] 并且，如本文所用的，“免疫球蛋白”（Ig）在本文中被定义为属于IgG、IgM、IgE、IgA或IgD类（或其任何亚类）的蛋白，且包括所有常规已知的抗体和其功能性片段。抗体/免疫球蛋白的“功能性片段”在本文中被定义为保留抗原结合区域的抗体/免疫球蛋白的片段（例如，IgG的可变区）。抗体的“抗原结合区”通常在抗体的一个或多个高变区中得到，即，CDR-1、CDR-2和/或CDR-3区域；然而，可变“构架”区可能也在抗原结合中具有重要作用，比如通过为CDR提供支架。优选地，“抗原结合区”包括可变轻（VL）链的至少氨基酸残基4到103和可变重（VH）链的氨基酸残基5到109，更优选地VL的氨基酸残基3到107和VH的4到111，且尤为优选地是完整的VL和VH链（VL的氨基酸第1位到第109位和VH的第1位到第113位；根据W097/08320编号）。用于本发明的优选的免疫球蛋白的类是IgG。本发明的“功能性片段”包括F(ab')₂片段、Fab片段、scFv的结构域或包含单一免疫球蛋白可变域的构建物或单一结构域抗体多肽，例如，单一重链可变域或单一轻链可变域。可对F(ab')₂或Fab进行改造以使C_{H1}和C_L结构域之间发生的分子间二硫键相互作用最小化或将其完全去除。

[0073] 本发明的抗体可来源于基于已在计算机模拟中设计且由合成产生的核酸所编码的氨基酸序列的重组抗体文库。抗体序列的计算机模拟设计可通过诸如分析人类序列的数据库并利用所获得的数据设计多肽序列来实现。用于设计和获得计算机模拟产生的序列的方法在例如以下中被描述：Knappik等人，J.Mol.Biol.296:57,2000；Krebs等人，J.Immunol.Methods..254:67,2001, Rothe等人，J.Mol.Biol.376:1182,2008和美国专利第6,300,064号，授予Knappik等人2000同前，其在此以其整体通过引用并入。

[0074] 对GM-CSF特异性的任何抗体可用于本发明。示例性的抗体在专利US 11/914,599中被公开，其以其整体通过引用并入。其它示例性的抗体包括包含如SEQ ID NO:1中所描绘的重链可变区的氨基酸序列或如SEQ ID NO:2中所描绘的轻链可变区的氨基酸序列的抗体。另一些示例性抗体包括来源于包含如SEQ ID NO:1中所描绘的重链可变区或如SEQ ID NO:2中所描绘的轻链可变区的氨基酸序列的抗体。另一些示例性抗体包括与包含如SEQ ID NO:1中所描绘的重链可变区或如SEQ ID NO:2中所描绘的轻链可变区的氨基酸序列的抗体具有相同特异性和/或结合相同的表位的抗体。另一些示例性抗体包括包含与SEQ

ID NO:1中所描绘的序列至少70%、至少80%、至少90%或至少95%同源的重链可变区的抗体。另一些示例性抗体包括包含与SEQ ID NO:2中所描绘的序列至少70%、至少80%、至少90%或至少95%同源的轻链可变区的抗体。

[0075] SEQ ID NO.1:

[0076] Met Glu Leu Ile Met Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly Val His
 [0077] Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
 [0078] Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
 [0079] Tyr Asn Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Asp Trp
 [0080] Ile Gly Tyr Ile Ala Pro Tyr Ser Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Glu
 [0081] Phe Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 [0082] Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
 [0083] Cys Ala Arg Arg Asp Arg Phe Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 [0084] Thr Thr Leu Arg Val Ser Ser Val Ser Gly Ser

[0085] SEQ ID NO.2:

[0086] Met Gly Phe Lys Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Tyr Met Leu
 [0087] Leu Trp Leu Ser Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Ile Gln Ser Gln
 [0088] Lys Phe Val Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys
 [0089] Ala Ser Gln Asn Val Gly Ser Asn Val Ala Trp Leu Gln Gln Lys Pro
 [0090] Gly Gln Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Ser Gly
 [0091] Arg Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile
 [0092] Leu Thr Ile Thr Thr Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys
 [0093] Gln Gln Phe Asn Arg Ser Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
 [0094] Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
 [0095] Ser Ser Lys Gly Glu Phe

[0096] 可用于本发明的可选的示例性抗体是包含如SEQ ID NO:3中所描绘的重链可变区的氨基酸序列或如SEQ ID NO:4中所描绘的轻链可变区的氨基酸序列的抗体。其它的示例性抗体包括来源于包含如SEQ ID NO:3中所描绘的重链可变区或如SEQ ID NO:4中所描绘的轻链可变区的氨基酸序列的抗体的抗体。另一些示例性的抗体包括与包含如SEQ ID NO:3中所描绘的重链可变区或如SEQ ID NO:4中所描绘的轻链可变区的氨基酸序列的抗体具有相同的特异性和/或结合相同的表位的抗体。另一些示例性抗体包括包含与SEQ ID NO:3中所描绘的序列至少70%、至少80%、至少90%或至少95%同源的重链可变区的抗体。另一些示例性抗体包括包含与SEQ ID NO:4中所描绘的序列至少70%、至少80%、至少90%或至少95%同源的轻链可变区的抗体

[0097] SEQ ID NO.3:重MOR

[0098] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQAPGKGLEWVSGDENKYAGGATYYAASVKGR
 FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFGTDFWGQGTLTVSS

[0099] SEQ ID NO.4:轻MOR

[0100] DIELTQPPSVSVAvgQTARISCSGDSIGKKYAYWYQQKPGQAPVLVIYKKRPSGIPERFSGNSGNTAT
 LTISGTQAEDEADYYCSAWGDKGMVFGGGTKLTVLGQ

[0101] 可用于本发明的可选的示例性抗体是包含选自以下的H-CDR3序列的抗体：
Ser Gly Leu Ile Phe Asp Tyr Trp Leu Asp

1 5 10
(SEQ ID NO. 5),

Ser Gly Leu Ile Ile Asp Ala Leu Ser Pro
1 5 10
(SEQ ID NO. 6),

Thr Ser Leu Met Ser Ile Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10
(SEQ ID NO. 7),

Ser Gly Leu Leu Phe Leu Tyr Phe Asp Tyr

[0102] 1 5 10
(SEQ ID NO. 8),

Ser Gly Leu Ile Asn Leu Gly Met His Pro
1 5 10
(SEQ ID NO. 9),

Ser Gly Leu Ile Phe Asp Ala Leu Arg Asp
1 5 10
(SEQ ID NO. 10),

Ser Gly Leu Ile Phe Asp Lys Leu Thr Ser
1 5 10
(SEQ ID NO. 11),

Ser Gly Leu Ile Asn Leu His Phe Asp Thr

1 5 10

(SEQ ID NO. 12),

Ser Thr His Phe Ser Ala Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

(SEQ ID NO. 13),

Ser Gly Leu Ile Met Asp Lys Leu Asp Asn

1 5 10

[0103] (SEQ ID NO. 14),

Ser Gly Leu Ile Ile Asp Asn Leu Asn Pro

1 5 10

(SEQ ID NO. 15),

和

Ser Gly Leu Ile Ala Val Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

(SEQ ID NO. 16)。

[0104] 优选地,包含选自SEQ ID NO.5-16中任何一项的H-CDR3序列的抗体,还包含以下的H-CDR1序列:

Asp Tyr Leu Leu His

[0105] 1 5

(SEQ ID NO. 17),

[0106] 和/或以下的H-CDR2序列:

Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly

[0107]

1 5 10 15

[0108] 和/或以下的L-CDR1序列:

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Arg Asn Ile Leu Asn

[0109] 1 5 10

(SEQ ID NO.19),

[0110] 和/或以下的L-CDR2序列:

Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser

[0111] 1 5

(SEQ ID NO. 20),

[0112] 和/或以下的L-CDR3序列:

Gln Gln Ser Tyr Ser Met Pro Arc Thr

[0113] 1 5

(SEQ ID NO.21)。

[0114] 可用于本发明的可选的示例性的抗体是包含以下的L-CDR1序列的抗体:

Arg Ala Ser His Arg Val Ser Ser Asn Tyr Leu Ala

[0115] 1 5 10

(SEQ ID NO. 22) ,

[0116] 和/或以下的L-CDR2序列:

Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr

[0117] 1 5

(SEQ ID NO. 23) ,

[0118] 和/或以下的L-CDR3序列:

[0119] Gln Gln Tyr Ala Ser Ser Pro Val Thr

1 5

[0120] (SEQ ID NO.24) ,

[0121] 和/或以下的H-CDR1序列:

Gly Tyr Ile Phe Pro Thr Phe Ala Leu His

[0122] 1 5 10

(SEQ ID NO. 25) ,

[0123] 和/或以下的H-CDR2序列:

Ser Ile Asn Thr Ala Ser Gly Lys Thr Lys Phe Ser Thr Lys Phe Gln

[0124] 1 5 10 15

(SEQ ID NO. 26) ,

[0125] 和/或以下的H-CDR3序列:

Asp Arg Phe Gln Asn Ile Met Ala Thr Ile Leu Asp Val

[0126] 1 5 10

(SEQ ID NO. 27) 。

[0127] 优选地所述抗体包含SEQ ID NO.22-27中的所有CRD。

[0128] GM-CSF受体是血细胞生成素受体超家族的成员。其为异源二聚体,由 α 亚基和 β 亚基组成。 α 亚基对GM-CSF具有高度特异性而 β 亚基是包括IL3和IL5的其它细胞因子受体所共有的。这反映在 β 受体亚基的较宽泛的组织分布上。 α 亚基,GM-CSFR α ,主要在骨髓细胞和非造血细胞上表达,比如嗜中性粒细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、树突细胞、内皮细胞和呼吸道上皮细胞。全长GM-CSFR α 是400个氨基酸I型膜糖蛋白,属于I型细胞因子受体家族,且由22个氨基酸的信号肽(第1-22位)、298个氨基酸的细胞外结构域(第23-320位)、从第321位到第345位的跨膜结构域和55个氨基酸的短的细胞内结构域组成。信号肽裂解以提供378个氨基酸蛋白的GM-CSFR α 的成熟形式。人类和小鼠的GM-CSFR α 的cDNA的克隆是可得到的,并且在蛋白水平上,受体亚基具有36%同一性。GM-CSF能够以相对低的亲和力(K_d 1-5nM)与 α 亚基单独结合,但完全不能与 β 亚基单独结合。然而, α 亚基和 β 亚基的共同存在导致高亲和力的配体-受体复合物($K_d >> 100$ pM)。GM-CSF通过与GM-CSFR α 链起始结合而发生信号传导,且然后与较大亚基共有 β 链交联以产生高亲和力相互作用,这使JAK-STAT通路磷酸化。

[0129] 对GM-CSF受体特异性的任何抗体可用于本发明。示例性的抗体包括包含SEQ ID No.:28-46中的任何一个中所描绘的H-CDR3序列的氨基酸序列的抗体。另外的示例性的抗体包括来源于包含SEQ ID No.:28-46中的任何一个中所描绘的H-CDR3序列的氨基酸序列的抗体的抗体。另一些示例性的抗体包括与包含SEQ ID No.:28-46中的任何一个中所描绘的H-CDR3序列的氨基酸序列的抗体具有相同的特异性和/或结合相同的表位的抗体。另一些示例性的抗体包括包含与SEQ ID No.:28-46中的任何一个中所描绘的H-CDR3序列至少70%、至少80%、至少90%或至少95%同源的H-CDR3序列的抗体。

SEQ ID NO:28:

Val Gly Ser Phe Ser Gly Ile Ala Tyr Arg Pro

5 10

SEQ ID NO:29:

Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Ala Leu Arg Pro

5 10

[0130] SEQ ID NO:30:

Val Gly Ser Phe Ser Pro Pro Thr Tyr Gly Tyr

5 10

SEQIDNO:31:

Val Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Pro Tyr Arg Pro

5 10

SEQ ID NO:32:

Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Leu Gly Leu

5 10

SEQ ID NO:33:

Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Val Tyr Gly Leu

5 10

SEQ ID NO:34:

Val Gly Ser Phe Ser Pro Pro Ala Tyr Arg Pro

5 10

SEQ ID NO:35:

Val Gly Ser Phe Ser Pro Val Thr Tyr Gly Leu

5 10

SEQ ID NO:36:

[0131]

Val Gly Ser Phe Ser Gly Leu Ala Tyr Arg Pro

5 10

SEQ ID NO:37:

Val Gly Ser Phe Ser Pro Ile Thr Tyr Gly Leu

5 10

SEQ ID NO:38:

Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr

5 10

SEQ ID NO:39:

Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr

5 10

SEQ ID NO:40:

Leu Gly Ser Val Thr Ala Trp Ala Phe Asp Tyr

5 10

SEQ ID NO:41:

Ala Gly Ser Ile Pro Gly Trp Ala Phe Asp Tyr

5 10

SEQ ID NO:42:

Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Met Gly Leu

5 10

SEQ ID NO:43:

Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Met Gly Leu

[0132]

5 10

SEQ ID NO:44:

Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Ala Leu His Leu

5 10

SEQ ID NO:45:

Val Gly Ser Val Ser Arg Ile Thr Tyr Gly Phe

5 10

SEQ ID NO:46:

Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Leu Gly Leu

5 10

[0133] 在某些方面,本发明提供了用于治疗受治疗者中的疼痛的方法,所述方法包括向所述受治疗者施用GM-CSF拮抗剂的步骤。如该上下文所用的,“受治疗者”指任何哺乳动物,包括啮齿动物,比如小鼠或大鼠,和灵长类动物,比如食蟹猴(*Macaca fascicularis*)、猕猴(*Macaca mulatta*)或人类(智人(*Homo sapiens*))。优选地受治疗者是灵长类动物,最优先地为人。

[0134] 在某些方面本发明提供了包含GM-CSF拮抗剂的组合物,所述GM-CSF拮抗剂能够在患有疼痛或怀疑患有疼痛的受治疗者中拮抗GM-CSF的激活、增殖、诱导细胞生长和/或细胞存活的能力,所述组合物还包含一种或多种药学上可接受的载体和/或稀释剂。本发明的抗

GM-CSF抗体可拮抗GM-CSF在疼痛中的任何作用。

[0135] 在另一方面,本发明提供了用于预防受治疗者中的疼痛的方法,所述方法包括向所述受治疗者施用GM-CSF拮抗剂。如该上下文所用的“预防”指旨在防止疾病的发作或延迟疾病的发作的方法。

[0136] 在某些方面,本发明提供了包含用于疼痛的治疗的GM-CSF拮抗剂的组合物,所述组合物还包含一种或多种药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[0137] 在另一些方面,本发明提供了GM-CSF拮抗剂在疼痛治疗中的药物的制备中的用途。

[0138] 在另一些方面,本发明提供了用于疼痛治疗的GM-CSF拮抗剂。

[0139] 本发明的组合物优选地为用于疼痛治疗的、包含GM-CSF拮抗剂和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂的药物组合物。这样的载体、稀释剂和赋形剂是本领域中熟知的,且有经验的技术人员将发现最适合用本发明的GM-CSF拮抗剂治疗受治疗者的制剂和施用途径。

[0140] 在另一方面,本发明提供了具有GM-CSF-/-基因型的基因工程哺乳动物。在具体的方面,所述哺乳动物是小鼠。术语“敲除”小鼠(或哺乳动物)、某基因“被破坏”的小鼠(或哺乳动物)和具有“-/-基因型”的小鼠(或哺乳动物)在本发明中可互换使用并且是领域公认的。相应的动物在染色体的两个等位基因上具有相应的基因缺陷,此处为GM-CSF基因。

[0141] 实施例1:

[0142] GM-CSF-/-小鼠的生成

[0143] GM-CSF-/-小鼠的生成在Stanley等人.(1994).Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:5592中被描述。简言之,通过将具有破坏的GM-CSF基因的129/OLA来源的ES细胞(H-2b)显微注射到C57BL/6(H-2b)宿主胚泡中而生成嵌合的小鼠。突变的GM-CSF等位基因的种系传递者与C57BL/6小鼠杂交11代,产生GM-CSF+/-小鼠,GM-CSF+/-小鼠杂交产生用于实验的GM-CSF-/-、GM-CSF+/-和GM-CSF+/-小鼠。GM-CSF基因型状态通过尾部DNA的PCR分析来测定。用标准啮齿动物食物和水随意饲养动物并按照同性别同胞仔将动物圈养于垫有锯末的笼中。两种性别的小鼠在8到15周龄时被用于实验。

[0144] 实施例2:

[0145] GM-CSF拮抗剂在治疗手术后疼痛方面是有效的

[0146] 使用了模拟手术后疼痛的疼痛模型来评估利用GM-CSF拮抗剂的效力。

[0147] 动物:

[0148] 将重量在220-240克的雄性Sprague Dawley大鼠在动物设施中适应1周,然后进行手术。

[0149] 手术:

[0150] 手术基于Brennan等人,Pain 64:493-501,1996中所描述的方法。利用含2%异氟烷的空气混合物使动物麻醉,并在手术过程中通过鼻锥(nose cone)来持续输送。右后爪的足底表面利用聚维酮碘垫来进行处理,从距后脚边缘0.5cm处开始并向脚趾延伸,穿过皮肤和筋膜作1cm的中央纵切。将足部保持在屈曲位时利用尺进行测量。利用弯钳提起跖肌并纵切。在肌起端和肌附着之间,穿过其全深切开肌肉。在手术过程中通过使用纱布垫按压来控制流血。利用两个褥式缝合缝线来闭合伤口(5-0 ethilon黑色单丝)。将这些缝线打结5-6

次,第一个结松散打结。用杆菌肽溶液擦拭伤口部位。在行为测验开始前使动物在干净的笼内恢复和休息两个小时或更长时间。

[0151] 静息疼痛的评价:

[0152] 使用累积疼痛评分来评估与负重相关的疼痛。将动物置于干净塑料笼中的塑料网上(网孔:8mm²),塑料笼被提高在平台(高度:18")上以允许检查它们的爪的底侧。20分钟适应期后,以0到2的等级评估负重。如果爪发白或按压网,表示完全负重,计0分。如果爪以皮肤刚接触到网进行支持,皮肤没有变白或压痕,计1分。如果爪完全脱离网,计2分。如果大鼠保持休息,缩爪被认为是2分。对每只动物每5分钟观察1分钟,持续数分钟。使用在1/2小时过程中所获得的6个分数的总和(0-12)来评估切开的足部中的疼痛。还计算2分的频率并用其评估严重疼痛的发生率或动物对爪的总防卫。在手术前24小时(基线)对每个动物进行检验,并在手术后2小时、24小时、48小时和72小时进行检验。本实验的结果显示了在利用GM-CSF拮抗剂处理的动物中观察到的累积静息疼痛评分与对照动物相比显著降低。负重是动物使用肢体的意愿的良好相关事件,并因此是疼痛减轻的有效量度。优选地,GM-CSF拮抗剂是对GM-CSF特异性或对GM-CSF受体特异性的抗体。在切开前15小时以抗体的不同浓度(例如,0.004、0.01、0.02、0.1、0.6和1mg每千克动物体重)将这样的抗体进行腹腔(i.p.)注射。阴性对照组不接受抗体而腹腔注射盐溶液。在手术后24小时,在检验前30分钟利用0.01mg/kg的芬太尼(Fentanyl)进行腹腔注射,作为阳性对照。对于每种条件,每个实验包括8只动物(每组n=8),并且对照组具有56只动物。如上所描述地进行手术并测量累积疼痛得分。在手术后24小时评价静息疼痛。

[0153] 在手术后,当以0.02mg/kg-1mg/kg剂量施用时,GM-CSF拮抗剂显著降低了静息疼痛。

[0154] 在另一实验中,检验了当在手术后施用GM-CSF拮抗剂时,GM-CSF拮抗剂减少手术后疼痛的效力。在手术两小时后静脉(i.v.)注射GM-CSF特异性的抗体或GM-CSF受体特异性的抗体。对照组不接受抗体而是静脉注射盐溶液。进行手术并在手术后24小时对表示为累积疼痛评分的静息疼痛进行评估。当在切开后两小时施用抗体时,利用GM-CSF拮抗剂处理显著减少了切开后24小时的静息疼痛。这些结果表明当在手术后施用时,GM-CSF拮抗剂有效缓解了手术后疼痛。

[0155] 热痛觉过敏的评价:

[0156] 根据Hargreaves等人。(1988)的修正方法,通过大鼠足底试验(rat plantar test)(Ugo Basile, Italy)对热痛觉过敏进行评估。将大鼠安置在由架高的玻璃台上的四个独立的有机玻璃盒组成的装置中。移动的辐射热源位于台下方且集中到后爪上。当动物静息但非睡眠时,按下控制盒上的按钮,辐射热源发出,且自动记录动物从热源缩回的时间。这种缩爪潜伏期(paw withdrawal latencies, PWL)由装在辐射热源上的光检测器来检测,该光检测器通过热源的反射比的改变来感应大鼠爪的运动。以秒来记录缩爪潜伏期(Paw Withdrawal Latencies, PWL)。具有22.5s的自动断开点以防止组织损害。对于每个动物的两个后爪记录三到四次的PWL,其平均值代表了右后爪和左后爪的基线。结果表示为在右后爪(手术部位)和左后爪中测量的分数的比值。将装置校正一次(在研究开始时)并设置到40的强度以得到约6秒的正常PWL。在手术前24小时(基线)、手术后3小时、24小时、48小时和72小时检测每个动物。在触觉异常痛敏测量后进行热痛觉过敏测量。结果表明利用GM-

CSF拮抗剂的处理显著减少了手术后的热痛觉过敏。

[0157] 实施例3:

[0158] GM-CSF拮抗剂在治疗骨癌疼痛中是有效的

[0159] GM-CSF拮抗剂,比如GM-CSF特异性的抗体或GM-CSF受体特异性的抗体在治疗与骨转移相关的癌症疼痛中是有效的。

[0160] 我们使用了小鼠骨癌疼痛模型以评估利用GM-CSF拮抗剂的治疗的效力。通过将溶骨肉瘤细胞髓内注射到小鼠股骨中并用牙科汞合金填充针孔以将肿瘤封闭在骨中,从而形成骨癌疼痛的鼠模型(参见Schwei等人,J:Neuroscience 19:10886-10897,1999和Luger等人,Pain 99:397-406,2002)。对C3H/HeJ成年雄鼠进行实验。在第0天,在利用戊巴比妥钠(50mg/kg,腹腔内(i.p.))进行全身麻醉后进行关节切开术。将针插入髓管以为肉瘤细胞建立通道。然后利用气动牙科高速机头进行压制。除首次用于实验的(naive)动物(n=5)外,利用最低限度基本培养基(20μl,Sigma,St.Louis,MO)注射到股骨的髓内空隙中(称作假实验)生成假实验动物(n=5),而肉瘤动物(对于每种检验条件n=5)用含有1052472溶骨肉瘤细胞(20μl,ATCC,Rockville,MD)的培养基来注射(称作肉瘤(sarcoma)或sarc)。对于所有动物,利用牙科汞合金堵塞物来封闭注射部位以将细胞或注射的培养基封闭在髓管中,且然后用无菌水冲洗(低渗溶液)。最后,用创缘夹来闭合切口。在第5天移去夹子以不妨碍行为测试。在第6天和第13天利用GM-CSF特异性的抗体或GM-CSF受体特异性的抗体(例如,10mg/kg,腹腔注射)处理第二组的注射肉瘤的动物。

[0161] 行为分析:

[0162] 在肿瘤植入后第10天和第14天检验动物的疼痛相关行为。利用以下的检验对动物进行行为检验:持续疼痛(自发防卫和退缩)、行走疼痛(肢体使用和旋转棍)和运动诱发疼痛(触摸诱发的防卫和触摸诱发的退缩)。将动物置于具有线网底部的干净的塑料观察箱中并使其适应30分钟的时间。适应以后,对自发防卫、自发退缩、在开放领域正常行走期间的肢体使用和被迫行走期间的防卫进行评估。在肉瘤注射和假实验注射的动物中的股骨远端的2分钟的正常非有害触摸后,测量触摸引起的防卫和退缩。

[0163] 在2分钟的观察期过程中同时记录代表疼痛反映行为的自发退缩的次数和防护所用的时间。防卫被定为后爪腾空的时间,而行走和退缩为动物使肢体腾空的次数。自发行走期间的正常肢体使用按照5到0的等级来评分:(5)正常使用,和(0)完全没有肢体使用。

[0164] 利用旋转棍(Columbus Instruments,Columbus,OH)来测定被迫行走防卫。旋转的机器具有旋转的棍并装备有速度控制器、加速控制器和灵敏度控制器。将动物置于具有X4速度、8.0加速和2.5灵敏度的棍上。以5-0的等级来评定被迫行走防卫:(5)正常使用,和(0)完全没有使用。每隔一秒对动物进行股骨远端的正常非有害触摸,持续2分钟后,将动物置于观察箱中并对其触摸诱导的防卫和触摸诱导的退缩进行测量,再持续2分钟。

[0165] 利用GM-CSF拮抗剂的处理:

[0166] 在第6天和第13天,利用GM-CSF拮抗剂对肉瘤注射的动物进行腹腔(i.p.)注射,所述GM-CSF拮抗剂比如抗-GM-CSF抗体或抗GM-CSF受体抗体(n=5),或用盐溶液注射(i.p.)肉瘤注射的动物或假实验注射的动物(对于每种条件n=5)。在第10天和第14天对所有的动物进行行为分析。

[0167] 持续疼痛行为的评价:

[0168] 如通过自发防卫和自发退缩所评估的,与假实验注射的动物(施用盐溶液)相比,肉瘤注射的动物(施用盐溶液)发生统计学显著的持续疼痛行为。

[0169] 在肉瘤植入后第10天和第14天,与施用盐溶液的肉瘤注射的小鼠相比,GM-CSF拮抗剂的施用在肉瘤注射的小鼠中显著减少了自发防卫和自发退缩。这些结果表明GM-CSF拮抗剂在肉瘤注射的小鼠中减少了持续疼痛。

[0170] 行走疼痛行为的评价:

[0171] 如通过肢体使用和被迫行走防卫(旋转棍)所评估的,与假实验注射的动物(施用盐溶液)相比,肉瘤注射的动物(施用盐溶液)发生行走疼痛行为。在肉瘤植入后第10天和第14天,与施用盐溶液的肉瘤注射的小鼠相比,在肉瘤注射的小鼠中GM-CSF拮抗剂的施用显著提高了肢体使用评分和被迫行走防卫评分。这些结果表明GM-CSF拮抗剂在肉瘤注射的小鼠中减少了行走疼痛。

[0172] 触摸引发的疼痛行为的评价:

[0173] 如通过触摸引发的防卫和触摸引发的退缩所评估的,与假实验注射的动物(施用盐溶液)相比,肉瘤注射的动物(施用盐溶液)发生触摸引发的疼痛行为。在肉瘤植入后第10天和第14天,与施用盐溶液的肉瘤注射的小鼠相比,在肉瘤注射的小鼠中GM-CSF拮抗剂的施用显著减少了触摸引发的防卫和触摸引发的退缩。这些结果表明GM-CSF拮抗剂在肉瘤注射的小鼠中减少了触摸引发的疼痛。

[0174] 实施例4:

[0175] GM-CSF拮抗剂的止痛作用

[0176] 利用嘶叫检验(vocalization test)研究GM-CSF拮抗剂在弗氏完全佐剂(CFA)诱导的慢性关节炎的大鼠中的止痛作用,与用作参考物的吲哚美辛进行对比。

[0177] 在实验阶段的开始,本研究包括重量在150g到220g的50只(50)雄性Lewis大鼠(LEWIS LEW/Crl 1co)。在实验前饲养所有动物至少5天,并在整个实验中将其圈养于温度(19.5-24.5°C)、相对湿度(45-65%)和12小时光亮/黑暗周期受控的室内,并且无限制获取过滤的自来水和标准丸粒状实验室饲料。在尾部对动物进行个体标识。

[0178] 在第0天(D0),通过将含0.05ml乳酪分歧杆菌的矿物油(10mg/ml)皮内注射到尾部而在大鼠中诱导关节炎。在第14天(D14),根据大鼠在轻柔弯曲后爪时的嘶叫能力和它们的关节炎指数将关节炎大鼠纳入研究,并利用对每个后爪和前爪的炎症评分来对其进行评价(参见,Kuzuna等人,Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 23:1184-1191,1975和Pearson等人,Arthritis Rheum. 2:440-459,1959)。

[0179] 基于以下标准对动物评分:0分:正常状况;1分:红斑;2分:伴有轻微水肿的红斑;3分:无关节僵硬的强烈炎症;4分:关节僵硬。仅在轻柔弯曲时能够嘶叫且表现为2或3分的动物纳入研究。

[0180] 将每组10只大鼠共四组纳入研究。对于第1组(载体),在第14天时(D14),在选择后,对大鼠静脉施用载体(盐溶液)。在第18天(D18),通过后爪的轻柔弯曲对疼痛反映强度进行评价,并记录每个动物的嘶叫水平的强度。对于第2组(4天),在第14天,在选择后,对大鼠静脉施用GM-CSF-特异性抗体。在第18天(D18),通过后爪的轻柔弯曲对疼痛反映强度进行评价,并记录每个动物的嘶叫水平的强度。对于第3组(24小时),在注射CFA后第17天,对大鼠静脉施用GM-CSF特异性抗体或GM-CSF受体特异性抗体。24小时后通过后爪的轻柔弯曲

对疼痛反映强度进行评价，并记录每个动物的嘶叫水平的强度。对于第4组(吲哚美辛)，在第18天(D18)，口服施用吲哚美辛(10mg/kg)1小时后通过后爪的轻柔弯曲对疼痛反映强度进行评价。并记录每个动物的嘶叫水平的强度。以盲法和随机方式通过静脉途径以5ml/kg的体积来施用检验物质，而吲哚美辛以10ml/kg的体积通过口服途径来施用。

[0181] GM-CSF拮抗剂显示了显著的止痛作用。利用邓奈特氏检验(Dunnett's test)在方差的单因素分析之后使用剩余方差来测定治疗组和载体组之间的统计学显著性。在抗体单一施用后24小时或4天，GM-CSF特异性抗体和GM-CSF受体特异性抗体显著减少了类风湿性关节炎的大鼠模型中的疼痛。

[0182] 实施例5：

[0183] GM-CSF拮抗剂在治疗骨关节炎疼痛中是有效的

[0184] 在该实验中我们使用了对GM-CSF特异性的单克隆抗体来证明GM-CSF拮抗剂能够有效治疗骨关节炎疼痛。

[0185] 胶原诱导的OA小鼠模型：

[0186] 在第0天和第2天对C57BL/6小鼠关节内施用1个单位的VII型胶原酶至右膝盖中以诱导关节不稳定(参见，Blom等人。(2004) *Osteoarthritis Cartilage.* 12;627-35)。

[0187] 抗GM-CSF抗体治疗：

[0188] 将20只小鼠随机分成2组(10只小鼠/组)。

[0189] 组1(n=10)：抗GM-CSF抗体(22E9)

[0190] 组2(n=10)：IgG2a同种型对照抗体。

[0191] 利用250μg/小鼠/处理的抗GM-CSF抗体(22E9)或IgG2a同种型对照抗体对小鼠进行每周三次共六周的腹腔注射处理。在OA诱导前4天开始处理(预防性的)，即，在第-4天、第-2天、第0天(第一次胶原酶注射当天)处理小鼠，然后每周三次处理直到在六周实验末期。在第2周、第4周和第6周时，对小鼠采血。将对照抗体和抗GM-CSF抗体纯化至含有小于10个内毒素单位/ml。

[0192] 将抗体22E9用作示例性的抗GM-CSF抗体。22E9是IgG2a同种型，是大鼠抗小鼠GM-CSF特异性抗体。22E9购自AbD Serotec (Martinsried, Germany; 目录号1023501)。可选的供应商有，例如eBioscience (SanDiego, CA, USA, 目录号14-7331)。

[0193] 组织学：

[0194] 最终注射后6-周，在小鼠膝关节上进行组织学。采集膝关节，将其固定、脱钙、在石蜡中包埋并用切片机以7μm进行切片。用番红-0/固绿和苏木精和伊红对切片染色以显示关节病理。所研究的病理包括：软骨损伤、滑膜炎、骨赘形成和关节形变。

[0195] 用于软骨病理的评分系统如下：

[0196] 等级

[0197] 0 正常

[0198] 1 不规则但完好

[0199] 1.5 不规则且具有粗糙表面

[0200] 2 表面纤维化

[0201] 2.5 表面纤维化且软骨层中细胞减少

[0202] 3 垂直裂隙

- [0203] 3.5 分支和/或水平裂隙,潮标破裂
- [0204] 4 软骨丢失未延伸至潮标
- [0205] 4.5 软骨丢失延伸至潮标
- [0206] 5 软骨丢失超过潮标但未延伸至骨
- [0207] 5.5 软骨丢失,延伸至骨
- [0208] 6 骨丢失/重塑/形变
- [0209] 阶段
- [0210] 1 <10%的区域损坏
- [0211] 2 10-25%的区域损坏
- [0212] 3 25-50%的区域损坏
- [0213] 4 50-75%的区域损坏
- [0214] 将等级乘以阶段得到评分。
- [0215] 该评分系统基于评估临床和实验性OA中的OA组织病理学的公认的方法。参见Pritzker等人. (2006) *Osteoarthritis Cartilage*;14;13-29。等级被定义为OA进展到软骨中的深度。阶段被定义为受累软骨的水平范围,即,软骨中的多少受到影响。等级乘以阶段得到评分以得到整体评分,代表OA严重度和范围的联合评估。对于每只小鼠对多达6个切片进行评分。
- [0216] 将等级乘以阶段而得到评分。
- [0217] 对于滑膜炎利用以下的评分系统(滑膜层评分系统):
- [0218] 0 对比正常关节无改变
- [0219] 1 滑膜内衬变厚且炎性细胞的一些流入
- [0220] 2 滑膜内衬变厚且炎性细胞的中等流入
- [0221] 3 滑膜内衬变厚且炎性细胞的所观察到的最大流入
- [0222] 疼痛测量:
- [0223] 用于OA模型的疼痛指示物是利用双足平衡测痛仪所测量的重量的差异分布。该仪器测量被施手术的后肢和对侧的未被施手术的后肢之间的重量分布的变化。在实验前使小鼠适应装置三次。对置于每个后肢上的重量进行5秒的测量。对于每个时间点对每只小鼠进行三次独立的测量,然后将其平均。在整个实验中,每周进行2次测量。结果表示为胶原酶注射肢体/对照肢体×100
- [0224] 结果:
- [0225] 对于组织学中所分析的所有区域(除股骨内侧),即股骨外侧、胫骨外侧和胫骨内侧,在利用抗GM-CSF抗体处理的小鼠中存在朝向较少疾病的明显趋势。图1中描绘了结果。
- [0226] 重量分布的评估作为与关节炎相关的疼痛的量度,显示了在抗GM-CSF mAb处理组中,对比对照mAb处理组,在第27天以后重量从关节炎性膝盖的明显转移。图2中描绘了结果。
- [0227] 利用GM-CSF拮抗剂处理的小鼠与利用对照抗体处理的小鼠相比显示了较少疾病。利用GM-CSF拮抗剂处理的小鼠与利用对照抗体处理的小鼠相比在疾病的较晚期阶段还显示了显著较少的疼痛。利用同种型对照抗体处理的小鼠与接受GM-CSF特异性抗体的小鼠相比显示了骨关节炎的显著增加的症状。这表明了GM-CSF拮抗剂在骨关节炎疼痛的治疗中是

有效的。

[0228] 实施例6:

[0229] GM-CSF拮抗剂在治疗炎性疼痛/mBSA模型中是有效的

[0230] 以下的实验证明了GM-CSF拮抗剂在炎性疼痛的治疗中也是有效的。为此,在GM-CSF敲除的小鼠和对照小鼠中诱导mBSA/IL-1单关节炎。在不同的时间点利用双足平衡测痛仪在施用或不施用吲哚美辛时对疼痛进行评估,吲哚美辛是疼痛减轻物质。

[0231] 小鼠

[0232] 在四个处理组中使用了24只雄性C57BL/6小鼠和24只雄性GM-CSF-/-小鼠(参见实施例1):

[0233] 组1:GM-CSF KO (n=12):甲基化的BSA/IL-1

[0234] 组2:GM-CSF KO (n=12):甲基化的BSA/IL-1+吲哚美辛

[0235] 组3:C57BL/6野生型 (n=12):甲基化的BSA/IL-1

[0236] 组4:C57BL/6野生型 (n=12):甲基化的BSA/IL-1+吲哚美辛

[0237] 单关节炎的诱导

[0238] 通过将含mBSA (20mg/ml) 的10μl盐溶液关节内注射到膝关节中而诱导单关节炎,并将10μl的盐溶液关节内注射到对侧膝关节中。每天皮下施用20μl的IL-1 β (250ng),持续3天。通常在注射mBSA后第4天到第7天之间形成响应,并在第28天消退。在第2天、第3天、第4天、第5天和第7天时测验双足平衡。

[0239] 吲哚美辛(Sigma)是常用于退烧、减少疼痛、僵硬和肿胀的非甾体抗炎药物。其通过抑制前列腺素的产生而发挥作用。在利用双足平衡测痛仪评估疼痛前1小时对组2和组4腹腔内施用1mg/kg的吲哚美辛。

[0240] 疼痛读数:

[0241] 使用双足平衡测痛仪(Dual Weight Averager)通过测量两个后爪上的重量分布而自动地且可重复地评估止痛能力。由每个肢体施加的力(以克来测量)在用户可选择的时间内被平均,从而显示了动物将其重量从一侧转移到另一侧的任何趋势,因此提供了双足平衡的定量测量。

[0242] 在5秒的时间内对置于每个后肢上的重量进行测量。对于每个时间点对每只小鼠记录三个独立的测量,然后将其平均。结果表示为注射肢体/对照肢体×100。因此100的值意为右肢和左肢上置有相等的重量。低于100的值意为与对照肢体(右)相比注射肢体(左)上放置了较少重量。

[0243] 结果

[0244] 该模型通过mBSA的注射在膝关节中诱导了滑膜炎。在第7天,目测检测膝关节并进行从0(正常)到3(严重发炎)的评分(图3)。注射mBSA的左膝盖与右膝盖(注射盐溶液)相比具有更显著的炎症(对于C57小鼠p>0.001,且对于GM-CSF-/-小鼠p=0.02)(图3)。事实上,所有注射盐溶液的右膝得到的评分为0。对于每个种系,利用吲哚美辛处理的小鼠和不利用吲哚美辛处理的小鼠之间没有显著差异。

[0245] 当诱导mBSA/IL-1单关节炎时,与GM-CSF-/-小鼠相比C57BL/6小鼠显示了明显较多的疼痛(如由mBSA注射的膝盖中重量的转移所测量的)(图4)。这从第4天以后是显著的。

[0246] 在mBSA/IL-1单关节炎诱导后,利用吲哚美辛处理的C57BL/6小鼠与不利用吲哚美

辛处理的那些小鼠相比显示了明显较少的疼痛(图4),因而读数与GM-CSF-/-小鼠相似。因为GM-CSF-/-没有表现出疼痛,所以吲哚美辛治疗没有效果。

[0247] 显著性水平如下:

[0248] C57BL/6小鼠:吲哚美辛处理组对比未处理的组(组4对比组3)

[0249] 第4天p<0.0001;第5天p<0.001;第7天,p=0.007

[0250] GM-CSF-/-小鼠对比C57BL/6小鼠(组1对比组3):

[0251] 第4天p<0.0001;第5天p<0.001;第7天,p=0.022

[0252] 这些结果表明在mBSA/IL-1单关节炎模型中,C57BL/6小鼠从第4天以后发生显著疼痛,而GM-CSF-/-小鼠没有显示任何的疼痛的明显症状。因此GM-CSF的拮抗剂在炎性疼痛的治疗中是高度有效的。

[0253] 实施例7:

[0254] GM-CSF拮抗剂在治疗炎性疼痛/CFA模型中是有效的

[0255] 以下的实验是证明GM-CSF拮抗剂在炎性疼痛的治疗中的效力的另外的实验。该实验利用弗氏完全佐剂来诱导炎性疼痛。如实验5中一样,在不同的时间点利用双足平衡测痛仪在施用或不施用吲哚美辛时对疼痛进行评估,吲哚美辛是疼痛减轻物质。

[0256] 小鼠

[0257] 在三个处理组中的每组使用了12只雄性C57BL/6小鼠和12只雄性GM-CSF-/-小鼠(参见实施例1):

[0258] 组1:C57BL/6野生型(n=12):CFA

[0259] 组2:C57BL/6野生型(n=12):CFA+吲哚美辛

[0260] 组3:GM-CSF-/-KO(n=12):CFA

[0261] 单关节炎的诱导

[0262] 弗氏完全佐剂(CFA)(Sigma)含有矿物油中的1mg/ml浓度的热灭活的结核分支杆菌(Mycobacterium tuberculosis)菌株H37Ra。通过涡旋彻底混合CFA以保证热灭活的细菌混合到悬浮液中(Kamala T (Hock immunization:a humane alternative to mouse footpad injections (后踝免疫:小鼠足垫注射的人道替代). J Immunol Methods 328: 204-214. 2007)。涡旋之后,立即用19号注射针将佐剂吸入玻璃注射器中。从注射器中小心除去气泡并将注射针移除。将20μl的CFA乳浊液皮下注射到每个小鼠的左后爪(足垫)中。在疼痛评估前1小时向组2的小鼠腹腔内施用1mg/kg的吲哚美辛(参见实验5)。

[0263] 疼痛读数:

[0264] 如实验5中,使用双足平衡测痛仪(Dual Weight Averager)通过测量两个后爪上的重量分布而自动地且可重复地评估止痛能力。在5秒的时间内对置于每个后肢上的重量进行测量。对于每个时间点对每只小鼠记录三个独立的测量,然后将其平均。结果表示为注射肢体/对照肢体×100。因此100的值意为右肢和左肢上置有相等的重量。低于100的值意为与对照肢体(右)相比注射肢体(左)上放置了较少重量。在CFA注射后24小时、48小时和72小时对双足平衡进行检验。

[0265] 结果

[0266] 将CFA皮下注射到左足垫中后,小鼠发生左足垫的肿胀,其与C57BL/6小鼠(组1)和GM-CSF-/-小鼠(组3)中的程度相似。利用吲哚美辛处理的C57BL/6小鼠(组2)在肿胀程度上

也显示无差别(参见图5)。在任何组中对侧(右)足都没有肿胀。

[0267] 重量分布的评估作为疼痛的量度,显示了随时间推移在CFA注射后48小时($p=0.03$)和72小时($p=0.0009$)C57BL/6小鼠发生的疼痛显著高于GM-CSF-/-小鼠(图6)。显著地,GM-CSF-/-小鼠没有发生任何疼痛。利用吲哚美辛处理小鼠缓解了疼痛,从而读数与GM-CSF-/-小鼠的读数没有差异(图6)。CFA注射72小时后,利用吲哚美辛处理的C57BL/6小鼠比未利用吲哚美辛处理的C57BL/6小鼠具有显著较少疼痛($p=0.05$)。

[0268] 显著性水平总结:

[0269] 48小时:

[0270] 组3对比组1- $p=0.03$

[0271] 组2对比组1- $p=0.09$

[0272] 72小时:

[0273] 组3对比组1- $p=0.0009$

[0274] 组2对比组1- $p=0.05$

[0275] CFA注射后,GM-CSF-/-小鼠中足垫的肿胀程度和C57BL/6小鼠相比没有差异。而且,C57BL/6小鼠的吲哚美辛处理对肿胀没有作用,这可能是由于事实上其仅在双足平衡读数前1小时被施用而导致的。因此在24小时时在首次吲哚美辛注射前已发生了绝大部分的肿胀。

[0276] 相比之下,CFA注射后,C57BL/6小鼠发生了显著的疼痛,该疼痛被吲哚美辛减轻。而GM-CSF-/-小鼠没有显示疼痛的任何症状。因此这些实验显著地显示了,虽然CFA注射后所有小鼠的足垫具有炎症,但GM-CSF-/-小鼠没有显示疼痛的任何症状。

[0277] 实施例8:

[0278] 包含SEQ ID NO.1或2的GM-CSF特异性抗体的治疗效力

[0279] 利用作为GM-CSF拮抗剂的GM-CSF特异性抗体重复实施例2-7,所述GM-CSF特异性抗体包含如SEQ ID NO.:1中所描绘的重链可变区的氨基酸序列或包含如SEQ ID NO.:2中所描绘的轻链可变区的氨基酸序列。可使用除小鼠外的另外物种,特别是与本实验中所用的抗体具有交叉反应性的物种。用于本实验的优选动物物种是大鼠。

[0280] 利用对照抗体处理的动物与接受GM-CSF特异性抗体的动物相比显示了显著增加的疼痛的症状,所述GM-CSF特异性抗体包含如SEQ ID NO.:1中所描绘的重链可变区的氨基酸序列或包含如SEQ ID NO.:2中所描绘的轻链可变区的氨基酸序列。这表明了抗体在疼痛的治疗中的效力。

[0281] 实施例9:

[0282] 包含SEQ ID NO.3或4的GM-CSF特异性抗体的治疗效力

[0283] 重复实施例2-7。利用作为GM-CSF拮抗剂的GM-CSF特异性抗体,所述GM-CSF特异性抗体包含如SEQ ID NO.:3中所描绘的重链可变区的氨基酸序列或包含如SEQ ID NO.:4中所描绘的轻链可变区的氨基酸序列。可使用除小鼠外的另外物种,特别是与本实验中所用的抗体具有交叉反应性的物种。用于本实验的优选动物物种是大鼠。

[0284] 利用对照抗体处理的动物,例如大鼠,与接受GM-CSF特异性抗体的动物相比显示了显著增加的疼痛的症状,所述GM-CSF特异性抗体包含如SEQ ID NO.:3中所描绘的重链可变区的氨基酸序列或包含如SEQ ID NO.:4中所描绘的轻链可变区的氨基酸序列。这表明了

抗体在疼痛的治疗中的效力。

[0285] 实施例10:

[0286] 包含SEQ ID NO.5-20的GM-CSF特异性抗体的治疗效力

[0287] 重复实施例2-7。利用作为GM-CSF拮抗剂的GM-CSF特异性抗体包含选自SEQ ID No.:5-16中的任何一个的H-CDR3序列。优选地,所述抗体还包含SEQ ID No.:16的H-CDR1序列,和/或SEQ ID No.:18的H-CDR2序列,和/或SEQ ID No.:19的L-CDR1序列,和/或SEQ ID No.:20的L-CDR2序列,和/或SEQ ID No.:21的L-CDR3序列。可使用除小鼠外的另外物种,特别是与本实验中所用的抗体具有交叉反应性的物种。用于本实验的优选动物物种是大鼠。

[0288] 利用对照抗体处理的动物,例如大鼠,与接受根据本实施例的GM-CSF特异性抗体的动物相比显示了显著增加的疼痛的症状。这表明了抗体在疼痛的治疗中的效力。

[0289] 实施例11:

[0290] 包含SEQ ID NO.21-26的GM-CSF特异性抗体的治疗效力

[0291] 重复实施例2-7。利用作为GM-CSF拮抗剂的GM-CSF特异性抗体包含SEQ ID No.:22的L-CDR1序列,和/或SEQ ID No.:23的L-CDR2序列,和/或SEQ ID No.:24的L-CDR3序列,和/或SEQ ID No.:25的H-CDR1序列,和/或SEQ ID No.:26的H-CDR2序列,和/或SEQ ID No.:27的H-CDR3序列。优选地所述抗体包含SEQ ID No.:22-28的所有CRD。可使用除小鼠外的另外物种,特别是与本实验中所用的抗体具有交叉反应性的物种。用于本实验的优选动物物种是大鼠。

[0292] 利用对照抗体处理的动物,例如大鼠,与接受根据本实施例的GM-CSF特异性抗体的动物相比显示了显著增加的疼痛的症状。这表明了抗体在疼痛的治疗中的效力。

[0293] 实施例12:

[0294] 对GM-CSF受体特异性的抗体的治疗效力

[0295] 重复实施例2-7。利用作为GM-CSF拮抗剂的GM-CSF受体特异性的抗体,所述GM-CSF受体特异性的抗体包含SEQ ID No.:28-46中的任何一个中所描绘的H-CDR3序列。可使用除小鼠外的另外物种,特别是与本实验中所用的抗体具有交叉反应性的物种。用于本实验的优选动物物种是大鼠。

[0296] 利用对照抗体处理的动物,例如大鼠,与接受根据本实施例的GM-CSF受体特异性的抗体的动物相比显示了显著增加的疼痛的症状。这表明了抗体在疼痛的治疗中的效力。

[0297] 本领域中的技术人员将理解,本文中所描述的本发明除特别描述的那些外可进行变化和更改。应理解地是本发明包括所有这样的变化形式和更改形式。本发明还单独地或整体地包括本说明书中所提及或指明的所有步骤、特征、组合物和化合物,和所述步骤或特征中的任何两个或多个的任何一种和所有组合。

[0298] 参考文献

[0299] Brennan等人,Pain 64:493-501,1996

[0300] Ghose等人,J Combin Chem:1:55-68,1999

[0301] Hargreaves等人,1988

[0302] Knappik等人,J.Mol.Biol.296:57,2000

[0303] Krebs等人,J.Immunol.Methods.254:67,2001

- [0304] Kuzuna等人,Chem.Pharm.Bull. (Tokyo) 23:1184-1191,1975
- [0305] Lipinski等人,Adv Drug Del Rev:23:3-25,1997
- [0306] Luger等人,Pain 99:397-406,2002
- [0307] Pearson等人,Arthritis Rheum.2:440-459,1959
- [0308] Rothe等人,J.Mol.Biol.376:1182,2008
- [0309] Schwei等人,J:Neuroscience 19:10886-10897,1999

序列表

<110> 墨尔本大学
<120> 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的拮抗剂的用途
<130> 30898435/EJH
<150> US 61/139,687
<151> 2008-12-22
<150> US 61/164,491
<151> 2009-03-30
<160> 46

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1
<211> 140
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

<223> 重链可变区的氨基酸序列

<400> 1

Met Glu Leu Ile Met Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly Val His
1 5 10 15
Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
20 25 30
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
35 40 45
Tyr Asn Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Asp Trp
50 55 60
Ile Gly Tyr Ile Ala Pro Tyr Ser Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Glu
65 70 75 80
Phe Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
85 90 95
Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Ala Arg Arg Asp Arg Phe Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
115 120 125
Gly Thr Thr Leu Arg Val Ser Ser Val Ser Gly Ser
130 135 140
<210> 2
<211> 150
<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 轻链可变区的氨基酸序列

<400> 2

Met Gly Phe Lys Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Tyr Met Leu

1 5 10 15

Leu Trp Leu Ser Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Ile Gln Ser Gln

20 25 30

Lys Phe Val Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys

35 40 45

Ala Ser Gln Asn Val Gly Ser Asn Val Ala Trp Leu Gln Gln Lys Pro

50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Ser Gly

65 70 75 80

Arg Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile

85 90 95

Leu Thr Ile Thr Thr Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys

100 105 110

Gln Gln Phe Asn Arg Ser Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu

115 120 125

Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro

130 135 140

Ser Ser Lys Gly Glu Phe

145 150

<210> 3

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链可变区的氨基酸序列

<400> 3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Gly Ile Glu Asn Lys Tyr Ala Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Gly Thr Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 4
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 轻链可变区的氨基酸序列
 <400> 4
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Lys Lys Tyr Ala
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Lys Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
 50 55 60
 Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu Asp Glu
 65 70 75 80
 Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ala Trp Gly Lys Gly Met Val Phe Gly Gly
 85 90 95
 Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105
 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 智人(Homo sapiens)CDR3(H-CDR3)的氨基酸序列
 <400> 5
 Ser Gly Leu Ile Phe Asp Tyr Trp Leu Asp
 1 5 10
 <210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 智人 (Homo sapiens) CDR3 (H-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 6

Ser Gly Leu Ile Ile Asp Ala Leu Ser Pro

1 5 10

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 智人 (Homo sapiens) CDR3 (H-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 7

Thr Ser Leu Met Ser Ile Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 智人 (Homo sapiens) CDR3 (H-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 8

Ser Gly Leu Leu Phe Leu Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 智人 (Homo sapiens) CDR3 (H-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 9

Ser Gly Leu Ile Asn Leu Gly Met His Pro

1 5 10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 智人(Homo sapiens)CDR3(H-CDR3)的氨基酸序列

<400> 10

Ser Gly Leu Ile Phe Asp Ala Leu Arg Asp

1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 智人(Homo sapiens)CDR3(H-CDR3)的氨基酸序列

<400> 11

Ser Gly Leu Ile Phe Asp Lys Leu Thr Ser

1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 智人(Homo sapiens)CDR3(H-CDR3)的氨基酸序列

<400> 12

Ser Gly Leu Ile Asn Leu His Phe Asp Thr

1 5 10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 智人(Homo sapiens)CDR3(H-CDR3)的氨基酸序列

<400> 13

Ser Thr His Phe Ser Ala Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 智人(Homo sapiens)CDR3(H-CDR3)的氨基酸序列

<400> 14

Ser Gly Leu Ile Met Asp Lys Leu Asp Asn

1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 智人(Homo sapiens)CDR3(H-CDR3)的氨基酸序列

<400> 15

Ser Gly Leu Ile Ile Asp Asn Leu Asn Pro

1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 智人(Homo sapiens)CDR3(H-CDR3)的氨基酸序列

<400> 16

Ser Gly Leu Ile Ala Val Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR1(H-CDR1)的氨基酸序列

<400> 17

Asp Tyr Leu Leu His

1 5

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR2(H-CDR2)的氨基酸序列

<400> 18

Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 轻链CDR1 (L-CDR1) 的氨基酸序列

<400> 19

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Arg Asn Ile Leu Asn

1 5 10

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 轻链CDR2 (L-CDR2) 的氨基酸序列

<400> 20

Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 轻链CDR3 (L-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 21

Gln Gln Ser Tyr Ser Met Pro Arg Thr

1 5

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 轻链CDR1 (L-CDR1) 的氨基酸序列

<400> 22

Arg Ala Ser His Arg Val Ser Ser Asn Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 轻链CDR2 (L-CDR2) 的氨基酸序列

<400> 23

Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 轻链CDR3 (L-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 24

Gln Gln Tyr Ala Ser Ser Pro Val Thr

1 5

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR3 (H-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 25

Gly Tyr Ile Phe Pro Thr Phe Ala Leu His

1 5 10

<210> 26

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR2 (H-CDR2) 的氨基酸序列

<400> 26

Ser Ile Asn Thr Ala Ser Gly Lys Thr Lys Phe Ser Thr Lys Phe Gln

1 5 10 15

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR3 (H-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 27

Asp Arg Phe Gln Asn Ile Met Ala Thr Ile Leu Asp Val
1 5 10

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR3 (H-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 28

Val Gly Ser Phe Ser Gly Ile Ala Tyr Arg Pro
1 5 10

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR3 (H-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 29

Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Ala Leu Arg Pro
1 5 10

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR3 (H-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 30

Val Gly Ser Phe Ser Pro Pro Thr Tyr Gly Tyr
1 5 10

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR3 (H-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 31

Val Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Pro Tyr Arg Pro
1 5 10

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR3 (H-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 32

Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Leu Gly Leu

1

5

10

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR3 (H-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 33

Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Val Tyr Gly Leu

1

5

10

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR3 (H-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 34

Val Gly Ser Phe Ser Pro Pro Ala Tyr Arg Pro

1

5

10

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR3 (H-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 35

Val Gly Ser Phe Ser Pro Val Thr Tyr Gly Leu

1

5

10

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR3 (H-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 36

Val Gly Ser Phe Ser Gly Leu Ala Tyr Arg Pro

1 5 10

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR3 (H-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 37

Val Gly Ser Phe Ser Pro Ile Thr Tyr Gly Leu

1 5 10

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR3 (H-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 38

Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR3 (H-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 39

Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR3 (H-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 40

Leu Gly Ser Val Thr Ala Trp Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR3 (H-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 41

Ala Gly Ser Ile Pro Gly Trp Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR3 (H-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 42

Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Met Gly Leu
1 5 10

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR3 (H-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 43

Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Met Gly Leu
1 5 10

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR3 (H-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 44

Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Ala Leu His Leu
1 5 10

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR3 (H-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 45

Val Gly Ser Val Ser Arg Ile Thr Tyr Gly Phe

1 5 10

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR3 (H-CDR3) 的氨基酸序列

<400> 46

Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Leu Gly Leu

1 5 10

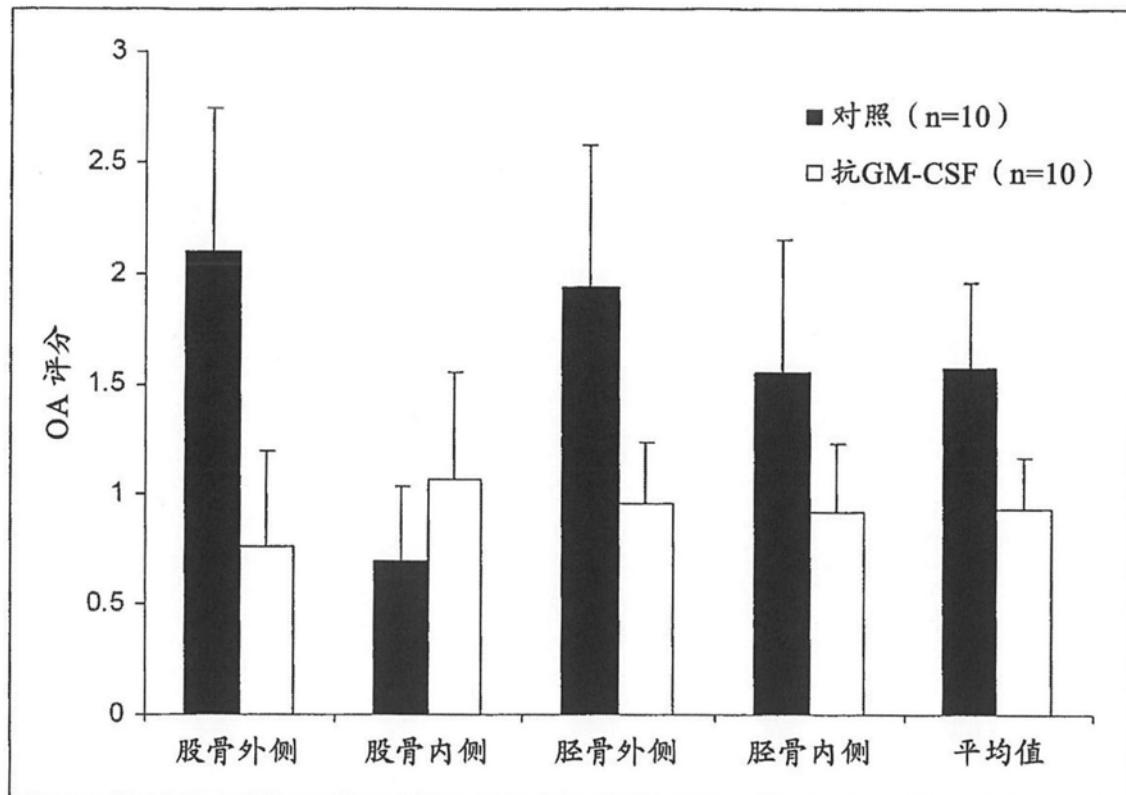
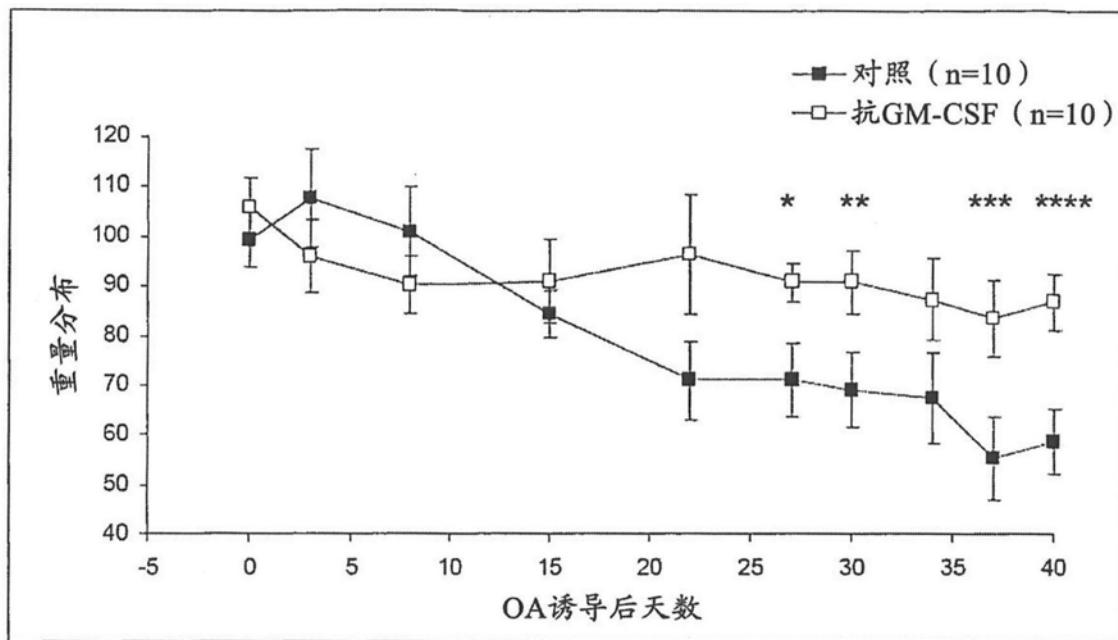


图1



结果表示为平均值 \pm SEM

* p=0.04, ** p=0.04, *** p=0.02, **** p=0.005. 非配对t检验

图2

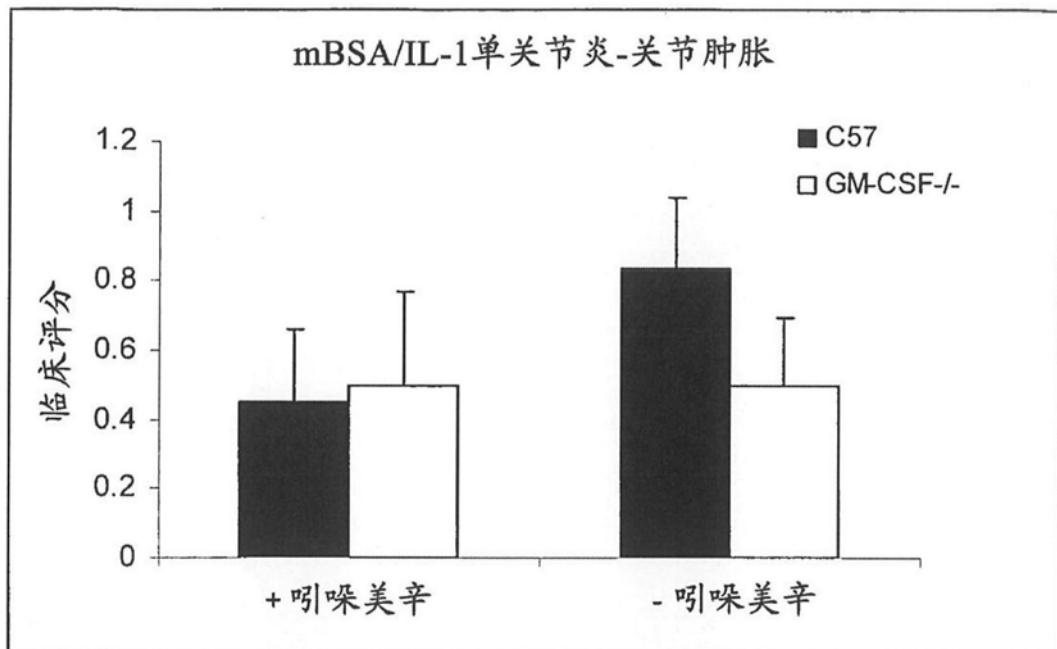


图3

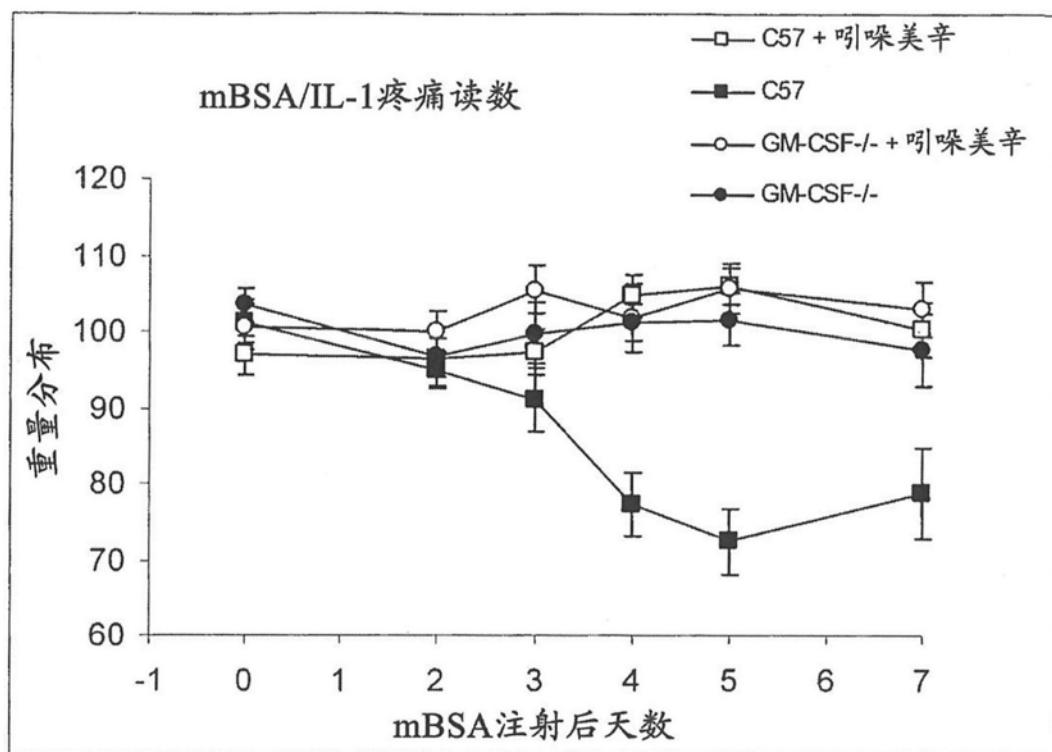


图4

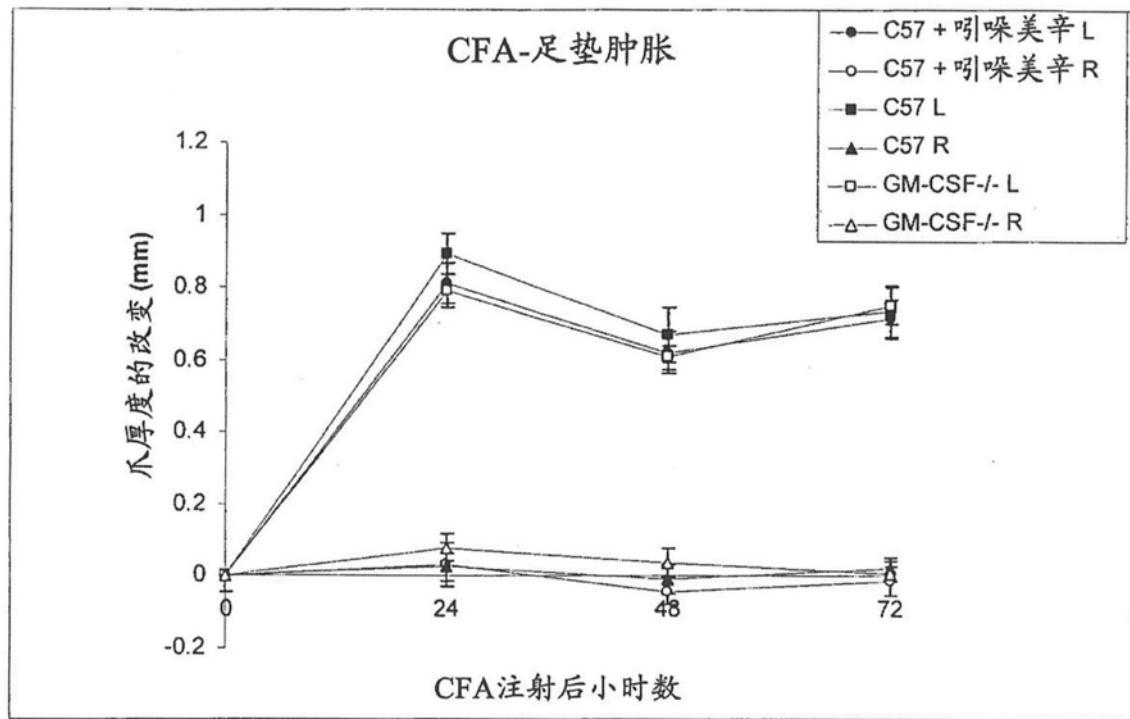


图5

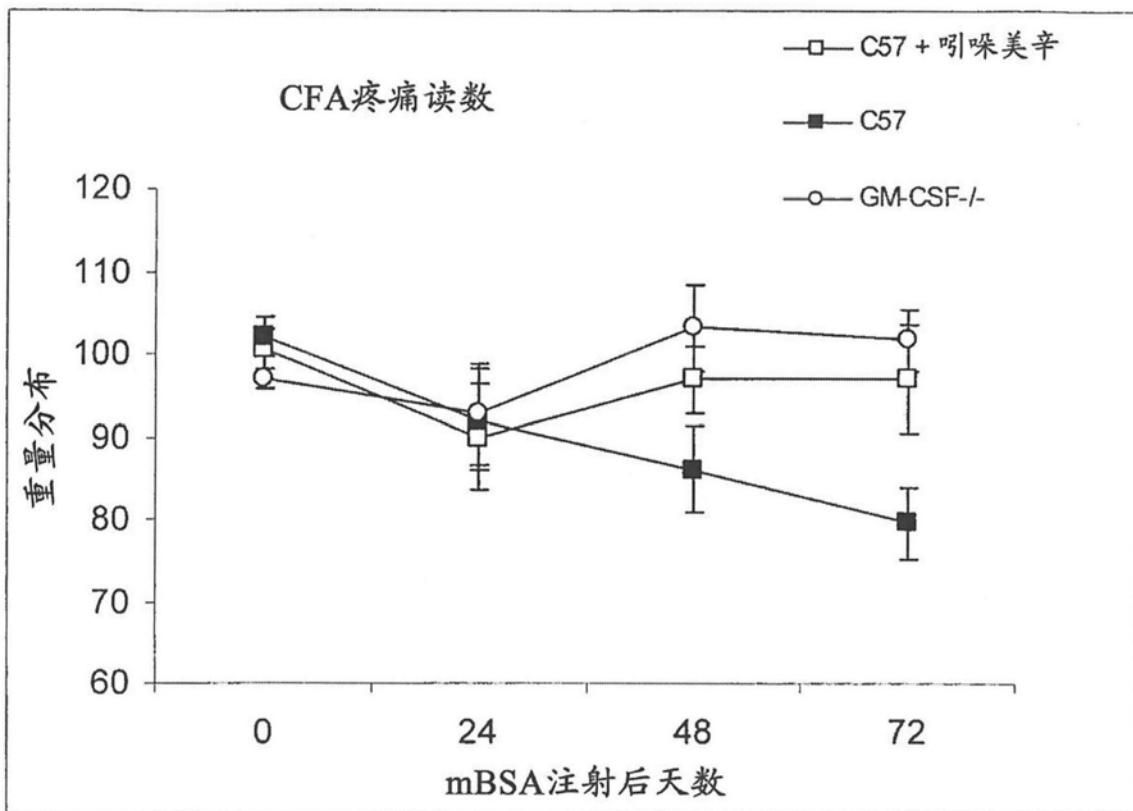


图6

Abstract

The present invention relates generally to the use of an antagonist of granulocyte macrophage colony-stimulating factor, particularly to use of said antagonist in the manufacture of a medicament for the treatment of pain in a subject, wherein said antagonist is an antibody specific for GM-CSF or an antibody specific for the GM-CSF receptor and wherein said pain is selected from the group consisting of osteoarthritic pain, rheumatoid arthritic pain and inflammatory pain. In accordance with the present invention, it is proposed that antagonists of GM-CSF are effective in the treatment of pain. Antagonists of GM-CSF include, but are not limited to, antibodies which are specific for GM-CSF or the GM-CSF receptor. The present invention further provides transgenic animals, such as a GM-CSF knock-out mouse, useful for testing antagonists in certain disease models.