



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102740884 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 17

(21) 申请号 201080038586. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 08. 23

A61K 39/395 (2006. 01)

C07K 16/26 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/237, 901 2009. 08. 28 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 02. 28

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2010/053787 2010. 08. 23

(87) PCT申请的公布数据

W02011/024113 EN 2011. 03. 03

(83) 生物保藏信息

PTA-6867 2005. 07. 15

PTA-6866 2005. 07. 15

(71) 申请人 瑞纳神经科学公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 A·A·皮奥斯 K·T·波尔森

D·L·谢尔顿 J·泽勒

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 左路 林晓红

权利要求书 2 页 说明书 29 页

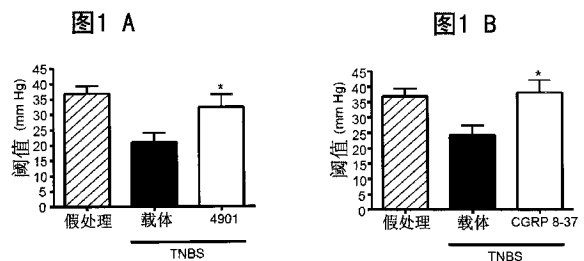
序列表 16 页 附图 2 页

(54) 发明名称

通过施用针对降钙素基因相关肽的拮抗性抗体来治疗内脏痛的方法

(57) 摘要

本发明涉及用于通过施用抗 CGRP 拮抗性抗体来预防或治疗内脏痛的方法, 所述内脏痛包括与功能性肠紊乱、炎症肠病和间质性膀胱炎相关的疼痛。



1. 治疗个体的内脏痛和 / 或一或多种内脏痛症状的方法, 包括给患有内脏痛或具有发生内脏痛的风险的个体施用治疗有效量的抗 CGRP 拮抗性抗体。
2. 权利要求 1 的方法, 其中所述内脏痛与功能性肠紊乱 (FBD) 相关。
3. 权利要求 2 的方法, 其中所述 FBD 选自胃食管反流、消化不良、肠易激综合征 (IBS) 和功能性腹痛综合征 (FAPS)。
4. 权利要求 1 的方法, 其中所述内脏痛与炎性肠病 (IBD) 相关。
5. 权利要求 4 的方法, 其中所述 IBD 选自克罗恩病、回肠炎和溃疡性结肠炎。
6. 权利要求 1 的方法, 其中所述内脏痛与肾绞痛、痛经、膀胱炎、月经期、分娩、绝经期、前列腺炎或胰腺炎相关。
7. 权利要求 6 的方法, 其中所述内脏痛与间质性膀胱炎 (IC) 相关。
8. 权利要求 1 的方法, 其中所述抗 CGRP 拮抗性抗体以 50nM 或更低的 K_D (通过表面等离子共振在 37°C 测定) 结合 CGRP ; 和 / 或具有至少 7 天的体内半衰期。
9. 权利要求 1 的方法, 其中所述抗 CGRP 拮抗性抗体特异性结合 CGRP 的 C 端区域。
10. 权利要求 9 的方法, 其中所述抗 CGRP 拮抗性抗体特异性识别序列 GSKAF (SEQ ID NO :39) 所限定的表位。
11. 权利要求 1 的方法, 其中所述抗 CGRP 抗体包含 VH 结构域, 所述 VH 结构域具有 SEQ ID NO :1 或 19 所示的氨基酸序列。
12. 权利要求 1 的方法, 其中所述抗 CGRP 抗体包含 VL 结构域, 所述 VL 结构域具有 SEQ ID NO :2 或 20 所示的氨基酸序列。
13. 权利要求 1 的方法, 其中所述抗 CGRP 抗体包含至少一种 CDR, 所述 CDR 选自以下一组:
 - (a) SEQ ID NO :3、21、33、34、36 或 37 所示的 CDR H1 ;
 - (b) SEQ ID NO :4、22、35 或 38 所示的 CDR H2 ;
 - (c) SEQ ID NO :5 或 23 所示的 CDR H3 ;
 - (d) SEQ ID NO :6 或 24 所示的 CDR L1 ;
 - (e) SEQ ID NO :7 或 25 所示的 CDR L2 ; 和
 - (f) SEQ ID NO :8 或 26 所示的 CDR L3。
14. 权利要求 1 的方法, 其中所述抗 CGRP 抗体包含 VH 结构域和 VL 结构域, 所述 VH 结构域具有 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列, 所述 VL 结构域具有 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列。
15. 权利要求 1 的方法, 其中所述抗 CGRP 抗体由 ATCC 登记号为 PTA-6867 和 / 或 PTA-6866 的表达载体产生。
16. 权利要求 1 的方法, 其中所述抗 CGRP 抗体包含:
 - SEQ ID NO :11 所示的抗体 G1 重链全抗体氨基酸序列, 具有或不具有 C 端赖氨酸 ; 和
 - SEQ ID NO :12 所示的抗体 G1 轻链全抗体氨基酸序列。
17. 权利要求 1 的方法, 其中所述抗 CGRP 抗体包含:
 - SEQ ID NO :29 所示的抗体 G2 重链全抗体氨基酸序列 ; 和
 - SEQ ID NO :30 所示的抗体 G2 轻链全抗体氨基酸序列。
18. 用于治疗 and / 或预防个体的内脏痛和 / 或内脏痛症状的药物组合物, 其包含抗

CGRP 拮抗性抗体和药用可接受的载体,其中所述组合物被制备为用于外周施用。

通过施用针对降钙素基因相关肽的拮抗性抗体来治疗内脏痛的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2009 年 8 月 28 日提交的美国临时专利申请 61/237,901 的优先权,通过引用将其全部内容并入本申请。

[0003] 对序列表的引用

[0004] 本申请以电子申请形式提交并包括电子形式提交的 .txt 格式的序列表。该 .txt 文件含有 2010 年 8 月 11 日创建的名为 "PC33920A_SeqList.txt" 的序列表,文件大小为 28KB。该 .txt 文件所含的序列表是本申请说明书的一部分,在此通过引用将其全部内容并入本申请。

技术领域

[0005] 本发明涉及使用抗 CGRP 抗体来治疗和 / 或预防内脏痛和 / 或内脏痛症状的方法,并涉及用于预防和 / 或治疗内脏痛和 / 或内脏痛症状的抗 CGRP 抗体。

背景技术

[0006] 内脏痛是患者就诊的主要原因,但对内脏痛的有效治疗十分有限。内脏痛在临床上很难处理,经常需要使用麻醉药。尽管麻醉药被广泛使用,但其严重的剂量限制性不良反应常常导致其功效降低。此外,麻醉药还具有被滥用和成瘾性的危险,并可引起便秘和其他不良反应,这些情况对于很多病例而言是禁忌并可降低生活质量。

[0007] 内脏痛是与内脏相关的疼痛,内脏是指肌体的内部器官,这些器官包括,例如,心脏、肺、生殖器官、膀胱、子宫、消化器官、肝脏、胰腺、脾和肾脏。可以出现内脏痛的情况多种多样,例如,胰腺炎、分娩 (labor)、与肠梗阻有关的腹部手术、膀胱炎、月经期或痛经。类似地,肾脏痛、上腹痛、胸膜痛、胆绞痛以及阑尾炎痛均可以认为是内脏痛。早期心肌梗死的胸骨后疼痛和压榨感也是内脏痛。胃、十二指肠或结肠的疾病可引起内脏痛。引起内脏痛的常见胃肠道 (GI) 疾病包括功能性肠紊乱 (FBD) 和炎性肠病 (IBD)。这些 GI 疾病包括目前尚不能完全控制的多种疾病状态,就 FBD 而言,包括胃食管反流、消化不良、肠易激综合征 (IBS) 和功能性腹痛综合征 (FAPS),就 IBD 而言,包括克罗恩病、回肠炎和溃疡性结肠炎,它们均经常引起内脏痛。

[0008] 全世界的成人和青少年中有 10-20 % 有 IBS (Longstreth et al., 2006, *Gastroenterology* 130 (5) :1480-91)。这些患者就诊的首要原因是慢性内脏痛,其原因被认为是内脏敏感性增强 (Aziz, 2006, *Gastroenterology* 131 (2) :661-4)。已经发现 IBS 患者对结直肠扩张具有较低的内脏感觉阈值,而这与内脏痛症状高度相关 (DeLafoy et al, 2006, *Gut* 55 (7) :940-5)。对以三硝基苯磺酸 (TNBS) 诱导结肠炎的大鼠进行结直肠扩张是许多研究者在探讨内脏过度敏感机制时所使用的动物模型 (Gay et al, 2006, *Neuroimmunomodulation* 23 ;13 (2) :114-121 ;DeLafoy et al, 2006 ;Adam et al., 2006, *Pain* 123 (1-2) :179-86)。

[0009] 间质性膀胱炎 (Interstitial cystitis, IC) 是一种痛性膀胱综合征, 临床特征为尿急、尿频和慢性盆腔痛。临床研究表明, 这涉及内脏感觉传入神经过度敏感, 患者在膀胱充盈度低于正常体积时便有膀胱充盈感, 说明膀胱粘膜下神经密度增加, 并有神经性炎症, 膀胱的充盈产生疼痛感。IC 的组织学检查提示内脏传入神经的参与。

[0010] 内脏痛的产生可以是对例如炎症、扩张或压力增加的反应。它并不总是由内脏损伤引起。此外, 内脏痛是弥漫性的, 可以有其他部位的牵涉痛; 并可以与其他自主性或运动反射相关联 (例如, 恶心、肾绞痛引起的腰背部肌肉紧张) (Lancet 1999, 353, 2145-48)。

[0011] CGRP (降钙素基因相关肽) 是 37 个氨基酸的神经肽, 属于包括降钙素、肾上腺髓质素和糊精等在内的肽家族。在人类, 存在两种形式的 CGRP (α -CGRP 和 β -CGRP), 它们具有相似的活性。它们之间有 3 个氨基酸不同, 并具有不同的分布。至少有两种 CGRP 受体亚型, 这也可能是不同活性的原因。CGRP 是中枢神经系统的神经递质, 在外周发现其是强效的血管舒张剂, 其中含 CGRP 的神经元过程 (CGRP-containing neuronal processes) 与血管密切相关。CGRP 介导的血管舒张还与神经性炎症相关, 是导致血浆外渗和微血管舒张的级联事件中的一部分, 并且也见于偏头痛。

[0012] 已经发现, 可采用椎管内施用小分子选择性 CGRP 拮抗剂来治疗神经性和伤害性疼痛病症 (Adwanikar et al, Pain, 2007, 132(1-2): 53-66), 这提示去除脊髓中的内源性 CGRP 信号途径具有镇痛效应。一些报道发现, 阻断 CGRP 信号途径对于通过全身注射 CGRP 8-37——一种 CGRP 受体拮抗剂——来逆转内脏过度敏感 (VH) 是有效的 (Delafroy et al., 2006; Plourde et al., 1997, Am J Physiol. 273(1 Pt 1): G191-6; Julia and Bueno, 1997, Am J Physiol. 272(1Pt 1): G141-6)。不过, CGRP 8-37 的体内半衰期很短, 因此不会是一种有用的治疗剂。因此, 临床上亟需鉴定到用于治疗 and 预防内脏痛的新的治疗剂。

[0013] 本申请中引用了多种出版物 (包括专利和专利申请)。通过引用将这些出版物的全部内容并入本申请。

发明内容

[0014] 本发明提供预防和 / 或治疗个体的内脏痛和 / 或内脏痛症状的方法, 所述方法包括给患有内脏痛或具有发生内脏痛的风险的个体施用治疗有效量的抗 CGRP 拮抗性抗体。

[0015] 在一些实施方式中, 所述抗 CGRP 拮抗性抗体在外周施用。在其他实施方式中, 所述抗 CGRP 拮抗性抗体通过口服、舌下、吸入、透皮、皮下、静脉内、动脉内、关节内、关节周围、局部和 / 或肌肉内施用。

[0016] 在一些实施方式中, 所述内脏痛与功能性肠紊乱 (FBD) 相关。FBD 可以是胃食管反流、消化不良、肠易激综合征 (IBS) 和功能性腹痛综合征 (FAPS)。在一些实施方式中, 所述内脏痛与炎性肠病 (IBD) 相关。IBD 可以是克罗恩病、回肠炎或溃疡性结肠炎。在一些实施方式中, 所述内脏痛与肾绞痛、痛经、膀胱炎、月经期、分娩、绝经期、前列腺炎或胰腺炎相关。在一些实施方式中, 所述内脏痛与间质性膀胱炎 (IC) 相关。

[0017] 在一些实施方式中, 所述抗 CGRP 拮抗性抗体结合 CGRP; 阻断 CGRP 与其受体结合; 阻断或降低 CGRP 受体活化; 抑制、阻断、阻抑或降低 CGRP 的生物学活性; 增加 CGRP 的清除; 和 / 或抑制 CGRP 的合成、产生或释放。

[0018] 在一些实施方式中, 所述抗 CGRP 拮抗性抗体是人抗体或人源化抗体。在一些实施

方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体是单克隆抗体。在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体能以 50nM 或更低的 KD 结合 CGRP (通过表面等离子共振在 37°C 测定和 / 或具有至少 7 天的体内半衰期)。

[0019] 在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体特异性结合 CGRP 的 C 端区域。在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体特异性识别序列 GSKAF (SEQ ID NO :39) 所限定的表位。在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体包含 VH 结构域,该 VH 结构域的氨基酸序列与 SEQ ID NO :1 或 19 具有至少 90% 的相同性。

[0020] 在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体包含 VL 结构域,该 VL 结构域的氨基酸序列与具有至少 90% 的相同性 SEQ ID NO :2 或 20。在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体还包含 VH 结构域,该 VH 结构域的氨基酸序列与 SEQ ID NO :1 或 19 具有至少 90% 的相同性。在其他实施方式中,所述抗 CGRP 抗体包含至少一种 CDR,所述 CDR 选自以下一组 : (a) SEQ ID NO :3、21、33、34、36 或 37 所示的 CDR H1 ; (b) SEQ ID NO :4、22、35 或 38 所示的 CDR H2 ; (c) SEQ ID NO :5 或 23 所示的 CDR H3 ; (d) SEQ ID NO :6 或 24 所示的 CDR L1 ; (e) SEQ ID NO :7 或 25 所示的 CDR L2 ; (f) SEQ ID NO :8 或 26 所示的 CDR L3 ; 和 (g) L1、L2 和 H2 的变体。

[0021] 在一些实施方式中,所述抗 CGRP 抗体包含 SEQ ID NO :11 所示的抗体 G1 重链全抗体氨基酸序列,具有或不具有 C 端赖氨酸。在一些实施方式中,所述抗 CGRP 抗体包含 SEQ ID NO :12 所示的抗体 G1 轻链全抗体氨基酸序列。在一些实施方式中,所述抗 CGRP 抗体包含 SEQ ID NO :11 所示的抗体 G1 重链全抗体氨基酸序列,具有或不具有 C 端赖氨酸 ; 和 SEQ ID NO :12 所示的抗体 G1 轻链全抗体氨基酸序列。

[0022] 在一些实施方式中,所述抗 CGRP 抗体包含 SEQ ID NO :29 所示的抗体 G2 重链全抗体氨基酸序列,具有或不具有 C 端赖氨酸。在一些实施方式中,所述抗 CGRP 抗体包含 SEQ ID NO :30 所示的抗体 G2 轻链全抗体氨基酸序列。在一些实施方式中,所述抗 CGRP 抗体包含 SEQ ID NO :29 所示的抗体 G2 重链全抗体氨基酸序列和 SEQ ID NO :30 所示的抗体 G2 轻链全抗体氨基酸序列。

[0023] 在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体包含 VH 结构域和 VL 结构域,该 VH 结构域的氨基酸序列与 SEQ ID NO :1 具有至少 90% 的相同性,该 VL 结构域的氨基酸序列与 SEQ ID NO :2 具有至少 90% 的相同性。在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体包含由 ATCC 登记号为 PTA-6867 的表达载体产生的重链。在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体包含由 ATCC 登记号为 PTA-6866 的表达载体产生的轻链。在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体由 ATCC 登记号为 PTA-6867 和 PTA-6866 的表达载体产生。

[0024] 在一些实施方式中,所述抗 CGRP 通过皮下或静脉每月施用 1、2、3 或 4 次。在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体的施用浓度在 5 至 100mg/ml 之间。在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体的施用浓度在 1 至 100mg/kg 体重之间。

[0025] 在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体不引起运动协调或注意力的 CNS 损害。在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体不通过中枢、椎管内或气管内施用。在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体不是中枢、椎管内或气管内穿透分子。

[0026] 在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体与一或多种其他药理学活性化合物相组合地分开、依次或同时施用。在一些实施方式中,所述一或多种其他药理学活性化合

物选自：阿片类镇痛药，例如吗啡、海洛因、氢吗啡酮、羟吗啡酮、左啡诺、左洛啡烷、美沙酮、哌替啶、芬太尼、可卡因、可待因、双氢可待因、羟考酮、氢可酮、丙氧芬、纳美芬、烯丙吗啡、纳洛酮、纳曲酮、丁丙诺啡、布托啡诺、纳布啡或喷他佐辛；非甾体抗炎药 (NSAID)，例如阿司匹林、双氯芬酸、地夫美多、依托度酸、芬布芬、非诺洛芬、氟苯柳、氟比洛芬、布洛芬、吲哚美辛、酮洛芬、酮咯酸、甲氯芬那酸、甲芬那酸、萘丁美酮、萘普生、奥沙普秦、保泰松、吡罗昔康、舒林酸、托美汀或佐美酸、或它们的药用可接受的盐；巴比妥酸盐镇静药，例如异戊巴比妥、阿普比妥、仲丁巴比妥、布他比妥 (butabital)、甲苯比妥、美沙比妥、美索比妥、戊巴比妥、苯巴比通 (phenobarbital)、司可巴比妥、他布比妥、theamylal 或硫喷妥钠或它们的药用可接受的盐；具有镇静作用的苯二氮卓类，例如氯氮卓、氯拉卓酸、地西洋、氟西洋、劳拉西洋、奥沙西洋、替马西洋或三唑仑或它们的药用可接受的盐；具有镇静作用的 H1 拮抗剂，例如苯海拉明、吡拉明、异丙嗪、氯苯那敏或氯环利嗪或它们的药用可接受的盐；镇静剂例如苯乙哌啶酮、甲丙氨酯、甲喹酮或氯醛比林或它们的药用可接受的盐；骨骼肌松弛药，例如巴氯芬、卡立普多、氯唑沙宗、环苯扎林、美索巴莫或 orphrenadine 或它们的药用可接受的盐；NMDA 受体拮抗剂，例如右美沙芬 ((+)-3-羟基-N-甲基吗啡) 或其代谢物右啡烷 ((+)-3-羟基-N-甲基吗啡)、氯胺酮、美金刚、吡咯喹啉醌 (pyrroloquinoline quinone) 或顺-4-(磷酸基甲基)-2-哌啶羧酸或它们的药用可接受的盐； α -肾上腺素能药物，例如多沙唑嗪、坦洛新、可乐定或 4-amino-6,7-dimethoxy-2-(5-methanesulfonamido-1,2,3,4-tetrahydroisoquinol-2-yl)-5-(2-pyridyl)quinazoline；三环抗抑郁药，例如地昔帕明、丙咪嗪、amitriptyline 或去甲替林；抗惊厥药，例如卡马西平或丙戊酸盐；速激肽 (NK) 拮抗剂，特别是 NK-3、NK-2 或 NK-1 拮抗剂，例如 (α R,9R)-7-[3,5-bis(trifluoromethyl)benzyl]-8,9,10,11-tetrahydro-9-methyl-5-(4-methylphenyl)-7H-[1,4]diazocino[2,1-g][1,7]naphthridine-6-13-dione (TAK-637)、5-[[2R,3S)-2-[(1R)-1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]ethoxy-3-(4-fluorophenyl)-4-morpholinyl]methyl]-1,2-dihydro-3H-1,2,4-triazol-3-one (MK-869)、拉奈匹坦、达匹坦或 3-[[2-methoxy-5-(trifluoromethoxy)phenyl]methylamino]-2-phenyl-piperidine (2S,3S)；毒蕈碱拮抗剂，例如 oxybutin、托特罗定、丙哌维林、trospium chloride 或达非那新；COX-2 抑制剂，例如塞来昔布、罗非昔布或伐地考昔；非选择性 COX 抑制剂 (优选地具有 GI 保护作用)，例如硝基氟吡洛芬 (HCT-1026)；煤焦油止痛剂 (coal-tar analgesic)，特别是扑热息痛；精神安定药例如氟哌利多；辣椒素受体激动剂 (例如 resiniferatoxin) 或拮抗剂 (例如辣椒素受体阻断剂)； β -肾上腺素能药物例如普萘洛尔；局麻药，例如美西律；皮质类固醇，例如地塞米松；血清素受体激动剂或拮抗剂；胆碱能 (烟碱) 止痛剂；曲马多 (Tramadol [®])；PDEV 抑制剂，例如西地那非、伐地那非或 taladafil； α -2- δ 配体例如加巴喷丁或普瑞巴林；以及大麻素 (cannabinoid)。

[0027] 本发明还提供抗 CGRP 拮抗性抗体在制备用于预防和 / 或治疗内脏痛和 / 或内脏痛症状的药物中的用途。在一些实施方式中，所述药物被制备为用于外周施用。在一些实施方式中，所述抗 CGRP 拮抗性抗体施用后在外周起作用。

[0028] 本发明还提供治疗和 / 或预防个体的内脏痛和 / 或内脏痛症状的药物组合物，其包含抗 CGRP 拮抗性抗体和药用可接受的载体。在一些实施方式中，所述组合物被制备为用于外周施用。

[0029] 本发明还提供试剂盒,其包含用于治疗 and / 或预防个体的内脏痛和 / 或内脏痛症状药物组合物,以及用于给个体外周施用治疗有效量的所述药物组合物以治疗 and / 或预防内脏痛和 / 或内脏痛症状的说明书。

[0030] 附图简述

[0031] 图 1A 和图 1B 显示的是内脏痛模型。(A) 动物在进行剖腹术后注射三硝基苯磺酸 (TNBS),再给这些动物静脉施用抗体 4901 (“4901”) 或 PBS 对照 (“载体”)。采用球囊扩张法测试动物的内脏痛阈值。痛阈以 mm Hg 显示 (y 轴)。假处理 (Sham) 代表剖腹术后注射对照物 (30% 乙醇) 溶液而非 TNBS 的动物。(B) 给剖腹术后以 TNBS 处理的动物静脉施用 CGRP 受体拮抗剂 CGRP 8-37 或 PBS 对照 (“载体”)。与 (A) 一样,采用球囊扩张法测试动物的内脏痛阈值,痛阈以 mm Hg 显示 (y 轴)。

[0032] 图 2 显示的是内脏痛模型。给动物静脉施用抗体 4901 (“4901”) 或 PBS 对照 (“载体”)。在松节油诱导膀胱炎后 1 小时、3 小时和 5 小时测试膀胱的运动性,以收缩次数 (y 轴) 来测量。

[0033] 发明详述

[0034] 本发明提供通过给个体施用治疗有效量的抗 CGRP 拮抗性抗体来治疗和 / 或预防个体的内脏痛的方法。

[0035] 本发明还提供抗 CGRP 拮抗性抗体和衍生自 W02007/054809 表 6 所示的 G1 或其变体的多肽,通过引用将 W02007/054809 的全部内容并入本申请。本发明还提供制备和使用这些抗体和多肽的方法。

[0036] 通用技术

[0037] 除非另有说明,本发明的实施可使用分子生物学 (包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,这些都是本领域人员已知的。此类技术在文献中有完善的解释,例如参见 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel et al., eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practical approach* (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies: a practical approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using antibodies: a Laboratory manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold

Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995)。

[0038] 定义

[0039] “抗体”是免疫球蛋白分子,其能够通过位于其可变区内的至少一个抗原识别位点而特异性结合靶,例如糖类、多核苷酸、脂质、多肽等等。在本申请中,该术语不仅涵盖完整的多克隆或单克隆抗体,也涵盖它们的片段(例如 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv)、单链(ScFv)、突变体、包含抗体部分的融合蛋白(例如结构域抗体)、以及包含抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他修饰构型。抗体包括任何类型的抗体,例如 IgG, IgA 或 IgM(或它们的亚型),且抗体不必是任何特殊的类型。基于抗体重链恒定结构域的氨基酸序列,免疫球蛋白可分为不同类型。有五种主要类型的免疫球蛋白: IgA, IgD, IgE, IgG 和 IgM, 它们中的一些可进一步分为若干亚型(同种型),例如, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 和 IgA2。对应于不同类型免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类型免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是已知的。

[0040] 在本申请中,“单克隆抗体”指的是从基本上均质的抗体群体中获得的抗体,即,除了可能有少量天然发生的突变之外,组成该群体的单个抗体是相同的。单克隆抗体具有高度的特异性,针对的是单一的抗原性位点。此外,与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物不同,每一单克隆抗体均针对抗原上的单一决定簇。定语“单克隆”表示抗体是从基本上均质的抗体群体中获得的这一特征,而不能理解为要求所述抗体是通过任何特殊的方法产生的。例如,本发明所述的单克隆抗体可以通过 Kohler 和 Milstein, 1975, Nature, 256:495 首先描述的杂交瘤方法制备的,或者可以通过例如美国专利 4,816,567 所述的重组 DNA 方法制备的。单克隆抗体还可以是从采用例如 McCafferty et al., 1990, Nature, 348:552-554 所述的技术所产生的噬菌体文库中分离的。

[0041] 在本申请中,“人源化”抗体指的是非人(例如鼠的)抗体,它们是特异性的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(例如 Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 或抗体的其他抗原结合亚序列),它们含有来源于非人免疫球蛋白的最小序列。对于绝大多数情况,人源化抗体是这样的人免疫球蛋白(受者抗体),其中来自受者的互补决定区(CDR)残基被具有所需特异性、亲和力和生物学活性的来自非人物种抗体(供者抗体)的 CDR 残基置换,所述非人物种例如为小鼠、大鼠或兔。在一些情况中,人免疫球蛋白 Fv 构架区(FR)残基被相应的非人残基置换。此外,人源化抗体可包含既不存在于受者抗体也不存在于输入的 CDR 或构架序列中的残基,这些残基被纳入的目的是进一步改善和优化抗体性能。通常,人源化抗体包含基本上全部的至少一种、但通常两种可变结构域(例如,重链可变结构域和轻链可变结构域),其中全部或基本上全部 CDR 区相应于非人免疫球蛋白的 CDR 区,而全部或基本上全部 FR 区是人免疫球蛋白共有序列的 FR 区。人源化抗体理想地还包含至少一部分免疫球蛋白恒定区或结构域(Fc),通常是人免疫球蛋白恒定区或结构域(Fc)。可按照 WO 99/58572 所述对抗体的 Fc 区进行修饰。其他形式的人源化抗体具有相对于原始抗体被改变的一或多种 CDR(1、2、3、4、5、6 种),这也称为“来源于”原始抗体的一或多种 CDR 的一或多种 CDR。

[0042] 在本申请中,“人抗体”是指这样的抗体,其具有相应于由人产生的抗体的氨基酸序列和/或是以本领域已知的或本申请公开的任何用于制备人抗体的技术所制备的抗

体。人抗体的定义包括那些包含至少一种人重链多肽或至少一种人轻链多肽的抗体。一个这样的实例是包含鼠轻链多肽和人重链多肽的抗体。可以使用本领域已知的多种技术产生人抗体。在一个实施方式中,所述人抗体选自噬菌体文库,其中所述噬菌体文库表达人抗体 (Vaughan et al., 1996, *Nature Biotechnology*, 14 :309-314 ;Sheets et al., 1998, *PNAS*, (USA) 95 :6157-6162 ;Hoogenboom and Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227 :381 ;Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222 :581)。也可以通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物中而制备人抗体,所述动物例如为内源性免疫球蛋白基因已经部分或完全失活的小鼠。这种方法可参见美国专利 5, 545, 807、5, 545, 806、5, 569, 825、5, 625, 126、5, 633, 425 和 5, 661, 016。或者可以通过使得产生针对靶抗原的抗体的人 B 淋巴细胞永生而制备人抗体 (此类 B 淋巴细胞可从个体收集或已经在体外进行免疫)。参见,例如, Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77, 1985 ;Boerner et al., 1991, *J. Immunol.*, 147(1) :86-95 ;和美国专利 5, 750, 373。

[0043] 在本申请中,术语“降钙素基因相关肽”和“CGRP”指的是任何形式的降钙素基因相关肽及其保留了 CGRP 的至少一部分活性的变体。例如, CGRP 可以是 α -CGRP 或 β -CGRP。在本申请中, CGRP 包括所有哺乳动物物种的天然序列的 CGRP,所述哺乳动物例如为人、犬、猫、马和牛。

[0044] 在本申请中,“抗 CGRP 拮抗性抗体”(与“抗 CGRP 抗体”可互换使用)指的是这样的抗体,其能够结合 CGRP 并抑制 CGRP 的生物学活性和 / 或由 CGRP 信号途径介导的下游途径。抗 CGRP 拮抗性抗体涵盖那些阻断、拮抗、阻抑或降低 (包括明显降低) CGRP 的生物学活性, CGRP 的生物学活性包括由 CGRP 信号途径介导的下游途径,例如受体结合和 / 或由 CGRP 引发的细胞应答。在本发明中,术语“抗 CGRP 拮抗性抗体”应明确理解为涵盖使得 CGRP 本身、CGRP 的生物学活性 (包括但不限于其介导内脏痛的任何方面的能力) 或所述生物学活性的结果以任何有意义的程度被明显失效、降低或被中和的所有以往鉴定的术语、标题和功能状态和特征。在一些实施方式中,抗 CGRP 拮抗性抗体结合 CGRP 并防止 CGRP 结合于 CGRP 受体。在其他实施方式中,抗 CGRP 抗体结合 CGRP 并防止 CGRP 受体活化。本申请提供了抗 CGRP 拮抗性抗体的实例。

[0045] 在本申请中,术语“G1”和“抗体 G1”可互换使用,指的是由保藏号为 ATCC-PTA-6867 和 ATCC-PTA-6866 的表达载体所产生的抗体。重链和轻链可变区的氨基酸序列显示于 SEQ ID NO :1 和 2。抗体 G1 的 CDR 部分 (包括 Chothia 和 Kabat CDR) 显示于 W02007/054809 的图 5,通过引用将 W02007/054809 的全部内容并入本申请。编码所述重链和轻链可变区的多核苷酸序列显示于 SEQ ID NO :9 和 10。W02007/054809 的实施例对抗体 G1 进行了表征。

[0046] 在本申请中,术语“G2”和“抗体 G2”可互换使用,指的是 Wong HC et al. *Hybridoma* 12 :93-106, 1993 所述的抗大鼠 CGRP 的小鼠单克隆抗体。所述重链和轻链可变区的氨基酸序列显示于 SEQ ID NO :19 和 20。编码所述重链和轻链可变区的多核苷酸序列显示于 SEQ ID NO :27 和 28。SEQ ID NO :21 至 26 给出了抗体 G2 的 CDR 部分。

[0047] 术语“多肽”、“寡肽”、“肽”和“蛋白质”在本申请中可互换使用,指的是任何长度的氨基酸链,优选地为相对短的氨基酸链 (例如, 10-100 个氨基酸)。链可以是线性的或分叉的,其可以包含修饰的氨基酸,和 / 或可被非氨基酸中断。该术语也涵盖天然修饰的或通

过干预而修饰的氨基酸链；例如，形成二硫键、糖基化、脂质化 (lipidation)、乙酰化、磷酸化或任何其他操作或修饰，例如与标记成分缀合。还定义还包括，例如，含有一或多个氨基酸类似物（包括，例如，非天然氨基酸等）以及其他本领域已知的修饰的多肽。要理解所述多肽可以是单链或结合链的形式。

[0048] 本领域已知，“多核苷酸”或“核酸”在本申请中可互换使用，指的是任何长度的核苷酸链，并包括 DNA 和 RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核酸、核糖核酸、修饰的核苷酸或碱基、和 / 或它们的类似物、或能够被 DNA 或 RNA 聚合酶掺入链中的任何底物。多核苷酸可包含修饰的核苷酸，例如甲基化核苷酸和它们的类似物。如果存在修饰，那么对核苷酸结构的修饰可以在链组装之前或之后进行。核苷酸的序列可以被非核苷酸成分打断。可以在聚合后对多核苷酸做进一步修饰，例如与标记成分缀合。其他类型的修饰包括，例如，“加冒”；以类似物置换一或多个天然存在的核苷酸；核苷酸间修饰，例如具有不带电荷的连键（例如，甲基磷酸酯、磷酸三酯、phosphoamidates、氨基甲酸酯等等）和具有带电荷的连键（例如，硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等等），含有悬垂 (pendant) 部分，例如，蛋白质（例如，核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚-L-赖氨酸等等），具有嵌入剂（例如，吡啶、补骨脂素等等），含有螯合剂（例如，金属、放射性金属、硼、氧化性金属等等），含有烷化剂，具有修饰的连键（例如， α 异头核酸等等）；以及非修饰形式的多核苷酸。此外，可以置换糖中正常存在的任何羟基，例如，通过磷酸酯基团、磷酸酯基团、通过标准保护基保护或活化以便为额外的核苷酸准备额外的连键，或者可以缀合于固相支持物。5' 端和 3' 端 OH 可以被磷酸化或以胺或 1-20 个碳原子的有机加冒基团部分取代。还可以将其他羟基衍生化为标准的保护基。多核苷酸还可含有本领域熟知的类似形式的核糖或脱氧核糖，包括，例如，2'-O-甲基-、2'-O-烯丙基、2'-氟-或 2'-叠氮-核糖，碳环糖类类似物 (carbocyclic sugar analogs)， α -或 β -异头糖，差向异构糖例如阿拉伯糖、木糖或来苏糖、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖，无环类似物 (acyclic analogs) 和脱碱基核苷酸类似物例如甲基核苷。可用替代性连接基团置换一或多种磷酸二酯键。这些替代性连接基团包括，但不限于以下情况，将磷酸酯置换为 P(O)S (“硫代”)、P(S)S (“二硫代”)、(O)NR₂ (“酰胺”)、P(O)R、P(O)OR'、CO 或 CH₂ (“formacetal”)，其中每一 R 或 R' 独立地是 H 或取代的或非取代的烃基 (1-20C)，且任选地含有醚 (-O-) 连键、芳基、烯基、环烷基、环烯基或 araldyl。多核苷酸中的连键不必全部相同。以上描述适用于本申请中提及的所有多核苷酸，包括 RNA 和 DNA。

[0049] 抗体“可变区”指的是抗体轻链的可变区或抗体重链的可变区，可以是单独的或相组合。重链和轻链可变区各自自由通过三个互补决定区 (CDR) 连接的四个构架区 (FR) 组成，CDR 也称为高变区。每一链中的 CDR 通过 FR 保持为紧密靠近在一起，并与另一链的 CDR 一起，形成抗体的抗原结合位点。至少有两种技术用于确定 CDR：(1) 基于物种间序列变异性的方法（即，Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)）；和 (2) 基于抗原抗体复合物晶体学研究的方法 (Al-lazikani et al (1997) J. Molec. Biol. 273 :927-948)。在本申请中，CDR 可以指通过任一方法或两种方法的组合而定义的 CDR。

[0050] 抗体的“恒定区”指的是抗体轻链的恒定区或抗体重链的恒定区，可以是单独的或相组合。

[0051] 在本申请中，抗体的“免疫特异性”结合指的是抗体的抗原结合位点与该抗体识

别的特定抗原之间的抗原特异性结合相互作用（即，抗体与蛋白质在 ELISA 或其他免疫测定法中反应，而不与无关的蛋白质发生可检测的反应）。

[0052] 与抗体或多肽“优先结合”或“特异性结合”（在本申请中可互换使用）的表位是本领域熟知的术语，且确定此类特异性或优先结合的方法也是本领域熟知的。如果一种分子与一种特定细胞或物质的反应或结合较其与其他细胞或物质的反应或结合更加频繁、持续更长时间和 / 或具有更好的亲和力，则称该分子表现出“特异性结合”或“优先结合”。如果抗体与靶的结合较其与其他物质的结合具有更高的亲和力、亲和性、更容易和 / 或持续更长的时间，则抗体与所述靶“特异性结合”或“优先结合”。例如，特异性结合或优先结合 CGRP 表位的抗体是这样的抗体，其与该表位的结合相对于其与其他 CGRP 表位或非 CGRP 表位的结合而言具有更高的亲和力、亲和性、更容易和 / 或持续更长的时间。还要理解，根据该定义，例如，特异性或优先结合第一靶的抗体（或部分或表位）可以特异性或优先结合第二靶，也可以不特异性或优先结合第二靶。因此，“特异性结合”或“优先结合”不一定要要求（尽管可以包括）排他性结合。通常，结合指的是优先结合，但也不是必需如此。

[0053] 在本申请中，“基本上纯的”指的是材料至少是 50% 纯的（即，不含污染物），更优选地是至少 90% 纯的，更优选地是至少 95% 纯的，更优选地是至少 98% 纯的，更优选地是至少 99% 纯的。

[0054] “宿主细胞”包括单个的细胞或细胞培养物，其可以是或者已经是用于掺入多核苷酸插入物的载体的受者。宿主细胞包括单个宿主细胞的子代，由于天然的、偶然或人为的突变，所述子代不一定与原始的亲代细胞（在形态学上或在基因组 DNA 上）完全相同。宿主细胞包括以本发明的多核苷酸转染的细胞。

[0055] 术语“Fc 区”定义的是免疫球蛋白重链的 C 端区域。“Fc 区”可以是天然序列的 Fc 区或变体 Fc 区。尽管免疫球蛋白重链 Fc 区的边界可以不同，但人 IgG 重链 Fc 区通常从重链的 Cys226 或 Pro230 氨基酸残基开始延伸至重链的羧基端。Fc 区内的残基编号是 Kabat 中 EU 指数的编号。Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991。免疫球蛋白的 Fc 区通常包含两个恒定结构域，即 CH2 和 CH3。

[0056] 在本申请中，“Fc 受体”和“FcR”指的是结合抗体 Fc 区的受体。优选的 FcR 是天然序列的人 FcR。此外，优选的 FcR 是结合 IgG 抗体的 FcR (γ 受体)，并包括 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 亚型的受体，包括这些受体的等位基因变体和替代剪接形式。Fc γ RII 受体包括 Fc γ RIIA (“活化受体”) 和 Fc γ RIIB (“抑制受体”)，它们具有相似的氨基酸序列，主要在胞浆结构域存在不同。有关 FcR 的综述见 Ravetch and Kinet, 1991, Ann. Rev. Immunol., 9 :457-92 ;Capel et al., 1994, Immunomethods, 4 :25-34 ;和 de Haas et al., 1995, J. Lab. Clin. Med., 126 :330-41。“FcR”还包括新生儿受体 FcRn，其负责将母体的 IgG 转运给胎儿 (Guyer et al., 1976, J. Immunol., 117 :587 ;和 Kim et al., 1994, J. Immunol., 24 :249)。

[0057] “补体依赖性细胞毒性”和“CDC”指的是在存在补体的情况下裂解靶。补体活化途径由补体系统的第一种补体 (C1q) 结合与相关抗原相复合的分子（例如抗体）而起始。为了评估补体活化，可进行 CDC 测定，例如参见 Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202 :163 (1996)。

[0058] “功能性 Fc 区”具有天然序列的 Fc 区的至少一种效应物功能。示例性的“效应物功能”包括结合 C1q ;补体依赖性细胞毒性 (CDC) ;Fc 受体结合 ;抗体依赖性细胞介导的细胞毒反应 (ADCC) ;吞噬作用 ;下调细胞表面受体 (例如 B 细胞受体 ;BCR) 等等。此类效应物功能通常需要 Fc 区与一结合结构域 (例如抗体可变结构域) 相组合,并能够采用多种本领域人员已知的用于评价此类抗体效应物功能的测定法进行分析。

[0059] “天然序列的 Fc 区”包含的氨基酸序列与天然存在的 Fc 区的氨基酸序列相同。“变体 Fc 区”包含的氨基酸序列与天然序列的 Fc 区的氨基酸序列的不同之处在于具有至少一种氨基酸修饰,但保留天然序列的 Fc 区的至少一种效应物功能。优选地,与天然序列的 Fc 区或亲代多肽的 Fc 区相比,变体 Fc 区具有至少一个氨基酸的取代,例如,在天然序列的 Fc 区或亲代多肽的 Fc 区中有大约 1 至大约 10 个氨基酸取代,优选地大约 1 至大约 5 个氨基酸取代。本申请中的变体 Fc 区与天然序列的 Fc 区和 / 或与亲代多肽的 Fc 区优选地将具有至少大约 80% 序列相同性,且最优选地与之具有至少大约 90% 序列相同性,更优选地阈值具有至少大约 95%、至少大约 96%、至少大约 97%、至少大约 98%、至少大约 99% 序列相同性。

[0060] 在本申请中,“抗体依赖性细胞介导的细胞毒反应”和“ADCC”指的是细胞介导的反应,其中表达 Fc 受体 (FcR) 的非特异性细胞毒细胞 (例如天然杀伤 (NK) 细胞、中性粒细胞和巨噬细胞) 识别靶细胞上结合的抗体,并随后导致靶细胞裂解。可通过体外 ADCC 测定法分析感兴趣的分子的 ADCC 活性,例如参见美国专利 5, 500, 362 或 5, 821, 337。可用于此类测定法的效应细胞包括外周血单个核细胞 (PBMC) 和 NK 细胞。或者,或额外地,可在体内分析感兴趣的分子的 ADCC 活性,例如,在动物模型中分析,例如参见 Clynes et al., 1998, PNAS (USA), 95 :652-656。

[0061] 在本申请中,“治疗”是获得有益的或所需的临床结果的过程。就本发明的目的而言,有益的或所需的临床结果包括,但不限于,以下情况中的一或多种:改善内脏痛的任何方面,包括减轻严重程度、缓和疼痛强度和其他相关症状、降低复发频率、提高内脏痛患者的生活质量、和降低治疗内脏痛所需的其他药物的剂量。其他相关症状包括,但不限于,痛性痉挛、疼痛、弥漫性疼痛、压力、胀感、挤压感、恶心、呕吐、和对光、声和 / 或运动的敏感性。

[0062] “降低内脏痛的发生率”是指降低严重程度 (这可包括降低 (例如,暴露于) 通常用于这种情况是其他药物和 / 或治疗 (例如,麻醉药 (例如,羟考酮,吗啡,布托啡诺,纳布啡等等)) 的需求和 / 或量)、持续时间和 / 或频率中的任一种。本领域人员理解,个体对治疗的反应可以不同,因此,例如,“降低个体内脏痛的发生率的方法”反映的是基于给该特定个体施用抗 CGRP 拮抗性抗体很可能会使得所述发生率降低这一合理预期而施用抗 CGRP 拮抗性抗体。

[0063] “减轻”内脏痛和 / 或与内脏痛相关的症状是指与不施用抗 CGRP 拮抗性抗体相比,一或多种内脏痛症状和 / 或与内脏痛相关的症状得以变轻或改善。“减轻”也包括缩短或减少症状的持续时间。

[0064] “缓解”内脏痛和 / 或与内脏痛相关的症状是指使用本发明的抗 CGRP 拮抗性抗体治疗的个体或群体的一或多种内脏痛的不利临床表现的严重程度变轻。

[0065] 在本申请中,“控制内脏痛”指的是与治疗前的水平相比,保持或降低了一或多

种内脏痛症状的严重程度或持续时间或内脏痛频率。例如,与治疗前的水平相比,个体的内脏痛持续时间或严重程度或内脏痛的频率可以被降低至少大约 10%、20%、30%、40%、50%、60%或 70%。

[0066] 在本申请中,“延缓”内脏痛的发生指的是延迟、阻碍、减慢、减缓、稳定和 / 或推迟内脏痛的进展。依病史和 / 或所治疗的个体,这种延迟可以是不同长度的时间。本领域人员明了,足够的或明显的延迟实际上可包括预防,即个体不发生内脏痛。“延迟”症状发生的方法是这样的方法,与不使用该方法相比,其在给定时间范围内降低症状发生的可能性和 / 或在给定时间范围内减轻症状的程度。此类比较通常是基于使用足够显示出治疗对象和非治疗对象之间的统计学显著性差异的数目的对象的临床研究。

[0067] 内脏痛的“发生”或“进展”指的是疾病的初始表现和 / 或随后的进展。内脏痛的发生可以是可检测到的,并可采用本领域熟知的标准临床技术来评估。不过,发生还可以指不可检测到的进展。就本发明的目的而言,发生或进展指的是症状的生物学过程。“发生”包括出现、复发和发作。在本申请中,内脏痛的“发作”或“出现”包括初始发作和 / 或出现。

[0068] “生物学样品”涵盖获自个体的可用于诊断或监测分析的各种样品类型。该定义涵盖生物学来源的血液和其他液体样品,固体组织样品例如活检标本或由此而来的组织培养物或细胞及其子代。该定义还包括在获得之后以各种方式进行处理过的样品,例如以试剂处理、增溶、或富集某些成分(例如蛋白质或多核苷酸),或包埋于半固体或固体基材中以便切片。术语“生物学样品”涵盖临床样品,也包括培养的细胞、细胞上清液、细胞裂解物、血清、血浆、生物学液体和组织样品。

[0069] 在本申请中,药物、化合物或药物组合物的“有效剂量”或“有效量”是足以实现有益的或所需的结果的量。就预防性应用而言,有益的或所需的结果包括这样的结果,例如消除或降低疾病的风险、减轻疾病的严重程度、或延迟疾病的发作,包括疾病的生化、组织学和 / 或行为症状、其并发症和疾病发生过程中的中间病理学表型。就治疗性应用而言,有益的或所需的结果包括这样的结果,例如降低疼痛强度、内脏痛发作的持续时间或频率,减少内脏痛引起的一或多种症状(生化、组织学和 / 或行为症状),包括其并发症和疼痛发生过程中的中间病理学表型,提高疼痛患者的生活质量,减少治疗疼痛所需的其他药物的剂量,增强其他药物的效果,和 / 或延迟患者疼痛的进展。可以通过一或多次施用而施用有效剂量。就本发明的目的而言,药物、化合物或药物组合物的有效剂量是足以直接或间接实现预防性或治疗性治疗的量。临床上可以理解,药物、化合物或药物组合物的有效剂量可以与或不与其他药物、化合物或药物组合物相组合而实现。因此,可以根据施用一或多种治疗剂来考虑“有效剂量”,且在与一或多种其他药物组合时,可以考虑以有效量给予单一药物是否能够实现所需结果。

[0070] “个体”或“对象”是哺乳动物,更优选地是人。哺乳动物还包括,但不限于,牲畜、竞赛动物、宠物、灵长类、马、狗、猫、小鼠和大鼠。

[0071] 在本申请中,“载体(vector)”指的是一种构建体,其能够将一或多种感兴趣的基因或序列转运至宿主细胞并优选地表达所述基因或序列。载体的实例包括,但不限于,病毒载体、裸 DNA 或 RNA 表达载体、质粒、粘粒或噬菌体、与阳离子凝聚剂结合的 DNA 或 RNA 表达载体、包囊化于脂质体的 DNA 或 RNA 表达载体以及某些真核细胞,例如生产细胞。

[0072] 在本申请中,“表达控制序列”指的是指导核酸转录的核酸序列。表达控制序列

可以是启动子,例如组成型或诱导型启动子、或增强子。表达控制序列可操纵地连接于待转录的核酸序列。

[0073] 在本申请中,“药用可接受的载体”或“药用可接受的赋形剂”包括任何这样的材料,当其与活性成分组合时,使得所述成分保持生物学活性,且不与对象的免疫系统发生反应。实例包括,但不限于,任何标准的药用载体例如磷酸缓冲盐溶液、水、乳剂例如油/水乳剂、以及各种类型的湿润剂。用于气溶胶或胃肠外施用的优选稀释剂是磷酸缓冲盐水或生理盐水(0.9%)。可使用本领域熟知的常规方法配制包含此类载体的组合物(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,18th edition,A.Gennaro,ed.,Mack Publishing Co.,Easton,PA,1990;和Remington,The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed.Mack Publishing,2000)。

[0074] 在本申请中,术语“ k_{on} ”用于指抗体与抗原结合的速率常数。

[0075] 在本申请中,术语“ k_{off} ”用于指抗体从抗体/抗原复合物解离的速率常数。

[0076] 在本申请中,术语“ K_D ”用于指抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。

[0077] 预防或治疗内脏痛的方法

[0078] 本发明提供用于预防和/或治疗内脏痛和/或内脏痛症状的方法和用于预防和/或治疗个体的内脏痛和/或一或多种内脏痛症状的药物。

[0079] 在一些实施方式中,本发明提供用于预防和/或治疗个体的内脏痛和/或一或多种内脏痛症状的方法,包括给所述个体外周施用有效量的抗CGRP拮抗性抗体。

[0080] 在其他实施方式中,本发明提供用于减轻、控制个体的内脏痛和/或一或多种内脏痛症状或降低其发生率或延迟其发生或进展的方法,包括给所述个体外周施用有效量的抗CGRP拮抗性抗体。

[0081] 在一些实施方式中,本发明提供抗CGRP拮抗性抗体在制备用于预防和/或治疗内脏痛和/或一或多种内脏痛症状的药物中的用途,其中所述药物被制备为用于外周施用,或其中所述药物被外周施用。

[0082] 在其他实施方式中,本发明提供用于预防和/或治疗内脏痛和/或内脏痛症状的抗CGRP拮抗性抗体,其中所述抗体被制备为用于外周施用,或其中所述抗体被外周施用。

[0083] 在其他实施方式中,本发明提供抗CGRP拮抗性抗体在制备用于减轻、控制内脏痛和/或内脏痛症状或降低其发生率或延迟其发生或进展的药物中的用途,其中所述药物被制备为用于外周施用,或其中所述药物被外周施用。

[0084] 在一些实施方式中,所述个体优选地是哺乳动物,例如宠物,例如马、猫或狗,或牲畜,例如羊、牛或猪。最优选地,所述哺乳动物是人。

[0085] 在一些实施方式中,所述药物和/或抗CGRP拮抗性抗体被制备为用于口服、舌下、含服、局部、直肠、吸入、透皮、皮下、静脉内、动脉内、肌肉内、心内、骨内、皮内、腹腔内、经粘膜、经阴道、玻璃体内、关节内、关节周围、中枢、局部或上角质层(epicutaneous)施用。

[0086] 在一些实施方式中,所述药物被制备为在内脏痛发生之前和/或过程中和/或之后外周施用。

[0087] 在一些实施方式中,所述抗CGRP拮抗性抗体施用后在外周起作用。在一个实施方式中,所述抗CGRP拮抗性抗体不以中枢内、椎管内或鞘内形式施用。

[0088] 在一些实施方式中,所述内脏痛与疾病相关和/或由疾病引起,所述疾病例如,功

能性肠紊乱 (FBD) 或炎性肠病 (IBD)。在内脏痛与 FBD 相关的实施方式中, FBD 可以是, 例如但不限于, 胃食管反流、消化不良、肠易激综合征 (IBS) 或功能性腹痛综合征 (FAPS)。最优选地, 疾病是 IBS。在内脏痛与 IBD 相关的实施方式中, IBD 可以是, 例如但不限于, 克罗恩病、回肠炎或溃疡性结肠炎。其他类型的内脏痛包括与以下情况相关的疼痛, 例如, 癌症、肾绞痛、痛经、膀胱炎包括间质性膀胱炎 (IC)、与肠梗阻相关的手术、月经期、分娩、绝经期、骨折、憩室炎、腹膜炎、心包炎、肝炎、阑尾炎、结肠炎、胆囊炎、子宫内膜异位症、慢性和 / 或急性胰腺炎、心肌梗死、肾绞痛、胸膜炎、前列腺炎、骨盆痛和器官创伤。

[0089] 在一些实施方式中, 本发明的方法或用途可用于减轻患有 FBD、IBD 或 IC 的个体内脏痛和 / 或一或多种与内脏痛相关的症状。

[0090] 内脏痛的诊断或评估是本领域熟知的。可基于本领域已知的测量法进行评估, 例如采用多种疼痛评级表的患者疼痛表征。参见, 例如, Katz et al, Surg Clin North Am., 1999, 79(2):231-52; Caraceni et al. J Pain Symptom Manage, 2002, 23(3):239-55。例如, 可以采用语言描述符评级表 (verbal descriptor scale, VDS)、视觉模拟评级表 (visual analog scale, VAS)、Prince Henry Hospital 疼痛评级表 (PHHPS)、数值评定量表 (numeric rating scale, NRS) 和 Faces 疼痛评级表以及它们的各种变化来评估疼痛并评价对治疗的应答。还有一些通常用于测量疾病状态的评级表, 例如功能性肠紊乱严重程度指数 (FBDSI) (Drossman et al., 1995, Digestive Diseases and Sciences 40(5):986-995) 和 IBS 严重程度评分系统 (Francis et al., 1997, Aliment Pharmacol Ther., 11(2):395-402)。此类评级表可用于评价治疗反应。

[0091] 在一些实施方式中, 通过 FBDSI、VDS、VAS、PHHPS、NRS 和 Faces 疼痛评级表的一或多种来测量减轻、控制 FBD 疼痛的发生或进展和 / 或 FBD 疼痛的症状或降低其发生率或延迟其发生或进展的情况。在另一实施方式中, 通过 IBS 严重程度评分系统、VDS、VAS、PHHPS、NRS 和 Faces 疼痛评级表的一或多种来测量减轻、控制 IBS 疼痛的发生或进展和 / 或 IBS 疼痛的症状或降低其发生率或延迟其发生或进展的情况。

[0092] 在一些实施方式中, 通过 VDS、VAS、PHHPS、NRS 和 Faces 疼痛评级表的一或多种来测量减轻、控制 IC 疼痛的发生或进展和 / 或 IC 疼痛的症状或降低其发生率或延迟其发生或进展的情况。

[0093] 抗 CGRP 拮抗性抗体

[0094] 在一些实施方式中, 所述抗 CGRP 拮抗性抗体结合 CGRP。优选地, 抗 CGRP 拮抗性抗体结合 CGRP 并抑制 CGRP 结合 CGRP 受体的能力。在一些实施方式中, 所述抗 CGRP 拮抗性抗体结合人和啮齿动物的 CGRP, 优选地人和大鼠的 CGRP。更优选地, 抗体结合人 CGRP。在优选的实施方式中, 抗 CGRP 拮抗性抗体结合人 α -CGRP 或结合人 α -CGRP 和 / 或 β -CGRP。最优选地, 抗 CGRP 拮抗性抗体是表现出以下功能特征中的任何一或多种功能特征的抗体: (a) 结合 CGRP; (b) 阻断 CGRP 与其受体结合; (c) 阻断或降低 CGRP 受体活化, 包括 cAMP 活化; (d) 抑制、阻断、阻抑或降低 CGRP 生物学活性, 包括 CGRP 途径介导的下游途径, 例如受体结合和 / 或引发对 CGRP 的细胞应答; (e) 预防、减轻或治疗内脏痛的任一方面; (f) 增加 CGRP 的清除; 和 (g) 抑制 (降低) CGRP 的合成、产生或释放。

[0095] 在一些实施方式中, 所述抗 CGRP 拮抗性抗体结合 CGRP 的片段, 更优选地结合 CGRP 的片段并结合全长 CGRP。优选地, 抗 CGRP 拮抗性抗体结合 CGRP 的 C 端区域或片段。CGRP 的

C端区域或片段优选地包含 CGRP 的氨基酸 19-37 或 25-37 或 29-37, 或者氨基酸 30-37, 或者氨基酸 31-37。在另一个实施方式中, CGRP 的 C 端区域或片段优选地包含氨基酸 32-37, 最优选地 CGRP 的氨基酸 33-37。优选地, CGRP 是 α -CGRP 或 β -CGRP, 进一步优选地是人或啮齿动物的, 进一步优选地人或大鼠的, 更优选地人的, 进一步优选地人 α -CGRP 或 β -CGRP, 最优选地人 α -CGRP。

[0096] 在一些实施方式中, 所述抗 CGRP 拮抗性抗体特异性结合氨基酸序列 GSKAF (SEQ ID NO :39)。优选地, CGRP 的序列 GSKAF (SEQ ID NO :39) 是抗 CGRP 拮抗性抗体所结合的表位。

[0097] 在一些实施方式中, 提供了抗 CGRP 拮抗性抗体, 其特异性结合 CGRP 的氨基酸 G33 至 F37 所限定的表位。抗 CGRP 拮抗性抗体可特异性结合氨基酸序列 GSKAF (SEQ ID NO :39) 所限定的表位。在一些实施方式中, 本发明提供这种抗体在本发明各方面所定义的用途和方法中的用途。

[0098] 在一些实施方式中, 所述抗 CGRP 拮抗性抗体抑制或防止 CGRP 受体的活化。优选地, 抗 CGRP 抗体的 IC_{50} 为大约 0.0001 (0.1nM) 至大约 500 μ M。在一些优选的实施方式中, 如体外结合测定法所测量的那样, IC_{50} 为大约 0.0001 μ M 以及大约 250 μ M、100 μ M、50 μ M、10 μ M、1 μ M、500nM、250nM、100nM、50nM、20nM、15nM、10nM、5nM、1nM 或 0.5nM 中的任一值。在一些进一步优选的实施方式中, 如体外结合测定法所测量的那样, IC_{50} 低于大约 500pM、或大约 100pM、或大约 50pM 中的任一值。在一个进一步更加优选的实施方式中, IC_{50} 为大约 1.2nM 或 31nM。

[0099] 在一些实施方式中, 所使用的抗 CGRP 拮抗性抗体能够与本申请中所述的上述抗体竞争结合 CGRP 或 CGRP 的片段, 或竞争结合 CGRP 的片段以及全长 CGRP, 优选地竞争结合 CGRP 的 C 端区域或片段。在优选的实施方式中, CGRP 的 C 端区域或片段包含 CGRP 的氨基酸 19-37、25-37、29-37、30-37 或 31-37。在另一个实施方式中, CGRP 的 C 端区域或片段优选地包含 CGRP 的氨基酸 32-37, 最优选地为 CGRP 的氨基酸 33-37。

[0100] 在一些实施方式中, 所述抗 CGRP 拮抗性抗体结合 CGRP、CGRP 的区域或 CGRP 的片段, 且其结合亲和力 (K_D) 为大约 0.00001 μ M (0.01nM) 至大约 500 μ M。在一些实施方式中, 如体外结合测定法所测量的那样, 所述结合亲和力 (K_D) 为大约 0.00001 μ M 和大约 250 μ M、100 μ M、50 μ M、10 μ M、1 μ M、500nM、250nM、100nM、50nM、20nM、15nM、10nM、5nM、1nM、0.5nM、1nM、0.05nM 或 0.01nM 中的任一值。在一些实施方式中, 如体外结合测定法所测量的那样, 所述结合亲和力 (K_D) 低于大约 500pM 或 100pM、50pM 或 10pM 中的任一值。在进一步更加优选的实施方式中, 结合亲和力 (K_D) 是大约 0.04nM 或 16nM。

[0101] 本发明所使用的抗 CGRP 拮抗性抗体可选自: 单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片段 (例如, Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fc、ScFv 等等)、嵌合抗体、双特异性抗体、异源缀合物 (heteroconjugate) 抗体、单链 (ScFv) 抗体、它们的突变体、包含抗体部分的融合蛋白 (例如, 结构域抗体)、人源化抗体、以及免疫球蛋白分子包含具有所需特异性的抗原识别位点的任何其他修饰构型, 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。抗 CGRP 拮抗性抗体可以来源于鼠、大鼠、人或是任何其他来源 (包括嵌合或人源化抗体)。在一些实施方式中, 所述抗 CGRP 拮抗性抗体可以是人源化的, 但更优选地是人的。在一些实施方式中, 所述抗 CGRP 拮抗性抗体是分离的。在一些实施方式中, 所述抗 CGRP 拮抗性抗体是基本上纯的。在抗 CGRP 拮抗性抗体是抗体片段的情况下, 所述片段优选地保留原

始抗体的功能特征,即前面功能特征部分所述的对 CGRP 的结合和 / 或拮抗活性。

[0102] 抗 CGRP 拮抗性抗体的实例是本领域已知的。因此,根据本发明的优选实施方式,本发明所使用的抗 CGRP 拮抗性抗体优选地是以下任一所宽泛或具体公开的抗 CGRP 抗体:(i)W02007/054809,(ii)W02007/076336,(iii)Tan et al.,Clin. Sci. (Lond). 89 :565-73, 1995,(iv)Sigma(Missouri, US), 产 品 号 C7113(clone #4901),(v)Plourde et al., Peptides 14 :1225-1229,1993,或所述抗 CGRP 抗体包含或由以下任一组成:

[0103] (a) 所述抗体的片段(例如, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, ScFv 等等),

[0104] (b) 所述抗体的轻链,

[0105] (c) 所述抗体的重链,

[0106] (d) 来自所述抗体的轻链和 / 或重链的一或多个可变区,

[0107] (e) 所述抗体的一或多个 CDR(1、2、3、4、5 或 6 个 CDR),

[0108] (f) 来自所述抗体的重链的 CDR H3,

[0109] (g) 来自所述抗体的轻链的 CDR L3,

[0110] (h) 来自所述抗体的轻链的 3 个 CDR,

[0111] (i) 来自所述抗体的重链的 3 个 CDR,

[0112] (j) 来自所述抗体的轻链的 3 个 CDR 和来自所述抗体的重链的 3 个 CDR,

[0113] (k) (a) 至 (j) 中的任何一或多种。

[0114] 在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体是抗体 G2 或抗体 G1。根据本发明的最优选的实施方式,所使用的抗 CGRP 拮抗性抗体是 PCT 专利申请公开文本 W02007/054809 具体公开的抗 CGRP 抗体 G1 或包含 W02007/054809 表 6 中所示的其变体,也包括 G1 的功能性等价抗体,即包含保守性氨基酸残基的取代或一或多个氨基酸的缺失或添加而不明显影响他们的功能特征,如与 CGRP 结合或 CGRP 拮抗活性,以及具有增强的或降低的活性和 / 或结合的变体。在本申请中,术语“G1”和“抗体 G1”可互换使用,指的是 W02007/054809 中所公开的保藏号为 ATCC PTA-6867 和 ATCC PTA-6866 的表达载体所产生的抗体。申请日均为 2009 年 3 月 3 日的 PCT 申请 PCT/IB2009/050849 和 PCT/IB2009/050852 公开了抗体 G1 的功能特征,通过引用将上述申请的全部内容并入本申请。

[0115] 根据本发明进一步的实施方式,抗 CGRP 拮抗性抗体包含选自以下一组中的多肽或由所述多肽组成:(a) 抗体 G1 或 W02007/054809 的表 6 中所示的其变体;(b) 抗体 G1 或 W02007/054809 的表 6 中所示的其变体的片段或区域;(c) 抗体 G1 或 W02007/054809 的表 6 中所示的其变体的轻链;(d) 抗体 G1 或 W02007/054809 的表 6 中所示的其变体的重链;(e) 来自抗体 G1 或 W02007/054809 的表 6 中所示的其变体的轻链和 / 或重链的一或多个可变区;(f) 来自抗体 G1 或 W02007/054809 的表 6 中所示的其变体的一或多个 CDR(1、2、3、4、5 或 6 个 CDR);(g) 来自抗体 G1 或 W02007/054809 的表 6 中所示的其变体的重链的 CDR H3;(h) 来自抗体 G1 或 W02007/054809 的表 6 中所示的其变体的轻链的 CDR L3;(i) 来自抗体 G1 或 W02007/054809 的表 6 中所示的其变体的轻链的 3 个 CDR;(j) 来自抗体 G1 或 W02007/054809 的表 6 中所示的其变体的重链的 3 个 CDR;(k) 来自抗体 G1 或 W02007/054809 的表 6 中所示的其变体的轻链的 3 个 CDR 和来自所述抗体或所述变体的重链的 3 个 CDR;和 (i) 包含 (b) 至 (k) 中任一项的抗体。本发明还提供多肽,其包含上述的任何一或多种。在一些实施方式中,所述至少 1、2、3、4、5 或 6 个 CDR 与 G1 或 W02007/054809

的表 6 中所示的其变体的至少 1、2、3、4、5 或 6 个 CDR 具有至少大约 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的相同性。本领域人员能够容易地确定 CDR 区。要理解的是, 在一些实施方式中, CDR 可以是 Kabat 和 Chothia CDR 的组合。在一些实施方式中, 所述 CDR 是 Kabat CDR。在其他实施方式中, 所述 CDR 是 Chothia CDR。

[0116] 抗 CGRP 拮抗性抗体优选地包含抗体 G1 或 W02007/054809 的表 6 中所示其变体的片段或区域 (例如, Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fc、ScFv 等等) 或由所述片段或区域组成。优选地, 所述片段或区域具有抗 CGRP 拮抗性抗体的功能特征, 例如, CGRP 结合活性和 / 或拮抗活性, 并包含以下一或多种或由以下一或多种组成: (i) 抗体 G1 的轻链、(ii) 抗体 G1 的重链、(iii) 含有来自抗体 G1 的轻链和 / 或重链的一或多个可变区的抗体、和 (iv) 来自抗体 G1 的轻链和 / 或重链的一或多个 CDR。

[0117] 在一些实施方式中, 所述抗 CGRP 拮抗性抗体包含轻链可变区 (LCVR) 和 / 或重链可变区 (HCVR), 所述 LCVR 包含具有选自 W02007/076336 中的 SEQ ID NO:28-32 的序列的肽, 所述 HCVR 包含具有选自 W02007/076336 中的 SEQ ID NO:34-38 的序列的肽。

[0118] 进一步优选地, 抗 CGRP 拮抗性抗体包含具有 W02007/076336 表 1 所示的一个 SEQ ID NO 的 LCVR 多肽, 并进一步包含具有 W02007/076336 表 1 所示的一个 SEQ ID NO 的 HCVR 多肽。

[0119] 根据本发明进一步的实施方式, 所使用的抗 CGRP 拮抗性抗体包含轻链 CDR (CDRL) 和 / 或重链 CDR (CDRH), 所述 CDRL 选自 W02007/076336 的 SEQ ID NO:8-13, 所述 CDRH 选自 W02007/076336 的 SEQ ID NO:14-22。

[0120] W02007/076336 公开了制备和分离 W02007/076336 的抗 CGRP 拮抗性抗体的方法以及证明该抗体结合 CGRP 及其拮抗剂特征的数据。

[0121] 在一些实施方式中, 用于本发明的所述抗 CGRP 拮抗性抗体包含 VH 结构域, 其与本申请给出的 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:19 具有至少大约 85%、至少大约 86%、至少大约 87%、至少大约 88%、至少大约 89%、至少大约 90%、至少大约 91%、至少大约 92%、至少大约 93%、至少大约 94%、至少大约 95%、至少大约 96%、至少大约 97%、至少大约 98%、至少大约 99% 或 100% 的氨基酸序列相同性。

[0122] 在一些实施方式中, 所述抗 CGRP 拮抗性抗体包含 VL 结构域, 其与本申请给出的 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:20 具有至少大约 85%、至少大约 86%、至少大约 87%、至少大约 88%、至少大约 89%、至少大约 90%、至少大约 91%、至少大约 92%、至少大约 93%、至少大约 94%、至少大约 95%、至少大约 96%、至少大约 97%、至少大约 98%、至少大约 99% 或 100% 的氨基酸序列相同性。

[0123] 在一些实施方式中, 所述抗 CGRP 拮抗性抗体包含 VH 结构域和 VL 结构域, 它们分别与本申请给出的 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 或分别与 SEQ ID NO:19 和 SEQ ID NO:20 具有至少大约 85%、至少大约 86%、至少大约 87%、至少大约 88%、至少大约 89%、至少大约 90%、至少大约 91%、至少大约 92%、至少大约 93%、至少大约 94%、至少大约 95%、至少大约 96%、至少大约 97%、至少大约 98%、至少大约 99% 或 100% 的氨基酸序列相同性。

[0124] 在一些实施方式中, 所述抗 CGRP 拮抗性抗体包含 VH 结构域和 VL 结构域, 该 VH 结构域的氨基酸序列与 SEQ ID NO:1 具有至少 90% 的相同性, 该 VL 结构域的氨基酸序列与

SEQ ID NO :2 具有至少 90% 的相同性。

[0125] 或者,所述抗 CGRP 拮抗性抗体可包含与 SEQ ID NO :19 具有至少 90% 氨基酸序列相同性的 VH 结构域和与 SEQ ID NO :20 具有至少 90% 氨基酸序列相同性的 VL 结构域。

[0126] 在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体包含选自以下一组中的至少一个 CDR:(a)SEQ ID NO :3、21、33、34、36 或 37 所示的 CDR H1;(b)SEQ ID NO :4、22、35 或 38 所示的 CDR H2;(c)SEQ ID NO :5 或 23 所示的 CDR H3;(d)SEQ ID NO :6 或 24 所示的 CDR L1;(e)SEQ ID NO :7 或 25 所示的 CDR L2;(f)SEQ ID NO :8 或 26 所示的 CDR L3;和 (g) W02007/054809 的表 6 中所示的 CDR L1、CDR L2 和 CDR H2 的变体。

[0127] 在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体的重链恒定区可来自任何类型的恒定区,例如 IgG、IgM、IgD、IgA 和 IgE;以及任何同种型,例如 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。

[0128] 在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体包含由 ATCC 登记号为 PTA-6867 的表达载体产生的重链。进一步优选地,抗 CGRP 拮抗性抗体包含由 ATCC 登记号为 PTA-6866 的表达载体产生的轻链。在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体包含抗体 G1 的重链全抗体氨基酸序列(包括本申请中所述的修饰的 IgG2),见 SEQ ID NO :11,具有或不具有 C 端赖氨酸。抗 CGRP 拮抗性抗体还包括重链缺乏末端赖氨酸的抗体,因为在制备过程中一部分抗体通常丢失末端赖氨酸。在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体包含 SEQ ID NO :12 所示的抗体 G1 轻链全抗体氨基酸序列。在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体包含 SEQ ID NO :29 所示的抗体 G2 重链全抗体氨基酸序列。在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体包含 SEQ ID NO :30 所示的抗体 G2 轻链全抗体氨基酸序列。在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体由 ATCC 登记号为 PTA-6867 和 PTA-6866 的表达载体产生。

[0129] 在一些实施方式中,用于本发明的所述抗 CGRP 拮抗性抗体是在此定义的抗体 G1 或抗体 G2。在优选的实施方式中,用于本发明的抗 CGRP 拮抗性抗体是抗体 G1 或其抗原结合片段。

[0130] 根据本发明的进一步的实施方式,抗 CGRP 拮抗性抗体包含修饰的恒定区,例如如 W02007/054809 所述。优选地,修饰的恒定区是免疫学无活性的,包括部分免疫学无活性的,这样就不会触发补体介导的裂解作用,不会激发抗体依赖型细胞介导的细胞毒反应(ADCC),不会活化小神经胶质细胞。优选地,修饰的恒定区的一或多种这些活性是降低的。最优选地,按照以下文献修饰恒定区:Eur. J. Immunol., 1999, 29 :2613-2624;PCT 申请 PCT/GB99/01441;和/或 UK 专利申请 9809951.8。在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体包含人重链 IgG2 恒定区,所述恒定区包含以下突变:A330,P331 至 S330,S331(氨基酸编号参照野生型 IgG2 序列)。Eur. J. Immunol., 1999, 29 :2613-2624。

[0131] W02007/054809 公开了制备和分离 W02007/054809 的抗 CGRP 拮抗性抗体的方法以及证明该抗体结合 CGRP 及其拮抗剂特征的数据。该申请中的 SEQ ID NO :1 至 14 分别为本申请的 SEQ ID NO :1 至 14。

[0132] 剂量和施用

[0133] 在一些实施方式中,外周施用所述抗 CGRP 拮抗性抗体,例如,每周大约一次至大约 7 次,进一步优选地每月大约一次至大约 4 次,进一步优选地每 6 个月大约一次至大约 6 次,进一步优选地每年大约一次至大约 12 次。优选地,按照以下时间外周施用抗 CGRP 拮抗性抗体:大约每日一次,每 2、3、4、5 或 6 天一次,每周一次,每两周一次,每三周一次,每月一

次,每两个月一次,每三个月一次,每四个月一次,每五个月一次,每六个月一次,每七个月一次,每八个月一次,每九个月一次,每十个月一次,每十一个月一次或每年一次。根据优选的实施方式,通过一或多种选自以下的途径施用抗 CGRP 拮抗性抗体:口服、舌下、含服、局部、直肠、吸入、透皮、皮下、静脉内、动脉内或肌肉内、心内、骨内、皮内、腹腔内、经粘膜、经阴道、玻璃体内、上角质层、关节内、关节周围、或局部施用。

[0134] 根据本发明进一步的实施方式,药物被制备为用于外周施用,每周大约一次至大约 7 次,进一步优选地每月大约一次至大约 4 次,进一步优选地每 6 个月大约一次至大约 6 次,进一步优选地每年大约一次至大约 12 次。优选地,药物被制备为用于按照以下时间外周施用:大约每日一次,每 2、3、4、5 或 6 天一次,每周一次,每两周一次,每三周一次,每月一次,每两个月一次,每三个月一次,每四个月一次,每五个月一次,每六个月一次,每七个月一次,每八个月一次,每九个月一次,每十个月一次,每十一个月一次或每年一次。根据优选的实施方式,通过一或多种选自以下的途径施用药物:口服、舌下、含服、局部、直肠、吸入、透皮、皮下、静脉内、动脉内或肌肉内、心内、骨内、皮内、腹腔内、经粘膜、经阴道、玻璃体内、上角质层、关节内、关节周围、或局部施用。

[0135] 根据本发明进一步的实施方式,抗体浓度为大约 0.1 至大约 200mg/ml;优选地为以下任一浓度:大约 0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190 或 200mg/ml \pm 10% 误差,最优选地为大约 50mg/ml。

[0136] 根据本发明进一步的实施方式,药物被制备为用于外周施用,其中抗体浓度为 0.1 至 200mg/kg 体重;优选地为以下任一浓度:大约 0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190 或 200mg/kg 体重 \pm 10% 误差,最优选地为大约 10mg/kg。

[0137] 根据本发明的优选实施方式,抗 CGRP 拮抗性抗体的体内半衰期超过以下任一时间:大约 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170、172、174、176、178、180、182、184、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、206、208 或 210 天 \pm 1 天,进一步优选地超过以下任一时间:大约 7、8、9、10、11 或 12 个月。

[0138] 优选地,抗 CGRP 拮抗性抗体的体内半衰期超过 6 天。

[0139] 根据本发明的进一步优选的实施方式,药物和/或抗 CGRP 拮抗性抗体不产生中枢神经系统效应和/或认知损害。优选地,所述药物和/或抗 CGRP 拮抗性抗体不诱导任何一或多种以下效应:健忘、意识模糊、人格解体、感觉减退、异常思维、牙关紧闭、眩晕、静坐不能、淡漠、共济失调、口周感觉异常、CNS 刺激、情绪不稳定、欣快、幻觉、敌意、感觉过敏、运动过度、张力过低、动作失调、性欲增加、躁狂反应、肌阵挛、神经痛、神经病、精神病、痉挛、言语异常、木僵、自杀观念;头晕、嗜睡、失眠症、焦虑、颤抖、抑郁或感觉异常。最优选地,所述药物和/或抗 CGRP 拮抗性抗体不诱导运动协同性或注意力的损害。

[0140] 根据本发明进一步的实施方式,药物和/或抗 CGRP 拮抗性抗体不产生呼吸系统、肝、肾或胃肠道损害。

[0141] 根据本发明进一步的实施方式,药物和 / 或抗 CGRP 拮抗性抗体不产生身体的和 / 或心理的依赖性。优选地,所述药物和 / 或抗 CGRP 拮抗性抗体对鸦片剂、苯二氮卓类、苯环己哌啶 (PCP) 或 N- 甲基 -D- 天冬氨酸 (NMDA) 受体或 CNS 刺激物不表现出亲和力或不产生任何镇静或欣快效应。

[0142] 在一些实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体在施用后可减轻、控制中枢疼痛感的发生或进展、降低其发生率或延迟其发生或进展。

[0143] 在其他实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体的效应等同于和 / 或优于 NSAIDs 和 / 或麻醉药在相同的内脏痛模型中的效应。在一个实施方式中,所述抗 CGRP 拮抗性抗体可有效治疗难治性疼痛群体。

[0144] 根据本发明进一步的实施方式,提供了本发明任何其他方面的用途或方法,其中抗 CGRP 拮抗性抗体与一或多种其他药用活性化合物或药物 (优选地为可用于治疗内脏痛的药物) 相组合而分开、依次或同时施用。优选地,额外的药物选自以下一或多种 :

[0145] (i) 阿片类镇痛药,例如吗啡、海洛因、氢吗啡酮、羟吗啡酮、左啡诺、左洛啡烷、美沙酮、哌替啶、芬太尼、可卡因、可待因、双氢可待因、羟考酮、氢可酮、丙氧芬、纳美芬、烯丙吗啡、纳洛酮、纳曲酮、丁丙诺啡、布托啡诺、纳布啡或喷他佐辛 ;

[0146] (ii) 非甾体抗炎药 (NSAID), 例如阿司匹林、双氯芬酸、地夫美多、依托度酸、芬布芬、非诺洛芬、氟苯柳、氟比洛芬、布洛芬、吲哚美辛、酮洛芬、酮咯酸、甲氯芬那酸、甲芬那酸、萘丁美酮、萘普生、奥沙普秦、保泰松、吡罗昔康、舒林酸、托美汀或佐美酸、环加氧酶 -2 (COX-2) 抑制剂、塞来昔布 ; 罗非昔布 ; 美洛昔康 ; JTE-522 ; L-745,337 ; NS398 ; 或它们的药用可接受的盐 ;

[0147] (iii) 巴比妥酸盐镇静药,例如异戊巴比妥、阿普比妥、仲丁巴比妥、布他比妥 (butabital)、甲苯比妥、美沙比妥、美索比妥、戊巴比妥、苯巴比通 (phenobarbital)、司可巴比妥、他布比妥、theamylal 或硫喷妥钠或它们的药用可接受的盐 ;

[0148] (iv) 具有镇静作用的苯二氮卓类,例如氯氮卓、氯拉卓酸、地西洋、氟西洋、劳拉西洋、奥沙西洋、替马西洋或三唑仑或它们的药用可接受的盐 ;

[0149] (v) 具有镇静作用的 H1 拮抗剂,例如苯海拉明、吡拉明、异丙嗪、氯苯那敏或氯环利嗪或它们的药用可接受的盐 ;

[0150] (vi) 镇静剂例如苯乙哌啶酮、甲丙氨酯、甲喹酮或氯醛比林或它们的药用可接受的盐 ;

[0151] (vii) 骨骼肌松弛药,例如巴氯芬、卡立普多、氯唑沙宗、环苯扎林、美索巴莫或 orphenadine 或它们的药用可接受的盐 ;

[0152] (viii) NMDA 受体拮抗剂,例如右美沙芬 ((+)-3- 羟基 -N- 甲基吗啡) 或其代谢产物右啡烷 ((+)-3- 羟基 -N- 甲基吗啡)、氯胺酮、美金刚、吡咯喹啉醌 (pyrroloquinoline quinone) 或顺 -4-(膦酰基甲基)-2- 哌啶羧酸或它们的药用可接受的盐 ;

[0153] (ix) α - 肾上腺素能药物,例如多沙唑嗪、坦洛新、可乐定或 4-amino-6,7-dimethoxy-2-(5-methanesulfonamido-1,2,3,4-tetrahydroisoquinol-2-yl)-5-(2-pyridyl) quinazoline ;

[0154] (x) 三环抗忧郁药,例如地昔帕明、丙咪嗪、amtryptiline 或去甲替林 ;

[0155] (xi) 抗惊厥药,例如卡马西平或丙戊酸盐 ;

[0156] (xii) 速激肽 (NK) 拮抗剂, 特别是 NK-3、NK-2 或 NK-1 拮抗剂, 例如 (α R, 9R)-7-[3,5-bis(trifluoromethyl)benzyl]-8,9,10,11-tetrahydro-9-methyl-5-(4-methylphenyl)-7H-[1,4]diazocino[2,1-g][1,7]naphthridine-6-13-dione (TAK-637)、5-[[(2R,3S)-2-[(1R)-1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]ethoxy-3-(4-fluorophenyl)-4-morpholinyl]methyl]-1,2-dihydro-3H-1,2,4-triazol-3-one (MK-869)、拉奈匹坦、达匹坦或 3-[[2-methoxy-5-(trifluoromethoxy)phenyl]methylamino]-2-phenyl-piperidine (2S,3S) ;

[0157] (xiii) 毒蕈碱拮抗剂, 例如 oxybutin、托特罗定、丙哌维林、tropium chloride 或达非那新 ;

[0158] (xiv) COX-2 抑制剂, 例如塞来昔布、罗非昔布或伐地考昔 ;

[0159] (xv) 非选择性 COX 抑制剂 (优选地具有 GI 保护作用), 例如硝基氟吡洛芬 (HCT-1026) ;

[0160] (xvi) 煤焦油止痛剂, 特别是扑热息痛 ;

[0161] (xvii) 精神安定药例如氟哌利多 ;

[0162] (xviii) 辣椒素受体激动剂 (例如 resiniferatoxin) 或拮抗剂 (例如辣椒素受体阻断剂) ;

[0163] (xix) β - 肾上腺素能药物例如普萘洛尔 ;

[0164] (xx) 局麻药, 例如美西律 ;

[0165] (xxi) 皮质类固醇, 例如地塞米松 ;

[0166] (xxii) 血清素受体激动剂或拮抗剂 ;

[0167] (xxiii) 胆碱能 (烟碱) 止痛剂 ;

[0168] (xxiv) 曲马多 ;

[0169] (xxv) PDEV 抑制剂, 例如西地那非、伐地那非或 taladafil ;

[0170] (xxvi) α -2- δ 配体例如加巴喷丁或普瑞巴林 ;

[0171] (xxvii) 大麻素 (cannabinoid) ; 和

[0172] (xxviii) 抗抑郁剂, 例如阿米替林 (Elavil [®])、曲唑酮 (Desyrel [®]) 和丙咪嗪 (Tofranil [®]) 或抗惊厥药例如苯妥英 (Dilantin [®]) 或卡马西平 (Tegretol [®])。

[0173] 根据本发明的另一方面, 提供了用于预防和 / 或治疗内脏痛和 / 或内脏痛症状或用于减轻、控制个体的内脏痛和 / 或内脏痛症状、降低其发生率或延迟其发生或进展的药物组合物, 其包含抗 CGRP 拮抗性抗体和药用可接受的载体和 / 或赋形剂, 其中所述组合物被制备为用于外周施用。

[0174] 试剂盒

[0175] 根据本发明的另一方面, 提供了试剂盒, 其包含上述定义的药物组合物和给个体外周施用有效量的所述药物组合物的说明, 用于预防和 / 或治疗内脏痛和 / 或内脏痛症状或用于减轻、控制内脏痛和 / 或内脏痛症状、降低其发生率或延迟其发生或进展。

[0176] 试剂盒可包括一或多个容器, 其中含有抗 CGRP 拮抗性抗体或本申请所述的多肽以及根据本发明的方法或用途进行使用的说明。试剂盒可进一步包含基于鉴定是否个体患有内脏痛或处于发生内脏痛的风险中而选择适合于治疗的个体的说明。对外周施用药物组合物的说明可包括有关要进行的治疗的剂量、用药方案和施用途径的信息。

[0177] 本发明的各方面的优选的特征经必要修改等同适用于其他方面。

实施例

[0178] 以下实施例仅用于演示的目的,其无意于以任何形式限制本发明的范围。实际上,根据前面的描述,对在此所给出和描述的本发明实施方式以外的各种改变对本领域人员而言将是显而易见的,且因此它们也落入所附权利要求书的范围内。

[0179] 实施例 1:内脏痛模型

[0180] 本实施例以内脏痛模型阐述抗 CGRP 拮抗性抗体治疗的效果。

[0181] 已经发现 IBS 患者对结直肠扩张具有较低的内脏感觉阈值,而这与内脏痛症状高度相关 (Delafoy et al,2006)。在 TNBS 诱导大鼠结肠炎之后进行结直肠扩张是许多研究者探讨内脏过度敏感的机制时所使用的动物模型 (Gay et al,2006,Delafoy et al,2006,Adam et al.,2006)。在本实施例中使用大鼠 TNBS 结肠炎模型测试 CGRP 的功能阻断性抗体的效应。在该模型中,与人类 IBS 研究一样,通过对结肠的球囊扩张的反应来测量内脏痛阈值。

[0182] 禁食过夜后,以氯胺酮 (80mg/ml)/ 甲苯噻嗪 (12mg/ml) 麻醉大鼠,剂量为 1ml/kg。进行剖腹术并以 TNBS 溶液 (50mg,以 1.5ml/kg 溶于 30%的乙醇中,“TNBS 处理组”) 或 30%的乙醇溶液 (“假处理组”) 注射至距盲肠远端 1cm 处的近端结肠。假处理组作为非结肠炎对照。手术后第 5 天,将 TNBS 处理组分为两组。一组接受抗 CGRP 拮抗性单克隆抗体 4901 (购自 Sigma(Missouri,US),产品号 C7113,clone #4901),10mg/kg 静脉注射。另一组接受载体 (PBS,0.01%吐温 20) 作为阴性对照。

[0183] 手术后第 7 天,第二次禁食过夜后,以球囊扩张测试体重下降不超过 11%的经 TNBS 处理的大鼠的内脏痛阈值。将连接于导管的 5cm 乳胶球囊插入远端结肠,球囊的基底距肛门 5cm。用带子将导管固定于尾部以防止球囊运动。30 分钟的适应期之后,以 30 秒为间隔给球囊顺序充气,从 5mmHg 达到 80mmHg。在引发定型啮齿动物内脏痛体位 (stereotypical rodent visceral pain posture) 所需的压力处停止球囊扩张,该体位称为 α 位置 (反复的斜肌收缩波并且后肢内旋),将其记录为内脏痛阈值。

[0184] 在手术后第 7 天,经受假处理的大鼠的阈值为 36.8 ± 2.6 ($N = 5$, 平均值 \pm se) (图 1A)。在第 5 天接受抗体 4901 (10mg/kg) 的 TNBS 处理大鼠在第 7 天的阈值为 32.3 ± 4.1 ($N = 9$),与在第 5 天接受载体的 TNBS 处理大鼠在第 7 天的阈值 (21.0 ± 3.0 , $N = 10$) 存在具有统计学显著意义的差异 (单变量 ANOVA+Dunnet 多重比较,试验后) (图 1A)。4901 的效果与 CGRP 受体拮抗剂 CGRP 8-37 相当 (图 1B)。这一结果证实,抗 CGRP 拮抗性抗体在内脏痛模型中有效地使得内脏痛阈值向假处理组的阈值显著偏移,即逆转疼痛。

[0185] 实施例 2:相互作用分析和结合测定

[0186] 在装备有包被了抗生蛋白链菌素 (SA) 的传感器芯片的 Biacore 3000™ 系统 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) 上使用标准 Biacore 电泳缓冲液 (HBS-P 或 HBS-EP) 在 25°C 和 37°C 进行相互作用分析。N-LC-生物素化的人和大鼠的 α -和 β -CGRP 被低水平 (典型地 100 个反应单位) 捕获于单个的流动细胞上以提供反应表面,而未修饰的流动细胞作为参比通道。产生抗体 G1 和 G2 的纯化 Fab 片段。典型地,以两倍系列稀释法制备 Fab,以 0.5 μ M 作为最高浓度,以 100 μ l/min 注射 1 分钟,解离时间至多达 2 小时。以 50% v/

v 乙醇 +25mM NaOH 的混合物为 G1Fab 再生表面,以 2 : 1 v/v Pierce Gentle Elution Buffer/4M NaCl 为 G2 Fab 再生表面。Fab 注射物一式两份,以证明该测定法的可重复性。使用 BiaEvaluation v. 4.0 软件对结合应答进行双重参照并整体拟合成简单模型。根据动力学速率常数的高推导出亲和力 ($K_D = k_{off}/k_{on}$)。

[0187] 以下表 1 给出了抗体 G1 的结果。抗体 G1 以相似的高亲和力结合人 α -和 β -CGRP(当在同一芯片上在 37°C 并列分析且解离时间为 20 分钟时, K_D 分别为 163 和 155pM)。人和食蟹猴 (cynomolgus monkey) 具有相同的序列;因此人的数据也适用于食蟹猴。G1 也结合大鼠的 CGRP,但在 α -与 β -同种型之间有差异 (K_D 分别为等于 2.57nM 和 < 150pM, 37°C)。

[0188] 表 1 :在 25°C 和 37°C 测定的 G1 抗体对人和大鼠 CGRP 的 K_D

[0189]

芯片上的 N-生物素 CGRP	温度(°C)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	$T_{1/2}$ (h)	K_D (nM)
α -人/食蟹猴	25	1.86×10^5	7.80×10^{-6}	24.68	0.042
α -人/食蟹猴	37	5.87×10^5	3.63×10^{-5}	5.30	0.063
β -人/食蟹猴	37	4.51×10^5	$<6.98 \times 10^{-5}$	2.76	<0.155
α -大鼠	25	5.08×10^4	6.18×10^{-5}	3.12	1.22
α -大鼠	37	1.55×10^5	3.99×10^{-4}	0.48	2.57
β -大鼠	37	5.16×10^5	$<7.85 \times 10^{-5}$	2.45	<0.152

[0190] G1Fab 从 α -人、 β -人和 β -人-CGRP 的解离发生的很慢。因此,除非对解离期进行很长时间的观察,无法精确测定否则解离速率 (k_{off})。作为通用的经验法则,结合应答在允许报告精确的解离速率的解离时间内衰减至少 5%。不过,基线漂移妨碍在 Biacore 上监测长解离时间,对于以动力学分析所需的低表面能力进行工作时,这尤其具有挑战性。在本研究中,对 α -CGRP 的解离期观察了两个小时,而对 β -CGRP 仅为 20 分钟。结果, β -CGRP 的解离速率无法象 α -CGRP 的解离速率那样得到精确的解析。不过,当在同一芯片上在相同条件下使用 20 分钟的解离时间进行并列分析时,G1 对 α -人/食蟹猴、 β -人/食蟹猴和 β -大鼠 CGRP 具有基本上相同的结合动力学 ($K_D = 150pM, 37^\circ C$)。

[0191] 表 2 给出了抗体 G2 的结果。抗体 G2 对 α -大鼠 CGRP 的结合亲和力 ($K_D = 0.9nM, 25^\circ C$) 高于对 α -和 β -人 CGRP 的结合亲和力 (K_D 分别为 19nM 和 20nM, 25°C)。在这一测定格式中没有检测 G2 结合 β -大鼠 CGRP,但在反向定位测定格式中发现其对 α -和 β -人 CGRP 显示出相当的结合特征(数据未显示)。

[0192] 表 2 :在 25°C 和 37°C 测定的 G2 抗体对人和大鼠 CGRP 的 K_D

[0193]

芯片上的 N-生物素 CGRP	温度(°C)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	$T_{1/2}$ (min)	K_D (nM)
α -大鼠	25	2.31×10^5	2.14×10^{-4}	53.98	0.9
α -大鼠	37	5.0×10^5	1.7×10^{-3}	6.80	3.4
α -人	25	6.03×10^4	1.15×10^{-3}	10.05	19.1
α -人	37	9.3×10^4	3.9×10^{-3}	2.96	41.9
β -人	25	8.14×10^4	1.62×10^{-3}	7.13	19.9

[0194] 进行结合分析以测定抗 CGRP G1 抗体阻断人 α -CGRP 结合 CGRP1 受体的 IC_{50} 。将来自 SK-N-MC 细胞的膜 (25 μ g) 在总体积 1ml 的含有 $10pM^{125}I$ -人 α -CGRP 和不同浓度的抗 CGRP 抗体 (0.015nM-33nM) 的温育缓冲液 (50mM Tris-HCl, pH 7.4, 5mM MgCl₂, 0.1% BSA) 中 25°C 温育 90 分钟。通过以 0.5% 聚乙稀亚胺封闭的玻璃微纤维滤膜 (GF/B, 1 μ m) 过滤终止温育。以 γ 计数器测定结合的蛋白质的反应性。做出剂量应答曲线, 并使用以下方程确定 K_i 值: $K_i = IC_{50} / (1 + ([配体] / K_D))$; 其中 SK-N-MC 细胞中的人 α -CGRP 与 CGRP1 受体的平衡解离常数为 $K_D = 8pM$ 。将报告的 IC_{50} 值 (就 IgG 分子而言) 转换为结合位点 (通过将其乘以 2, 因为 Biacore 分析的是 Fab 片段), 这样便能够与 Biacore 所确定的亲和力 (K_D) 进行比较。观察到的 IC_{50} (1.8nM) 是在等温度下通过 Biacore 观察到 K_D 值 (42pM) 的 23 倍。这一不匹配情况反映了结合测定法可能敏感性不足。

[0195] 实施例 3: 内脏痛模型

[0196] 本实施例在内脏痛模型中阐述抗 CGRP 拮抗性抗体治疗的效果。

[0197] 在本实施例中, 使用大鼠间质性膀胱炎模型测试功能阻断性抗体对 CGRP 的效应。在该模型中, 通过应答于松节油刺激膀胱引起的膀胱运动来测定内脏过度敏感性。

[0198] 膀胱测压过程中以乌拉坦麻醉雌性大鼠, 不使其苏醒。使用恒温连接于温控加热垫的直肠探针将体温维持在 37°C。一组大鼠 ($n = 7$) 接受抗 CGRP 拮抗性单克隆抗体 4901 (购自 Sigma (Missouri, US), 产品号 C7113, clone #4901), 10mg/kg, 静脉注射。另一组 ($n = 7$) 接受载体 (PBS, 0.01% tween 20) 作为阴性对照。

[0199] 给予 4901 或载体后 24 小时, 将大鼠麻醉, 以 PE50 管 (1mm OD) 经尿道膀胱置管, 以便以生理盐水以 0.06ml/min 的速度充盈膀胱 (使用注射泵)。管子在靠近膀胱处有 T 形接头, 以便以压力换能器监测膀胱压力。以 14 分钟为间隔 (0.84ml 总体积) 监测压力和收缩以确定膀胱的运动性。建立基线膀胱内压图之后, 注入 0.5ml 的 50% 松节油 1 小时以产生膀胱刺激。然后引流膀胱, 随后测试松节油处理后立即 (1 小时)、处理后 3 小时和 5 小时后的膀胱运动性。

[0200] 与接受载体的大鼠相比, 膀胱内压图程序之前 24 小时接受了抗体 4901 (10mg/kg) 的大鼠在所有测量时间点均具有更少的膀胱收缩 (图 2)。这一结果证实, 抗 CGRP 拮抗性抗体在内脏痛模型上有效降低了应答于松节油刺激的膀胱运动性, 即逆转疼痛。

[0201] 生物材料保藏

[0202] 以下材料已经保藏于美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA (ATCC)):

[0203]

材料	抗体号	ATCC 登记号	保藏日期
pDb.CGRP.hFcGI	G1 重链	PTA-6867	2005 年 7 月 15 日
pEb.CGRP.hKGI	G1 轻链	PTA-6866	2005 年 7 月 15 日

[0204] 载体 pEb.CGRP.hKGI 是编码 G1 轻链可变区和轻链 κ 恒定区的多核苷酸;载体 pDb.CGRP.hFcGI 是编码 G1 重链可变区和重链 IgG2 恒定区的多核苷酸,其含有以下突变:A330P331 至 S330S331(氨基酸编号参照野生型 IgG2 序列;见 Eur. J. Immunol., 1999, 29: 2613-2624)。

[0205] 这些保藏是在国际认可的用于专利程序目的的微生物保藏的布达佩斯条约下做出的(Budapest Treaty)。这里保证自保藏日期起的 30 年内维持保藏物的存活。ATCC 可根据布达佩斯条约的规定以及 Rinat Neuroscience Corp. 与 ATCC 的协议提供该培养物,该协议保证在有关的美国专利授权后或任何美国或外国专利申请公开后,无论哪一个在先,永久地不受限制地为公众提供保藏物培养物的子代,并保证向美国专利商标局的审查员所指定的依据 35 USC Section 122 和相关的审查规定(包括 37 CFR Section 1.14,特别是 886 OG 638) 有权获得所述子代的人提供所述子代。

[0206] 本申请的受让人同意,如果保藏材料的培养物在合适的培养条件下失去活性或者丢失或损坏,收到通知后将尽快以同样的培养物进行替换。获得所保藏的材料并不意味着被许可在侵犯任何政府依据其专利法而授予的专利权的情况下实施本发明。

[0207] 以下是用于本申请所公开的各种实施方式中的一些抗体序列。

[0208] 抗体序列

[0209] 抗体 G1 重链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO :1)

[0210] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWISWVRQAPGKGLEWVAEIRSESDASATHYA

[0211] EAVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLAYFDYGLAIQNYWGQGLTLTVSS

[0212] 抗体 G1 轻链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO :2)

[0213] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCASKRVTTYVSWYQQKPGQAPRLLIYGASNRYLGIPARFS

[0214] GSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCSQSYNYPYTFGQGTKLEIK

[0215] 抗体 G1 CDR H1 (延伸的 CDR) (SEQ ID NO :3)

[0216] GFTFSNYWIS

[0217] 抗体 G1 CDR H2 (延伸的 CDR, 与 Kabat CDR 相同) (SEQ ID NO :4)

[0218] EIRSESDASATHYAEAVKG

[0219] 抗体 G1 CDR H3 (SEQ ID NO :5)

[0220] YFDYGLAIQNY

[0221] 抗体 G1 CDR L1 (SEQ ID NO :6)

[0222] KASKRVTTYVS

[0223] 抗体 G1 CDR L2 (SEQ ID NO :7)

[0224] GASNRYL

[0225] 抗体 G1 CDR L3 (SEQ ID NO :8)

[0226] SQSYNYPYT

[0227] 抗体 G1 重链可变区核苷酸序列 (SEQ ID NO :9)

- [0228] GAAGTTCAGCTGGTTGAATCCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCAGGTGGTTCCCTGCGTCTGTCC
- [0229] TGCGCTGCTTCCGGTTTTACCTTCTCCAACACTACTGGATCTCCTGGGTTTCGTCAGGCTCCTGGT
- [0230] AAAGGTCTGGAATGGGTTGCTGAAATCCGTTCCGAATCCGACGCGTCCGCTACCCATTACGCT
- [0231] GAAGCTGTAAAGGTCGTTTTACCATCTCCCGTGACAACGCTAAGAAGCTCCCTGTACCTGCAG
- [0232] ATGAACTCCCTGCGTGCTGAAGACACCGCTGTTACTACTGCCTGGCTTACTTTGACTACGGT
- [0233] CTGGCTATCCAGAACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTTACCGTTTTCTCC
- [0234] 抗体 G1 轻链可变区核苷酸序列 (SEQ ID NO :10)
- [0235] GAAATCGTTCGACCCAGTCCCCGGCTACCCTGTCCCTGTCCCCAGGTGAACGTGCTACCCTG
- [0236] TCCTGCAAAGCTTCCAAACGGGTTACCACCTACGTTTCTGGTACCAGCAGAAACCCGGTCAG
- [0237] GCTCCTCGTCTGCTGATCTACGGTGCTTCCAACCGTTACCTCGGTATCCCAGCTCGTTTCTCC
- [0238] GGTTCCGGTTCGGTACCGACTTACCCTGACCATCTCCTCCCTGGAACCCGAAGACTTCGCT
- [0239] GTTTACTACTGCAGTCAGTCTACAACCTACCCCTACACCTTCGGTCAGGGTACCAAACCTGGAA
- [0240] ATCAAA
- [0241] 抗体 G1 重链全抗体氨基酸序列 (包括本申请所述的修饰的 IgG2) (SEQ ID NO :11)
- [0242] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWISWVRQAPGKGLEWVAEIRSESDASATHYA
- [0243] EAVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLAYFDYGLAIQNYWGQTLVTVSSASTK
- [0244] GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSS
- [0245] VVTVPSSNFGTQYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
- [0246] MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWL
- [0247] NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
- [0248] AVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKS
- [0249] LSLSPGK
- [0250] 抗体 G1 轻链全抗体氨基酸序列 (SEQ ID NO :12)
- [0251] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCASKRVTTYVSWYQQKPGQAPRLLIYGASNRYLGIPARFS
- [0252] GSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCSQSYNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
- [0253] SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSITLTSKADYEKH
- [0254] KVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0255] 抗体 G1 重链全抗体核苷酸序列 (包括本申请所述的修饰的 IgG2) (SEQ ID NO :13)
- [0256] GAAGTTCAGCTGGTTGAATCCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCAGGTGGTTCCCTGCGTCTGTCC
- [0257] TGCGCTGCTTCCGGTTTTACCTTCTCCAACACTACTGGATCTCCTGGGTTTCGTCAGGCTCCTGGT
- [0258] AAAGGTCTGGAATGGGTTGCTGAAATCCGTTCCGAATCCGACGCGTCCGCTACCCATTACGCT
- [0259] GAAGCTGTAAAGGTCGTTTTACCATCTCCCGTGACAACGCTAAGAAGCTCCCTGTACCTGCAG
- [0260] ATGAACTCCCTGCGTGCTGAAGACACCGCTGTTACTACTGCCTGGCTTACTTTGACTACGGT
- [0261] CTGGCTATCCAGAACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTTACCGTTTCTCCGCTCCACCAAG
- [0262] GGCCCATCTGTCTTCCCACTGGCCCATGCTCCCGCAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTG
- [0263] GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCAGAACCTGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCTCTG
- [0264] ACCAGCGCGTGCACACCTTCCAGCTGTCTGCAGTCTCAGGTCTTACTCCCTCAGCAGC
- [0265] GTGGTGACCGTGCCATCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAG
- [0266] CCAAGCAACACCAAGGTCGACAAGACCGTGGAGAGAAAAGTGTGTGGAGTGTCCACCTTGT

- [0267] CCAGCCCCTCCAGTGGCCGGACCATCCGTGTTCTGTTCCTCCAAAGCCAAAGGACACCCTG
- [0268] ATGATCTCCAGAACCCAGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAG
- [0269] GTGCAGTTCAACTGGTATGTGGACGGAGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAAGAGAG
- [0270] GAGCAGTTCAACTCCACCTTCCAGAGTGGTGGAGCGTGTGACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTG
- [0271] AACGGAAAGGAGTATAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGGACTGCCATCCAGCATCGAGAAGACC
- [0272] ATCTCCAAGACCAAGGGACAGCCAAGAGAGCCACAGGTGTATACCCTGCCCCCATCCAGAGAG
- [0273] GAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGATTCTATCCATCCGACATC
- [0274] GCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCAGAGAACAATAAGACCACCCCTCCAATGCTG
- [0275] GACTCCGACGGATCCTTCTTCTGTATTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAG
- [0276] GGAAACGTGTTCTTGTTCCTGTATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTATACCCAGAAGAGC
- [0277] CTGTCCCTGTCTCCAGGAAAGTAA
- [0278] 抗体 G1 轻链全抗体核苷酸序列 (SEQ ID NO :14)
- [0279] GAAATCGTTCTGACCCAGTCCCCGGCTACCCTGTCCCTGTCCCCAGGTGAACGTGCTACCCTG
- [0280] TCCTGCAAAGCTTCCAAACGGGTTACCACCTACGTTTCTGGTACCAGCAGAAAACCCGGTCAG
- [0281] GCTCCTCGTCTGCTGATCTACGGTGCTTCCAACCGTTACCTCGGTATCCCAGCTCGTTTCTCC
- [0282] GGTTCCGGTCCGGTACCGACTTACCCTGACCATCTCCTCCCTGGAACCCGAAGACTTCGCT
- [0283] GTTTACTACTGCAGTCAGTCTACAACCTACCCTACACCTTCGGTTCAGGGTACCAAACTGGAA
- [0284] ATCAAACGCACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCTCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
- [0285] TCCGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAAATTCTATCCGCGCGAGGCCAAAAGTACAG
- [0286] TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCCGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC
- [0287] AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACAC
- [0288] AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGTTCTCCAGTCACAAAAGAGCTTCAAC
- [0289] CGCGGTGAGTGCTAA
- [0290] 人与大鼠 CGRP (人 α -CGRP (SEQ ID NO :15) ;人 β -CGRP (SEQ ID NO :16) ;大鼠 α -CGRP (SEQ ID NO :17) ;和 大鼠 β -CGRP (SEQ ID NO :18)) 的氨基酸序列比对 :
- [0291] NH₂-ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKNFVPTNVGSKAF-CONH₂ (SEQ ID NO :15)
- [0292] NH₂-ACNTATCVTHRLAGLLSRSGGMVKS NFVPTNVGSKAF-CONH₂ (SEQ ID NO :16)
- [0293] NH₂-SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNFVPTNVGSEAF-CONH₂ (SEQ ID NO :17)
- [0294] NH₂-SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNFVPTNVGSKAF-CONH₂ (SEQ ID NO :18)
- [0295] 抗体 G2 重链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO :19)
- [0296] EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSSVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTYNEK
- [0297] FK GKATLTS DKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAKGGNDGYWGQTTLTVSS
- [0298] 抗体 G2 轻链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO :20)
- [0299] EIVLTQSPTTMAASPGEKITITCSASSSISSYLHWYQQKPGFSPKVL IYRASNLASGVPARF
- [0300] SGSGSGTSYSLTIGTMEAEDVATYYCQQGSTIPFTFGSGTKLEIK
- [0301] 抗体 G2 CDR H1 (Kabat CDR) (SEQ ID NO :21)
- [0302] SSVMH
- [0303] 抗体 G2 CDR H2 (延伸的 CDR) (SEQ ID NO :22)
- [0304] YINPYNDGTYNEKFKG

- [0305] 抗体 G2 CDR H3 (SEQ ID NO :23)
[0306] GGNDGY
[0307] 抗体 G2 CDR L1 (SEQ ID NO :24)
[0308] SASSSISSIYLH
[0309] 抗体 G2 CDR L2 (SEQ ID NO :25)
[0310] RASNLAS
[0311] 抗体 G2 CDR L3 (SEQ ID NO :26)
[0312] QQGSTIPFT
[0313] 抗体 G2 重链可变区核苷酸序列 (SEQ ID NO :27)
[0314] GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCC
[0315] TGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTCTGTTATGCACTGGGTGAAGCAGAAGCCTGGG
[0316] CAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTACTAAGTACAATGAGAAG
[0317] TTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAAGTCAAG
[0318] AGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAAAAGGGGGTAACGATGGCTACTGG
[0319] GGCCAAGGCACTACTCTCACAGTCTCCTCA
[0320] 抗体 G2 轻链可变区核苷酸序列 (SEQ ID NO :28)
[0321] GAAATTGTGCTCACCCAGTCTCCAACCACCATGGCTGCATCTCCCGGGGAGAAGATCACTATC
[0322] ACCTGTAGTGCCAGCTCAAGTATAAGTTCCATTTACTTGCATTGGTATCAGCAGAAGCCAGGA
[0323] TTCTCCCCTAAAGTCTTGATTTATAGGGCATCCAATCTGGCTTCTGGAGTCCCAGCTCGCTTC
[0324] AGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTTACTCTCTCACAATTGGCACCATGGAGGCTGAAGATGTT
[0325] GCCACTTACTACTGCCAGCAGGGTAGTACTATAACCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTG
[0326] GAAATAAAA
[0327] 抗体 G2 重链全抗体氨基酸序列 (不包括 Fc 结构域) (SEQ ID NO :29)
[0328] EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYFTSSVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTKYNEK
[0329] FKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAKGGNDGYWGQGTTLTVSSAKTTPPSVYPL
[0330] APGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSST
[0331] WPSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRD
[0332] 抗体 G2 轻链全抗体氨基酸序列 (SEQ ID NO :30)
[0333] EIVLTQSPTTMAASPGEKITYTCSASSISSIYLHWYQQKPGFSPKVLIRASNLASGVPARF
[0334] SGSGSGTSYSLTIGTMEAEDVATYYCQQGSTIPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQL
[0335] TSGGASVVCFLNFFYPRDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYER
[0336] HNSYTCEATHKTSTSPIVKSFRNEC
[0337] 抗体 G2 重链全抗体核苷酸序列 (不包括 Fc 结构域) (SEQ ID NO :31)
[0338] GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCC
[0339] TGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTCTGTTATGCACTGGGTGAAGCAGAAGCCTGGG
[0340] CAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTACTAAGTACAATGAGAAG
[0341] TTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAAGTCAAG
[0342] AGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAAAAGGGGGTAACGATGGCTACTGG
[0343] GGCCAAGGCACTACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTG

- [0344] GCCCCTGGATCTGCTGCCCAAACCTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTAT
- [0345] TTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTC
- [0346] CCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACC
- [0347] TGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAG
- [0348] AAAATTGTGCCAGGGAT
- [0349] 抗体 G2 轻链全抗体核苷酸序列 (SEQ ID NO :32)
- [0350] GAAATTGTGCTCACCCAGTCTCCAACCACCATGGCTGCATCTCCCGGGGAGAAGATCACTATC
- [0351] ACCTGTAGTGCCAGCTCAAGTATAAGTTCCATTTACTTGCATTGGTATCAGCAGAAGCCAGGA
- [0352] TTCTCCCCTAAAGTCTTGATTTATAGGGCATCCAATCTGGCTTCTGGAGTCCCAGCTCGCTTC
- [0353] AGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATTGGCACCATGGAGGCTGAAGATGTT
- [0354] GCCACTTACTACTGCCAGCAGGGTAGTACTATAACCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAAGTTG
- [0355] GAAATAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTA
- [0356] ACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCAGAGACATCAATGTC
- [0357] AAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGTGTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGAC
- [0358] AGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACATTGACCAAGGACGAGTATGAACGA
- [0359] CATAACAGCTATACTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATCGTCAAGAGCTTC
- [0360] AACAGGAATGAGTGTTAA
- [0361] 抗体 G1 CDR H1 (Chothia CDR) (SEQ ID NO :33)
- [0362] GFTFSNY
- [0363] 抗体 G1 CDR H1 (Kabat CDR) (SEQ ID NO :34)
- [0364] NYWIS
- [0365] 抗体 G1 CDR H2 (Chothia CDR) (SEQ ID NO :35)
- [0366] RSESDASA
- [0367] 抗体 G2 CDR H1 (延伸的 CDR) (SEQ ID NO :36)
- [0368] GYTFTSSVMH
- [0369] 抗体 G2 CDR H1 (Chothia CDR) (SEQ ID NO :37)
- [0370] GYTFTSS
- [0371] 抗体 G2 CDR H2 (Chothia CDR) (SEQ ID NO :38)
- [0372] NPYNDG

[0373] 虽然已参照各种应用、方法、试剂盒和组合物描述了本发明，但应明白可在不背离本发明和以下权利要求的情况下进行各种改变和修改。提供以上实施例以更好地说明本发明，且其不意在限制本发明的范围。尽管本发明已参照这些示例性实施方式进行了描述，但本领域技术人员明白这些示例性实施方式可有多种变化和修改，而无需过多的试验。全部这类变化和修改在本发明的范围内。

[0374] 本文所用的段落标题仅用于文章组织结构，而并非以任何方式限制所述的主体。应理解本发明所述的温度、浓度、时间等之前都隐含有“约”，使得在本发明范围内可有细小且轻微偏差。在本发明中，除非另有说明，所用的单数也包括复数。此外，“包括”(“comprise”，“comprises”，“comprising”)、“包含”(“contain”，“contains”，“containing”)、“含有”(“include”，“includes”和“including”)的使用并非意在限制。应

理解在前的概括性描述和以下具体描述仅是示例性和说明性的,而非限制本发明。

[0375] 本文引用的全部文献,包括专利、专利申请、文章、教科书等以及本文引用的文献整体上援引加入本文。在一篇或多篇并入的文献和类似素材,例如所定义的术语、术语应用、所述技术等与本发明相冲突的情况下,以本发明为准。

[0376] 前述说明书和实施例详述了某些本发明的具体实施方式并描述了发明人预期的最佳模式。然而,应理解无论在文中出现多么详细的描述,本发明可以许多方式实施,且本发明应根据所附权利要求和其等价方式来解释。

[0001]

序列表

<110> 瑞纳神经科学公司
 <120> 通过施用针对降钙素基因相关肽的拮抗性抗体来治疗内脏痛的方法
 <130> PC33920A
 <150> US 61/237,901
 <151> 2009-08-28
 <160> 39
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Synthetic polypeptide, Antibody G1 heavy chain variable region
 <400> 1
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly 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 Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Ser Glu Ser Asp Ala Ser Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
 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 Leu Ala Tyr Phe Asp Tyr Gly Leu Ala Ile Gln Asn Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 2
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Synthetic polypeptide, Antibody G1 light chain variable region
 <400> 2
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

[0002]

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Lys Arg Val Thr Thr Tyr
 20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Leu Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Tyr Asn Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic polypeptide, Antibody G1 CDR H1

<400> 3

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp Ile Ser
 1 5 10

<210> 4
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic polypeptide, Antibody G1 CDR H2

<400> 4

Glu Ile Arg Ser Glu Ser Asp Ala Ser Ala Thr His Tyr Ala Glu Ala
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic polypeptide, Antibody G1 CDR H3

<400> 5

Tyr Phe Asp Tyr Gly Leu Ala Ile Gln Asn Tyr
 1 5 10

<210> 6

[0003]

<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic polypeptide, Antibody G1 CDR L1

<400> 6

Lys Ala Ser Lys Arg Val Thr Thr Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic polypeptide, Antibody G1 CDR L2

<400> 7

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Leu
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic polypeptide, Antibody G1 CDR L3

<400> 8

Ser Gln Ser Tyr Asn Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 9
<211> 366
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide, Antibody G1 heavy chain variable region

<400> 9

```
gaagttcagc tggttgaatc cggtagtggt ctggttcagc caggtaggtc cctgcgtctg      60
tctgcgctg cttccggttt caccttctcc aactactgga tctcctgggt tcgtcaggct      120
cctggtaaag gtctggaatg ggttgctgaa atccgttccg aatccgacgc gtccgctacc      180
cattacgctg aagctgttaa aggtcgttcc accatctccc gtgacaacgc taagaactcc      240
ctgtacctgc agatgaactc cctgcgtget gaagacaccg ctgtttacta ctgcctggct      300
tactttgact acggtctggc tatccagaac tactggggtc agggtagcct ggttaccggt      360
tcctcc                                             366
```

<210> 10
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial sequence

[0004]

<220>
 <223> Synthetic oligonucleotide, Antibody G1 light chain variable region
 <400> 10
 gaaatcgttc tgaccagtc cccggctacc ctgtccctgt ccccaggatga acgtgctacc 60
 ctgtcctgca aagcttccaa acgggttacc acctacgttt cctggtagca gcagaaaccc 120
 ggtcaggctc ctcgtctgct gatctacggt gttccaacc gttacctcgg tatcccagct 180
 cgtttctccg gttccggttc cggtagcgac ttcacctga ccatctctc cctggaaccc 240
 gaagacttcg ctgtttacta ctgcagtcag tctacaact accctacac cttcggtcag 300
 ggtaccaaac tggaaatcaa a 321

<210> 11
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic polypeptide, Antibody G1 heavy chain
 <400> 11
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly 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 Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Ser Glu Ser Asp Ala Ser Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
 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 Leu Ala Tyr Phe Asp Tyr Gly Leu Ala Ile Gln Asn Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

[0005]

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

Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195 200 205

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

Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
225 230 235 240

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

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

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

Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 12
<211> 214

[0006]

<212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Synthetic polypeptide, Antibody G1 light chain

 <400> 12
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Lys Arg Val Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Leu Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Tyr Asn Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

 <210> 13
 <211> 1347
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Synthetic oligonucleotide, Antibody G1 heavy chain

[0007]

<400> 13

gaagttcagc tggttgaatc cggtggtggt ctggttcagc caggtggttc cctgcgtctg 60

tcctgcgctg cttccggttt caccttctcc aactactgga tctcctgggt tcgtcaggct 120

cctggtaaag gtctggaatg ggttgctgaa atccgttccg aatccgacgc gtcgctacc 180

cattacgctg aagctgttaa aggtcgtttc accatctccc gtgacaacgc taagaactcc 240

ctgtacctgc agatgaactc cctgcgtgct gaagacaccg ctgtttacta ctgectgget 300

tactttgact acggtctggc tatecagaac tactggggtc agggttaccct ggttaccgtt 360

tcctccgctt ccaccaaggg cccatctgtc tccccactgg ccccatgctc ccgcagcacc 420

tccgagagca cagccgcctt gggtgcctg gteaaggact acttcccaga acctgtgacc 480

gtgtcctgga actctggcgc tctgaccagc gggctgcaca ccttcccagc tgtcctgcag 540

tcctcaggtc tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc catccagcaa cttcggcacc 600

cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag ccaagcaaca ccaaggtcga caagaccgtg 660

gagagaaagt gttgtgtgga gtgtccacct tgtccagccc ctccagtggc cggaccatcc 720

gtgttccctgt tccctccaaa gccaaaggac accctgatga tctccagaac cccagagggtg 780

acctgtgtgg tgggtggacgt gtcccacgag gaccagagg tgcagttcaa ctggtatgtg 840

gacggagtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagccaagag aggagcagtt caactccacc 900

ttcagagtgg tgagcgtgct gaccgtggtg caccaggact ggctgaacgg aaaggagtat 960

aagtgttaagg tgtccaacaa gggactgcc a tccagcatcg agaagaccat ctccaagacc 1020

aagggacagc caagagagcc acaggtgtat accctgcccc catccagaga ggagatgacc 1080

aagaaccagg tgtccctgac ctgtctgggt aagggattct atccatccga catcgccgtg 1140

gagtgggagt ccaacggaca gccagagaac aactataaga ccacctcc aatgctggac 1200

tccgacgat ccttcttctt gtattccaag ctgaccgtgg acaagtccag atggcagcag 1260

ggaaacgtgt tctcttgctt cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta taccagaag 1320

agcctgtccc tgtctccagg aaagtaa 1347

<210> 14
 <211> 645
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic oligonucleotide, Antibody G1 light chain

<400> 14

gaaatcgttc tgaccagtc cccggctacc ctgtccctgt ccccagggtga acgtgctacc 60

ctgtcctgca aagcttccaa acgggttacc acctacgttt cctggtacca gcagaaaccc 120

ggtcaggctc ctcgtctgct gatctacggt gcttccaacc gttacctcgg tatccagct 180

cgtttctccg gtccgggtc cggtaaccgac ttcacctga ccatctctc cctggaaccc 240

gaagactteg ctgtttacta ctgcagtcag tctacaact accctacac cttcggctcag 300

ggtaccaaac tggaaatcaa acgcaactgt gctgcacat ctgtcttcat cttccctcca 360

[0008]

tctgatgagc agttgaaatc cggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 ccgcgcgagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatccgg taactcccag 480
 gagagtgta cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag cacctgacc 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagttctc cagtcacaaa gagcttcaac cgcggtgagt gctaa 645

<210> 15
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Polypeptide, Alpha-CGRP

<400> 15

Ala Cys Asp Thr Ala Thr Cys Val Thr His Arg Leu Ala Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Arg Ser Gly Gly Val Val Lys Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Lys Ala Phe
 35

<210> 16
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Polypeptide, Beta-CGRP

<400> 16

Ala Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr His Arg Leu Ala Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Arg Ser Gly Gly Met Val Lys Ser Asn Phe Val Pro Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Lys Ala Phe
 35

<210> 17
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<220>
 <223> Polypeptide, Alpha-CGRP

<400> 17

Ser Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr His Arg Leu Ala Gly Leu Leu
 1 5 10 15

[0009]

Ser Arg Ser Gly Gly Val Val Lys Asp Asn Phe Val Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Glu Ala Phe
35

<210> 18
<211> 37
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<220>
<223> Polypeptide, Beta-CGRP

<400> 18

Ser Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr His Arg Leu Ala Gly Leu Leu
1 5 10 15

Ser Arg Ser Gly Gly Val Val Lys Asp Asn Phe Val Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Lys Ala Phe
35

<210> 19
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic polypeptide, Antibody G2 heavy chain variable region

<400> 19

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Gly Asn Asp Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
100 105 110

[0010]

Val Ser Ser
115

<210> 20
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic polypeptide, Antibody G2 light chain variable region
<400> 20

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

Glu Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ile
20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Phe Ser Pro Lys Val Leu
35 40 45

Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

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

Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Thr Ile Pro
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic polypeptide, Antibody G2 Kabat CDR H1
<400> 21

Ser Ser Val Met His
1 5

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic polypeptide, Antibody G2 CDR H2
<400> 22

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

[0011]

<210> 23
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic polypeptide, Antibody G2 CDR H3

<400> 23

Gly Gly Asn Asp Gly Tyr
 1 5

<210> 24
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic polypeptide, Antibody G2 CDR L1

<400> 24

Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ile Tyr Leu His
 1 5 10

<210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic polypeptide, Antibody G2 CDR L2

<400> 25

Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic polypeptide, Antibody G2 CDR L3

<400> 26

Gln Gln Gly Ser Thr Ile Pro Phe Thr
 1 5

<210> 27
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic oligonucleotide, Antibody G2 heavy chain variable region

<400> 27

gagggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

[0012]

tcctgcaagg cttctggata cacattcact agctctgtta tgcactgggt gaagcagaag 120
 cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg tactaagtac 180
 aatgagaagt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atggaactca gcagcctgac ctctgaggac tetgcggtct attactgtgc aaaaggggt 300
 aacgatggct actggggcca aggcaactact ctcacagtct cctca 345

<210> 28
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic oligonucleotide, Antibody G2 light chain variable region

<400> 28

gaaattgtgc tcaccagtc tccaaccacc atggctgcat ctcccggga gaagatcact 60
 atcacctgta gtgccagctc aagtataagt tccatttact tgcatggta tcagcagaag 120
 ccaggattct cccctaaagt cttgatttat agggcatcca atctggcttc tggagtcca 180
 gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaattgg caccatggag 240
 gctgaagatg ttgccactta ctactgccag cagggtagta ctataccatt cacgttcggc 300
 tcggggacaa agttggaat aaaa 324

<210> 29
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic polypeptide, Antibody G2 heavy chain

<400> 29

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

[0013]

Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser
 145 150 155 160

Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu
 165 170 175

Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser
 180 185 190

Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val
 195 200 205

Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp
 210 215

<210> 30
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic polypeptide, Antibody G2 light chain

<400> 30

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

Glu Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ile
 20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Phe Ser Pro Lys Val Leu
 35 40 45

Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Thr Ile Pro
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala
 100 105 110

Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser
 115 120 125

[0014]

Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Asp
 130 135 140

Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val
 145 150 155 160

Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser
 180 185 190

Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215

<210> 31
 <211> 648
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic oligonucleotide, Antibody G2 heavy chain

<400> 31

gagggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggettc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg cttctggata cacattcact agctctgtta tgcactgggt gaagcagaag 120
 cctgggcagg gccttgagtg gattggatal attaatcctt acaatgatgg tactaagtac 180
 aatgagaagt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atggaactca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aaaagggggt 300
 aacgatggct actggggcca aggcactact ctcacagtct cctcagccaa aacgacacc 360
 ccaatctgtct atccactggc ccttgatct gctgcccaaa ctaactccat ggtgacctg 420
 ggatgctgg tcaagggcta ttccctgag ccagtacagc tgacctggaa ctctggatcc 480
 ctgtccagcg gtgtgcacac cttcccagct gtctgcagc ctgaccteta cactctgagc 540
 agctcagtga ctgtcccctc cagcacctgg cccagcgaga ccgtcacctg caacgttgcc 600
 caccggcca gcagcaccaa ggtggacaag aaaattgtgc ccagggat 648

<210> 32
 <211> 648
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic oligonucleotide, Antibody G2 light chain

<400> 32

gaaattgtgc tcaccagtc tccaaccacc atggctgcat ctcccgggga gaagatcact 60
 atcacctgta gtgcccagctc aagtataagt tccatttact tgcattggta tcagcagaag 120

[0015]

ccaggattct ccctaaagt cttgatttat agggcatcca atctggcttc tggagtccca 180
gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaattgg caccatggag 240
gctgaagatg ttgccactta ctactgccag cagggtagta ctataccatt cacgttcggc 300
tcggggacaa agttggaaat aaaacgggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca 360
ccatccagtg agcagttaac atctggaggt gcctcagtcg tgtgettctt gaacaacttc 420
taccocagag acatcaatgt caagtggaag attgatggca gtgaacgaca aaatggtgtc 480
ctgaacagtt ggactgatca ggacagcaaa gacagcacct acagcatgag cagcacctc 540
acattgacca aggacgagta tgaacgacat aacagctata cctgtgaggc cactcacaag 600
acatcaactt cacccatcgt caagagcttc aacaggaatg agtgtaa 648

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic polypeptide, Antibody G1 Chothia CDR H1
<400> 33

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
1 5

<210> 34
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic polypeptide, Antibody G1 Kabat CDR H1
<400> 34

Asn Tyr Trp Ile Ser
1 5

<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic polypeptide, Antibody G1 Chothia CDR H2
<400> 35

Arg Ser Glu Ser Asp Ala Ser Ala
1 5

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic polypeptide, Antibody G2 extended CDR H1
<400> 36

[0016]

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Val Met His
1 5 10

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic polypeptide, Antibody G2 Chothia CDR H1

<400> 37

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
1 5

<210> 38
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic polypeptide, Antibody G2 Chothia CDR H2

<400> 38

Asn Pro Tyr Asn Asp Gly
1 5

<210> 39
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic polypeptide

<400> 39

Gly Ser Lys Ala Phe
1 5

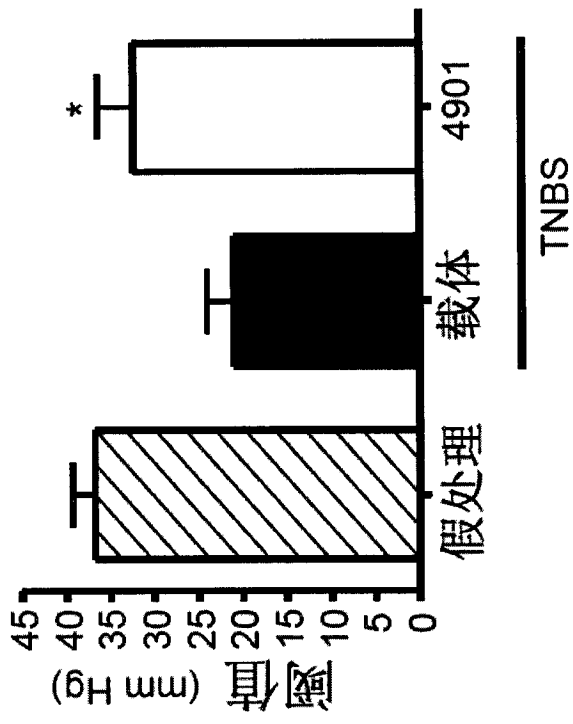


图 1A

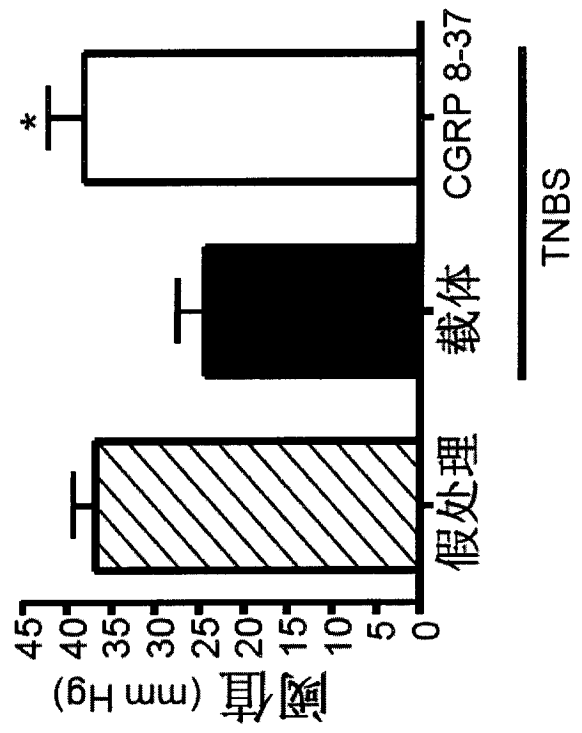


图 1B

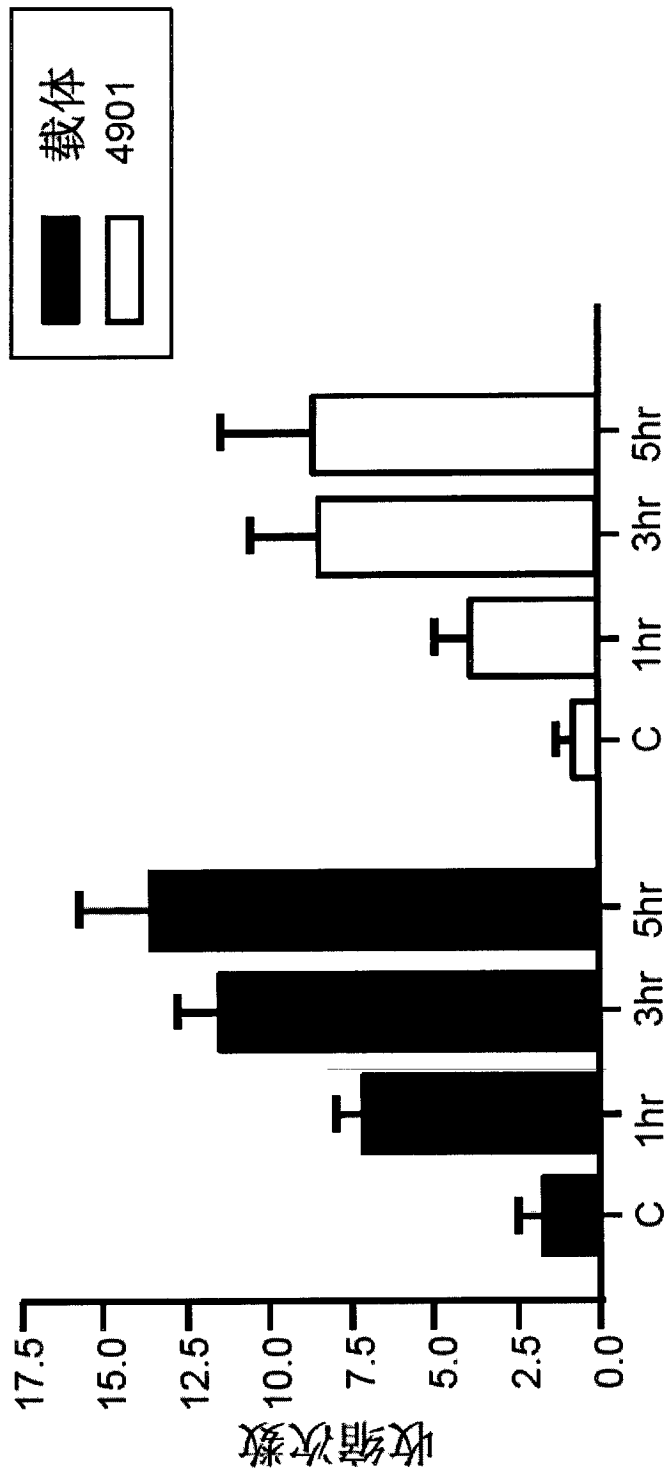


图 2