

神经生长因子的单克隆抗体及其编码基因和应用

技术领域

本发明属免疫学和分子生物学技术领域，更具体地说，本发明涉及一种神经生长因子的单克隆抗体及其编码基因和在制备检测试剂盒、多种药物中的应用。

背景技术

神经生长因子（nervous growth factor, NGF）是最早确定的神经生长营养因子之一，在生物体神经元的发生、分化及功能维持中承担重要作用。NGF可高亲和性与原肌球蛋白受体激酶（tropomyosin receptor kinase A, TrKA）结合，并且能够与P75^{NTR}受体非特异性结合。随着越来越多的证据表明，除具有促进神经元的生长、发育、存活等生物学作用外，NGF被广泛认为是持续性疼痛和慢性疼痛的介导者。例如，静脉输入NGF可导致全身性疼痛反应，局部注射NGF可在注射部位引起痛觉过敏及异常疼痛。NGF在炎症部位的分泌量增加，并且维持时间较长。此外，在某些性质的癌症中，过量的NGF促进神经纤维的生长和浸润，从而诱发癌痛。有报道称 TrKA 受体的基因敲除小鼠缺乏痛觉，认为 NGF 是与疼痛的表现紧密相关的分子。证据表明，在神经性和慢性炎症性疼痛动物模型中，使用NGF抑制剂可以缓解疼痛反应。在鼠类癌痛模型中和型抗NGF抗体可使疼痛显著减轻。

抗体治疗药物，特别是单克隆抗体已在多种疾病的治疗中取得了良好的疗效。制备安全、有效地抗NGF单克隆抗体可为慢性痛、癌痛的治疗提供一类不同于阿片类、非甾体类等具有成瘾性或消化道副作用的新的镇痛药物。目前由辉瑞制药有限公司研发的Tanezumab在临床前及临床研究中展现出了良好的镇痛效果，但是目前尚缺乏其它活性更高的抗NGF抗体。

发明内容

本发明的目的在于：克服现有技术中存在的神经生长因子抗体活性不高且具有种属差异性的缺陷，提供一种活性高、排除种属差异性的神经生长因子的单克隆抗体及其编码基因和应用，以及其在制备检测试剂盒、多种药物中的应用。

为了实现上述发明目的，本发明提供了一种可与人神经生长因子特异性良好结合的单克隆抗体；包括重链和轻链，重链包括重链恒定区和重链可变区，轻链包括轻链恒定区和轻链可变区。

轻链和重链的可变区决定抗原的结合；每条链的可变区均含有三个高变区，称互补决定区（CDR）（重链(H)的CDR包含HCDR1、HCDR2、HCDR3，轻链（L）的CDR包含LCDR1、

LCDR2、LCDR3；其由Kabat等人命名，见Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition (1991), 第1-3卷, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md)。

本发明中，所述重链可变区包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3，轻链可变区包含三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3；

5 其中，所述互补决定区HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示；

所述互补决定区HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示；

所述互补决定区HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示；

所述互补决定区LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示；

所述互补决定区LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示；

10 所述互补决定区LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示。

本发明构建了6个CDR区的氨基酸序列，并做了特定修改以提高抗体可变区对抗原的结合活性。为配合在CDR区的改动，框架区也同时被修改，但是需要确保这些框架区的修改仍与人源的种系序列相兼容。框架的修改也将同时进行分析，以确保这些改变对CDR区与抗原的结合没有影响。

15 通过本领域技术人员所熟知的技术手段，例如通过美国国立生物技术信息中心网站（NCBI），分析该单克隆抗体重链可变区和轻链可变区的互补决定区（CDR），其亦分别如上面的SEQ ID NO: 5~7和SEQ ID NO: 8~10所示。在本发明中，将该单克隆抗体命名为H26L17。

作为本发明神经生长因子的单克隆抗体的一种优选技术方案，所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示；所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。

20 作为本发明神经生长因子的单克隆抗体的一种更进一步的优选技术方案，编码所述重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示；编码所述轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示。

本发明神经生长因子的单克隆抗体的一种实施方案中，所述神经生长因子的单克隆抗体选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、单链抗体（例如，scFv）、人源化
25 抗体、嵌合抗体或双抗体。

本发明神经生长因子的单克隆抗体的一种实施方案中，所述神经生长因子的单克隆抗体以小于100nM（例如小于大约10 nM、1 nM、0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、0.1 nM或更小）的EC₅₀与NGF蛋白结合。其中，EC₅₀可通过ELISA夹心法测定。

30 本发明神经生长因子的单克隆抗体的一种实施方案中，所述神经生长因子的单克隆抗体

包括非-CDR区，且所述非-CDR区来自不是鼠类的物种，例如来自人抗体。

为了实现上述发明目的，本发明还提供了编码上述神经生长因子的单克隆抗体的基因。

为了实现上述发明目的，本发明还提供了一种载体，其包含所述重链可变区的核苷酸序列和/或所述轻链可变区的核苷酸序列。

- 5 为了实现上述发明目的，本发明还提供了一种宿主细胞，其包含所述重链可变区的核苷酸序列和/或所述轻链可变区的核苷酸序列；

或

包含所述重链可变区的核苷酸序列和/或所述轻链可变区的核苷酸序列的载体。

- 10 为了实现上述发明目的，本发明还提供了制备所述神经生长因子的单克隆抗体的方法，其包括在合适的条件下培养本发明的宿主细胞，以及从细胞培养物中回收所述神经生长因子的单克隆抗体的步骤。

本发明还提供了一种单克隆抗体偶联物，其包括所述神经生长因子的单克隆抗体以及与其偶联的偶联部分，所述偶联部分为可检测的标记。优选地，所述偶联部分为放射性同位素、发光物质、有色物质或酶。

- 15 本发明还提供了一种试剂盒，其包括所述神经生长因子的单克隆抗体和/或所述单克隆抗体偶联物。

作为本发明试剂盒的一种优选技术方案，所述试剂盒还包含第二抗体，所述第二抗体特异性识别所述的神经生长因子的单克隆抗体；另外，所述第二抗体还包括可检测的标记，例如放射性同位素、发光物质、有色物质或酶。

- 20 本发明还提供了神经生长因子的单克隆抗体和/或单克隆抗体偶联物在可检测神经生长因子的存在和/或水平的试剂盒中的应用。所述试剂盒用于检测NGF在样品中的存在或其水平。

本发明还提供了一种药物，其包括所述神经生长因子的单克隆抗体和/或所述单克隆抗体偶联物；可选地，其还包括药学上可以接受的载体和/或辅料。

- 25 上述药物与神经生长因子特异性结合，可用于抑制神经生长因子介导的生物学效应，如TF-1细胞的增殖；

和/或

用于治疗或预防神经性疼痛、慢性疼痛、炎性疼痛。

本发明通过体内实验发现，本发明神经生长因子的单克隆抗体能够改善

- 30 Lenti-IL-1 β -NIH/3T3小鼠膝关节炎疼痛模型中动物的患肢行走行为的改变以及体重下降。

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本发明中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

5 如本发明中所使用的，术语“抗体”是指，是指通常由两对多肽链（每对具有一条“轻”（L）链和一条“重”（H）链）组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ 和 λ 轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并且分别将抗体的同种型定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约12或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约3个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(V_H)和重链恒定区(C_H)组成。重链恒定区
10 由3个结构域(C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3})组成。各轻链由轻链可变区(V_L)和轻链恒定区(C_L)组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞(例如，效应细胞)和经典补系统的第一组分($C1q$)的结合。 V_H 和 V_L 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR))，其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各 V_H 和 V_L 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4从氨基末端至
15 羧基末端排列的3个CDR和4个FR组成。各重链/轻链对的可变区(V_H 和 V_L)分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991))，或Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia等人 (1989) Nature 342:878-883的定义。术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如，其包括，特别地，重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体
20 可以是不同种型的抗体，例如，IgG (例如，IgG1, IgG2, IgG3或IgG4亚型)，IgA1, IgA2, IgD, IgE或IgM抗体。

如本发明中所使用的，术语抗体的“抗原结合片段”是指包含全长抗体的片段的多肽，其保持特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力，和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合，其也被称为“抗原结合部分”。通常参见，Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed.,
25 第2版，Raven Press, N.Y. (1989)，其以其全文通过引用合并入本文，用于所有目的。可通过重组DNA技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗体的抗原结合片段。在一些情况下，抗原结合片段包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb和互补决定区(CDR)片段、单链抗体（例如，scFv）、嵌合抗体、双抗体(diabody)和这样的多肽，其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。

30 如本发明中所使用的，术语“Fd片段”意指由 V_H 和 C_{H1} 结构域组成的抗体片段；术语“Fv

片段”意指由抗体的单臂的V_L和V_H结构域组成的抗体片段；术语“dAb片段”意指由V_H结构域组成的抗体片段(Ward 等人, Nature 341:544-546 (1989))；术语“Fab片段”意指由V_L、V_H、C_L和C_{H1}结构域组成的抗体片段；术语“F(ab')₂片段”意指包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个Fab片段的抗体片段。

- 5 在一些情况下，抗体的抗原结合片段是单链抗体(例如，scFv)，其中V_L和V_H结构域通过使其能够产生为单个多肽链的连接体配对形成单价分子(参见，例如，Bird等人, Science 242:423-426 (1988)和Huston等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988))。此类scFv分子具有一般结构：NH₂-V_L-接头-V_H-COOH或NH₂-V_H-接头-V_L-COOH。合适的现有技术接头由重复的GGGGS氨基酸序列或其变体组成。例如，可使用具有氨基酸序列(GGGGS)₄的接头，
- 10 但也可使用其变体(Holliger等人(1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448)。可用于本发明的其他接头由Alfthan等人(1995), Protein Eng. 8:725-731, Choi等人(2001), Eur. J. Immunol. 31: 94-106, Hu等人(1996), Cancer Res. 56:3055-3061, Kipriyanov等人(1999), J. Mol. Biol. 293:41-56和Roovers等人(2001), Cancer Immunol.描述。

- 15 在一些情况下，抗体的抗原结合片段是双抗体，即，双价抗体，其中V_H和V_L结构域在单个多肽链上表达，但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对，从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位(参见，例如，Holliger P等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)，和Poljak R. J.等人, Structure 2:1121-1123 (1994))。

- 可使用本领域技术人员已知的常规技术（例如，重组DNA技术或酶促或化学断裂法）从
- 20 给定的抗体获得抗体的抗原结合片段，并且以与用于完整抗体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合片段。

在本发明中，除非上下文明确指出，否则当提及术语“抗体”时，其不仅包括完整抗体，而且包括抗体的抗原结合片段。

- 如本发明中所使用的，术语“单抗”和“单克隆抗体”是指，来自一群高度同源的抗体
- 25 分子中的一个抗体或抗体的一个片断，也即除可能自发出现的自然突变外，一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的，其通常包含至少2种或更多种的不同抗体，这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。单克隆抗体通常可采用Kohler等首次报道的杂交瘤技术获得（Nature, 256:495, 1975），但也可采用重组DNA技术获得(如参见U.S.P 4,816,567)。

- 30 如本发明中所使用的，术语“人源化抗体”是指，人源免疫球蛋白（受体抗体）的全部

或部分CDR区被一非人源抗体（供体抗体）的CDR区替换后得到的抗体或抗体片段，其中的供体抗体可以是具有预期特异性、亲和性或反应性的非人源（例如，小鼠、大鼠或兔）抗体。此外，受体抗体的构架区（FR）的一些氨基酸残基也可被相应的非人源抗体的氨基酸残基替换，或被其他抗体的氨基酸残基替换，以进一步完善或优化抗体的性能。关于人源化抗体的更多详细内容，可参见例如，Jones et al., *Nature*, 321:522 525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332:323 329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593 596 (1992);和Clark, *Immunol. Today* 21: 397 402 (2000)。

如本发明中所使用的，术语“表位”是指，抗原上被免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位。“表位”在本领域内也称为“抗原决定簇”。表位或抗原决定簇通常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或碳水化合物或糖侧链组成并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。例如，表位通常以独特的空间构象包括至少3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14或15个连续或非连续的氨基酸，其可以是“线性的”或“构象的”。参见，例如，*Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*，第66卷，G. E. Morris, Ed. (1996)。在线性表位中，蛋白质与相互作用分子（例如抗体）之间的所有相互作用的点沿着蛋白质的一级氨基酸序列线性存在。在构象表位中，相互作用的点跨越彼此分开的蛋白质氨基酸残基而存在。

如本发明中所使用的，术语“分离的”或“被分离的”指的是，从天然状态下经人工手段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分，那么可能是其所处的天然环境发生了改变，或从天然环境下分离出该物质，或二者情况均有发生。例如，某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽，而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”或“被分离的”不排除混有人工或合成的物质，也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

如本发明中所使用的，术语“大肠杆菌表达系统”是指由大肠杆菌(菌株)与载体组成的表达系统，其中大肠杆菌(菌株)来源于市场上可得到的菌株，例如但不限于：GI698, ER2566, BL21(DE3), B834(DE3), BLR(DE3)。

如本发明中所使用的，术语“载体(vector)”是指，可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时，载体称为表达载体。载体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体，例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC)；噬菌体如λ噬菌体或M13噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于，逆转录酶

病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（如SV40）。一种载体可以含有多种控制表达的元件，包括但不限于，启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。

5 如本发明中所使用的，术语“宿主细胞”是指，可用于导入载体的细胞，其包括但不限于，如大肠杆菌或枯草菌等的原核细胞，如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞，如S2果蝇细胞或Sf9等的昆虫细胞，或者如纤维原细胞，CHO细胞，COS细胞，NSO细胞，HeLa细胞，BHK细胞，HEK 293细胞或人细胞等的动物细胞。

10 如本发明中使用的，术语“特异性结合”是指，两分子间的非随机的结合反应，如抗体和其所针对的抗原之间的反应。在某些实施方式中，特异性结合某抗原的抗体（或对某抗原具有特异性的抗体）是指，抗体以小于大约 10^{-5} M，例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M或更小的亲和力（ K_D ）结合该抗原。

15 如本发明中所使用的，术语“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数，其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小，抗体-抗原结合越紧密，抗体与抗原之间的亲和力越高。通常，抗体以小于大约 10^{-5} M，例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M或更小的解离平衡常数（ K_D ）结合抗原（例如，L1蛋白），例如，如使用表面等离子体共振术（SPR）在BIAcore仪中测定的。

20 如本发明中所使用的，术语“单克隆抗体”和“单抗”具有相同的含义且可互换使用；术语“多克隆抗体”和“多抗”具有相同的含义且可互换使用；术语“多肽”和“蛋白质”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中，氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如，丙氨酸可用A或Ala表示。

25 如本发明中所使用的，术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如，预防疾病有效量是指，足以预防，阻止，或延迟疾病的发生的量；治疗疾病有效量是指，足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如，对于治疗用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄，体重和性别，药物的施用方式，以及同时施用的其他治疗等等。

相对于现有技术，本发明具有如下优点：

30 本发明抗神经生长因子单克隆抗体能特异性地与神经生长因子结合，具有活性高等优点，可用于检测神经生长因子的存在和/或水平，以及制备拮抗神经生长因子的药物和制备治疗或

预防神经性疼痛、慢性疼痛、炎性疼痛中的药物，具有良好的应用前景和市场价值。

附图说明

图 1 为本发明神经生长因子的单克隆抗体 H26L17 的 SDS-PAGE 检测结果。从左至右的 4 个泳道的样品及其上样量依次为：非还原型蛋白电泳上样缓冲液样品抗体，1 μ g；还原型蛋白电泳上样缓冲液样品抗体，1 μ g；标准分子量蛋白，5 μ l；牛血清白蛋白，1 μ g。

图 2 为 H26L17，Tanezumab 与抗原人 β -NGF 的结合活性检测结果。

图 3 为 CCK-8 法检测 H26L17 与 Tanezumab 抑制 TF-1 细胞增殖标准曲线结果。

图 4 为本发明抗神经生长因子的单克隆抗体 H26L17 抑制 NGF 诱导的 TF-1 细胞增殖的实验中 72h 后的细胞量。

图 5 为 CCK-8 法检测 H26L17 与 Tanezumab 抑制 TF-1 细胞增殖的实验中各组 OD 值。

图 6 为 H26L17 抑制 NGF 诱导的 TF-1 细胞增殖曲线。以抗体浓度 (nM) 的对数为 x 轴，OD 450nm 值为 y 轴，进行剂量效应曲线拟合，比较不同抗体的 EC₅₀。

图 7 为 H26L17 对 Lenti-IL-1 β -NIH/3T3 小鼠膝关节炎疼痛模型中疼痛导致的患肢的行走行为的影响结果。

图 8 为 H26L17 对 Lenti-IL-1 β -NIH/3T3 小鼠膝关节炎疼痛模型中小鼠体重的影响结果。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者，按照本领域内的文献所描述的技术或条件（例如参考 J.萨姆布鲁克等著，黄培堂等译的《分子克隆实验指南》，第三版，科学出版社）或按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，为可以通过市场购买获得的常规产品。

在本发明的下述实施例中，使用的 C57BL/6 小鼠小鼠购自广东省医学实验动物中心。

所用的阳性对照抗体 Tanezumab 是 Pfizer 抗体 Tanezumab (David L. Shelton. Methods for treating bone cancer by administering a Nerve Growth Factor antagonist antibody. USA, 20110243961A1. 2011-06-06)。

实施例 1 H26L17 重链和轻链序列的设计，表达和纯化

1. 抗体的设计

为制备抗人 NGF 抗体 H26L17，本发明人根据 NGF 蛋白序列及其蛋白三维晶体结构等，创造性地人工设计了一系列的抗体序列。通过大量的筛选和检测，最终得到了一种与 NGF 特

异性结合的抗体 H26L17。该抗体重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列及其编码 DNA 序列如 SEQ ID NO: 1~4。

2. 抗体的表达和纯化

将 H26L17 的重链可变区的编码核苷酸序列(如 SEQ ID NO: 1 所示;恒定区是 Ig gamma-1 chain C region, ACCESSION: P01857)和轻链可变区的编码核苷酸序列(如 SEQ ID NO: 3 所示;恒定区为 Ig lambda-2 chain C regions; ACCESSION: P0CG05.1)分别克隆到 pUC57simple 载体(金斯瑞公司提供)中,分别获得 pUC57simple-H26L17H 和 pUC57simple-H26L17L 质粒。

分别将质粒 pUC57simple-H26L17H 和 pUC57simple-H26L17L 进行酶切(*HindIII* & *EcoRI*),电泳回收得到的重链轻链核苷酸序列分别亚克隆到 pcDNA3.1 载体中,提取重组质粒共转染 293F 细胞。转染后的 293F 细胞培养 7 天后,将培养液高速离心,获得的上清浓缩后上样至 HiTrap MabSelect SuRe 柱,用洗脱液一步洗脱蛋白,回收目标样品。抗体样品保存于 PBS 溶液中。

将纯化后的样品分别加入还原型蛋白电泳上样缓冲液和非还原型蛋白电泳上样缓冲液,随后煮沸。处理后的样品进行 SDS-PAGE 电泳检测。H26L17 的电泳图如图 1 所示,还原型蛋白样品目标蛋白在 45kD 和 30kD 处,非还原型蛋白样品(单个抗体)目标蛋白在 150kD 处。

本实施例制得的 H26L17 用于下面的实施例 2~4。

20 实施例 2 H26L17 与抗原人 β -NGF 的结合活性分析

本实验应用 ELISA 的方法测定 H26L17 与人 β -NGF 的结合 EC_{50} (半数效应浓度),以考察抗体与人 β -NGF 的结合特异性和亲和力。

以 0.5 μ g/ml 的人 β -NGF,每孔 50 μ l 包被酶标板,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗板一次拍干后,每孔用 300 μ l 1%BSA 溶液(用 PBS 溶解)封闭,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时,洗板三次后拍干。将抗体稀释至 1 μ g/ml 作为起始浓度,在酶标板上进行 1:3 的梯度稀释,共获得 7 个浓度;另设空白对照孔。以上操作均做 2 个复孔,每孔终体积 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。洗板三次拍干后,每孔加入 50 μ l 辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG (H+L) 二抗工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。洗板四次拍干后,每孔加入 50 μ l TMB 显色液,室温条件下避光显色 5 分钟后,每孔加入 50 μ l 终止液终止显色反应。反应终止后立即把酶标板放入酶标仪中,选择 450nm 光波长读取酶标板各孔的 OD 数值。用 SoftMax Pro 6.2.1 软件对数据进行分析处理。

由表 2 和图 2 可见，450nm 读数结果显示 H26L17 能有效地结合人 β -NGF，结合效率呈现剂量依赖关系。以抗体浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标进行 4-parameter 拟合曲线作图，得到的结合 EC_{50} 为 0.071nM，结合活性与 Tanezumab 相当。H26L17，Tanezumab 与人 β -NGF 的结合活性检测结果见表 2。结果表明，H26L17 与抗原人 β -NGF 的结合效率呈现剂量依赖关系，结合 EC_{50} 为 0.071nM，结合活性与 Tanezumab 相当。

表 2 H26L17，Tanezumab 与抗原人 β -NGF 的结合活性检测结果

抗体稀释	抗原抗体结合 OD（450nm）值			
	H26L17		Tanezumab	
1 μ g/ml	2.730	2.655	2.770	2.705
1:3	2.704	2.797	2.656	2.553
1:9	2.663	2.605	2.482	2.274
1:27	2.242	2.222	2.166	1.969
1:81	1.613	1.525	1.178	1.266
1:243	0.779	0.735	0.560	0.609
1:729	0.323	0.313	0.227	0.245
0	0.047	0.046	0.044	0.045
EC_{50} （nM）	0.071		0.103	

实施例 3 H26L17 的细胞生物学活性分析

1. 检测 H26L17 抑制 NGF 诱导的 TF-1 细胞增殖的药理学活性

为检测 H26L17 抑制 NGF 依赖的 TF-1 细胞增殖效应，分别用不同浓度的抗体、NGF 和 TF-1 细胞共孵育培养 72h 后检测细胞增殖，具体的：

离心收集 TF-1 细胞，计数，96 孔板中每孔接种 4 万个细胞。给药，NGF 对照组设置三个浓度：0.2、2、20 ng/ml，抗体组中用 20ng/ml NGF；抗体分别设置五个浓度：0.016、0.08、0.4、2、10 nM。施与细胞 NGF/抗体预混液前，抗体与 NGF 于 37℃预孵 30min。实验中并设置同型对照组。细胞接受处理后培养 72 小时（每间隔 24 小时吹散打匀一次）后，参照 CCK-8 检测试剂盒说明书检测细胞增殖情况（检测时吸取 100 μ l 液体）。细胞增殖标准曲线如图 3 所示。细胞孵育 72 h 细胞增殖检测结果如图 4 所示。由图 4 可见，H26L17 呈剂量依赖性抑制 NGF 对 TF-1 细胞增殖促进效应。特别地，当抗体浓度低于 0.08nM 时，H26L17 抗体抑制 NGF 对 TF-1 细胞增殖效应明显优于阳性对照抗体 Tanezumab。

20

2. H26L17 抑制 NGF 诱导的 TF-1 细胞增殖实验中 H26L17 对 NGF 的中和活性 EC_{50} 值

为检测 H26L17 抑制 NGF 诱导的 TF-1 细胞增殖的药理学活性并计算 H26L17 对 NGF 的中和活性的 EC_{50} ，分别用不同浓度的抗体、NGF 和 TF-1 细胞共孵育培养 72 小时后检测细胞增殖，具体的操作步骤或方法简述如下：

TF-1 细胞离心收集接种于 96 孔板中，每孔接种 4 万个细胞。给药，NGF 对照组设置三个浓度：0.06、0.3、1.5 nM。NGF/抗体预混液组中 NGF 终浓度为 1.5 nM，抗体分别为 0.0468、0.07、0.105、0.158、0.237、0.356、0.533、0.8 nM。施与细胞 NGF/抗体预混液前，抗体与 NGF 于 37℃ 预孵 30min。实验中设置同型抗体对照组，浓度为 1.5 nM。细胞接受处理后培养 72 小时（每间隔 24 小时吹散、打匀一次）后，参照 CCK-8 检测试剂盒说明书检测细胞增殖情况（检测时吸取 100 μ l 液体）。

CCK-8 实验中检测的各组 OD 值如图 5 所示。以抗体浓度(nM)的对数为 x 轴，OD450nm 值为 y 轴，进行剂量效应曲线拟合，比较不同抗体的 EC_{50} ，拟合曲线如图 6 所示。H26L17 可呈剂量依赖性地抑制 NGF 诱导的 TF-1 细胞增殖，表现其对 NGF 的中和活性，且活性略优于同靶点上市药 Tanezumab，二者中和 NGF 活性 EC_{50} 分别为 0.16nM 和 0.21nM，H26L17 抗体抑制 NGF 对 TF-1 细胞增殖效应明显优于阳性对照抗体 Tanezumab。

15

实施例 4 H26L17 在 Lenti-IL-1 β -NIH/3T3 小鼠膝关节炎疼痛模型中能改善小鼠患肢的行走行为以及减少体重的下降。

在关节炎的患者中，患者会由于疼痛而出现跛行等行为学改变，并由于疼痛诱发的不良情绪导致摄食量减少，体重下降。为检测抗 NGF 抗体对膝关节炎疼痛反应的缓解，建立 Lenti-IL-1 β -NIH/3T3 诱导的小鼠膝关节炎疼痛模型，并通过小鼠行为学改善进行药效评估。在此模型中，Lenti-IL-1 β -NIH/3T3 细胞在小鼠关节腔内过量表达 IL-1 β ，进而诱发注射部位关节炎炎症及疼痛。在本实验中，60 只 C57BL/6 小鼠根据体重分为 6 组，即正常组（Saline，皮下给药）、模型组（Anti-HEL，20mg/kg，皮下给药）、Tanezumab 组（Tanezumab，20mg/kg，皮下给药）及 H26L17 抗体低剂量组（H26L17，0.2mg/kg，皮下给药）、中剂量组（H26L17，2mg/kg，皮下给药）、高剂量组（H26L17，20mg/kg，皮下给药），每组 10 只。分组当天记为第 0 天（D0）。分组后对小鼠进行称重，并根据小鼠体重按照 10ml/kg 给药体积皮下注射相对应药物，共给药三次，分别在分组后 D0，D3，D6 进行皮下给药。分组当天给药后，正常组 10 只 C57BL/6 小鼠膝关节腔内接种 NIH/3T3 细胞悬液（5 万个细胞/只），其余各组 50 只 C57BL/6 小鼠膝关节腔内注射接种 Lenti-IL-1 β -NIH/3T3 细胞悬液（5 万个细胞/只）。然后在分组给药后 D3，D5 和 D11 进行小鼠行为学评分。

30

抗 NGF 抗体对小鼠膝关节疼痛反应的结果如图 7 所示, H26L17 高剂量组 (20mg/kg, 皮下给药) 与阳性对照抗体 Tanezumab (20mg/kg, 皮下给药) 相比, 降低疼痛反应明显; H26L17 抗体低剂量组 (0.2mg/kg, 皮下给药) 和 H26L17 中剂量组 (2mg/kg, 皮下给药) 与阳性对照抗体 Tanezumab (20mg/kg, 皮下给药) 相比, 降低小鼠疼痛效果相当。抗 NGF 抗体对减轻小鼠膝关节炎疼痛模型中小鼠体重下降结果如图 8 所示, H26L17 抗体中、高剂量组与阳性对照抗体 Tanezumab 减轻膝关节炎疼痛模型中的小鼠体重下降效果相当, 较同型对照 anti-HEL 明显。

以上对本发明的较佳实施方式进行了具体说明, 但本发明创造并不限于所述实施例, 熟悉本领域的技术人员在不违背本发明精神的前提下还可做出种种的等同变型或替换, 这些等同的变型或替换均包含在本申请权利要求所限定的范围内。

序列表

	<110>	中山康方生物医药有限公司	
5	<120>	神经生长因子的单克隆抗体及其编码基因和应用	
	<160>	10	
	<170>	SIP0SequenceListing 1.0	
10			
	<210>	1	
	<211>	363	
	<212>	DNA	
	<213>	单克隆抗体 H26L17 重链可变区的核苷酸序列(Artificial Sequence)	
15			
	<400>	1	
	caggtgcagc tgcaggaaag cggaccagga ctggtgaagc ctagecgagac cctgagcctg	60	
	acttgtaccg tgtccggatt cgatctgagc ggctacgacc tgaattggat cagacagcct	120	
	cccggaaagg gcctggagtg gatcggatc gtctggggag acggcagcag cgattacaac	180	
20	agcgccgtga agagccgcgt gacaatcagc aaggacacca gcaagaacca gttcagcctg	240	
	aagctgtcta gcgtgacagc cgccgataca gcagtgtact attgcgtgcg gggcggctat	300	
	tggtacgcca ccagctacta cttcgactat tggggccagg gaacactggt gaccgtgtct	360	
	tct	363	
25	<210>	2	
	<211>	121	
	<212>	PRT	
	<213>	单克隆抗体 H26L17 重链可变区的氨基酸序列(Artificial Sequence)	
30	<400>	2	

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asp Leu Ser Gly Tyr
 20 25 30
 5 Asp Leu Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ile Val Trp Gly Asp Gly Ser Ser Asp Tyr Asn Ser Ala Val Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 10 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val
 85 90 95
 Arg Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 15 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3
 <211> 321
 20 <212> DNA
 <213> 单克隆抗体 H26L17 轻链可变区的核苷酸序列(Artificial Sequence)

<400> 3
 gatatccaga tgaccagag ccccagctct ctgtcagcca gcgtgggcga tagagtgacc 60
 25 atcacttgca gagccagcga gagcatcagc agcaacctga attggtacca gcagaagcca 120
 ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagat tccacagcgg cgtgcctagc 180
 agattcagcg gaagcggcag cggcaccgac ttaccttca ccatcagctc tctgcagccc 240
 gaggacatcg ccactacta ttgccagcag gagcacacce tgccctttac ctttgccag 300
 ggaacaaagc tggagatcaa g 321
 30

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> 单克隆抗体 H26L17 轻链可变区的氨基酸序列(Artificial Sequence)

5

<400> 4

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Ser Ser Asn

10 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Phe His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

15 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Glu His Thr Leu Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

20 100 105

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

25 <213> 重链可变区互补决定区 1(HCDR1)

<400> 5

Gly Phe Asp Leu Ser Gly Tyr Asp

1 5

30

- <210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> 重链可变区互补决定区 2 (HCDR2)
- 5
<400> 6
Val Trp Gly Asp Gly Ser Ser
1 5
- 10 <210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> 重链可变区互补决定区 3 (HCDR3)
- 15 <400> 7
Val Arg Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10 15
- <210> 8
20 <211> 6
<212> PRT
<213> 轻链可变区互补决定区 1 (LCDR1)
- <400> 8
25 Glu Ser Ile Ser Ser Asn
1 5
- <210> 9
<211> 3
30 <212> PRT

<213> 轻链可变区互补决定区 2(LCDR2)

<400> 9

Tyr Thr Ser

5 1

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

10 <213> 轻链可变区互补决定区 3(LCDR3)

<400> 10

Gln Gln Glu His Thr Leu Pro Phe Thr

1 5