

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 021284

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2015.05.29

(21) Номер заявки
201070888

(22) Дата подачи заявки
2009.02.04

(51) Int. Cl. **C07K 16/28 (2006.01)**
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА И ИХ ПРОИЗВОДНЫЕ

(31) **61/025,995**
(32) **2008.02.04**
(33) **US**
(43) **2011.04.29**
(86) **PCT/EP2009/051285**
(87) **WO 2009/098238 2009.08.13**
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЛЕЙ ЛАЙН ДЖЕНОМИКС С.П.А.
(IT)
(72) Изобретатель:
Бенини Фабио, Д'Амбросио Даниель
(IT)
(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) **WO-A-0073344**
WO-A-2006131951
WO-A-2006137106
WO-A-2005061540
UGOLINI GABRIELE ET AL.: "The function neutralizing anti-TrkA antibody MNAC13 reduces inflammatory and neuropathic pain". PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 20 FEB 2007, vol. 104, no. 8, 20 February 2007 (2007-02-20), pages 2985-2990, XP002523974, ISSN: 0027-8424, page 2986, right-hand column - page 2989, right-hand column, paragraph 3
CATTANEO A. ET AL.: "FUNCTIONAL BLOCKADE OF TYROSINE KINASE A IN THE RAT BASAL FOREBRAIN BY A NOVEL ANTAGONISTIC ANTI-RECEPTOR MONOCLONAL ANTIBODY". JOURNAL OF NEUROSCIENCE, NEW YORK, NY, US, vol. 19, no. 22, 15 November, 1999 (1999-11-15), pages 9687-9697, XP000945020, ISSN: 0270-6474, page 9688, left-hand column, paragraph 2 - paragraph 3, page 9694, right-hand column, paragraph 3, page 9695, left-hand column, paragraph 2, page 9690, left-hand column, paragraph 1

(57) Предложено антитело против TrkA, которое включает а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, выбранную из BXhVH1, BXhVH2, BXhVH3, BXhVH4, BXhVH5 или HuVHWOv, приведенных на фиг. 1a, или из вариантов любой из указанных последовательностей; и/или б) вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность, выбранную из BXhVL1, BXhVL2, BXhVL3, BXhVL4, BXhVL5, BXhVL6, BXhVL7 или BXhVL8, приведенных на фиг. 1b, или из вариантов любой из указанных последовательностей. Также предложены производные антител, которые связывают TrkA. Антитела или производные антител согласно настоящему изобретению полезны в ряде способов лечения, включая терапию боли.

B1

021284

021284
B1

Настоящее изобретение относится к антителам и к их производным, в частности к гуманизированным антителам и их производным.

Фактор роста нервов (NGF) действует через два мембранных рецептора: один представляет собой рецептор p75 с относительно низкой аффинностью, другой представляет собой рецептор 140 кДа с высокой аффинностью, известный как TrkA.

NGF потенциально можно применять для лечения широкого диапазона расстройств, таких как различные нейродегенеративные расстройства (включая болезнь Альцгеймера), диабет и лепру.

Тем не менее, NGF может обладать различными нежелательными агонистическими свойствами. Эти свойства включают увеличение болевой чувствительности. Система NGF-TrkA представляет собой потенциальную мишень для способов лечения боли.

Были получены различные антитела против TrkA. Одно из таких антител представляет собой моноклональное антитело, которое в WO 97/21732 (McGill University) обозначают как 5C3. Тем не менее, обнаружили, что оно представляет собой агонист TrkA и, следовательно, не будет полезным для уменьшения боли. В частности, при связывании с TrkA это антитело не предотвращает его функциональную активацию.

Моноклональное антитело против TrkA, известное как MNAC13, описано в заявке WO 00/73344 (Societa Italiana Per La Ricerca Scientifica) и полученном на ее основе патенте EP-B-118138 (Lay Line Genomics SpA). Показано, что антитело и различные его производные эффективны для предотвращения функциональной активации TrkA во множестве биологических систем. Моноклональное антитело MNAC13 применяли в стандартном teste на ноцицепцию и было обнаружено, что оно обеспечивает заметную гипоалгезию.

Одноцепочный вариант указанного антитела Fv (ScFv) также описан в WO 00/73344 и обозначен в указанном документе как MNAC13 ScFv. Он включает вариабельные области легкой (VL) и тяжелой (VH) цепи большого антитела, связанные друг с другом линкерным полипептидом, который соединяет С-конец области VL с N-концом области VH. Было обнаружено, что этот вариант связывает TrkA также эффективно, как и MNAC13. Последовательности вариабельных областей легкой и тяжелой цепей сравнили с последовательностями соответствующих участков антитела, описанного в WO 97/21732, и было обнаружено, что они имели низкий совокупный уровень идентичности последовательностей.

В WO 06/131952 (Lay Line Genomics SpA) описано медицинское применение антител против TrkA для лечения хронической боли. В данном документе приведены данные, полученные с применением моделей постоянной боли, в частности модели хронической компрессии (CCI).

В WO 06/137106 (Lay Line Genomics SpA) описано применение антитела против TrkA, способного ингибировать связывание между NGF и TrkA, в комбинации по меньшей мере с одним опиоидным анальгетиком для лечения или предупреждения боли. В этом документе указано, что эта комбинированная терапия позволяет уменьшить дозировку опиоида, чтобы обеспечить тот же уровень купирования боли, что и при гораздо более высокой дозировке. Следовательно, это может оказаться полезным для уменьшения побочных эффектов опиоидов при терапии боли, так как можно уменьшить дозировки.

В WO 05/061540 (Lay Line Genomics SpA & Scuolo Internazionale Superiore Di Studi Avanzati-Sissa) описан способ получения гуманизированных антител, согласно которому структурные данные, полученные с помощью кристаллографических исследований, используются для осуществления первых стадий гуманизирования. В качестве примеров в WO 05/061540 берут антитела против TrkA, описанные в WO 00/73344, и антитела против NGF в качестве отправных точек, а затем переконструируют их, применяя описанный способ.

Хотя гуманизированные антитела, описанные в WO 05/061540, являются полезными, существует потребность в обеспечении дополнительных гуманизированных антител для расширения возможностей эффективных способов лечения.

Авторами настоящего изобретения предложено множество антител против TrkA и их производных, которые не описаны в WO 05/061540. Авторами настоящего изобретения также представлены данные, указывающие на пользу таких антител. До настоящего изобретения указанные антитела были неизвестны в данной области техники, и представленные результаты не могли быть предсказаны.

Согласно одному своему аспекту настоящее изобретение обеспечивает антитело против TrkA, которое включает:

а) вариабельную область тяжелой цепи, включающую последовательность, выбранную из BXhVH1 (SEQ ID NO 1), BXhVH2 (SEQ ID NO 2), BXhVH3 (SEQ ID NO 3), BXhVH4 (SEQ ID NO 4), BXhVH5 (SEQ ID NO 5) или HuVHWOr (SEQ ID NO 6), приведенных на фиг. 1a; или из вариантов любой из указанных последовательностей; и/или

б) вариабельную область легкой цепи, включающую последовательность, выбранную из BXhVL1 (SEQ ID NO 7), BXhVL2 (SEQ ID NO 8), BXhVL3 (SEQ ID NO 9), BXhVL4 (SEQ ID NO 10), BXhVL5 (SEQ ID NO 11), BXhVL6 (SEQ ID NO 12), BXhVL7 (SEQ ID NO 13) или BXhVL8 (SEQ ID NO 14), приведенных на фиг. 1b, или из вариантов любой из указанных последовательностей.

Также предложено производное указанного антитела, при этом указанное производное способно связывать TrkA.

Более предпочтительно указанное антитело включает как вариабельную область тяжелой цепи, описанную в а) выше, так и вариабельную область легкой цепи, описанную в части б), т.е. оно включает одну из следующих комбинаций легкой и тяжелой цепей:

BXhVH1VL1, BXhVH1VL2, BXhVH1VL3, BXhVH1VL4, BXhVH1VL5, BXhVH1VL6,
BXhVH1VL7, BXhVH1VL8,

BXhVH2VL1, BXhVH2VL2, BXhVH2VL3, BXhVH2VL4, BXhVH2VL5, BXhVH2VL6,
BXhVH2VL7, BXhVH2VL8,

BXhVH3VL1, BXhVH3VL2, BXhVH3VL3, BXhVH3VL4, BXhVH3VL5, BXhVH3VL6,
BXhVH3VL7, BXhVH3VL8,

BXhVH4VL1, BXhVH4VL2, BXhVH4VL3, BXhVH4VL4, BXhVH4VL5, BXhVH4VL6,
BXhVH4VL7, BXhVH4VL8,

BXhVH5VL1, BXhVH5VL2, BXhVH5VL3, BXhVH5VL4, BXhVH5VL5, BXhVH5VL6,
BXhVH5VL7, BXhVH5VL8,

или HuVHWOr/HuVLWO.

Предпочтительно производное указанного антитела содержит по меньшей мере один гипервариабельный участок, выбранный из участков, подчеркнутых на фиг. 1а и 1б для каждой последовательности, или из вариантов указанных участков, которые имеют не более чем две замены аминокислот (предпочтительно не более чем одну замену аминокислоты) на подчеркнутый участок.

Более предпочтительно указанное производное содержит множество гипервариабельных участков, выбранных из участков, подчеркнутых на фиг. 1а и 1б для каждой последовательности, или из их вариантов, которые имеют не более чем две замены аминокислот (предпочтительно не более чем одну замену аминокислоты) на подчеркнутый участок.

Указанное производное, таким образом, может включать один, два, три, четыре, пять или шесть таких гипервариабельных участков (возможно в комбинации с одним или более другими гипервариабельным участком).

Указанное производное предпочтительно может включать, по меньшей мере, третий гипервариабельный участок тяжелой цепи, более предпочтительно, по меньшей мере, третий гипервариабельный участок тяжелой и легкой цепей.

Наиболее желательно, тем не менее, указанное производное содержит шесть гипервариабельных участков, соответствующих шести гипервариабельным участкам, подчеркнутым на фиг. 1а и 1б для каждой последовательности, или соответствующих их вариантам, которые имеют не более чем две замены аминокислот на подчеркнутый участок.

Действительно, в большинстве случаев, предпочтительно, чтобы в последовательностях гипервариабельных участков присутствовало мало изменений или они вообще отсутствовали. Таким образом, один, два, три, четыре, пять или даже все шесть гипервариабельных участков могут иметь те же последовательности аминокислот, что и последовательности, представленные на фиг. 1а и 1б.

В отношении каркасных областей предпочтительно, чтобы указанное производное имело по меньшей мере одну каркасную область, выбранную из неподчеркнутых последовательностей, показанных на фиг. 1а и 1б, или из их вариантов, которые имеют по меньшей мере 75% идентичности последовательностей аминокислот (например, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95 или по меньшей мере 98% идентичности последовательностей).

Степень идентичности последовательности аминокислот можно определить с помощью простого выравнивания последовательностей в отсутствие разрывов (гэпов) и определения различия последовательностей.

Последовательности можно выровнять согласно схеме нумерации по Kabat, а затем можно определить идентичность последовательностей соответствующим образом (см. Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Бетесда, Мэриленд, 1987 и 1991). Эта схема нумерации описана в WO 05/061540 (можно также сослаться на Chothia и Lesk, J. Mol. Biol, 196, 901 (1987) и на Chothia et al., Nature, 342, 878 (1989)).

Менее предпочтительно можно ввести один или более гэпов (например, для вставки/длекции одной или более аминокислот), а затем можно назначить штрафы за гэп.

Идентичность последовательностей можно определить, применяя программное обеспечение для анализа последовательностей, например, BLASTN или BLASTP (доступны по адресу

www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Параметры по умолчанию для сравнения двух последовательностей (например, сравнения с помощью "Blast" двух последовательностей друг с другом) в BLASTN (для последовательностей нуклеотидов) включают: награду за совпадение = 1, штраф за несовпадение = 2, за открытие гэпа = 5, за продление гэпа = 2. Если использовать BLASTP для белковых последовательностей, параметры по умолчанию включают: награду за совпадение = 0, штраф за несовпадение = 0, за открытие гэпа = 11 и за продление гэпа = 11.

Более предпочтительно присутствует множество каркасных областей, и эти участки выбраны из не-подчеркнутых последовательностей, показанных на фиг. 1а и 1б, или из их вариантов, которые имеют по меньшей мере 75% идентичности последовательностей аминокислот (например, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95 или по меньшей мере 98% идентичности последовательностей).

Каждая цепь, показанная на фиг. 1а и 1б, имеет четыре каркасные области. Таким образом, предпочтительно, чтобы присутствовало по меньшей мере два, по меньшей мере три или четыре таких участка/их варианта.

Наиболее предпочтительно, чтобы присутствовало четыре каркасные области или их варианта.

Если присутствует один или более вариант каркасных областей, как правило, предпочтительно, чтобы данные участки не содержали замен аминокислот, которые приводят к замене на аминокислоту, которая присутствует в соответствующем положении в последовательности мыши.

Соответствующие аминокислоты мыши, которые можно применять, для сравнения, представлены в mVHEP и mVLEP на фиг. 1а и 1б соответственно, за исключением того, что в целях данного обсуждения считают, что несколько выделенных курсивом аминокислот, показанных в mVHEP и mVLEP, не принадлежат мыши. Остатки аминокислот в этих положениях, которые должны присутствовать в последовательностях мыши, представлены в таблице ниже, в порядке, в котором выделенные курсивом остатки присутствуют на фигурах.

Положение	Выделенный курсивом остаток, показанный на Фигуре	Соответствующий остаток мыши
Тяжелая цепь	M	V
Тяжелая цепь	Q	G
Легкая цепь	D	Q
Легкая цепь	S	T

Таким образом, процент гуманизации одной или более каркасных областей можно уменьшить с помощью замен аминокислот, которые необязательно повышают процент присутствующих остатков мыши.

Это можно осуществить с помощью консервативных замен на не принадлежащие мыши аминокислоты и/или с помощью неконсервативных замен на не принадлежащие мыши аминокислоты.

Тем не менее, консервативные замены являются наиболее предпочтительными. Аминокислоты можно сгруппировать, как описано далее.

Группа I (гидрофобные боковые цепи): M, A, V, L, I.

Группа II (нейтральные гидрофильные боковые цепи): C, S, T, N, Q.

Группа III (кислотные боковые цепи): D, E.

Группа IV (основные боковые цепи): K, R.

Группа V (остатки, которые влияют на ориентацию основной цепи): G, P.

Группа VI (ароматические боковые цепи): F, Y, W.

Консервативные замены аминокислот включают замены аминокислот в рамках одной группы, тогда как неконсервативные замены аминокислот включают замены на аминокислоты из различных групп.

Какие бы последовательности ни присутствовали в различных участках легкой и/или тяжелой цепей, предпочтительно, чтобы антитело или производное антитела согласно настоящему изобретению имело определенные функциональные свойства.

В дополнение к связыванию с TrkA, предпочтительно, чтобы антитело или производное антитела согласно настоящему изобретению было способным блокировать или уменьшать связывание NGF с TrkA.

Предпочтительно оно должно быть способным блокировать или уменьшать одну или более биологическую активность, которые в противном случае будут индуцированы связыванием NGF с рецептором TrkA.

Таким образом, предпочтительно, чтобы антитело представляло собой антагонист одной или более активностей, индуцированных связыванием NGF с TrkA (но не агонист). Таким образом, антитела и их производные согласно настоящему изобретению подходящим образом предотвращают функциональную активацию TrkA. Ингибирование функциональной активации TrkA антителами согласно настоящему изобретению и их производными может привести к обезболиванию *in vivo*.

Можно использовать различные процедуры тестов.

Стандартный тест представляет собой классический анализ PC 12 *in vitro*, в котором клетки PC 12 инкубируют с NGF и исследуемые агенты оценивают в отношении эффективности уменьшения степени роста нейритов, индуцированного NGF. Эту модель использовали, например, в WO 00/73344.

В другом тесте предпочтительные антитела дают значение OD на 450/630 нм, большее чем 0,1, в анализе на связывание TrkA-IgG, проиллюстрированном на фиг. 2. Более предпочтительно значение OD на 450/630 нм больше чем 0,2. Наиболее предпочтительно указанное значение больше чем 0,3.

В дополнительном способе анализа предпочтительные антитела или их производные обеспечивают увеличение FACS окрашивания клеток TF-1 в тесте, основанном на способе сортировки клеток с возбуждением флуоресценции - FACS, описанном в примерах (см. табл. 2). Это увеличение предпочтительно составляет более 1,0 раза. Более предпочтительно указанное увеличение составляет по меньшей мере 1,5 раза, по меньшей мере 2,0 раза или по меньшей мере 2,5 раза. Наиболее предпочтительно указанное увеличение составляет по меньшей мере 3,0 раза.

Дополнительные способы анализа включают тест на уменьшение боли, описанный ниже в связи с применением настоящего изобретения в медицине (особенно желательно для применений в медицине, чтобы антитела/их производные действовали как антагонисты, а не агонисты, в отношении ответа на боль).

Предпочтительные антитела/производные согласно настоящему изобретению являются селективными в том смысле, что они связываются с большей аффинностью с TrkA, чем с TrkB (например, если сравнить черные и белые колонки на фиг. 2).

Например, антитела/производные предпочтительно имеют аффинность связывания, которая по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере 4 раза или по меньшей мере 6 раз выше для TrkA, чем для TrkB.

Высокая аффинность связывания с TrkA, по сравнению с TrkB, приводит к большей селективности и сниженному риску нежелательных побочных эффектов.

Аффинности связывания можно легко проанализировать с помощью сравнительных исследований связывания, таких как показанные на фиг. 2.

Наиболее предпочтительные антитела согласно настоящему изобретению включают одну из следующих комбинаций легкой и тяжелой цепей: BXhVH3VL3, BXhVH5VL1 или BXhVH5VL3.

Такие антитела позволили получить наилучшие результаты в тесте, показанном на фиг. 3.

Предпочтительные производные представляют собой производные BXhVH3VL3, BXhVH5VL1 или BXhVH5VL3.

Из предшествующего обсуждения должно быть очевидно, что в объем настоящего изобретения входит широкий диапазон антител и их производных.

Указанные антитела и производные имеют множество применений, включая обсуждаемые ниже.

Применения в медицине.

Антитела или производные антител согласно настоящему изобретению можно применять в медицине.

Их можно применять для лечения различных расстройств/состояний, соответствующих различным категориям, описанным ниже.

Настоящее изобретение, таким образом, обеспечивает способ лечения описанных ниже состояний, который включает введение нуждающемуся в этом субъекту, предпочтительно субъекту, который представляет собой млекопитающее, в частности пациенту - человеку, терапевтически эффективного количества антитела или производного антитела, описанных в данном документе, таким образом, что осуществляется лечение указанного состояния.

Настоящее изобретение также обеспечивает применение антитела или производного антитела, описанных в данном документе, для получения лекарственного средства для лечения описанных ниже состояний.

Настоящее изобретение также обеспечивает набор, включающий антитело или производное, описанные в данном документе, а также инструкции, описывающие их применение субъектом для лечения описанных ниже состояний.

В данном описании термин "лечение" включает терапевтическое лечение существующего расстройства/состояния. Он также включает профилактическое лечение. Данный термин дополнительно включает облегчение одного или более нежелательных симптомов, даже если пациент окончательно не излечивается от расстройства/состояния. Например, боль можно облегчить или ослабить.

Боль.

Предпочтительным применением в медицине является лечение боли.

Согласно Международной ассоциации по лечению боли ("IASP") боль в общем определяют как "неприятное сенсорное и эмоциональное восприятие, связанное с фактическим или потенциальным повреждением ткани, или описываемое с точки зрения такого повреждения, или и то и другое". Существенным элементом при всех формах боли является активация специальных обладающих высоким порогом рецепторов и нервных волокон для предупреждения организма о потенциальном повреждении ткани. Вовлечение воспалительных клеток и процессов является обычным явлением во многих болевых состоя-

ниях. Термин "острая боль" означает незамедлительную, как правило, высокопороговую, боль, вызванную повреждением, таким как порез, раздробление, ожог или химическое раздражение. Термин "хроническая боль" в данном документе означает боль, отличную от острой боли как воспалительного, так и невропатического происхождения. Должно быть очевидно, что хроническая боль часто имеет относительно продолжительный характер, например может длиться месяцы или годы, и может быть непрерывной или периодической.

Антитела согласно настоящему изобретению можно применять для лечения хронической боли или острой боли.

Лечение хронической боли является предпочтительным.

Применение антител против TrkA для лечения боли обсуждается, например, в WO 00/73344, WO 05/061540 и WO 06/131952.

Боль может быть связана, например, с любым из следующих состояний: панкреатит, камни в почках, эндометриоз, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, послеоперационные спайки, камни в желчном пузыре, головные боли, дисменорея, скелетно-мышечная боль, растяжения, висцеральная боль, кисты яичника, простатит, цистит, интерстициальный цистит, послеоперационная боль, мигрень, невралгия тройничного нерва, боль от ожогов и/или ран, боль, связанная с травмой, невропатическая боль, боль, связанная со скелетно-мышечными заболеваниями, ревматоидный артрит, остеоартрит, анкилозирующий спондилит, околосуставные патологии, онкологическая боль, боль от метастазов в кости, ВИЧ-инфекция.

Для оценки боли известны различные модели, которые можно применять для скрининга антител/их производных.

Например, можно использовать тест на ноцицепцию с нагревательной пластиной, как описано, в частности, в WO 00/73344. Эксперимент можно осуществить согласно McMahon et al., *Nature Medicine*, 1, 774-780 (1995), применяя антитело/производное согласно настоящему изобретению в качестве иммuno-адгезина. Осуществляют инфузию антитело/производного подкожно в заднюю лапу взрослой крысы в течение трех недель или с помощью осмотической минипомпы. Ноцицептивную чувствительность оценивают через определенные промежутки времени, применяя тест с нагревательной пластиной (Eddy и Leimbach, *J. Phar. Exp. Ther.*, 107, 385-393(1953)), который имитирует случай гипералгезии после воспаления или частичного повреждения нерва. Ноцицептивный стимул индуцирует в таком случае ответ (лизание лапы и/или прыганье), что предполагает более согласованную координацию, чем просто рефлекс. В этом тесте животное помещают на площадку с пластиной в основании, которую нагревают до желательной температуры, обычно до 56°C. Задержку любого из двух ответов (лизание лапы и прыганье) измеряли у контрольных животных, которым вводили неродственное антитело, и у животных, которым вводили антитело против TrkA или его производное.

В качестве альтернативы тесту с нагревательной пластиной можно оценить ноцицептивный ответ на формалин. Этот тест описан у Porro и Cavazzuti in *Prog. Neurobiol.*, 41:565-607 (1993), и его использовали в WO 06/137106. Он включает оценку уменьшения ответа на боль путем анализа уменьшения лизания лапы в результате введения перед тестовым воздействием соединения кандидата. Солевой раствор обычно используют в качестве отрицательного контроля.

Модель хронической компрессии (CCI) также представляет собой хорошо известную модель исследований на животных. Она включает хроническую компрессию седалищного нерва, и ее используют для оценки хронической боли невропатической природы. Эта модель описана у Bennett и Xie в *Pain*, 33, 87-107 (1988). Ее применяли, например, в WO 06/131592.

Рак.

Антитела и производные антител согласно настоящему изобретению также можно применять для лечения рака.

TrkA экспрессируется при различных типах рака. Взаимодействие TrkA с NGF может быть вовлечено в развитие опухоли (например, раков предстательной железы и поджелудочной железы). Действительно, при некоторых формах рака избыток NGF может способствовать росту и инфильтрации нервных волокон. Путем блокирования действия NGF можно значительно уменьшить образование невром.

Более того, в качестве альтернативы простому обеспечению блокирующего эффекта, антитела/производные согласно настоящему изобретению можно соединить с цитотоксическим агентом и можно применять для нацеливания на раковые клетки, экспрессирующие TrkA, что более подробно обсуждается ниже.

Тем не менее, нет необходимости соединять антитела/производные согласно настоящему изобретению с токсинами. ADCC (антителозависимая опосредованная клетками цитотоксичность) возникает вследствие иммунного ответа, при котором антитела/производные, покрывая целевые клетки, могут сделать их восприимчивыми к атаке иммунной системой (например, Т-клетками, путем активации комплемента и т.д.).

Нервные расстройства.

Указанные антитела/производные также можно применять для лечения различных нервных расстройств.

Как указано выше, антитела/производные согласно настоящему изобретению можно применять для снижения образования невром.

Их также можно применять для лечения нейродегенеративных расстройств. Ранее обсуждалось, что NGF имеет потенциальное применение для лечения болезни Альцгеймера, но он проявляет нежелательные агонистические свойства, включая увеличение болевой чувствительности. Антитела/производные согласно настоящему изобретению могут быть полезны при таком лечении, чтобы уменьшить нежелательные агонистические эффекты NGF (см. также раздел "Комбинированная терапия").

Более того, антитела/производные согласно настоящему изобретению можно применять для лечения невропатической боли, что обсуждалось выше. Это может быть связано с повреждением или дисфункцией нервной системы.

Воспалительные расстройства.

Еще один вариант применения представляет собой лечение воспалительных расстройств.

NGF высвобождается тучными клетками, фибробластами и другими типами клеток в периферических участках, в которых происходят воспалительные процессы. В частности, тучные клетки, по всей видимости, играют основную роль. Они продуцируют NGF и в то же время экспрессируют функциональные рецепторы TrkA на своей поверхности. Система NGF/TrkA, по всей видимости, опосредует активацию тучных клеток через автокринный механизм положительной обратной связи, который обеспечивает местное усиление альгогенного воспалительного сигнала. Примеры воспалительных расстройств, от которых можно лечить, включают воспалительные формы заболеваний мочевыводящих путей и брюшной области, остеоартрит, ревматоидный артрит, астму.

Другие расстройства.

Ранее обсуждалось, что NGF можно потенциально применять для лечения диабета и лепры, но он проявляет нежелательные агонистические свойства, включая увеличение болевой чувствительности. Антитела/производные согласно настоящему изобретению могут быть полезны для такого лечения, чтобы уменьшить нежелательное агонистическое действие NGF (см. также раздел "Комбинированная терапия").

Комбинированная терапия.

Антитела или производные антител согласно настоящему изобретению можно применять совместно с одним или более другим активным агентом в комбинированной терапии. Их можно применять в медицине для одновременного, последовательного или совместного введения.

Например, антитело или производное можно комбинировать с аналгезирующим опиоидом. В WO 06/137106 указано, что небольшие количества молекул, способных блокировать биологическую активность TrkA, могут усиливать аналгезирующее действие опиоидов.

Такие опиоиды включают одно или более соединений, выбранных из группы, содержащей морфин, кодеин, дигидрокодеин, диацетилморфин, гидрокодон, гидроморфон, леворфанол, оксиморфон, альфентанил, бупренорфин, буторфанол, фентанил, суфентанил, меперидин, метадон, набулфина, пропоксифен, пентазоцин и фармацевтически приемлемые производные указанных соединений (например, фармацевтически приемлемые соли указанных соединений).

В качестве альтернативы антитело или производное антитела согласно настоящему изобретению можно применять в комбинированной терапии с одним или более неопиоидным анальгетиком.

Дополнительная комбинация представляет собой комбинацию антитела или производного антитела согласно настоящему изобретению с NGF. Как обсуждалось выше, было предложено применение NGF для лечения различных расстройств, включая болезнь Альцгеймера, сахарный диабет, лепру и т.д., но было отмечено увеличение болевой чувствительности, возникшее вследствие агонистических свойств к периферическим мишеням. Применяя антитело или производное антитела согласно настоящему изобретению, можно ослабить болевую чувствительность, что делает основанные на NGF способы лечения более привлекательными.

Дополнительная комбинация представляет собой комбинацию одного или более антитела или производного антитела согласно настоящему изобретению с одним или более другим антителом. Предпочтительная комбинация представляет собой комбинацию с одним или более другим антителом против TrkA или против NGF. Такие комбинации могут обеспечить повышенную эффективность при лечении одного или более расстройства, обсуждаемого в данном документе, по сравнению с лечением одним антителом. Например, можно применять комбинации двух или более антител, которые оказались наиболее эффективными в процедурах тестирования, используемых в данном документе.

Фармацевтические композиции, среды и пути введения.

Антитела/производные согласно настоящему изобретению можно вводить любым подходящим путем.

Такие пути включают (но не ограничены перечисленными) интраперитонеальное, внутримышечное, внутривенное, подкожное, внутритеракеальное, пероральное, энтеральное, парентеральное, интрана-

зальное или дермальное введение.

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, которая содержит антитело или производное антитела согласно настоящему изобретению, совместно с фармацевтически приемлемым носителем или вспомогательным веществом.

Антитела/производные для местного применения, как правило, можно вводить путем инъекции жидких лекарственных форм (интраперитонеальной или интракраниальной, обычно в желудочек головного мозга, или внутриперикардиальной, или внутрь синовиальной сумки) или путем приема внутрь твердых лекарственных форм (в форме пилюль, таблеток, капсул) или жидких лекарственных форм (в виде эмульсий и растворов).

Композиции для парентерального введения обычно включают раствор иммуноглобулина, растворенного в совместном, предпочтительно водном, растворе. Концентрация антитела/производного в данных лекарственных формах может варьировать от менее чем 0,005 до 15-20% в отношении веса к объему. Значение концентрации выбирают преимущественно в соответствии с объемами жидкости, вязкостью и т.д. и в соответствии с конкретным желательным способом введения.

В качестве альтернативы антитела/производные можно получить для введения в твердой форме. Антитела можно объединить с различными инертными или вспомогательными веществами, которые могут включать лиганды, такие как микрокристаллическая целлюлоза, желатин или гуммиарабик; реагенты, такие как лактоза или крахмал; агенты, такие как альгиновая кислота, примогель или кукурузный крахмал; лубриканты, такие как стеарат магния, коллоидный диоксид кремния; подсластители, такие как сахароза или сахарин; или ароматические добавки, такие как мята и метилсалцилат. Другие фармацевтические системы введения включают гидрогель, гидроксиметилцеллюлозу, липосомы, микрокапсулы, микроэмульсии, микросфера и т.д.

Местные инъекции непосредственно в место, пораженное расстройством, или рядом с этим местом, представляют собой предпочтительный способ введения, если расстройство является локализованным.

В противоположность противоопухолевым способам лечения, в WO 06/131952 обсуждают применение различных антител против TrkA для лечения боли.

В данном описании объясняется, что антитела против TrkA вводят системно подходящим образом. Системное введение можно осуществить путем инъекции, например непрерывной внутривенной инфузии, болюсной внутривенной инфузии, подкожной или внутримышечной инъекции. В качестве альтернативы также можно применять другие способы введения (например, пероральный, мукозальный, путем ингаляции, сублингвальный и т.д.).

Если это желательно, доставку антитела/производного можно осуществить путем местного введения (например, внутрисуставной инъекции или подкожной, внутримышечной инъекции) вблизи пораженных тканей.

Антитело против TrkA/производное можно подходящим образом вводить в состав фармацевтической композиции, подходящей для предполагаемого пути введения. Растворы для инъекции могут подходящим образом включать антитело/производное согласно настоящему изобретению, подходящим образом растворенное или диспергированное в водной среде (например, в воде для инъекции), включающей подходящие буферы и модификаторы молярности (например, фосфат, соль и/или дектозу).

Схема лечения (т.е. доза, расписание и повторение) может представлять собой однократное или многократное введение (например, повторные инъекции) продукта выбранным путем введения.

Промежуток времени между введением доз можно изменять в зависимости от степени и продолжительности клинического ответа, а также от конкретного индивидуума и истории болезни индивидуума.

Подходящей является большая продолжительность действия антитела против TrkA/производного согласно настоящему изобретению. В частности, клиническая эффективность антитела после введения может составлять до 21 дня, что определили при исследованиях на животных. Более того, антитела против TrkA/производные согласно настоящему изобретению могут обеспечивать клиническую пользу в течение более длительного периода, чем период, в который их присутствие можно детектировать в подходящей биологической среде, такой как сыворотка или плазма, после введения.

В свете предполагаемой большой продолжительности действия (т.е. действие подходящим образом длится по меньшей мере одну неделю или предпочтительно по меньшей мере две недели, например по меньшей мере три недели или по меньшей мере четыре недели) можно вводить антитело/производное подходящим образом субъектам с частотой не более чем раз в неделю, например не более чем раз в две недели, или раз в три недели, или раз в четыре недели. Подходящая ежедневная доза антитела против TrkA/производного согласно настоящему изобретению обычно составляет от 0,1 до 10 мг/кг массы тела.

При применении гуманизированных антител против TrkA и модели CCI в WO 06/131592 выявили, что важные болеутоляющие свойства достигались у экспериментальных животных при дозировке 2 мг/кг, хотя более низкие дозировки, несомненно, могут быть предпочтительны для людей.

Возвращаясь к введению для лечения опухолей, такое введение можно осуществлять путем непосредственной и локализованной инъекции в опухоль или ткань рядом с опухолью. Для системного введения дозы варьируют от 0,05 до 500 мг/кг в день, хотя дозировки на более низком участке диапазона являются предпочтительными, так как их легче вводить. Дозировки можно стандартизировать, например,

чтобы гарантировать конкретный уровень антитела/производного согласно настоящему изобретению в плазме (приблизительно 5-30 мг/мл, предпочтительно 10-15 мг/мл) и поддерживать этот уровень в течение необходимого периода времени до тех пор, пока не будут достигнуты клинические результаты.

Эффективные способы измерения или оценки стадии опухолей поджелудочной железы или предстательной железы основаны на измерении специфического антигена предстательной железы (PSA) в крови, на измерении времени выживания для опухолей поджелудочной железы, на измерении замедления или ингибирования проникновения метастаз в случае обоих типов опухоли.

Для непосредственной инъекции вблизи опухоли дозировка зависит от различных факторов, включая тип, стадию и объем опухоли, наряду со многими другими переменными параметрами.

В зависимости от объема опухоли можно варьировать обычные терапевтические дозы инъекций от 0,01 до 10 мг/мл, которые можно вводить с необходимой частотой.

При любой природе терапии гуманизированные антитела/производные могут выводиться гораздо медленнее и требовать более низких дозировок для сохранения эффективного уровня в плазме, чем негуманизированные антитела. Более того, при высокой аффинности антител/производных введение можно осуществлять с меньшей частотой и в меньшем количестве, чем для антител, обладающих низкой аффинностью.

Квалифицированный врач может определить терапевтически эффективную дозировку каждого антитела/производного во время лечения. При необходимости, дозировки можно уменьшить (например, для уменьшения побочных действий) или увеличить (для увеличения активности).

Перед введением препараты антител/производных согласно настоящему изобретению можно хранить замороженными или лиофилизованными. Их влагосодержание затем можно восстановить подходящим буфером непосредственно перед применением. В связи с тем что лиофилизация и восстановление влагосодержания могут приводить к потере активности, уровни вводимого антитела можно откалибровать, чтобы компенсировать это. Для обычных иммуноглобулинов антитела IgM имеют тенденцию к большей потере активности, чем антитела IgG. Также можно определить срок хранения, чтобы антитела/производные не использовались после некоторого периода хранения.

Диагностические и прогностические применения.

Антитело или производное антитела согласно настоящему изобретению можно применять для постановки диагноза или предсказания дальнейшего течения любых заболеваний/состояний, которые обсуждались выше в отношении медицинского применения.

Например, его можно применять для облегчения детектирования маркеров TrkA-положительных опухолей, в качестве раннего маркера начала болезни Альцгеймера и т.д.

Его также можно применять для диагностики CIPA ("врожденное отсутствие чувствительности к боли с ангиорозом"). Это наследственный, рецессивный, аутосомный синдром, описываемый периодическими эпизодами лихорадочного состояния, ангиорозом, отсутствием реакции на ноцицептивные стимулы, умственной отсталостью и склонностью к нанесению себе увечий. Он возникает в результате мутаций в гене TrkA.

Антитело или производное согласно настоящему изобретению можно применять для диагностики или прогнозирования широкого диапазона состояний, включая аберрантную экспрессию TrkA (по сравнению с экспрессией TrkA у здорового индивида или в образце здоровой ткани).

Следовательно, в объем настоящего изобретения входит способ, включающий получение биологического образца от пациента и приведение во взаимодействие указанного образца с антителом или производным согласно настоящему изобретению.

При желании, антитело/производное может быть иммобилизовано. Оно может быть обеспечено в форме диагностического набора.

Указанный способ может включать последующий анализ связывания антитела/производного согласно настоящему изобретению с указанным образцом количественным или качественным способом. При желании, это можно осуществить по сравнению с положительным контролем (указывает на здоровое состояние) и/или отрицательным контролем (указывает на наличие/вероятность расстройства).

Для диагностических целей антитела/производные согласно настоящему изобретению могут быть как помечены детектируемым маркером, так и быть немеченными. Термин "маркер" в данном документе включает метки или любую другую детектируемую молекулу/молекулу, которая может вызвать детектируемое изменение.

Немеченные антитела можно применять в комбинации с другими меченными антителами (вторичными антителами), которые направлены против гуманизированного антитела или антитела человека (например, специфичные антитела к константным областям иммуноглобулинов человека).

В качестве альтернативы антитела можно пометить непосредственно. Можно применять большое разнообразие маркеров, например радионуклиды, флуорофоры, красители, ферменты, ферментативные субстраты, ферментативные факторы, ферментативные ингибиторы, лиганды и т.д.

В частности, для диагностической или прогностической визуализации детектируемый агент коньюгируют с антителом, которое является детектируемым или помечено детектируемым радиоактивным изотопом (например, радиоактивным изотопом, таким как изотоп йода, индия, технеция) или парамаг-

нитным способом (парамагнитными атомами или ионами, такими как переходные элементы, актиноиды и редкоземельные элементы, в частности марганец II, медь II и кобальт II).

Процедуры визуализации могут включать внутривенную, интраперитонеальную или подкожную инъекцию (в участки выделения лимфы, чтобы определить метастазы в лимфатические узлы) и для них можно использовать детекторы излучения радионуклидов (такие как счетчики β -сцинтиляций) в случае иммunoцинтиграфии.

Если вместо этого используют парамагнитное мечение, можно применять ЯМР-спектрометр.

Другие применения.

Антитела/их производные согласно настоящему изобретению можно применять в качестве исходного материала для разработки дополнительных антител. Таким образом, их можно применять как средства разработки.

Можно осуществить их скрининг с помощью одного или более тестов на связывание/функциональных тестов, и, следовательно, они могут стать частью программы разработки лекарственного средства. Их можно применять для определения типа ткани, для криминалистических исследований и т.д., а также как инструменты исследования.

Например, их можно применять для дополнительного исследования TrkA и/или расстройств, в которые может быть вовлечено связывание TrkA с NGF (или с другими связывающими TrkA агентами), а также для исследования связывания и/или активации.

Все описанные выше применения антител/производных входят в объем настоящего изобретения.

Природа антител и производных антител.

Из предшествующего описания должно быть очевидно, что в соответствии с настоящим изобретением можно применять широкий диапазон антител и их производных.

Во избежание сомнений термины "антитела" и "производные антител" обсуждаются более подробно ниже.

Антитела.

Антитела согласно настоящему изобретению могут иметь любую желательную структуру иммуноглобулина.

IgG и IgM, тем не менее, являются предпочтительными, при этом IgG является наиболее предпочтительным. Из изоформ IgG предпочтительной является IgG₁, но можно применять другие формы, включая IgG₄.

Антитела являются химерными, т.е. они включают один или более участок, которые обычно не связаны друг с другом в природе. В частности, в антителах присутствует один или более гипервариабельный участок, полученный из мыши, а другие участки (особенно константные области) предпочтительно получены из человека или гуманизированы.

Гуманизированные участки имеют больше остатков аминокислот, подобных остаткам данного участка иммуноглобулина человека, чем соответствующего участка иммуноглобулина мыши. Предпочтительно они имеют по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95 или по меньшей мере 98% идентичности с участком человека на уровне последовательностей аминокислот. Более предпочтительно они имеют 100% идентичности последовательностей на протяжении одного или более негипервариабельных участков (например, константных областей).

В некоторых случаях, тем не менее, может оказаться полезным введение некоторых изменений. Например, может оказаться желательным введение изменений, которые предотвращают/уменьшают одно или более из следующего:

- a) активация системы комплемента;
- b) опосредованный комплементом лизис;
- c) активация Т-клеток;
- d) связывание с Fc-рецептором.

Мутации, которые позволяют достижение одного или более указанных свойств, обсуждаются в различных патентах. Одну или более из указанных мутаций, следовательно, можно включить в антитела/производные согласно настоящему изобретению.

Например, в патенте США № 6194551 предложены замены аминокислот в положениях 322, 329 и/или 331 (используя систему нумерации по Kabat) константной области тяжелой цепи молекулы IgG и указано, что их можно применять для предотвращения/уменьшения нежелательной активации системы комплемента путем нарушения связывания Fc с Clq (см. также Ward и Ghetie, Therapeutic Immunology, 2: 77-94 (1995)). В патенте США № 6194551 объясняют, что пролин консервативен в положении 329 в IgG человека. Этот остаток (который гликозилирован и, следовательно, может быть вовлечен в активацию системы комплемента) предпочтительно замещают на аланин. Тем не менее, также предполагают замену на любую другую аминокислоту, например серин, треонин, аспарагин, глицин или валин. В патенте США № 6194551 обсуждается, что пролин также консервативен в положении 331 в IgG₁, IgG₂ и IgG₃, но не в IgG₄ человека (который в положении 331 имеет остаток серина). Остаток 331 предпочтительно замещают на аланин или другую аминокислоту, например серин (для участков IgG, отличных от IgG₄), глицин или валин. Обсуждалась дополнительная возможность введения замены в положение 322. Лизин

322 консервативен в IgG человека, и считают, что этот остаток предпочтительно должен быть замещен на остаток аланина, хотя также предполагают замену на любой другой остаток аминокислоты (например, серин, треонин, глицин или валин).

В патенте США № 6491916 описано, что мутации в участке гуманизированного антитела, включающем положения с приблизительно 230 по приблизительно 240, могут обеспечить определенные преимущества. В этом патенте указано, что сравнение антител, которые связываются с Fc, с антителами, которые не связываются с Fc, позволило предположить, что изменения на этом участке приводят к получению антител против CD3, которые не активируют Т-клетки. Например, некоторые из предпочтительных антител включают мутации в положении 234, в положении 235 или в обоих положениях. Ожидают, что антитела против CD3, включающие одну, две, три, четыре, пять или более мутаций в одном или более положениях 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 или 240, будут иметь преимущества. В этом патенте также описано, что антитело, которое включает Fc-область IgG₁ и мутированное с введением аланина в обоих положениях 234 и 235, не связывается с компонентом Clq системы комплемента и не запускает опосредованный комплементом каскад. Дополнительно, в этом патенте объясняют, что мутация Lys 320 на Gln приводит к аффинности к Clq лишь немного более слабой, чем у дикого типа, но не лизитической.

В патенте США № 5624821 описано, что путем изменения любого одного остатка 318 (Glu), 320 (Lys) и 322 (Lys) на Ala можно нарушить связывание Clq. Это указывает на то, что для нарушения связывания Clq необязательно заменять ионные остатки именно на Ala, а можно также использовать вместо любого одного из трех остатков другие алкилзамещенные неионные остатки, такие как Gly, Ile, Leu или Val, или такие ароматические неполярные остатки, как Phe, Тир, Трп и Pro, чтобы нарушить связывание Clq. Также можно использовать такие полярные неионные остатки, как Ser, Thr, Cys и Met, вместо остатков 320 и 322, но не вместо 318, чтобы нарушить активность связывания с Clq. В патенте США № 5624821 дополнительно описано, что замена остатка 297 (Asn) на Ala приводит к устраниению лизитической активности при лишь небольшом снижении (ослаблении приблизительно в три раза) аффинности к Clq. Предполагают, что это происходит, потому что указанная замена устраниет сайт гликозилирования, а присутствие углевода необходимо для активации комплемента. Это указывает на то, что любая другая замена в этом сайте также уничтожит сайт гликозилирования. В патенте США № 5624821 также описано, что мутации в этом сайте, в смежных или близких сайтах в шарнирном участке (например, замена остатков 234, 236 или 237 на Ala), т.е. изменения остатков 234, 235, 236 и 237, по меньшей мере, влияют на аффинность к рецептору Fc-гамма-R1.

Конечно, можно осуществить одну или более замену аминокислоты (обычно консервативную замену аминокислоты), которые, по существу, не влияют на биологические свойства. Возможные мутации, следовательно, не ограничены обсуждаемыми выше.

Антитела любой природы можно обеспечить в моноклональной форме (т.е. вместе с идентичными антителами) или поликлональной форме (т.е. вместе с различными антителами). Гибридомы, способные продуцировать моноклональные антитела согласно настоящему изобретению, также входят в объем настоящего изобретения.

Производные антител.

Термин "производные антител" предполагает широкий диапазон структурных изменений, которые можно произвести с антителом, с условием, что при этом сохраняются его желательные функциональные свойства.

Таким образом, например, желательно сохранить аффинность связывания с TrkA. Предпочтительно производные также эффективны при одном или более функциональном анализе, описанном в данном документе.

Во избежание неоднозначности толкования стоит отметить, что все следующие молекулы считают производными антитела согласно настоящему изобретению:

- а) фрагмент указанного антитела;
- б) мультимер, включающий множество фрагментов указанного антитела (названный в данном документе "мультимер фрагментов");
- с) продукт слияния указанного антитела, фрагмента или мультимера фрагментов и другой молекулы;
- д) вариант указанного антитела, фрагмента, мультимера фрагментов или продукта слияния, имеющий с ними по меньшей мере 75% идентичности последовательности.

Таким образом, термин "производное" интерпретируется в широком смысле.

Возвращаясь к фрагментам антител согласно настоящему изобретению, они предпочтительно имеют длину по меньшей мере семь аминокислот (таким образом, они по меньшей мере имеют длину самого короткого гипервариабельного участка, показанного на фиг. 1а и 1б для тяжелой и легкой цепей, согласно настоящему изобретению). Более предпочтительно они имеют длину по меньшей мере 10, по меньшей мере 15 или по меньшей мере 20 аминокислот.

Их можно получить посредством протеолитического расщепления интактных антител или путем вставки стоп-кодонов в желательные положения в векторах, несущих последовательности ДНК, которые

кодируют вариабельные области тяжелой и легкой цепи. Это можно осуществить после участка СН₁ для получения фрагментов Fab или после шарнирного участка для получения фрагментов (Fab')₂.

Производные в форме цепей ScFv можно получить путем соединения вариабельных областей тяжелой и легкой цепей посредством линкера (Huston et al., PNAS, 85, 5879 (1988); Bird et al., Science, 242, 423 (1988)). Fv или Fab фрагменты можно экспрессировать в E.coli (Buchner и Rudolph, Bio/Technology, 9, 157 (1991); Skerra et al., Bio/Technology, 9, 273 (1991)), а также в эукариотических клетках, предпочтительно полученных от млекопитающего.

Возможен широкий диапазон форм фрагментов, включая обсуждаемые у Holliger и Hudson в Nature Biotechnology, vol. 23, No. 9, 1126-1136 (2005).

Все они входят в объем настоящего изобретения и могут включать фрагменты, состоящие из отдельных VH или VL цепей (иногда называемые "доменные антитела" или "dAb"), или даже фрагменты указанных цепей (например, отдельные гипервариабельные участки). Также входят в объем настоящего изобретения мультимерные формы, такие как миниантитела, бис- (или выше) -ScFv, ди-, три- и тетравалентные антитела (diabodies, triabodies, tetrabodies), Fab-мультимеры и т.д. (называемые в данном документе "мультимерами фрагментов").

Более того, с антителами/фрагментами согласно настоящему изобретению могут быть ковалентно связаны различные другие группы, чтобы обеспечить полезные свойства. Такие "продукты слияния" входят в объем термина "производные" согласно настоящему изобретению. Указанная группа, например, может представлять собой диагностический агент, терапевтический агент, метящий агент, агент, который увеличивает время полужизни продукта, или агент, который уменьшает иммуногенность (предпочтительно у человека).

Например, могут быть обеспечены продукты слияния в форме пегилированных антител/фрагментов. Полиэтиленгликоль (PEG) преимущественно применяют для уменьшения иммуногенности и увеличения времени полужизни антител в кровотоке. Он также может оказывать полезное влияние на применение антител в некоторых клинических целях, таких как нацеливание на опухоль.

Части продукта слияния могут быть связаны друг с другом химически. Например, это можно осуществить путем перекрестной сшивки, применяя гетеробифункциональные агенты (например, SPDP, карбодиимид, глутаральдегид и т.д.).

В случае рекомбинантных (слитых) белков их предпочтительно получают, применяя методики генной инженерии. Таким образом, можно обеспечить подходящие кодирующие последовательности, основанные на генетическом коде, кодирующие желательный рекомбинантный белок, а затем их можно клонировать в клетку-хозяин с применением подходящего вектора экспрессии. Экспрессию можно осуществлять под контролем конститутивного или индуцируемого промотора. Экспрессированный рекомбинантный белок можно очистить, применяя стандартные методики (например, с помощью иммуноаффинных процедур). Можно применять основанные на клетках или бесклеточные системы экспрессии.

Рекомбинантные белки могут, например, включать антитела/фрагменты согласно настоящему изобретению, сливые с цитотоксинами. Полученные рекомбинантные белки затем можно применять для нацеливания на клетки, которые экспрессируют рецепторы TrkA, например опухолевые клетки, экспрессирующие TrkA.

Получение различных цитотоксических иммунотоксина описано у Thorpe et al., Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Academic Press, 168 (1982). Действительно, множество цитотоксических агентов подходит для применения в иммунотоксинах. Такие агенты включают радионуклиды, такие как йод 131 или другие изотопы йода, иттрий 90, рений 188 и висмут 212 или другие изотопы, которые испускают альфа частицы, множество химиотерапевтических лекарственных средств, таких как виндезин, метотрексат, адриамицин и цисплатин; цитотоксические белки, такие как белки, которые ингибируют рибосомы (например, противовирусный белок лаконоса, экзотоксин A из Pseudomonas, дифтерийный токсин, рицин A и клавин растительного происхождения), или агенты, активные на уровне поверхности клетки (например, фосфолипазные ферменты, такие как фосфолипаза C).

Иногда цитотоксический участок иммунотоксина может быть иммуногенным и, следовательно, ограничивать клиническую пользу рекомбинантного белка в случае хронической или длительной терапии.

Альтернативным подходом, чтобы избежать проблемы иммуногенности, служит экспрессирование рекомбинантного белка, который включает связывающий домен антитела/производного и белок, способный взаимодействовать с ДНК, и связывание с таким рекомбинантным белком вектора (например, плазмиды), который включает кассету экспрессии токсина. Сильный положительный заряд протамина, белка человека, который связывает ДНК, может стабильно взаимодействовать с отрицательным зарядом ДНК, позволяя получить партнера для слияния для антитела/производного с нейтральным зарядом. Эта структура гораздо более стабильна и менее иммуногена, чем сам токсин. После интернализации комплекса антитело-вектор путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, экспрессия токсина вызывает гибель клетки.

Более того, при желании, в кассете экспрессии токсина можно обеспечить индуцируемые или специфичные для клетки промоторы. Этот подход нацелен на осуществление максимального избирательного элиминирования опухолевых клеток, при этом с минимальным токсичным побочным действием (Chen

et al., *Gene Ther.*, 2, 116 (1995)). Рекомбинантные белки также могут включать рекомбинантные белки с другими антителами/производными. Например, слитый белок, включающий dAb против определенных антигенов с другими dAb, способными связывать долгоживущие сывороточные белки (например, сывороточный альбумин), применяют для увеличения времени полужизни в сыворотке крови.

Последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи согласно настоящему изобретению могут образовывать часть поливалентных антител, имеющих специфичность к одному или более антигенам, один из которых представляет собой TrkA, или один или более эпитопов в составе TrkA. Поливалентные антитела со специфичностью к одному или более антигенам, один из которых представляет собой TrkA.

Системы экспрессии.

Можно применять множество систем экспрессии, чтобы обеспечить антитела/производные согласно настоящему изобретению.

Например, можно применять прокариотические системы, которые хорошо описаны.

E.coli представляет собой одну из прокариотических систем, которые особенно полезны для клонирования последовательностей ДНК согласно настоящему изобретению. Более того, доступно множество хорошо описанных промоторов, например из оперона *lac* или *ttr* или β -лактамазы или фага λ . Обычно данные промоторы контролируют экспрессию и несут сайт связывания с рибосомой для правильного начала и окончания транскрипции и трансляции. Можно увеличить время полужизни гуманизированных иммуноглобулинов согласно настоящему изобретению, полученных в прокариотических системах, путем коньюгирования с полиэтиленгликолем (PEG).

Можно использовать для экспрессии и другие одноклеточные организмы, такие как дрожжи. Предпочтительно выбирают дрожжи *Saccharomyces*, снабжают их, применяя подходящие носители, последовательностями для контроля экспрессии, терминации и начала репликации.

Библиотеки в формате фагового дисплея, содержащие последовательности вариабельных областей иммуноглобулинов, были хорошо описаны, и их можно применять в тестах на связывание [Cesareni, FEBS Letts, 307, 66 (1992); Swimmer et al. PNAS, 89, 3756 (1992); Gram et al. PNAS, 89, 3576 (1992); Clackson et al. Nature, 352, 624 (1991); Scott & Smith, Science, 249, 386 (1990); Garrard et al. Bio/Techniques, 9, 1373 (1991)].

Также можно использовать культуры клеток насекомых: обычно применяют стабильно трансформированные клетки S2 *Drosophila* или клетки *Spodoptera frugiperda* с системой экспрессии, основанной на бакуловирусах (Putlitz et al. Bio/Technology, 8, 651 (1990)).

Можно даже использовать растения и культуры растительных клеток (Lerrick & Fry, *Hum. Antibodies Hybridomas*, 2, 172 (1991); Benvenuto et al. *Plant Mol. Biol.*, 17 865 (1991); Durin et al. *Plant Mol. Biol.*; 15, 281 (1990); Hiatt et al. *Nature*, 342, 76 (1989)).

Также можно использовать культуры клеток млекопитающих, чтобы экспрессировать полипептиды согласно настоящему изобретению. Это может быть предпочтительным для получения вариантов гликозилирования, характерных для человека. Можно экспрессировать различные изотипы. IgG₁ оказался наиболее эффективным изотопом для индукции иммунного ответа (Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, Нью-Йорк, (1987)) тогда как IgG₄ часто используют в целях диагностики (Riechmann et al., *Nature*, 332, 323 (1988)).

Также могут быть предусмотрены мутированные формы, которые нарушают/уменьшают активацию комплемента, что обсуждалось ранее относительно патента США № 6194551, патента США № 5624821 и/или патента США № 6491916.

В частности, предпочтительными являются клетки млекопитающих. Множество линий клеток-хозяев было разработано для секреции интактных иммуноглобулинов, в том числе линии клеток СНО, несколько линий клеток COS, клетки HeLa, линии клеток миеломы (NSO, SP/2, YB/0 e P3X63.Ag8.653), трансформированные β -клетки или гибридомы. Векторы экспрессии для данных клеток могут включать последовательности для контроля экспрессии, такие как точку начала репликации, промотор, энхансер (Queen et al., PNAS, 86:10029 (1989)), и последовательности, необходимые для связывания рибосомы, сплайсинга и полиаденилирования РНК, и последовательности для терминации транскрипции. В качестве последовательностей для контроля экспрессии выбирают промоторы, полученные из генов иммуноглобулинов и из вирусов, таких как SV40, адено-вирус, вирус папилломы крупного рогатого скота, цитомегаловирус и т.п. Как правило, вектор экспрессии включает селектируемый маркер, такой как ген устойчивости к неомицину.

Для экспрессии гуманизированных антител предпочтительно культивируют линии клеток млекопитающего в среде без сыворотки. Например, линию клеток HUDREG-55 можно легко выращивать в среде для гибридом, не содержащей сыворотки и белков, номер в каталоге S-2897 у Sigma (Сент-Луис, Миссури).

Нуклеиновые кислоты, векторы, трансгенные животные.

Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие антитела/производные/цепи антитела, согласно настоящему изобретению можно получить с помощью стандартных методик, с учетом того, что последовательности аминокислот для ключевых вариабельных областей приведены в данном документе и что соответствующие кодирующие последовательности можно получить, используя генетический код. Данные последовательности можно включить в векторы экспрессии и/или клонировать в клетки.

Действительно, методики получения и клонирования "видоизмененных антител" с гипервариабельными участками грызунов и гуманизированными каркасными областями сегодня хорошо известны. Они обсуждаются, например, у Jones, Dear, Foote, Neuberger и Winter, Nature, 321, 522-4 (1986); Riechmann, Clark, Waldman и Winter, Nature, 332, 323-327 (1988) и Verhoeven, Milstein и Winter, Science, 239, 1534-1536 (1988).

Такие нуклеиновые кислоты можно встроить в векторы экспрессии, включая плазмиды, фаг и т.д., что хорошо известно в данной области и обсуждалось выше.

Нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению также можно применять для разработки зондов или праймеров. Их можно применять, например, для выделения или амплификации нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению.

Зонды или праймеры, следовательно, входят в объем настоящего изобретения. Обычно они имеют длину по меньшей мере 10, по меньшей мере 15 или по меньшей мере 20 оснований. Предпочтительно они гибридизируются при строгих условиях гибридизации с нитями нуклеиновой кислоты, которые кодируют антитела/производные согласно настоящему изобретению или с комплементарными им нитями. Один пример строгих условий гибридизации включает применение раствора для предварительной промывки 5× SSC, 0,5% ДСН, 1,0 мМ EDTA (pH 8,0) и проведение гибридизации в течение ночи при 55°C, применяя 5× SSC. Тем не менее, существует множество других возможностей. Некоторые из них перечислены в табл. 1 в WO 98/45435, например (см. особенно условия, описанные в A-F этой таблицы и менее предпочтительно перечисленные ниже в G-L или M-R).

В дополнительном аспекте настоящего изобретения нуклеиновые кислоты можно успешно применять для получения трансгенов, чтобы применять их для получения отличных от человека трансгенных животных, предпочтительно мышей. Для этого указанное антитело/производное можно экспрессировать индуцируемым образом или под контролем конститутивных промоторов.

Таких животных можно предпочтительно использовать для исследования и тестирования лекарственных средств для патологий человека, при которых ингибируется взаимодействие NGF/TrkA, и особенно нейродегенеративных патологий.

Антитело/производное можно предпочтительно экспрессировать в извлекаемой биологической жидкости, такой как молоко или сыворотка крови, из которой его можно извлечь и очистить, применяя стандартные методики.

Трансгены, применяемые для получения трансгенных животных, могут включать соответствующую кодирующую последовательность(и), функционально связанную с промотором, обычно в комбинации с энхансерной последовательностью, такой как последовательность из иммуноглобулина грызуна или промотор/энхансер гена казеина (Buhler et al., Bio/Technology; 8,140 (1990); Meade et al., Bio/Technology, 8,443 (1990)).

Трансгены можно переносить в клетки или зародыши посредством гомологичной рекомбинации. Можно получить широкий диапазон отличных от человека трансгенных животных, включая мышей, крыс, овец, коров, коз и т.д. (см. WO 91/08216).

Из предшествующего описания должно быть очевидно, что настоящее изобретение обеспечивает диапазон новых антител, производных, нуклеиновых кислот и т.д.

При желании, их можно обеспечить, по существу, в очищенной форме. Для целей настоящего изобретения это означает, что они составляют большую часть сухого веса определенной композиции. Например, они могут составлять по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95 или по меньшей мере 98% указанного сухого веса.

Указанные продукты можно обеспечить в изолированной (выделенной) форме. Это означает, что их отделяют от одного или более других компонентов, с которыми они обычно связаны в природе (например, нуклеиновую кислоту можно обеспечить в форме, которая выделена из клетки).

Их можно обеспечить в целом ряде других форм. Например, их можно соединить с гетерологичными группами и/или их можно иммобилизовать.

Все из указанных выше форм входят в объем настоящего изобретения.

Настоящее изобретение далее будет описано исключительно в качестве примера со ссылкой на следующие сопроводительные фигуры.

На фиг. 1а и 1б приведены выравнивания последовательностей аминокислот для различных тяжелых и легких цепей.

На фиг. 2 приведены результаты по специфичности связывания антигена по отношению к TrkA-IgG для супернатантов от различных клонов, полученных в результате эксперимента по временной экспрес-

ции гуманизированных вариантов MNAC13 в клетках COS-7.

На фиг. 3 приведены результаты эксперимента, в котором клеточное связывание антител с TrkA, экспрессированным на поверхности клеток TF-1, анализировали с помощью проточной цитофлуорометрии.

На фиг. 4 приведены результаты дополнительного анализа, в котором лучшие связывающие молекулы, определенные на фиг. 3 (BXhVH3VL3, BXhVH5VL1, BXhVH5VL3 и HuMNACWOv), сравнивали с HuMNACWO.

На фиг. 5 приведены результаты анализа, в котором различные гуманизированные варианты антител согласно настоящему изобретению анализировали параллельно с антителом MNAC13 мыши (muMNACEP), chimMNAC13, HuMNACWO и IgG₁ человека в качестве стандартного контроля.

На фиг. 6 приведены тяжелая и легкая цепи BXhVH5VL1, включающие константные области (первая аминокислота константной области подчеркнута.)

На фиг. 7 приведена тяжелая цепь BXhVH5VL1 N297A, включающая константную область (первая аминокислота константной области подчеркнута и положение 297A выделено жирным шрифтом и подчеркнуто).

На фиг. 8 показано связывание BXhVH5VL1 и BXhVH5VL1 N297A с линиями клеток, экспрессирующими huTrkA.

На фиг. 9 показано влияние различных антител на индуцированную NGF продукцию MIP-1 β в линии тучных клеток HMC-1 человека.

На фиг. 10 показано связывание BXhVH5VL1 с Fc-рецепторами на поверхности клеток линии THP1 по сравнению с BXhVH5VL1 N297A.

На фиг. 11 показан эксперимент, демонстрирующий болеутоляющее действие местной внутрикожной инъекции BXhVH5VL1 N297A или контрольного hIgG при совместной инъекции с rhNGF.

На фиг. 12 показан эксперимент, демонстрирующий болеутоляющее действие местной внутрикожной инъекции muMNACEP или контрольного mIgG при совместной инъекции с rhNGF.

На фиг. 13 показан эксперимент, демонстрирующий болеутоляющее действие при системном введении BXhVH5VL1 N297A по сравнению с контрольным hIgG в модели индуцированной NGF боли на животном.

На фиг. 14 показан эксперимент, демонстрирующий болеутоляющее действие при системном введении muMNACEP по сравнению с контрольным hIgG в модели индуцированной NGF боли на животном.

Примеры

Перед подробным обсуждением примеров номенклатура, используемая в данном описании, приведена ниже.

muMNACEP.

Этот термин используют для описания антитела мыши MNAC13, как описано в EP1181318.

Вариабельная область тяжелой цепи этого антитела в данном описании обозначается как mVHEP (SEQ ID NO: 15). Вариабельная область легкой цепи в данном описании обозначается как mVLEP (SEQ ID NO: 16).

HuMNACWO.

Этот термин используют для описания гуманизированного антитела MNAC13, описанного в WO 05/061540.

Вариабельная область тяжелой цепи этого антитела в данном описании обозначается как HuVHWO (SEQ ID NO: 17). Вариабельная область легкой цепи в данном описании обозначается как HuVLWO (SEQ ID NO: 18).

HuMNACWOv.

Этот термин используют для описания варианта антитела, обозначенного как HuMNACWO (см. выше), в котором участок CDR3 тяжелой цепи был замещен на участок CDR3, соответствующий участку, присутствующему в muMNACEP. Этот вариант новый и входит в объем настоящего изобретения.

Вариабельная область тяжелой цепи этого антитела в данном описании обозначается как HuVHWOv (SEQ ID NO: 6). Вариабельная область легкой цепи может называться в данном описании HuVLWOv. Тем не менее, чтобы избежать дублирования, она не показана на фиг. 1b, поскольку она точно соответствует HuVLWO (SEQ ID NO: 18).

ChimMNAC13.

Этот термин относится к muMNACEP, которое включает константные области человека вместо константных областей мыши.

Вариабельная область тяжелой цепи этого антитела в данном описании обозначается как mVHEP (SEQ ID NO: 15). Легкая цепь в данном описании обозначается как mVLEP (SEQ ID NO: 16).

3-23*01 (SEQ ID NO: 19), JH4 (SEQ ID NO: 20), L6*01 (SEQ ID NO: 21) и JK1 (SEQ ID NO: 22).

Эти термины описывают кодирующие последовательности, полученные из зародышевых генов человека. Их используют для оценки степеней гуманизирования в табл. 1. Таким образом, если нет изменений по сравнению с зародышевой последовательностью человека, это рассматривают как 100% гумани-

зирование.

[Процент гуманизирования = количество изменений Х 100]

общее количество сравненных остатков

В табл. 1 показан процент гуманизирования для различных вариантов.

Таблица 1

Вариант последовательности	Количество AK мыши в FW/общее количество AK в FW	% гуманизирования (по сравнению с последовательностью FW)	Количество AK мыши, включая AK CDR /общее количество AK в вариабельной области	% гуманизирования (по сравнению с полной вариабельной последовательностью)
BXhVH1	0/87	100	36/123	70.7
BXhVH2	3/87	96.6	39/123	68.3
BXhVH3	3/87	96.6	39/123	68.3
BXhVH4	3/87	96.6	39/123	68.3
BXhVH5	5/87	94.2	41/123	66.7
BXhVHWO	12/87	86.2	48/123	61.0
BXhVL1	0/80	100	26/106	75.5
BXhVL2	4/80	95	30/106	71.7
BXhVL3	6/80	92.5	32/106	69.8
BXhVL4	6/80	92.5	32/106	69.8
BXhVL5	6/80	92.5	32/106	69.8
BXhVL6	8/80	90	34/106	67.9
BXhVL7	8/80	90	34/106	67.9
BXhVL8	11/80	86.2	37/106	65.1
BXhVLWO	9/80	88.8	35/106	67

Видно, что все варианты вариабельной цепи имеют степень гуманизирования на протяжении каркасных областей выше 85%.

Последовательности "BX".

Последовательности, маркированные кодом, включающим "BX", представляют собой новые последовательности согласно настоящему изобретению. Буквы после "BX" представляют собой либо VH, либо VL для обозначения вариабельной области тяжелой или легкой цепей соответственно. Указанные последовательности затем просто последовательно нумеруют в том порядке, в котором они показаны на фиг. 1а и 1б для данной цепи.

Существует пять последовательностей тяжелой цепи. Таким образом, они пронумерованы следующим образом:

BXhVH1 (SEQ ID NO. 1)

BXhVH2 (SEQ ID NO. 2)

BXhVH3 (SEQ ID NO. 3)

BXhVH4 (SEQ ID NO. 4)

BXhVH5 (SEQ ID NO. 5)

Существует восемь последовательностей легкой цепи. Таким образом, они пронумерованы следующим образом:

BXhVL1 (SEQ ID NO. 7)

BXhVL2 (SEQ ID NO. 8)

BXhVL3 (SEQ ID NO. 9)

BXhVL4 (SEQ ID NO. 10)

BXhVL5 (SEQ ID NO. 11)

BXhVL6 (SEQ ID NO. 12)

BXhVL7 (SEQ ID NO. 13)

BXhVL8 (SEQ ID NO. 14)

Указанные цепи можно комбинировать в антителах или их производных.

Были получены все сорок возможных комбинаций, и они представляют собой следующие:

BXhVH1VL1, BXhVH1VL2, BXhVH1VL3, BXhVH1VL4, BXhVH1VL5, BXhVH1VL6,
 BXhVH1VL7, BXhVH1VL8,
 BXhVH2VL1, BXhVH2VL2, BXhVH2VL3, BXhVH2VL4, BXhVH2VL5, BXhVH2VL6,
 BXhVH2VL7, BXhVH2VL8,
 BXhVH3VL1, BXhVH3VL2, BXhVH3VL3, BXhVH3VL4, BXhVH3VL5, BXhVH3VL6,
 BXhVH3VL7, BXhVH3VL8,
 BXhVH4VL1, BXhVH4VL2, BXhVH4VL3, BXhVH4VL4, BXhVH4VL5, BXhVH4VL6,
 BXhVH4VL7, BXhVH4VL8,
 BXhVH5VL1, BXhVH5VL2, BXhVH5VL3, BXhVH5VL4, BXhVH5VL5, BXhVH5VL6,
 BXhVH5VL7, BXhVH5VL8.

"N297A".

Обозначение "N297A" после названия антитела указывает на то, что в положении 297 константной области тяжелой цепи присутствует замена N на A.

Последовательность BXhVH5VL1 N297A соответствует SEQ ID NO: 23.

Векторы экспрессии.

Подходящие кодирующие последовательности были слиты с последовательностью, кодирующей секреторный сигнал на 5'-конце, и последовательностью донора сплайсированного фрагмента на 3'-конце в кДНК для клонирования в систему экспрессии антитела.

Фрагменты ДНК клонировали в векторы экспрессии IgG₁.

Эти векторы экспрессии были основаны на геномных последовательностях, кодирующих константные домены человека, и кассетах для клонирования для вставки выбранных фрагментов кДНК в последовательности hVH и hVL.

Временная экспрессия гуманизированных вариантов MNAC13 в клетках COS-7 и определение титров антител.

Каждой комбинацией тяжелой и легкой цепей временно трансфицировали клетки COS-7 и определяли титр антитела.

Проводили совместную временную трансфекцию векторов экспрессии, кодирующих легкую и тяжелую цепи, в клетки COS-7 путем липофекции, с помощью липофектамина согласно инструкциям изготовителя (Invitrogen, Германия) в 24-луночном формате.

После трансфекции среду заменяли на DMEM, содержащую 10% FCS и 2% L-глутамина, и супернатанты клеток COS-7 собирали через 4 дня после трансфекции.

Титр гуманизированных антител, секретированных в супернатанты трансфицированных клеток COS-7, анализировали с помощью "сэндвич"-ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ).

Вкратце, антитело мыши, узнающее каппа-цепь человека (BD), иммобилизировали на 96-луночном планшете, блокировали и инкубировали с разбавленным супернатантом от трансфицированных клеток COS-7. Присутствие антитела детектировали с помощью конъюгированного с POD антитела кролика против IgG (H+L) человека (Dianova, Германия). В качестве стандарта использовали химерное контрольное антитело в концентрации от 1 до 10 нг/мл. Измеренные концентрации антитела дополнительно корректировали с помощью образца для внутреннего стандарта, имеющего стандартизированную концентрацию антитела.

Пример 1.

Сравнение связывания гуманизированного антитела с TrkA-IgG в анализе ELISA.

На основании определенных концентраций антитела супернатанты из всех образцов корректировали до таких же концентраций антитела.

Активности связывания всех вариантов гуманизированного антитела анализировали с помощью ELISA с антигеном TrkA-IgG. Их сравнивали с активностями связывания ChimMNAC13 и HuMNACWOv.

Антитела и антигены размораживали, разделяли на аликовты и хранили при -20°C. Аликовты используемых антител хранили при 4°C в течение максимум двух недель.

ELISA с антигеном выполняли, как описано ниже: планшеты Maxisorb (Nunc, Германия) покрывали 0,125, 0,25, 0,5 и 1 мкг/мл TrkA-IgG. Для проверки специфичности связывания антитела с антигеном использовали TrkB-IgG (1 мкг/мл) в качестве отрицательного контроля.

Временно экспрессированные варианты антитела использовали в концентрации 1, 10 и 100 нг/мл.

Процедура подробно описана далее.

Покрытие.

Планшеты: Nunc MaxiSorp 96-луночные, 100 мкл/лунку TrkA-IgG при концентрации 2 мкг/мл в 0,1 М карбонатном буфере, pH 9,6 (TrkB-IgG использовали в качестве отрицательного контроля).

Планшеты запечатывали и инкубировали в течение ночи при 4°C.

Промывали 3 раза 200 мкл промывочного буфера.

Блокирование.

Планшеты блокировали путем добавления 200 мкл блокирующего буфера SuperBlock на ФБР (Pierce, номер в каталоге 37515) в каждую лунку.

Планшет немедленно опустошали путем переворачивания. Повторяли процедуру еще два раза. Инкубировали при 37°C в течение 2 ч.

Первичное антитело.

Отбрасывали супернатант и добавляли 100 мкл очищенного МАТ, подходящим образом разбавленного в буфере для анализа (диапазон на стандартной кривой: 50-5000 пг/мл). Планшеты запечатывали и инкубировали при 37°C в течение 2 ч (для повышения чувствительности инкубировали в течение ночи при 4°C) Промывали 4 раза промывочным буфером.

Вторичное антитело.

Добавляли 100 мкл конъюгированного с HRP (пероксидазой хрена) антитела козы против IgG мыши (Pierce, номер в каталоге 31430), разбавленного до 1:10000 в буфере для анализа. Инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Промывали 4 раза промывочным буфером.

Проявка.

Добавляли 100 мкл раствора субстрата в каждую лунку. Инкубировали при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2 М H₂SO₄. Определяли оптическую плотность в каждой лунке, применяя считающее устройство для титрационных микропланшетов, при 450 нм.

Результаты.

Результаты для супернатантов от различных клонов, которые оценивали на специфичность связывания антигена, применения анализ ELISA, приведены на фиг. 2.

Вкратце, специфичным антигеном TrkA-IgG (черные столбики) и отрицательным контролем TRKB-IgG (белые столбики) покрывали различные 96-луночные планшеты при концентрации 1 мкг/мл.

Определяли количество антител в супернатантах, подходящим образом разбавляли и тестировали при концентрации 5 нг/мл. После промывки детектировали связывание с подходящим вторичным антителом, меченым HRP, определенное по хромогенной реакции, и определяли количество путем измерения OD на 450/630 нм.

Большая часть гуманизированных антител проявила сравнимую селективную аффинность к антигену TrkA при высокой плотности. Кроме того, их специфичность связывания не отличалась значительно от исходного антитела мыши против TrkA человека и его химерной изоформы, что указывало на то, что селективность к антигену полностью сохранилась после процедуры гуманизирования.

Пример 2.

Клеточный анализ на связывание новых кандидатов с помощью цитофлуорометрического анализа экспрессии TrkA на поверхности клеток TF-1.

Процедура.

Собирали клетки из культуры, получали суспензию отдельных клеток (для получения максимальной экспрессии антигена рассаживали клетки 1:3 за день до этого).

Распределяли по 0,3-0,4×10⁶ клеток на образец и промывали 1 раз холодным буфером для FACS (ФБР pH 7,4 + 0,1% NaN₃ + 0,1% БСА).

Центрифугировали при 350×g в течение 5 мин. Отбрасывали супернатант и держали пробирки на льду.

Блокирование Fc-рецепторов.

Добавляли 50 мкл на образец IgG человека [300 мкг/мл] в буфере для FACS и смешивали аккуратным встряхиванием.

Инкубировали при 4°C в течение 15 мин.

Первичное антитело.

Добавляли 100 мкл на образец первичного антитела muMNAC13 [4 мкг/мл] в буфере для FACS и смешивали аккуратным встряхиванием.

В качестве отрицательного контроля использовали очищенный изотопический контроль IgG₁ мыши в той же концентрации.

Инкубировали при 4°C в течение 30 мин.

Промывали 2 раза 1 мл буфера для FACS, откручивали 5 мин при 350×g и супернатант отбрасывали.

Вторичное антитело.

Добавляли 100 мкл на образец антител осла против IgG (H+L) мыши, конъюгированных с R-фикаротротином (Jackson ImmunoResearch, номер в каталоге 715-116-151), в буфере для FACS и смешивали аккуратным встряхиванием.

Инкубировали при 4°C в течение 30 мин.

Промывали 2 раза 1 мл буфера для FACS, откручивали 5 мин при 350×g и супернатант отбрасывали.

Ресуспенсировали в 0,5 мл буфера для FACS.

Получали результаты для образцов на проточном цитометре.

Результаты.

Клетки TF-1 окрашивали супернатантами из всех клонов, а также HuMNACWO и HuMNACWOv антителами в качестве контролей (4 мкг/мл) в течение 30 мин при 4°C. Окрашивание выявляли с помощью подходящего PE-меченого вторичного антитела и определяли количество с помощью цитофлуорометрического анализа, чтобы оценить интенсивность флуоресценции после связывания.

Результаты показаны на фиг. 3, которая основана на табл. 2.

Таблица 2

°	Варианты	Среднее геометрическое значение флуоресценции		Повышение, разы		
		Среднее	±	Среднеквадратичное отклонение	Среднее	±
	mVHEP/mVLEP	11.0	±	2.2	3.2	± 0.7
	hVHWOv/hVLWO	8.9	±	1.9	2.6	± 0.6
	hVH1/hVL1	5.7	±	0.4	1.7	± 0.1
	hVH1/hVL2	4.6	±	0.4	1.3	± 0.1
	hVH1/hVL3	6.1	±	0.6	1.8	± 0.2
	hVH1/hVL4	5.1	±	0.5	1.5	± 0.2
	hVH1/hVL5	4.5	±	0.3	1.3	± 0.1
	hVH1/hVL6	4.9	±	0.4	1.4	± 0.1
	hVH1/hVL7	5.1	±	0.4	1.5	± 0.1
0	hVH1/hVL8	5.2	±	0.1	1.5	± 0.0
1	hVH2/hVL1	9.2	±	1.3	2.6	± 0.4
2	hVH2/hVL2	6.4	±	0.7	1.8	± 0.2
3	hVH2/hVL3	10.8	±	1.3	3.1	± 0.4
4	hVH2/hVL4	6.1	±	0.3	1.8	± 0.1
5	hVH2/hVL5	6.4	±	0.2	1.8	± 0.1
6	hVH2/hVL6	6.4	±	0.7	1.8	± 0.2
7	hVH2/hVL7	6.5	±	0.8	1.9	± 0.3
8	hVH2/hVL8	6.5	±	1.0	1.9	± 0.3
	hVH3/hVL1	8.6	±	1.5	2.5	± 0.5

9							
0	hVH3/hVL2	7.1	±	2.1	2.0	±	0.6
1	hVH3/hVL3	12.6	±	0.6	3.6	±	0.2
2	hVH3/hVL4	7.1	±	0.1	2.0	±	0.0
3	hVH3/hVL5	6.9	±	0.5	2.0	±	0.2
4	hVH3/hVL6	6.4	±	0.5	1.8	±	0.2
5	hVH3/hVL7	7.1	±	1.0	2.0	±	0.3
6	hVH3/hVL8	6.5	±	1.2	1.9	±	0.3
7	hVH4/hVL1	10.4	±	2.4	3.0	±	0.7
8	hVH4/hVL2	8.3	±	2.5	2.4	±	0.7
9	hVH4/hVL3	10.9	±	3.0	3.1	±	0.9
0	hVH4/hVL4	8.0	±	2.2	2.3	±	0.6
1	hVH4/hVL5	8.6	±	1.7	2.5	±	0.5
2	hVH4/hVL6	8.0	±	1.4	2.3	±	0.4
3	hVH4/hVL7	8.7	±	2.5	2.5	±	0.7
4	hVH4/hVL8	8.3	±	1.9	2.4	±	0.6
5	hVH5/hVL1	11.3	±	2.7	3.2	±	0.8

6	hVH5/hVL2	8.6	±	2.3	2.5	±	0.7
7	hVH5/hVL3	13.7	±	2.1	3.9	±	0.6
8	hVH5/hVL4	9.1	±	2.2	2.6	±	0.7
9	hVH5/hVL5	8.3	±	2.0	2.4	±	0.6
0	hVH5/hVL6	9.1	±	1.5	2.6	±	0.5
1	hVH5/hVL7	8.6	±	2.0	2.5	±	0.6
2	hVH5/hVL8	8.3	±	1.6	2.4	±	0.5
3	huIgG	3.5	±	0.0	1.0	±	0.0

Полученные результаты показали, что все тестированные клоны, а также HuMNACWOv позволяли положительно детектировать связанные с мембраной рецепторы TrkA на клетках TF-1, хотя и до различной степени. HuMNACWO не было способно окрашивать клетки TF-1, которые имеют низкую плотность поверхностных рецепторов TrkA.

Чтобы дополнительно подтвердить это, из 40 тестированных клонов для дополнительного анализа выбрали клон, показавшие наилучшее связывание.

В двух отдельных экспериментах (фиг. 4) оценили BXH VH3VL3, BXhVH5VL1, BXhVH5VL3 и HuMNACWOv по сравнению с HuMNACWO.

Подтвердили, что выбранные клоны хорошо связывались и проявили себя несколько лучше, чем HuMNACWOv.

Изоформы гуманизированного антитела BXhVH5VL1 N297A и BXhVH5VL1 вместе с эталонными антителами muMNACEP и HuMNACWO также анализировали на способность связывания с линиями клеток TF-1, HMC-1 и PC12-hTrkA, которые экспрессируют поверхностный рецептор hTrkA на различных уровнях.

Как показано на фиг. 8, антитела BXhVH5VL1 N297A и BXhVH5VL1 сопоставимо связывали все тестированные линии клеток, независимо от плотности рецептора на клеточной поверхности. Оба антитела связывались более эффективно по сравнению с исходным muMNACEP. HuMNACWO связывалось только с линией клеток с высокой плотностью поверхностного рецептора PC12-hTrkA.

Пример 3.

Сравнение биологической активности гуманизированного антитела *in vitro* с помощью анализа пролиферации на клетках TF-1.

Чтобы измерить способность моноклональных антител против TrkA человека блокировать биологическую активность, опосредованную TrkA-β-NGF на поверхности клетки, использовали анализ пролиферации клеток, применяя факторзависимую эритролейкемическую линию клеток человека, TF-1 (Kitamura, T. et al., 1989, J. Cell Physiol. 140:323-334).

Клетки TF-1 инкубировали с различными концентрациями антител в течение 0,5 ч при 37°C в 96-луночном плоскодонном культуральном планшете.

После этого периода предварительной инкубации добавляли рекомбинантное антитело против β-NGF человека (rec-hu-β-NGF, R&D Systems) в смесь клеток с антителами.

Анализируемую смесь в суммарном объеме 200 мкл, включающую антитело при различных указанных концентрациях, β-NGF человека при концентрации 5,0 нг/мл и клетки TF-1 при концентрации 5×10³ клеток/лунку, инкубировали при 37°C в течение 5 дней в увлажненном CO₂-инкубаторе.

По прошествии этого периода планшеты центрифугировали и после удаления супернатанта замораживали при -80°C, чтобы лизировать клетки.

Набор CyQUANT для анализа пролиферации клеток (Molecular Probes) использовали для измерения пролиферации клеток согласно инструкциям изготовителя.

Этот эксперимент выполняли дважды.

Результаты.

Различные гуманизированные варианты антител анализировали наряду с антителом мыши MNAC13 (muMNACEP), chimMNAC13, HuMNACWO и IgG₁ человека в качестве стандартного контроля

(фиг. 5).

Рассчитывали IC₅₀ для каждой кривой и результаты представили в табл. 3.

Было обнаружено, что антитело BXhVH5VL1 проявило себя лучше всех вариантов. Тяжелая и легкая цепи этого антитела, следовательно, показаны на фиг. 6.

Среднее IC₅₀ для MNAC13 мыши для серии экспериментов составляло 0,54±0,47 мкг/мл.

Таблица 3

Анализ пролиферации на клетках TF1, IC50 (мкг/мл)			
	<u>Среднее</u>		<u>Станд.откл.</u>
	<u>Эксп-1</u>	<u>Эксп-2</u>	
muMNACEP	0.54	0.47	
ChimMNAC13	0.06	0.58	
BXhVH5VL1	0.17	1.84	
BXhVH3VL3	0.41	2.38	
BXhVH5VL3	1.40	1.21	
HuMNACWO	-	-	
HuIgGstd	-	-	

Пример 4.

Анализ с помощью поверхностного плазменного резонанса.

Анализ с применением поверхностного плазменного резонанса использовали, чтобы измерить константы скорости ассоциации и диссоциации для кинетики связывания различных антител (мышиное, химерное, 5 гуманизированные варианты) с TrkA-IgG, применяя BIACORE 2000 (Biacore AB, Уппсала, Швеция). TrkA-IgG иммобилизировали на сенсорном чипе CM-5, используя условия, рекомендованные изготовителем, таким образом, чтобы достичь плотности иммобилизации 1100 RU. Каждый образец антитела анализировали в диапазоне концентраций антитела 20-0,63 мкг/мл. Расчет сенсограммы выполняли, применяя версию 3 программного обеспечения BIA Evaluation (1999).

Анализ отдельных наборов сенсограмм выполняли, применяя версию 3 программного обеспечения BIA Evaluation (1999). Среди различных моделей, которые проверили на соответствие кинетическим данным, наибольшее соответствие было получено для алгоритма "separated 1:1". В этой модели для расчетов использовался лишь определенный диапазон кривых ранней ассоциации и диссоциации. Принято считать, что во время этих ранних фаз кривой эффекты наложения, такие как перенос массы, связывание заново или другие эффекты, не влияют на расчет.

Результаты.

Константу диссоциации (K_D) определили для различных антител и представили в табл. 4 в порядке возрастания значений.

Значение K_D выражено в молярных единицах (M), которые соответствуют концентрации лиганда, при которой половина сайтов связывания на конкретном белке занята. Чем меньше это значение, тем более сильно связан лиганд или тем выше аффинность между лигандом и белком (здесь между антигеном и антителом).

Таблица 4

Антитело	K _{on} (1/Mc)	K _{off} (1/c)	K _D [M]
ChimMNAC13	2.68x10 ⁵	3.53x10 ⁻⁴	1.51x10 ⁻¹⁰
MNAC13	8.50x10 ⁵	1.67x10 ⁻⁴	2.50x10 ⁻¹⁰
BXhVH5VL1	7.68x10 ⁵	4.70x10 ⁻⁴	6.15x10 ⁻¹⁰
BXhVH5VL3	1.00x10 ⁶	6.38x10 ⁻⁴	6.62x10 ⁻¹⁰
BXhVH3VL3	3.25x10 ⁵	4.42x10 ⁻⁴	1.45x10 ⁻⁹
HuMNACWOv	1.62x10 ⁶	3.86x10 ⁻³	2.48x10 ⁻⁹
HuMNACWO (отдельный эксперимент)	7.39x10 ⁵	3.09x10 ⁻²	4.18x10 ⁻⁸

Из табл. 4 выше видно, что рассчитанные значения K_D для мышиных и химерных изоформ в значительной степени сопоставимы друг с другом.

Они несколько ниже, но имеют такой же порядок величины, что и для гуманизированных вариантов BXhVH5VL1 и BXhVH5VL3.

Напротив, гуманизированные варианты HuMNACWOv и BXhVH3VL3 имеют значение K_D на один порядок больше, чем наблюдаемое для мышиных и химерных вариантов.

Тем не менее, полученные значения K_D все же ниже, чем для гуманизированного антитела HuMNACWO, которое известно из предшествующего уровня техники.

Действительно, предпочтительные значения K_D для антител/вариантов согласно настоящему изобретению, с применением этой модели ниже, чем $4,18 \times 10^{-8}$ (таким образом, они ниже, чем соответствующее значение для гуманизированного антитела HuMNACWO, известного из предшествующего уровня техники).

Более предпочтительные значения ниже чем $2,48 \times 10^{-9}$ (таким образом, они ниже, чем для HuMNACWOv, которое представляет собой вариант HuMNACWO с теми же каркасными областями, но с заменами в третьем гипервариабельном участке тяжелой цепи).

Наиболее предпочтительно, чтобы значения K_D были ниже чем 1×10^{-9} (таким образом, чтобы они имели тот же порядок величин, что и для мышиных и химерных изоформ).

Соответственно, расстановка по порядку, приведенная в таблице выше, которая основана на рассчитанных результатах с применением "отдельного" алгоритма, очень хорошо отражала расстановку по результатам визуальных исследований сенсограмм всех исследованных вариантов в наложенных графиках.

Пример 5.

Сравнение биологической активности гуманизированного антитела *in vitro* с помощью теста на секрецию хемокинов линией тучных клеток HMC-1.

NGF действует как важный интермедиат при воспалительной боли, участвующий как в периферической, так и в центральной сенсибилизации. Сенсибилизация периферических ноцицепторов может быть очень быстрой и может включать не относящиеся к нервной системе клетки, такие как тучные клетки.

Чтобы измерить способность моноклональных антител TrkA человека ингибировать индуцированную β -NGF секрецию MIP-1 α , использовали биологический тест с применением линии тучных клеток HMC-1 (Ahamed, J. et al., J. Immunol. 1 июня 2004 г.; 172(11):6961-8.).

Клетки HMC-1 ($0,1 \times 10^6$ /лунку) высевали в трех повторениях в полной ростовой среде в 96-луночный культуральный планшет с плоским дном и инкубировали с различными концентрациями моноклонального антитела в течение 0,5 ч при 37°C.

После этого периода предварительной инкубации добавляли рекомбинантный β -NGF человека (гес- β -NGF, R&D Systems) в смесь клеток с антителами до конечной концентрации 50 нг/мл и инкубирование при 37°C продолжали в течение 6 ч в увлажненном CO₂-инкубаторе.

Затем собирали супернатанты и уровень MIP-1 β определяли с помощью "сэндвич"-ELISA, применяя набор DuoSet® Elisa для CCL4/MIP-1 β человека от R&D Systems (номер в каталоге DY271).

Полученные результаты выражали как % ответа и анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 5, применяя нелинейный регрессионный анализ, log (ингибитор) в зависимости от нормированного ответа, уравнение переменной крутизны.

Результаты.

Антитело BXhVH5VL1 N297A тестировали наряду с muMNACEP мыши, HuMNACWO и IgG₁ человека в качестве стандартного контроля. Значения IC₅₀ рассчитывали для каждой кривой, результаты показаны на фиг. 9. Ингибиторная активность BXhVH5VL1 N297A была значительно выше, чем указанная активность для гуманизированного антитела HuMNACWO.

Пример 6.

Характеристика *in vitro* BXhVH5VL1 N297A и BXhVH5VL1.

Оценка связывания с клеточными FcR на клетках THP-1.

Линию клеток острой моноцитарной лейкемии человека THP1 (ATCC) культивировали в среде RPMI1640/GLUTAMAX (Invitrogen) + 10% фетальной бычьей сыворотки (Invitrogen) + пенициллин/стрептомицин и поддерживали концентрацию 2-9×100,000 клеток/мл.

Клетки собирали из культуры и получали суспензию отдельных клеток, 0,3-0,4×10⁶ клеток на образец затем распределяли по 96-луночным культуральным планшетам со скругленным дном (Costar, Кембридж, Массачусетс) и промывали 1 раз холодным буфером для FACS.

После центрифugирования на 350×g в течение 5 мин супернатант отбрасывали и планшеты помещали на лед. Связывание IgG с Fc γ R на клетках THP-1 осуществляли путем инкубирования мономерных IgG в буфере для FACS, начиная с концентрации от 30 до 0,02 мкг/мл (разведения 1:3) в суммарном объеме 100 мкл при 4°C в течение 30 мин.

Клетки затем промывали три раза 200 мкл буфера для FACS и детектирование связывания IgG осуществляли путем добавления 100 мкл антител осла против IgG (H+L) человека, коньюгированных с R-флюореозитрином (Jackson Immuno Research, номер в каталоге 709-116-149), разбавленных 1:100 в буфере для FACS. После аккуратного встряхивания клетки инкубировали при 4°C в течение 30 мин.

Планшеты промывали 2 раза 200 мкл буфера для FACS, клетки окончательно ресуспендировали и переносили в 0,5 мл буфера для FACS и подсчитывали с помощью проточного цитометра.

Результаты.

На фиг. 10 ясно видно, что, как и ожидалось на основании предшествующего уровня техники (см. патент США № 5624821 Winter), мутированная изоформа BXhVH5VL1 N297A была в значительной степени лишена способности связываться с клеточными Fc-рецепторами.

Пример 7.

Эксперименты *in vivo*.

Эксперименты *in vivo*, которые выполняли для дополнительного тестирования антител/производных согласно настоящему изобретению, описаны ниже.

Модели NGF - опосредованной боли.

Фактор роста нервов (NGF) и его рецептор TrkA представляют собой ключевые медиаторы болевых ощущений, свойственных воспалительной боли.

NGF известен как фактор развития и выживаемости для сенсорных и симпатических нейронов, но он продолжает синтезироваться у взрослых животных на периферии, где он ретроградно транспортируется в клеточные тела сенсорных нейронов (Hendry et al., 1974, Otten et al. 1980).

Воспаление и повреждение нерва вызывает высвобождение NGF, который стимулирует первичные афферентные волокна и индуцирует поведенческую сенсибилизацию. Длительное лечение подкожным введением NGF крысам вызывает гипералгезию и изменяет локальную кожную чувствительность (Lewin et al., 1993; Andreev et al., 1995).

Внутрикожная инъекция rhNGF в предплечье и жевательную мышцу человека вызывает гипералгезию, аллодинию и изменяет локальную кожную чувствительность, которая начинается через 3 ч после инъекции и достигает пика через 1-7 дней после инъекции, и восстановление происходит ко дню 21 (Dyck et al., 1997; Svensson et al., 2003).

Таким образом, инъекции rhNGF в заднюю лапу крысы использовали в данном описании как модель поведенческой сенсибилизации, которая специфически вызывалась NGF.

Настоящие эксперименты включали использование двух различных протоколов.

1. Сначала исследовали, могла ли внутрикожная инъекция в лапу крысы рекомбинантного NGF человека (rhNGF) отдельно вызывать поведенческую сенсибилизацию, которую измеряли с помощью стандартных ноцицептивных тестов на гипералгезию (тест подошвы лап Hargreave). Затем выяснили, влияла ли внутрикожная совместная инъекция антител IgG мыши muMNACEP, IgG человека и BXhVH5VL1 N297A при дозе 100 мкг на индуцированную rhNGF сенсибилизацию. Антитела IgG₁ мыши и IgG человека использовали в качестве отрицательных контролей при подходящих дозировках.

2. Затем исследовали, могло ли влиять предварительное системное введение антитела muMNACEP (при дозах 8 и 1 мг/кг, интраперитонеально) и BXhVH5VL1 N297A (дозы по 8, 3 и 1 мг/кг, интраперитонеально) на периферически индуцированную rhNGF сенсибилизацию.

В первом протоколе, при котором введение осуществляли местно, использовали самцов крыс Lewis (Charles River, 5-6 недель, 200 г) в количестве 8-9 животных на группу в 4 экспериментальных группах, введение осуществляли согласно описанному способу. Инъекции осуществляли слепым способом. Краткое описание процедур приведено в табл. 5.

Таблица 5

	muMNACEP /BXhVH5VL1 N297A	mIgG ₁ /hIgG
Внутрикожные инъекции	100 мкг + 500 нг rhNGF, n=9	100 мкг + 500 нг rhNGF, n=9

При втором протоколе, при котором введение осуществляли системно (интраперитонеально) за 24 ч до инъекции rhNGF в лапу, использовали самцов крыс Lewis (Charles River, 5-6 недель, 200 г) в количестве 10-12 животных на группу в 10 экспериментальных группах. Инъекции осуществляли слепым способом. Краткое описание процедур приведено в табл. 6.

Таблица 6

	muMNACEP	mIgG ₁	BXhVH5VL1 N297A	hIgG
Системное интраперитонеальное введение за 24 ч до инъекции	1мг/кг n=10 8мг/кг n= 10	1мг/кг n=12 8мг/кг n= 8	1мг/кг n=10 3мг/кг n=10 8мг/кг n= 12	1мг/кг n=10 3мг/кг n=10 8мг/кг n= 12
внутрикожное введение rhNGF	500 нг	500 нг	500 нг	500 нг

Тест.

Всех животных пронумеровали, а затем приучили к процедурам поведенческого тестирования за 24-48 ч перед началом эксперимента. Регистрируемая поведенческая величина представляла собой задержку отдергивания лапы в подошвенном teste как меру гипералгезии.

Регистрировали исходный уровень, чтобы установить задержки отдергивания лапы. Ноцицептивную чувствительность индуцировали внутрикожным введением rhNGF в момент времени 0 и поведенческую ноцицептивную чувствительность отслеживали в течение 30 мин, 1, 2, 24 и 48 ч после инъекции rhNGF. Инъецирование можно осуществлять слепым способом, как описано далее.

Протокол 1. Введение путем внутрикожной инъекции в момент времени 0.

Протокол 2. Введение путем однократной системной интраперитонеальной инъекции за 24 ч до инъекции rhNGF в лапу.

Фоновый уровень в teste с подошвой лапы и teste von Frey определяли перед введением лекарственного средства.

Измерения гипералгезии проводили через 30 мин, 1, 2, 24 и 48 ч после инъекции rhNGF. Снимали 3-4 показания для каждой задней лапы ипсилатерально (правая лапа, в которую инъецировали rhNGF) и контралатерально (левая лапа, в которую не инъецировали rhNGF) к месту инъекции rhNGF.

Сопоставляли результаты для животных из отдельных групп лечения и рассчитывали средние и стандартные отклонения для реакций контралатеральных и ипсилатеральных лап.

На наличие гипералгезии указывало значительное уменьшение задержки отдергивания лапы (порядка секунд) для ипсилатеральной задней лапы, в которую инъецировали rhNGF, по сравнению с контрольной контралатеральной лапой (с помощью двустороннего критерия Стьюдента) и по сравнению с фоном перед инъекцией/перед лечением (с помощью однофакторного дисперсионного анализа).

Внутрикожная противогипералгезическая эффективность.

Авторы изобретения сравнили противогипералгезическую эффективность BXhVH5VL1 N297A (фиг. 11) и muMNACEP (фиг. 12) (плюс mIgG₁ и hIgG в качестве соответствующих контролей) при внутрикожной инъекции в указанной модели гипералгезии, индуцированной NGF.

Когда BXhVH5VL1 N297A и muMNACEP вводили совместно с rhNGF, не наблюдали развития существенной гипералгезии, что определили по несущественному различию между реакциями отдергивания ипсилатеральных и контралатеральных лап (фиг. 11 и 12).

После совместной инъекции с отрицательными контролями (mIgG₁, hIgG) всегда наблюдали гипералгезию при реакции ипсилатеральной лапы.

Результаты представлены в виде средних значений \pm 95% CI (доверительный интервал), перед (фоновый) и после внутрикожной инъекции 500 нг rhNGF с соответствующим лечением (указано стрелкой). Существенное уменьшение задержки отдергивания ипсилатеральной лапы указано символами "*" и "***" ($p<0,05$, $p<0,01$, двусторонний критерий Стьюдента) по сравнению с отдергиванием контралатеральной лапы.

Системная противогипералгезическая эффективность.

Авторы изобретения сравнили противогипералгезическую эффективность BXhVH5VL1 N297A, muMNACEP mIgG₁ и hIgG при системной инъекции в указанной модели гипералгезии, индуцированной NGF.

Тестировали три различные дозы BXhVH5VL1 N297A и контрольного hIgG (1, 3 и 8 мг/кг) (фиг. 13). Аналогично, тестировали две различные дозы muMNACEP и mIgG₁, 1 и 8 мг/кг (фиг. 14). Все введения осуществляли интраперитонеально за 24 ч до внутрикожной инъекции rhNGF.

Предварительное системное введение 8 и 3 мг/кг BXhVH5VL1 N297A значительно предотвращало развитие гипералгезии после инъекции rhNGF, на что указывало отсутствие существенных различий между ответами отдергивания ипсилатеральных и контралатеральных лап (фиг. 13).

Предварительное системное введение исходного антитела мыши mMNACEP (8 мг/кг) также предотвращало развитие индуцированной rhNGF гипералгезии (фиг. 14). Тем не менее, полный анальгетический ответ для BXhVH5VL1 N297A оказался лучше, чем для антитела mMNACEP.

При той же дозе после совместной инъекции с отрицательным контролем - mIgG₁ и hIgG всегда наблюдали гипералгезию при реакции отдергивания ипсилатеральной лапы.

Результаты представлены в виде средних значений $\pm 95\%$ CI (доверительный интервал), перед (фоновый) и после внутрикожной инъекции 500 нг rhNGF с соответствующим лечением (указано стрелкой). Существенное уменьшение задержки отдергивания ипсилатеральной лапы указано символами "*" и "****" ($p < 0,05$, $p < 0,01$, двусторонний критерий Стьюдента) по сравнению с отдергиванием контралатеральной лапы.

Пример 8.

Дополнительные эксперименты *in vivo*, которые можно осуществить, чтобы протестировать антитела/производные согласно настоящему изобретению, приведены ниже.

Формалиновый тест.

Мышам предварительно вводят антитело/производное интраперитонеально и через 18 ч осуществляют инъекцию в правую тыльную подушечку стопы 5% формалин. Время лизания (время, проведенное за лизанием поврежденной лапы) измеряют вплоть до 1 ч.

Тест на хроническую компрессию.

Мышей подвергают хирургической компрессии седалищного нерва, чтобы индуцировать невропатическую аллодинию. Животным затем вводят антитело/производное и измеряют отдергивание в ответ на механический стимул в месте поврежденной конечности по сравнению с противоположной конечностью.

Модель артрита.

Крысам вводят полный адьювант Фрейнда внутрикожно в основание хвоста. Приблизительно три недели спустя у них развивается системный полиартрит, характеризуемый болью в суставах. Животным вводят антитело/производное и оценивают болеутоляющее действие с помощью теста на издавление звуков, состоящего в измерении интенсивности издавания звуков при легком воздействии на суставы.

Модель индуцированной каррагенаном боли у обезьян.

Макакам-резус предварительно вводят внутривенно антитело/производное. На следующий день животным делают инъекцию каррагенана подкожно в хвост. Измеряют время до отдергивания лапы при тепловом стимуле.

Основные положения.

Если контекст не указывает на противоположное, применяются следующие основные положения.

1) Содержание всех источников, обсуждаемых в данном документе, считается включенным посредством ссылки.

2) Термин "включает/содержит" не ограничен в том смысле, что он охватывает термины "включающий", а также "составляющий из". Таким образом, термин "включает/содержит" и его варианты, такие как "включать/содержать" и "включающий/содержащий", следует понимать как означающие включение заявленного целого этапа, группы целых или группы этапов, но не исключение любого другого целого этапа, группы целых или группы этапов.

3) Эквиваленты аспектов настоящего изобретения, которые обсуждались в данном описании, подразумевают входящими в объем настоящего изобретения, даже если указанные эквиваленты не обсуждались отдельно.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ЛЕЙ ЛАЙН ДЖЕНОМИКС С.П.А.
 БЕНИНЫ Фабио
 Д'АМБРОСИО даниель
 <120> АНТИТЕЛА И ИХ ПРОИЗВОДНЫЕ
 <130> BXL-P824PCT
 <150> US 61/025,995
 <151> 2008-02-04
 <160> 23
 <170> ПАТЕНТНАЯ ВЕРСИЯ 3.5
 <210> 1
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Glu Val Lys Leu Leu 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 Thr Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 2
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Tyr

20

25

30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Tyr
 20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 4

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

<210> 5

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

Ala Arg Gly Ala Met Phe Gly Asn Asp Phe Phe Phe Pro Met Asp Arg
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 6
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 7
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
 85 90 95

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

<210> 8
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

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

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

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
 85 90 95

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

<210> 9
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Gln 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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 10
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 Gln 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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 11
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 Gln 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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

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

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

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
 85 90 95

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

<210> 12
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

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

Glu Glu Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

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

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

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
 85 90 95

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

<210> 13
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

Gln 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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

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

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

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 14

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

Glu Glu Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

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

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

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 15

<211> 123

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

Thr Met Ser Trp Ala Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gln Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 16

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

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

Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Leu Leu Ile Thr
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 17

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Tyr
 20 25 30

Thr Met Ser Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Ala Met Phe Gly Asn Asp Phe Phe Pro Met Asp Arg
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 18
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

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

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

Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 19

<211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys

<210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10 15
 <210> 21
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 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 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr 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 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
 85 90 95
 <210> 22
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10
 <210> 23
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 Glu Val Lys Leu Leu 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 Thr Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Ser Thr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Gly Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против TrkA, которое включает одну из следующих комбинаций вариабельных областей тяжелой и легкой цепей: SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 9 соответственно.
2. Антитело по п.1, которое связывается с TrkA с большей аффинностью, чем с TrkB.
3. Антитело по любому предшествующему пункту, которое способно блокировать или уменьшать связывание фактора роста нервов (NGF) с рецептором TrkA.
4. Антитело по любому предшествующему пункту, которое способно блокировать или уменьшать одну или более биологическую активность, которая может быть индуцирована связыванием NGF с рецептором TrkA.
5. Антитело по любому предшествующему пункту, включающее не происходящую от грызуна константную область.
6. Антитело по любому предшествующему пункту, включающее константную область человека или константную область, имеющую по меньшей мере 75% идентичности последовательности с константной областью человека.
7. Антитело по любому предшествующему пункту, включающее константную область IgG человека или константную область, имеющую по меньшей мере 75% идентичности последовательности с указан-

ной константной областью.

8. Антитело по любому предшествующему пункту, включающее константную область, которая имеет одну или более замен аминокислот по сравнению с константной областью иммуноглобулина человека, что предотвращает/уменьшает одну или более из следующих активностей: активацию комплемента, комплемент-опосредованный лизис, активацию Т-клеток, связывание с Fc-рецептором.

9. Антитело по любому предшествующему пункту, которое обеспечивает значение OD при 450 нм больше чем 0,1 при анализе на связывание TrkA-IgG с применением ELISA.

10. Антитело по любому предшествующему пункту, отличающееся тем, что отношение средней интенсивности окрашивания для FACS клеток TF-1 при анализе экспрессии TrkA на поверхности TF-1 клеток с применением FACS, при использовании указанного антитела к средней интенсивности окрашивания для FACS клеток TF-1 при анализе экспрессии TrkA на поверхности TF-1 клеток с применением FACS с использованием антитела IgG человека составляет больше 1,0,

11. Антитело по любому предшествующему пункту, которое имеет значение K_D менее чем $4,18 \times 10^{-8}$ М в отношении связывания TrkA-IgG при анализе с применением поверхностного плазмонного резонанса, при котором TrkA-IgG иммобилизован на сенсорном чипе CM-5.

12. Антитело по любому предшествующему пункту, которое гуманизировано по меньшей мере на 90% на всем протяжении каркасных участков вариабельной области по меньшей мере одной из цепей.

13. Антитело по любому предшествующему пункту, которое гуманизировано по меньшей мере на 95% на всем протяжении каркасных участков вариабельной области по меньшей мере одной из цепей.

14. Антитело согласно любому из пп.12, 13, которое имеет по меньшей мере 90-95% гуманизации для каркасных участков как легкой, так и тяжелой цепей.

15. Производное антитела по любому предшествующему пункту, отличающееся тем, что указанное производное представляет собой:

а) фрагмент указанного антитела, который находится в форме ScFv цепи, представляет собой фрагмент Fv или Fab или состоит из индивидуальных VH и VL цепей;

б) мультимер фрагмента, такой как мини-антитело, димер или мультимер ScFv, диатело, триатело, тетратело, мультимер Fab;

с) продукт слияния указанного антитела, фрагмента или мультимера фрагмента и другого фрагмента,

при этом указанный другой фрагмент представляет собой агент, выбранный из диагностического агента, терапевтического агента, метящего агента, агента, который увеличивает время полужизни и/или который снижает иммуногенность указанного производного у хозяина-человека.

16. Производное антитела по п.15, отличающееся тем, что указанный терапевтический агент представляет собой цитотоксин.

17. Антитело или производное антитела по любому предшествующему пункту, которое модифицировано полизиленгликолем.

18. Антитело или производное антитела по любому предшествующему пункту в иммобилизованной форме.

19. Применение антитела или производного антитела по любому из пп.1-18 для блокирования или уменьшения связывания NGF с TrkA.

20. Применение антитела или производного антитела по любому из пп.1-18 для лечения боли.

21. Применение по п.20 для лечения хронической боли.

22. Применение по п.20, отличающееся тем, что боль представляет собой острую боль.

23. Применение по п.20, отличающееся тем, что боль связана с одним или более из следующих состояний: панкреатит, камни в почках, эндометриоз, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, послеоперационные спайки, камни в желчном пузыре, головные боли, дисменорея, скелетно-мышечная боль, растяжения, висцеральная боль, кисты яичника, простатит, цистит, интерстициальный цистит, послеоперационная боль, мигрень, невралгия тройничного нерва, боль от ожогов и/или ран, боль, связанная с травмой, невропатическая боль, боль, связанная со скелетно-мышечными заболеваниями, ревматоидный артрит, остеоартрит, анкилозирующий спондилит, околосуставные патологии, онкологическая боль, боль от метастазов в кости, ВИЧ-инфекция.

24. Применение антитела или производного антитела по любому из пп.1-18 для лечения рака, невронального нарушения, например нейродегенеративного нарушения, болезни Альцгеймера, сахарного диабета, вирусного заболевания, ВИЧ опосредованного нарушения, лепры или воспалительного нарушения.

25. Применение по любому из пп.20-24, отличающееся тем, что при лечении возникает антителозависимая опосредованная клетками цитотоксичность.

26. Комбинация антитела или производного антитела по любому из пп.1-18 и анальгетика для одновременного, последовательного или совместного введения для блокирования или уменьшения связывания NGF с TrkA.

27. Комбинация антитела или производного антитела по любому из пп.1-18 и NGF для одновременного, последовательного или совместного введения для блокирования или уменьшения связывания NGF

с TrkA.

28. Комбинация антитела или производного антитела по любому из пп.1-18 и дополнительного антитела против TrkA или производного указанного антитела для одновременного, последовательного или совместного введения для блокирования или уменьшения связывания NGF с TrkA.

29. Фармацевтическая композиция, которая содержит терапевтически эффективное количество антитела или производного антитела по любому из пп.1-18 и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество для блокирования или уменьшения связывания NGF с TrkA.

30. Фармацевтическая композиция, которая содержит терапевтически эффективное количество антитела по любому из пп.1-18 и другой фармацевтически активный агент для блокирования или уменьшения связывания NGF с TrkA, причём указанный другой агент представляет собой болеутоляющий агент, другое антитело против TrkA или производное указанного антитела, NGF, противораковый агент или комбинацию указанных агентов.

31. Применение антитела или производного антитела по любому из пп.1-18 для диагностики или прогнозирования, причём указанные диагностика или прогнозирование представляют собой диагностику или прогнозирование любого из заболеваний или расстройств, перечисленных в пп.20-24.

32. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или производное антитела по любому из пп.1-18.

33. Вектор, который содержит нуклеиновую кислоту по п.32.

34. Отличное от человека трансгенное млекопитающее, при этом указанное млекопитающее экспрессирует антитело или производное антитела по любому из пп.1-18 или у указанного млекопитающего можно индуцировать такую экспрессию.

35. Набор, включающий антитело или его производное по любому из пп.1-18 вместе с инструкцией, описывающей их применение субъектом в качестве анальгетика.

Выравнивание последовательностей

Подчеркнуты гипервариабельные участки по данным в EP1181318

ТЯЖЕЛАЯ ЦЕЛЬ:

```

mVHEP
EVKLMESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMswARQTPKRLewVAYISKGGGSTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTALYYCARGAMYGNDFFYPM
(SEQ IN No. 15) D-23*01 EVQILLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMswVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK...
(SEQ IN No. 19) JH4
..YFDYWGQQGTLVTVSS
(SEQ IN No. 20) BXHVH1
EVQILLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMswVRQAPGKGLEWVSYISKGGGSTYYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK...
(SEQ IN No. 1) BXHVH2
EVKLMESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMswVRQTPGKGLEWVAYISKGGGSTYYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK...
(SEQ IN No. 2) BXHVH3
EVQILLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMswVRQTPGKRLewVAYISKGGGSTYYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK...
(SEQ IN No. 3) BXHVH4
EVQILLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMswVRQAPGKRLewVAYISKGGGSTYYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAM...
(SEQ IN No. 4) BXHVH5
EVKLMESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMswVRQTPGKRLewVAYISKGGGSTYYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAM...
(SEQ IN No. 5) HuVHWO
EVQILLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMswARQAPGKGLEWVAYISKGGGSTYYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDSAVYYCARGAM...
(SEQ IN No. 17) HuVHWOv
EVQILLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMswVRQAPGKGLEWVAYISKGGGSTYYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDSAVYYCARGAM...
(SEQ IN No. 6)

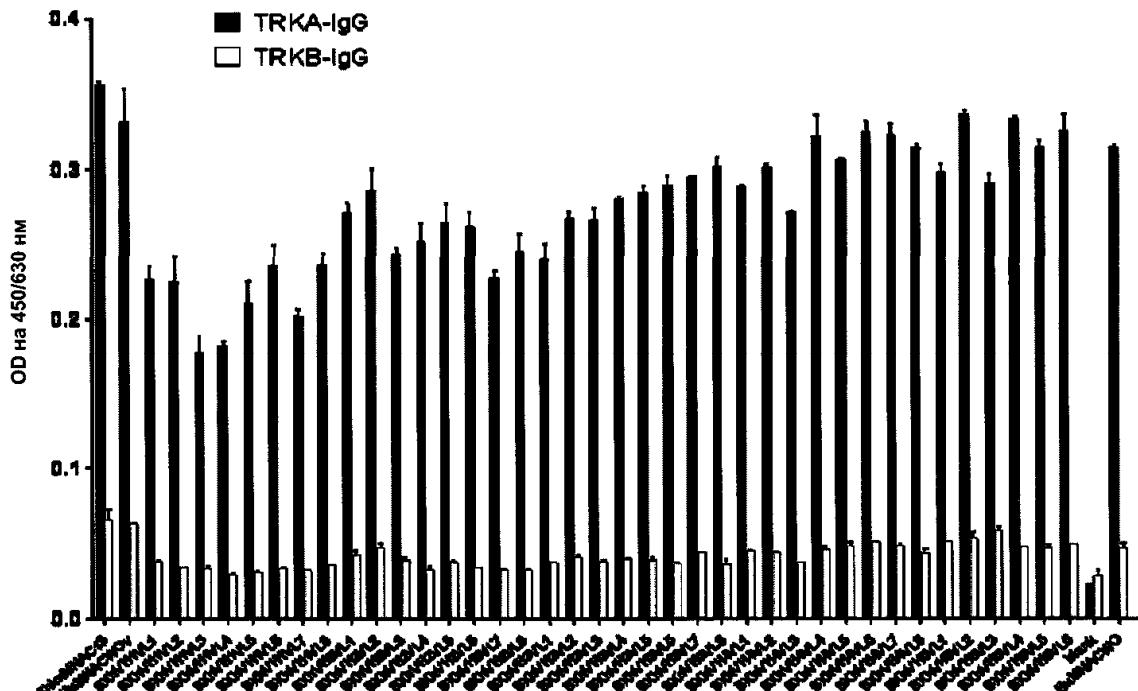
```

Фиг. 1а

ЛЕГКАЯ ЦЕЛЬ:

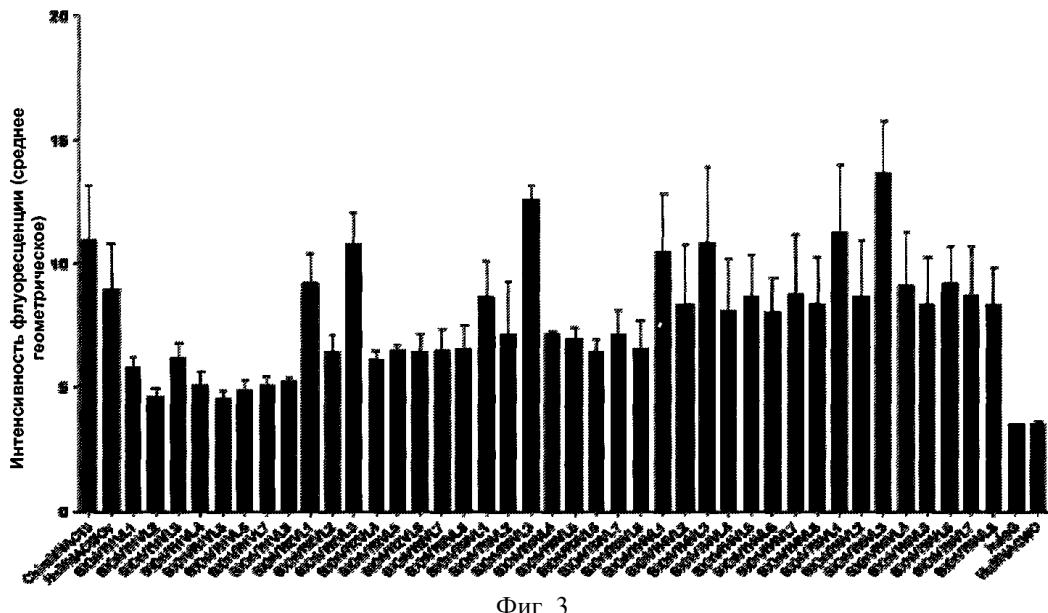
MVLEP DIVLSQSPAIMSASLGEEITLTCASSSVSYMH-WYQQKSGTSPKLLITTSNLASGVPSRSGSGSGTFYSLTISSEADAADYYCHQWSSYPWTFGGGTKLEIK
 (SEQ IN No. 16)
 L6*01 EIVLTQSPATLSSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWP
 (SEQ IN No. 21)
 JK1 .WTFGQGKVEIK
 (SEQ IN No. 22)
 BXhVL1 EIVLTQSPATLSSLSPGERATLSCSASSSVSYMH-WYQQKPGQAPRLLIYTTSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQWSSYPWTFGQGKLEIK
 (SEQ IN No. 7)
 BXhVL2 EIVLTQSPATLSSLSPGERATLSCSASSSVSYMH-WYQQKPGQSPRLLIYTTSNLASGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDAADYYCHQWSSYPWTFGQGKLEIK
 (SEQ IN No. 8)
 BXhVL3 QIVLTQSPATLSSLSPGERATLSCSASSSVSYMH-WYQQKPGQSPRLLIYTTSNLASGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQWSSYPWTFGGGTKLEIK
 (SEQ IN No. 9)
 BXhVL4 QIVLTQSPATLSSLSPGERATLSCSASSSVSYMH-WYQQKPGQSPRLLIYTTSNLASGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDAADYYCHQWSSYPWTFGGGTKLEIK
 (SEQ IN No. 10)
 BXhVL5 QIVLTQSPATLSSLSPGERATLSCSASSSVSYMH-WYQQKPGQSPRLLIYTTSNLASGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDAADYYCHQWSSYPWTFGQGKLEIK
 (SEQ IN No. 11)
 BXhVL6 EIVLTQSPATLSSLSPGEEATLSCSASSSVSYMH-WYQQKPGQSPRLLIYTTSNLASGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDAADYYCHQWSSYPWTFGGGTKLEIK
 (SEQ IN No. 12)
 BXhVL7 QIVLTQSPATLSSLSPGERATLSCSASSSVSYMH-WYQQKPGQSPRLLIYTTSNLASGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDAADYYCHQWSSYPWTFGGGTKLEIK
 (SEQ IN No. 13)
 BXhVL8 QIVLTQSPATLSSLSPGEEATLSCSASSSVSYMH-WYQQKSGTSPRLLIYTTSNLASGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDAADYYCHQWSSYPWTFGGGTKLEIK
 (SEQ IN No. 14)
 HuVWLW0 DIVLTQSPSSLSASVGDRVITITCSASSSVSYMH-WYQQKPGQAPKLLIYTTSNLASGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDAVATYYCHQWSSYPWTFGGGTKVEIK
 (SEQ IN No. 18)

Фиг. 1б

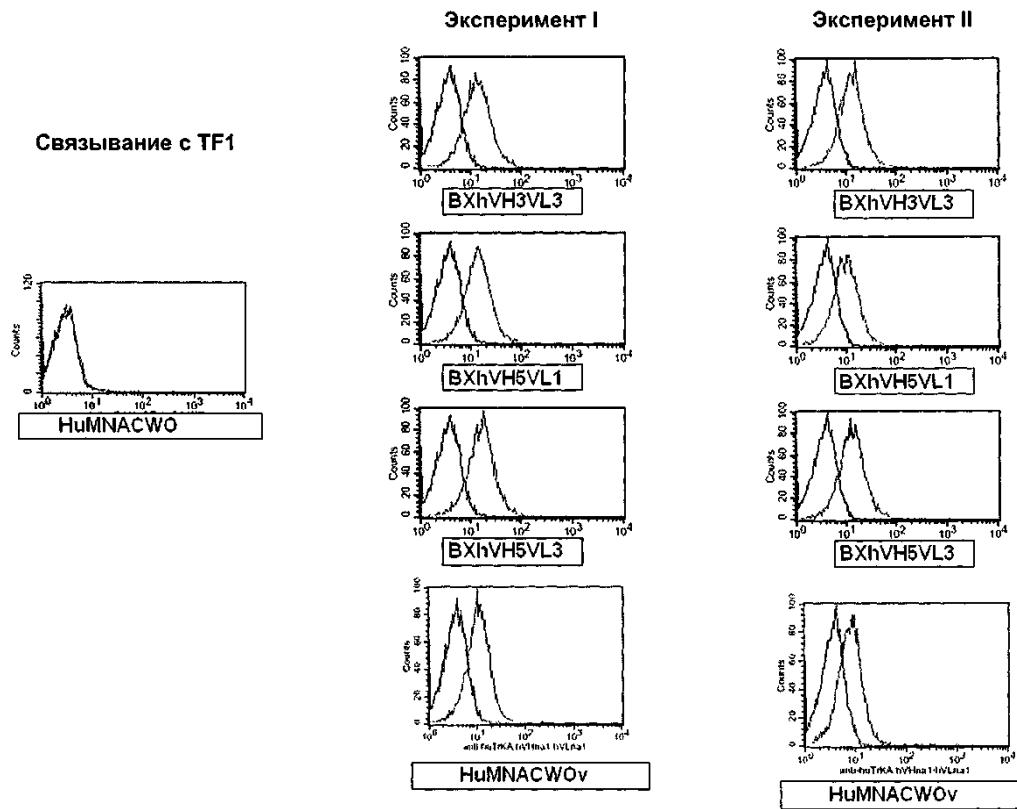


Фиг. 2

Поверхностное окрашивание клеток TF1

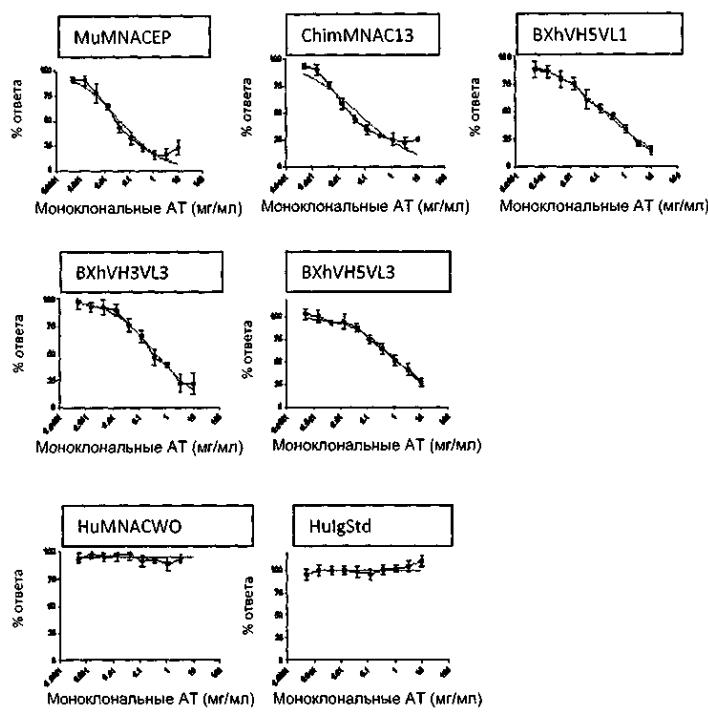


Фиг. 3



Фиг. 4

Тест на пролиферацию TF1



Фиг. 5

Тяжелая цепь BXhV5 с константной областью

EVKLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYTM**SWVRQTPGK**
 RLEWWVAYIS**KGGGSTYY**PDTVKGRFT**ISRDNSKNTLY**LQMNSLRA
 EDTAVYYCARGAMYGNDFFYPM**DYWGQGTT**TVSSA**STKG**PSV
 FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF**PEPVTV**SWNSGALTSGVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSVV**TPVSSSLGT**QTYICNVN**HKPSNT**KVDKKV
 EPKSCDKTH**TCPPCP**AP**ELLGGPSV**FLFPPKPKDTLM**ISRTPEVT**
 CVVVDVSHEDPEVKFNWYV**DGVEVHNA**TKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVL**HQDWLN**GKEYKCKVSNKALPAPI**EKTISKA**GQPREPQV
 YTLPPSRDEL**TKNQVSLT**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVD**KSRW**QQGNVF**SCSV**MHEGLHNHYT
 QKSLSLSPGK

Легкая цепь BXhVL1 с константной областью

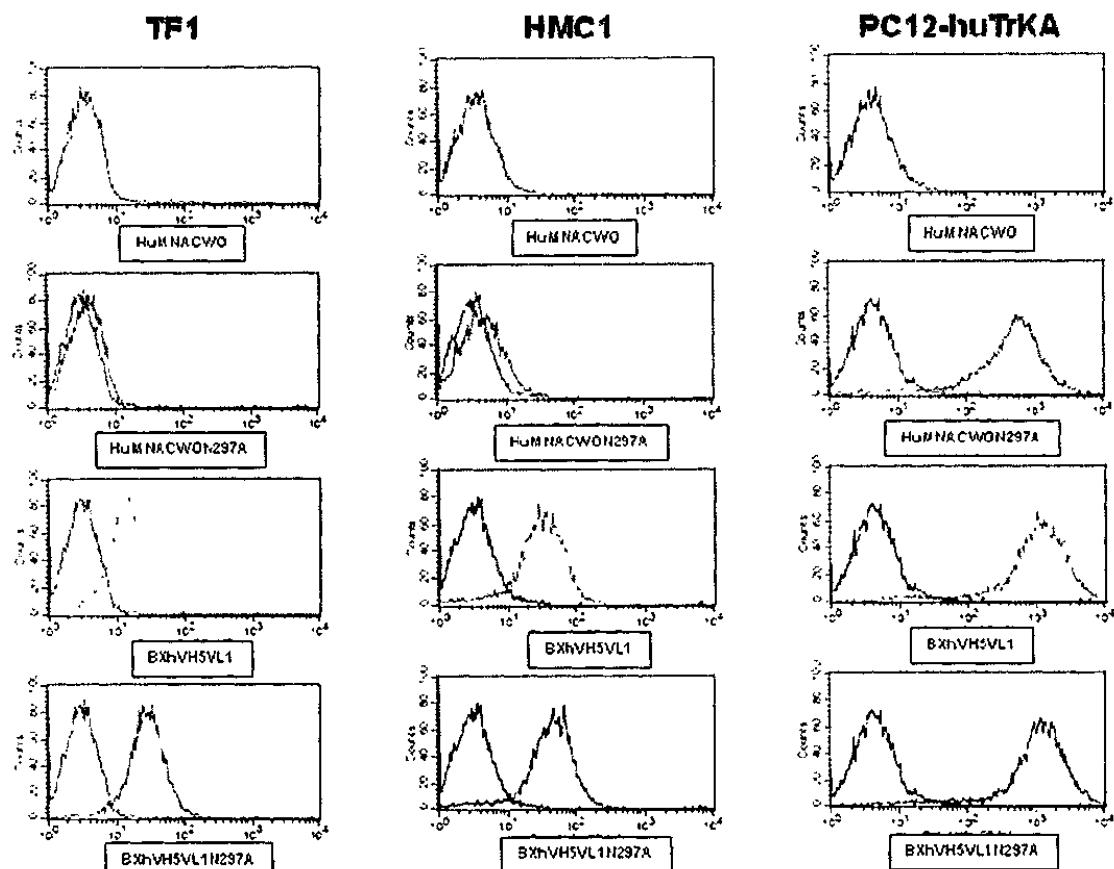
EIVLTQSPATL**SLSPGERATL**SCASSSVSY**MHWY**QQKPGQAPRL
 LIYTTSNLAS**GIPARFSGSG**TDFTLT**ISSLE**PEDFAVYYCHQWS
 SYPWTGQGT**KLEIKR**TVAAPSVF**IFPPSDE**QLKSGTASVV**CLLN**
 NFYP**REAKVQWKVDNAL**QSGNSQESV**TEQDSKD**STYSLST**LTL**
 SKADYE**EHKVYACE**VTH**QGLSSPVT**KS**FN**RGEC

Фиг. 6

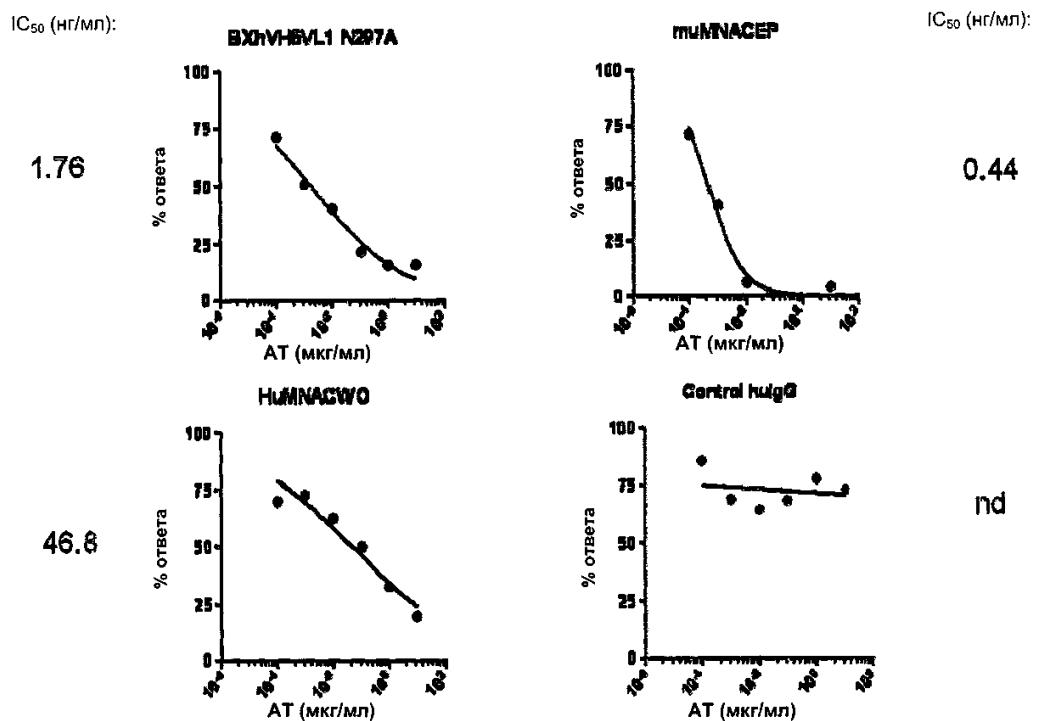
Тяжелая цепь BXhV5 N297A с константной областью

EVKLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYTM**SWVRQTPGK**RLEWWVAYIS**KGGGSTYY**PDTV
 KGRFT**ISRDNSKNTLY**LQMNSLRA**DTAVYYCARGAMYGNDFFY**PM**DYWGQGTT**TVSSA**STKG**
 PSV**FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF**PEPVTV**SWNSGALTSGVHTF**PAVLQSSGLYSLSSVV
 TVPSSSLGT**QTYICNVN**HKPSNT**KVDKKV**EPKSCDKTH**TCPPCP**AP**ELLGGPSV**FLFPPKPKDT
 LMI**ISRTPEVTCVV**DVSHEDPEVKFNWYV**DGVEVHNA**TKPREEQYASTYRVVSVLT**VLHQDWL**
 NGKEYKCKVSNKALPAPI**EKTISKA**GQPREPQV**YTLPPSRDEL**TKN**QVSLT**CLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNY**KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD**KSRW**QQGNVF**SCSV**MHEGLHNHYT**QKSL
 LSPGK

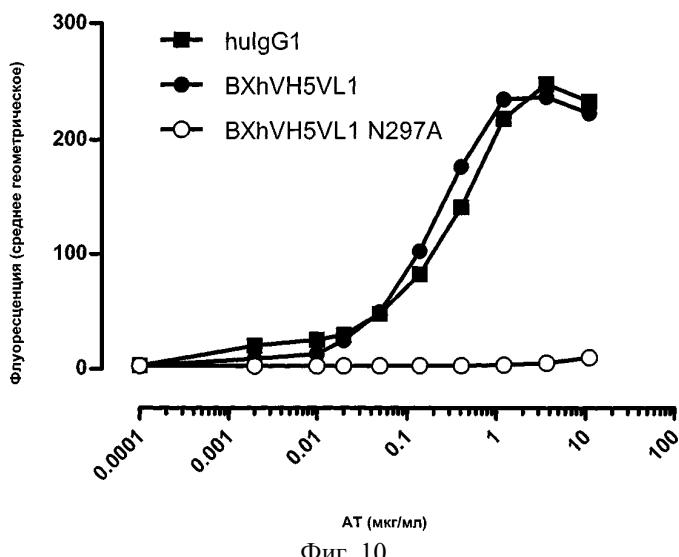
Фиг. 7



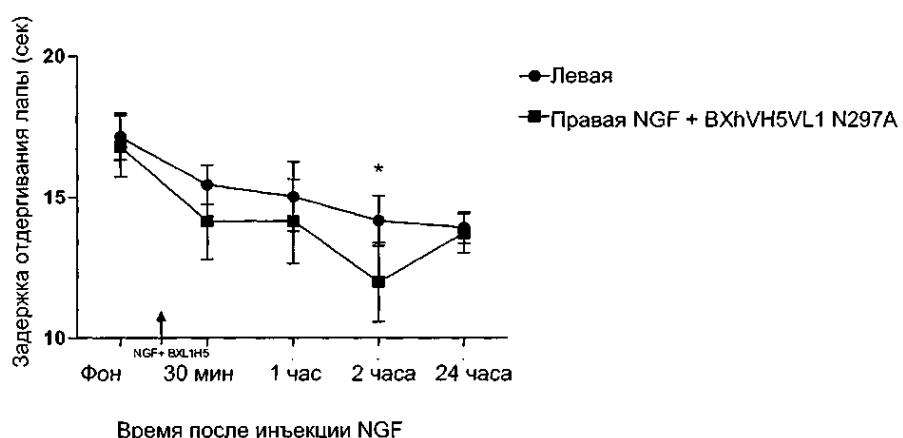
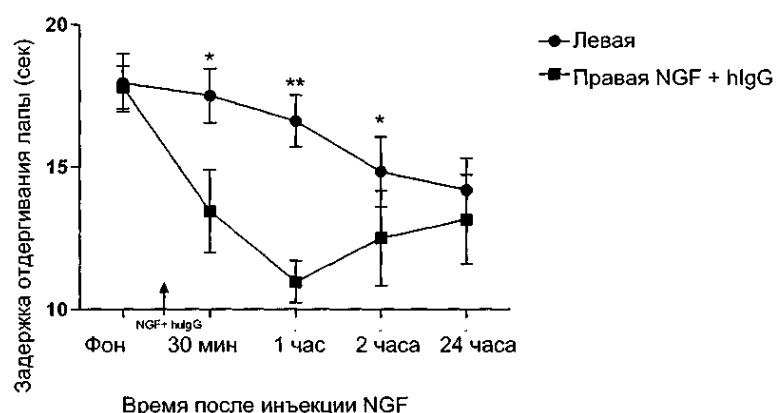
ФИГ. 8



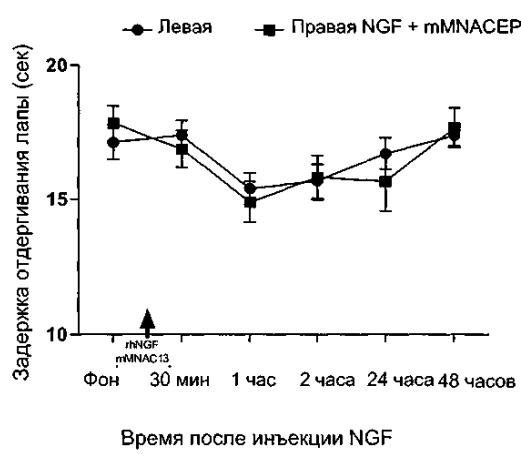
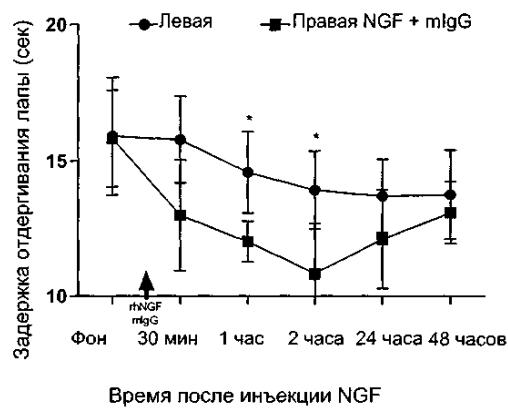
ФИГ. 9



Фиг. 10

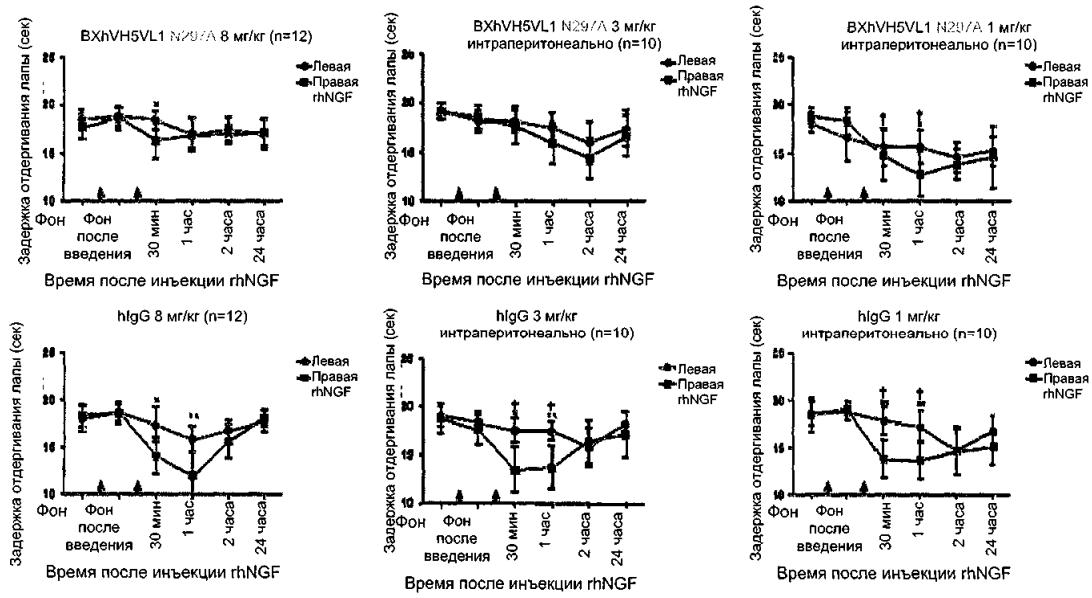


Фиг. 11



Время после инъекции NGF

Фиг. 12



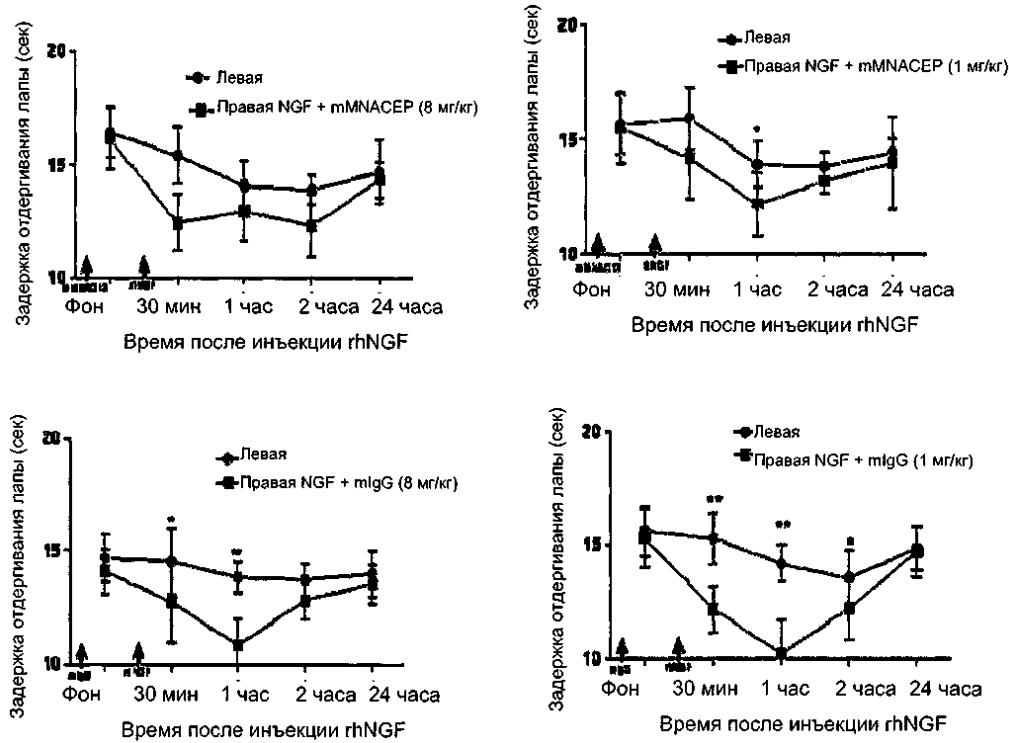
* p<0.05, двусторонний критерий Стьюдента, после

введения по сравнению с правой лапой

** p<0.01, двусторонний критерий Стьюдента, после

введения по сравнению с левой лапой

Фиг. 13



Фиг. 14



Евразийская патентная организация, ЕАПО

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2