УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **115960** (13) **C2**

(51) МПК (2017.01)
***A61K 39/395*** (2006.01)
***C07K 16/22*** (2006.01)
***G01N 33/577*** (2006.01)
***C12N 5/10*** (2006.01)
A61P 25/00

**МІНІСТЕРСТВО ЕКОНОМІЧНОГО РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ УКРАЇНИ**

# (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2011 09302**

(22) Дата подання заявки: **15.07.2004**

(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.01.2018**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **60/487,431**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **15.07.2003**

(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US**

(41) Публікація відомостей про заявку: **26.12.2011, Бюл.№ 24**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.01.2018, Бюл.№ 2**

(62) Номер та дата подання попередньої заявки, з якої виділено заявку, позначену кодом (21): **, a200601428, 15.07.2004**

(72) Винахідник(и):
**Уайлд Кеннет Д. (UA),**
**Трінор Джеймс Дж. С. (UA),**
**Хуань Хайчунь (UA),**
**Іну Хезер (UA),**
**Чжан Тай Дж. (UA),**
**Мартін Френк (UA)**

(73) Власник(и):
**ЕМДЖЕН, ІНК.,**,
One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA 91320-1799, USA (US),
**Е.Р. Сквібб & Санз, Л.Л.К.**,
Route 206 & Province Line Road, Princeton, NJ 08540, USA (US)

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 02/096458 A, 05.12.2002
WO 01/78698 A, 25.10.2001
US 2001/046959 A1, 29.11.2001

UA 115960 C2

## (54) ЛЮДСЬКІ АНТИ-NGF НЕЙТРАЛІЗУЮЧІ АНТИТІЛА ЯК СЕЛЕКТИВНІ ІНГІБІТОРИ МЕТАБОЛІЧНИХ ШЛЯХІВ ФАКТОРА РОСТУ НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ (NGF)

(57) Реферат:

Винахід стосується фармацевтичної композиції, яка містить фармацевтично прийнятний носій і терапевтично ефективну кількість виділеного людського антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, яке специфічно зв'язується з фактором росту нервової тканини (NGF).

Ця заявка стосується і претендує на пріоритет тимчасової заявки на патент США № 60/487,431, поданої 15 липня 2003 року, розкриття якої включено до цього опису шляхом посилання.

Галузь, до якої належить винахід

Цей винахід стосується людських моноклональних антитіл, що зв'язують фактор росту нервової тканини (NGF). Описуються також композиції та способи лікування болю та розладів, пов'язаних із болем.

Передумови створення винаходу

Кожного дня у Сполучених Штатах хронічний біль позбавляє працездатності більше двох мільйонів людей (Джессел (Jessell), Келлі (Kelly), 1991, "Pain and Analgesia" in PRINCIPLES OF NEURAL SCIENCE, 3 видання, (редактори Кандел (Kandel), Шварц (Schwartz), Джессел (Jessell)), Elsevier, Нью-Йорк). На жаль, існуючі способи лікування болю мають лише часткову ефективність і багато з цих способів лікування самі по собі спричинюють ослаблення здоров'я або мають небезпечні побічні ефекти. Наприклад, незважаючи на те, що такі нестероїдні протизапальні лікарські засоби ("NSAIDs") як аспірин, ібупрофен та індометацин, є помірно ефективними проти запального болю, вони також є нирковими токсинами, і високі дози цих засобів є спричиненням подразнення шлунково-кишкового тракту, виникнення виразок, кровотеч та появи сплутаності свідомості. Хворі, ліковані опіоїдами, також часто відчувають сплутаність свідомості, а тривале застосування опіоїдів пов'язується із звичністю та залежністю. Місцеві анестезуючі засоби, наприклад, лідокаїн та мексілетин, одночасно пригнічують біль і викликають втрату нормальної чутливості.

Біль являє собою відчуття, основу якого становлять сигнали, що надходять із навколишнього середовища, а передаються і інтерпретуються нервовою системою (дивись оглядову статтю Міллан (Millan), 1999, Prog. Neurobiol. 57:1-164). Шкідливі подразники, наприклад, тепло та торкання, примушують спеціалізовані чутливі нервові закінчення у шкірі надсилати сигнали до центральної нервової системи ("ЦНС"). Цей процес називають сприйняттям болю, а периферичні чутливі нейрони, що його опосередковують, носять назву ноці(ре)цепторів (больових рецепторів). Залежно від інтенсивності сигналу від ноціцептора(ів) та виділення і обробки цього сигналу ЦНС, особа може сприйняти або може не сприйняти шкідливий подразник як больовий. Коли сприйняття болю особою відповідним чином співвідноситься з інтенсивністю подразника, біль виконує призначену йому захисну функцію. Однак пошкодження тканин певних типів викликає явище, відоме як гіпералгезія або підвищена больова чутливість, у разі якої відносно нешкідливі подразники сприймаються як сильно болючі, оскільки больовий поріг особи знизився. Гіпералгезія може викликатись як запальним пошкодженням, так і пошкодженням нервової тканини. Особи, уражені запальними станами, наприклад сонячною еритемою, остеоартритом, колітом, кардитом, дерматитом, міозитом, невритом, дифузною хворобою сполучної тканини судин (яка включає ревматоїдний артрит і вовчак) тощо, часто відчувають посилене сприйняття болю. Подібним же чином травма, хірургічне втручання, ампутація, абсцес, каузалгія, дифузна хвороба сполучної тканини судин, демієлінізуюче захворювання, невралгія трійчастого нерва, рак, хронічний алкоголізм, інсульт, таламічний больовий синдром, діабет, герпетичні інфекції, синдром набутого імунодефіциту ("СНІД"), стан, спричинений токсинами, та стан, спричинений хіміотерапією, спричиняють пошкодження нервової тканини, наслідком чого є надмірний біль.

Оскільки механізми передачі ноціцепторами зовнішніх сигналів за нормальних та гіпералгетичних умов стають краще зрозумілими, на процеси, залучені до гіпералгезії, можна цілеспрямовано впливати для запобігання зниженню больового порогу і, таким чином, зниженню інтенсивності болю, що сприймається.

Було показано, що нейротрофні фактори відіграють значну роль у передачі фізіологічного та патологічного болю. Особливо важливим видається фактор росту нервової тканини (NGF) (дивись оглядові статті Макмагон (McMahon), 1996, Phil Trans. R. Soc. Lond. 351:431-440; та Апфел (Apfel), 2000, The Clinical Journal of Pain 16:S7-S11). Було показано, що як місцеве, так і системне введення NGF викликає гіпералгезію і алодинію (Левін (Lewin) та інші, 1994, Eur. J. Neurosci. 6:1903-1912). Внутрішньовенне вливання NGF викликає у людей міалгію усього тіла, у той час як місцеве введення, окрім системних ефектів, спричинює гіпералгезію і алодинію на місці ін'єкції (Апфел (Apfel) та інші, 1998, Neurology 51:695-702). Значний обсяг даних вказує також на причетність ендогенного NGF до станів, головною особливістю яких є біль. Наприклад, активація NGF спостерігається у шваннівських клітинах гангліїв задніх корінців головного мозку (DRG) впродовж щонайменше 2 місяців після пошкодження периферичної нервової тканини. Повідомляли про підвищені рівні NGF у суглобах тварин, що страждають від різноманітних моделей артриту (наприклад, Алоу (Aloe) та інші, 1993, Growth Factors 2:149-155). Щодо людей,

то рівні NGF підвищені у синовіальній рідині хворих на ревматоїдний артрит або артрити інших типів (наприклад, Алоу (Aloe) та інші, 1992, Arthritis and Rheumatism 35:351-355). Окрім того, було показано, що антагонізм функції NGF запобігає виникненню гіпералгезії та алодинії, на моделях невропатичного та хронічного запального болю. Наприклад, на тваринних моделях невропатичного болю (наприклад, перев'язка нервового стовбура або спинномозкового нерва) системна ін'єкція NGF-нейтралізуючих антитіл запобігає виникненню як алодинії, так і гіпералгезії (Ремер (Ramer) та інші, 1999, Eur. J. Neurosci. 11:837-846; та Ро (Ro) та інші, 1999, Pain 79:265-274). Приклади анти-NGF антитіл, відомих у цій галузі, наведені, наприклад, у публікаціях WO 01/78698, WO 01/64247, WO 02/096458 та WO 2004/032870; патентах США № 5,844,092, № 5,877,016 та № 6,153,189; Хонго (Hongo) та інші, 2000, Hybridoma 19:215-227; Хонго (Hongo) та інші, 1993, Cell. Mol. Biol. 13:559-568; депонуваннях GenBank'у № U39608, № U39609, № L17078 або № L17077.

Зрозуміло, що існує потреба у нових безпечних та ефективних способах лікування болю, зокрема, шляхом цільового впливу на медіатори або загострювачі болю невеликої молекулярної маси, наприклад, NGF.

Короткий виклад суті винаходу

Цей винахід пропонує нові людські моноклональні антитіла, що є терапевтично придатними для зняття болю. Зокрема, цей винахід пропонує моноклональні антитіла, що зв'язуються з фактором росту нервової тканини (NGF). За варіантом, якому віддають перевагу, згаданими моноклональними антитілами є людські моноклональні антитіла, що нейтралізують біологічні активності NGF і є придатними для поліпшення ефектів NGF-опосередкованих больових реакцій. Цим винаходом пропонуються також клітини, що продукують і, за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, секретують до культуральних середовищ моноклональні антитіла за цим винаходом. Окрім їх застосування для лікування та зняття болю, антитіла за цим винаходом є придатними для лікування реакцій, пов'язаних з невропатичним та запальним болем.

Цей винахід додатково пропонує гібридні білки, що містять послідовність Fc-ділянки антитіла і одну або декілька послідовностей, позначених як ПОСЛІДОВНІСТЬ № 10, ПОСЛІДОВНІСТЬ № 12, ПОСЛІДОВНІСТЬ № 14, ПОСЛІДОВНІСТЬ № 16, ПОСЛІДОВНІСТЬ № 18, ПОСЛІДОВНІСТЬ № 20, ПОСЛІДОВНІСТЬ № 22 і ПОСЛІДОВНОСТІ № 79-130. Такі молекули можна одержати за допомогою способів, описаних, наприклад, у публікації міжнародної заявки WO 00/24782, яку включено до цього опису шляхом посилання. Такі молекули можуть експресуватись, наприклад, у клітинах ссавців (наприклад, у клітинах яєчника китайського хом'ячка) або бактеріальних клітинах (наприклад, у клітинах E. coli).

За певними аспектами, цей винахід пропонує антитіла, за варіантом, якому віддають перевагу, моноклональні антитіла, за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, людські антитіла і людські моноклональні антитіла, що містять важкий ланцюг і легкий ланцюг, де згаданий важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 2, ПОСЛІДОВНІСТЮ № 4 або ПОСЛІДОВНІСТЮ № 6, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент, а варіабельна ділянка важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 10, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент. За варіантом, якому віддають перевагу, важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 4.

За певними аспектами, цей винахід пропонує антитіла, за варіантом, якому віддають перевагу, людські антитіла, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, моноклональні антитіла, за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, людські моноклональні антитіла, що містять важкий ланцюг і легкий ланцюг, де згаданий важкий ланцюг містить константну ділянку важкого ланцюга, вибрану з групи, що включає константні ділянки важкого ланцюга IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA та IgE або будь-який їхній алельний варіант (як обговорюється у роботі Кабат (Kabat) та інших, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, п'яте видання, U.S.Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, що включена до цього опису шляхом посилання), а варіабельна ділянка важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 10, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент. За варіантом, якому віддають перевагу, антитіло за цим винаходом містить амінокислотну послідовність константної ділянки важкого ланцюга IgG2, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 4, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент.

За певними аспектами, цей винахід пропонує антитіла, за варіантом, якому віддають перевагу, людські антитіла, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, моноклональні

антитіла, за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, людські моноклональні антитіла, що містять важкий ланцюг і легкий ланцюг, де згаданий легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 8, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент, а варіабельна ділянка легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 12, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент.

За певними аспектами, антитіла за цим винаходом містять важкий ланцюг і легкий ланцюг, де варіабельна ділянка згаданого важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 10, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент. За іншими аспектами, варіабельна ділянка згаданого легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 12, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент. За додатковими аспектами, важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 14, ПОСЛІДОВНІСТЮ № 18 або ПОСЛІДОВНІСТЮ № 20, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент. За ще іншими додатковими аспектами, легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену будь-якою з ПОСЛІДОВНОСТІ № 16, ПОСЛІДОВНОСТІ № 20, ПОСЛІДОВНОСТІ № 24, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент.

Цей винахід пропонує також антитіла, що специфічно зв'язуються з NGF, важкий ланцюг яких містить варіабельну ділянку, що містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 10, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент, а легкий ланцюг містить варіабельну ділянку, що містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 12, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент.

Цей винахід додатково пропонує виділені людські антитіла, що специфічно зв'язуються з NGF, де згадані антитіла містять:

(a) важкий ланцюг, де варіабельна ділянка згаданого важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 79, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент, і легкий ланцюг, де варіабельна ділянка згаданого легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 80, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент;

(b) важкий ланцюг, де варіабельна ділянка згаданого важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 81, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент, і легкий ланцюг, де варіабельна ділянка згаданого легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 82, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент;

(c) важкий ланцюг, де варіабельна ділянка згаданого важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 83, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент, і легкий ланцюг, де варіабельна ділянка згаданого легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 84, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент; або

(d) важкий ланцюг, де варіабельна ділянка згаданого важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 86, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент, і легкий ланцюг, де варіабельна ділянка згаданого легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 87, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент.

За певними аспектами, цей винахід пропонує також антитіла, що містять важкий ланцюг і легкий ланцюг, де згаданий важкий ланцюг містить варіабельну ділянку важкого ланцюга і де варіабельна ділянка згаданого важкого ланцюга містить послідовність, що має щонайменше 75 %, за варіантом, якому віддають перевагу, 80 %, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, щонайменше 85 %, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % і, за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, приблизно 99 % ідентичність з амінокислотною послідовністю, представленою ПОСЛІДОВНІСТЮ № 10, і де згаданий легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, і де варіабельна ділянка згаданого легкого ланцюга містить послідовність, що має

щонайменше 80 %, за варіантом, якому віддають перевагу, щонайменше 85 %, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % і, за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, приблизно 99 % ідентичність з амінокислотною послідовністю, представленою ПОСЛІДОВНІСТЮ № 12, де згадане антитіло специфічно зв'язується з NGF.

Цей винахід пропонує також антитіла, що специфічно зв'язуються з NGF, важкий ланцюг яких містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 14, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент, а легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 16, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент.

За певними аспектами, цей винахід пропонує антитіла, що містять важкий ланцюг і легкий ланцюг, де згаданий важкий ланцюг містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, і де варіабельна ділянка згаданого важкого ланцюга містить послідовність, що має щонайменше 75 %, за варіантом, якому віддають перевагу, 80 %, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, щонайменше 85 %, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % і за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, приблизно 99 % ідентичність з амінокислотною послідовністю, представленою будь-якою з ПОСЛІДОВНОСТІ № 14, ПОСЛІДОВНОСТІ № 18, ПОСЛІДОВНОСТІ № 22, і де згаданий легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, і де варіабельна ділянка згаданого легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 80 %, за варіантом, якому віддають перевагу, щонайменше 85 %, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % і, за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, приблизно 99 % ідентичність з амінокислотною послідовністю, представленою ПОСЛІДОВНІСТЮ № 16, де згадане антитіло специфічно зв'язується з NGF.

Цей винахід пропонує також одноланцюгові антитіла, одноланцюгові Fv антитіла, F(ab) антитіла, F(ab)' антитіла і $(Fab')_2$ антитіла.

За конкретними аспектами, цей винахід пропонує легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 16, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент.

На додаток до цього, цей винахід пропонує важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, представлену будь-якою з ПОСЛІДОВНОСТІ № 14, ПОСЛІДОВНОСТІ № 18 або ПОСЛІДОВНОСТІ № 22, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент.

Цей винахід має також відношення до виділених людських антитіл, що специфічно зв'язують NGF, де згадане антитіло містить: (a) остовні ділянки людського важкого ланцюга, CDR1 ділянку людського важкого ланцюга, CDR2 ділянку людського важкого ланцюга та CDR3 ділянку людського важкого ланцюга; і (b) остовні ділянки людського легкого ланцюга, CDR1 ділянку людського легкого ланцюга, CDR2 ділянку людського легкого ланцюга та CDR3 ділянку людського легкого ланцюга. За певними аспектами, CDR1 ділянка людського важкого ланцюга може бути CDR1 ділянкою важкого ланцюга моноклонального антитіла (mAb), позначеного 4D4, як показано ПОСЛІДОВНІСТЮ № 22, а CDR1 ділянка людського легкого ланцюга може бути CDR1 ділянкою легкого ланцюга моноклонального антитіла 4D4, як показано ПОСЛІДОВНІСТЮ № 24. За іншими аспектами, CDR2 ділянка людського важкого ланцюга може бути CDR2 ділянкою важкого ланцюга моноклонального антитіла 4D4, як показано ПОСЛІДОВНІСТЮ № 18, а CDR2 ділянка людського легкого ланцюга може бути CDR2 ділянкою легкого ланцюга моноклонального антитіла 4D4, як показано ПОСЛІДОВНІСТЮ № 20. За ще іншими аспектами, CDR3 ділянка людського важкого ланцюга є CDR3 ділянкою важкого ланцюга моноклонального антитіла 4D4, як показано ПОСЛІДОВНІСТЮ № 14, а CDR3 ділянка людського легкого ланцюга є CDR3 ділянкою легкого ланцюга моноклонального антитіла 4D4, як показано ПОСЛІДОВНІСТЮ № 16.

Цей винахід пропонує також виділені людські антитіла, що специфічно зв'язують фактор росту нервової тканини, які містять важкий ланцюг і легкий ланцюг, де згаданий важкий ланцюг містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 10, ПОСЛІДОВНІСТЮ № 79, ПОСЛІДОВНІСТЮ № 81, ПОСЛІДОВНІСТЮ № 83, ПОСЛІДОВНІСТЮ № 85 або ПОСЛІДОВНІСТЮ № 87, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент.

Цей винахід додатково пропонує виділені людські антитіла, що специфічно зв'язують NGF, які містять важкий ланцюг і легкий ланцюг, де згаданий легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 12, ПОСЛІДОВНІСТЮ № 80, ПОСЛІДОВНІСТЮ № 82, ПОСЛІДОВНІСТЮ

№ 84, ПОСЛІДОВНІСТЮ № 86, ПОСЛІДОВНІСТЮ № 88, ПОСЛІДОВНІСТЮ № 89, ПОСЛІДОВНІСТЮ № 90, ПОСЛІДОВНІСТЮ № 91 або ПОСЛІДОВНІСТЮ № 131, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент.

Антитіла за цим винаходом характеризуються здатністю антагонізувати щонайменше одну in vitro та/або in vivo активність, пов'язану з NGF поліпептидами. За варіантом, якому віддають перевагу, цей винахід пропонує виділені людські антитіла проти людського NGF з високою спорідненістю зв'язування з NGF поліпептидами, де згадані антитіла зв'язуються з людським NGF поліпептидом і відділяються від людського NGF поліпептиду з константою дисоціації ($K_D$) приблизно $50\times10^{-12}$ М або менше, як визначається за допомогою KinExA, або які пригнічують NGF-індуковану виживаність у in vitro реакції нейтралізації з $IC_{50}$ приблизно $1\times10^{-8}$ М або менше.

За варіантом, якому віддають перевагу, цей винахід пропонує виділене людське антитіло проти людського NGF, що має наведені нижче характеристики:

a) пригнічує NGF-індуковану виживаність у in vitro реакції нейтралізації з $IC_{50}$ приблизно $1\times10^{-9}$ М або менше;

b) має CDR3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 14; і

c) має CDR3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 16.

Цей винахід пропонує також виділені людські антитіла або їх антигензв'язувальні чи імунологічно функціональні імуноглобулінові фрагменти, що специфічно зв'язуються з NGF з високою спорідненістю, де згадані антитіла або фрагменти відділяються від людського NGF поліпептиду з $K_D$ приблизно $1\times10^{-9}$ або менше і нейтралізують біологічну активність людського NGF у стандартній in vitro реакції з $IC_{50}$ приблизно $1\times10^{-8}$ М або менше, і де антитіла або фрагменти містять варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить:

a) CDR1 ділянку, що містить амінокислотну послідовність формули:

$a^1a^2a^3a^4a^5$,

де:

$a^1$ - полярний гідрофільний амінокислотний залишок; $a^2$ - ароматичний амінокислотний залишок; $a^3$ - аліфатичний, полярний гідрофобний, ароматичний амінокислотний залишок; $a^4$ - нейтральний гідрофобний або аліфатичний амінокислотний залишок; і $a^5$ - аліфатичний або полярний гідрофільний амінокислотний залишок;

b) CDR2 ділянку, що містить амінокислотну послідовність формули:

$b^1b^2b^3b^4b^5b^6b^7b^8b^9b^{10}b^{11}b^{12}b^{13}b^{14}b^{15}b^{16}b^{17}$,

де:

$b^1$ - аліфатичний, полярний гідрофобний або ароматичний амінокислотний залишок; $b^2$ - аліфатичний гідрофобний амінокислотний залишок; $b^3$ - полярний гідрофільний або ароматичний амінокислотний залишок; $b^4$ - полярний гідрофільний, гідрофобний або ароматичний амінокислотний залишок; $b^5$-$b^9$, незалежно одна від одної, являють собою полярні гідрофільні або аліфатичні амінокислотні залишки; $b^{10}$ - полярний гідрофільний, ароматичний або аліфатичний амінокислотний залишок; $b^{11}$ - ароматичний або гідрофобний амінокислотний залишок; $b^{12}$ - аліфатичний гідрофобний або полярний гідрофільний амінокислотний залишок; $b^{13}$ - аліфатичний, гідрофобний або полярний гідрофільний амінокислотний залишок; $b^{14}$ і $b^{16}$, незалежно одна від одної, являють собою полярні гідрофільні амінокислотні залишки; $b^{15}$ - аліфатичний або ароматичний гідрофобний амінокислотний залишок; і $b^{17}$ - аліфатичний кислий амінокислотний залишок; і

c) CDR3 ділянку, що містить амінокислотну послідовність формули:

$c^1c^2c^3c^4c^5c^6c^7c^8c^9c^{10}c^{11}c^{12}c^{13}c^{14}c^{15}c^{16}c^{17}$, де:

$c^1$ - відсутня або являє собою аліфатичний амінокислотний залишок; $c^2$ - відсутня або являє собою полярний гідрофільний або ароматичний гідрофобний амінокислотний залишок; $c^3$ і $c^4$, незалежно одна від одної, відсутні або являють собою полярні гідрофільні, ароматичні гідрофобні або аліфатичні амінокислотні залишки; $c^5$ - відсутня або являє собою полярний гідрофільний, аліфатичний або ароматичний амінокислотний залишок; $c^6$ - відсутня або являє собою полярний гідрофільний або аліфатичний амінокислотний залишок; $c^7$ - полярний гідрофільний або аліфатичний амінокислотний залишок; $c^8$ - полярний гідрофільний, гідрофобний або ароматичний амінокислотний залишок; $c^9$ - полярний гідрофільний, ароматичний гідрофобний або аліфатичний гідрофобний амінокислотний залишок; $c^{10}$ - полярний гідрофільний, ароматичний гідрофобний або аліфатичний гідрофобний амінокислотний залишок; $c^{11}$-$c^{13}$, незалежно одна від одної, являють собою полярні гідрофільні або ароматичні гідрофобні амінокислотні залишки; $c^{14}$ - аліфатичний або ароматичний гідрофобний амінокислотний залишок; $c^{15}$ - полярний гідрофільний або нейтральний

гідрофобний амінокислотний залишок; $c^{16}$ - відсутня або являє собою полярний гідрофільний амінокислотний залишок; і $c^{17}$ - ароматичний гідрофобний або аліфатичний гідрофобний амінокислотний залишок.

За одним аспектом, $a^1$ - полярний гідрофільний амінокислотний залишок; $a^2$ - ароматичний гідрофобний амінокислотний залишок; $a^3$ - аліфатичний гідрофобний амінокислотний залишок; $a^4$ - нейтральний гідрофобний амінокислотний залишок; $a^5$ - полярний гідрофільний амінокислотний залишок; $b^1$ - аліфатичний або ароматичний амінокислотний залишок; $b^2$ - Ile; $b^3$ - полярний гідрофільний амінокислотний залишок; $b^4$ - полярний гідрофільний або ароматичний амінокислотний залишок; $b^5$-$b^9$, незалежно одна від одної, являють собою полярні гідрофільні або аліфатичні амінокислотні залишки; $b^{10}$ - аліфатичний амінокислотний залишок; $b^{11}$ - Tyr; $b^{12}$ - аліфатичний гідрофобний амінокислотний залишок; $b^{13}$ - аліфатичний або полярний гідрофільний амінокислотний залишок; $b^{14}$ і $b^{16}$, незалежно одна від одної, являють собою полярні гідрофільні амінокислотні залишки; і $b^{15}$ - аліфатичний гідрофобний амінокислотний залишок; $b^{17}$ - аліфатичний кислий амінокислотний залишок; $c^1$ - відсутня або являє собою аліфатичний амінокислотний залишок; $c^2$ - відсутня або являє собою полярний гідрофільний або ароматичний гідрофобний амінокислотний залишок; $c^3$ і $c^4$, незалежно одна від одної, відсутні або являють собою полярні гідрофільні, ароматичні гідрофобні або аліфатичні амінокислотні залишки; $c^5$ - відсутня або являє собою полярний гідрофільний амінокислотний залишок; $c^6$ - відсутня або являє собою полярний гідрофільний або аліфатичний амінокислотний залишок; $c^7$ - полярний гідрофільний або аліфатичний амінокислотний залишок; $c^8$ - полярний гідрофільний, гідрофобний або ароматичний амінокислотний залишок; $c^9$ - полярний гідрофільний, аліфатичний або ароматичний гідрофобний амінокислотний залишок; $c^{10}$ - полярний гідрофільний, ароматичний гідрофобний або аліфатичний гідрофобний амінокислотний залишок; $c^{11}$-$c^{13}$, незалежно одна від одної, являють собою полярні гідрофільні або ароматичні гідрофобні амінокислотні залишки; $c^{14}$ - аліфатичний або ароматичний гідрофобний амінокислотний залишок; $c^{15}$ - полярний гідрофільний або нейтральний гідрофобний амінокислотний залишок; $c^{16}$ - відсутня або являє собою полярний гідрофільний амінокислотний залишок; і $c^{17}$ - ароматичний гідрофобний або аліфатичний гідрофобний амінокислотний залишок.

За конкретним аспектом, $a^1$ - Ser, Asp або Thr; $a^2$ - Tyr; $a^3$ - Ala, Ser, Trp або Gly; $a^4$ - Met або Ile; $a^5$ - His, Gly або Asn; $b^1$ - Tyr, Gly, Ile або Asp; $b^2$ - Ile; $b^3$ - Ser, Thr, Tyr або Asn; $b^4$ - Trp, Arg або Pro; $b^5$ - Ser, Asn або Gly; $b^6$ - Ser, Arg, Asp або Gly; $b^7$ - Ser, His або Gly; $b^8$ - Ser, Ile, Asp або Thr; $b^9$ - Leu, Ile або Thr; $b^{10}$ - Gly, Lys або Phe; $b^{11}$ - Tyr; $b^{12}$ - Ala або Ser; $b^{13}$ - Asp, Gly або Pro; $b^{14}$ - Ser; $b^{15}$ - Val або Phe; $b^{16}$ - Lys або Gln; $b^{17}$ - Gly; $c^1$ - відсутня або являє собою аліфатичний амінокислотний залишок; $c^2$ - відсутня або являє собою Tyr; $c^3$ та $c^4$, незалежно одна від одної, відсутні або являють собою Tyr, Asn, Val або Glu; $c^5$ - відсутня або являє собою Ser, Gly або Trp; $c^6$ - відсутня або являє собою Ser, Gly, Glu або Leu; $c^7$ - Gly, Arg або Asp; $c^8$ - Trp, Pro, Ser або Thr; $c^9$ - His, Gly або Tyr; $c^{10}$ - Val, Tyr або Arg; $c^{11}$-$c^{13}$, незалежно одна від одної, являють собою Ser, Phe, Tyr, Asp або Asn; $c^{14}$ - Phe, Val або Gly; $c^{15}$ - Met або Asp; $c^{16}$ - відсутня або являє собою Asp або Asn; і $c^{17}$ - Tyr або Val.

За іншим конкретним аспектом, $a^1$ - Ser або Asp; $a^2$ - Tyr; $a^3$ - Ala або Ser; $a^4$ - Met або Ile; $a^5$ - His або Asn; $b^1$ - Tyr або Gly; $b^2$ - Ile; $b^3$ - Ser, Thr, Tyr або Asn; $b^4$ - Trp, Arg або Pro; $b^5$ - Ser або Asn; $b^6$ - Ser або Arg; $b^7$ – His або Gly; $b^8$ - Ile або Thr; $b^9$ - Leu, Ile або Thr; $b^{10}$ - Gly або Phe; $b^{11}$ - Tyr; $b^{12}$ - Ala або Ser; $b^{13}$ - Asp або Gly; $b^{14}$ - Ser; $b^{15}$ - Val або Phe; $b^{16}$ - Lys або Gln; $b^{17}$ - Gly; $c^1$ - відсутня або являє собою Gly; $c^2$ - відсутня або являє собою Tyr; $c^3$ та $c^4$, незалежно одна від одної, відсутні або являють собою Tyr, Gly або Val; $c^5$ відсутня або являє собою Ser; $c^6$ - Ser або Gly; $c^7$ - Gly або Arg; $c^8$ - Trp або Pro; $c^9$ - His, Gly або Tyr; $c^{10}$ - Val або Tyr; $c^{11}$-$c^{13}$, незалежно одна від одної, являють собою Ser, Tyr, Phe або Asp; $c^{14}$ - Phe або Val; $c^{15}$ - Met або Asp; $c^{16}$ відсутня або являє собою Asp; і $c^{17}$ - Tyr або Val. За іншими конкретними аспектами:

a) CDR1 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 22, CDR2 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 18, і CDR3 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 14;

b) CDR1 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 92, CDR2 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 93, і CDR3 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 94;

c) CDR1 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 98, CDR2 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність,

представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 99, і CDR3 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 100;

d) CDR1 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 104, CDR2 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 105, і CDR3 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 106;

e) CDR1 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 110, CDR2 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 111, і CDR3 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 112;

f) CDR1 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 116, CDR2 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 117, і CDR3 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 118.

Цей винахід пропонує також виділене людське антитіло або його антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент, що специфічно зв'язується з NGF, де згадане антитіло або фрагмент містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить:

a) CDR1 ділянку, що містить амінокислотну послідовність формули:

$a^1a^2a^3a^4a^5a^6a^7a^8a^9a^{10}a^{11}a^{12}$,

де:

$a^1$ - полярний гідрофільний амінокислотний залишок; $a^2$, $a^{11}$ і $a^{12}$, незалежно одна від одної, являють собою аліфатичні або гідрофобні амінокислотні залишки; $a^3$, $a^5$, $a^7$ і $a^8$, незалежно одна від одної, являють собою аліфатичні, полярні гідрофільні або гідрофобні амінокислотні залишки; $a^4$ - полярний гідрофільний амінокислотний залишок; $a^6$ - аліфатичний або гідрофобний амінокислотний залишок; $a^9$ - відсутня або являє собою аліфатичний або полярний гідрофільний амінокислотний залишок; і $a^{10}$ - аліфатичний, ароматичний або гідрофобний амінокислотний залишок;

b) CDR2 ділянку, що містить амінокислотну послідовність формули:

$b^1b^2b^3b^4b^5b^6b^7$,

де:

$b^1$ - аліфатичний, полярний гідрофобний або гідрофобний амінокислотний залишок; $b^2$ - аліфатичний або гідрофобний амінокислотний залишок; $b^3$ та $b^4$, незалежно одна від одної, являють собою полярні гідрофільні, аліфатичні або гідрофобні амінокислотні залишки; $b^5$ - полярний гідрофільний або аліфатичний гідрофобний амінокислотний залишок; $b^6$ - полярний гідрофільний або аліфатичний гідрофобний амінокислотний залишок; і $b^7$ - полярний гідрофільний амінокислотний залишок; і

c) CDR3 ділянку, що містить амінокислотну послідовність формули:

$c^1c^2c^3c^4c^5c^6c^7c^8c^9c^{10}c^{11}c^{12}c^{13}c^{14}c^{15}c^{16}c^{17}$,

де:

$c^1$ і $c^2$, незалежно одна від одної, являють собою полярні гідрофільні амінокислотні залишки; $c^3$ - полярний гідрофільний, аліфатичний або гідрофобний амінокислотний залишок; $c^4$, $c^5$ і $c^6$, незалежно одна від одної, являють собою аліфатичні, полярні гідрофільні або гідрофобні амінокислотні залишки; $c^7$ - відсутня або являє собою полярний гідрофільний або аліфатичний гідрофобний амінокислотний залишок; $c^8$ - полярний гідрофільний або гідрофобний амінокислотний залишок; і $c^9$ - полярний гідрофільний амінокислотний залишок; і де згадане антитіло або фрагмент відділяється від людського NGF поліпептиду з $K_D$ приблизно $1\times10^{-9}$ або менше і нейтралізує біологічну активність людського NGF у стандартній in vitro реакції з $IC_{50}$ приблизно $1\times10^{-8}$ М або менше.

За одним аспектом, $a^1$, $a^3$, $a^4$, $a^7$ і $a^8$, незалежно одна від одної, являють собою полярні гідрофільні амінокислотні залишки; $a^2$, $a^6$, $a^{11}$ і $a^{12}$, незалежно одна від одної, являють собою аліфатичні гідрофобні амінокислотні залишки; $a^5$ - полярний гідрофільний або аліфатичний амінокислотний залишок; $a^9$ - відсутня або являє собою аліфатичний або полярний гідрофільний амінокислотний залишок; $a^{10}$ - аліфатичний або ароматичний амінокислотний залишок; $b^1$ - аліфатичний, полярний гідрофобний або гідрофобний амінокислотний залишок; $b^2$ - аліфатичний гідрофобний амінокислотний залишок; $b^3$, $b^4$ і $b^7$, незалежно одна від одної, являють собою полярні гідрофільні амінокислотні залишки; $b^5$ і $b^6$, незалежно одна від одної, являють собою полярні гідрофільні або аліфатичні гідрофобні амінокислотні залишки; $c^1$ і $c^2$, незалежно одна від одної, являють собою полярні гідрофільні амінокислотні залишки; $c^3$ - полярний гідрофільний, аліфатичний або гідрофобний амінокислотний залишок; $c^4$, $c^5$ і $c^6$, незалежно одна від одної, являють собою аліфатичні, полярні гідрофільні або гідрофобні

амінокислотні залишки; $c^7$ - відсутня або являє собою аліфатичний гідрофобний амінокислотний залишок; $c^8$ - гідрофобний амінокислотний залишок; і $c^9$ - полярний гідрофільний амінокислотний залишок.

За конкретним аспектом, $a^1$, $a^3$, $a^4$ і $a^7$ - Arg, Ser, Gln та Ser, відповідно; $a^2$ - Ala; $a^5$ - Gly або Ser; $a^8$ - Ser або Ile; $a^9$ - відсутня, Ser або Gly; $a^{10}$ - Ala, Tyr, Trp або Phe; $b^1$ - Asp, Gly, Ala або Val; $b^2$ і $b^3$ - Ala та Ser, відповідно; $b^4$ - Ser або Asn; $b^5$ - Leu або Arg; $b^6$ - Glu, Ala або Gln; $b^7$ - Ser або Thr; $c^1$ і $c^2$ - Gln; $c^3$ - Phe, Tyr, Arg або Ala; $c^4$ - Asn, Gly або Ser; $c^5$ - Ser або Asn; $c^6$ - Tyr, Ser, Trp або Phe; $c^7$ - відсутня, Pro або His; $c^8$ - Leu, Trp, Tyr або Arg; і $c^9$ - Thr.

За іншим конкретним аспектом, $a^1$, $a^2$, $a^3$, $a^4$ і $a^7$ - Arg, Ala, Ser, Gln та Ser, відповідно; $a^5$ - Gly або Ser; $a^8$ - Ser або Ile; $a^9$ - відсутня, Ser або Gly; $a^{10}$ - Ala або Tyr; $b^1$ - Asp або Gly; $b^2$ і $b^3$ - Ala та Ser, відповідно; $b^4$ - Ser або Asn; $b^5$ - Leu або Arg; $b^6$ - Glu, Ala або Gln; $b^7$ - Ser або Thr; $c^1$ і $c^2$ - Gln; $c^3$ - Phe, Tyr, Arg або Ala; $c^4$ - Asn, Gly або Ser; $c^5$ - Ser або Asn; $c^6$ - Tyr, Ser, Trp або Phe; $c^7$ - відсутня, Pro або His; $c^8$ - Leu, Trp, Tyr або Arg; і $c^9$ - Thr.

За іншими конкретними аспектами:

a) CDR1 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 24, CDR2 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 20, і CDR3 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 16;

b) CDR1 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 95, CDR2 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 96, і CDR3 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 97;

c) CDR1 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 101, CDR2 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 102, і CDR3 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 103;

d) CDR1 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 107, CDR2 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 108, і CDR3 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 109;

e) CDR1 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 113, CDR2 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 114, і CDR3 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 115;

f) CDR1 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 119, CDR2 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 120, і CDR3 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 121;

g) CDR1 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 122, CDR2 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 123, і CDR3 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 124;

h) CDR1 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 125, CDR2 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 126, і CDR3 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 127;

i) CDR1 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 128, CDR2 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 129, і CDR3 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 130;

j) CDR1 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 132, CDR2 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 133, і CDR3 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 134.

Частиною цього винаходу є також полінуклеотидні послідовності, що кодують нові людські антитіла проти людського NGF, вектори, що містять полінуклеотидні послідовності, що кодують людські антитіла проти людського NGF, клітини-хазяї, трансформовані векторами, що містять полінуклеотиди, що кодують людські антитіла проти людського NGF, композиції, що містять людські антитіла проти людського NGF та способи її одержання та застосування.

Цей винахід пропонує також способи визначення рівня NGF у біологічній пробі, що включають стадію контактування згаданої проби з антитілом за цим винаходом або його антигензв'язувальним фрагментом. Анти-NGF антитіло за цим винаходом може застосовуватись у будь-якому відомому аналітичному методі, наприклад, реакціях конкурентного зв'язування, прямих та непрямих сендвіч-методах, методах імунопреципітації та твердофазному імуноферментному аналізі (ELISA) (дивись Сола (Sola), 1987, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158, CRC Press, Inc.) для виявлення та кількісного визначення NGF. Антитіла можуть зв'язувати NGF зі спорідненістю, що відповідає застосованому аналітичному методу.

На додаток до цього, цей винахід пропонує способи лікування захворювання, пов'язаного з підвищеним продукуванням NGF або підвищеною чутливістю до NGF, що включають стадію введення фармацевтично ефективної кількості фармацевтичної композиції, що містить щонайменше одне антитіло за цим винаходом або його антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент, індивіду, який цього потребує.

Конкретні варіанти здійснення цього винаходу, яким віддають перевагу, стануть очевидними з наведеного нижче докладнішого опису певних варіантів здійснення цього винаходу, яким віддають перевагу, та формули винаходу.

Короткий опис фігур

На Фіг. 1 зображені графіки, що демонструють нейтралізацію активності NGF у реакції нейтралізації на основі нейронів DRG моноклональними антитілами 4D4, очищеними з кондиціонованих середовищ для гібридом.

На Фіг. 2 зображені графіки, що демонструють експресію VR1, стимульовану активністю людського NGF і нейтралізацію активності NGF у реакціях нейтралізації на основі нейронів DRG анти-NGF моноклональним антитілом (4D4), очищеним із кондиціонованих середовищ для гібридом.

На Фіг. 3 зображені графіки, що демонструють нейтралізацію активності NGF у реакціях нейтралізації на основі нейронів DRG тимчасово експресованими рекомбінантними моноклональними анти-NGF антитілами 4D4, експресованими як IgG1 або IgG2 та у клітинах, вирощених у ролерній культурі (R) або у спін-культурі (S).

На Фіг. 4 зображений порівняльний аналіз послідовностей нейротрофінів. Цифрові позначення та елементи вторинної структури над послідовностями відносяться до зрілого людського NGF. Консервативні залишки помічені зірочкою, а ділянки з низькою гомологією послідовностей заштриховані. Людський NGF - ПОСЛІДОВНІСТЬ № 135; мишачий NGF - ПОСЛІДОВНІСТЬ № 136; BDNF -№ 137; NT3 - ПОСЛІДОВНІСТЬ № 138.

На Фіг. 5 зображений порівняльний аналіз і відсоток ідентичності CDR1 важкого ланцюга анти-NGF антитіл 14D10 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 98), 6H9 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 104), 7H2 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 110), 4G6 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 116), 14D11 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 92) та 4D4 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 22).

На Фіг. 6 зображений порівняльний аналіз і відсоток ідентичності CDR2 важкого ланцюга анти-NGF антитіл 14D10 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 99), 6H9 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 105), 7H2 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 111), 4G6 (ПОСЛІДОВНІСТЬ №117), 14D11 (ПОСЛІДОВНІСТЬ №93) та 4D4 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 18).

На Фіг. 7 зображений порівняльний аналіз і відсоток ідентичності CDR3 важкого ланцюга анти-NGF антитіл 14D10 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 100), 6H9 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 106), 7H2 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 112), 4G6 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 118), 14D11 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 94) та 4D4 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 14).

На Фіг. 8 зображений порівняльний аналіз і відсоток ідентичності CDR1 легкого ланцюга анти-NGF антитіл 14D10 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 95), 6H9 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 107), 7H2 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 113), 4G6a (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 119), 4G6b (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 122), 4G6c (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 125), 4G6d (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 128), 4G6e (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 132), 14D11 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 95) та 4D4 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 24) (антитіло 4G6a на різних Фігурах позначається як 20031028340; антитіло 4G6b на різних Фігурах позначається як 20031028351; антитіло 4G6c на різних Фігурах позначається як 20031071526; антитіло 4G6d на різних Фігурах позначається як 20031028344; антитіло 4G6e на різних Фігурах позначається як 20031000528).

На Фіг. 9 зображений порівняльний аналіз і відсоток ідентичності CDR2 легкого ланцюга анти-NGF антитіл 14D10 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 96), 6H9 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 108), 7H2 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 114), 4G6a (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 120), 4G6b (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 123), 4G6c (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 126), 4G6d (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 129), 4G6e (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 133), 14D11 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 96) та 4D4 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 20) (антитіло 4G6a на різних

Фігурах позначається як 20031028340; антитіло 4G6b на різних Фігурах позначається як 20031028351; антитіло 4G6c на різних Фігурах позначається як 20031071526; антитіло 4G6d на різних Фігурах позначається як 20031028344; антитіло 4G6e на різних Фігурах позначається як 20031000528).

На Фіг. 10 зображений порівняльний аналіз і відсоток ідентичності CDR3 легкого ланцюга анти-NGF антитіл 14D10 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 97), 6H9 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 109), 7H2 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 115), 4G6a (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 121), 4G6b (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 124), 4G6c (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 127), 4G6d (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 130), 4G6e (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 134), 14D11 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 97) та 4D4 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 16) (антитіло 4G6a на різних Фігурах позначається як 20031028340; антитіло 4G6b на різних Фігурах позначається як 20031028351; антитіло 4G6c на різних Фігурах позначається як 20031071526; антитіло 4G6d на різних Фігурах позначається як 20031028344; антитіло 4G6e на різних Фігурах позначається як 20031000528).

На Фіг. 11 зображений порівняльний аналіз і відсоток ідентичності легкого ланцюга анти-NGF антитіл 14D10 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 82), 6H9 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 84), 7H2 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 86), 4G6a (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 88), 4G6b (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 89), 4G6c (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 90), 4G6d (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 91), 4G6e (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 131), 14D11 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 80) та 4D4 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 12) (антитіло 4G6a на різних Фігурах позначається як 20031028340; антитіло 4G6b на різних Фігурах позначається як 20031028351; антитіло 4G6c на різних Фігурах позначається як 20031071526; антитіло 4G6d на різних Фігурах позначається як 20031028344; антитіло 4G6e на різних Фігурах позначається як 20031000528).

На Фіг. 12 зображений порівняльний аналіз і відсоток ідентичності важкого ланцюга анти-NGF антитіл 4D4 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 10), 4G6 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 87), 14D10 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 81), 14D11 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 79), 7H2 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 85) та 6H9 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 83).

Докладний опис конкретних варіантів здійснення винаходу, яким віддають перевагу

Назви розділів, що застосовуються у цьому описі, переслідують лише організаційні цілі і не повинні розглядатись як такі, що обмежують об'єкт опису. Усі посилання, згадані у цьому описі, включено до цього опису шляхом посилання для будь-якої цілі.

Визначення

Для одержання рекомбінантних ДНК, синтезу олігонуклеотидів, культивування та трансформації тканин можна вдаватись до традиційних методів (наприклад, електропорації, ліпофекції). Ферментативні реакції та методи очищення можуть здійснюватись за специфікаціями виробника, за традиційними для цієї галузі методиками або за наведеним описом. Подальші методики та процедури можуть, у цілому, здійснюватись за способами, добре відомими у цій галузі, та за описами, наведеними у різноманітних загальних та спеціалізованих джерелах, які наводяться шляхом посилання та обговорюються у цьому описі. Дивись, наприклад, довідник Сембрук (Sambrook) та інші, 2001, MOLECULAR CLONING: A LFBORATORY MANUAL, 3 видання, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк, який включено до цього опису шляхом посилання з будь-якою метою. У разі відсутності конкретних визначень, у цьому описі у зв'язку з та по відношенню до лабораторних процедур та методів аналітичної хімії, синтетичної органічної хімії, медичної та фармацевтичної хімії застосовується номенклатура, що є добре відомою і традиційно застосовуваною у цій галузі. Подібним чином, для хімічного синтезу, хімічних аналізів, одержання фармацевтичних препаратів, композицій, їх доставки та лікування хворих можуть застосовуватись традиційні методи.

Слід розуміти, що наведені нижче терміни, що вживаються у описі цього винаходу, у разі відсутності інших визначень, мають таке значення: Словосполучення "біологічна властивість", "біологічна характеристика" і термін "активність" відносно антитіла за цим винаходом застосовуються у цьому описі взаємозамінно і означають (але не обмежуються) спорідненість і специфічність відносно антигенної детермінанти (наприклад, зв'язування людського антитіла проти людського NGF з людським NGF), здатність до антагонізування активності цільового поліпептиду (наприклад, активності NGF), in vivo стабільність антитіла та імуногенні властивості антитіла. Іншими біологічними властивостями або характеристиками антитіла, що піддаються визначенню і визнаються у цій галузі, є, наприклад, перехресна реактивність (тобто з гомологами цільового поліпептиду нелюдського походження або, взагалі, з іншими білками або тканинами) і здатність до збереження високих рівнів експресії білка у клітинах ссавців. Вищезгадані властивості або характеристики можуть спостерігатись або вимірюватись за допомогою визнаних у цій галузі методів, у тому числі, але без обмеження, за допомогою

твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA), конкурентного ELISA, аналізу поверхневого плазменного резонансу, in vitro та in vivo реакцій нейтралізації (наприклад, Приклад 2) та імуногістохімічних методів зі зрізами тканин із різних джерел, у тому числі від людей, приматів або з будь-якого іншого джерела, відповідно до потреб. Конкретні активності та біологічні властивості людських антитіл проти людського NGF докладно описані у наведених нижче Прикладах.

Словосполучення "виділений полінуклеотид", що застосовується у цьому описі, означає полінуклеотид геномного, кДНК або синтетичного походження чи їх комбінації, причому, завдяки своєму походженню, згаданий виділений полінуклеотид (1) не є пов'язаним із цілим полінуклеотидом або частиною полінуклеотиду, у складі якого виділений полінуклеотид знаходиться за природних умов, (2) є зв'язаним із полінуклеотидом, з яким він не є зв'язаним за природних умов або (3) не зустрічається за природних умов, як частина більшої послідовності.

Словосполучення "виділений білок", що згадується у цьому описі, означає, що цільовий білок (1) є вільним від щонайменше деяких інших білків, з якими він знаходиться за нормальних умов, (2) є по суті вільним від інших білків з того самого джерела, наприклад, від того самого виду, (3) експресується клітиною іншого виду, (4) було відділено від щонайменше приблизно 50 відсотків полінуклеотидів, ліпідів, вуглеводів або інших матеріалів, з якими він є пов'язаним за природних умов, (5) не є зв'язаним (ковалентною або нековалентною взаємодією) з частинами білка, з якими згаданий "виділений білок" є зв'язаним за природних умов, (6) є функціонально зв'язаним (ковалентною або нековалентною взаємодією) з поліпептидом, з яким він не є зв'язаним за природних умов або (7) не зустрічається за природних умов. Такий виділений білок може кодуватись геномною ДНК, кДНК, мРНК або іншою РНК синтетичного походження чи будь-якою їх комбінацією. За варіантом, якому віддають перевагу, згаданий виділений білок є по суті вільним від білків або поліпептидів чи інших забруднювачів, що знаходяться у його природному оточенні, які могли б перешкоджати його застосуванню (терапевтичному, діагностичному, профілактичному, науково-дослідному тощо).

"Виділеним" антитілом є антитіло, яке було ідентифіковане і відділене та/або виділене зі складової його природного оточення. Забруднювальними складовими його природного оточення є матеріали, які могли б перешкодити діагностичному або терапевтичному застосуванням антитіла, і вони можуть включати ферменти, гормони та інші білкові або небілкові розчинені речовини. За варіантом, якому віддають перевагу, антитіло буде очищеним (1) до рівня, що перевищує 95 % (мас.) антитіла, що визначається за методом Лоурі, а за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, до рівня, що перевищує 99 % (мас), (2) до ступеня, достатнього для одержання щонайменше 15 залишків N-кінцевої або внутрішньої амінокислотної послідовності за допомогою секвенатора з центрифугальною чашкою, або (3) до однорідності за допомогою електрофорезу у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE) за відновних або невідновних умов із застосуванням барвника кумасі блакитного або, за варіантом, якому віддають перевагу, срібла. Виділене антитіло включає антитіло in situ у межах рекомбінантних клітин, оскільки щонайменше одна складова природного середовища антитіла буде відсутньою.

Терміни "поліпептид" або "білок" означають молекули, що мають послідовність нативних білків, тобто білків, продукованих природними клітинами та специфічними нерекомбінантними клітинами, генно-інженерними або рекомбінантними клітинами, і включають молекули, що мають амінокислотну послідовність нативного білка або молекули, з яких були видалені, до яких були додані та/або замінені одна або декілька амінокислот нативної послідовності. Терміни "поліпептид" та "білок", зокрема, означають анти-NGF антитіла або послідовності, з яких були видалені, до яких були додані та/або замінені одна або декілька амінокислот анти-NGF антитіла.

Термін "фрагмент поліпептиду" означає поліпептид, що має делецію на амінокінці, делецію на карбоксильному кінці та/або внутрішню делецію. За певних варіантів здійснення довжина фрагментів становить від щонайменше 5 амінокислот до приблизно 500 амінокислот. Буде зрозуміло, що, за певними варіантами здійснення довжина фрагментів становить щонайменше 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 або 450 амінокислот. Особливо придатні фрагменти поліпептидів містять функціональні домени, у тому числі зв'язувальні домени. У разі анти-NGF антитіла, придатні фрагменти містять (але не обмежуються) CDR (гіперваріабельну) ділянку, варіабельну ділянку важкого або легкого ланцюга, частину ланцюга антитіла або лише його варіабельну ділянку, що містить дві гіперваріабельні ділянки тощо.

Термін "специфічний зв'язувальний агент" означає природну або штучну молекулу, яка специфічно зв'язується з мішенню. Прикладами специфічних зв'язувальних агентів є (але ними

не обмежуються) білки, пептиди, нуклеїнові кислоти, вуглеводи і ліпіди. За певними варіантами здійснення специфічним зв'язувальним агентом є антитіло.

Термін "специфічний NGF-зв'язувальний агент" означає специфічний зв'язувальний агент, який специфічно зв'язує будь-яку частину NGF. За певними варіантами здійснення специфічним NGF-зв'язувальним агентом є антитіло, що специфічно зв'язується з NGF.

Термін "імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент", що застосовується у цьому описі, означає фрагмент поліпептиду, що містить щонайменше гіперваріабельні ділянки важкого і легкого ланцюгів імуноглобуліну. Імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент за цим винаходом є здатним до зв'язування з антигеном. За варіантами, яким віддають перевагу, антиген являє собою ліганд, що специфічно зв'язується з рецептором. За цими варіантами здійснення зв'язування імунологічно функціонального імуноглобулінового фрагмента за цим винаходом запобігає зв'язуванню ліганду з його рецептором, з перериванням біологічної реакції, що є наслідком зв'язування ліганду з рецептором. За варіантом, якому віддають перевагу, імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент за цим винаходом специфічно зв'язується з NGF. За варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, згаданий фрагмент специфічно зв'язується з людським NGF.

Термін "природний", що застосовується у цьому описі і стосується об'єкта, означає те, що цей об'єкт може бути знайденим у природі. Наприклад, поліпептидна або полінуклеотидна послідовність, присутня у організмі (у тому числі вірусах), яка може бути виділена із природного джерела і навмисно людиною не модифікувалась, є природною.

Термін "функціонально зв'язаний" означає, що складові, до яких застосовується цей термін, знаходяться у взаємозв'язку, який надає їм можливість здійснення притаманних їм функцій за відповідних умов. Наприклад, контрольна послідовність, "функціонально зв'язана" з кодувальною послідовністю білка, є сполучена з нею таким чином, що експресія кодувальної послідовності білка відбувається за умов, сумісних із транскрипційною активністю контрольних послідовностей.

Термін "контрольна послідовність", що застосовується у цьому описі, означає полінуклеотидні послідовності, які можуть забезпечувати експресію, процесинг або внутрішньоклітинну локалізацію кодувальних послідовностей, з якими вони зв'язані. Природа таких контрольних послідовностей може залежати від організму-хазяїна. За конкретними варіантами здійснення контрольні послідовності для прокаріот можуть містити промотор, сайт зв'язування рибосом і термінатор транскрипції. За іншими конкретними варіантами здійснення, контрольні послідовності для еукаріот можуть включати промотори, що містять один або множину сайтів упізнання факторів транскрипції, енхансерних послідовностей транскрипції, термінаторів транскрипції та послідовностей поліаденілування. За певними варіантами здійснення "контрольні послідовності" можуть включати лідерні послідовності та/або послідовності гібридизаційного партнера.

Термін "полінуклеотид", що застосовується у цьому описі, означає одноланцюгові або дволанцюгові нуклеїновокислотні полімери довжиною щонайменше 10 нуклеотидів. За певними варіантами здійснення нуклеотидами, що входять до складу полінуклеотиду, можуть бути рибонуклеотиди або дезоксирибонуклеотиди чи модифікована форма нуклеотиду будь-якого з цих типів. Згадані модифікації включають модифікації основ, наприклад, бромуридину, модифікації рибоз, наприклад, арабінозиду та 2'3'-дидезоксирибози та модифікації внутрішньонуклеотидних зв'язків, наприклад, фосфоротіоату, фосфородітіоату, фосфороселеноату, фосфородиселеноату, фосфороанілотіоату, фосфороаніладату і фосфороамідату. Термін "полінуклеотид", зокрема, включає однониткові та двониткові форми ДНК.

Термін "олігонуклеотид", що застосовується у цьому описі, включає природні і модифіковані нуклеотиди, зв'язані природними та/або штучними олігонуклеотидними зв'язками. Олігонуклеотиди являють собою субпопуляцію полінуклеотидів, члени якої є, як правило, однонитковими і мають у довжину 200 або менше нуклеотидів. За певними варіантами здійснення олігонуклеотиди мають від 10 нуклеотидів до 60 нуклеотидів у довжину. За певними варіантами здійснення олігонуклеотиди мають 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 нуклеотидів або від 20 нуклеотидів до 40 нуклеотидів у довжину. Олігонуклеотиди можуть бути однонитковими або двонитковими, наприклад, для застосування при конструюванні генетичного мутанту. Олігонуклеотиди за цим винаходом можуть бути смисловими або антисмисловими олігонуклеотидами відносно білок-кодувальної послідовності.

Термін "природні нуклеотиди" означає дезоксирибонуклеотиди і рибонуклеотиди. Термін "модифіковані нуклеотиди" означає нуклеотиди з модифікованими або заміненими цукровими групами тощо. Термін "олігонуклеотидні зв'язки" означає олігонуклеотидні зв'язки, наприклад,

фосфоротіоат, фосфородітіоат, фосфороселеноат, фосфородиселеноат, фосфороанілотіоат, фосфороаніладат, фосфороамідат тощо. Дивись, наприклад, Лапланш (LaPlanche) та інші, 1986, Nucl. Acids Res., 14:9081; Стек (Stec) та інші, 1984, J. Am. Chem. Soc, 106:6077; Стейн (Stein) та інші, 1988, Nucl. Acids Res., 16:3209; Зон (Zon) та інші, 1991, Anti-Cancer Drug Design, 6:539; Зон (Zon) та інші, 1991, OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH, стор. 87-108, (редактор Ф. Екстейн (F. Eckstein)), Oxford University Press, Oxford England; Стек (Stec) та інші, патент США № 5,151,510; Ульман (Uhlmann), Пейман (Peyman), 1990, Chemical Reviews, 90:543, розкриття яких наведено у цьому описі шляхом посилання для будь-якої мети. Олігонуклеотид може містити виявну мітку, яка надає можливість виявлення олігонуклеотиду або його гібридизації.

Термін "вектор" означає нуклеїновокислотну молекулу, здатну до транспортування іншої нуклеїнової кислоти, з якою вона зв'язана. Вектором одного з типів є "плазміда", що являє собою кільцеву петлю двониткової ДНК, до якої можуть бути ліговані додаткові сегменти ДНК. Вектором іншого типу є вектор на основі вірусного геному, де додаткові сегменти ДНК можуть бути лігованими до вірусного геному. Певні вектори є здатними до автономної реплікації у клітини-хазяїні, до якої вони були введені (наприклад, вектори на основі бактеріального геному, що мають бактеріальний сайт ініціювання реплікації та вектори на основі епісом ссавців). Інші вектори (наприклад, вектори не на основі епісом ссавців) можуть бути інтегровані до геному клітини-хазяїна при введенні до згаданої клітини і, таким чином, розмножуватися разом із геномом хазяїна. Більше того, певні вектори є здатними до спрямування експресії генів, з якими вони є функціонально зв'язані. Такі вектори згадуються у цьому описі, як "рекомбінантні вектори експресії" (або просто "експресійні вектори"). Взагалі, експресійні вектори, придатні для методу рекомбінантних ДНК, часто мають форму плазмід. У цьому описі терміни "плазміда" і "вектор" можуть застосовуватись взаємозамінно, оскільки плазміда являє собою найпоширенішу форму вектора. Цей винахід, однак, включає інші форми експресійних векторів, наприклад, вектори на основі вірусного геному (наприклад, реплікаційно-дефектні ретровіруси, аденовіруси та аденоасоційовані віруси), які здійснюють еквівалентні функції.

Словосполучення "рекомбінантна клітина-хазяїн" (або просто "клітина-хазяїн") означає клітину, до якої було введено рекомбінантний експресійний вектор. Фахівцям у цій галузі буде зрозуміло, що такі терміни, як мається на увазі, означають не лише конкретну клітину-об'єкт, але і потомство такої клітини. Оскільки у подальших генераціях можуть відбуватись певні модифікації унаслідок мутацій або впливу навколишнього середовища, таке потомство може, по суті не бути ідентичним батьківській клітині, однак воно, як і до того, включається до обсягу терміну "клітина-хазяїн", який застосовується у цьому описі. Для експресії антитіл за цим винаходом можуть застосовуватись найрізноманітніші системи експресії в хазяїні, у тому числі бактеріальні, дріжджові, бакуловірусні системи експресії та системи експресії у ссавцях (а також системи експресії з фаговою індикацією). Прикладом придатного експресійного вектора на основі бактеріального геному є pUC19. Для рекомбінантної експресії антитіл, клітина-хазяїн трансфікується одним або декількома рекомбінантними експресійними векторами, що несуть фрагменти ДНК, що кодує легкі та важкі ланцюги антитіла таким чином, що згадані легкі та важкі ланцюги експресуються у клітині-хазяїні і, за варіантом, якому віддають перевагу, секретуються до живильного середовища, у якому культивуються клітини-хазяї, з якого згадані антитіла можуть виділятись. Стандартна методика рекомбінантних ДНК застосовується для одержання генів важких і легких ланцюгів антитіла, включення цих генів до рекомбінантних експресійних векторів та введення цих векторів до клітин-хазяїв, описаних, наприклад, у довіднику Сембрук (Sambrook) та інші, 2001, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratories, (під редакцією Осбел Ф.М. (Ausubel F.M.) та інших, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associaties, (1989)) та у патенті США № 4,816,397 на ім'я Босс (Boss) та інші.

Термін "клітина-хазяїн" застосовують для позначення клітини, яку було трансформовано або яка є здатною до трансформування нуклеїновокислотною послідовністю з подальшою експресією вибраного гена, який становить інтерес. Згаданий термін доти включає потомство батьківської клітини, незалежно від того, чи є згадане потомство ідентичним вихідній батьківській клітині за морфологією або організацією генетичного матеріалу, доки є присутнім вибраний ген.

Термін "трансдукція" означає перенесення генів від однієї бактерії до іншої, як правило, за допомогою фага. "Трансдукція" означає також набуття та перенесення еукаріотних клітинних послідовностей ретровірусами.

Термін "трансфекція" означає захоплення клітиною чужорідної або екзогенної ДНК і клітина є "трансфікованою" у разі, коли екзогенна ДНК була введена досередини клітинної мембрани. У

цій галузі добре відомі численні методи трансфекції, які розкриваються у цьому описі. Дивись, наприклад, Грехем (Graham) та інші, 1973, Virology 52:456; Сембрук (Sambrook) та інші, 2001, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratories; Девіс (Davis) та інші, 1986, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Elsevier; Чу (Chu) та інші, 1981, Gene, 13:197. Такі методи можуть застосовуватись для введення до придатних клітин-хазяїв однієї або декількох екзогенних ДНК.

Термін "трансформація", що застосовується у цьому описі, означає зміну генетичних характеристик клітини, і клітина є трансформованою у тому разі, коли вона була модифікована таким чином, що містить нову ДНК. Наприклад, клітина є трансформованою у тому разі, коли її піддали генетичній модифікації порівняно з її нативним станом. Після трансфекції або трансдукції, трансформуюча ДНК може рекомбінуватись із ДНК клітини шляхом фізичної інтеграції з хромосомою клітини або може тимчасово підтримуватись як епісомний елемент без реплікації або може реплікуватись незалежно як плазміда. Клітина вважається стабільно трансформованою, коли ДНК реплікується разом із поділом клітини.

Термін "природний" або "нативний", у разі застосування у зв'язку з біологічними матеріалами, наприклад, молекулами нуклеїнової кислоти, поліпептидами, клітинами-хазяями тощо, означає матеріали, які знаходяться у природі, і не зазнавали маніпуляції з боку людини. Аналогічно, термін "штучний" або "ненативний", що застосовується у цьому описі, означає матеріал, який є відсутнім у природі або який був структурно модифікованим або синтезованим людиною.

Термін "антиген" означає молекулу або частину молекули, здатну до зв'язування селективним зв'язувальним агентом, наприклад, антитілом, і додатково здатну до застосування у організмі тварини для продукування антитіл, здатних до зв'язування з антигенною детермінантою цього антигену. Антиген може мати одну або декілька антигенних детермінант.

Термін "ідентичність", як відомо у цій галузі, означає спорідненість між послідовностями двох чи декількох поліпептидних молекул або двох чи декількох нуклеїновокислотних молекул, що визначається шляхом порівняння їх послідовностей. Термін "ідентичність" у цій галузі означає також ступінь спорідненості послідовностей між нуклеїновокислотними молекулами або поліпептидами, відповідно, що визначається сумісністю ниток двох чи декількох нуклеотидних або двох чи декількох амінокислотних послідовностей. "Ідентичність" встановлює відсоток ідентичних співпадінь між меншими з двох або декількох послідовностей з впорядкованим розміщенням двониткових розривів (у разі їх присутності), який визначають за допомогою конкретної математичної моделі або комп'ютерної програми (тобто "алгоритмів").

Термін "подібність" застосовують у цій галузі відносно спорідненої концепції, але на відміну від "ідентичності", "подібність" означає ступінь спорідненості, який включає як ідентичні співпадіння, так і консервативні замінні співпадіння. Якщо дві поліпептидні послідовності мають, наприклад, 10/20 ідентичних амінокислот, а усі залишкові амінокислоти є неконсервативними замінами, у такому разі відсоток як ідентичності, так і подібності буде дорівнювати 50 %. Якщо, у тому самому прикладі, є п'ять додаткових позицій, де є консервативні заміни, у такому разі відсоток ідентичності залишиться на рівні 50 %, а відсоток подібності буде становити 75 % (15/20). Таким чином, у тих випадках, де є консервативні заміни, відсоток подібності між двома поліпептидами буде вищим за відсоток ідентичності між цими двома поліпептидами.

Ідентичність і подібність споріднених нуклеїнових кислот і поліпептидів може бути легко обчислена за відомими методами. До них належать (але ними не обмежуються) методи, описані у COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY (редактор Леск А.М. (Lesk A.M.)), 1988, Oxford University Press, New York; BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS, (редактор Сміт Д.В. (Smith D.W.)), 1993, Academic Press, New York; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, Part 1, (редактори Гріффін А.М. (Griffin A.M.), Гріффін Г.Дж. (Griffin H.G.)), 1994, Humana Press, New Jersey; фон Гейне Дж. (von Heinje G.), SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1987, Academic Press; SEQUENCE ANALYSIS PRIMER, (Грібсков В. (Gribskov V.), Деверо Дж. (Devereux J.)), 1991, M. Stockton Press, New York; Карілло (Carillo), 1988, SIAM J. Applied Math., 48:1073; Дурбін (Durbin) та інші, 1998, BIOLOGICAL SEQUENCE ANALYSIS, Cambridge University Press.

Методи визначення ідентичності, яким віддають перевагу, розробляються таким чином, щоб вони забезпечували найбільшу сумісність між послідовностями, що перевіряються. Методи визначення ідентичності описуються у доступних комп'ютерних програмах. Методи комп'ютерних програм із визначення ідентичності двох послідовностей, яким віддають перевагу, включають (але ними не обмежуються) пакет програм GCG, що містить програми GAP (Деверо (Devereux) та інші, 1984, Nucl. Acid Res., 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, штат Вісконсін), BLASTP, BLASTN та FASTA (Алтшул (Altschul) та інші,

1990, J. Mol. Biol, 215:403-410). Програма BLASTX є доступною від Національного центру з біотехнологічної інформації (National Center for Biotechnology Information (NCBI)) та з інших джерел (BLAST Manual, Алтшул (Altschul) та інші, NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Алтшул (Altschul) та інші, 1990, дивись вище). Для визначення ідентичності може застосовуватись також добре відомий алгоритм Сміта Уотермена (Smith Waterman algorithm).

Наслідком застосування певних схем порівняльного аналізу з впорядованим розміщенням двох амінокислотних послідовностей може виявитись сумісність лише короткої ділянки двох згаданих послідовностей, і ця невелика впорядковано розміщена ділянка може мати дуже високу ідентичність послідовностей, незважаючи навіть на відсутність значної спорідненості між двома непроцесованими послідовностями. Відповідно, за певними варіантами здійснення наслідком застосування вибраного методу порівняльного аналізу (програма GAP) виявиться впорядковане розміщення, що охоплює щонайменше 50 суміжних амінокислот цільового поліпептиду.

Наприклад, у разі застосування комп'ютерного алгоритму GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, штат Вісконсін), два поліпептиди, у яких слід визначити відсоток ідентичності послідовностей, впорядковано розміщуються для оптимального співпадіння їх відповідних амінокислот ("суміщений відрізок", як визначається алгоритмом). За певними варіантами здійснення разом з алгоритмом застосовують штрафні бали за розрив (які обчислюються, як потроєна середня діагональ, де "середня діагональ" є середнім значенням діагоналі застосованої порівняльної матриці; "діагональ" являє собою бал або число, що приписується кожному абсолютному співпадінню амінокислоти конкретною порівняльною матрицею) і штрафні бали за довжину розриву (які, як правило, дорівнюють одній десятій штрафних балів за розрив), а також порівняльну матрицю, наприклад, PAM 250 або BLOSUM 62. За певними варіантами здійснення алгоритмом застосовується також стандартна порівняльна матриця (дивись Дейхофф (Dayhoff) та інші, 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure, 5:345-352 щодо порівняльної матриці PAM 250; Хенікофф (Henikoff) та інші, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 8£: 10915-10919 щодо порівняльної матриці BLOSUM 62).

За певними варіантами здійснення параметри порівняння поліпептидних послідовностей охоплюють наведене нижче:

алгоритм: Нідлмен (Needleman) та інші, 1970, J. Mol. Biol, 48:443-453;
порівняльна матриця: BLOSUM 62 від Хенікофф (Henikoff) та інші, 1992, дивись вище;
штрафні бали за розрив: 12;
штрафні бали за довжину розриву: 4;
поріг подібності: 0.

З вищенаведеними параметрами корисною може бути програма GAP. За певними варіантами здійснення вищезгадані параметри є параметрами за замовчуванням для порівняння поліпептидних послідовностей (без штрафних балів за закінчення розриву) із застосуванням алгоритму GAP.

Термін "гомологія" означає ступінь подібності між білковими або нуклеїновокислотними послідовностями. Інформація щодо гомології є корисною для розуміння генетичної спорідненості певних видів білків або нуклеїнових кислот. Гомологія може визначатись шляхом впорядкованого розміщення і порівняння послідовностей. За типовим варіантом, для визначення гомології амінокислот, білкову послідовність порівнюють із базою даних відомих білкових послідовностей. Гомологічні послідовності мають спільні функціональні одиниці на якійсь ділянці своїх послідовностей. Високий ступінь подібності або ідентичності, як правило, є свідченням гомології, хоча низький ступінь подібності або ідентичності не обов'язково вказує на відсутність гомології.

Для визначення гомології шляхом порівняння амінокислот однієї послідовності з амінокислотами іншої послідовності може застосовуватись декілька варіантів підходів. Взагалі, згадані варіанти підходів можна підрозділити на дві категорії: (1) порівняння фізичних характеристик, а саме полярності, заряду, вандерваальсівського об'єму, для створення порівняльної матриці; і (2) порівняння ймовірної заміни амінокислоти у послідовності будь-якою іншою амінокислотою, що грунтується на спостереженні багатьох білкових послідовностей відомих гомологічних білків, і створення Матриці Прийнятних Точкових Мутацій (Point Accepted Mutation Matrix (PAM)).

Відсоток ідентичності може обчислюватись шляхом застосування голки для відбирання програм (пакет програм EMBOSS) або розширювача програм (пакет програм EMBOSS) чи узгоджування програм X, як модуля вектора NTI пакета програм 9.0.0, із застосуванням значень параметрів, за замовчуванням (наприклад, 5 штрафних балів за присутність двониткового

розриву, 15 штрафних балів за відкриття двониткового розриву, 6,6 штрафних балів за довжину двониткового розриву).

У цьому описі застосовуються двадцять традиційних амінокислот та їхні скорочені позначення. Дивись довідник IMMUNOLOGY-A SYNTHESIS 2 видання, (редактори E.C. Голаб (E.S. Golub), Д.Р. Грен (D.R. Gren)), Sinauer Associates: Sunderland, штат Массачусетс, 1991, який включено до цього опису шляхом посилання для будь-яких цілей. Стереоізомери (наприклад, D-амінокислоти) двадцяти традиційних амінокислот; штучні амінокислоти, наприклад, $\alpha$-, $\alpha$-двозаміщені амінокислоти, N-алкіламінокислоти, молочна кислота та інші нетрадиційні амінокислоти можуть також бути придатними складовими для поліпептидів за цим винаходом. Прикладами нетрадиційних амінокислот є: 4-гідроксипролін, $\gamma$-карбоксиглутамат, $\varepsilon$-N,N,N-триметиллізин, $\varepsilon$-N-ацетиллізин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формілметіонін, 3-метилгістидин, 5-гідроксилізин, $\sigma$-N-метиларгінін та інші подібні амінокислоти та імінокислоти (наприклад, 4-гідроксипролін). У позначенні поліпептидів, яке застосовується у цьому описі, лівостороннім напрямом є напрям до амінокінця, а правостороннім напрямом є напрям до карбоксильного кінця, відповідно до стандартного застосування і традиції.

Природні залишки можуть підрозділятись на класи на основі властивостей звичайних бічних ланцюгів:

1) гідрофобні: норлейцин (Nor), Met, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Tyr, Pro;
2) полярні гідрофільні: Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr;
3) аліфатичні: Ala, Gly, Ile, Leu, Val, Pro;
4) аліфатичні гідрофобні: Ala, Ile, Leu, Val, Pro;
5) нейтральні гідрофільні: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
6) кислі: Asp, Glu;
7) основні: His, Lys, Arg;
8) залишки, які впливають на орієнтацію ланцюга: Gly, Pro;
9) ароматичні: His, Trp, Tyr, Phe; і
10) ароматичні гідрофобні: Phe, Trp, Tyr.

Консервативні амінокислотні заміни можуть включати заміну члена одного з цих класів іншим членом того самого класу. Консервативні амінокислотні заміни можуть охоплювати штучні амінокислотні залишки, які, як правило, включаються скоріше хімічним синтезом пептидів, аніж синтезом у біологічних системах. Сюди включаються пептидоміметики та інші обернені або інвертовані форми амінокислотних складових.

Неконсервативні заміни можуть включати заміну члена одного з цих класів членом іншого класу. Такі замінені залишки можуть вводитись на ділянки людського антитіла, що є гомологічними з антитілами нелюдського походження або на негомологічні ділянки молекули.

У разі здійснення таких замін, за певними варіантами здійснення, до уваги може прийматись гідропатичний індекс амінокислот. Кожній амінокислоті, на основі характеристик її гідрофобності та заряду, був приписаний гідропатичний індекс. Вони є такими: ізолейцин (+4,5); валін (+4,2); лейцин (+3,8); фенілаланін (+2,8); цистеїн/цистин (+2,5); метіонін (+1,9); аланін (+1,8); гліцин (-0,4); треонін (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролін (-1,6); гістидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамін (-3,5); аспартат (-3,5); аспарагін (-3,5); лізин (-3,9); і аргінін (-4,5).

Важливість гідропатичного індексу амінокислот при наданні білку інтерактивної біологічної функції є зрозумілою у цій галузі (дивись, наприклад, Кайт (Kyte) та інші, 1982, J. Mol. Biol, 157:105-131). Відомо, що певні амінокислоти можуть бути замінені іншими амінокислотами, що мають подібний гідропатичний індекс або коефіцієнт, і зберегти, як і досі, подібну біологічну активність. При здійсненні замін, виходячи з гідропатичного індексу, за певними варіантами здійснення включають заміну амінокислот, гідропатичні індекси яких знаходяться у межах ±2. За певними варіантами здійснення включають амінокислоти, гідропатичні індекси яких знаходяться у межах ±1, і за певними варіантами здійснення включають амінокислоти, гідропатичні індекси яких знаходяться у межах ±0,5.

У цій галузі зрозуміло також, що заміна подібних амінокислот може здійснюватись ефективніше на основі гідрофільності, зокрема, у тому разі, коли одержаний таким чином біологічно функціональний білок або пептид призначається для застосування у імунологічних варіантах здійснення, що розкриваються у цьому описі. За певними варіантами здійснення найбільша місцева середня гідрофільність білка, яка регулюється гідрофільністю прилеглих амінокислот, корелює з його імуногенністю та антигенністю, тобто з біологічними властивостями білка.

Цим амінокислотним залишкам були приписані наведені нижче значення гідрофільності: аргінін (+3,0); лізин (+3,0); аспартат (+3,0±1); глутамат (+3,0±1); серин (+0,3); аспарагін (+0,2); глутамін (+0,2); гліцин (0); треонін (-0,4); пролін (-0,5±1); аланін (-0,5); гістидин (-0,5); цистеїн (-

1,0); метіонін (-1,3); валін (-1,5); лейцин (-1,8); ізолейцин (-1,8); тирозин (-2,3); фенілаланін (-2,5); і триптофан (-3,4). При здійсненні замін, виходячи з подібних значень гідрофільності, за певними варіантами здійснення включають заміну амінокислот, значення гідрофільності яких знаходяться у межах ±2, за певними варіантами здійснення включають амінокислоти, значення гідрофільності яких знаходяться у межах ±1, і за певними варіантами здійснення включають амінокислоти, значення гідрофільності яких знаходяться у межах ±0,5. За послідовностями основних амінокислот, на основі гідрофільності, можуть також бути ідентифіковані антигенні детермінанти. Ці ділянки називають також "коровими ділянками антигенних детермінант".

Зразкові амінокислотні заміни наведені у Таблиці 1.

Таблиця 1

Амінокислотні заміни

| Вихідні залишки | Зразкові заміни | Заміни, яким віддають перевагу |
|---|---|---|
| Ala | Val, Leu, He | Val |
| Arg | Lys, Gln, Asn | Lys |
| Asn | Gln | Gln |
| Asp | Glu | Glu |
| Cys | Ser, Ala | Ser |
| Gln | Asn | Asn |
| Glu | Asp | Asp |
| Gly | Pro, Ala | Ala |
| His | Asn, Gln, Lys, Arg | Arg |
| Ile | Leu, Val, Met, Ala, Phe, норлейцин | Leu |
| Leu | норлейцин, Ile, Val, Met, Ala, Phe | Ile |
| Lys | Arg, 1,4 діаміномасляна кислота, Gln, Asn | Arg |
| Met | Leu, Phe, Ile | Leu |
| Phe | Leu, Val, Ile, Ala, Tyr | Leu |
| Pro | Ala | Gly |

| Вихідні залишки | Зразкові заміни | Заміни, яким віддають перевагу |
|---|---|---|
| Ser | Thr, Ala, Cys | Thr |
| Thr | Ser | Ser |
| Trp | Tyr, Phe | Tyr |
| Tyr | Trp, Phe, Thr, Ser | Phe |
| Val | Ile, Met, Leu, Phe, Ala, норлейцин | Leu |

Досвідчений фахівець зможе визначити відповідні варіанти поліпептиду, як наведено у цьому описі, за допомогою добре відомих методів. За певними варіантами здійснення фахівець у цій галузі може визначити відповідні ділянки молекули, які можуть бути змінені без руйнування активності, обираючи мішенню ті ділянки, які, як гадають, не є важливими для активності. За іншими варіантами здійснень досвідчений фахівець може визначити залишки та ділянки молекул, які зберігаються серед подібних поліпептидів. За додатковими варіантами здійснень навіть ділянки, які можуть бути важливими для біологічної активності або для структури, можуть бути піддані консервативним амінокислотним замінам без знищення біологічної активності або без виявлення негативного впливу на структуру поліпептидів.

На додаток до цього, фахівець у цій галузі може переглянути дані структурно-функціональних досліджень, які визначають залишки подібних поліпептидів, що є важливими для активності або структури. Приймаючи до уваги результати такого порівняння, досвідчений фахівець може прогнозувати важливість амінокислотних залишків у білку, що відповідають амінокислотним залишкам, важливим для активності або структури у подібних білків. Фахівець у цій галузі для таких визначених важливих амінокислотних залишків може вибрати хімічно подібні амінокислотні заміни.

Фахівець у цій галузі може також проаналізувати об'ємну структуру і амінокислотну послідовність у зв'язку з такою структурою у подібних поліпептидів. Приймаючи до уваги таку інформацію, фахівець у цій галузі може прогнозувати впорядковане розміщення амінокислотних

залишків антитіла відповідно до його об'ємної структури. За певними варіантами здійснення фахівець у цій галузі може уникнути варіанта внесення радикальних змін до амінокислотних залишків, які передбачаються на поверхні білка, оскільки такі залишки можуть бути залученими до важливих взаємодій з іншими молекулами. Більше того, фахівець у цій галузі може розробити експериментальні варіанти, які включають заміну однієї амінокислоти на кожному бажаному амінокислотному залишку. Після цього згадані варіанти можуть перевірятись у реакціях визначення активності, відомих фахівцям у цій галузі. Такі варіанти можуть застосовуватись для збирання інформації щодо придатних варіантів. Наприклад, у разі визначення того, що наслідком заміни певного амінокислотного залишку є знищена, небажано знижена або невідповідна активність, варіанти з такою заміною можуть виключатись. Іншими словами, виходячи з інформації, зібраної шляхом подібних звичайних експериментів, фахівець у цій галузі може легко визначити амінокислоти, які слід виключити з процесу замін або самостійно, або у поєднанні з іншими мутаціями.

Ряд наукових публікацій присвячено прогнозуванню вторинної структури. Дивись Молт (Moult), 1996, Curr. Op. in Biotech., 7:422-427; Чу (Chou) та інші, 1974, Biochemistry, 13:222-245; Чу (Chou) та інші, 1974, Biochemistry, 113:211-222: Чу (Chou) та інші, 1978, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol, 47:45-148; Чу (Chou) та інші, 1979, Ann. Rev. Biochem. 47:251-276; Чу (Chou) та інші, 1979, Biophys. J., 26:367-384. Окрім того, зараз є доступними комп'ютерні програми, що допомагають визначити вторинну структуру. Один із методів прогнозування вторинної структури базується на моделюванні гомології. Наприклад, два поліпептиди або білки, що мають ідентичність послідовності, яка перевищує 30 %, або подібність, яка перевищує 40 %, часто мають подібну структурну топологію. Нещодавнє збільшення обсягу бази даних із структури білків (PDB) забезпечує значне посилення ступеню прогнозованості вторинної структури, у тому числі потенційної кількості складок у межах структури поліпептиду або білка. Дивись Холм (Holm) та інші, 1999, Nucl. Acid. Res., 27:244-247. Висунули припущення (Бреннер (Brenner) та інші, 1997, Curr. Op. Struct. Biol., 7:369-376) про існування обмеженої кількості складок у даного поліпептиду або білка і про те, що після визначення критичної кількості структур, структурне прогнозування стане набагато точнішим.

Додаткові методи прогнозування вторинної структури включають "нарізання різьби" (Джоунс (Jones), 1997, Curr. Op. Struct. Biol., 7:377-387; Сіппл (Sippl) та інші, 1996, Structure 4:15-19), "аналіз профілю" (Боуі (Bowie) та інші, 1991, Science 253:164-170; Грібсков (Gribskov) та інші, 1990, Meth. Enzym. 183:146-159; Грібсков (Gribskov) та інші, 1987, Proc. Nat. Acad. Sci. 84:4355-4358) та "еволюційний зв'язок" (дивись Холм (Holm), 1999, (дивись вище); та Бреннер (Brenner), 1997 (дивись вище)).

За певними варіантами здійснення варіанти антитіл включають глікозиловані варіанти, де кількість та/або тип сайту глікозилування був змінений, порівняно з амінокислотними послідовностями вихідного поліпептиду. За певними варіантами здійснення білкові варіанти включають більшу або меншу кількість N-зв'язаних сайтів глікозилування, аніж нативний білок. N-зв'язаний сайт глікозилування характеризується послідовністю: Asn-X-Ser або Asn-X-Thr, де амінокислотним залишком, позначеним як X, може бути будь-який амінокислотний залишок, за винятком проліну. Заміна амінокислотних залишків для одержання цієї послідовності забезпечує одержання потенційно нового сайту для додання N-зв'язаного вуглеводного ланцюга. За альтернативним варіантом заміни, які ліквідують цю послідовність, будуть видаляти існуючий N-зв'язаний вуглеводний ланцюг. Пропонується також реаранжування N-зв'язаних вуглеводних ланцюгів, де один або декілька N-зв'язаних сайтів глікозилування (як правило, природних) ліквідуються з утворенням одного або декількох нових N-зв'язаних сайтів. Додаткові варіанти антитіл, яким віддають перевагу, включають цистеїнові варіанти, де, порівняно з вихідною амінокислотною послідовністю, один або декілька цистеїнових залишків видаляють або замінюють на іншу амінокислоту (наприклад, серин). Цистеїнові варіанти можуть бути придатними у тому разі, коли антитіла повинні повторно укладатись до біологічно активної конформації, такої як, наприклад, після виділення нерозчинних тілець включення. Цистеїнові варіанти, як правило, мають меншу кількість залишків цистеїну, аніж нативний білок і, типово, мають парну їх кількість для зведення до мінімуму взаємодій, що є наслідком неспарованих залишків цистеїну.

За додатковими варіантами здійснення варіанти антитіл можуть включати антитіла, що містять модифікований Fc-фрагмент або модифіковану константну ділянку важкого ланцюга. Fc-фрагмент (де скорочення означає "фрагмент, що кристалізується") або константна ділянка важкого ланцюга можуть бути модифіковані шляхом мутації для надання антитілу змінених характеристик зв'язування. Дивись, наприклад, Бартон (Burton), Вуф (Woof), 1992, Advances in Immunology 51:1-84; Равеч (Ravetch), Болланд (Bolland), 2001, Annu. Rev. Immunol. 19:275-290;

Шіддс (Shields) та інші, 2001, Journal of Biol. Chem. 276:6591-6604; Теллман (Telleman), Джунханс (Junghans), 2000, Immunology 100:245-251; Медсан (Medesan) та інші, 1998, Eur. J. Immunol 28:2092-2100; усі ці роботи включено до цього опису шляхом посилання. Такі мутації можуть включати заміни, додання, делеції або будь-яку їх комбінацію, і здійснюються, як правило, сайт-спрямованим мутагенезом із застосуванням одного або декількох мутагенних олігонуклеотидів за методами, опис яких наведено у цьому описі, або за методами, відомими у цій галузі (дивись, наприклад, Сембрук (Sambrook) та інші, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3 видання, 2001, Cold Spring Harbor, N.Y. та Бергер (Berger), Кіммел (Kimmel), METHODS IN ENZYMOLOGY, том 152, Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, Inc., San Diego, штат Каліфорнія, які включено до цього опису шляхом посилання).

За певними варіантами здійснення амінокислотними замінами є заміни, які: (1) знижують сприйнятливість до протеолізу, (2) знижують сприйнятливість до окиснення, (3) змінюють зв'язувальну спорідненість для утворення білкових комплексів, (4) змінюють зв'язувальні спорідненості та/або (5) надають або модифікують інші фізико-хімічні або функціональні властивості таких поліпептидів. За певними варіантами здійснення одиночна амінокислотна заміна або численні амінокислотні заміни (за певними варіантами здійснення консервативні амінокислотні заміни) можуть здійснюватись у природній послідовності (за певними варіантами здійснення на ділянці поліпептиду за межами домену(-ів), що забезпечує міжмолекулярні контакти). За варіантами здійснення, яким віддають перевагу, консервативна амінокислотна заміна, як правило, суттєво не змінює структурних характеристик вихідної послідовності (наприклад, замінна амінокислота не руйнує спіралі, що існує у вихідній послідовності, і не руйнує вторинної структури інших типів, що характеризує вихідну послідовність). Приклади визнаних у цій галузі вторинних та третинних структур поліпептидів описані у PROTEINS, STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES, (редактор Крейтон (Creighton)), 1984, W.H. Freeman and Company, New York; INTRODUCTION TO PROTEIN STRUCTURE (редактори К. Бренден (C. Branden), Дж. Туз (J. Tooze)), 1991, Garland Publishing, New York, N.Y.; Торнтон (Thornton) та інші, 1991, Nature 354:105; кожну з цих робот включено до цього опису шляхом посилання.

Аналоги пептидів широко застосовують у фармацевтичній промисловості як непептидні лікарські засоби з властивостями, аналогічними властивостям матричного пептиду. Непептидні сполуки такого типу називають "пептидними міметиками" або "пептидоміметиками". Дивись Фошер (Fauchere), 1986, Adv. Drug Res. 15:29; Вебер (Veber), Фрідінгер (Freidinger), 1985, TINS, 392; Еванс (Evans) та інші, 1987, J. Med. Chem. 30:1229; усі ці роботи включено до цього опису шляхом посилання для будь-яких цілей. Такі сполуки часто розробляються за допомогою комп'ютеризованого молекулярного моделювання. Пептидоміметики, структурно подібні до терапевтично придатних пептидів, можуть застосовуватись для одержання подібного терапевтичного або профілактичного ефекту. Взагалі, пептидоміметики є структурно подібними до парадигматичного поліпептиду (тобто поліпептиду, що має біохімічну властивість або фармакологічну активність), наприклад, людського антитіла, але мають один або декілька пептидних зв'язків, факультативно заміненими зв'язком, вибраним з групи, що включає: $-CH_2-NH-$, $-CH_2-S-$, $-CH_2-CH_2-$, -CH=CH- (цис і транс), $-COOCH_2-$, $-CH(OH)CH_2-$ і $-CH_2SO-$, методами, добре відомими у цій галузі. Систематична заміна однієї або декількох амінокислот консенсусної послідовності на D-амінокислоту того самого типу (наприклад, D-лізин замість L-лізину) може застосовуватись у певних варіантах здійснення для одержання більш стійких пептидів. На додаток до цього, обмежені пептиди, що містять консенсусну послідовність або по суті ідентичний варіант консенсусної послідовності, можуть одержуватись за допомогою методів, відомих у цій галузі (Різо (Rizo), Герат (Gierasch), 1992, Ann. Rev. Biochem. 61:387; ця робота включена до цього опису шляхом посилання для будь-якої цілі); наприклад, шляхом додання внутрішніх залишків цистеїну, здатних до утворення міжмолекулярних дисульфідних містків, що циклізують пептид.

Термін "антитіло" або "антитіло-пептид(и)" означає інтактне антитіло або його зв'язувальний фрагмент, що конкурує з інтактним антитілом за специфічне зв'язування. За певними варіантами здійснення зв'язувальні фрагменти одержують методами рекомбінантних ДНК. За додатковими варіантами здійснення зв'язувальні фрагменти одержують шляхом ферментативного або хімічного розщеплення інтактних антитіл. Зв'язувальні фрагменти включають (але ними не обмежуються) F(ab), F(ab'), $F(ab')_2$, Fv та одноланцюгові антитіла.

Термін "важкий ланцюг" включає будь-який імуноглобуліновий поліпептид, що має достатню послідовність варіабельної ділянки для надання специфічності відносно NGF. Термін "легкий ланцюг" включає будь-який імуноглобуліновий поліпептид, що має достатню послідовність

варіабельної ділянки для надання специфічності відносно NGF. Непроцесований важкий ланцюг включає варіабельну ділянку важкого ланцюга, $V_H$-ділянку, та три константні ділянки важкого ланцюга, $C_H1$, $C_H2$ і $C_H3$. $V_H$-ділянка знаходиться на амінокінці поліпептиду, $C_H3$-ділянка знаходиться на карбоксильному кінці. Термін "важкий ланцюг", що застосовується у цьому описі, означає непроцесований важкий ланцюг та його фрагменти. Непроцесований легкий ланцюг включає варіабельну ділянку легкого ланцюга, $V_L$-ділянку, та константну ділянку легкого ланцюга, $C_L$-ділянку. Подібно важкому ланцюгу, варіабельна ділянка легкого ланцюга знаходиться на амінокінці поліпептиду. Термін "легкий ланцюг", що застосовується у цьому описі, означає непроцесований легкий ланцюг та його фрагменти. F(ab)-фрагмент включає один легкий ланцюг, $C_H1$ і варіабельні ділянки одного важкого ланцюга. Важкий ланцюг молекули F(ab) не може утворювати дисульфідний зв'язок з іншою молекулою важкого ланцюга. F(ab')-фрагмент включає один легкий ланцюг і один важкий ланцюг, що містить більшу частину константної ділянки, між ділянками $C_H1$ і $C_H2$, завдяки чому між двома важкими ланцюгами може утворюватись міжланцюговий дисульфідний зв'язок з утворенням молекули $F(ab')_2$. Fv-ділянка включає варіабельні ділянки як важкого, так і легкого ланцюгів, однак їй бракує константних ділянок. Одноланцюгові антитіла є молекулами Fv, у яких варіабельні ділянки важкого і легкого ланцюгів з'єднуються гнучким лінкером з утворенням одного поліпептидного ланцюга, який являє собою антигензв'язувальну ділянку. Одноланцюгові антитіла докладно обговорюються у публікації міжнародної заявки на WO 88/01649 і патентах США № 4,946,778 і № 5,260,203.

Слід розуміти, що двовалентне антитіло, окрім "мультиспецифічного" або "мультифункціонального" антитіла, за певними варіантами здійснення включає зв'язувальні сайти, що мають ідентичну антигенну специфічність.

При визначенні зв'язування та специфічності антитіла за цим винаходом, антитіло по суті пригнічує адгезію ліганду до рецептора, коли надлишок антитіла зменшує кількість ліганду, зв'язаного з рецептором щонайменше приблизно на 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 85 % або більше (що визначається, inter alia, із застосуванням in vitro реакції конкурентного зв'язування).

Словосполучення "нейтралізуюче антитіло" означає молекулу антитіла, здатну блокувати або суттєво знизити ефекторну функцію антигену-мішені, з яким вона зв'язується. Відповідно, "нейтралізуюче" анти-NGF антитіло є здатним блокувати або суттєво знизити ефекторну функцію NGF, наприклад, зв'язування з рецептором та/або викликання клітинної реакції. Словосполучення "суттєво знизити" означає щонайменше приблизно 60 %, за варіантом, якому віддають перевагу, щонайменше приблизно 70 %, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, щонайменше приблизно 75 %, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 80 %, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 85 %, за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, щонайменше приблизно 90 % зниження ефекторної функції антигену-мішені (наприклад, людського NGF).

Термін "антигенна детермінанта" включає будь-яку детермінанту, за варіантом, якому віддають перевагу, поліпептидну детермінанту, здатну до специфічного зв'язування з імуноглобуліном або Т-клітинним рецептором. За певними варіантами здійснення антигенні детермінанти включають хімічно активні поверхневі групи молекул, наприклад, амінокислоти, бічні ланцюги цукрів, фосфорильні групи або сульфонільні групи, і за певними варіантами здійснення можуть мати специфічні об'ємні структурні характеристики та/або специфічні зарядні характеристики. Антигенна детермінанта являє собою ділянку антигену, яка зв'язується антитілом. За певними варіантами здійснення кажуть, що антитіло специфічно зв'язується з антигеном, коли воно переважно розпізнає свій антиген-мішень у складній суміші білків та/або макромолекул. За варіантами, яким віддають перевагу, кажуть, що антитіло специфічно зв'язується з антигеном, коли константа дисоціації у стані рівноваги становить $\leq 10^{-8}$ М, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, коли константа дисоціації у стані рівноваги становить $\leq 10^{-9}$ М і, за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, коли константа дисоціації у стані рівноваги становить $\leq 10^{-10}$ М.

Антитіло зв'язує "по суті ту саму антигенну детермінанту", що і еталонне антитіло, коли два антитіла розпізнають ідентичні антигенні детермінанти або антигенні детермінанти, що стерично перекриваються. Найширше застосовуваними і швидкими методами визначення того, чи зв'язують два антитіла ідентичні антигенні детермінанти або антигенні детермінанти, що стерично перекриваються, є конкурентні реакції, які можуть розроблятись для здійснення у найрізноманітніших форматах, із застосуванням міченого антигену або міченого антитіла. Як правило, антиген іммобілізують на субстраті, і здатність немічених антитіл до блокування зв'язування мічених антитіл визначається за допомогою радіоактивних або ферментних міток.

Термін "агент" застосовують у цьому описі для позначення хімічної сполуки, суміші хімічних сполук, біологічної макромолекули або екстракту, одержаного з біологічних матеріалів.

Терміни "мітка" або "мічений", що застосовуються у цьому описі, означають включення виявного маркера, наприклад, шляхом включення амінокислоти, міченої радіоактивним ізотопом, або приєднання до поліпептиду біотинових складових, які можуть бути виявлені міченим авідином (наприклад, стрептавідином, який, за варіантом, якому віддають перевагу, містить виявний маркер, наприклад, флуоресцентний маркер, хемілюмінесцентний маркер, або який має ферментативну активність, що може бути виявлена оптичними або колориметричними методами). За певними варіантами здійснення згадана мітка може також бути терапевтичною. У цій галузі відомі різні методи мічення поліпептидів і глікопротеїнів, які можуть ефективно бути застосовані у методах, що розкриваються у цьому описі. Прикладами міток для поліпептидів є (але ними не обмежуються) наведені нижче: радіоактивні ізотопи або радіоактивні нукліди (наприклад, $^{3}H$, $^{14}C$, $^{15}N$, $^{35}S$, $^{90}Y$, $^{99m}Tc$, $^{111}In$, $^{125}I$, $^{131}I$), флуоресцентні мітки (наприклад, флуоресцинізотіоціанат або FITC, родамін або лантаноїдні люмінофори), ферментативні мітки (наприклад, пероксидаза з хрону, β-галактозидаза, люцифераза, лужна фосфатаза), хемілюмінесцентні мітки, гаптенові мітки, наприклад, біотинільні групи, та попередньо визначені поліпептидні антигенні детермінанти, розпізнані вторинним репортером (наприклад послідовності зі зв'язаними парами залишків лейцину, зв'язувальні сайти вторинних антитіл, ділянки зв'язування металів або мітки антигенних детермінант). За певними варіантами здійснення мітки приєднуються спейсерними групами (наприклад $(CH_2)_n$, де n<приблизно 20) різної довжини для зменшення можливої стеричної невідповідності.

Термін "біологічна проба", що застосовується у цьому описі, означає (але не обмежується) будь-яку кількість речовини від живої особини або раніше живої особини. Такі живі особини включають (але не обмежуються) людей, мишей, мавп, пацюків, кролів та інших тварин. Такі речовини включають (але не обмежуються) кров, сироватку, сечу, клітини, органи, тканини, кістку, кістковий мозок, лімфатичні вузли та шкіру.

Термін "фармацевтичний агент або лікарський засіб", що застосовується у цьому описі, означає хімічну сполуку або композицію, здатну індукувати бажаний терапевтичний ефект у разі відповідного введення хворому. Слід розуміти, що словосполучення "фармацевтично ефективна кількість" у відношенні фармацевтичної композиції, що містить одне або декілька антитіл за цим винаходом, означає, за цим винаходом, кількість згаданої фармацевтичної композиції, що є здатною до запобігання, у згаданого хворого, зниження порогу чутливості до зовнішніх подразників із поверненням згаданого порогу чутливості до рівня, порівнянного з тим, що спостерігається у здорових суб'єктів.

"Розладом" є будь-який стан, що поліпшується у разі лікування за цим винаходом. Терміни "розлад" та "стан" застосовуються у цьому описі взаємозамінно і включають хронічні та гострі NGF-опосередковані розлади або NGF-опосередковані захворювання, у тому числі ті патологічні стани, які сприяють виникненню у ссавця згаданого розладу.

Словосполучення "NGF-опосередковане захворювання" та "NGF-опосередкований стан" означають будь-який медичний стан або розлад, що пов'язується зі зростанням рівнів NGF або підвищенням чутливості до NGF, у тому числі (але без обмеження) гострий біль, зубний біль, біль, викликаний травмою, біль, викликаний хірургічним втручанням, біль унаслідок ампутації або абсцесу, каузалгію, демієлінізаційні захворювання, невралгію трійчастого нерва, рак, хронічний алкоголізм, інсульт, таламічний больовий синдром, діабет, синдром набутого імунодефіциту ("СНІД"), стан, спричинений токсинами, стан, спричинений хіміотерапією, головний біль у цілому, мігрень, сильний нападоподібний головний біль з періодичними рецидивами, змішані серцево-судинні та несерцево-судинні синдроми, головний біль, викликаний гіпер- або гіпотензією, запалення у цілому, артрит, ревматичні захворювання, вовчак, остеоартрит, запальні захворювання кишечнику, синдром подразненої товстої кишки, запальні захворювання очей, запальні розлади або нестабільність сечового міхура, псоріаз, скарги на шкірні захворювання із запальними складовими, сонячну еритему, кардит, дерматит, міозит, неврит, дифузну хворобу сполучної тканини судин, хронічні запальні стани, запальний біль та пов'язані з цим гіпералгезію та алодинію, невропатичний біль та пов'язані з цим гіпералгезію та алодинію, діабетичний невропатичний біль, біль унаслідок пошкодження симпатичних сенсорних нервів, синдроми деаферентації, астму, пошкодження або дисфункцію епітеліальної тканини, простий герпес, порушення вісцеральної рухливості на респіраторних, статево-сечових, шлунково-кишкових або серцево-судинних ділянках, рани, опіки, алергічні шкірні реакції, свербіж, вітіліго, загальні захворювання шлунково-кишкового тракту, коліт, виразки шлунка, виразки дванадцятипалої кишки, вазомоторний або алергічний риніт, бронхіальні розлади, дисменорею, диспепсію, гастроезофагеальний рефлюкс, панкреатит і вісцералгію.

Словосполучення "ефективна кількість" та "терапевтично ефективна кількість", що застосовуються у цьому описі, у разі застосування відносно носія або фармацевтичної композиції, що містить одне або декілька людських антитіл проти людського NGF, означає кількість або дозу, достатню для викликання бажаного результату (тобто у разі лікування із застосуванням носія або фармацевтичної композиції, що містить людські антитіла проти людського NGF за цим винаходом, бажаним результатом є, наприклад, бажане зменшення запалення та/або болю) або підтримання зменшення рівня однієї або декількох біологічних активностей NGF, що спостерігається. Конкретніше, терапевтично ефективною кількістю є кількість людського антитіла(-іл) проти людського NGF, достатня для пригнічення, впродовж деякого періоду часу, одного або декількох клінічно визначених патологічних процесів, що пов'язуються зі згаданим станом, наприклад, запалення або болю, у суб'єкта, якого піддають in vivo лікуванню за допомогою згаданого засобу. За цим винаходом, "ефективна кількість" анти-NGF антитіла може запобігати, припиняти, контролювати або зменшувати відчуття болю, пов'язаного з будь-яким болісним медичним станом. У способах за цим винаходом термін "контроль" та його граматичні варіанти застосовуються для позначення запобігання, часткового або повного пригнічення, зменшення, затримки або уповільнення небажаного явища, наприклад, болю. Ефективна кількість може різнитися залежно від конкретного вибраного носія або людського антитіла(іл) проти людського NGF, і залежить також від різноманітних факторів та станів, пов'язаних із суб'єктом, якого піддають лікуванню, а також тяжкості розладу. Наприклад, у разі, якщо носій або людське антитіло(-а) проти людського NGF повинні вводитись in vivo, факторами, які повинні прийматись до уваги, є вік, маса та стан здоров'я хворого, а також криві залежності "доза-ефект" та дані щодо токсичності, одержані у передклінічних дослідах на тваринах. Якщо засіб має контактувати з клітинами in vitro, слід розробити також різноманітні передклінічні in vitro дослідження для визначення таких параметрів, як поглинання, час напіввиведення, доза, токсичність тощо. Визначення ефективної кількості або терапевтично ефективної кількості даного засобу знаходиться у межах здатності фахівців у цій галузі.

Терміни "фактор росту нервової тканини" та "NGF", що вживаються у цьому описі, означають нативну послідовність NGF усіх видів ссавців, у тому числі рекомбінантний людський NGF 1-120, представлений ПОСЛІДОВНІСТЮ № 30.

Словосполучення "по суті чистий" або "по суті очищений", що застосовується у цьому описі, означає сполуку або різновид, представлений переважним різновидом (тобто на молярній основі, це різновид у складі композиції, кількісно переважаючий будь-який інший окремий різновид). За певними варіантами здійснення по суті очищеною фракцією є композиція, де згадані різновиди становлять щонайменше приблизно 50 відсотків (на молярній основі) усіх присутніх макромолекулярних різновидів. За певними варіантами здійснення по суті чиста композиція буде містити більше ніж приблизно 80 %, 85 %, 90 %, 95 % або 99 % усіх макромолярних різновидів, присутніх у композиції. За певними варіантами здійснення різновид є очищеним по суті до однорідності (забруднювальні різновиди у складі композиції не можуть бути виявлені за допомогою традиційних методів виявлення), коли композиція містить по суті один макромолекулярний різновид.

Термін "хворий" означає людей і тварин.

"Лікування" або "лікувати" означає терапевтичне лікування, профілактичні або запобіжні заходи. До тих, що потребують лікування, належать ті, що вже мають захворювання, а також схильні до появи захворювання, або ті, появі захворювання у яких необхідно запобігти.

Якщо контекстом не вимагається іншого, терміни у однині будуть включати множину, а терміни у множині будуть включати однину.

За певними варіантами здійснення цього винаходу антитіла, спрямовані проти NGF, можуть застосовуватись для лікування невропатичного та запального болю і NGF-опосередкованих захворювань, у тому числі (але без обмеження) згаданих вище.

За одним з аспектів цього винаходу пропонуються повністю людські моноклональні антитіла, які були одержані проти і які мають біологічну та імунологічну специфічність до зв'язування з людським NGF. За іншим аспектом винахід пропонує нуклеїнові кислоти, що містять нуклеотидні послідовності, що кодують амінокислотні послідовності важкого та легкого ланцюгів імуноглобулінових молекул, зокрема, послідовності, що відповідають їхнім варіабельним ділянкам. Конкретними варіантами здійснення цього аспекту винаходу є послідовності, що відповідають гіперваріабельним ділянкам (CDRs), зокрема, CDR1-CDR3, важких і легких ланцюгів, що пропонуються цим винаходом. За ще іншим аспектом, цей винахід пропонує клітини гібридом та лінії клітин, що експресують імуноглобулінові молекули та антитіла, за варіантом, якому віддають перевагу, моноклональні антитіла за цим винаходом. Цей винахід пропонує також біологічно та імунологічно очищені препарати антитіл, за варіантом, якому

віддають перевагу, моноклональних антитіл, що були одержані проти і які мають біологічну та імунологічну специфічність до зв'язування з людським NGF.

Можливість клонування та реконструювання людських локусів величиною у мільйони п.н. у дріжджових штучних хромосомах (YACs) та їх введення до мишачої зародкової лінії, надає вигідний підхід до встановлення функціональних складових дуже великих або приблизно картованих локусів, а також розробки корисних моделей людського захворювання. Окрім того, застосування такої методики для заміни мишачих локусів їхніми людськими еквівалентами надає унікальну можливість зрозуміння механізмів експресії та регуляції продуктів людського гена у процесі їх розвитку, їх зв'язку з іншими системами та їх залучення до індукування і розвитку захворювання.

Важливим практичним варіантом застосування такої методики є "гуманізація" мишачої гуморальної імунної системи. Введення людських імуноглобулінових (Ig) локусів мишам, у яких ендогенні Ig гени були інактивовані, надає можливість вивчення механізмів, що лежать у основі програмованої експресії та складання антитіл, а також їх ролі у розвитку В-клітин. На додаток до цього, подібна методика забезпечує джерело продукування повністю людських моноклональних антитіл (MAbs).

Термін "людське антитіло" означає антитіла, що мають варіабельні і константні ділянки, які по суті відповідають імуноглобуліновим послідовностям людської зародкової лінії. За певними варіантами здійснення людські антитіла продукуються ссавцями, окрім людини, у тому числі (але без обмеження) гризунами, наприклад, мишами та пацюками, і зайцеподібними, наприклад, кроликами. За певними варіантами здійснення людські антитіла продукуються клітинами гібридоми. За певними варіантами здійснення людські антитіла продукуються рекомбінантним шляхом.

Термін "рекомбінантний" у відношенні антитіла означає антитіла, які одержують, експресують, створюють або виділяють рекомбінантними способами. Репрезентативними прикладами є антитіла, експресовані за допомогою рекомбінантного експресійного вектора, трансфікованого до клітини-хазяїна, антитіла, виділені з бібліотеки рекомбінантних гібридних людських антитіл, антитіла, виділені з тварини (наприклад, миші), що є трансгенною за людськими імуноглобуліновими генами (дивись, наприклад, Тейлор Л.Д. (Taylor L.D.) та інші, Nucl. Acids Res. 20:6287-6295, (1992)) або антитіла, одержані, експресовані, створені або виділені будь-якими способами, що залучають розщеплення послідовностей людського імуноглобулінового гена на інші послідовності ДНК. Такі рекомбінантні людські антитіла мають варіабельні та константні ділянки, одержані з імуноглобулінових послідовностей людської зародкової лінії.

Людські антитіла мають щонайменше три переваги над нелюдськими та гібридними антитілами для застосування при лікуванні людей:

1) оскільки ефекторна ділянка антитіла є людською, вона може краще взаємодіяти з іншими складовими частинами людської імунної системи (наприклад, ефективніше знищувати клітини-мішені за допомогою комплементзалежної цитотоксичності (CDC) або антитілозалежної клітинної цитотоксичності (ADCC));

2) людська імунна система не повинна розпізнавати людське антитіло, як чужорідне і, завдяки цьому, гуморальна імунна відповідь проти такого введеного антитіла повинна бути слабкішою, аніж проти повністю чужорідного нелюдського антитіла або частково чужорідного гібридного антитіла;

3) повідомляли про те, що введені нелюдські антитіла мають набагато коротший час напіввиведення у системі кровообігу людини, аніж час напіввиведення людських антитіл. Час напіввиведення введених людських антитіл буде по суті ідентичним до часу напіввиведення природних людських антитіл, що надасть можливість рідшого введення менших доз.

Очікується, таким чином, що повністю людські антитіла зведуть до мінімуму імуногенні та алергійні реакції, притаманні мишачим моноклональним антитілам та деривативованим із мишачих моноклональних антитіл і, завдяки цьому, підвищать ефективність та безпечність введених антитіл. Повністю людські антитіла за цим винаходом, таким чином, можуть застосовуватись для лікування хронічного та рецидивного болю, лікування якого потребує повторного введення антитіл. Таким чином, одна з конкретних переваг анти-NGF антитіл за цими винаходом полягає у тому, що згадані антитіла є повністю людськими і можуть вводитись хворим безболісним чином з одночасним зведенням до мінімального рівня негативних реакцій, які традиційно пов'язуються з людськими антимишачими антитілами або іншими раніше описаними частково людськими антитілами від інших видів, окрім людини.

Фахівець у цій галузі може одержати лінії мишей, дефіцитних щодо продукування мишачих антитіл, з великими фрагментами людських Ig локусів, завдяки чому такі миші продукують

людські антитіла за відсутності мишачих антитіл. Великі людські Ig фрагменти можуть зберігати велике розмаїття варіабельних генів, а також відповідну регуляцію продукування і експресії антитіл. Завдяки використанню мишачих клітинних механізмів для диверсифікації та добору антитіл і відсутності імунологічної толерантності до людських білків, спектр репродукованих людських антитіл у таких мишачих лініях надає високоспоріднені антитіла проти будь-якого антигену, що становить інтерес, у тому числі людських антигенів. За допомогою гібридомної технології можуть продукуватись і відбиратись антигенспецифічні людські моноклональні антитіла бажаної специфічності.

Можуть застосовуватись трансгенні тварини (наприклад, миші), що є здатними, у разі імунізації, до продукування повного спектру людських антитіл за відсутності продукування ендогенного імуноглобуліну. Наслідком перенесення сукупності людських зародкових імуноглобулінових генів до таких ембріональних мутантних мишей буде продукування людських антитіл у разі антигенної стимуляції (дивись, наприклад, Джейкобовіц (Jakobovits) та інші, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551-2555, (1993); Джейкобовіц (Jakobovits) та інші, Nature, 362:255-258, (1993); Бруггемен (Bruggemann) та інші, Year in Immun., 7:33 (1993); Nature 148:1547-1553 (1994), Nature Biotechnology 14:826 (1996); Гросс Дж.А. (Gross J.A.) та інші, Nature, 404:995-999 (2000); та патенти США № 5,877,397, № 5,874299, № 5,814,318, № 5,789,650, № 5,770,429, № 5,661,016, № 5,633,425, № 5,625,126, № 5,569,825 та № 5,545,806 (кожен з яких включено до цього опису у повному обсязі шляхом посилання для будь-якої цілі)). Людські антитіла можуть також продукуватись у бібліотеках із проявленням у фагах (Хугенбум (Hoogenboom), Вінтер (Winter), J. Mol. Biol., 227:381 (1992); Маркс (Marks) та інші, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). Доступними для одержання людських моноклональних антитіл є також методи Коул (Cole) та інших і Бернер (Boerner) та інших (Коул (Cole) та інші, Monoclonal Antibodies and Cancer Therap, Alan R. Liss, crop. 77 (1985); Бернер (Boerner) та інші, J. Immunol, 147(1):86-95 (1991)).

Рекомбінантні людські антитіла можуть також бути піддані in vitro мутагенезу (або, у разі застосування тварин, трансгенних за людськими Ig послідовностями, in vivo соматичному мутагенезу) і, таким чином, амінокислотні послідовності VH та VL ділянок рекомбінантних антитіл являють собою послідовності, які, у разі одержання з послідовностей, пов'язаних із людськими зародковими VH та VL послідовностями, можуть не існувати за природних умов у межах зародкового спектру людських антитіл in vivo.

За певними варіантами здійснення досвідчений фахівець для продукування гібридних антитіл такими мишами може застосовувати константні ділянки від інших видів, окрім людини, разом із людською(ими) варіабельною(ими) ділянкою(ами).

Структура природних антитіл

Структурні одиниці природних антитіл являють собою, як правило, тетрамер. Кожен із таких тетрамерів, як правило, складається з двох ідентичних пар поліпептидних ланцюгів, де кожна пара має один повномірний "легкий" ланцюг (молекулярна маса якого становить, як правило, приблизно 25 кДа) і один повномірний "важкий" ланцюг (молекулярна маса якого становить, як правило, приблизно 50-70 кДа). Амінокінцева ділянка кожного легкого і важкого ланцюга, як правило, включає варіабельну ділянку довжиною приблизно 100-110 або більше амінокислот, що, як правило, несе відповідальність за розпізнавання антигенів. Карбоксикінцева ділянка кожного ланцюга, як правило, має константну ділянку, що несе відповідальність за ефекторну функцію. Людські легкі ланцюги, як правило, класифікуються як легкі ланцюги типів каппа і ламбда. Важкі ланцюги, як правило, класифікуються як важкі ланцюги типів мю, дельта, гамма, альфа або епсилон і визначають ізотип антитіла, як IgM, IgD, IgG, IgA та IgE, відповідно. IgG має декілька підкласів, у тому числі (але без обмеження), IgG1, IgG2, IgG3 та IgG4. IgM має підкласи, що включають (але не обмежуються) IgM1 та IgM2. IgA подібним чином підрозділяється на підкласи, що включають (але не обмежуються) IgA1 та IgA2. Варіабельні та константні ділянки у межах повномірних легких і важких ланцюгів сполучаються, як правило, "J" ділянкою, довжина якої становить приблизно 12 або більше амінокислот, причому важкий ланцюг включає також "D" ділянку, довжина якої становить приблизно 10 або більше амінокислот. Дивись, наприклад, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, розділ 7, (редактор Пол В. (Paul W.)), 1989, Raven Press, N.Y. (ця робота включена до цього опису у повному обсязі шляхом посилання для будь-яких цілей). Варіабельні ділянки кожної пари (легкий/важкий ланцюг) утворюють, як правило, антигензв'язувальний центр.

Варіабельні ділянки, як правило, демонструють таку саму загальну структуру, що і відносно консервативні остовні ділянки (FR), і сполучаються трьома гіперваріабельними ділянками, які називають також hv-ділянками (CDRs). Гіперваріабельні ділянки двох ланцюгів кожної пари впорядковано розміщаються остовними ділянками, які можуть забезпечити можливість зв'язування зі специфічною антигенною детермінантою. Від N-кінця до C-кінця варіабельні

ділянки як легких, так і важких ланцюгів включають, як правило, домени FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 та FR4. Приналежність амінокислот до кожного домену відповідає, як правило, визначенням, наведеним у довіднику Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (1987 та 1991, National Institutes of Health, Bethesda, штат Мериленд) та роботах Чотья (Chothia), Леск (Lesk), 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Чотья (Chothia) та інші, 1989, Nature 342:878-883.

Біспецифічні або гетеровалентні антитіла

Біспецифічне або гетеровалентне антитіло, як правило, являє собою штучне гібридне антитіло, що має дві різні пари важкий ланцюг/легкий ланцюг та два різні зв'язувальні центри. Біспецифічні антитіла можна одержати різноманітними методами, у тому числі (але без обмеження) шляхом злиття гібридом або зв'язування F(ab')-фрагментів. Дивись, наприклад, Сонгсівілаі (Songsivilai), Лахман (Lachmann), 1990, Clin. Exp. Immunol. 22:315-321; Костелні (Kostelny) та інші, 1992, J. Immunol. 148:1547-1553.

Одержання антитіл

Цей винахід пропонує антитіла, що зв'язуються з людським NGF. Ці антитіла можуть продукуватись шляхом імунізації повномірним NGF або його фрагментами. Антитіла за цим винаходом можу бути поліклональними або моноклональними та/або можуть бути рекомбінантними антитілами. За варіантами, яким віддають перевагу, антитілами за цим винаходом є людські антитіла, які одержують, наприклад, шляхом імунізації трансгенних тварин, здатних до продукування людських антитіл (дивись, наприклад, міжнародну патентну заявку, публікація WO 93/12227).

Гіперваріабельні ділянки (CDRs) варіабельних ділянок легких і важких ланцюгів анти-NGF антитіл за цим винаходом можуть пересаджуватись до остовних ділянок (FRs) того самого або іншого виду. За певними варіантами здійснення гіперваріабельні ділянки варіабельних ділянок легкого і важкого ланцюгів анти-NGF антитіла можуть пересаджуватись до консенсусних людських остовних ділянок. Для одержання консенсусних людських остовних ділянок, остовні ділянки амінокислотних послідовностей декількох людських важких або легких ланцюгів впорядковано розміщують для визначення консенсусних амінокислотних послідовностей. Остовні ділянки важкого або легкого ланцюга анти-NGF антитіла можуть бути замінені основними ділянками іншого важкого або легкого ланцюга. Рідкі амінокислоти у остовних ділянках важких і легких ланцюгів анти-NGF антитіла, як правило, не замінюються, у той час як решта амінокислот остовних ділянок можуть замінюватись. Рідкими амінокислотами є специфічні амінокислоти, які знаходяться у положеннях, які вони, як правило, у остовних ділянках не займають. Пересаджені варіабельні ділянки анти-NGF антитіл за цим винаходом можуть застосовуватись із константною ділянкою, що відрізняється від константної ділянки анти-NGF антитіла. За альтернативним варіантом, пересаджені варіабельні ділянки є частиною одноланцюгового Fv-антитіла. Пересадження гіперваріабельної ділянки описують, наприклад, у патентах США № 6,180,370, № 5,693,762, № 5,693,761, № 5,585,089 та № 5,530,101, які включено до цього опису шляхом посилання для будь-якої цілі.

Антитіла за цим винаходом, за варіантом, якому віддають перевагу, одержують за допомогою трансгенних мишей, до антитілопродукувальних клітин яких була введена значна частина людського антитілопродукувального локусу. Ці миші були також додатково піддані генно-інженерним заходам для того, щоб перетворитись на дефіцитних із продукування ендогенних мишачих антитіл. Такі миші є здатними до продукування людських імуноглобулінових молекул і антитіл, і не продукують мишачих імуноглобулінових молекул та антитіл або продукують їх у значно зменшеному обсязі. Методики досягнення такого результату розкриваються у патентах, заявках та посиланнях, які розкриваються у наведеному описі. За варіантами, яким віддають перевагу, досвідчений фахівець може застосовувати методи, розкриті у міжнародній патентній заявці, публікація WO 98/24893, яку включено до цього опису шляхом посилання з будь-якою метою. Дивись також роботу Мендес (Mendez) та інші, 1997, Nature Genetics 15:146-156, яку включено до цього опису шляхом посилання з будь-якою метою.

Моноклональні антитіла (mAbs) за цим винаходом можуть продукуватись різноманітними методами, у тому числі за традиційною методикою продукування моноклональних антитіл, наприклад, за стандартною методикою гібридизації соматичних клітин Колер (Kohler) та Мілстейн (Milstein) (1975, Nature 256:495). Незважаючи на те, що перевагу віддають методикам гібридизації соматичних клітин, застосовуватись, у принципі, можуть і інші методики продукування моноклональних антитіл, наприклад, вірусна або онкогенна трансформація В-лімфоцитів.

Тваринною системою для одержання гібридом, якій віддають перевагу, є миші. Спосіб продукування гібридом мишачим організмом є добре розробленим, а схеми імунізації та методи

виділення імунізованих спленоцитів для злиття є добре відомими у цій галузі. Відомими є також клітини, що зливаються (наприклад, клітини мишачої мієломи) та методики злиття.

За варіантом, якому віддають перевагу, людські моноклональні антитіла, спрямовані проти NGF, можуть одержуватись за допомогою трансгенних мишей, які, замість мишачої імунної системи, несуть складові частини людської імунної системи. Ці трансгенні миші, яких у цьому описі позначають як "HuMab" мишей, несуть в собі мінілокус людського імуноглобулінового гена, що кодує неаранжовані імуноглобулінові послідовності людського важкого ланцюга (типів $\mu$ та $\gamma$) і легкого ланцюга типу $\kappa$, разом із цільовими мутаціями, які інактивують локуси ендогенних ланцюгів типів $\mu$ і $\kappa$ (Лонберг (Lonberg) та інші, 1994, Nature 368:856-859). Відповідно, миші демонструють знижену експресію мишачого IgM або $\kappa$ і, у відповідь на імунізацію, введені трансгени людського важкого ланцюга і легкого ланцюга зазнають зміну класу і соматичну мутацію з продукуванням високоспоріднених людських моноклональних антитіл IgG $\kappa$ (Лонберг (Lonberg) та інші (дивись вище); Лонберг (Lonberg), Гушар (Huszar), 1995, Intern. Rev. Immunol. 13:69-93; Гардінг (Harding), Лонберг (Lonberg), 1995, Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546). Одержання HuMab мишей докладно описано у роботах Тейлор (Taylor) та інші, 1992, Nucleic Acids Res. 20:6287-6295; Чен (Chen) та інші, 1993, International Immunology, 5:647-656; Тайон (Tuaillon) та інші, 1994, J. Immunol. 152: 2912-2920; Лонберг (Lonberg) та інші, 1994, Nature 368:856-859; Лонберг (Lonberg), 1994, Handbook of Exp. Pharmacology 113:49-101; Тейлор (Taylor) та інші, 1994, International Immunology 6:579-591; Лонберг (Lonberg), Гушар (Huszar), 1995, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93; Гардінг (Harding), Лонберг (Lonberg), 1995, Ann. N.Y. Acad. Sci 764:536-546; Фішвайлд (Fishwild) та інші, 1996, Nature Biotechnology 14:845-851, які у повному обсязі включено до цього опису шляхом посилання. Дивись також патенти США № 5,545,806; № 5,569,825; № 5,625,126; № 5,633,425; № 5,789,650; № 5,877,397; № 5,661,016; № 5,814,318; № 5,874,299; та № 5,770,429 (усі на ім'я Лонберг (Lonberg) та Кей (Kay)), а також патент США № 5,545,807 (на ім'я Сурані (Surani) та інші); міжнародні заявки WO 93/1227 (опублікована 24 липня 1993 року); WO 92/22646 (опублікована 23 грудня 1992 року); та WO 92/03918 (опублікована 19 березня 1992 року), розкриття яких у повному обсязі включено до цього опису шляхом посилання. За альтернативним варіантом, для одержання людських анти-NGF антитіл можуть застосовуватись трансгенні миші ліній HCo7, HCo12 і KM, опис яких представлено у наведених нижче Прикладах.

Цей винахід пропонує людські моноклональні антитіла, які є специфічними до і нейтралізують біологічно активні людські NGF поліпептиди. Цей винахід пропонує також амінокислотні послідовності важкого і легкого ланцюгів антитіла, які є високоспецифічними до і нейтралізують NGF поліпептиди, у тому разі, коли вони зв'язуються з ними. Ця висока специфічність надає можливість людським антитілам проти людського NGF та людським моноклональним антитілам із подібною специфічністю бути ефективним імунотерапевтичним засобом для лікування NGF-асоційованих захворювань.

За одним з аспектів, цей винахід пропонує виділені людські антитіла, що зв'язують ту саму або по суті ту саму антигенну детермінанту, що і антитіло 4D4, яке пропонується цим винаходом.

За одним з аспектів, цей винахід пропонує виділені людські антитіла, що містять щонайменше одну з амінокислотних послідовностей, представлених ПОСЛІДОВНОСТЯМИ № 10, № 12, № 14, № 16, № 18, № 20, № 22, № 24 та № 79-130, що зв'язують антигенну детермінанту NGF поліпептидів із високою спорідненістю і є здатними до антагонізування активності NGF поліпептидів. За варіантом, якому віддають перевагу, ці антитіла зв'язують ту саму або по суті ту саму антигенну детермінанту, що і антитіло 4D4, яке пропонується цим винаходом.

За варіантами, яким віддають перевагу, виділені людські антитіла зв'язуються з NGF поліпептидом із константою дисоціації ($K_D$) $1\times10^{-9}$ М або менше і пригнічують NGF-індуковану виживаність у in vitro реакції нейтралізації з $IC_{50}$ $1\times10^{-7}$ М або менше. За варіантами, яким віддають більшу перевагу, виділені людські антитіла зв'язуються з NGF поліпептидом із константою дисоціації ($K_D$) $1\times10^{-10}$ М або менше і пригнічують NGF-індуковану виживаність у in vitro реакції нейтралізації з $IC_{50}$ $1\times10^{-8}$ М або менше. За варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, виділені людські антитіла зв'язуються з людським NGF поліпептидом із константою дисоціації ($K_D$) $1\times10^{-11}$ М або менше і пригнічують NGF-індуковану виживаність у in vitro реакції з $IC_{50}$ $1\times10^{-9}$ М або менше. Приклади людських антитіл проти людського NGF, які задовольняють вищезгаданим критеріям зв'язування та нейтралізації, наведені у цьому описі.

Людське антитіло проти людського NGF за цим винаходом, якому віддають найбільшу перевагу, позначається як 4D4 і має VL та VH поліпептидні послідовності, представлені ПОСЛІДОВНІСТЮ № 12 та ПОСЛІДОВНІСТЮ № 10, відповідно. Полінуклеотидна послідовність,

що кодує VL і VH 4D4 представлена ПОСЛІДОВНІСТЮ № 11 та ПОСЛІДОВНІСТЮ № 9, відповідно. Властивості людських антитіл проти людського NGF за цим винаходом розкриваються, зокрема, у Прикладах. Особливої уваги заслуговує показана у цьому описі висока спорідненість до NGF поліпептиду і висока здатність антагонізувати активність NGF поліпептиду.

Константа дисоціації ($K_D$) людського антитіла проти людського NGF може визначатись поверхневим плазмонним резонансом, як у цілому описано у Прикладі 9. Взагалі, аналізом поверхневого плазмонного резонансу (SPR) із застосуванням системи BIAcore (Pharmacia Biosensor, Piscataway, штат Нью-Джерсі) у масштабі реального часу визначають зв'язувальні взаємодії між лігандом (рекомбінантний NGF поліпептид, іммобілізований на біосенсорній матриці) та речовиною, яку піддають аналізу (антитіла у розчині). Аналіз поверхневого плазмонного резонансу може здійснюватись також шляхом іммобілізації речовини, яку піддають аналізу (антитіла на біосенсорній матриці), і представленням ліганду (рекомбінант V у розчині). Константа дисоціації ($K_D$) людського антитіла проти людського NGF може визначатись також за методикою KinExA. За певними варіантами здійснення цього винаходу антитіла зв'язуються з NGF з $K_D$ у межах приблизно $10^{-8}$ М-$10^{-12}$ М. Термін "$K_D$", що застосовується у цьому описі, означає константу дисоціації конкретної взаємодії антитіла-антигена. Для цілей цього винаходу $K_D$ визначали як показано у Прикладі 9.

За варіантами, яким віддають перевагу, антитіла за цим винаходом належать до ізотипів IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4. За варіантом, якому віддають перевагу, згадані антитіла належать до ізотипу IgG3. За варіантом, якому віддають більшу перевагу, згадані антитіла належать до ізотипу IgG1. За варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, згадані антитіла належать до ізотипу IgG2. За іншими варіантами здійснення антитіла за цим винаходом належать до ізотипів IgM, IgA, IgE або IgD. За варіантами здійснення цього винаходу, яким віддають перевагу, згадані антитіла містять людський легкий ланцюг типу каппа та людський важкий ланцюг IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4. Експресію антитіл за цим винаходом, що містять константну ділянку важкого ланцюга IgGl або IgG2, описують у наведених нижче Прикладах. За конкретними варіантами здійснення варіабельні ділянки згаданих антитіл лігуються до іншої константної ділянки, окрім константної ділянки ізотипів IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4. За певними варіантами здійснення антитіла за цим винаходом клонували для експресії у клітинах ссавців.

За певними варіантами здійснення наслідком консервативних модифікацій важких ланцюгів і легких ланцюгів анти-NGF антитіл (і відповідних модифікацій кодувальних нуклеотидів) буде одержання анти-NGF антитіл, що мають функціональні і хімічні характеристики, подібні відповідним характеристикам анти-NGF антитіл, що розкриваються у цьому описі. У протилежність до цього, значні модифікації функціональних та/або хімічних характеристик анти-NGF антитіл можуть здійснюватись шляхом вибору замін у амінокислотній послідовності важких і легких ланцюгів, що значно відрізняються за їх ефектом на підтримання (a) структури молекулярного остову на ділянці заміни, наприклад, листової або спіральної конформації, (b) заряду або гідрофобності молекули на цільовій ділянці, або (c) об'єму бічного ланцюга.

Наприклад, "консервативна амінокислотна заміна" може залучати заміну нативного амінокислотного залишку ненативним залишком, що незначно або зовсім не впливає на полярність або заряд амінокислотного залишку у цьому положенні. Окрім того, будь-який нативний залишок поліпептиду може також бути заміненим на аланін, як описувалось раніше для "мутагенезу методом ідентифікації аланіну".

Бажані амінокислотні заміни (консервативні або неконсервативні) можуть визначатись фахівцями у цій галузі під час виникнення необхідності у таких замінах. За певними варіантами здійснення амінокислотні заміни можуть застосовуватись для ідентифікації важливих залишків анти-NGF антитіла або для посилення чи ослаблення спорідненості анти-NGF антитіл, опис яких наведено.

Як добре відомо, наслідком незначних замін у амінокислотній послідовності, наприклад, видалення, додання або заміни однієї, декількох або навіть декількох десятків амінокислот, може бути одержання алельної форми вихідного білка, яка має по суті ідентичні властивості. Таким чином, на додаток до антитіл, опис яких наведено, інші "по суті гомологічні" антитіла можуть легко розроблятись і одержуватись із застосуванням різноманітних методів рекомбінантних ДНК, добре відомих фахівцям у цій галузі. Взагалі, модифікації генів можуть легко здійснюватись різноманітними добре відомими методами, наприклад, сайт-спрямованим мутагенезом. Таким чином, цей винахід передбачає "варіантні" або "мутантні" людські антитіла проти NGF, що мають характеристики по суті подібні характеристикам людських антитіл проти NGF, які розкриваються у цьому описі. (Дивись, наприклад, WO 00/56772, яку у повному обсязі включено до цього опису шляхом посилання). Таким чином, згаданий термін "варіантне" або

"мутантне" у відношенні до людського антитіла проти NGF означає будь-яку зв'язувальну молекулу (молекулу X) (i) гіперваріабельні ділянки CDR1, CDR2 і CDR3 важкого ланцюга або гіперваріабельні ділянки CDR1, CDR2 і CDR3 легкого ланцюга якої, взяті у цілому, є щонайменше на 80 % гомологічними, за варіантом, якому віддають перевагу, щонайменше на 90 % гомологічними, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, щонайменше на 95 % гомологічними гіперваріабельним ділянкам, представленим ПОСЛІДОВНОСТЯМИ № 14, № 18 і № 22 або ПОСЛІДОВНОСТЯМИ № 16, № 20 і № 24, відповідно, і (ii) варіант або мутант якої є здатним до пригнічення активності людського NGF такою самою мірою, що і еталонне людське антитіло проти NGF, яке має остовні ділянки, ідентичні остовним ділянкам молекули X.

За звичайних умов варіант людського антитіла проти NGF буде мати гіперваріабельні ділянки легкого та/або важкого ланцюга, які, взяті у цілому, мають щонайменше приблизно 80 % ідентичність амінокислотних послідовностей, за варіантом, якому віддають перевагу, щонайменше приблизно 85 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 90 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 91 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 92 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 93 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 94 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 95 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 96 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 97 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 98 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 99 % ідентичність послідовностей з амінокислотними послідовностями, представленими ПОСЛІДОВНОСТЯМИ № 14, № 18 і № 22 та/або ПОСЛІДОВНОСТЯМИ № 16, № 20 і № 24, відповідно.

За варіантом, якому віддають більшу перевагу, варіант людського антитіла проти NGF буде мати варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка, взята у цілому, має щонайменше приблизно 80 % ідентичність амінокислотних послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 81 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 82 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 83 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 84 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 85 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 86 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 87 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 88 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 89 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 90 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 91 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 92 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 93 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 94 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 95 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 96 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 97 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 98 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 99 % ідентичність послідовностей з амінокислотними послідовностями, представленими ПОСЛІДОВНОСТЯМИ № 12, № 80, № 82, № 84, № 86, № 88, № 89, № 90 або № 91, та/або варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка, взята у цілому, має щонайменше приблизно 70 % ідентичність амінокислотних послідовностей, за варіантом, якому віддають перевагу, щонайменше приблизно 75 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 80 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 81 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 82 % ідентичність

послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 83 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 84 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 85 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 86 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 87 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 88 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 89 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 90 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 91 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 92 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 93 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 94 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 95 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 96 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 97 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 98 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 99 % ідентичність послідовностей з амінокислотними послідовностями, представленими ПОСЛІДОВНОСТЯМИ № 10, № 81, № 83, № 85 або № 87.

Термін "варіант" відносно полінуклеотиду означає нуклеїновокислотну молекулу, що має щонайменше приблизно 75 % ідентичність нуклеїновокислотної послідовності з полінуклеотидною послідовністю за цим винаходом. За звичайних умов полінуклеотидний варіант буде мати щонайменше приблизно 75 % ідентичність нуклеїновокислотної послідовності, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, щонайменше приблизно 80 % ідентичність нуклеїновокислотних послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 81 % ідентичність нуклеїновокислотних послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 82 % ідентичність нуклеїновокислотних послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 83 % ідентичність нуклеїновокислотних послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 84 % ідентичність нуклеїновокислотних послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 85 % ідентичність нуклеїновокислотних послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 86 % ідентичність нуклеїновокислотних послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 87 % ідентичність нуклеїновокислотних послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 88 % ідентичність нуклеїновокислотних послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 89 % ідентичність нуклеїновокислотних послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 90 % ідентичність нуклеїновокислотних послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 91 % ідентичність нуклеїновокислотних послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 92 % ідентичність нуклеїновокислотних послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 93 % ідентичність нуклеїновокислотних послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 94 % ідентичність нуклеїновокислотних послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 95 % ідентичність нуклеїновокислотних послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 96 % ідентичність нуклеїновокислотних послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 97 % ідентичність нуклеїновокислотних послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 98 % ідентичність нуклеїновокислотних послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 99 % ідентичність нуклеїновокислотних послідовностей з новою амінокислотною послідовністю, що розкривається у цьому описі.

За конкретними варіантами здійснення цей винахід пропонує антитіла, що мають відсоток ідентичності з антитілом за цим винаходом або антитіло, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, варіабельну ділянку легкого ланцюга, CDR1, CDR2 або CDR3 ділянку, що має

відсоток ідентичності з варіабельною ділянкою важкого ланцюга, варіабельною ділянкою легкого ланцюга, CDR1, CDR2 або CDR3 ділянкою за цим винаходом, як показано у наведеному у цьому описі Прикладі 10 та Фігурах 5-10.

За конкретними варіантами здійснення цей винахід пропонує виділене людське антитіло, яке специфічно зв'язує фактор росту нервової тканини і містить важкий ланцюг і легкий ланцюг, де згаданий важкий ланцюг містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, яка є: щонайменше на 70 % або 75 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 10, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 %, 80 %, 85 % або 95 % гомологічною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 81, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 %, 80 %, 85 % або 95 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 83, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 75 %, 80 % або 85 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 85, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 %, 75 % або 80 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 87, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 56 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 79, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту.

За конкретними варіантами здійснення цей винахід пропонує виділене людське антитіло, яке специфічно зв'язує фактор росту нервової тканини і містить важкий ланцюг і легкий ланцюг, де згаданий легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, яка є: щонайменше на 70 %, 75 %, 80 % або 90 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 12, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 %, 85 % або 90 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 80, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 %, 74 %, 90 % або 94 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 88, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 %, 80 %, 85 % або 87 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 89, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 %, 85 %, 90 % або 94 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 90, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 %, 85 %, 90 %, 95 % або 99 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 91, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 96 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 82, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 84, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 86, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту.

За певними іншими варіантами здійснення цей винахід пропонує виділене людське антитіло, яке специфічно зв'язує фактор росту нервової тканини і містить CDR1 людського важкого ланцюга, де згадана CDR1 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, яка є щонайменше на 40 % або 60 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 98, ПОСЛІДОВНІСТЮ № 105, ПОСЛІДОВНІСТЮ № 110 або ПОСЛІДОВНІСТЮ № 22, чи її антигензв'язувальному або імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту.

За іншими варіантами здійснення цей винахід пропонує виділене людське антитіло, яке специфічно зв'язує фактор росту нервової тканини і містить CDR2 людського важкого ланцюга, де згадана CDR2 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, що є: щонайменше на 70 %, 82 % або 94 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 99, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 % або 76 % ідентичною амінокислотній

послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 106, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 59 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ №18, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 117, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; або щонайменше на 70 %, 75 % або 80 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 111, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту.

За ще іншими варіантами здійснення цей винахід пропонує виділене людське антитіло, яке специфічно зв'язує фактор росту нервової тканини і містить CDR1 людського легкого ланцюга, де згадана CDR1 має амінокислотну послідовність, яка є: щонайменше на 70 % або 80 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 101, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 %, 75 %, 80 % або 90 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 95, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 75 %, 80 % або 90 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 119, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 75 %, 80 % або 90 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 122, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 80 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 125, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 75 %, 80 % або 90 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 24, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 % або 80 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 107, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; або щонайменше на 70 % або 80 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 113, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту.

За додатковими варіантами здійснення цей винахід пропонує виділене людське антитіло, яке специфічно зв'язує фактор росту нервової тканини і містить CDR2 людського легкого ланцюга, де згадана CDR2 має амінокислотну послідовність, що є: щонайменше на 70 % або 85 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 102, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 96, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ №120, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 123, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 % або 85 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 126, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 % або 85 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 129, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 20, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 % або 85 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ №108, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 133, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; або щонайменше на 70 % або 85 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 114, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту.

За іншими варіантами здійснення цей винахід пропонує виділене людське антитіло, яке специфічно зв'язує фактор росту нервової тканини і містить CDR3 людського легкого ланцюга, де згадана CDR3 має амінокислотну послідовність, що є: щонайменше на 70 % або 85 %

ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 103, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 % або 85 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 97, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 % або 78 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ №121, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 % або 78 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 127, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 % або 78 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 130, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 % або 78 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 16, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 % або 85 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 109, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 78 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 134, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; або щонайменше на 85 % ідентичною амінокислотній послідовності, представленій ПОСЛІДОВНІСТЮ № 115, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту.

Послідовності варіабельних ділянок важкого і легкого ланцюгів антитіла 4D4 представлені ПОСЛІДОВНОСТЯМИ № 10 і № 12, відповідно. Однак багато потенційних залишків, що контактують із гіперваріабельною ділянкою, є придатними для заміни іншими амінокислотами, але незважаючи на це, антитіло зберігає значний ступінь спорідненості з антигеном. Подібним же чином, багато залишків остовних ділянок, які не контактують із гіперваріабельними ділянками важких і легких ланцюгів, можуть сприйняти заміни амінокислот із відповідних положень інших людських антитіл, людських консенсусних амінокислот або з інших мишачих антитіл, без значної втрати спорідненості або неімуногенності людського антитіла. Можна вдатись до вибору різних альтернативних амінокислот для одержання версій розкритих анти-NGF антитіл та їхніх фрагментів, що мають різні комбінації спорідненості, специфічності, неімуногенності, легкості одержання та інші бажані властивості.

За альтернативними варіантами здійснення антитіла за цим винаходом можуть експресуватись у інших лініях клітин, окрім ліній клітин гібридом. За цими варіантами здійснення для трансформації відповідних клітин-хазяїв ссавців можуть застосовуватись послідовності, що кодують конкретні антитіла. За цими варіантами здійснення трансформація може здійснюватись за допомогою будь-якого відомого способу введення полінуклеотидів до клітини-хазяїна, у тому числі, наприклад, шляхом пакування полінуклеотиду до вірусу (або до вектора на основі вірусного геному) і трансдукції клітини-хазяїна згаданим вірусом (або вектором) чи за допомогою методів трансфекції, відомих у цій галузі, як описано у патентах США № 4,399,216, № 4,912,040, № 4,740,461 та № 4,959,455 (усі з яких включені до цього опису шляхом посилання для будь-якої цілі). Взагалі, застосована методика трансформації може залежати від хазяїна, що піддається трансформації. Методи введення гетерологічних полінуклеотидів до клітин ссавців є добре відомими у цій галузі і включають (але без обмеження) декстран-опосередковану трансфекцію, осадження фосфатом кальцію, полібрен-опосередковану трансфекцію, злиття протопластів, електропорацію, пакування полінуклеотиду(-ів) до ліпосом та пряму мікроін'єкцію ДНК до ядер.

Нуклеїновокислотну молекулу, що кодує амінокислотну послідовність константної ділянки важкого ланцюга, варіабельної ділянки важкого ланцюга, константної ділянки легкого ланцюга або варіабельної ділянки легкого ланцюга NGF-антитіла за цим винаходом, вводять до відповідного експресійного вектора за допомогою стандартного методу лігування. За варіантами, яким віддають перевагу, константна ділянка важкого ланцюга або легкого ланцюга анти-NGF антитіла додається до С-кінця відповідної варіабельної ділянки і лігується до експресійного вектора. Згаданий вектор, як правило, вибирають таким чином, щоб він був функціональним у конкретній застосованій клітині-хазяїні (тобто згаданий вектор є сумісним із механізмами клітини-хазяїна такою мірою, що може відбуватись ампліфікація та/або експресія гена). Огляд експресійних векторів дивись у роботі METH. ENZ. 185 (редактор Геддел (Goeddel)), 1990, Academic Press.

За типовим варіантом, експресійні вектори, що застосовуються у будь-якій з клітин-хазяїв, будуть містити послідовності для підтримання плазмід та для клонування і експресії екзогенних

нуклеотидних послідовностей. Такі послідовності, які за певними варіантами здійснення у сукупності називають "фланкуючими послідовностями", будуть, як правило, включати одну або декілька з наведених нижче нуклеотидних послідовностей: промотор, одну або декілька енхансерних послідовностей, сайт ініціації реплікації, термінатор транскрипції, повну інтронну послідовність, що містить донорну та акцепторну точку сплайсингу, послідовність, що кодує лідерну послідовність для секреції поліпептиду, сайт зв'язування рибосоми, послідовність поліаденілування, полілінкерну ділянку для введення нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид для експресії та селективний маркерний елемент. Кожна з цих послідовностей обговорюється нижче.

За факультативним варіантом, згаданий вектор може містити послідовність кодування "мітки", тобто олігонуклеотидну молекулу, розміщену на 5' або 3' кінці поліпептидної кодувальної послідовності анти-NGF антитіла; згадана олігонуклеотидна послідовність кодує поліHis (наприклад, гексаHis) або іншу "мітку", наприклад, FLAG, HA (гемаглютинін вірусу грипу) або тус, для яких існують комерційно доступні антитіла. Ця мітка, як правило, зливається з поліпептидом при його експресії, і може правити за засіб афінного очищення або виявлення NGF антитіла у клітині-хазяїні. Афінне очищення може здійснюватись, наприклад, шляхом хроматографування на колонках із застосуванням антитіл проти згаданої мітки, як афінної матриці. За факультативним варіантом, згадана мітка може у подальшому видалятись з очищеного анти-NGF антитіла різними способами, наприклад, шляхом застосування певних пептидаз для розщеплення.

Фланкуючі послідовності можуть бути гомологічними (тобто від того самого виду та/або штаму, що і клітина-хазяїн), гетерологічними (тобто від інших видів, окрім виду клітини-хазяїна або штаму), гібридними (тобто комбінація фланкуючих послідовностей з більше ніж одного джерела), синтетичними або нативними. Як таким, джерелом фланкуючої послідовності може бути будь-який прокаріотний або еукаріотний організм, будь-який хребетний або безхребетний організм або будь-яка рослина, за умови, що згадана фланкуюча послідовність є функціональною у клітинних механізмах клітини-хазяїна і може бути активованою клітинними механізмами клітини-хазяїна.

Фланкуючі послідовності, придатні для згаданих векторів за цим винаходом, можна одержати за допомогою будь-якого з декількох способів, добре відомих у цій галузі. За типовим варіантом, фланкуючі послідовності, придатні для цього винаходу, будуть попередньо ідентифікуватись шляхом картування та/або рестриктазного розщеплення і можуть, таким чином, виділятись з відповідного тканинного джерела за допомогою відповідних рестриктаз. У деяких випадках, повна нуклеотидна послідовність фланкуючої послідовності може бути відомою. У такому разі, фланкуюча послідовність може бути синтезована за допомогою наведених у цьому описі методів синтезу або клонування нуклеїнових кислот.

Незалежно від того, чи є відомою уся або лише частина фланкуючої послідовності, цю фланкуючу послідовність можна одержати за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (PCR) та/або шляхом скринінгу геномної бібліотеки за допомогою відповідного зонда, наприклад, олігонуклеотиду та/або фрагмента фланкуючої послідовності від того самого або іншого виду. У разі, коли фланкуюча послідовність є невідомою, фрагмент ДНК, що містить фланкуючу послідовність, може бути виділеним із більшого відрізку ДНК, що може містити, наприклад, кодувальну послідовність або навіть інший ген або гени. Виділення може здійснюватись шляхом рестриктазного розщеплення з одержанням відповідного фрагмента ДНК з подальшим виділенням шляхом очищення на лунках із гелем агарози, хроматографування на колонках Qiagen® (Chatsworth, штат Каліфорнія) або за допомогою інших методів, відомих досвідченому фахівцю. Вибір відповідних ферментів для досягнення згаданої мети буде очевидним для пересічного фахівця у цій галузі.

Сайт ініціації реплікації являє собою, як правило, частину тих прокаріотних експресійних векторів, які одержують з комерційних джерел, і згаданий сайт допомагає у разі ампліфікації вектора у клітина-хазяїні. Якщо обраний вектор не містить сайту ініціації реплікації, його можна синтезувати хімічним шляхом, виходячи з відомої послідовності, та лігувати до вектора. Наприклад, сайт ініціації реплікації з плазміди pBR322 (фірма New England Biolabs, Beverly, штат Массачусетс) є придатним для більшості грамнегативних бактерій, а різноманітні вірусні сайти (наприклад, SV40, вірусу поліоми, аденовірусу, вірусу везикулярного стоматиту (VSV) або вірусу папіломи, наприклад, вірусу папіломи людини (HPV) або вірусу папіломи великої рогатої худоби (BPV)) є придатними для клонування векторів у клітинах ссавців. Взагалі, така складова, як сайт ініціації реплікації не є необхідною для експресійних векторів ссавців (наприклад, сайт ініціації реплікації SV40 часто застосовують лише тому, що він містить також ранній промотор вірусу).

Термінатор транскрипції, як правило, знаходиться у прямому (3) напрямку відносно кінця поліпептидної кодувальної ділянки і призначений для закінчення транскрипції. Термінатор у клітинах-прокаріотах являє собою, як правило, G-C-збагачений фрагмент, за яким іде полі(Т)-послідовність. Незважаючи на те, що термінатор легко клонується з бібліотеки або навіть одержується з комерційних джерел як частина вектора, він може бути легко синтезованим за допомогою методів синтезу нуклеїнових кислоти, наприклад, наведених у цьому описі.

Маркерний ген, що селектується, Селектований маркерний ген кодує білок, необхідний для виживання та росту клітини-хазяїна, яка вирощується на селективному культуральному середовищі. Типові селектовані маркерні гени кодують білки, які (а) забезпечують стійкість до антибіотиків або інших токсинів, наприклад, ампіциліну, тетрацикліну або канаміцину у разі прокаріотних клітин-хазяїв; (Ь) доповнюють ауксотрофні дефіцити клітини; або (с) постачають критичні поживні речовини, недоступні із живильних середовищ повного або певного складу. Переважними селектованими маркерними генами є ген стійкості до канаміцину, ген стійкості до ампіциліну та ген стійкості до тетрацикліну. Перевага полягає у тому, що ген стійкості до неоміцину може також застосовуватись для добору як прокаріотних, так і еукаріотних клітин-хазяїв.

Для ампліфікації гена, який буде експресуватись, можуть застосовуватись інші селектовані гени. Ампліфікація являє собою процес, під час якого гени, необхідні для продукування білка, критичного для росту або виживання клітини, послідовно повторюються у хромосомах наступних генерацій рекомбінантних клітин. Прикладами придатних селектованих маркерів для клітин ссавців є дигідрофолатредуктаза (DHFR) та безпромоторні гени тимідинкінази. Клітини-трансформанти ссавців піддаються селекційному тиску, у разі якого лише трансформанти виявляються специфічно пристосованими для виживання завдяки присутності у векторі селектованого гена. Селекційний тиск накладається шляхом культивування трансформованих клітин за умов, при яких концентрація селекційного засобу у живильному середовищі поступово збільшується, наслідком чого є ампліфікація як селектованого гена, так і ДНК, що кодує інший ген, наприклад, антитіло, що зв'язується з NGF поліпептидом. Як наслідок, з ампліфікованої ДНК синтезуються підвищені кількості поліпептиду, наприклад, анти-NGF антитіла.

Сайт зв'язування рибосоми є, як правило, необхідним для ініціювання трансляції мРНК і характеризується присутністю послідовності Шайна-Делгарно (прокаріоти) або послідовності Козака (еукаріоти). Згаданий елемент знаходиться, як правило, у прямому (3') напрямку відносно промотору і зворотному (5') напрямку відносно кодувальної послідовності поліпептиду, що буде експресуватись.

У деяких випадках, наприклад, коли бажаним є глікозилування експресійної системи, представленої еукаріотною клітиною-хазяїном, для поліпшення глікозилування або виходу можна здійснювати маніпуляції з різними пре- або пропослідовностями. Наприклад, можна змінити сайт пептидазного розщеплення конкретного сигнального пептиду або додати пропослідовності, які також можуть вплинути на глікозилування. Кінцевий білковий продукт може мати у -1 положенні (відносно першої амінокислоти зрілого білка) одну або декілька додаткових амінокислот, зв'язаних з експресією, які могли бути неповністю видаленими. Наприклад, кінцевий білковий продукт може мати один або два амінокислотні залишки на сайті пептидазного розщеплення, приєднані до амінокінця. За альтернативним варіантом, наслідком застосування деяких сайтів ферментативного розщеплення може буде дещо укорочена форма бажаного поліпептиду, якщо фермент виявляє свою дію на такій ділянці у межах зрілого поліпептиду.

Вектори експресії та клонування за цим винаходом будуть, як правило, містити промотор, який розпізнається організмом-хазяїном і є функціонально зв'язаним із молекулою, що кодує анти-NGF антитіло. Промоторами є нетранскрибовані послідовності, які знаходяться у зворотному напрямку (тобто 5') відносно стартового кодону структурного гена (як правило, приблизно у межах від 100 п.н. до 1000 п.н.), що контролюють транскрипцію структурного гена. Промотори, за традицією, об'єднують одним або двома класами: індуцибельні промотори і конститутивні промотори. Індуцибельні промотори ініціюють підвищені рівні транскрипції з ДНК під своїм контролем у відповідь на деяку зміну умов культивування, наприклад, присутність або відсутність поживної речовини або зміну температури. Конститутивні промотори, з іншого боку, одностайно транскрибують ген, з яким вони є функціонально зв'язаними, тобто з незначним або повною відсутністю контролю за експресією гена. Добре відомою є велика кількість промоторів, що розпізнаються різноманітними потенційними клітинами-хазяями. Придатний промотор функціонально зв'язується з ДНК, що кодує важкий ланцюг або легкий ланцюг, що містить анти-NGF антитіло за цим винаходом, шляхом видалення згаданого промотору з ДНК-джерела рестриктазним розщепленням і введенням бажаної промоторної послідовності до вектора.

У цій галузі добре відомими є також придатні промотори для застосування з дріжджовими клітинами-хазяями. Дріжджові енхансери застосовуються переважно з дріжджовими промоторами. Придатні промотори для застосування з клітинами-хазяями ссавців є добре відомими і включають (але без обмеження) промотори, одержані з геномів таких вірусів, як вірус поліоми, вірус віспи птиці, аденовірус (наприклад, аденовірус 2), вірус папіломи великої рогатої худоби, вірус саркоми птиці, вірус цитомегалії людини, ретровіруси, вірус гепатиту В і, за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, мавпячий вірус 40 (SV40). До інших придатних промоторів ссавців належать гетерологічні промотори ссавців, наприклад, промотори теплового шоку та промотор актину.

Додаткові промотори, що можуть становити інтерес, включають (але не обмежуються): ранній промотор SV 40 (Бернуа (Bernoist), Шамбон (Chambon), 1981, Nature 290:304-10); промотор CMV (Томсен (Thomsen) та інші, 1984, Proc. Natl. Acad. USA 81:659-663); промотор, що міститься у 3' довгому кінцевому повторі вірусу саркоми Рауса (Ямамото (Yamamoto) та інші, 1980, Cell 22:787-797); промотор тимідинкінази вірусу герпесу (Вагнер (Wagner) та інші, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1444-1445); промотор та регуляторні послідовності гена металотіоніну (Брінстер (Brinster) та інші, 1982, Nature 296:39-42); та промотори прокаріот, наприклад, промотор бета-лактамази (Вілла-Камароф (Villa-Kamaroff) та інші, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75:3727-3731); або tac промотор (Дебер (DeBoer) та інші, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:21-25). Інтерес становлять також наведені нижче ділянки транскрипційного контролю тварин, які демонструють тканинну специфічність і застосовуються у трансгенних тварин: контрольна ділянка гена еластази I, що є активною у ацинарних клітинах підшлункової залози (Свіфт (Swift) та інші, 1984, Cell 38:639-646; Орніц (Ornitz) та інші, 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986); Макдоналд (MacDonald), 1987, Hepatology 7:425-515); контрольна ділянка інсулінового гена, що є активною у бета-клітинах підшлункової залози (Ханахан (Hanahan), 1985, Nature 315:115-22); контрольна ділянка імуноглобулінового гена, що є активною у лімфоїдних клітинах (Гросшедл (Grosschedl) та інші, 1984, Cell 38:647-658; Адамес (Adames) та інші, 1985, Nature 318:533-538; Александер (Alexander) та інші, 1987, Мої. Cell. Biol, 7:1436-1444); контрольна ділянка вірусу пухлин молочної залози мишей, що є активною у тестикулярних клітинах, клітинах молочної залози, лімфоїдних клітинах та тканинних базофільних гранулоцитах (Ледер (Leder) та інші, 1986, Cell 45:485-495); контрольна ділянка альбумінового гена, що є активною у печінці (Пінкерт (Pinkert) та інші, 1987, Genes and Devel. 1:268-276); контрольна ділянка гена альфа-фетобілка, що є активною у печінці (Крумлауф (Krumlauf) та інші, 1985, Mol. Cell. Biol., 5:1639-1648; Хаммер (Hammer) та інші, 1987, Science 235:53-58); контрольна ділянка гена альфа 1-антитрипсину, що є активною у печінці (Келсі (Kelsey) та інші, 1987, Genes and Devel. 1:161-171); контрольна ділянка гена бета-глобіну, що є активною у мієлоїдних клітинах (Могрем (Mogram) та інші, 1985, Nature 315:338-340; Колліас (Kollias) та інші, 1986, Cell 46:89-94); контрольна ділянка основного мієлінового білка, що є активною у олігодендроцитах головного мозку (Рідхед (Readhead) та інші, 1987, Cell 48:703-712); контрольна ділянка гена легкого ланцюга-2 міозину, що є активною у скелетних м'язах (Сані (Sani), 1985, Nature 314:283-286); та контрольна ділянка гена гонадотропінвивільнювального гормону, що є активною у гіпоталамусі (Мейсон (Mason) та інші, 1986, Science 234:1372-1378).

Енхансерна послідовність може вводитись до вектора для підсилення транскрипції ДНК, що кодує легкий ланцюг або важкий ланцюг, що містить анти-NGF антитіло за цим винаходом, вищими еукаріотами. Енхансери є ^недіючими елементами ДНК, довжиною, як правило, приблизно 10-300 п.н., які діють на промотор для підсилення транскрипції. Енхансери є відносно орієнтаційно та позиційно незалежними, оскільки їх знаходили як у 5'-, так і у 3'-положеннях відносно транскрипційної одиниці. Відомими є декілька енхансерних послідовностей, доступних із генів ссавців (наприклад, глобін, еластаза, альбумін, альфа-фетопротеїн та інсулін). За типовим варіантом, однак, застосовують енхансер із вірусу. Зразковими енхансерними елементами для активації еукаріотних промоторів є такі відомі у цій галузі, як енхансер SV 40, енхансер раннього промотору вірусу цитомегалії людини, енхансер вірусу поліоми та енхансери аденовірусу. Незважаючи на те, що енхансер може займати у векторі 5'- або 3'-положення відносно кодувальної послідовності, він, як правило, розміщується на ділянці у зворотному напрямку (5')відносно промотора.

Експресійні вектори за цим винаходом можуть конструюватись із вихідного вектора, наприклад, комерційно доступного вектора. Такі вектори можуть містити або можуть не містити усі бажані фланкуючі послідовності. У разі, якщо у згаданому векторі немає однієї або декількох фланкуючих послідовностей, опис яких наведено, вони можуть бути одержані у індивідуальному

порядку і ліговані до вектора. Методи, що застосовуються для одержання кожної зі згаданих фланкуючих послідовностей, є добре відомими фахівцю у цій галузі.

Після завершення конструювання вектора і введення нуклеїновокислотної молекули, що кодує легкий ланцюг, важкий ланцюг або легкий ланцюг і важкий ланцюг, що містить анти-NGF антитіло, на відповідну ділянку вектора, готовий вектор може вводитись до відповідної клітини-хазяїна для ампліфікації та/або експресії поліпептиду. Трансформація експресійного вектора для анти-NGF антитіла у вибраній клітині-хазяїні може здійснюватись добре відомими методами, у тому числі шляхом трансфекції, інфекції, копреципітації фосфатом кальцію, електропорації, мікроін'єкції, ліпофекції, трансфекції, опосередкованої ДЕАЕ-декстраном або інших відомих методів. Вибраний метод буде частково залежати від типу застосованої клітини-хазяїна. Ці методи та інші придатні методи є добре відомими досвідченому фахівцю і наведені, наприклад, у довіднику Сембрук (Sambrook) та інших (дивись вище).

Клітина-хазяїн, культивована за відповідних умов, синтезує анти-NGF антитіло, яке у подальшому може виділятись із культурального середовища (якщо клітина-хазяїн секретує його до живильного середовища) або безпосередньо з клітини-хазяїна, що його продукує (якщо воно не секретується). Вибір придатної клітини-хазяїна буде залежати від різних факторі, у тому числі бажаних рівнів експресії, модифікацій поліпептиду, що є бажаними або необхідними для активності (наприклад, глікозилування або фосфорилування) та легкості укладання у біологічно активну молекулу.

Лінії клітин ссавців, доступні як хазяї для експресії, є добре відомими у цій галузі і включають (але без обмеження) імморталізовані лінії клітин, доступні від Американської колекції типових культур (ATCC), у тому числі (але без обмеження), клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), клітини HeLa, клітини нирок хом'ячка (BHK), клітини нирок мавпи (COS), клітини злоякісної гепатоми людини (наприклад, Hep G2) та ряд інших клітинних ліній. За певними варіантами здійснення лінії клітин можуть бути вибрані шляхом визначення, яка з клітинних ліній має високі рівні експресії і конститутивно продукує антитіла з NGF-зв'язувальними властивостями. За іншими варіантами здійснення може бути вибрана лінія клітин B-клітинної лінії диференціювання, яка не продукує свого власного антитіла, але є здатною до продукування та секреції гетерологічного антитіла.

Антитіла за цим винаходом є придатними для виявлення NGF у біологічних пробах та ідентифікації клітин або тканин, що продукують NGF білок. Антитіла за цим винаходом, які специфічно зв'язуються з NGF, можуть бути придатними для лікування NGF-опосередкованих захворювань. Згадані антитіла можуть застосовуватись у реакціях зв'язування для виявлення NGF та пригнічення утворення комплексу NGF із рецепторами NGF. Згадані антитіла, що зв'язуються з NGF і блокують взаємодію з іншими зв'язувальними сполуками, можуть мати терапевтичне застосування при модулюванні NGF-опосередкованих захворювань. За варіантами, яким віддають перевагу, антитіла проти NGF можуть блокувати зв'язування NGF з його рецептором, наслідком чого може бути руйнування шляху трансдукції NGF-індукованого сигналу.

Цей винахід має також відношення до застосування одного або декількох антитіл за цим винаходом для виготовлення лікарського засобу для лікування болісного розладу або стану, що спричинюється підвищеною експресією NGF або підвищеною чутливістю до NGF у хворого, наприклад, будь-якого з розладів або станів, розкритих у цьому описі.

За варіантами, яким віддають перевагу, цей винахід пропонує фармацевтичні композиції, що містять терапевтично ефективну кількість одного або декількох антитіл за цим винаходом разом із фармацевтично прийнятним розріджувачем, носієм, солюбілізатором, емульгатором, консервантом та/або ад'ювантом. За варіантом, якому віддають перевагу, матеріали, придатні для композицій, є нетоксичними для реципієнтів у застосованих дозах та концентраціях. За варіантами, яким віддають перевагу, пропонуються фармацевтичні композиції, що містять терапевтично ефективну кількість анти-NGF антитіл.

За певними варіантами здійснення матеріали, придатні для композицій, є нетоксичними для реципієнтів у застосованих дозах та концентраціях.

За певними варіантами здійснення фармацевтична композиція може містити матеріали для модифікування, підтримання або збереження, наприклад, pH, осмотичного тиску, в'язкості, прозорості, кольору, ізотонічності, запаху, стерильності, стабільності, швидкості розчинення або виділення, поглинання або проникнення згаданої композиції. За такими варіантами здійснення до придатних для одержання композицій матеріалів належать (але ними не обмежуються) амінокислоти (наприклад, гліцин, глутамін, аспарагін, аргінін або лізин); протимікробні засоби; антиоксиданти (наприклад, аскорбінова кислота, сульфіт натрію або гідросульфіт натрію); буфери (наприклад, борат, бікарбонат, трис-HCl, цитрати, фосфати або інші органічні кислоти);

наповнювачі (наприклад, маніт або гліцин); хелатоутворювачі (наприклад, етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA)); комплексоутворювачі (наприклад, кофеїн, полівінілпіролідон, бета-циклодекстрин або гідроксипропіл-бета-циклодекстрин); заповнювачі; моносахариди; дисахариди; та інші вуглеводи (наприклад, глюкоза, маноза або декстрини); білки (наприклад, сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни); барвники, коригенти та розріджувачі; емульгатори; гідрофільні полімери (наприклад, полівінілпіролідон); поліпептиди низької молекулярної маси; солетворні протиіони (наприклад, натрій); консерванти (наприклад, бензалконію хлорид, бензойна кислота, саліцилова кислота, тімеросаль, фенетиловий спирт, метилпарабен, пропілпарабен, хлоргексидин, сорбінова кислота або пероксид водню); розчинники (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь або поліетиленгліколь); спирти з цукру (наприклад, маніт або сорбіт); суспендувальні засоби; поверхнево-активні або змочувальні речовини (наприклад, плуроніки, поліетиленгліколь, складні ефіри сорбітану, полісорбати, наприклад, полісорбат 20, полісорбат 80, тритон, трометамін, лецитин, холестерин, тилоксапал); речовини, що сприяють підвищенню стійкості (наприклад, цукроза або сорбіт); засоби, що сприяють підвищенню ізотонічності (наприклад, галогеніди лужних металів, за варіантом, якому віддають перевагу, хлорид натрію або калію, маніт, сорбіт); носії; розчинники; наповнювачі та/або фармацевтичні ад'юванти. Дивись REMINGRTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18 видання, (редактор A.P. Геннаро (A.R. Gennaro)), 1990, Mack Publishing Company.

За певними варіантами здійснення оптимальна фармацевтична композиція буде визначатись фахівцем у цій галузі залежно від, наприклад, передбачуваного шляху введення, формату доставки та бажаної дози. Дивись, наприклад, REMINGRTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (дивись вище). За певними варіантами здійснення такі композиції можуть впливати на фізичний стан, стійкість, швидкість виділення in vivo та швидкість виведення in vitro антитіл за цим винаходом.

За певними варіантами здійснення головний розчинник або носій фармацевтичної композиції може бути за своєю природою водним або неводним. Наприклад, прийнятним розчинником або носієм може бути вода для ін'єкцій, фізіологічний розчин або штучна цереброспінальна рідина, можливо, доповнена іншими матеріалами, що традиційно застосовуються у композиціях для парентерального введення. Додатковими зразковими носіями є нейтральний буферний розчин або фізіологічний розчин у суміші із сироватковим альбуміном. За варіантами, яким віддають перевагу, фармацевтичні композиції за цим винаходом містять трис-буфер із приблизним pH 7,0-8,5 або ацетатний буфер із приблизним pH 4,0-5,5 і можуть додатково містити сорбіт, цукрозу, твін-20 та/або їхні придатні замісники. За певними варіантами здійснення цього винаходу композиції анти-NGF антитіла можуть готуватись для збереження шляхом змішування вибраної композиції, що має бажаний ступінь чистоти, з факультативними речовинами для виготовлення композицій (REMINGRTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (дивись вище)) у вигляді ліофілізованого брикету або водного розчину. На додаток до цього, за певними варіантами здійснення анти-NGF антитіло може вводитись до складу композиції як ліофілізат із застосуванням придатних наповнювачів, наприклад, цукрози.

Фармацевтичні композиції за цим винаходом можуть вибиратись для парентерального введення. За альтернативним варіантом, композиції можуть вибиратись для інгаляції або доставки через травний тракт, наприклад, пероральним шляхом. Виготовлення таких фармацевтично прийнятних композицій знаходиться у межах можливостей цієї галузі.

Компоненти композиції, за варіантом, якому віддають перевагу, надаються у концентраціях, які є прийнятними для місця введення. За певними варіантами здійснення буфери застосовуються для підтримання композиції у межах фізіологічного або дещо нижчого pH, як правило, у діапазоні pH від приблизно 5 до приблизно 8.

У разі, коли передбачається парентеральне введення, терапевтичні композиції для застосування за цим винаходом можуть надаватись у формі апірогенного, парентерально прийнятного водного розчину, що містить бажане анти-NGF антитіло у фармацевтично прийнятному розчиннику. Особливо прийнятним розчинником для парентеральної ін'єкції є стерильна дистильована вода, до якої анти-NGF антитіло вводять у вигляді стерильного, відповідним чином консервованого ізотонічного розчину. За певними варіантами здійснення виготовлення композиції може включати введення до її складу бажаної молекули з агентом, наприклад, придатними для ін'єкцій мікросферами, частинками, що піддаються біорозкладу, полімерними сполуками (наприклад, полімером молочної кислоти або полігліколевою кислотою), кульками або ліпосомами, який може забезпечити пролонговане вивільнення згаданого продукту, який може доставлятись шляхом ін'єкції речовин уповільненого

всмоктування. За певними варіантами здійснення може застосовуватись також гіалуронова кислота, що має ефект збільшення часу перебування у системі кровообігу. За певними варіантами здійснення для введення бажаної молекули антитіла можуть застосовуватись засоби доставки лікарського препарату, що імплантуються.

Фармацевтичні композиції за цим винаходом можуть виготовлятись у формі, придатній для інгаляції. За цими варіантами здійснення композиціям, до складу яких входять анти-NGF антитіла, надається форма сухого порошку для інгаляцій. За варіантами, яким віддають перевагу, до складу інгаляційних розчинів анти-NGF антитіла може вводитись пропелент для аерозольної доставки. За певними варіантами здійснення розчини можуть розпилюватись. Внутрішньолегеневе введення і способи одержання таких композицій додатково описані у міжнародній заявці PCT/US94/001875, яка включена до цього опису шляхом посилання і описує внутрішньолегеневу доставку хімічно модифікованих білків.

Передбачається також, що композиції можуть вводитись пероральним шляхом. Анти-NGF антитіла, що вводяться подібним чином, можуть вводитись до складу композицій з носіями або без носіїв, які традиційно застосовуються при виготовленні твердих лікарських форм, наприклад, таблеток та капсул. За певними варіантами здійснення капсула може конструюватись таким чином, щоб вивільнення активної складової композиції відбувалось на ділянці шлунково-кишкового тракту, коли біодоступність є максимальною, а передсистемний розклад є мінімальним. Для полегшення поглинання анти-NGF антитіла можуть включатись додаткові агенти. Можуть застосовуватись також розріджувачі, коригенти, смоли з низькою температурою розплавлення, рослинні олії, змащувальні речовини, суспендувальні речовини, речовини, що сприяють розпаду таблетки, і в'яжучі речовини.

Фармацевтична композиція за цим винаходом, за варіантом, якому віддають перевагу, надається таким чином, щоб вона містила ефективну кількість одного або декількох анти-NGF антитіл у суміші з нетоксичними наповнювачами, придатними для виготовлення таблеток. Шляхом розчинення таблеток у стерильній воді або іншому прийнятному носії можуть бути одержані розчини у однодозовій формі. До прийнятних наповнювачів належать (але без обмеження) інертні розріджувачі, наприклад, карбонат кальцію, карбонат або бікарбонат натрію, лактоза або фосфат кальцію; або зв'язувальні речовини, наприклад, крохмаль, желатин або аравійська камедь; або змащувальні речовини, наприклад, стеарат магнію, стеаринова кислота або тальк.

Фахівцям у цій галузі будуть очевидними додаткові фармацевтичні композиції, у тому числі композиції, що містять анти-NGF антитіла для пролонгованого вивільнення. Фахівцям у цій галузі відомі також інші способи виготовлення різноманітних інших засобів доставки пролонгованої дії, наприклад, ліпосомних носіїв, мікрочастинок або пористих кульок, що піддаються біорозкладу і ін'єкцій речовин уповільненого всмоктування. Дивись, наприклад, міжнародну заявку PCT/US93/00829, яку включено до цього опису шляхом посилання і яка описує пролонговане вивільнення пористих полімерних мікрочастинок для доставки фармацевтичних композицій. Препарати пролонгованої дії можуть включати напівпроникні полімерні матриці у формі виробів певної форми, наприклад, плівок або мікрокапсул. Матриці пролонгованої дії можуть включати складні поліефіри, гідрогелі, полімери молочної кислоти (як розкривається у патенті США № 3,773,919 та публікації заявки на європатент EP 058481, які включено до цього опису шляхом посилання), співполімери L-глутамінової кислоти та гамма-етил-L-глутамату (Сідмен (Sidman) та інші, 1983, Biopolymers 22:547-556), полі-(2-гідроксіетилметакрилат) (Лангер (Langer) та інші, 1981, /. Biomed. Mater. Res. 15:167-277, Лангер (Langer), 1982, Chem. Tech. 12:98-105), етиленвінілацетат (Лангер (Langer) та інші (дивись вище)) або полі-(D)-(-)-3-гідроксимасляну кислоту (публікація заявки на європатент EP 133,988). Композиції пролонгованої дії можуть включати також ліпосоми, які можуть бути одержані за будь-яким із декількох способів, відомих у цій галузі. Дивись, наприклад, Еппстейн (Eppstein) та інші, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692; публікація заявок на європатент EP 036,676; EP 088,046 та EP 143,949, які включено до цього опису шляхом посилання.

Фармацевтичні композиції, що застосовуються для введення in vivo. надаються, як правило, у вигляді стерильних препаратів. Стерилізація може здійснюватись шляхом фільтрації через стерильні фільтраційні мембрани. Коли композиція ліофілізується, стерилізація за цим способом може здійснюватись перед або після ліофілізації та відновлення. Композиції для парентерального введення можуть зберігатись у ліофілізованій формі або у вигляді розчину. Парентеральні композиції, як правило, вміщують до контейнера, що має отвір для стерильного доступу, наприклад, до мішечка для зберігання внутрішньовенних розчинів або до флакона з пробкою, яка може проколюватись голкою шприца для ін'єкцій.

Після виготовлення фармацевтичної композиції, вона може зберігатись у стерильних флаконах у вигляді розчину, суспензії, гелю, емульсії, твердої речовини або зневодненого чи ліофілізованого порошку. Такі композиції можуть зберігатись у готовій до застосування формі або у формі (наприклад, ліофілізованій), що відновлюється перед введенням.

Цей винахід пропонує також набори для введення разової дози. Кожен зі згаданих наборів за цим винаходом може включати перший контейнер, що містить сухий білок, і другий контейнер, що містить водну композицію. За певними варіантами здійснення цього винаходу пропонуються набори, що включають одно- та багатокамерні попередньо заповнені шприци (наприклад, шприци для рідини та шприци для введення ліофілізованої речовини).

Ефективна кількість фармацевтичної композиції, що містить анти-NGF антитіло, призначеної для терапевтичного застосування, буде залежати, наприклад, від терапевтичного контексту та цілей. Фахівцю у цій галузі буде зрозуміло, що придатна доза для лікування буде залежати, частково, від молекули, що доставляється, показання, за яким застосовується анти-NGF антитіло, шляху введення і розміру (маса тіла, поверхня тіла або розмір органа) та/або стану (вік та загальний стан здоров'я) хворого. За певними варіантами здійснення лікар може титрувати дозу і модифікувати шлях введення для одержання оптимального терапевтичного ефекту. Типова доза може коливатись у межах від приблизно 0,1 мкг/кг до приблизно 30 мг/кг або більше, залежно від згаданих вище факторів. За варіантами, яким віддають перевагу, доза може коливатись у межах від 0,1 мкг/кг до приблизно 30 мг/кг; за варіантом, якому віддають більшу перевагу, від 1 мкг/кг до приблизно 30 мг/кг; за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, від 5 мкг/кг до приблизно 30 мг/кг.

Частота введення доз буде залежати від фармакокінетичних параметрів конкретного анти-NGF антитіла, що застосовується у композиції. За типовим варіантом, лікар вводить композицію до досягнення дози, що забезпечує одержання бажаного ефекту. Згадана композиція може, таким чином, вводитись разовою дозою або двома чи більше дозами (які можуть містити або можуть не містити однакову кількість бажаної речовини) впродовж певного періоду часу або шляхом безперервного вливання через імплантований засіб або катетер. Додаткове точніше визначення придатної дози здійснюється фахівцями у цій галузі звичайним шляхом і входить до обсягу завдань, які традиційно здійснюються ними. Прийнятність дози може підтверджуватись за допомогою відповідних даних залежності реакції від дози. За певними варіантами здійснення антитіла за цим винаходом можуть вводитись хворим впродовж тривалих періодів часу. Постійне введення антитіла за цим винаходом зводить до мінімального рівня негативні імунні та алергічні реакції, які традиційно пов'язують з антитілами, які одержують проти людського антигену у тваринах, окрім людини, наприклад, із неповним людським антитілом, одержаним у видах, окрім людини.

Спосіб введення фармацевтичної композиції відповідає відомим методам, наприклад, пероральним шляхом, шляхом ін'єкцій внутрішньовенним, внутрішньоочеревинним, інтрацеребральним (внутрішньопаренхіматозним), інтрацеребровентрикулярним, внутрішньом'язовим, внутрішньоочним, внутрішньоартеріальним, інтрапортальним шляхами або шляхом введення до середини місця ураження; системами пролонгованого вивільнення або засобами, що імплантуються. За певними варіантами здійснення композиції можуть вводитись шляхом ін'єкції болюса або безперервно шляхом вливання чи засобом, що імплантується.

Композиція може також вводитись місцево шляхом імплантування мембрани, губки або іншого відповідного матеріалу, яким бажана молекула була абсорбована або до якого її було включено. За певними варіантами здійснення у разі застосування засобу, що імплантується, засіб може бути імплантованим до будь-якої відповідної тканини або органа, і доставка бажаної молекули може здійснюватись шляхом дифузії, шляхом застосування болюса пролонгованої дії або шляхом безперервного введення.

Бажаним може також бути ex vivo застосування фармацевтичних композицій, що містять анти-NGF антитіло за цим винаходом. У подібних випадках, клітини, тканини або органи, видалені у хворого, обробляють фармацевтичними композиціями, що містять анти-NGF антитіло, після чого згадані клітини, тканини та/або органи знову імплантують хворому.

Зокрема, анти-NGF антитіла можуть доставлятись шляхом імплантування певних клітин, які були піддані генно-інженерним маніпуляціям із застосуванням таких, наприклад, способів, які наводяться у цьому описі, для експресії та секреції поліпептиду. За певними варіантами здійснення такими клітинами можуть бути клітини тварин або людей, і ці клітини можуть бути автологічними, гетерологічними або ксеногенними. За певними варіантами здійснення згадані клітини можуть бути імморталізовані. За певними варіантами здійснення для зменшення ймовірності імунологічної реакції, клітини можуть бути включені до капсул для запобігання

інфільтрації навколишніх тканин. За додатковими варіантами здійснення матеріали для виготовлення згаданих капсул є, як правило, біосумісними, напівпроникними полімерними матеріалами або мембранами, які забезпечують можливість вивільнення білка(-ів), але запобігають знищенню клітин імунною системою хворого або іншими шкідливими факторами з навколишніх тканин.

ПРИКЛАДИ

Наведені нижче приклади, що включають проведені експерименти і одержані результати, подані виключно з ілюстративною метою і не повинні розглядатись як такі, що обмежують цей винахід.

Приклад 1

Одержання людського NGF білка з клітин E. coli

Клонування rHu-NGF (1-120)

Нуклеотидну послідовність, що кодує людський NGF, ампліфікували з кДНК за допомогою олігонуклеотидних праймерів із послідовностями, представленими ПОСЛІДОВНІСТЮ № 27 та ПОСЛІДОВНІСТЮ № 28, і стандартної полімеразної ланцюгової реакції (PCR). 5'-праймер утворює NdeI сайт рестрикції та метіоніновий ініціювальний кодон, що безпосередньо передує кодону 1 (серин) зрілої послідовності. 3'-праймер утворює BamHI сайт рестрикції, який безпосередньо розміщується за стоп-кодоном. Одержаний PCR продукт піддавали очищенню у лунках із гелем, розщеплювали рестриктазами NdeI і BamHI, після чого лігували до вектора pCFM1656, який також розщеплювали за допомогою NdeI і BamHI. Ліговану ДНК трансформували у компетентних клітинах-хазяях E. coli штам 657. Клони перевіряли на здатність до продукування рекомбінантного білкового продукту і на присутність плазміди, що має відповідну нуклеотидну послідовність (наприклад, ПОСЛІДОВНІСТЬ № 29). Амінокислотна послідовність рекомбінантного людського NGF 1-120 представлена як ПОСЛІДОВНІСТЬ № 30.

Експресійний вектор pCFM1656 (ATCC № 69576) одержали з експресійної векторної системи, описаної у патенті США № 4,710,473. Плазміду pCFM1656 можна одержати з описаної плазміди pCFM836 (патент № 4,710,473) таким чином: (a) руйнуванням двох ендогенних NdeI сайтів рестрикції шляхом доповнення кінців ферментом T4 полімеразою з подальшим лігуванням по "тупих" кінцях; (b) заміною послідовності ДНК між специфічними AatII і ClaI сайтами рестрикції, що містить синтетичний промотор $P_L$, на подібний фрагмент, одержаний з pCFM636 (патент № 4,710,473), що містить промотор PL, із подальшою (c) заміною невеликої послідовності ДНК між специфічними ClaI і KpnI сайтами рестрикції на олігонуклеотид, який одержали шляхом ренатурації двох зондів, що мають нуклеотидні послідовності, представлені ПОСЛІДОВНІСТЮ № 31 і ПОСЛІДОВНІСТЮ № 32.

Штам-хазяїн K12 E. coli (штам 657, фірма Amgen) є похідною E. coli W1485 (штам K12), культуру якої одержали з центру E. coli Genetic Stock Center, Yale University, New Haven, штат Конектикут (CGSC штам 6159).

Експресія rHu-NGF (1-120)

Клітини E. coli, що містять генно-інженерну конструкцію для експресії NGF (як описано вище), піддавали ферментації у збагаченому середовищі у режимі підживлювання культури одного виробничого циклу. Клітини вирощували при температурі 30 °C до оптичної густини 49 при 600 нм, після чого індукували температурним зсувом до 42 °C. Клітини збирали шляхом центрифугування впродовж 4 год. після індукування. Кінцева оптична густина становила 75. Вихід продукту експресії, за визначенням, становив приблизно 0,15 г/л.

Повторне укладання і очищення rHu-NGF (1-120)

Клітинну масу піддавали лізису у Microfluidizer, центрифугували при 10000 ×g впродовж 30 хв, осад промивали 1 % дезоксихолевою кислотою, центрифугували, як вказано вище, після чого одержаний осад промивали холодною водою і піддавали повторному центрифугуванню. Одержаний осад ((WIBs - промиті тільця включення) ресуспендували у денатурованому 8 М розчині гуанідину-HCl, 50 мМ розчині трис-буфера (pH 8,5), що містив 10 мМ розчин DTT (дитіотреїтол), і солюбілізували при кімнатній температурі впродовж 1 год., центрифугували при 10000 xg впродовж 30 хв, супернатант обережно зливали, після чого піддавали 25-кратному розведенню водним буферним розчином, що містив окислювально-відновну пару при температурі 4 °C впродовж 5 днів. Одержаний повторно укладений продукт після цього титрували до pH 3,0 і фільтрували через 0,45 мкМ фільтр. Згаданий повторно укладений продукт очищали на колонці Sp-Sepharose fast flow із застосуванням стандартного градієнта NaCl. Пул із катіонообмінної колонки у подальшому концентрували, і аліквоти заморожували при температурі -80 °C. Чистоту білка визначали шляхом електрофорезу у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE) і аналізували забарвлюванням кумасі синім. Головну смугу за цим способом більше ніж на 90 % становив очищений білок.

Приклад 2

Одержання людських моноклональних антитіл проти фактора росту нервової тканини (NGF)

Трансгенні HuMab і KM миші

Повністю людські моноклональні антитіла проти NGF одержали за допомогою трансгенних мишей ліній HCo7, HCo12, HCo7+HCo12 і KM, кожна з яких експресує гени людського антитіла. У кожної з цих ліній мишей ендогенний ген мишачого легкого ланцюга типу каппа гомозиготно руйнували, як описано у Чен (Chen) та інших (1993, EMBO J. 12:811-820), а ендогенний ген мишачого важкого ланцюга гомозиготно руйнували, як описано у Прикладі 1 публікації міжнародної заявки WO 01/09187 (яку включено до цього опису шляхом посилання). Кожна з цих мишачих ліній несе людський трансген легкого ланцюга типа каппа, KCo5, як описано у Фішвайлд (Fishwild) та інших (1996, Nature Biotechnology 14:845-851). Лінія HCo7 несе трансген HCo7 людського важкого ланцюга, як описано у патентах США № 5,545,806, № 5,625,825 і № 5,545,807 (які включено до цього опису шляхом посилання). Лінія HCo12 несе трансген HCo12 людського важкого ланцюга, як описано у Прикладі 2 публікації міжнародної заявки WO 01/09187 (яку включено до цього опису шляхом посилання). Лінія HCo7+HCo12 несе обидва трансгени HCo7 і HCo12 важкого ланцюга і є гемізиготною по кожному трансгену. Миші лінії KM містять трансген SC20 важкого ланцюга, як описано у Томізука (Tomizuka) та інших (1997, Nature Genet. 16, 133-143 і 2000, Proc. Natl. Acad. Sci, 97, 722-727). Цей трансген не інтегрується до мишачої хромосоми, але замість цього розмножується як незалежний хромосомний фрагмент. Цей фрагмент включає приблизно 15 MB людської хромосоми 14. Він містить повний локус людського важкого ланцюга, у тому числі усі сегменти генів VH, D і JH та усі ізотипи константної ділянки важкого ланцюга. Усі ці лінії позначаються у цьому описі як HuMab миші.

Імунізація HuMab:

Для одержання повністю людських моноклональних антитіл проти NGF, HuMab мишей імунізували очищеним рекомбінантним NGF, який одержали з клітин E. coli, який відігравав роль антигену (Приклад 1). Загальні схеми імунізації HuMab мишей описані у Лонберг (Lonberg) та інших (1994, Nature 368:856-859; Фішвайлд (Fishwild) та інших (дивись вище) і у публікації міжнародної заявки WO 98/24884; усі згадані матеріали включено до цього опису шляхом посилання). Під час першого вливання антигену вік мишей становив 6-16 тижнів. Для імунізації HuMab мишей внутрішньоочеревинним (IP) та підшкірним (SC) шляхами застосовували очищений рекомбінантний препарат (25-100 мкг) NGF антигену.

Імунізацію HuMab трансгенних мишей здійснювали шляхом введення антигену у повному ад'юванті Фрейнда і двома ін'єкціями антигену у неповному ад'юванті Фрейнда через 2-4 тижні після імунізації внутрішньоочеревинним шляхом (у загальній кількості до 9 імунізацій). Кожним антигеном імунізували декілька десятків мишей. У загальній кількості NGF антигеном імунізували 118 мишей ліній HCo7, HCo12, HCo7+HCo12 і KM. Імунну реакцію контролювали шляхом відбирання проб крові на ретроорбітальній ділянці.

Для того, щоб вибрати HuMab мишей, що продукують антитіла, які зв'язують людський NGF, проби сироватки імунізованих мишей піддавали ELISA (твердофазний імуноферментний аналіз), як описано у Фішвайлд (Fishwild) та інших (дивись вище). Стисло, титраційні мікропланшети сенсибілізували очищеним рекомбінантним NGF від E. coli (Приклад 1) (1-2 мкг/мл у PBS (забуферений фосфатом фізіологічний розчин)/50 мкл/лунку), інкубували при температурі 4 °C впродовж ночі, після чого блокували 200 мкл/лунку 5 % розчину курячої сироватки у PBS/Твін (0,05 %). До кожної лунки додавали розведення плазми від NGF-імунізованих мишей, і інкубували впродовж 1-2 год. при температурі навколишнього середовища. Планшети промивали PBS/Твін, після чого інкубували з козячим антилюдським IgG Fc-специфічним поліклональним реактивом, кон'югованим із пероксидазою з хрону (HRP) впродовж 1 год. при кімнатній температурі. Планшети промивали PBS/Твін і інкубували з козячим антилюдським IgG Fc-специфічним поліклональним реактивом, кон'югованим із пероксидазою з хрону (HRP) впродовж 1 год. при кімнатній температурі. Після промивання планшети проявляли субстратом ABTS (фірма Sigma Chemical Co., St. Louis, штат Міссурі, номер за каталогом A-1888, 0,22 мг/мл), і піддавали спектрофотометричному аналізу шляхом визначення оптичної густини (OD) при довжині хвилі 415-495 нм. Мишей з достатніми титрами людського імуноглобуліну проти NGF застосовували для продукування моноклональних антитіл, як описано нижче.

Одержання гібридом, що продукують людські моноклональні антитіла проти NGF

Мишей готували для продукування моноклональних антитіл шляхом внутрішньовенної реімунізації антигеном за 2 дні до умертвіння з подальшим видаленням селезінок. Мишачі спленоцити виділяли з HuMab мишей і за стандартними методиками, за допомогою

поліетиленгліколю, зливали з лінією клітин мишачої мієломи. За типовим варіантом, здійснили 10-20 зливань для кожного антигену.

Стисло, суспензії окремих клітин лімфоцитів селезінки імунізованих мишей зливали з однією четвертою кількості несекретуючих клітин мишачої мієломи P3X63-Ag8.653 (ATCC, номер депонування CRL 1580) з 50 % розчином поліетиленгліколю (PEG) (фірма Sigma). Клітини висівали (приблизно $1\times10^5$/лунку) на титраційні мікропланшети з плоским дном із подальшим приблизно двотижневим інкубуванням у селективному середовищі, що містило 10 % сироватки зародка великої рогатої худоби, 10 % кондиціонованого живильного середовища P388D1 (ATCC, номер депонування CRL TIB-63), 3-5 % розчин оригену (фірма IGEN) у DMEM (модифіковане за способом Дульбекко середовище Ігла) (фірма Mediatech, номер за каталогом CRL 10013, із високим вмістом глюкози, L-глутаміну і пірувату натрію) плюс 5 мМ розчин ГЕПЕС-буфера, 0,055 мМ розчин 2-меркаптоетанолу, 50 мг/мл гентаміцину і 1×HAT (гіпоксантин-аміноптеринтимідинове середовище) (фірма Sigma, номер за каталогом CRL P-7185). Через 1-2 тижні клітини культивували у середовищі, у якому HAT замінили на HT (гіпоксантин-тимідинове "проміжне" середовище).

Одержані гібридоми перевіряли на продукування антигенспецифічних антитіл. Окремі лунки перевіряли за допомогою ELISA (описано вище) на людські анти-NGF моноклональні IgG антитіла. Після екстенсивного росту гібридом, середовище контролювали, як правило, через 10-14 днів. Гібридоми, що секретували антитіла, пересівали, знову перевіряли, і у разі, якщо вони все ще залишались позитивними на людський IgG, анти-NGF моноклональні антитіла субклонували щонайменше двічі шляхом обмежувального розведення. Після цього стабільні субклони культивували in vivo з одержанням невеликої кількості антитіла у середовищі для культивування тканин для визначення характеристик.

Добір людських моноклональних антитіл, що зв'язуються з NGF

Твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA), як описано вище, застосовували для добору гібридом, які продемонстрували позитивну реактивність із NGF імуногеном. Гібридоми, які секретують моноклональне антитіло, що з високою спорідненістю зв'язується з NGF, субклонували і піддавали подальшому визначенню характеристик. Один клон кожної гибридоми, який зберігав реактивність батьківських клітин (за результатами визначення за допомогою ELISA), вибирали для одержання банку клітин (5-10 флаконів), який зберігали у рідкому азоті.

Для визначення ізотипу моноклональних антитіл, які продукуються за наведеним описом, вдавались до проведення ізотипоспецифічного ELISA. Під час проведення цих експериментів, лунки титраційних мікропланшетів сенсибілізували 50 мкл/лунку розчину 1 мкг/мл мишачого антилюдського легкого ланцюга типу каппа у PBS та інкубували при температурі 4° С впродовж ночі. Після блокування 5 % розчином курячої сироватки, на планшет наносили супернатант кожного експериментального моноклонального антитіла і очищений контрольний ізотип. Планшети інкубували при температурі навколишнього середовища впродовж 1-2 год. Після цього до лунок вносили різні людські IgG-специфічні, кон'юговані з пероксидазою з хрону козячі антилюдські поліклональні антисироватки, планшети проявляли і аналізували, як описувалось вище.

Моноклональні антитіла, очищені із супернатантів гібридом, які продемонстрували значний рівень зв'язування з NGF (за результатами ELISA) додатково перевіряли на біологічну активність за допомогою різноманітних біоаналізів, як описано нижче.

Приклад 3

Добір та клонування анти-NGF антитіл із сильною NGF-нейтралізуючою активністю

Ефективність антитіл, які початково були ідентифіковані у Прикладі 2, як інгібітори активності NGF (тобто NGF-"нейтралізація"), оцінювали шляхом визначення здатності кожного модифікованого пептиду блокувати викликану NGF індукцію експресії ванілоїдного рецептора-1 (VR1).

Культури нейронів гангліїв заднього корінця головного мозку

Гангліїзаднього корінця (DRG) головного мозку відрізали один за одним за асептичних умов від усіх спінальних сегментів 19-добових зародків пацюків (E19), хірургічним шляхом видалених із маток термінально анестезованих на певному періоді вагітності пацюків лінії Sprague-Dawley (фірма Charles River, Wilmington, штат Массачусетс). DRG збирали до середовища L-15 (фірма GibcoBRL, Grand Island, штат Нью-Йорк), що мало температуру танення льоду і містило 5 % інактивованої теплом конячої сироватки (фірма GibcoBRL), з видаленням будь-якої зайвої сполучної тканини і кровоносних судин. DRG двічі промивали фізіологічним розчином, забуференим фосфатом Дульбекко (DPBS) без $Ca^{2+}$ і $Mg^{2+}$ (pH 7,4) (фірма GibcoBRL). Після цього з DRG, за допомогою папаїнової дисоціаційної системи (фірма Worthington Biochemical

Corp., Freehold, штат Нью-Джерсі), одержували суспензію поодиноких клітин. Стисло, DRG інкубували у гідролітичному розчині, що містив 20 Од/мл папаїну у збалансованому сольовому розчині Ерла (EBSS) при температурі 37 °C впродовж 50 хв. Клітини відділяли шляхом продавлювання через відполіровані оплавленням пастерівські піпетки у дисоціативному середовищі, що містило MEM (мінімальне підтримувальне середовище)/Нат'8 F12 (неоднорідне штучне живильне середовище F12) (1:1), 1 мг/мл овомукоїдного інгібітора, 1 мг/мл овальбуміну та 0,005 % дезоксирибонуклеази I (ДНКаза).

Відділені клітини осаджували при 200 xg впродовж 5 хв і ресуспендували у EBSS, що містив 1 мг/мл овомукоїдного інгібітора, 1 мг/мл овальбуміну та 0,005 % ДНКази. Суспензію клітин центрифугували у градієнтному розчині, що містив 10 мг/мл овомукоїдного інгібітора, 10 мг/мл овальбуміну при 200 ×g впродовж 6 хв для видалення дебрісу, після чого фільтрували через 88-мкм нейлонову сітку (фірма Fisher Scientific, Pittsburgh, штат Пенсільванія) для видалення будь-яких скупчень. Кількість клітин визначали за допомогою гемоцитометра, і клітини висівали ($10\times10^3$ клітин/лунку) на 96-лункові планшети, сенсибілізовані поліорнітином (100 мкг/мл) (фірма Sigma, St. Louis, штат Міссурі) та мишачим ламініном (1 мкг/мл) (фірма GibcoBRL) у повному живильному середовищі. Повне живильне середовище містило мінімальне підтримувальне середовище (MEM) і Ham's F12 (1:1), пеніцилін (100 Од/мл), стрептоміцин (100 мкг/мл) і 10 % активованої теплом конячої сироватки (фірма GibcoBRL). Культури витримували при температурі 37 °C, 5 % $CO_2$ і 100 % вологості. Для контролювання росту ненейронних клітин, до складу живильного середовища включали 5-флуоро-2'-дезоксиуридин (75 мкМ) і уридин (180 мкМ).

Обробка NGF і анти-NGF

Через 2 год. після висівання клітини обробляли рекомбінантним людським β-NGF (фірма Amgen) або рекомбінантним щурячим β-NGF (фірма R&D Systems, Minneapolis, штат Міннесота) з концентрацією 10 нг/мл (0,38 нМ). До кожного культурального планшета додавали позитивні контролі, що містили серійно розведене анти-NGF антитіло (фірма R&D Systems). Експериментальні антитіла додавали у десяти розведеннях із застосуванням 3,16-кратних серійних розведень. Усі проби перед доданням до культур розбавляли у повному живильному середовищі. Перед визначенням експресії VR1, планшети інкубували впродовж 40 год.

Визначення експресії VR1 у нейронах DRG

Культури фіксували 4 % розчином параформальдегіду у збалансованому сольовому розчині Хенкса впродовж 15 хв, блокували за допомогою Superblock (фірма Pierce, Rockford, штат Іллінойс) і підвищували коефіцієнт проникності за допомогою 0,25 % розчину Nonidet P-40 (фірма Sigma) у фізіологічному розчині, забуференому трис-HCl (фірма Sigma) (TBS) впродовж 1 год. при кімнатній температурі. Культури один раз промивали TBS, що містив 0,1 % Твін-20 (фірма Sigma) і інкубували з кролячим анти-VR1 IgG впродовж 1,5 год. при кімнатній температурі з подальшим інкубуванням з Eu-міченим антикролячим "другим" антитілом (фірма Wallac Oy, Turku, Фінляндія) впродовж 1 год. при кімнатній температурі. Після інкубування з кожним антитілом, культури промивали TBS (3 × 5 хв із повільним струшуванням). До культур додавали підсилювальний розчин (150 мкл/лунку, фірма Wallac Oy). Після цього за допомогою флуориметра з часовим розділенням (фірма Wallac Oy) вимірювали інтенсивність флуоресценції. Експресію VR1 у зразках, які були оброблені модифікованими пептидами, визначали шляхом порівняння зі стандартною кривою титрування NGF від 0-1000 нг/мл. Відсоток (порівняно з максимальним можливим пригніченням) пригнічувального ефекту NGF на експресію VR1 у нейронах DRG визначали шляхом порівняння з контролями, які обробці NGF не піддавались. Результати наведені у Таблицях 2 і 5.

Клітинні лінії були позначені № 110-129. Антитіла клітинних ліній № 119, № 124 і № 125 демонстрували надзвичайно сильну NGF-нейтралізуючу активність (Фіг. 1). Клітинна лінія № 124 являла собою батьківську клітинну лінію, на яку також посилаються, як на лінію 4D4. Клітинні лінії № 119 і № 125 були субклонами батьківської лінії 4D4. З вихідного флакона, що містив гібридому № 124 (4D4), виростили додатковий зразок, який помітили № 167 (4D4).

Антитіла, продуковані гібридомою № 167 (4D4), піддавали такому самому аналізу нейтралізації NGF на основі нейронів DRG, що і попередні зразки. Антитіло № 167 (4D4) демонструвало сильну анти-NGF активність з $IC_{50}$ на рівні 0,50 нМ (Фіг. 2), що відповідало активності зразків № 119, № 124 і № 125. Рівні активності 4 зразків наведені у Таблиці 2.

Таблиця 2

| Анти-hNGF активність у клітинах DRG і | з застосуванням 0,38 нМ hNGF |
|---|---|
| Код № | $IC_{50}$ |
| 119 (з 124) | <1,2 нМ |
| 124 (батьківська) | <0,57 нМ |
| 125 (з 124) | <0,3 нМ |
| 167 (з того самого зразка, що і 124)* | 0,50 нМ |

Секвенування N-кінця і мас-спектрометрія

Зразки очищених анти-NGF гібридомних антитіл були підготовлені для секвенування білків та рідинно-хроматографічного і мас-спектрометричного (LC/MS) аналізів. Антитіла очищали з кондиціонованих середовищ шляхом концентрування згаданих середовищ за допомогою препаративної центрифуги Amicon centriprep-30 доти, доки їх об'єм не ставав меншим за 15 мл. Порцію смоли rProA (фірма Pharmacia) промивали (4×) PBS; після останнього промивання одержали 50 % суспензію у PBS. До зразка антитіл додавали відповідну кількість смоли rProA (приблизно 5 мкг антитіла/мкл смоли, однак застосовувати слід не менше за 50 мкл смоли) та інкубували впродовж ночі при температурі 4 °C. Суміш смоли з антитілами центрифугували, і збирали незв'язану фракцію. Після додання 0,5 мл PBS і перенесення до 0,45 мкл центрифугальної пробірки Spin-X (фірма CoStar), зразок центрифугували при 10000 об/хв впродовж 3 хв. Після цього смолу промивали щонайменше тричі 0,5 мл PBS, після чого до 1,5х об'єму смоли додавали 0,1 М гліцину (pH 2,7) та інкубували впродовж 10 хв при кімнатній температурі з подальшим додатковим центрифугуванням впродовж 3 хв при 10000 об/хв і збиранням супернатанту. Цю стадію елюювання повторювали ще двічі, після чого об'єднаний супернатант нейтралізували 1/25-ою об'єму 1,0 М розчину трис-буфера (pH 9,2).

Після завершувальної стадії фільтрування через нову пробірку Spin-x (0,2 мкм), антитіла піддавали кількісному визначенню за допомогою стандартного аналізу Бредфорда із застосуванням людського IgG як стандарту або, за альтернативним варіантом, шляхом визначення оптичної густини при 280 нм для зразків більшого об'єму. Гель також піддавали аналізу із застосуванням 2 мкг кожного зразка разом із 2 мкг людського IgG1, k (фірма Sigma). Для мас-спектрометрії чотири мікрограми зразків деглікозилували, відновлювали і завантажували до хроматографічної колонки (HP 1090), зв'язаної у реальному масштабі часу з мас-спектрометром Finingan LCQ. Легкий ланцюг відділяли від важкого ланцюга шляхом високоефективного рідинного хроматографування з оберненою фазою. Легкі ланцюги і важкі ланцюги також збирали для секвенування N-кінцевих білків.

Обидві N-кінцеві послідовності легкого ланцюга і важкого ланцюга проби анти-NGF антитіла № 167 (4D4) відповідали обом N-кінцевим послідовностям проби анти-NGF антитіла № 119 (4D4). На додаток до цього, визначена маса антитіл вказувала на те, що антитіла, виділені з гібридом № 167 і № 119, були однаковими. Визначена маса (23096) розгорнутого легкого ланцюга анти-NGF антитіла № 167 відповідала визначеній масі (23096) легкого ланцюга анти-NGF антитіла № 119.

Клонування важкого і легкого ланцюгів анти-NGF антитіла

Гібридому, що експресує найсильніше NGF-зв'язувальне моноклональне антитіло, 4D4.D7, використовували як джерело для виділення тотальної РНК за допомогою реактиву TRIzol® (фірма Invitrogen). кДНК першої нитки синтезували за допомогою довільного праймеру з адаптером подовжувального сегменту (5'-GGC CGG ATA GGC CTC CAN NNN NNT-3') (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 33); препаративний аналіз 5' RACE (швидка ампліфікація кінців кДНК) здійснили за допомогою набору GeneRacer™ (фірма Invitrogen) за інструкціями виробника. Прямим праймером, застосованим для одержання кДНК, що кодує повний легкий ланцюг, був праймер, що входив до складу набору GeneRacer™, у той час як зворотним праймером був 5'-GGG GTC AGG CTG GAA CTG AGG-3' (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 34). Прямим праймером, застосованим для одержання кДНК, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга, був праймер, що входив до складу набору GeneRace™, у той час як зворотним праймером був 5'-TGA GGA CGC TGA CCA CAC G-3' (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 35). Продукти аналізу RACE клонували у pCR4-TOPO (фірма Invitrogen) із визначенням послідовностей. Для конструювання праймерів для PCR (полімеразна ланцюгова реакція) ампліфікації повномірних ланцюгів антитіла застосовували консенсусні послідовності.

Для одержання кДНК, що кодує легкий ланцюг типу каппа анти-NGF антитіла 4D4.D7, 5' PCR праймер кодував амінокінець сигнальної послідовності, сайт рестрикції Xbal і оптимізовану

послідовність Козака (5'-CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GGA CAT GAG GGT GCC CGC TCA GCT CCT GGG - 3'; ПОСЛІДОВНІСТЬ № 36). 3'-праймер кодував карбоксильний кінець, стоп-кодон, а також сайт рестрикції Sail (5'-CTT GTC GAC TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT C-3'; ПОСЛІДОВНІСТЬ № 37). Фрагмент, одержаний за допомогою PCR, очищали, розщеплювали за допомогою Xbal і Sail, після чого виділяли на лунках із гелем і лігували до експресійного вектора pDSRα20 ссавців (дивись публікацію міжнародної заявки WO 90/14363, яку включено до цього опису шляхом посилання з будь-якою метою. pDSRα20 одержали шляхом заміни нуклеотиду 2563 у pDSRα19 (гуанозин на аденозин) сайт-спрямованим мутагенезом).

Для одержання кДНК, що кодує важкий ланцюг анти-NGF антитіла 4D4.D7, 5' PCR праймер кодував амінокінець сигнальної послідовності, сайт рестрикції Xbal і оптимізовану послідовність Козака (5'-CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GGA GTT GGG GCT GTG CTG GGT TTT CCT TGT T-3'; ПОСЛІДОВНІСТЬ № 38). 3'-праймер кодував карбоксильний кінець, стоп-кодон, а також сайт рестрикції Sall (5'-GCA TGT CGA CTC ATT TAC CCG GAG ACA GGG AGA G-3'; ПОСЛІДОВНІСТЬ № 39). Одержаний продукт очищали, розщеплювали за допомогою Xbal і Sail, виділяли на лунках із гелем і лігували до вектора pDSRα20.

Обчислена маса (23099) (яку визначили шляхом трансляції нуклеотидної послідовності на прогнозовані амінокислоти і підсумовуванням молекулярних мас амінокислот) послідовності ДНК легкого ланцюга клону анти-NGF антитіла 4D4 відповідала масі, визначеній мас-спектрометричним шляхом. Визначена маса (49479) розгорнутого важкого ланцюга анти-NGF антитіла № 167 відповідала визначеній масі (49484) важкого ланцюга анти-NGF антитіла № 119 і також відповідала теоретичній масі (49484) послідовності ДНК важкого ланцюга клону анти-NGF антитіла 4D4 (Таблиця 3) у межах відхилення вимірювального приладу.

Дані секвенування білків N-кінця і LC/MS підтвердили, що гібридома № 119 експресувала таке саме антитіло, що і гібридома № 167. На додаток до цього, маса антитіл, обчислена на основі послідовності, додатково підтвердила наведене спостереження.

Таблиця 3

Підсумок мас-спектрометричних даних

| Анти-NGF антитіло | Визначена маса антитіла № 167 | Визначена маса антитіла № 119 | Теоретична маса, визначена за послідовністю ДНК антитіла 4D4 |
|---|---|---|---|
| Легкий ланцюг | 23096 | 23096 | 23099 |
| Важкий ланцюг | 49479 | 49484 | 49484 |

Приклад 4

Експресія анти-NGF антитіл у клітинах яєчника китайського хом'ячка (CHO)

Стабільну експресію моноклонального анти-NGF антитіла 4D4 забезпечували шляхом котрансфекції важким ланцюгом 4D4/pDSRα9 IgG2 або важким ланцюгом 4D4/pDSRα9 IgG1 та NGF-каппа/pDSRα19 плазмідами дегідрофолатредуктаза-дефіцитних ((DHFR$^-$) безсироваткових адаптованих клітин яєчника китайського хом'ячка (CHO) за допомогою кальційфосфатного методу. Трансфіковані клітини відбирали у середовищі, що містило діалізовану сироватку, але не містило гіпоксантину-тимідину, для забезпечення росту клітин, що експресують фермент DHFR. Трансфіковані клони піддавали перевірці за допомогою таких аналізів, як ELISA, для виявлення експресії моноклонального анти-NGF антитіла 4D4 у кондиціонованому середовищі. Клони з найвищим рівнем експресії піддавали впливу підвищених концентрацій метотрексату (MTX) для ампліфікації DHFR. Клони, ампліфіковані за допомогою MTX, піддавали перевірці за допомогою таких аналізів, як ELISA, для виявлення підвищеного рівня експресії моноклонального анти-NGF антитіла 4D4 у кондиціонованому середовищі. Клони з найвищими рівнями експресії піддавали субклонуванню для одержання гомогенної популяції та створення банків клітин.

Рекомбінантні анти-NGF антитіла за цим винаходом можуть бути одержані у DHFR-дефіцитних клітинах яєчника китайського хом'ячка за тією самою методикою, що наведена вище для моноклонального анти-NGF антитіла. Послідовності ДНК, які кодують повний важкий ланцюг або легкий ланцюг кожного анти-NGF антитіла за цим винаходом, клонують у експресійних векторах. DHFR-дефіцитні клітини яєчника китайського хом'ячка котрансфікують експресійним вектором, здатним експресувати повний важкий ланцюг та експресійним вектором, що експресує повний легкий ланцюг відповідного анти-NGF антитіла. Наприклад, для одержання анти-NGF антитіла, клітини котрансфікують вектором, здатним експресувати повний

важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 40 і вектором, здатним експресувати повний легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, представлену ПОСЛІДОВНІСТЮ № 44. Таблиця 4 підсумовує повні важкі і повні легкі ланцюги для 4D4 антитіл, що мають різні константні ділянки важкого ланцюга IgG.

Таблиця 4

| Антитіло | Варіабельна ділянка важкого ланцюга+константна ділянка важкого ланцюга | Повний важкий ланцюг |
|---|---|---|
| 4D4 (IgG2) | ПОСЛІДОВНІСТЬ № 10+ПОСЛІДОВНІСТЬ № 4 | ПОСЛІДОВНІСТЬ № 40 |
| 4D4 (IgG1) | ПОСЛІДОВНІСТЬ № 10+ПОСЛІДОВНІСТЬ № 2 | ПОСЛІДОВНІСТЬ № 41 |
| 4D4 (IgG4) | ПОСЛІДОВНІСТЬ № 10+ПОСЛІДОВНІСТЬ № 6 | ПОСЛІДОВНІСТЬ № 42 |
| 4D4 (IgG3) | ПОСЛІДОВНІСТЬ № 10+ПОСЛІДОВНІСТЬ № 26 | ПОСЛІДОВНІСТЬ № 43 |
| | | |
| Антитіло | Варіабельна ділянка важкого ланцюга+константна ділянка важкого ланцюга | Повний важкий ланцюг |
| 4D4 | ПОСЛІДОВНІСТЬ № 12+ПОСЛІДОВНІСТЬ № 8 | ПОСЛІДОВНІСТЬ № 44 |

Приклад 5

Визначення активності анти-NGF антитіла 4D4

Тимчасово експресовані анти-NGF антитіла 4D4, продуковані клітинами, що вирощуються за умов спін-культури (S) або ролерної культури (R), перевірялись для підтвердження їх здатності нейтралізувати NGF у реакції нейтралізації NGF на основі нейронів DRG, яку ставили, як описувалось вище (Приклад 3).

Анти-NGF антитіла тимчасово експресувались у адаптованих до безсироваткової суспензії клітинах 293T. Трансфекцію здійснювали на 500 мл або 1 л культурах. Стисло, клітинний інокулят ($5,0\times10^5$ клітин/мл×об'єм культури) центрифугували при 2500 об/хв впродовж 10 хв при температурі 4 °C для видалення кондиціонованого середовища. Клітини ресуспендували у безсироватковому DMEM і знову центрифугували при 2500 об/хв впродовж 10 хв при температурі 4 °C. Після відсмоктування промивного розчину, клітини ресуспендували у середовищі для вирощування [DMEM/F12 (3:1)+1x додаток інсулін-трансферин-селен+1× Pen Strep Glut+2 мМ розчин L-глутаміну+20 мМ розчин ГЕПЕС-буфера+0,01 % розчин плуроник F68] у 1 л або 3 л ролерній колбі. Культуру у ролерній колбі встановлювали на стіл магнітної мішалки (125 об/хв), яку вносили до вологої камери (37 °C, 5 % $CO_2$). Плазмідну ДНК об'єднували з трансфекційним реактивом у 50 мл конічній колбі. Комплекс ДНК-трансфекційний реактив одержували у 5 % кінцевого об'єму культури у безсироватковому DMEM. До безсироваткового DMEM спочатку додавали 1 мкг плазмідної ДНК/мл культури, потім 1 мкл X-TremeGene RO-1539/мл культури. Згадані комплекси інкубували при кімнатній температурі впродовж приблизно 30 хв, після чого додавали до клітин у ролерній колбі. Трансфекцію/експресію здійснювали впродовж 7 днів, після чого кондиціоноване середовище збирали шляхом центрифугування при 4000 об/хв впродовж 60 хв при температурі 4 °C.

Для тимчасової трансфекції ролерних колб ми застосовували адгезивні клітини 293T, які виросли і підтримувались у DMEM, доповненому 5 % FBS+1X замінних амінокислот+1× Pen Strep Glut+1× пірувату натрію. Приблизно $4\text{-}5\times10^7$ клітин 293T висівали у ролерних колбах (850 $см^2$) впродовж ночі. Наступного дня попередньо висіяні клітини трансфікували за допомогою трансфекційного реактиву FuGene6. Суміш ДНК-трансфекційний реактив одержували у приблизно 6,75 мл безсироваткового DMEM. Спочатку додавали 675 мкл трансфекційного реактиву FuGene6, потім 112,5 мкг плазмідної ДНК. Одержаний комплекс інкубували при кімнатній температурі впродовж 30 хв. Після цього суміш у цілому вносили до ролер-флакона. Ролер-флакон заповнювали газовою сумішшю (5 % $CO_2$), герметично закривали і вміщували до термостата (37 °C) на ролерний штатив, що обертався зі швидкістю 0,35 об/хв. Трансфекцію здійснювали впродовж 24 год., після чого згадане середовище замінювали 100 мл DMEM+1× додаток інсулін-трансферин-селен+1× Pen Strep Glut+1× замінних амінокислот+1× пірувату

натрію. За типовим варіантом, з кожного ролер-флакона одержали два 100 мл 48 год. врожаю. Зібрані безсироваткові кондиціоновані середовища об'єднували, і центрифугували при 4000 об/хв впродовж 30 хв при температурі 4 °С.

Як 4D4.IgG1, так і 4D4.IgG2 продемонстрували високу активність проти людського NGF зі значеннями $IC_{50}$ від приблизно 0,14 нМ до приблизно 0,2 нМ (Фіг. 2). Результати аналізу активності підсумовані у Таблиці 5. Згадані антитіла продемонстрували низьку активність проти щурячого NGF (Фіг. 3). Одержані результати нагадують активність антитіл, що перевірялись безпосередньо з гибридом, як описувалось вище.

Таблиця 5

| Антитіло | $IC_{50}$ hNGF (нМ) | $IC_{50}$ rNGF (нМ) |
|---|---|---|
| 4D4.IgG1.R | 0,1488 | > 34 нМ |
| 4D4.IgG1.S | 0,1587 | > 45 нМ |
| 4D4.IgG2.R | 0,2047 | > 59 нМ |
| 4D4.IgG2.S | 0,2063 | > 37 нМ |

hNCP=людський NGF, rNGF=щурячий NGF, R=ролерна культура, S=спін-культура

Приклад 6

Продукування анти-NGF антитіла

Анти-NGF антитіло продукують шляхом експресії у клональній лінії клітин CHO. Для кожного виробничого циклу клітини з одного флакона розморожують у безсироваткових культуральних середовищах. Клітини спочатку вирощують у Т-колбі, потім у ролерних колбах, потім у реакторах із нержавіючої сталі у зростаючих об'ємах до 2000 л біореактора. Продукування здійснюють у 2000 л біореакторі за методом підживлювання культури одного виробничого циклу, за яким концентровані поживні інгредієнти середовища додають для підтримання росту клітин та життєздатності культур. Виробничий цикл триває впродовж приблизно двох тижнів. Впродовж цього періоду часу анти-NGF антитіло конститутивно продукується клітинами і секретується до культурального середовища.

У виробничому реакторі підтримують визначений pH, температуру і рівень розчиненого кисню: pH регулюють шляхом додання газоподібного діоксиду вуглецю та карбонату натрію; рівень розчиненого кисню регулюють шляхом продування повітря, газоподібного азоту та кисню.

На кінець виробничого циклу клітинну масу вносять до тарілчастого сепаратора, і культуральний супернатант відділяють від клітин. Одержаний концентрат додатково просвітлюють спочатку за допомогою глибинного фільтра, потім за допомогою 0,2 мкм фільтра. Просвітлене кондиціоноване середовище після цього концентрують шляхом ультрафільтрації з тангенціальним потоком. Кондиціоноване середовище піддають 15-30-кратній концентрації. Після цього одержане концентроване кондиціоноване середовище піддають очищенню або заморожують для пізнішого очищення.

Приклад 7

Перехресна реактивність з іншими нейротрофінами

Антитіла 4D4 перевіряли на перехресну реактивність проти людського NT3 або людського BDNF (фактор росту нервової тканини мозкового походження) різними біотестами, у тому числі аналізом виживаності нейронів DRG для людського NT3 і аналізом поглинання DA (допамін) культивованими нейронами DA для людського BDNF.

Обробка культур DRG NT3, анти-NT3 і анти-NGF антитілами

Через 2 год. після висівання клітини DRG (опис методики виділення наведено вище у Прикладі 3) обробляли рекомбінантним hNT-3 (100 нг/мл, 3,8 нМ). Серійно розведене анти-hNT3 антитіло (фірма R&D) застосовували як позитивний контроль. Невідомі антитіла (проби анти-NGF антитіл) додавали у 10 концентраціях із застосуванням 3,16-кратних серійних розведень. Усі проби перед доданням до культур розбавляли у повному живильному середовищі.

Визначення експресії МЛР2 у нейронах DRG

Культури фіксували 4 % розчином параформальдегіду у збалансованому сольовому розчині Хенкса впродовж 15 хв, блокували за допомогою Superblock (фірма Pierce) впродовж 1 год. і підвищували коефіцієнт проникності за допомогою 0,25 % розчину Nonidet P-40 (фірма Sigma) у фізіологічному розчині, забуференому трис-HCl (фірма Sigma) (TBS) впродовж 1 год. при кімнатній температурі (RT). Культури один раз промивали TBS, що містив 0,1 % Твін-20 (фірма Sigma) і інкубували з мишачим анти-MAP2 IgG (фірма Chemicon, Temecula, штат Каліфорнія)

впродовж 1,5 год. при кімнатній температурі з подальшим інкубуванням з Eu-міченим антимишачим "другим" антитілом (фірма Wallac Oy, Turku, Фінляндія) впродовж 1 год. при кімнатній температурі. Після інкубування з кожним антитілом, культури промивали TBS (3 × 5 хв з обережним струшуванням). До культур додавали підсилювальний розчин (150 мкл/лунку, фірма Wallac Oy). Після цього за допомогою флуориметра з часовим розділенням (фірма Wallac Oy) вимірювали інтенсивність флуоресценції.

Культура клітин середнього мозку зародка

Застосовували 19-добові зародки (E19) пацюків лінії Sprague-Dawley (фірма Jackson Labs). Вентральну тканину середнього мозку, збагачену допамінергічними нейронами, видаляли і переносили до холодного фізіологічного розчину, забуференого фосфатом Дульбекко (DPBS) без $Ca^{++}$ і $Mg^{++}$ (pH 7,4) (фірма Gibco). За допомогою папаїнової дисоціаційної системи (фірма Worthington Biochemical Corp., Freehold, штат Нью-Джерсі) з фрагментів тканини одержали суспензію окремих клітин. Стисло, фрагменти тканин інкубували у гідролітичному розчині, що містив 20 Од/мл папаїну у збалансованому сольовому розчині Ерла (EBSS) при температурі 37 °C впродовж 50 хв. Клітини відділяли шляхом продавлювання через відполіровані оплавленням пастерівські піпетки у дисоціативному середовищі, що містило MEM (мінімальне підтримувальне середовище)/Ham's F12 (неоднорідне штучне живильне середовище F12) (1:1), 1 мг/мл овомукоїдного інгібітора, 1 мг/мл овальбуміну та 0,005 % дезоксирибонуклеази I (ДНКаза). Відділені клітини осаджували при 200 xg впродовж 5 хв і ресуспендували у EBSS, що містив 1 мг/мл овомукоїдного інгібітора, 1 мг/мл овальбуміну та 0,005 % ДНКази. Суспензію клітин центрифугували у градієнтному розчині, що містив 10 мг/мл овомукоїдного інгібітора, 10 мг/мл овальбуміну при 200 × g впродовж 6 хв для видалення дебрісу, після чого фільтрували через 25 мкг нейлонову сітку Nitex (фірма Tetko, Inc.) для видалення скупчень. Відділені клітини висівали (100000/$см^2$) на планшети для культури тканин. Згадані планшети попередньо сенсибілізували поліорнітином (100 мкг/мл) (фірма Sigma) та мишачим ламініном (1 мкг/мл) (фірма Gibco BRL), як описувалось раніше (Луіс Дж.К. (Louis J.C.) та інші, / Pharmacol. Exp. Ther. 1992; 262:1274-1283). Культуральне середовище містило мінімальне підтримувальне середовище (MEM) і Ham's F12 (1:1), 12 % конячу сироватку (фірма Gibco), трансферин (100 мкг/мл) та інсулін (2,5 мкг/мл) (фірма Sigma). Культури витримували при температурі 37 °C, 5 % $CO_2$ і 100 % вологості впродовж 6 днів.

Обробка культур клітин середнього мозку DBNF, анти-BDNF або анти-NGF

Через 2 год. після висівання до клітин додавали спочатку BDNF (10 нг/мл), потім серійні концентрації проб анти-NGF антитіл. Анти-BDNF антитіло (фірма Amgen) застосовували як позитивний контроль.

Поглинання DA нейронами середнього мозку

Аналіз поглинання допаміну здійснювали, як описували раніше (Фрідман Л. (Friedman L.), Мітіліно К. (Mytilineou C), Neuroscience Letters 1987: 79:65-72). На 6 день культури один раз промивали попередньо підігрітим фосфатним буфером Кребса-Рінгера (pH 7,4), що містив 5,6 мМ розчин глюкози, 1,3 мМ розчин EDTA (етилендіамінтетраоцтова кислота) та 0,5 мМ розчин паргіліну (інгібітор моноамінооксидази). Культури інкубували у буфері для поглинання, що містив 50 нМ розчин [$^3$H]DA (NEN), впродовж 60 хв при температурі 37 °C. Поглинання припиняли шляхом видалення буфера для поглинання і культури тричі промивали фосфатним буфером Кребса-Рінгера. Клітини піддавали лізису для виділення [$^3$H]DA шляхом безпосереднього додання до культур рідкої сцинтиляційної суміші Opticphase supermix (фірма Wallac). Радіоактивність клітинних лізатів визначали за допомогою рідинного сцинтиляційного лічильника Microbeta-plus (фірма Wallac, Inc.). Поглинання DA низького рівня спорідненості визначали шляхом додання 0,5 мМ розчину GBR12909, специфічного інгібітора сайтів поглинання DA високого рівня спорідненості (Хіккіла Р.Е. (Heikkila R.E.), Мазіно Л. (Mazino L.), European Journal of Pharmacology 1984: 103:241-8), до буфера для поглинання з подальшим відніманням від загальної кількості поглинання з одержанням значення поглинання DA з високим рівнем спорідненості.

Таблиця 6

| Антитіло | $IC_{50}$ hNT-3 (нМ) | $IC_{50}$ hBDNF (нМ) |
|---|---|---|
| 4D4 (IgG2) | >13,75 | >13,75 |

Приклад 8

Ідентифікація антигенної детермінанти для анти-NGF антитіл

Картування антигенної детермінанти обмеженим протеолізом

П'ять мікрограмів (мкг) NGF інкубували з 4D4 (11 мкг) впродовж 30 хв при температурі 4 °С у 0,1 М розчині трис-буфера (pH 7,5). Після цього одержаний комплекс розщеплювали протеазою (субтилізин) (1 мкг) при температурі 37 °С впродовж 1 год. і 2 год. Пептидні карти (одержані шляхом високоефективного рідинного хроматографування (HPLC)) взаємно порівнювали для виявлення пептидів, які були захищені антитілами 4D4. Обмежений протеоліз NGF показав, що початково з NGF виділились декілька головних пептидів. Особливий інтерес становить одержання пептидів S18.3, S18.5 та S34.4 і їх захист від протеолізу антитілом. Інші піки не були чітко сформованими або захищеними. У Таблиці 7 наведені захищені пептиди двох експериментів (розщеплення впродовж 1 год. і 2 год.).

Таблиця 7

| | | | Відсоток захисту | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Розщеплення впродовж 1 год. | Розщеплення впродовж 2 год. |
| S16.1 | QAA (96-98) | С-кінець | - | 57 |
| S18.3 | FFETK (53-57) (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 45) | Ділянка петлі | 40 | 45 |
| S18.5 | SSSHPIFHR (1-9) (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 46) (HWNSY)* (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 47) | N-кінець | 40 | 50 |
| S34.4 | NSVEKQYFFETK (46-57) (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 48) | Ділянка петлі | 69 | 38 |

Відсоток захисту обчислювали за висотою пептидного піка. S18.5 містив два пептиди, але лише один пептид (SSSHPIFHR; ПОСЛІДОВНІСТЬ № 46) був захищений антитілом 4D4, оскільки пік іншого пептиду (HWNSY; ПОСЛІДОВНІСТЬ № 47), за результатами визначення оптичної густини при 280 нм, при доданні антитіл 4D4 залишився незмінним. Пептид S18.3 являв собою С-кінцеву частину S34.4; обидва пептиди походили з однієї ділянки петлі. N-кінцеві ділянки та центральні ділянки петлі також були можливими антигенними детермінантами.

Відділення розщеплених пептидів за допомогою мікроцентрифуги

Матеріал, розщеплений субтилізином (по 3 мкг кожного), інкубували з активними антитілами 4D4 та з неактивним моноклональним антитілом (№ 162) впродовж 30 хв при температурі 4 °С у 0,1 М розчині трис-буфера (pH 7,5). Зв'язані/незв'язані пептиди відділяли на мікроцентрифузі Microcon 10 (фірма Millipore Corp., Bedford, штат Массачусетс), і обидві фракції (зв'язану і незв'язану) піддавали аналізу засобами HPLC для виявлення пептидів, зв'язаних з антитілами. Виявили два вичерпані піки, ідентифіковані шляхом порівняння засобами HPLC незв'язаних фракцій після обробки антитілами 4D4 і № 162 та відділення за допомогою Microcon, які вказували на пептиди, зв'язані з антитілами. З антитілом 4D4 були зв'язані наведені нижче пептиди:

S1(4.4) ---- SRKAVRR (113-119) (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 49), С-кінцевий; і

S2(28.3) --- EVMVL (35-39) (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 50), ділянка петлі.

Пробу NGF за альтернативним варіантом розщеплювали за допомогою Lys-C (K) впродовж 24 год. Залишки цистеїну відновлювали і піддавали карбоксиметилуванню без денатурації. Одержану пробу інкубували з моноклональними антитілами 4D4 і AMG162 з подальшим відділенням на Microcon 100. Зв'язані і незв'язані фракції аналізували засобами HPLC з оберненою фазою. Лише два пептиди були ідентифіковані як К-пептиди, що зв'язують антитіло, як показано нижче. Обчислені маси пептидів, визначені аналізом послідовностей і мас-спектрометрією згаданих пептидів, співпадали. Згадані пептиди, як показано нижче, були картовані на N-кінцевій та С-кінцевій ділянці.

K1(37.6) - SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDK (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 51)

Обчислена маса=2821; фактична маса=2828,2; N-кінцевий.

K2(39.5) ---- QAAWRFIRIDTACVCVLSRK (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 52)

Обчислена маса=2452; фактична маса=2459,5; С-кінцевий.

Попередні експерименти з картування антигенних детермінант показали, що щонайменше три ділянки були можливими антигенними детермінантами для антитіл 4D4, у тому числі N-кінець (1-9), внутрішня (46-57) та С-кінцева (96-98) ділянки. На додаток до цього, розщеплення AspN показало, що фрагмент пептиду, який містив ---SSHPIFHRGEFSVC--- (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 53), був захищеним антитілом 4D4, у той час як розщеплення трипсином показало, що

фрагмент пептиду, який містив ---SSHPIFHR--- (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 54), не був захищеним антитілом 4D4. Таким чином, на N-кінці, послідовність GEFSVC (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 55) є найважливішою для зв'язування антитіл 4D4.

З метою точнішого встановлення антигенної детермінанти для анти-NGF антитіла 4D4.IgG1, за стандартними методами, виходячи з повної послідовності людського зрілого NGF (hNGF), синтезували у загальній кількості 23 пептиди (Таблиця 8). Згадані пептиди мали у довжину 15 амінокислот, із взаємоперекриттям 10 амінокислот, і цистеїновий кінцевий сегмент на С-кінці для кон'югації з матрицею. Для проведення експерименту з картування застосовували людське анти-hNGF антитіло 4D4.IgG1, описане вище.

Таблиця 8

| Пептид № | Послідовність | ПОСЛІДОВНІСТЬ № |
|---|---|---|
| 33582-27-01 | SSSHPIFHRGEFSVC (1-15) | 56 |
| 33582-27-02 | IFHRGEFSVADSVSVC (6-20) | 57 |
| 33582-27-03 | EFSVADSVSVWVGDKC (11-25) | 58 |
| 33582-27-04 | DSVSVWVGDKTTATDC (16-30) | 59 |
| 33582-27-05 | WVGDKTTATDIKGKEC (21-35) | 60 |
| 33582-27-06 | TTATDIKGKEVMVLGC (26-40) | 61 |
| 33582-27-07 | IKGKEVMVLGEVNIN (31-45) | 62 |
| 33582-27-08 | VMVLGEVNINNSVFKC (36-50) | 63 |
| 33582-27-09 | EVNINNSVFKQYFFEC (41-55) | 64 |
| 33582-27-10 | NSVFKQYFFETKARDC (46-60) | 65 |
| 33582-27-11 | QYFFETKARDPNPVDC (51-65) | 66 |
| 33582-27-12 | TKARDPNPVDSGARDC (56-70) | 61 |
| 33582-27-13 | PNPVDSGARDIDSKHC (61-75) | 68 |
| 33582-27-14 | SGARDIDSKHWNSYC (66-80) | 69 |
| 33582-27-15 | IDSKHWNSYATTTHTC (71-85) | 70 |
| 33582-27-16 | WNSYATTTHTFVKALC (76-90) | 71 |
| 33582-27-17 | TTTHTFVKALTMDGKC (81-95) | 72 |
| 33582-27-18 | FVKALTMDGKQAAWRC (86-100) | 73 |
| 33582-27-19 | TMDGKQAAWRFIRIDC (91-105) | 74 |
| 33582-27-20 | QAAWRFIRIDTAAVC (96-110) | 75 |
| 33582-27-21 | FIRIDTAAVAVLSRKC (101-115) | 76 |
| 33582-27-22 | TAAVAVLSRKAVRRAC (106-120) | 77 |
| 33582-27-23 | CAAVAVLSRKAVRRA (107-120) | 78 |

Фрагменти людського NGF пептиду розбавляли у PBS з 5 % розчином DMSO (диметилсульфоксид), 1 мМ розчином EDTA (етилендіамінтетраоцтова кислота) (pH 6,23). Кінцева концентрація пептиду була нормалізована до молярної концентрації, що відповідала 55 мкМ (приблизно 100 мкг/мл). Пептиди інкубували у 96-лункових титраційних мікропланшетах Reacti-Bind, активізованих малеімідом (фірма Pierce, номер за каталогом 15150) (100 мкг/лунку) при кімнатній температурі впродовж 2 год., потім при температурі 4 °С впродовж ночі з перемішуванням. Людський NGF (100 мкг/мл) застосовували як позитивний контроль. Планшети промивали промивним буфером (KPL) і блокували 0,2 % знежиреним сухим молоком (у буфері PBS-EDTA, pH 6,23) впродовж 2 год. при кімнатній температурі з подальшим додатковим блокування 5 % BSA впродовж 1 год. Після цього планшети інкубували з людським анти-NGF антитілом у різних концентраціях (0 мкг/мл, 3 мкг/мл, 10 мкг/мл, 30 мкг/мл), потім із козячим анти-hFc антитілом, кон'югованим із HRP (пероксидазою з хрону) (KPL) впродовж 2 год. Сигнал проявляли за допомогою субстрату TMB і зчитували при 450 нм після додання розчину для припинення реакції (KPL).

З-посеред 23 людських NGF пептидів, спостерігали щонайменше 4 головні піки, що вказували на зв'язування 4D4. Ці піки відповідали таким пептидам: пептид № 1 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 56), SSSHPIFHRGEFSVC (1-15); пептид № 10 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 65), NSVFKQYFFETKARD (46-60); пептиди № 16-17 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 71-ПОСЛІДОВНІСТЬ № 72), WNSYATTTHTFVKAL---(76-95); і пептиди № 18-21 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 73-ПОСЛІДОВНІСТЬ № 76), TTTHT---LSRKC (100-115).

Чотири піки зв'язування 4D4 були картовані на N-кінці, C-кінці, внутрішніх ділянках, а також на петлях L2 і L4 NGF, як описано у Вісман (Wiesmann) та інших (1999, Nature 401:184-8). Ці результати узагальнені у Таблиці 9.

Таблиця 9

| Антигенні детермінанти hNGF | N-кінець | L2 | Внутрішня ділянка | L4 | Внутрішня ділянка | C-кінець |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Пептид № | Пептид № 1 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 56), SSSHPI---, 1-15 | Пептид № 10 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 65), NSVFKQ---, 46-60 | Пептид № 16 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 71), WNSYA---, 76-90 | Пептид №17 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 72), TMDGKQ--81-95 | Пептид № 19 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 74), NMDGK---, 91-105 | Пептиди № 20-21 (ПОСЛІДОВНІСТЬ №75-ПОСЛІДОВНІСТЬ № 76), QAAWR---, 96-115 |
| Сигнал зв'язування антитіла | +++ | + | ++ | ++ | +++ | ++ |

Вісман (Wiesmann) та інші встановили кристалічну структуру hNGF, зв'язаного з рецептором trkA, і показали, що N-кінець (залишки 2-9) був важливим для зв'язування рецептора (Вісман (Wiesmann) та інші, 1999, Nature 401:184-188). Залишки цього сегменту у NGF є також важливими для специфічності до рецептора trkA, порівняно з рецепторами trkB або trkC. Антитіло 4D4 є селективним відносно людського NGF, порівняно з мишачим/щурячим NGF, а також BDNF і NT-3, найбільш ймовірно, з причини N-кінцевих різниць між людським NGF та іншими нейротрофінами.

Антитіло 4D4 зв'язується з пептидом № 10 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 65) (NSVFK---, 46-60) і пептидом № 17 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 72) (TTTHTFVKALTMDGKC, 81-95), що відповідають петлям L2 та L4, відповідно, які представляють дві із семи різних ділянок із більш високою, аніж середня, різницею послідовностей серед нейротрофінів. Експерименти з обміном цих семи ділянок між NGF і BDNF показали, що L2 і L4 були важливими для біологічної активності NGF. Окрім того, наслідком заміни п'яти залишків NT3 у петлях L2 і L4 залишками NGF була поява NGF-подібної активності з одночасним збереженням активності NT3. Таким чином, L2 і L4 є можливими ділянками, де антитіло 4D4 селективно зв'язується з NGF, а не з BDNF або NT-3.

Антитіло 4D4 також зв'язується з пептидом № 16 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 71) (WNSYATTTHTFVKAL, 76-90), сполученим із внутрішнім доменом кристалічної структури NGF. Ця ділянка є 100 % гомологічною у людського NGF і мишачого NGF, але відрізняється від інших нейротрофінів. 4D4 показало набагато слабкішу активність проти щурячого/мишачого NGF, порівняно з активністю проти людського NGF. Таким чином, зв'язування з цією частиною NGF, найбільш ймовірно, не є критичним для видової специфічності, але є важливим для селективності серед нейротрофінів.

Антитіло 4D4 зв'язується також з C-кінцевою ділянкою NGF (пептиди № 19-21 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 74-ПОСЛІДОВНІСТЬ № 76) TMDGK--- LSRKC, 91-115), що являє собою одну з ділянок людського NGF, яка відрізняє NGF від інших нейротрофінів (BDNF та NT3). Зв'язування з цією ділянкою допомагає пояснити, чому 4D4 не є активним проти інших нейротрофінів. Окрім того, між людським NGF і мишачим NGF на C-кінці існує різниця у одну амінокислоту, що дозволяє висунути припущення про те, що ця одна амінокислота може бути однією з причин того, що 4D4 віддає перевагу людському NGF, порівняно з щурячим/мишачим NGF. Подібне припущення має відношення і до N-кінця, де спостерігаються видові різниці.

І, нарешті, 4D4 взаємодіє також із внутрішнім доменом, який описується пептидом № 10 (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 65) (---KARDC, 50-60) людського NGF, який являє собою важливу ділянку для переважного зв'язування NGF з trkA, а не з trkB або trkC, що додатково пояснює його вибіркову нейтралізуючу активність проти людського NGF.

Приклад 9

Визначення спорідненості моноклональних антитіл за допомогою KinExA

Зв'язування антитіла 4D4 (38859-80) з huNGF (29714-91) перевіряли за допомогою KinExA. Стисло, Reacti-Gel 6x (фірма Piece) попередньо сенсибілізували за допомогою huNGF і

блокували за допомогою BSA. Проби антитіла 4D4 (10 пМ і 30 пМ) інкубували з різними концентраціями huNGF (фірма Amgen) при кімнатній температурі впродовж 8 год. перед пропусканням через гранули, сенсибілізовані huNGF. Кількість антитіла, зв'язану з гранулами, визначали за допомогою козячого антилюдського-IgG антитіла, міченого флуоресцентною міткою (Cy5) (фірма Jackson Immuno Research). Сигнал зв'язування був пропорційним концентрації вільного антитіла у стані рівноваги. Константу дисоціації у стані рівноваги ($K_D$) визначали шляхом нелінійного регресійного аналізу кривих конкурентного зв'язування із застосуванням моделі гомогенного односайтового зв'язування з двома кривими (програма KinEx™). $K_D$ зв'язування антитіла 4D4 з huNGF становила приблизно 4 пМ.

Приклад 10

Ідентифікація додаткових анти-NGF антитіл

Додаткові анти-NGF антитіла (позначені як 14D10, 6G9, 7H2, 14F11 і 4G6), які одержали та ідентифікували, як описано у наведених вище Прикладі 2 і Прикладі 3, були відібрані для додаткового дослідження. Стисло, кондиціоновані середовища перевіряли на зв'язувальну активність. Антитіла із середовищ очищали і секвенували. Прогнозовану масу порівнювали з мас-спектрометричними даними антитіл із кондиціонованих середовищ. Антитіла піддавали клонуванню. Два клони були експресовані у клітинах CHO і перевірені на активність, як описувалось вище. Результати наведено у Таблиці 10.

Таблиця 10

| Клон | $IC_{50}$ hNGF (нМ) | $IC_{50}$ rNGF (нМ) | Примітки | Молекулярний клон | $IC_{50}$ hNGF (нМ) | $IC_{50}$ rNGF (нМ) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 7H2 | 3,294 | 1,748 | клонований | 7H2-rFc | 0,963 | 0,792 |
| 6H9 | 3,172 | 1,699 | клонований | 6H9-rFc | 13,93 | 0,653 |
| 14D10 | 0,3918 | >13 | клонований | | | |
| 14D11 | 0,2803 | >20 | клонований | | | |
| 4G6 | 0,414 | >10 | клонований | | | |

Після цього послідовності варіабельних ділянок легкого і важкого ланцюгів цих антитіл порівнювали з послідовністю антитіла 4D4, а також між собою (Фіг. 5 і Фіг. 6). Відсоток гомології варіабельних ділянок важкого ланцюга, визначений цими порівняннями, подано у Таблиці 11. Відсоток гомології варіабельних ділянок легкого ланцюга подано у Таблиці 12. Окрім того, на Фіг. 5-10 зображено відсоток гомології гіперваріабельних ділянок різних антитіл.

Таблиця 11

| | 4D4VH | 14D10VH | 6H9VH | 7H2VH | 14D11VH | 4G6VH |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 4D4VH | 100 % | 70,9 % | 70,1 % | 75,6 % | 47,2. % | 73,4 % |
| 14D10VH | | 100 % | 95,3 % | 85 % | 54,3 % | 81,1 % |
| 6H9VH | | | 100 % | 86,6 % | 54,3 % | 81,1 % |
| 7H2VH | | | | 100 % | 51,2 % | 79,8 % |
| 14D11 VH | | | | | 100 % | 56,8 % |
| 4G6VH | | | | | | 100 % |

Таблиця 12

| | V4D4 VK | 14D11 LC | 4G6a LC | 4G6b LC | 4G6c LC | 14D10 LC | 6H9 LC | 4G6d LC | 7H2 LC | 4G6e |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| V4D4 VK | 100 % | 89 % | 91 % | 72 % | 74 % | 69 % | 71 % | 71 % | 70 % | 73 % |
| 14D11 LC | | 100 % | 94 % | 68 % | 71 % | 67 % | 68 % | 68 % | 6S% | 70 % |
| 4G6a LC | | | 100 % | 69 % | 74 % | 68 % | 70 % | 70 % | 69 % | 71 % |
| 4G6b LC | | | | 100 % | 87 % | 83 % | 86 % | 86 % | 86 % | 96 % |
| 4G6c LC | | | | | 100 % | 91 % | 94 % | 94 % | 94 % | 91 % |
| 14D10 LC | | | | | | 100 % | 91 % | 94 % | 94 % | 86 % |
| 6H9 LC | | | | | | | 100 % | 99 % | 98 % | 89 % |
| 4G6d LC | | | | | | | | 100 % | 99 % | 89 % |
| 7H2 LC | | | | | | | | | 100 % | |
| 4G6e | | | | | | | | | | 100 % |

Слід розуміти, що у наведеному описі наведені певні конкретні варіанти здійснення цього винаходу і що усі модифікації або альтернативні варіанти, еквівалентні згаданим варіантам, входять до суті та обсягу цього винаходу, представлених у формулі винаходу, що додається.

ЛІСТИНГ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110>Kenneth,Wild
Treanor, James
Huang, Haichun
Inoue, Heather
Zhang, Tie J.
Martin, Frank

<120> ЛЮДСЬКІ АНТИ-NGF НЕЙТРАЛІЗУЮЧІ АНТИТІЛА ЯК СЕЛЕКТИВНІ ІНГІБІТОРИ МЕТАБОЛІЧНИХ ШЛЯХІВ ФАКТОРА РОСТУ НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ (NGF)

<130> 02-1240

<150> US 60/487,431
<151> 2003-07-15

<160> 138

< 170> PatentIn version 3.0

<210> 1
<211> 990
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 1

```
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg     60
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg    120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca    180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc    240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc    300
```

aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 360
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 420
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag 720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

<210> 2
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 3
<211> 978
<212> ДІЖ
<213> Homo sapiens

<400> 3

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
agcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtcctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg cacccagacc 240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 300
aaatgttgtg tcgagtgccc accgtgccca gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc 360
ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacgtgc 420
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc 480

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 540

gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 600

aaggtctcca acaaaggcct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaaggg 660

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggaggagat gaccaagaac 720

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg 780

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac 840

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 900

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 960

tccctgtctc cgggtaaa 978

<210> 4
<211> 326
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 5
<211> 981
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 5

gccagcacca aggggccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 300
aaatatggtc ccccatgccc atcatgccca gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 360
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 420
tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccccat cccaggagga gatgaccaag 720
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 840
gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 900
aatgtcttct catgctccgt gakgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960
ctctccctgt ctctgggtaa a 981

<210> 6

<211> 327
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1               5                  10                  15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
            100                 105                 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
        115                 120                 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
    130                 135                 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145                 150                 155                 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
                165                 170                 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
            180                 185                 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
        195                 200                 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
    210                 215                 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225                 230                 235                 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
                245                 250                 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
            260                 265                 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
        275                 280                 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
    290                 295                 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305                 310                 315                 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
                325
```

<210> 7
<211> 321
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 7

cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213 > Homo sapiens

<400> 8

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 9
<211> 369
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 9

gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggctt caccttaaga agttatagca tgaactgggt tcgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtcgta gtagtcatac catattctac 180

gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ttcactgtat 240
ctgcaaatgg acagcctgag agacgaggac acggctatgt attactgtgc gagagtatat 300
agcagtggct ggcacgtctc tgattatttt gactactggg gccagggaat cctggtcacc 360
gtttcctca 369

<210> 10
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Arg Ser Ser His Thr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Val Tyr Ser Ser Gly Trp His Val Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 11
<211> 321
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 11

gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc agtgctttag cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt acccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 12
<211> 107
<212> PRT
<213 > Homo sapiens

<400> 12

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
            20                  25                  30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 13
<211> 42
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 13

gtatatagca gtggctggca cgtctctgat tattttgact ac 42

<210> 14
<211> 14
<212> PRT
<213 > Homo sapiens

<400> 14

```
Val Tyr Ser Ser Gly Trp His Val Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr
1               5                  10
```

<210> 15
<211> 27
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 15

caacagttta atagttaccc gctcact 27

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

```
Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1               5
```

<210> 17
<211> 51
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 17

tacattagtc gtagtagtca taccatattc tacgcagact ctgtgaaggg c 51

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Tyr Ile Ser Arg Ser Ser His Thr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 19
<211> 21
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 19

gatgcctcca gtttggaaag t 21

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 21
<211> 15
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 21

agttatagca tgaac 1

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Ser Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 23
<211> 33
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 23

cgggcaagtc agggcattag cagtgcttta gcc 33

<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 25
<211> 1131
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 25

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctctggg 60
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 240
tacacctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagctc 300
aaaaccccac ttggtgacac aactcacaca tgcccacggt gcccagagcc caaatcttgt 360
gacacacctc ccccgtgccc acggtgccca gagcccaaat cttgtgacac acctcccccg 420
tgcccacggt gcccagagcc caaatcttgt gacacacctc ccccatgccc acggtgccca 480
gcacctgaac tcctgggagg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggatacc 540
cttatgattt cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 600
cccgaggtcc agttcaagtg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 660
ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgttc cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 720
caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc 780

cccatcgaga aaaccatctc caaaaccaaa ggacagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 840

ctgccccccat cccgggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa 900

ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca gcgggcagcc ggagaacaac 960

tacaacacca cgcctcccat gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc 1020

accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacatcttct catgctccgt gatgcatgag 1080

gctctgcaca accgcttcac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a 1131

<210> 26
<211> 376
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
210 215 220

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
370 375

<210> 27
<211> 29
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> PCR праймер для людського NGF

<400> 27

acaccacata tgtcatcatc ccatcccat 29

<210> 28
<211> 40
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> PCR праймер для людського NGF

<400> 28

accacaggat cctccttatg cacgacgcac agctttacgg 40

<210> 29
<211> 375
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Нуклеотидна послідовність, що кодує рекомбінантний людський met-NGF

<400> 29

catatgtcat catcccatcc catcttccac aggggcgaat tctcggtgtg tgacagtgtc 60

agcgtgtggg ttggggataa gaccaccgcc acagacatca agggcaagga ggtgatggtg 120

ttgggagagg tgaacattaa caacagtgta ttcaaacagt acttttttga gaccaagtgc 180

cgggacccaa atcccgttga cagcgggtgc cggggcattg actcaaagca ctggaactca 240

tattgtacca cgactcacac ctttgtcaag gcgctgacca tggatggcaa gcaggctgcc 300

tggcggttta tccggataga tacggcctgt gtgtgtgtgc tcagccgtaa agctgtgcgt 360

cgtgcataag gatcc 375

<210> 30
<211> 121
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Амінокислотна послідовність рекомбінантного людського met-NGF (1-120)

<400> 30

Met Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys
1 5 10 15

Asp Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile
20 25 30

Lys Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser
35 40 45

Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro
50 55 60

Val Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr
65 70 75 80

Cys Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys
85 90 95

Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val
100 105 110

Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg Ala
115 120

<210> 31
<211> 55
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Послідовність 5'-праймеру для одержання вектора експресії pCFMl656 (ATCC№ 69576)

<400> 31

cgatttgatt ctagaaggag gaataacata tggttaacgc gttggaattc ggtac 55

<210> 32
<211> 49
<212> ДНК

<213> Штучна

<220>
<223> Послідовність 3'-праймеру для одержання вектора експресії pCFM1656 (ATCC № 69576)

<400> 32

taaactaaga tcttcctcct tattgtatac caattgcgca accttaagc 49

<210> 33
<211> 24
<212> ДІЖ
<213> Штучна

<220>
<223> PCR праймер
<220>
<221> Непевно
<222> (18)...(23)
<223> n - a, c, t, або g

<400> 33

ggccggatag gcctccannn nnnt 24

<210> 34
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> PCR праймер

<400> 34

ggggtcaggc tggaactgag g 21

<210> 35
<211> 19
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> PCR праймер

<400> 35

tgaggacgct gaccacacg 19

<210> 36
<211> 54
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> PCR праймер

<400> 36

cagcagaagc ttctagacca ccatggacat gagggtgccc gctcagctcc tggg 54

<210> 37
<211> 34
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> PCR праймер

<400> 37

cttgtcgact caacactctc ccctgttgaa gctc 34

<210> 38
<211> 55
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> PCR праймер

<400> 38

cagcagaagc ttctagacca ccatggagtt ggggctgtgc tgggttttcc ttgtt 55

<210> 39
<211> 34
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> PCR праймер

<400> 39

gcatgtcgac tcatttaccc ggagacaggg agag 34

<210> 40
<211> 449
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Arg Ser Ser His Thr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Val Tyr Ser Ser Gly Trp His Val Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val
195 200 205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 41
<211> 453
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Arg Ser Ser His Thr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Val Tyr Ser Ser Gly Trp His Val Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Ile Leu 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 Asn 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 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
        435                 440                 445

Leu Ser Pro Gly Lys
    450
```

<210> 42
<211> 450
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

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

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

Ser Tyr Ile Ser Arg Ser Ser His Thr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Val Tyr Ser Ser Gly Trp His Val Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
        115                 120                 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
    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 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
        195                 200                 205

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

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
225                 230                 235                 240

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

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

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

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 43
<211> 499
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Arg Ser Ser His Thr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Val Tyr Ser Ser Gly Trp His Val Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg 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 Thr Cys Asn Val
195 200 205

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

Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro
225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys
245 250 255

Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser
260 265 270

Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
275 280 285

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
290 295 300

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
305 310 315 320

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
325 330 335

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
340 345 350

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
355 360 365

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
370 375 380

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
385 390 395 400

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
405 410 415

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
420 425 430

Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro
435 440 445

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

```
     450                 455                 460

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val
465                 470                 475                 480

Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
                485                 490                 495

Ser Pro Gly
```

<210> 44
<211> 214
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
            20                  25                  30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 45
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

Phe Phe Glu Thr Lys
1 5

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg
1 5

<210> 47
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47

His Trp Asn Ser Tyr
1 5

<210> 48
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48

Asn Ser Val Glu Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys
1 5 10

<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49

Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg
1 5

<210> 50
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

Glu Val Met Val Leu
1 5

<210> 51
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51

Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp
1 5 10 15

Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp Lys
20 25

<210> 52
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52

Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val
1 5 10 15

Leu Ser Arg Lys
20

<210> 53
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53

Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys

1 5 10

<210> 54
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg
1 5

<210> 55
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55

Gly Glu Phe Ser Val Cys
1 5

<210> 56
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

«400> 56

Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys
1 5 10 15

<210> 57
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57

Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Ala Asp Ser Val Ser Val Cys
1 5 10 15

<210> 58
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58

Glu Phe Ser Val Ala Asp Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp Lys Cys
1 5 10 15

<210> 59
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59

Asp Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Cys
1 5 10 15

<210> 60
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<4.00> 60

Trp Val Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Cys
1 5 10 15

<210> 61
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61

Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly Cys
1 5 10 15

<210> 62
<211> 15
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Ile Lys Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn
1 5 10 15

<210> 63
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63

Val Met Val Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Cys
1 5 10 15

<210> 64
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64

Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Cys
1 5 10 15

<210> 65
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65

Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Ala Arg Asp Cys
1 5 10 15

<210> 66
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66

Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Ala Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Cys
1 5 10 15

<210> 67
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67

Thr Lys Ala Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Ser Gly Ala Arg Asp Cys
1 5 10 15

<210> 68
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<40p> 68

Pro Asn Pro Val Asp Ser Gly Ala Arg Asp Ile Asp Ser Lys His Cys
1 5 10 15

<210> 69
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69

Ser Gly Ala Arg Asp Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys
1 5 10 15

<210> 70
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70

Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Ala Thr Thr Thr His Thr Cys
1 5 10 15

<210> 71
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71

Trp Asn Ser Tyr Ala Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys Ala Leu Cys
1 5 10 15

<210> 72
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72

Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Cys
1 5 10 15

<210> 73
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 73

Phe Val Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala Trp Arg Cys
1 5 10 15

<210> 74
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 74

Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Cys
1 5 10 15

<210> 75
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75

Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Ala Val Cys
1 5 10 15

<210> 76
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76

Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Ala Val Ala Val Leu Ser Arg Lys Cys
1 5 10 15

<210 77
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77

Thr Ala Ala Val Ala Val Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg Ala Cys
1 5 10 15

<210> 78
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78

Cys Ala Ala Val Ala Val Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg Ala
1 5 10 15

<210> 79
<211> 125
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Asn Phe Thr Thr Tyr
            20                  25                  30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Asn Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
            100                 105                 110

Asn Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 80
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 80

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ile Trp
            20                  25                  30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 81
<211> 127
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 81

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Glu Asp Tyr
            20                  25                  30

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

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Arg Gly Ile Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Lys Glu Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Arg Pro Gly Tyr Phe Tyr Tyr
            100                 105                 110

Val Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 82
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 82

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly 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 Gly
            20                  25                  30

Phe Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
        35                  40                  45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Ala Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

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

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

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

<210> 83
<211> 127
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 83

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Arg Gly Ile Ile Gly Tyr Ala Gly Ser Val
50 55 60

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

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

Val Lys Glu Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Arg Pro Gly Tyr Phe Tyr Tyr
100 105 110

Val Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 84
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 84

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly 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 Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 85
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 85

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Thr Trp Asn Ser Gly Ile Leu Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Glu Glu Gly Ser Gly Arg Tyr Tyr Asn Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 86
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 86

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly 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 Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

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

<210> 87
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 87

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Asp Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gln Trp Leu Asp Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

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

<210> 88
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

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

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

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

<210> 89
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 89

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 Gly 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 Pro 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 His Arg
85 90 95

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

<210> 90
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 90

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly 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 Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 91
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 91

```
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 Trp

                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 92
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 92

```
Thr Tyr Trp Ile Gly
1               5
```

<210> 93
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 93

```
Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1               5                  10                  15

Gly
```

<210> 94
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 94

```
Asn Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asn Val
1               5                  10                  15
```

<210> 95
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 95

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ile Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 96
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 96

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 97
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 97

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 98
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 98

Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 99
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 99

Gly Ile Ser Trp Asn Arg Gly Ile Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 100
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 100

Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Arg Pro Gly Tyr Phe Tyr Tyr Val Met Asp
1 5 10 15

Val

<210> 101
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 101

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

<210> 102
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 102

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 103
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 103

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 104
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 104

Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 105
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 105

Gly Ile Ser Trp Asn Arg Gly Ile Ile Gly Tyr Ala Gly Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 106
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 106

Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Arg Pro Gly Tyr Phe Tyr Tyr Val Met Asp
1 5 10 15

Val

<210> 107
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 107

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 108
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 108

Val Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 109
<211> 9
<212> PRT
<213 > Homo sapiens

<400> 109

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 110
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 110

Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 111
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 111

Gly Ile Thr Trp Asn Ser Gly Ile Leu Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 112
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 112

Glu Gly Ser Gly Arg Tyr Tyr Asn Phe Asp Tyr
1 5 10

<210>> 113
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 113

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 114
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 114

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 115
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 115

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr Thr
1 5

<210> 116
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 116

Asp Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 117
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 117

Asp Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 118
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 118

Glu Gln Trp Leu Asp Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 119
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 119

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 120
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 120

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 121
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 121

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 122
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 122

Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 123
<211> 7
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<40f0> 123

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 124
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 124

Gln Gln Arg Ser Asn Trp His Arg Thr
1 5

<210> 125
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 125

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 126
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 126

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 127
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 127

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 128
<211> 11
<212> PRT
<213 > Homo sapiens

<400> 128

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 129

<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 129

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 130
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 130

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp Thr
1 5

<210> 131
<211>108
<212>PRT
<213> Homo sapiens

<400> 131

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly 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 Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

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

<210> 132
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 132

Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 133
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 133

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 134
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 134

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 135
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 135

Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp
1 5 10 15

Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys
20 25 30

Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val
35 40 45

Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val
50 55 60

Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys
65 70 75 80

Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln
85 90 95

Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu
100 105 110

Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg Ala
115 120

<210> 136
<211> 120
<212> PRT
<213> musmusculus

<400> 136

Ser Ser Thr His Pro Val Phe His Met Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp
1 5 10 15

Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys
20 25 30

Gly Lys Glu Val Thr Val Leu Ala Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val
35 40 45

Phe Arg Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Cys Arg Ala Ser Asn Pro Val
50 55 60

Glu Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys
65 70 75 80

Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys Ala Leu Thr Thr Asp Glu Lys Gln
85 90 95

Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu
100 105 110

Ser Arg Lys Ala Thr Arg Arg Ala
115 120

<210> 137
<211> 126
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 137

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu
1 5 10 15

Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys
20 25 30

Lys Thr Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys
35 40 45

Val Pro Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys
50 55 60

Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys
65 70 75 80

Arg His Trp Asn Ser Gln Cys Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala
85 90 95

Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile
100 105 110

Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Arg Gly Arg
115 120 125

<210> 138
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 138

Tyr Ala Glu His Lys Ser His Arg Gly Glu Tyr Ser Val Cys Asp Ser
1 5 10 15

Glu Ser Leu Trp Val Thr Asp Lys Ser Ser Ala Ile Asp Ile Arg Gly
20 25 30

His Gln Val Thr Val Leu Gly Glu Ile Lys Thr Gly Asn Ser Pro Val

```
          35                  40                  45

Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Arg Cys Lys Glu Ala Arg Pro Val Lys
    50                  55                  60

Asn Gly Cys Arg Gly Ile Asp Asp Lys His Trp Asn Ser Gln Cys Lys
65                  70                  75                  80

Thr Ser Gln Thr Tyr Val Arg Ala Leu Thr Ser Glu Asn Asn Lys Leu
                85                  90                  95

Val Gly Trp Arg Trp Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Ala Leu
            100                 105                 110

Ser Arg Lys Ile Gly Arg Thr
        115
```

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Фармацевтична композиція, яка містить фармацевтично прийнятний носій і терапевтично ефективну кількість виділеного людського антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, яке специфічно зв'язується з фактором росту нервової тканини (NGF), що містить:
а) легкий ланцюг, що містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить CDR1 ділянку людського легкого ланцюга (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 24), CDR2 ділянку людського легкого ланцюга (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 20) та CDR3 ділянку людського легкого ланцюга (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 16); та
b) важкий ланцюг, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить CDR1 ділянку людського важкого ланцюга (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 22), CDR2 ділянку людського важкого ланцюга (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 18) та CDR3 ділянку людського важкого ланцюга (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 14),
причому важкий ланцюг вибраний з ПОСЛІДОВНОСТЕЙ № 40-43 та містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить ПОСЛІДОВНІСТЬ № 10, і легкий ланцюг являє собою ПОСЛІДОВНІСТЬ № 44 та містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить ПОСЛІДОВНІСТЬ № 12.

2. Спосіб лікування болісного стану, спричиненого підвищеною експресією NGF або підвищеною чутливістю хворого до NGF, який включає введення хворому фармацевтичної композиції за п. 1.

3. Спосіб лікування болісного стану, спричиненого підвищеною експресією NGF або підвищеною чутливістю хворого до NGF, який включає введення хворому фармацевтично ефективної кількості фармацевтичної композиції за п. 1.

4. Спосіб за п. 3, який **відрізняється** тим, що згаданий болісний стан або є наслідком будь-чого з переліченого нижче, або є одним з перелічених нижче станів:
гострий біль, зубний біль, біль, викликаний травмою, біль, викликаний хірургічним втручанням, біль унаслідок ампутації або абсцесу, каузалгія, демієлінізаційні захворювання, невралгія трійчастого нерва, рак, хронічний алкоголізм, інсульт, таламічний больовий синдром, діабет, синдром набутого імунодефіциту (СНІД), стан, спричинений токсинами, стан, спричинений хіміотерапією, головний біль у цілому, мігрень, сильний нападоподібний головний біль з періодичними рецидивами, змішані серцево-судинні та несерцево-судинні синдроми, головний біль, викликаний гіпер- або гіпотензією, запалення у цілому, артрит, ревматичні захворювання, вовчак, остеоартрит, фіброміалгія, запальні захворювання кишечнику, синдром подразненої товстої кишки, запальні захворювання очей, запальні розлади або нестабільність сечового міхура, псоріаз, скарги на шкірні захворювання із запальними складовими, сонячна еритема, кардит, дерматит, міозит, неврит, дифузна хвороба сполучної тканини судин, хронічні запальні стани, запальний біль та пов'язані з цим гіпералгезія та алодинія, невропатичний біль та пов'язані з цим гіпералгезія та алодинія, діабетичний невропатичний біль, біль унаслідок пошкодження симпатичних сенсорних нервів, синдроми деаферентації, астма, пошкодження або дисфункція епітеліальної тканини, простий герпес, порушення вісцеральної рухливості на респіраторних, статево-сечових, шлунково-кишкових або серцево-судинних ділянках, рани, опіки, алергічні шкірні реакції, свербіж, вітиліго, загальні захворювання шлунково-кишкового тракту, коліт, виразки шлунка, виразки дванадцятипалої кишки, вазомоторний або алергічний риніт, бронхіальні розлади, дисменорея, диспепсія, гастроезофагеальний рефлюкс, панкреатит або вісцералгія.

5. Спосіб виявлення NGF у біологічній пробі, який включає:

a) контактування згаданої проби з антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом за умов, що надають можливість зв'язування згаданого антитіла або його антигензв'язувального фрагмента з NGF; де згадане антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить:

i) легкий ланцюг, що містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить CDR1 ділянку людського легкого ланцюга (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 24), CDR2 ділянку людського легкого ланцюга (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 20) та CDR3 ділянку людського легкого ланцюга (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 16); та

ii) важкий ланцюг, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить CDR1 ділянку людського важкого ланцюга (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 22), CDR2 ділянку людського важкого ланцюга (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 18) та CDR3 ділянку людського важкого ланцюга (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 14); та

b) визначення рівня зв'язаного зв'язувального агента у згаданій пробі, причому згаданий важкий ланцюг вибраний з ПОСЛІДОВНОСТЕЙ № 40-43 та містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить ПОСЛІДОВНІСТЬ № 10, і легкий ланцюг являє собою ПОСЛІДОВНІСТЬ № 44 та містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить ПОСЛІДОВНІСТЬ № 12.

6. Фармацевтична композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що згадане антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент відділяється від людського NGF поліпептиду з $K_D$ приблизно $1\times10^{-9}$M або менше і нейтралізує біологічну активність людського NGF у стандартній in vitro реакції з $IC_{50}$ приблизно $1\times10^{-8}$ M або менше.

7. Фармацевтична композиція за п. 6, яка **відрізняється** тим, що згадане антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент у процесі дисоціації відділяється від людського NGF поліпептиду з $K_D$ приблизно $1\times10^{-10}$ M або менше і нейтралізує біологічну активність людського NGF у стандартній in vitro реакції з $IC_{50}$ приблизно $1\times10^{-9}$ M або менше.

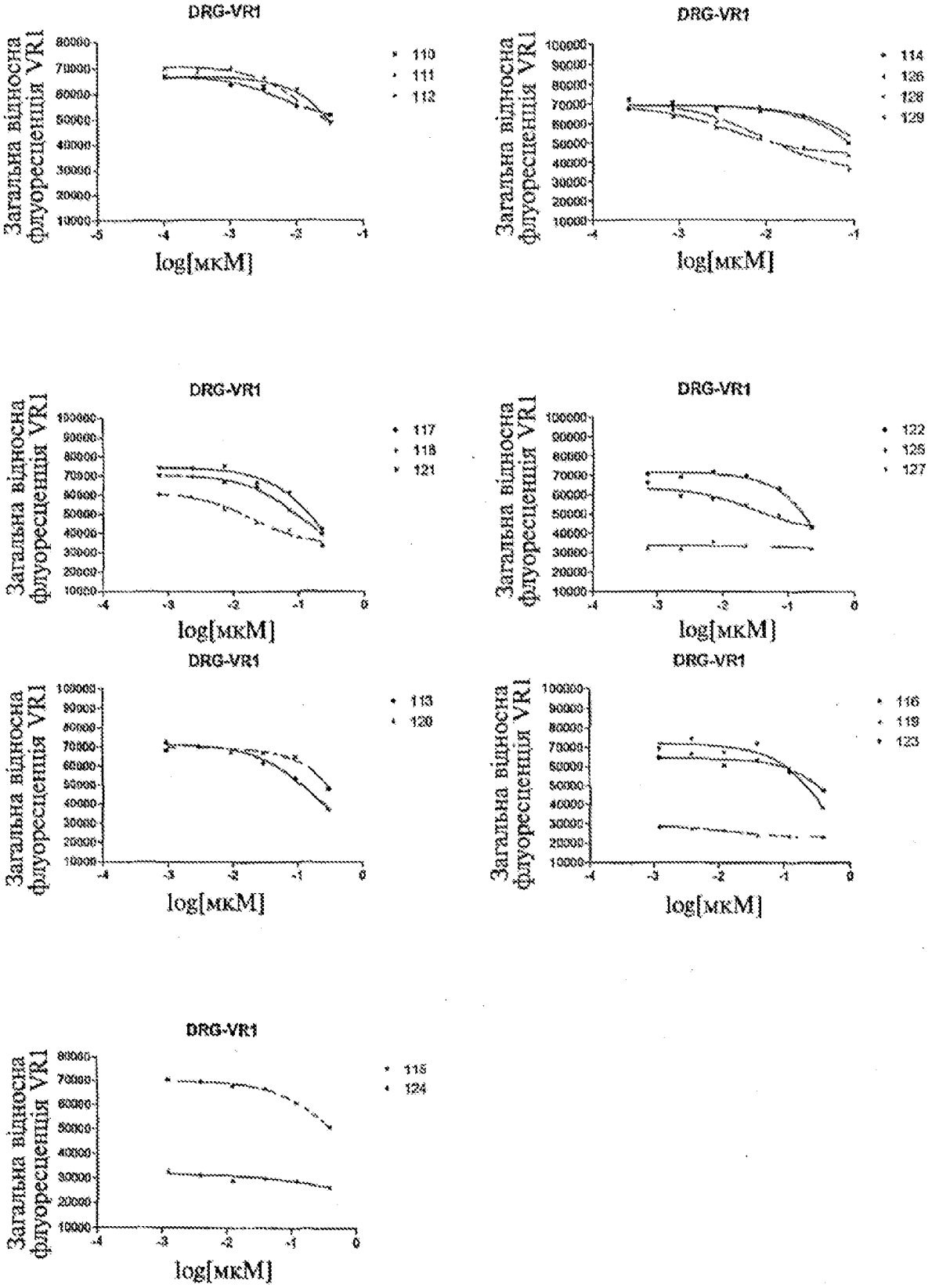
8. Фармацевтична композиція за п. 7, яка **відрізняється** тим, що згадане антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент у процесі дисоціації відділяється від людського NGF поліпептиду з $K_D$ приблизно $1\times10^{-11}$ M або менше і нейтралізує біологічну активність людського NGF у стандартній in vitro реакції з $IC_{50}$ приблизно $0{,}2\times10^{-9}$ M або менше.

9. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що згаданий болісний стан є наслідком раку.

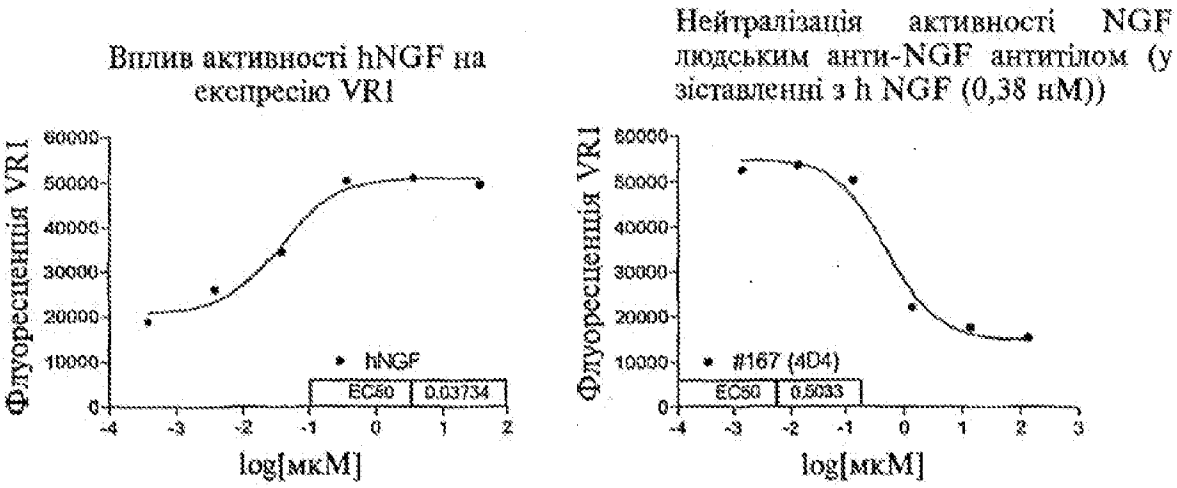
10. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що згаданий болісний стан є наслідком остеоартриту.

11. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що згаданий болісний стан є діабетичним невропатичним болем.

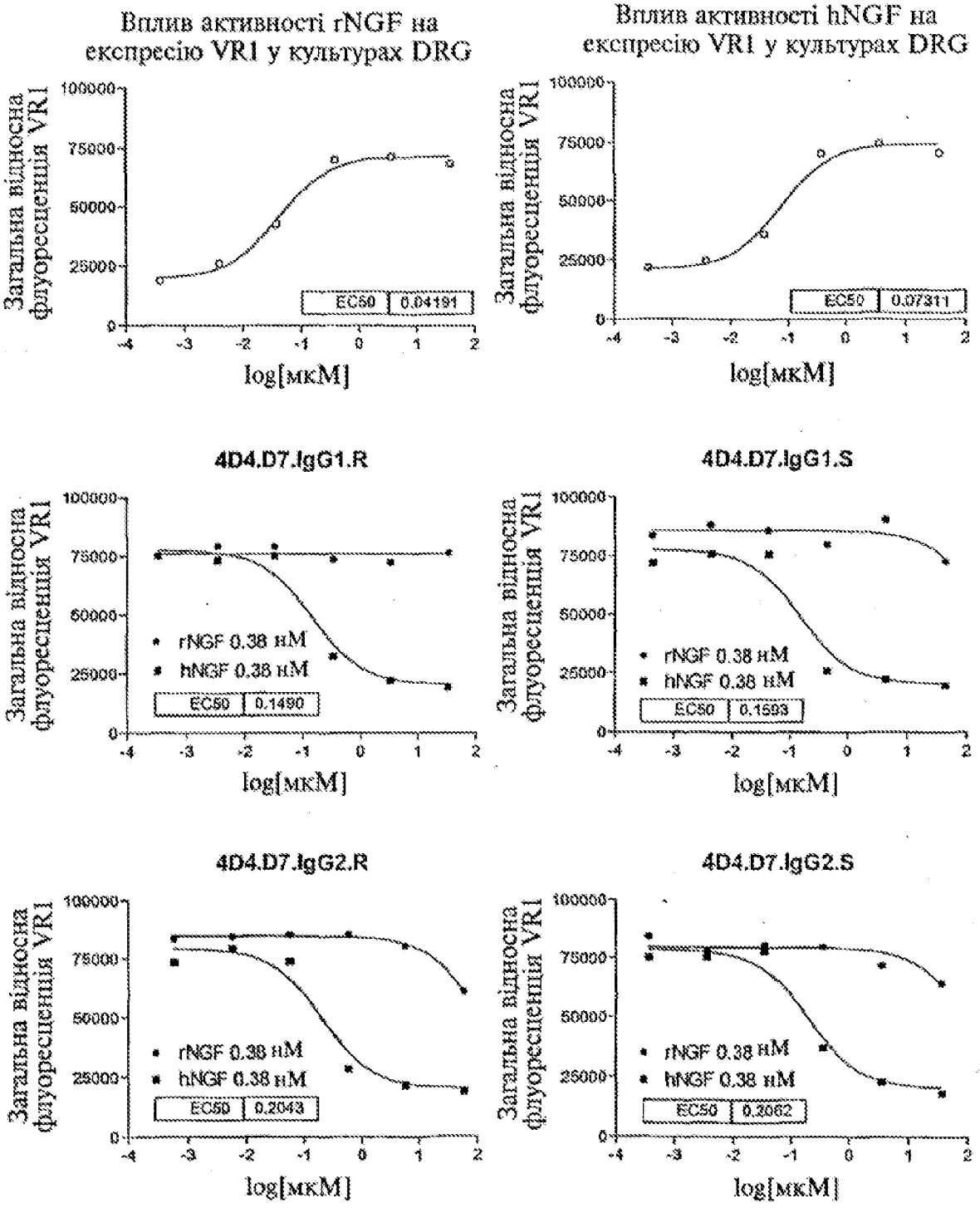
12. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що згаданий болісний стан є невропатичним болем.


DRG-VR1
Загальна відносна флуоресценція VR1
log[мкМ]
110
111
112
DRG-VR1
Загальна відносна флуоресценція VR1
log[мкМ]
114
126
128
129
DRG-VR1
Загальна відносна флуоресценція VR1
log[мкМ]
117
118
121
DRG-VR1
Загальна відносна флуоресценція VR1
log[мкМ]
122
125
127
DRG-VR1
Загальна відносна флуоресценція VR1
log[мкМ]
113
120
DRG-VR1
Загальна відносна флуоресценція VR1
log[мкМ]
116
119
123
DRG-VR1
Загальна відносна флуоресценція VR1
log[мкМ]
115
124

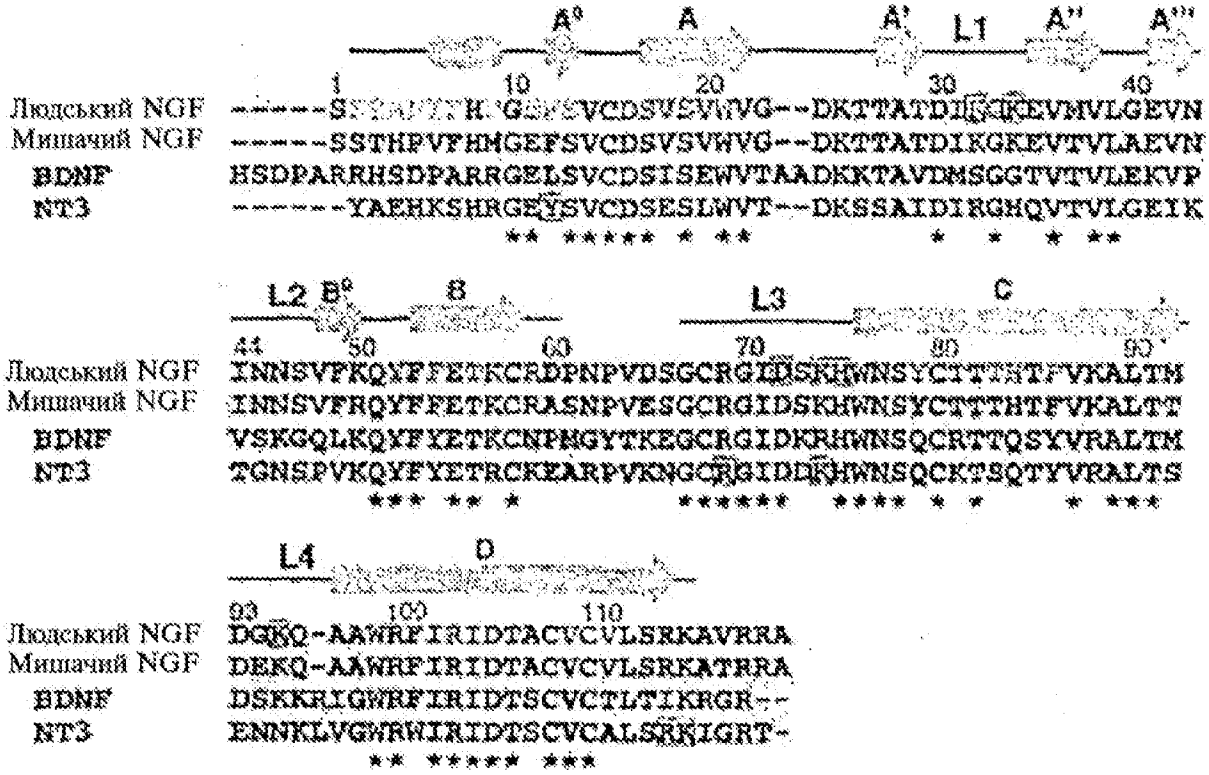
Фіг. 1


Вплив активності hNGF на експресію VR1
Флуоресценція VR1
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
log[мкМ]
hNGF
EC50
0.03734
Нейтралізація активності NGF людським анти-NGF антитілом (у зіставленні з h NGF (0,38 нМ))
Флуоресценція VR1
80000
60000
40000
30000
20000
10000
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
log[мкМ]
#167 (4D4)
EC50
6.5033

Фіг. 2


Вплив активності rNGF на експресію VR1 у культурах DRG
Загальна відносна флуоресценція VR1
log[мкМ]
EC50 0.04191
Вплив активності hNGF на експресію VR1 у культурах DRG
EC50 0.07311
4D4.D7.IgG1.R
rNGF 0.38 нМ
hNGF 0.38 нМ
EC50 0.1490
4D4.D7.IgG1.S
EC50 0.1593
4D4.D7.IgG2.R
EC50 0.2043
4D4.D7.IgG2.S
EC50 0.3062

Фіг. 3




Фіг. 4

Порівняльний аналіз/% ідентичності CDR1 важкого ланцюга NGF

(1) 1 5
14D10 HC CDR1 (1) DYAMH
6H9 HC CDR1 (1) DYAMH
7H2 HC CDR1 (1) DYAMH
4G6 HC CDR1 (1) DYGMH
14D11 HC CDR1 (1) TYWIG
4D4 HC CDR1 (1) SYGMH

| | 14D10 HC CDR1 | 6H9 HC CDR1 | 7H2 HC CDR1 | 4G6 HC CDR1 | 14D11 HC CDR1 | 4D4 HC CDR1 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 14D10 HC CDR1 | 100 | 100 | 100 | 60 | 20 | 40 |
| 6H9 HC CDR1 | | 100 | 100 | 60 | 20 | 40 |
| 7H2 HC CDR1 | | | 100 | 60 | 20 | 40 |
| 4G6 HC CDR1 | | | | 100 | 20 | 60 |
| 14D11 HC CDR1 | | | | | 100 | 20 |
| 4D4 HC CDR1 | | | | | | 100 |

Фіг. 5

Порівняльний аналіз/% ідентичності CDR2 важкого ланцюга NGF

```
                    (1) 1                 17
14D10 HC CDR2       (1) GISWNSGIIGYADSVKG
6H9 HC CDR2         (1) GISWNSGIIGYAGSVKG
7H2 HC CDR2         (1) GITWNSGILGYADSVKG
4G6 HC CDR2         (1) DINWNGGSTGYADSVKG
4D4 HC CDR2         (1) YISSSSNTIFYADSVKG
14D11 HC CDR2       (1) IIYPGDSDTKYSPSFQG
```

| | 14D10 HC CDR2 | 6H9 HC CDR2 | 14D11 HC CDR | 4D4 HC CDR2 | 4G6 HC CDR2 | 7H2 HC CDR2 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 14D10 HC CDR2 | 100 | 94 | 24 | 59 | 70 | 82 |
| 6H9 HC CDR2 | | 100 | 24 | 53 | 65 | 76 |
| 14D11 HC CDR2 | | | 100 | 24 | 29 | 24 |
| 4D4 HC CDR2 | | | | 100 | 47 | 53 |
| 4G6 HC CDR2 | | | | | 100 | 70 |
| 7H2 HC CDR2 | | | | | | 100 |

Фіг. 6

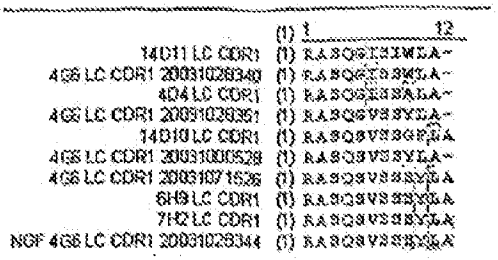
Порівняльний аналіз/% ідентичності CDR3 важкого ланцюга NGF

```
                    (1) 1                 17
14D10 HC CDR3       (1) GYYGSGRPGYFYYVMDV
6H9 HC CDR3         (1) GYYGSGRPGYFYYVMDV
14D11 HC CDR3       (1) -NYYGSGTYYYYYGMNV
4G6 HC CDR3         (1) --EQWLDFYYNYYGMDV
4D4 HC CDR3         (1) -VYS-SGWSVSDY-FDY
7H2 HC CDR3         (1) ---EGSGR---YYNFDY
```

| | 14D10 HC CDR3 | 6H9 HC CDR3 | 14D11 HC CDR | 4G6 HC CDR3 | 4D4 HC CDR3 | 7H2 HC CDR3 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 14D10 HC CDR3 | 100 | 100 | 35 | 41 | 18 | 18 |
| 6H9 HC CDR3 | | 100 | 35 | 41 | 18 | 18 |
| 14D11 HC CDR3 | | | 100 | 53 | 29 | 35 |
| 4G6 HC CDR3 | | | | 100 | 18 | 29 |
| 4D4 HC CDR3 | | | | | 100 | 41 |
| 7H2 HC CDR3 | | | | | | 100 |

Фіг. 7

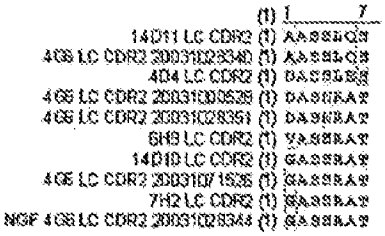
## Порівняльний аналіз/% ідентичності CDR1 легкого ланцюга NGF




| | 14D11 LC CDR1 | 4G6 LC CDR1 20031028340 | 4D4 LC CDR1 | 4G6 LC CDR1 20031028351 | 14D10 LC CDR1 | 4G6 LC CDR1 20031000528 | 4G6 LC CDR1 20031071526 | 6H9 LC CDR1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 14D11 LC CDR1 | 100 | 92 | 86 | 75 | 42 | 67 | 42 | 42 |
| 4G6 LC CDR1 20031028340 | | 100 | 92 | 83 | 58 | 75 | 58 | 58 |
| 4D4 LC CDR1 | | | 100 | 83 | 58 | 75 | 58 | 58 |
| 4G6 LC CDR1 20031028351 | | | | 100 | 58 | 92 | 58 | 58 |
| 14D10 LC CDR1 | | | | | 100 | 67 | 83 | 83 |
| 4G6 LC CDR1 20031000528 | | | | | | 100 | 67 | 67 |
| 4G6 LC CDR1 20031071526 | | | | | | | 100 | 100 |
| 6H9 LC CDR1 | | | | | | | | 100 |
| 7H2 LC CDR1 | | | | | | | | |
| NGF 4G6 LC CDR1 20031028344 | | | | | | | | |

**Фіг. 8**

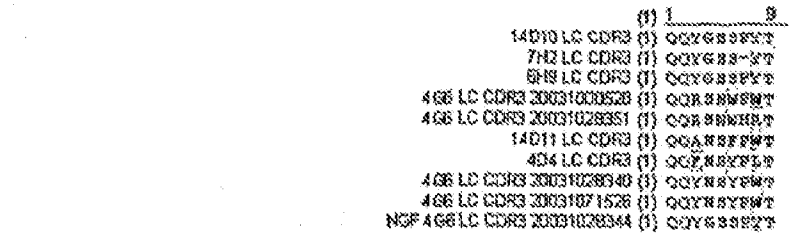
## Порівняльний аналіз/% ідентичності CDR2 легкого ланцюга NGF




| | 14D11 LC CDR2 | 4G6 LC CDR2 20031028340 | 4D4 LC CDR2 | 4G6 LC CDR2 20031000528 | 4G6 LC CDR2 20031028351 | 6H9 LC CDR2 | 14D10 LC CDR2 | 4G6 LC CDR2 20031071526 | 7H2 LC CDR2 | NGF 4G6 LC CDR2 20031028344 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 14D11 LC CDR2 | 100 | 100 | 71 | 29 | 29 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 |
| 4G6 LC CDR2 20031028340 | | 100 | 71 | 29 | 29 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 |
| 4D4 LC CDR2 | | | 100 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 |
| 4G6 LC CDR2 20031000528 | | | | 100 | 100 | 71 | 71 | 71 | 71 | 71 |
| 4G6 LC CDR2 20031028351 | | | | | 100 | 71 | 71 | 71 | 71 | 71 |
| 6H9 LC CDR2 | | | | | | 100 | 86 | 86 | 86 | 86 |
| 14D10 LC CDR2 | | | | | | | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4G6 LC CDR2 20031071526 | | | | | | | | 100 | 100 | 100 |
| 7H2 LC CDR2 | | | | | | | | | 100 | 100 |
| NGF 4G6 LC CDR2 20031028344 | | | | | | | | | | 100 |

**Фіг. 9**

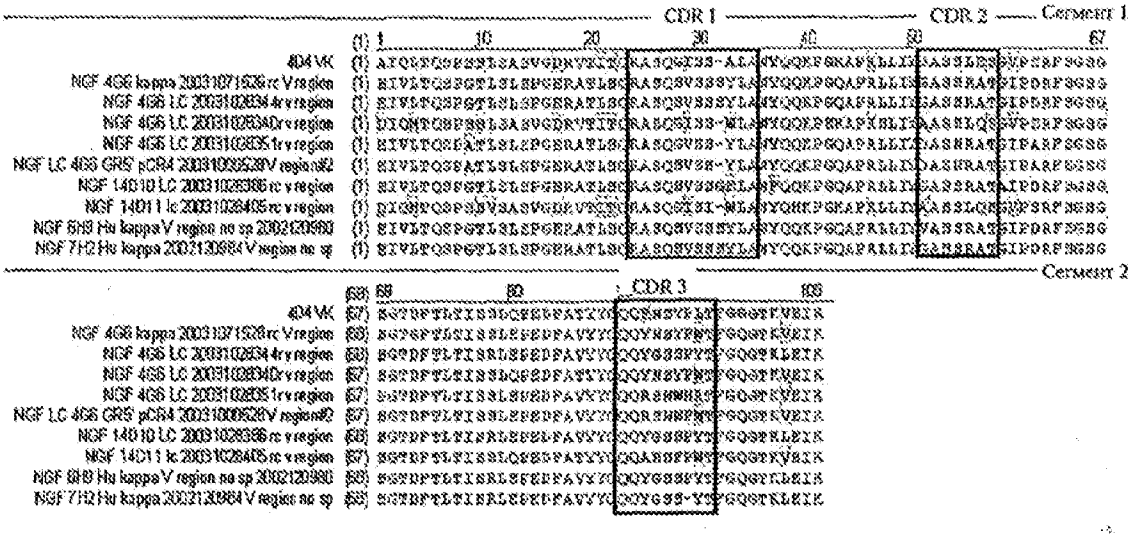
Порівняльний аналіз/% ідентичності CDR3 легкого ланцюга NGF



| | 14D10 LC CDR3 | 7H2 LC CDR3 | 6H9 LC CDR3 | 4G6 LC CDR3 20031000528 | 4G6 LC CDR3 20031028351 | 14D11 LC CDR3 | 4D4 LC CDR3 | 4G6 LC CDR3 20031028340 | 4G6 LC CDR3 20031071526 | NGF 4G6 LC CDR3 20031028344 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 14D10 LC CDR3 | 100 | 89 | 100 | 44 | 33 | 56 | 56 | 67 | 67 | 100 |
| 7H2 LC CDR3 | | 100 | 89 | 33 | 33 | 44 | 44 | 56 | 56 | 89 |
| 6H9 LC CDR3 | | | 100 | 44 | 33 | 56 | 56 | 67 | 67 | 100 |
| 4G6 LC CDR3 20031000528 | | | | 100 | 78 | 56 | 44 | 56 | 56 | 44 |
| 4G6 LC CDR3 20031028351 | | | | | 100 | 33 | 33 | 33 | 33 | 33 |
| 14D11 LC CDR3 | | | | | | 100 | 67 | 78 | 78 | 89 |
| 4D4 LC CDR3 | | | | | | | 100 | 78 | 78 | 89 |
| 4G6 LC CDR3 20031028340 | | | | | | | | 100 | 100 | 67 |
| 4G6 LC CDR3 20031071526 | | | | | | | | | 100 | 67 |
| NGF 4G6 LC CDR3 20031028344 | | | | | | | | | | 100 |

**Фіг. 10**

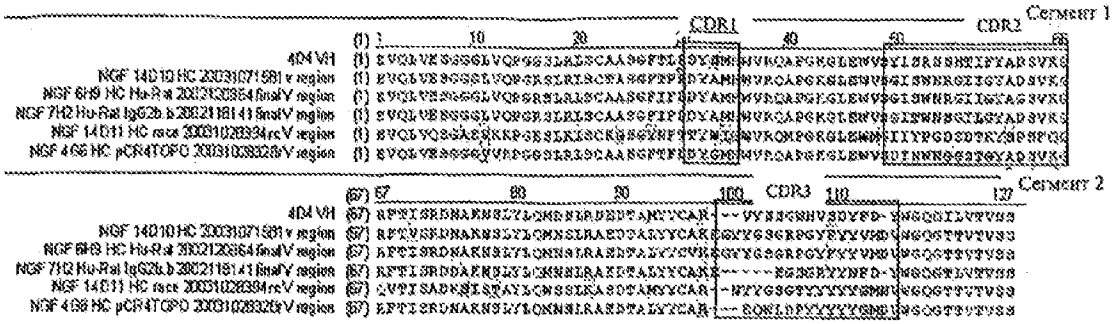
Порівняльний аналіз варіабельних ділянок легкого ланцюга моноклональних антитіл 4G6, 7H2, 14D10, 14D11, 6H9, 4D4




region — ділянка; kappa — каппа

**Фіг. 11**

Порівняльний аналіз варіабельних ділянок важкого ланцюга моноклональних антитіл 4D4, 4G6, 14D10, 14D11, 7H2, 6H9




region — ділянка; kappa — каппа

**Фіг. 12**

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601