



(51) МПК
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C07K 16/22 (2015.12); *C07K 16/467* (2015.12); *C07K 2317/24* (2015.12)

(21)(22) Заявка: 2013154301, 08.05.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 08.05.2012

Дата регистрации:
 27.12.2017

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
 06.05.2011 US 61/483,488;
 06.09.2011 US 61/531,439

(43) Дата публикации заявки: 20.06.2015 Бюл. № 17

(45) Опубликовано: 27.12.2017 Бюл. № 36

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
 национальной фазе: 06.12.2013

(86) Заявка РСТ:
 GB 2012/051003 (08.05.2012)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2012/153122 (15.11.2012)

Адрес для переписки:
 119019, Москва, Гоголевский бульвар, дом 11,
 "Гоуллинг ВЛГ (Интернэшнл) Инк.", Карпенко
 Оксане Юрьевне

(72) Автор(ы):
 ГИРИНГ Дэвид (AU)

(73) Патентообладатель(и):
 НЕКСВЕТ АВСТРАЛИЯ ПТИ ЛТД (AU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: WO 2012024650 A2, 23.02.2012. WO
 2010027488 A2, 11.03.2011. WO 2015061540
 A2, 07.07.2005. RU 2389509 C2, 23.02.2012.

R U 2 6 4 0 2 5 4 C 2

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И
 ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к
 биотехнологии, в частности к способу получения
 антител, подходящих для применения у кошки,
 которые специфично связываются с кошачьим
 фактором роста нервов (NGF) и нейтрализуют
 способность кошачьего NGF связываться с
 рецептором кошачьего NGF p75 или TrkA, и
 соответствующим антителам. Для осуществления
 указанного способа получают донорное антитело
 от вида, отличного от кошки, причем донорное

антитело характеризуется специфичностью
 связывания в отношении целевого антигена,
 присутствующего у кошек. Затем сравнивают
 каждый аминокислотный остаток в
 последовательности каркасных участков
 донорного антитела с каждым аминокислотным
 остатком, присутствующим в соответствующем
 положении в последовательности каркасных
 участков пула кошачьих антител. После чего
 замещают идентифицированные аминокислотные

R U 2 6 4 0 2 5 4 C 2

R U 2 6 4 0 2 5 4 C 2

остатки в донорном антителе аминокислотными остатками, присутствующими в соответствующем положении в пule кошачьих антител. Полученное антитело не содержит в любом положении в пределах каркасных участков какую-либо аминокислоту, которая будет чужеродной в соответствующем положении у кошек. Настоящее изобретение также раскрывает фармацевтическую композицию и набор, содержащие указанные

антитела, для лечения боли у кошек, в частности боли, связанной с иммуноопосредованным полиартритом, остеоартритом или ревматоидным артритом. Настоящее изобретение позволяет избежать при получении кошачьих антител снижения или потери антигенсвязывающей активности. 6 н. и 10 з.п. ф-лы, 17 ил., 16 табл., 11 пр.

R U 2 6 4 0 2 5 4 C 2

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19)

RU

(11)

2 640 254

⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C07K 16/22 (2015.12); *C07K 16/467* (2015.12); *C07K 2317/24* (2015.12)

(21)(22) Application: 2013154301, 08.05.2012

(24) Effective date for property rights:
08.05.2012

Registration date:
27.12.2017

Priority:

(30) Convention priority:
06.05.2011 US 61/483,488;
06.09.2011 US 61/531,439

(43) Application published: 20.06.2015 Bull. № 17

(45) Date of publication: 27.12.2017 Bull. № 36

(85) Commencement of national phase: 06.12.2013

(86) PCT application:
GB 2012/051003 (08.05.2012)

(87) PCT publication:
WO 2012/153122 (15.11.2012)

Mail address:
119019, Moskva, Gogolevskij bulvar, dom 11,
"Gouling VLG (Interneshn) Ink.", Karpenko
Oksane Yurevne

(72) Inventor(s):

GIRING Devid (AU)

(73) Proprietor(s):

NEXVET AUSTRALIA PTY LTD (AU)

R U 2 6 4 0 2 5 4 C 2

(54) ANTIBODIES AGAINST NERVE GROWTH FACTOR AND METHODS FOR THEIR PRODUCTION
AND APPLICATION

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to a method for production of antibodies suitable for use in cats that are specifically associated with the cat nerve growth factor (NGF) and neutralise the ability of the cat NGF to contact the cat NGF p75 or TrkA receptor and the corresponding antibodies. To implement this method, a donor antibody is obtained from a species other than a cat, the donor antibody having a binding specificity for the target antigen present in cats. Then, each amino acid residue in the sequence of the framework regions

of the donor antibody is compared to each amino acid residue present at the corresponding position in the sequence of the framework regions of cat antibodies pool. Then, the identified amino acid residues in the donor antibody are replaced with the amino acid residues present at the corresponding position in the pool of cat antibodies. The resulting antibody does not contain any amino acid foreign at the corresponding position in cats, at any position within the framework regions. This invention also discloses a pharmaceutical composition and a kit containing the said antibodies for

R U 2 6 4 0 2 5 4 C 2

treatment of pain in cats, in particular pain associated with arthritis or osteoarthritis immune-mediated rheumatoid arthritis.

EFFECT: decrease or loss of antigen-binding activity is avoided.

16 cl, 17 dwg, 16 tbl, 11 ex

R U 2 6 4 0 2 5 4 C 2

Область техники, которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к антителам и их фрагментам, которые действуют как антагонисты кошачьего фактора роста нервов. Настоящее изобретение относится к способам их получения и к терапевтическому применению этих антител и фрагментов в лечении состояний, связанных с фактором роста нервов, таких как боль, имеющие отношение к боли нарушения и состояния, которые приводят в результате к появлению боли у кошек.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Фактор роста нервов (NGF) представляет собой природный секретируемый белок,

который состоит из полипептидных цепей альфа, бета и гамма. NGF является членом семейства нейротрофинов и задействован в ряде различных ролей. NGF способствует выживанию и дифференцировке сенсорных и симпатических нейронов и участвует в передаче сигнала через два мембраносвязанных рецептора, p75, низкоаффинный рецептор NGF, и TrkA, трансмембранный тирозинкиназа и высокоаффинный рецептор NGF. Связывание NGF с TrkA или p75 приводит в результате к повышению экспрессии нейропептидов в сенсорных нейронах.

Было описано применение антагонистов NGF для лечения боли и болевой чувствительности у людей (Cattaneo A., Curr. Op. Mol. Ther. 2010 12(1):94-106). Например, в международной патентной заявке № WO 2006/131951 описана гуманизированная форма крысиного моноклонального антитела альфаD11 (αD11). Антитело αD11 характеризуется специфичностью связывания с мышевым NGF, но также, как известно, связывается с человеческой и крысиной формами NGF. Перед введением людям требуется гуманизация происходящего из крысы моноклонального антитела αD11 с целью сведения к минимуму выработки нейтрализующих антител, что приводит в результате к образованию человеческих антител против мышевого антигена (HAMA), направленных против происходящих из крысы антител. Более того, замена мышевых константных доменов на человеческие константные домены дает возможность выбора последующих эффекторных функций.

Купирование боли у кошек в настоящее время обеспечивают посредством введения анальгезирующих лекарственных средств нескольких классов, в том числе местных анестезирующих средств и анестезирующих средств общего действия, опиоидных анальгезирующих средств, α2-агонистов, нестероидных противовоспалительных средств (NSAID) и стероидов. Каждый из них требует частого введения, а также характеризуется ограничениями по эффективности и безопасности. Соответственно, существует потребность в редко принимаемом, действующем длительное время и эффективном виде средства облегчения боли для кошек, страдающих от хронической боли, как например, животные с невропатической или онкологической болью.

Хотя NGF экспрессируется в кошачьих тканях, доступен лишь неполный клон его последовательности. Эта неполная последовательность мРНК определена в записи Genbank с номером доступа EF 065101 (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). мРНК, подобная таковой для фактора роста нервов бета у *Felis catus*). Не было описано ни применение антагониста кошачьего NGF, ни применение блокирования опосредованной NGF передачи сигнала у кошек для предупреждения или ослабления боли. Применение у кошек известных антител, которые действуют как антагонисты NGF у других видов, не будет осуществимым, поскольку нельзя с уверенностью определить, будет ли антитело со специфичностью связывания с фактором роста нервов, экспрессируемым у другого вида, также связываться с кошачьим фактором роста нервов. Более того, также существует возможность, что против такого вводимого антитела могут вырабатываться

нейтрализующие антитела, поскольку они будут распознаваться кошачьей иммунной системой как чужеродные. Любая выработка нейтрализующих антител будет ограничивать длительное введение антитела кошкам, это является особенно важным требованием при лечении связанного с хронической болью состояния или ракового состояния. Кроме того, введение кошке антитела против NGF, происходящего из другого вида, оно может проявлять перекрестную реактивность с другими целевыми эпитопами, которые могут присутствовать у кошек, но не присутствуют у вида, из которого было первоначально получено антитело. Соответственно, существует значительная потребность в связывающих элементах, которые действуют как антагонисты кошачьего NGF и которые сохраняют высокие уровни связывающей способности и avidности при избежании выработки нейтрализующих антител против них, для применения в купировании боли у кошек.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

После длительных исследований авторами настоящего изобретения были неожиданно

15 получены неиммуногенные химерные и фелинизированные антитела и связывающие фрагменты, полученные из них, которые специфично связываются с кошачьим NGF. Это демонстрируется в настоящем документе, при этом достаточно неожиданно, что связывание антител и связывающих фрагментов согласно настоящему изобретению с кошачьим NGF ограничивает биологическую активность кошачьего NGF посредством 20 ингибиции связывания кошачьего NGF с высокояффинным рецептором TrkA или с рецептором p75. Это, в свою очередь, предотвращает повышение экспрессии нейропептидов в сенсорных нейронах с получаемым в результате эффектом, который заключается в том, что ощущение боли будет уменьшаться или устраняться. Антитела были получены с использованием методов рекомбинантной ДНК так, чтобы они были, 25 главным образом, неиммуногенными, то есть, чтобы при введении кошке эти антитела не индуцировали выработку нейтрализующих антител против них. Такое открытие является полностью неожиданным, поскольку антитела не получали с использованием стандартных методик, таких как CDR-прививка или подобное.

Согласно первому аспекту настоящего изобретения предусматривается способ

30 получения антитела, подходящего для применения у кошки, включающий или состоящий, по существу, из стадий:

- получения донорного антитела вида, отличного от кошки, причем донорное антитело характеризуется специфичностью связывания в отношении целевого антигена, присутствующего у кошек;

35 - сравнения каждого аминокислотного остатка в аминокислотной последовательности каркасных участков донорного антитела с каждым аминокислотным остатком, присутствующим в соответствующем положении в аминокислотной последовательности каркасных участков одного или нескольких кошачьих антител для идентификации одного или нескольких аминокислотных остатков в пределах аминокислотной

40 последовательности каркасных участков донорного антитела, которые отличаются от одного или нескольких аминокислотных остатков в соответствующем положении в пределах аминокислотной последовательности каркасных участков одного или нескольких кошачьих антител; и

45 - замещения одного или нескольких идентифицированных аминокислотных остатков в донорном антителе одним или несколькими аминокислотными остатками, присутствующими в соответствующем положении в одном или нескольких кошачьих антителях.

В способе согласно настоящему изобретению донорное антитело модифицируют

для применения у кошки таким образом, чтобы модифицированное антитело не содержало в любом положении в пределах каркасных участков какую-либо аминокислоту, которая будет чужеродной в этом положении у кошек.

Модифицированное антитело, таким образом, сохраняет специфичность и аффинность 5 донорного антитела в отношении целевого антигена, но важно то, что оно модифицировано так, чтобы не создавать потенциально чужеродных эпитопов. Таким образом, модифицированное антитело не распознается как чужеродное у кошек и, следовательно, не вызывает у кошек иммунный ответ, который может приводить к нейтрализации эффективности антитела, особенно после длительного введения.

10 Согласно определенным вариантам осуществления стадию, на которой замещают один или несколько идентифицированных аминокислотных остатков, включает замещение одного или нескольких идентифицированных аминокислотных остатков одним или несколькими аминокислотными остатками, присутствующими в соответствующем положении, которые характеризуются наибольшей гомологией с 15 одним или несколькими замещаемыми аминокислотными остатками.

Согласно определенным вариантам осуществления способ дополнительно включает стадию, на которой константные домены тяжелой цепи и/или легкой цепи донорного антитела заменяют константными доменами тяжелой и/или легкой цепи из кошачьего антитела. Как правило, константный домен тяжелой цепи заменяют кошачьим 20 константным доменом NC2-типа.

Согласно определенным вариантам осуществления целевой эпитоп представляет собой фактор роста нервов (NGF).

Способ согласно первому аспекту настоящего изобретения не предусматривает CDR-прививки. Антитела, полученные в соответствии со способом согласно первому аспекту 25 настоящего изобретения, содержат CDR донорного антитела, фелинизированные каркасные участки, полученные в соответствии со способом согласно первому аспекту настоящего изобретения, и кошачьи константные домены.

Согласно второму аспекту настоящего изобретения предусматривается химерное антитело или его связывающий фрагмент, которые специфично связываются с кошачьим 30 фактором роста нервов (NGF), причем указанное химерное антитело содержит вариабельные домены легкой и/или тяжелой цепей, происходящие из антитела, которое связывается с фактором роста нервов у вида, отличного от кошек, и константные домены легкой и тяжелой цепей, полученные из происходящих из кошки антител. Как правило, химерное антитело или связывающий фрагмент, полученный из него, 35 связывается с кошачьим NGF в связывающем эпитопе, что в случае связывания приводит в результате к нейтрализации биологической функции кошачьего NGF. То есть, связывание химерного антитела или связывающего фрагмента с кошачьим NGF ограничивает способность кошачьего NGF связываться с рецептором TrkA или с рецептором p75. Согласно определенным вариантам осуществления химерное антитело 40 или его связывающий фрагмент, связывается с кошачьим NGF со связывающей способностью (KD) 1×10^{-8} или менее.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения предусматривается химерное антитело против кошачьего NGF или его связывающий 45 фрагмент, которые связываются с кошачьим NGF и которые нейтрализуют способность кошачьего NGF связываться с рецепторами кошачьего NGF p75 или TrkA, причем химерное антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85, 90, 95 или 99% идентичностью последовательности

с ней, и/или тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85, 90, 95 или 99% идентичностью аминокислот с ней. Константные домены тяжелой цепи SEQ ID NO: 2 получают из антитела, происходящего из *Felis catus*, которое депонировано в 5 Genbank под номером доступа BAA32229.1. В дополнительном варианте осуществления тяжелая цепь характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:16, то есть константный домен соединен с константными доменами тяжелой цепи, полученными из антитела, происходящего из *Felis catus*, которое депонировано в Genbank под номером доступа BAA32230.1.

10 Как правило, константные домены химерного антитела против кошачьего NGF согласно настоящему изобретению не опосредуют последующие эффекторные функции, связанные с константными участками антитела, такие как фиксация комплемента, ADCC (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность), связывание Fc с рецептором или подобное. Согласно определенным вариантам осуществления 15 остатки в константных доменах тяжелой цепи могут быть замещены остатками, которые не могут быть гликозилированы. Согласно определенным вариантам осуществления агликозилированная тяжелая цепь характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 19 или последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 85, 90, 95 или 99% идентичностью аминокислот с ней.

20 Настоящее изобретение распространяется на антитела, полученные согласно первому аспекту настоящего изобретения. Соответственно, в определенных дополнительных аспектах настоящее изобретение распространяется на фелинизиранное нейтрализующее антитело против кошачьего NGF. Фелинизиранное антитело сохраняет специфичность связывания антитела, которое связывается с NGF, не 25 являющимся кошачьим NGF, в связывающем эпитопе, который по прогнозу авторов настоящего изобретения является консервативным у кошачьего NGF и NGF из другого вида, при снижении иммуногенности антитела с помощью обеспечения происходящих из кошки константных доменов и, что существенно, модификации выбранных остатков в каркасных участках (FR) вариабельного участка с тем, чтобы специфичность 30 связывания участков CDR не изменилась, но чтобы Т-клеточные эпитопы, которые могут присутствовать в каркасных участках, размещенных между участками CDR, были удалены посредством замещений конкретных остатков в каркасных участках донорного антитела происходящими из каркасных участков кошки аминокислотами. Важно, что остатки в каркасных участках не заменяют полностью на каркасные участки, 35 полученные из происходящих из кошки антител. Напротив, замещение остатков в каркасных участках является продуманным и конкретным.

Согласно дополнительному или связанныму аспекту настоящего изобретения предусматривается фелинизиранное антитело или его связывающий фрагмент, которые специфично связываются с кошачьим фактором роста нервов (NGF). Как 40 правило, фелинизиранное антитело или его связывающий фрагмент нейтрализует биологическую функцию кошачьего NGF в случае связывания с ним. То есть, связывание фелинизиранного антитела или связывающего фрагмента с кошачьим NGF ограничивает способность кошачьего NGF связываться с рецептором NGF TrkA или с рецептором NGF p75. Согласно определенным вариантам осуществления 45 фелинизиранное антитело или его связывающий фрагмент связывается с NGF со связывающей способностью $K_D 1 \times 10^{-8}$ или менее. Как правило, фелинизиранное антитело не является иммуногенным у кошек.

Согласно определенным вариантам осуществления фелинизиранное антитело

получают в соответствии со способом получения антитела согласно первому аспекту настоящего изобретения.

Согласно дополнительному или связанныму аспекту настоящего изобретения предусматривается нейтрализующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, 5 которые способны специфично связываться с кошачьим фактором роста нервов (NGF), причем антитело или связывающий фрагмент антитела содержит, состоит из или состоит, по существу, из вариабельного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85, 90, 95 или 99% идентичностью аминокислот с ней. Согласно 10 определенным вариантам осуществления указанная идентичность распространяется на длину по меньшей мере приблизительно на 15 аминокислот, предпочтительно приблизительно на 20 аминокислот, более предпочтительно приблизительно на 25 аминокислот.

Согласно некоторым вариантам осуществления нейтрализующее антитело

15 представляет собой моноклональное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой химерное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой фелинизированное антитело, то есть антитело, которое характеризуется аминокислотной последовательностью, которая была лишена иммуногенности так, чтобы при введении этого антитела кошке 20 не вырабатывались нейтрализующие антитела против него. Согласно определенным вариантам осуществления фелинизированное антитело получают в соответствии со способом получения антитела согласно первому аспекту настоящего изобретения. Как правило, константные домены тяжелой цепи антитела выбраны или модифицированы посредством замены или делеции аминокислоты так, чтобы константные домены не 25 опосредовали последующие эффекторные функции.

Согласно определенным вариантам осуществления фелинизированное антитело или связывающий фрагмент этого антитела содержит, состоит из или состоит, по существу, из легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85, 30 90, 95 или 99% идентичностью последовательности с ней. Согласно определенным вариантам осуществления указанная идентичность распространяется на длину по меньшей мере приблизительно на 15 аминокислот, предпочтительно приблизительно на 20 аминокислот, более предпочтительно приблизительно на 25 аминокислот.

Согласно дополнительному или связанныму аспекту предусматривается

35 нейтрализующее фелинизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые способны специфично связываться с кошачьим фактором роста нервов (NGF), причем фелинизированное антитело или связывающий фрагмент антитела содержит, состоит из или состоит, по существу, из вариабельного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или аминокислотную 40 последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85, 90, 95 или 99% идентичностью последовательности с ней. Согласно определенным вариантам осуществления указанная идентичность распространяется на длину по меньшей мере приблизительно на 15 аминокислот, предпочтительно приблизительно на 20 аминокислот, более предпочтительно приблизительно на 25 аминокислот.

45 Как правило, вариабельный участок тяжелой цепи (VH) соединен с константным участком тяжелой цепи, который содержит по меньшей мере один константный домен иммуноглобулинов. Как правило, константный участок тяжелой цепи составляют 3 последовательно расположенные (т.е. расположенные в ряд) константных домена,

причем шарнирный участок располагают между 2 из доменов для обеспечения структурной гибкости. Константные участки разных изотипов могут содержать больше или меньше 3 константных доменов. Согласно определенным вариантам осуществления константный участок тяжелой цепи является полученным из происходящего из кошки

5 антитела. Известны два различных кошачьих константных домена (представленных в Genbank под номерами доступа BAA32229.1 и BAA32230.1) с одинаковым шарнирным участком и восемью различиями в аминокислотной последовательности между CH3 доменами. Как правило, указанные константные домены содержат CH1, CH2 и CH3 вместе с подходящим линкером (или "шарниром"), расположенным между указанными 10 CH1 и CH2 доменами. Как правило, антитело против кошачьего NGF согласно настоящему изобретению содержит вариабельный домен тяжелой цепи, соединенный с константным доменом, причем константный домен не приводит в результате к опосредуемым Fc участком антитела последующим эффекторным функциям, таким как фиксация комплемента, ADCC, связывание Fc с рецептором или подобное.

15 Согласно определенным вариантам осуществления антитело или связывающий фрагмент антитела содержит, состоит из или состоит, по существу, из тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85, 90, 95 или 99% идентичностью аминокислот с ней.

20 Согласно конкретным вариантам осуществления фелинизированное антитело или связывающий фрагмент, полученный из него, может содержать тяжелую цепь, в которой по меньшей мере один остаток в константном домене был замещен или удален с целью предотвращения гликозилирования этого остатка. Согласно определенным вариантам осуществления подтип тяжелой цепи происходит из кошачьего антитела подтипа IgG2.

25 Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления константные домены получены из антитела, происходящего из *Felis catus*, которое депонировано в Genbank под номером доступа BAA32230.1.

Согласно еще одному дополнительному или связанному аспекту настоящего изобретение распространяется на фелинизированное антитело или его 30 антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с кошачьим фактором роста нервов (NGF) и нейтрализуют его биологическую функцию при связывании с рецептором NGF TrkA и рецептором NGF p75, причем фелинизированное антитело или связывающий фрагмент этого антитела содержит легкую цепь и тяжелую цепи, в которых вариабельный домен легкой цепи (VL) содержит, состоит из или состоит, по существу, из аминокислотной последовательности, которая является идентичной или, главным 35 образом, гомологичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85, 90, 95 или 99% идентичностью аминокислот с ней, и в которых вариабельный домен тяжелой цепи (VH) содержит, состоит из или состоит, по существу, из аминокислотной 40 последовательности, которая является идентичной или, главным образом, гомологичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85, 90, 95 или 98% идентичностью аминокислот с ней. Согласно определенным вариантам осуществления указанная идентичность распространяется на длину по меньшей мере приблизительно на 15 аминокислот, 45 предпочтительно приблизительно на 20 аминокислот, более предпочтительно приблизительно на 25 аминокислот.

Согласно определенным вариантам осуществления фелинизированное антитело или связывающий элемент содержит легкую цепь, которая содержит, состоит из или состоит,

по существу, из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25 или последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85%, более предпочтительно 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 98% идентичностью аминокислот с ней. Согласно определенным вариантам осуществления указанная идентичность

5 распространяется на длину по меньшей мере приблизительно на 15 аминокислот, предпочтительно приблизительно на 20 аминокислот, более предпочтительно приблизительно на 25 аминокислот.

Согласно определенным вариантам осуществления фелинизированное антитело или связывающий элемент содержит тяжелую цепь, которая содержит, состоит из или

10 состоит, по существу, из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24 или полипептида, характеризующегося аминокислотной последовательностью с по меньшей мере 85%, более предпочтительно 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 98% идентичностью с ней. Согласно определенным вариантам осуществления указанная идентичность

15 распространяется на длину по меньшей мере приблизительно на 15 аминокислот, предпочтительно приблизительно на 20 аминокислот, более предпочтительно приблизительно на 25 аминокислот.

Согласно определенным вариантам осуществления антитело может быть конъюгировано с по меньшей мере одной репортерной молекулой. Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления по меньшей мере один

20 остаток в по меньшей мере одном из константных доменов можно заместить или удалить с целью предотвращения гликозилирования этого остатка.

Согласно дополнительному или связанному аспекту настоящего изобретения предусматривается нейтрализующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые способны специфично связываться с кошачьим фактором роста нервов (NGF),

25 причем антитело или связывающий фрагмент антитела содержит, состоит из или состоит, по существу, из вариабельного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85, 90, 95 или 99% идентичностью аминокислот с ней. Согласно определенным вариантам осуществления указанная идентичность

30 распространяется на длину по меньшей мере приблизительно на 15 аминокислот, предпочтительно приблизительно на 20 аминокислот, более предпочтительно приблизительно на 25 аминокислот.

Согласно некоторым вариантам осуществления нейтрализующее антитело представляет собой моноклональное антитело. Согласно некоторым вариантам

35 осуществления антитело представляет собой химерное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой фелинизированное антитело, то есть антитело, которое характеризуется аминокислотной последовательностью, которая была лишена иммуногенности так, чтобы при введении этого антитела субъекту-кошке не вырабатывались нейтрализующие антитела против него. Согласно

40 определенным вариантам осуществления антитело получено согласно первому аспекту настоящего изобретения. Как правило, константные домены тяжелой цепи антитела выбраны или модифицированы посредством замены или делеции аминокислоты так, чтобы константные домены не опосредовали последующие эффекторные функции.

Согласно определенным вариантам осуществления фелинизированное антитело или

45 связывающий фрагмент этого антитела содержит, состоит из или состоит, по существу, из легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85, 90, 95 или 99% идентичностью последовательности с ней. Согласно определенным

вариантам осуществления указанная идентичность распространяется на длину по меньшей мере приблизительно на 15 аминокислот, предпочтительно приблизительно на 20 аминокислот, более предпочтительно приблизительно на 25 аминокислот.

Согласно дополнительному или связанныму аспекту предусматривается

- 5 нейтрализующее фелинизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые способны специфично связываться с кошачьим фактором роста нервов (NGF), причем фелинизированное антитело или связывающий фрагмент антитела содержит, состоит из или состоит, по существу, из вариабельного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или аминокислотную
- 10 последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85, 90, 95 или 99% идентичностью последовательности с ней. Согласно определенным вариантам осуществления указанная идентичность распространяется на длину по меньшей мере приблизительно на 15 аминокислот, предпочтительно приблизительно на 20 аминокислот, более предпочтительно приблизительно на 25 аминокислот.

- 15 Как правило, вариабельный участок тяжелой цепи (VH) соединен с константным участком тяжелой цепи, который содержит по меньшей мере один константный домен иммуноглобулина. Согласно определенным вариантам осуществления константный участок тяжелой цепи получен из происходящего из кошки антитела, например, представленные под номерами доступа в Genbank ВАА32229.1 и ВАА32230.1. Как правило, указанные константные домены содержат СН1, СН2 и СН3 вместе с подходящим линкером (или "шарниром"), расположенным между указанными СН1 и СН2 доменами. Как правило, антитело против кошачьего NGF согласно настоящему изобретению содержит вариабельный домен тяжелой цепи соединенный с константным доменом, причем константный домен не приводит к опосредованному Fc участком
- 25 антитела последующим эффекторным функциям, таким как фиксация комплемента, ADCC, связывание Fc с рецептором или подобное.

- Согласно определенным вариантам осуществления антитело или связывающий фрагмент антитела содержит, состоит из или состоит, по существу, из тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85, 90, 95 или 99% идентичностью аминокислот с ней. В указанном варианте осуществления константные домены получены из антитела, происходящего из *Felis catus*, которое депонировано в Genbank под номером доступа ВАА32229.1.

- Согласно конкретным вариантам осуществления фелинизированное антитело или связывающий фрагмент, полученный из него, может содержать тяжелую цепь, в которой по меньшей мере один остаток в константном домене был замещен или удален с целью предотвращения гликозилирования этого остатка. Соответственно, согласно определенным дополнительным вариантам осуществления антитело или связывающий фрагмент антитела содержит, состоит из или состоит, по существу, из тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85, 90, 95 или 99% идентичностью аминокислот с ней. Согласно определенным вариантам осуществления указанная идентичность распространяется на длину по меньшей мере приблизительно на 15 аминокислот, предпочтительно приблизительно на 20 аминокислот, более предпочтительно приблизительно на 25 аминокислот. Согласно определенным вариантам осуществления подтип тяжелой цепи происходит из кошачьего антитела подтипа IgG2.

Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления константные

домены получены из антитела, происходящего из *Felis catus*, которое депонировано в Genbank под номером доступа BAA32230.1. Соответственно, согласно определенным дополнительным вариантам осуществления тяжелая цепь дополнительно фелинизированного антитела согласно настоящему изобретению содержит тяжелую

5 цепь, полученную из антитела, происходящего из *Felis catus*, которое депонировано в Genbank под номером доступа BAA32230.1. Указанное антитело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17. Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:17 можно модифицировать с замещением любых аминокислотных остатков, которые 10 могут подвергнуться гликозилированию. Соответственно, еще один дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения предусматривает фелинизированное антитело с тяжелой цепью, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85, 90, 95 или 99% идентичностью последовательности с ней. Согласно 15 определенным вариантам осуществления указанная идентичность распространяется на длину по меньшей мере приблизительно на 15 аминокислот, предпочтительно приблизительно на 20 аминокислот, более предпочтительно приблизительно на 25 аминокислот.

Согласно еще одному дополнительному или связанному аспекту настоящее

20 изобретение распространяется на фелинизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с кошачьим фактором роста нервов (NGF) и нейтрализуют его биологическую функцию, заключающуюся в связывании с рецептором NGF TrkA и рецептором NGF p75, причем фелинизированное антитело или связывающий фрагмент этого антитела содержит легкую цепь и тяжелую 25 цепь, в которых вариабельный домен легкой цепи (VL) содержит, состоит из или состоит, по существу, из аминокислотной последовательности, которая является идентичной или, главным образом, гомологичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 или последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 85, 90, 95 или 99% идентичностью аминокислот с ней, и в которых вариабельный домен тяжелой 30 цепи (VH) содержит, состоит из или состоит, по существу, из аминокислотной последовательности, которая является идентичной или, главным образом, гомологичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 или последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 85, 90, 95 или 98% идентичностью аминокислот с ней. Согласно определенным вариантам осуществления указанная идентичность 35 распространяется на длину по меньшей мере приблизительно на 15 аминокислот, предпочтительно приблизительно на 20 аминокислот, более предпочтительно приблизительно на 25 аминокислот.

Согласно определенным вариантам осуществления фелинизированное антитело или связывающий элемент содержит легкую цепь, которая содержит, состоит из или состоит,

40 по существу, из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 или последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85%, более предпочтительно 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 98% идентичностью аминокислот с ней. Согласно определенным вариантам осуществления указанная идентичность распространяется на длину по меньшей мере приблизительно на 15 аминокислот, 45 предпочтительно приблизительно на 20 аминокислот, более предпочтительно приблизительно на 25 аминокислот.

Согласно определенным вариантам осуществления фелинизированное антитело или связывающий элемент содержит тяжелую цепь, которая содержит, состоит из или

состоит, по существу, из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 17 или полипептида, характеризующегося аминокислотной последовательностью с по меньшей мере 85%, более предпочтительно 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 98% идентичностью с ней. Согласно определенным вариантам

5 осуществления указанная идентичность распространяется на длину по меньшей мере приблизительно на 15 аминокислот, предпочтительно приблизительно на 20 аминокислот, более предпочтительно приблизительно на 25 аминокислот.

Согласно определенным вариантам осуществления антитело может быть конъюгировано с по меньшей мере одной репортерной молекулой.

10 Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления по меньшей мере один остаток в по меньшей мере одном из константных доменов можно заменить или удалить с целью предотвращения гликозилирования этого остатка. Соответственно, согласно определенным дополнительным вариантам осуществления фелинанизированное антитело или связывающий фрагмент антитела содержит, состоит из или состоит, по 15 существу, из тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% и более предпочтительно по меньшей мере 98% идентичностью с ней. Согласно определенным вариантам осуществления указанная идентичность распространяется на длину по меньшей мере приблизительно на 15 аминокислот, предпочтительно 20

20 аминокислот, более предпочтительно приблизительно на 25 аминокислот.

Авторами настоящего изобретения, кроме того, был определен ряд каркасных участков (FR), которые можно комбинировать с гипервариабельными участками (CDR) с образованием фелинанизированных вариабельных доменов тяжелой и легкой цепи.

25 Каждый из доменов тяжелой и легкой цепи характеризуется 4 каркасными участками, обозначенными FR1, FR2, FR3 и FR4.

Молекула антитела может содержать вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий участки CDR1, CDR2 и CDR3 и связанные располагающиеся между ними каркасные участки. CDR вариабельного домена тяжелой цепи (VH) известны как HCDR, причем 30 эти CDR находятся в следующих положениях в соответствии с системой нумерации по Kabat: HCDR1 - остатки 31-35 по Kabat, HCDR2 - остатки 50-65 по Kabat, HCDR3 - остатки 95-102 по Kabat (Kabat EA et al. (1991) Sequences of proteins of immunological interest, 5th edition. Bethesda: US Department of Health and Human Services).

Более того, антитело дополнительно содержит вариабельный домен легкой цепи, 35 содержащий участки CDR1, CDR2 и CDR3 и связанные располагающиеся между ними каркасные участки. CDR вариабельного домена легкой цепи (VL) известны как LCDR, причем эти CDR находятся в следующих положениях в соответствии с системой нумерации по Kabat: LCDR1 - остатки 24-34 по Kabat, LCDR2 - остатки 50-56 по Kabat, LCDR3 - остатки 89-97 по Kabat.

40 Вариабельный домен легкой или тяжелой цепи содержит четыре каркасных участка, FR1, FR2, FR3 и FR4, расположенные между CDR в следующем порядке: FR1-CDR1-CDR2-CDR3-FR3-CDR3-FR4.

Согласно еще одному дополнительному аспекту настоящее изобретение 45 распространяется на антитело против NGF или его связывающий NGF-антитела фрагмент, причем антитело или связывающий фрагмент антитела содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий по меньшей мере одно из:

каркасного участка FR1, состоящего из или содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26,

каркасного участка FR2, состоящего из или содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27,

каркасного участка FR3, состоящего из или содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и

5 каркасного участка FR4, состоящего из или содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29,

и/или вариабельный участок тяжелой цепи, содержащего по меньшей мере одно из:

каркасного участка FR1, состоящего из или содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30,

10 каркасного участка FR2, состоящего из или содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31,

каркасного участка FR3, состоящего из или содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, и

каркасного участка FR4, состоящего из или содержащего аминокислотную

15 последовательность SEQ ID NO: 33.

Как правило, CDR легкой и тяжелой цепи происходят из антитела, которое характеризуется специфичностью связывания с NGF, предпочтительно кошачьим NGF.

Согласно определенным вариантам осуществления вариабельный домен легкой цепи, содержащий указанный по меньшей мере один описанный выше каркасный

20 участок, соединен с происходящим из кошки константным доменом легкой цепи, как правило, с константным доменом каппа легкой цепи, но необязательно с константным доменом лямбда легкой цепи. Согласно определенным вариантам осуществления указанная легкая цепь содержит участок FR1, характеризующийся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 26, участок FR2 с аминокислотной

25 последовательностью SEQ ID NO: 27, участок FR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28 и участок FR4 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29 или каркасный участок с аминокислотной последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 85, 90, 95 или 98% идентичностью последовательности с вышеизложенными. Согласно определенным

30 вариантам осуществления указанная идентичность распространяется на длину по меньшей мере приблизительно на 5 аминокислот, предпочтительно приблизительно 10 аминокислот.

Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий по меньшей мере один из каркасных участков,

35 описанных выше, соединен по меньшей мере с одним происходящим из кошки константным доменом тяжелой цепи. Согласно определенным вариантам осуществления аминокислотная последовательность константного домена не содержит какие-либо посттрансляционные модификации, или ее можно модифицировать с удалением любого или всех остатков, которые могут подвергаться N- или O-гликозилированию, так, чтобы

40 константные домены были агликозилированными. Согласно определенным вариантам осуществления тяжелая цепь содержит участок FR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30, участок FR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31, участок FR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32 и участок FR4 с аминокислотной

45 последовательностью SEQ ID NO: 33 или каркасный участок с аминокислотной последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 85, 90, 95 или 98% идентичностью последовательности с вышеизложенными. Согласно определенным вариантам осуществления указанная идентичность распространяется на длину по

меньшей мере приблизительно на 5 аминокислот, предпочтительно приблизительно 10 аминокислот.

Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления в каркасных участках, описанных в настоящем документе, могут быть выполнены модификации.

5 То есть авторами настоящего изобретения было выявлено, что в отношении некоторых остатков в каждом каркасном участке существует выбор аминокислот для указанного положения. Важно, чтобы эти модификации в каркасном участке не приводили в результате к конформационным изменениям в связанных гипервариабельных участках, поскольку это может изменять специфичность связывания и/или аффинность

10 получаемого в результате антитела. Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретение распространяется на введение 2 или более аминокислотных замен в аминокислотные остатки каркасных участков вариабельного участка легкой цепи и/или вариабельного участка тяжелой цепи.

Соответственно, согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретение распространяется на полипептиды, такие как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат вариабельный домен легкой цепи с участком FR1, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, которая была модифицирована одной или несколькими из аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из следующих: D1 представляет собой E или N, 12 20 представляет собой V, R или T, E3 представляет собой V или M, M4 представляет собой L или I, S7 представляет собой T, S10 представляет собой F, S12 представляет собой P или A, T14 представляет собой I или A, E17 представляет собой D, S18 представляет собой P или A, V19 представляет собой A, 121 представляет собой F, и S22 представляет собой F.

25 Согласно определенным вариантам осуществления участок FR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, можно модифицировать одной или несколькими из аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из следующих: Y2 представляет собой F, L3 представляет собой F или R, K5 представляет собой R, R8 представляет собой Q, L12 представляет собой R, 114 представляет собой M, и Y15 представляет собой H или A.

Согласно определенным вариантам осуществления участок FR3 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, можно модифицировать одной или несколькими из аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из следующих: G1 представляет собой R, F6 представляет собой I, S7 представляет собой T, T13 представляет собой A или S, T16 представляет собой I или A, K18 представляет собой R или T, S20 представляет собой A, G или T, R21 представляет собой G, V22 представляет собой M, Q23 представляет собой E, T24 представляет собой A, V или P, E25 представляет собой D, V29 представляет собой I, H или L, и F31 представляет собой Y.

40 Согласно определенным вариантам осуществления участок FR4 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, может быть модифицирован одной или несколькими из аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из следующих: F1 представляет собой S, Q3 представляет собой P, K6 представляет собой H, Q, E, S или T, E8 представляет собой D, L9 представляет собой V, I или M, и 45 K10 представляет собой R, D или T.

Согласно определенным вариантам осуществления участок FR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, можно модифицировать одной или несколькими из аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей

из следующих: Q1 представляет собой D или E, V2 представляет собой E, Q3 представляет собой L или R, L4 представляет собой V, V5 представляет собой M, E6 представляет собой Q или D, A9 представляет собой G, EЮ представляет собой D или N, LI 1 представляет собой V или R, V12 представляет собой R или K, Q13 представляет собой K, T, E, N или R, P14 представляет собой T, G15 представляет собой E, E16 представляет собой G, A или T, S17 представляет собой A, L18 представляет собой V, R19 представляет собой K или E, L20 представляет собой I или P, T21 представляет собой F или S, A23 представляет собой K, V или Q, A24 представляет собой T или D, и G26 представляет собой A.

10 Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления участок FR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, можно модифицировать одной или несколькими из аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из следующих: V2 представляет собой L, F или I, R3 представляет собой C или H, A5 представляет собой S, V или T, G7 представляет собой A, E или S, K8 представляет собой Q или E, L10 представляет собой F или P, E11 представляет собой Q, W12 представляет собой C или L, M13 представляет собой V или I, и G14 представляет собой A или S.

15

Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления участок FR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, можно модифицировать одной или несколькими из аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из следующих: R1 представляет собой Q или K, L2 представляет собой F, T3 представляет собой I, 14 представляет собой L, M или V, T5 представляет собой S, R6 представляет собой A, T, K, G или V, T8 представляет собой N, D, A или S, S9 представляет собой A, D или T, K10 представляет собой T, E, Q, N или R, N11 25 представляет собой D или K, T12 представляет собой I или A, V13 представляет собой A, L или G, F14 представляет собой Y, V, A, S или W, L15 представляет собой M, Q16 представляет собой E, D, H или V, M17 представляет собой L, H18 представляет собой N, S, T, D, G или R, S19 представляет собой N, Q21 представляет собой R, K или T, S22 представляет собой T, I, A или V, E23 представляет собой A, T, D, G или S, A26 30 представляет собой G или S, T27 представляет собой V, M, I или A, Y28 представляет собой H, Y29 представляет собой H или F, и A31 представляет собой T, V, G, L, I или M.

Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления участок FR4 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, можно модифицировать одной или несколькими из аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из следующих: W1 представляет собой R, C или L, G2 представляет собой A, Q3 представляет собой H, R, P или V, G4 представляет собой D, T5 представляет собой A или V, T6 представляет собой L, I, Q, M или S, V7 представляет собой I, T8 представляет собой A, I или R, V9 представляет собой G, S10 представляет собой P, и 40 A11 представляет собой S или Q.

Согласно определенным вариантам осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело. Как правило, антитело представляет собой фелинизированное антитело.

Согласно еще одному дополнительному аспекту настоящее изобретение 45 распространяется на антитело против NGF или его связывающий NGF-антитела фрагмент, причем антитело или связывающий фрагмент антитела содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий по меньшей мере одно из:

каркасного участка FR1, состоящего из или содержащего аминокислотную

последовательность SEQ ID NO:8,

каркасного участка FR2, состоящего из или содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9,

каркасного участка FR3, состоящего из или содержащего аминокислотную

5 последовательность SEQ ID NO: 10, и

каркасного участка FR4, состоящего из или содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11,

и/или вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий по меньшей мере одно из:

каркасного участка FR1, состоящего из или содержащего аминокислотную

10 последовательность SEQ ID NO: 12,

каркасного участка FR2, состоящего из или содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13,

каркасного участка FR3, состоящего из или содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и

15 каркасного участка FR4, состоящего из или содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

Как правило, CDR легкой и тяжелой цепи происходят из антитела, которое характеризуется специфичностью связывания с NGF, предпочтительно кошачьим NGF.

Как правило, получение фелинанизированных антител против кошачьего NGF по 20 настоящему изобретению не требует введения обратных мутаций в каркасные участки вариабельных доменов легкой или тяжелой цепи.

Согласно определенным вариантам осуществления вариабельный домен легкой цепи, содержащий указанный по меньшей мере один описанный выше каркасный участок, соединен с происходящим из кошки константным доменом легкой цепи, как

25 правило, с константным доменом каппа легкой цепи, но необязательно с константным доменом лямбда легкой цепи. Согласно определенным вариантам осуществления указанная легкая цепь содержит участок FR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, участок FR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, участок FR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10 и

30 участок FR4 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11 или каркасный участок с аминокислотной последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 85, 90, 95 или 98% идентичностью последовательности с вышеизложенными.

Согласно определенным вариантам осуществления указанная идентичность распространяется на длину по меньшей мере приблизительно на 5 аминокислот,

35 предпочтительно приблизительно 10 аминокислот.

Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий по меньшей мере один из каркасных участков, описанных выше, соединен по меньшей мере с одним происходящим из кошки константным доменом тяжелой цепи. Согласно определенным вариантам осуществления

40 аминокислотная последовательность константного домена не содержит каких-либо посттрансляционных модификаций, или ее можно модифицировать с удалением любого или всех остатков, которые могут подвергнуться N - или O-гликозилированию, так, чтобы константные домены были агликозилизованными. Согласно определенным вариантам осуществления тяжелая цепь содержит участок FR1 с аминокислотной

45 последовательностью SEQ ID NO: 12, участок FR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13, участок FR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 14 и участок FR4 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15 или каркасный участок с аминокислотной

последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 85, 90, 95 или 98% идентичностью последовательности с вышеизложенными. Согласно определенным вариантам осуществления указанная идентичность распространяется на длину по меньшей мере приблизительно на 5 аминокислот, предпочтительно приблизительно 10

5 аминокислот.

Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления в каркасных участках, описанных в настоящем документе, могут быть выполнены модификации. То есть авторами настоящего изобретения было выявлено, что в отношении некоторых остатков в каждом каркасном участке существует выбор аминокислот для указанного 10 положения. Важно, чтобы эти модификации в каркасном участке не приводили в результате к конформационным изменениям в связанных гипервариабельных участках, поскольку это может изменять специфичность связывания и/или аффинность получаемого в результате антитела. Согласно определенным вариантам осуществления настояще изобретение распространяется на введение 2 или более аминокислотных 15 замен в аминокислотные остатки каркасных участков вариабельного участка легкой цепи и/или вариабельного участка тяжелой цепи.

Соответственно, согласно определенным дополнительным вариантам осуществления настояще изобретение распространяется на полипептиды, такие как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат вариабельный домен легкой цепи 20 с участком FR1, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, которая была модифицирована замещением аминокислотного остатка I в положении 21 (121) аминокислотным остатком A.

Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления участок FR3 легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25 10, можно модифицировать замещением аминокислотного остатка F в положении 31 (F31) аминокислотным остатком Y.

Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления участок FR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, можно 30 модифицировать одной или несколькими из следующих аминокислотных замен (причем аминокислоты обозначены их однобуквенным кодом): G9 может представлять собой A, D10 может представлять собой E, G15 может представлять собой E, G16 может представлять собой A, R19 может представлять собой K, A23 может представлять собой V или M. Более того, Q1 может представлять собой D или H, V2 может представлять собой E, Q3 может представлять собой L, E6 может представлять собой Q, G9 может 35 представлять собой R, L11 может представлять собой V, V12 может представлять собой R или S, Q13 может представлять собой K, L18 может представлять собой V, R19 может представлять собой S, L20 может представлять собой I, T21 может представлять собой F или S, A23 может представлять собой K, A24 может представлять собой T, F27 может представлять собой Y или L, S28 может представлять собой T или N, L29 может 40 представлять собой F или V, и T30 может представлять собой S, G или R.

Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления участок FR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13, можно 45 модифицировать одной или несколькими из следующих аминокислотных замен: V2 представляет собой L, W, F или A, R3 представляет собой C, A5 представляет собой P или T, G7 представляет собой E или A, K8 представляет собой Q или T, L10 представляет собой F, E11 представляет собой Q, W12 представляет собой E или T, M13 представляет собой V или L, и G14 представляет собой A, T или S.

Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления участок FR3

тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, можно модифицировать одной или несколькими из следующих аминокислотных замен:

F2 представляет собой L, S5 представляет собой T, N8 представляет собой T, A9 представляет собой S, N11 представляет собой D, L13 представляет собой A, K21

5 представляет собой R, и T22 представляет собой S. Более того, T3 представляет собой A, 14 представляет собой L или V, R6 представляет собой A или I, N8 представляет собой S, A9 представляет собой G или T, K10 представляет собой T, R, G или Q, T12 представляет собой A, Y14 представляет собой D или S, L15 представляет собой M, Q16 представляет собой E, L или R, M17 представляет собой L или T, N18 представляет собой S, D или T, S19 представляет собой I, N, R или T, K21 представляет собой G или T, T22 представляет собой P или A, E23 представляет собой T, A или D, T25 представляет собой A, T27 представляет собой V или M, Y29 представляет собой C или F, C30 представляет собой R, A31 представляет собой G, I, T, S или V, и R32 представляет собой K, S, T, I, V, P, N или G.

15 Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления участок FR4 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, можно модифицировать одной или несколькими из следующих аминокислотных замен: L6 представляет собой I. Более того, W1 может представлять собой R, G2 может представлять собой R, Q3 может представлять собой P, V, H или R, T5 может 20 представлять собой A, V, I или S, L6 может представлять собой Q, S10 может представлять собой T, и S11 может представлять собой Q, A или P.

Согласно определенным вариантам осуществления вышеизложенных аспектов настоящего изобретения антитело представляет собой моноклональное антитело. Как правило, антитело представляет собой фелинизированное антитело.

25 Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления вышеизложенных аспектов настоящего изобретения фелинизированное нейтрализующее NGF антитело согласно настоящему изобретению или связывающий фрагмент, полученный из него, специфично связывается с кошачьим NGF (фактор роста нервов) со связывающей способностью, характеризующейся равновесной константой

30 диссоциации (K_D) 1×10^{-8} или менее. Более того, предпочтительно, чтобы фелинизированные антитела согласно настоящему изобретению не являлись перекрестно-реактивными с любыми другими связывающими эпитопами, присутствующими у кошек (отличающимися от NGF), и, кроме того, чтобы при введении кошке не образовывались нейтрализующие антитела против антител согласно 35 настоящему изобретению. Более того, предпочтительно, чтобы константные домены антитела не опосредовали какие-либо последующие эффекторные функции, включающие без ограничения: связывание и активацию комплемента, ADCC и связывание Fc с рецептором и его активацию.

40 Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления в антителах согласно настоящему изобретению можно выполнить модификации в отношении аминокислотной последовательности константных участков тяжелой цепи. Указанная модификация может включать добавление, замещение или удаление одного или нескольких аминокислотных остатков. Указанные изменения аминокислот, как правило, осуществляют с целью модификации функциональных характеристик антитела.

45 Например, модификация аминокислот можно осуществить для ограничения последующих эффекторных функций, опосредованных константными доменами антитела, например, для ограничения способности антитела связываться с Fc рецепторами, активировать комплемент или индуцировать ADCC. Более того, в

шарнирном участке константного домена тяжелой цепи можно выполнить модификации с тем, чтобы модифицировать период полувыведения антитела из кровотока при введении кошке.

Согласно определенным вариантам осуществления антитело или его

5 антигенсвязывающий фрагмент не опосредуют последующие эффекторные функции. Как правило, антитело или связывающий фрагмент характеризуется подтипом HC2 кошачьей тяжелой цепи.

Согласно определенным вариантам осуществления фелинизированное антитело получают в соответствии со способом получения антитела согласно первому аспекту 10 настоящего изобретения.

Настоящее изобретение распространяется на фрагменты антитела, которые связываются с кошачьим NGF и ограничивают его способность связываться с рецепторами p75 или TrkA.

Согласно определенным вариантам осуществления связывающий фрагмент антитела 15 может содержать последовательности тяжелой цепи и легкой цепи согласно настоящему изобретению, соединенные гибким линкером с образованием одноцепочечного антитела.

Одноцепочечный Fv (scFv) содержит VH и VL домен. VH и VL домены связаны с 20 образованием сайта связывания мишени. Эти 2 домена ковалентно связаны пептидным линкером. Молекула scFv может иметь вид VL-линкер-VH в случаях, когда вариабельный домен легкой цепи требуется на N-конце, или VH-линкер-VL в случаях, когда VH домен требуется на N-конце.

Соответственно, согласно определенным дополнительным вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент одноцепочечного Fv (scFv) антитела. Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления 25 связывающий фрагмент антитела выбран из группы, состоящей, без ограничения, из Fab фрагмента антитела, Fab' фрагмента антитела, F(ab')2 фрагмента антитела, Fv фрагмента антитела и scFv фрагмента антитела и подобного.

Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления настоящее изобретение предусматривает мультиспецифичные или мультивалентные антитела, 30 содержащие антитело против кошачьего NGF или связывающий фрагмент, полученный из него, согласно настоящему изобретению, связанные или соединенные с дополнительными антителами с различными специфичностями связывания для применения в комбинированной терапии. Мультиспецифичное антитело содержит по меньшей мере одно фелинизированное или химерное антитело или связывающий 35 фрагмент, полученный из него, которые специфично связываются с первым эпитопом на кошачьем NGF, и по меньшей мере один сайт связывания, специфичный к другому эпитопу, присутствующему на кошачьем NGF, или к отличающемуся антигену.

Мультивалентное антитело содержит антитела или связывающие фрагменты антитела, 40 которые характеризуются специфичностью связывания с тем же эпитопом на кошачьем NGF. Соответственно, согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение распространяется на антитело-слитый белок, содержащий четыре или более Fv участков или Fab участков фелинизированных или химерных антител согласно настоящему изобретению. Еще один дополнительный вариант осуществления распространяется на антитело-слитый белок, содержащий один или несколько Fab 45 участков, происходящих из антитела согласно настоящему изобретению, вместе с одним или несколькими Fab или Fv участками из антител, специфичных к кошачьему NGF.

Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления настоящее изобретение распространяется на биспецифичное антитело, в котором антитело или

его связывающий фрагмент согласно настоящему изобретению связано с вторичным антителом или его фрагментом, который характеризуется связыванием, специфичным в отношении вторичной мишени, причем указанная мишень не является кошачьим NGF. Предпочтительно указанная вторичная мишень содействует предотвращению

5 опосредованной NGF передачи сигнала через рецепторы p75 или TrkA. Такие мультивалентные, биспецифичные или мультиспецифичные антитела можно получить с помощью ряда методов с использованием рекомбинации, которые будут хорошо известны специалисту в настоящей области техники.

Еще один дополнительный аспект настоящего изобретения предусматривает

10 фелинизированное нейтрализующее антитело против нейротрофина, содержащее:

(i) вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 23 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью с ней, и/или вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 22 или

15 последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью с ней, или

(ii) химерное антитело, имеющее легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 и/или тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

20 Согласно определенным вариантам осуществления фелинизированное антитело имеет легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 25 и/или тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 24. Согласно определенным вариантам осуществления нейротрофин представляет собой кошачий фактор роста нервов (NGF).

25 Еще один дополнительный аспект настоящего изобретения предусматривает способ лечения, подавления или ослабления боли у кошки, включающий стадии:

- получения терапевтически эффективного количества антитела против кошачьего NGF или его антигенсвязывающего фрагмента, в которых антитело представляет собой фелинизированное или химерное антитело по настоящему изобретению или его

30 связывающий фрагмент, и

- введения его кошке, нуждающейся в этом.

Согласно определенным вариантам осуществления фелинизированное антитело содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 23 или последовательность, которая

35 характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью с ней, и/или вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 22 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% гомологией последовательности с ней. Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления фелинизированное антитело содержит

40 легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO 25 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с ней, и/или тяжелую цепь, которая содержит, состоит из или состоит, по существу, из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO 24 или последовательности, характеризующейся по меньшей мере 85% и более 45 предпочтительно по меньшей мере 98% идентичностью аминокислот с ней.

Согласно определенным вариантам осуществления фелинизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой любой из таковых, предусматриваемых в вышеизложенных аспектах настоящего изобретения.

Согласно определенным вариантам осуществления химерное антитело содержит легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 и/или тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2.

Согласно определенным вариантам осуществления боль представляет собой

5 нейропатическую боль. В частности, боль может представлять собой послеоперационную боль или боль после хирургического вмешательства. Послеоперационная боль может возникать после любой операционной процедуры, которая у кошек может включать без ограничения ортопедическую операцию, операцию на мягких тканях, процедуры овариогистерэктомии, процедуры кастрации и подобное. Согласно определенным 10 дополнительным вариантам осуществления боль представляет собой хроническую боль, связанную с раком или раковым состоянием (онкологическую боль). Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления боль связана с или возникает в результате артрита, в том числе иммуноопосредованного полиартрита, воспаления, зуда, ревматоидного артрита или остеоартрита.

15 Согласно еще одному дополнительному аспекту настоящего изобретения предусматривается способ лечения артрита у субъекта-кошки, включающий стадии:

- получения терапевтически эффективного количества антитела против кошачьего NGF по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента и
- введения его кошке, нуждающейся в этом.

20 Согласно одному варианту осуществления антитело против кошачьего NGF представляет собой химерное антитело, в котором легкая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и/или тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

Согласно определенным вариантам осуществления антитело представляет собой 25 фелинизированное антитело. Согласно определенным вариантам осуществления фелинизированное антитело содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO 23 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью с ней, и/или вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную 30 последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO 22 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% гомологией последовательности с ней.

Согласно определенным вариантам осуществления артрит включает состояния, выбранные из группы, состоящей из иммуноопосредованного полиартрита, 35 ревматоидного артрита, остеоартрита и связанных состояний.

Как правило, лечение артрита включает ослабление, подавление, снижение, замедление или задержку появления боли, связанной с или относящейся к артритическому состоянию.

Дополнительный аспект настоящего изобретения предусматривает способ лечения 40 состояния, вызванного, связанного с или приводящего в результате к повышенной экспрессии кошачьего NGF или повышенной чувствительности к NGF у субъекта-кошки, включающий стадии:

- получения терапевтически эффективного количества антитела против кошачьего NGF согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента и
- введения его кошке, нуждающейся в этом.

Согласно еще одному дополнительному аспекту настоящего изобретения предусматривается способ лечения индуцируемой к пролиферации NGF опухоли у кошки и состояний, связанных с ней, включающий стадии:

- получения терапевтически эффективного количества антитела против кошачьего NGF согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента и - введения его кошке, нуждающейся в этом.

Согласно определенным вариантам осуществления опухоль представляет собой

5 остеосаркому. Согласно определенным вариантам осуществления опухоль индуцируется к пролиферации аутокринным или паракринным NGF.

Согласно определенным вариантам осуществления вышеизложенные способы согласно настоящему изобретению дополнительно включают стадию, на которой совместно вводят по меньшей мере одно дополнительно средство, которое может 10 усиливать и/или дополнять терапевтический эффект антитела против NGF согласно настоящему изобретению. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить совместно с по меньшей мере одним анальгезирующим средством, NSAID, опиоидом, кортикостероидом или стероидом.

Примеры подходящих анальгезирующих средств включают без ограничения

15 буторфанол, бупренорфин, фентанил, флуниксин меглумин, мерпидин, морфин, налбуфин и их производные. Подходящие NSAID включают без ограничения ацетаминофен, ацетилсалициловую кислоту, карпрофен, этодолак, кетопрофен, мелоксикам, фирококсиб, робенакоксиб, деракоксиб и подобное.

Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления по меньшей

20 мере одно дополнительное средство может представлять собой терапевтически активное средство, которое может представлять собой одно или несколько из группы, выбранной из антибиотика, противогрибкового средства, антипротозойного средства, противовирусного средства или подобных терапевтических средств. Более того, по меньшей мере одно дополнительное средство может представлять собой ингибитор

25 медиатора(медиаторов) воспаления, такой как антагонист рецептора PGE, иммунодепрессивное средство, такое как циклоспорин, или противовоспалительный глюкокортикоид. В определенных дополнительных аспектах по меньшей мере одно дополнительное средство может представлять собой средство, которое применяют для лечения когнитивной дисфункции или нарушения, такого как потеря памяти или

30 связанные состояния, которые могут становиться все более распространенными у старых кошек. Кроме того, по меньшей мере одно дополнительное средство может представлять собой противогипертоническое средство или другое соединение, применяемое для лечения сердечно-сосудистой дисфункции, например для лечения гипертензии, ишемии миокарда, застойной сердечной недостаточности и подобного.

35 Кроме того, по меньшей мере одно дополнительное средство можно выбрать из группы, состоящей из диуретического средства, сосудорасширяющего средства, антагониста бета-адренергических рецепторов, ингибитора ангиотензин-II-превращающего фермента, блокатора кальциевых каналов и ингибитора HMG-СоА-редуктазы.

Согласно определенным вариантам осуществления антитело или

40 антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению вводят кошке, нуждающейся в этом, в ходе вышеизложенных способов в дозе, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,01 мг/кг массы тела до приблизительно 10 мг/кг массы тела, в частности от 0,03 мг/кг массы тела до приблизительно 3 мг/кг массы тела.

Согласно различным дополнительным аспектам настоящее изобретение

45 распространяется на композицию, содержащую антитело или его связывающий фрагмент согласно любому вышеизложенному аспекту настоящего изобретения. Согласно определенным вариантам осуществления композиция дополнительно содержит по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

Еще один дополнительный аспект настоящего изобретения предусматривает фармацевтическую композицию для лечения боли или состояния, приводящего в результате или вызванного хронической болью у кошки, содержащую фармацевтически эффективное количество фелинанизированного антитела против кошачьего NGF согласно настоящему изобретению вместе с по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым носителем, вспомогательным веществом или разбавителем.

Согласно определенным вариантам осуществления композиция дополнительно содержит по меньшей мере одно анальгезирующее средство, NSAID, опиоид, кортикостероид или стероид.

Согласно различным дополнительным аспектам настоящее изобретение распространяется на выделенную нуклеиновую кислоту, которая кодирует антитело или связывающие фрагменты антитела согласно настоящему изобретению.

Соответственно, еще один дополнительный аспект настоящего изобретения предусматривает выделенную нуклеиновую кислоту, которая кодирует антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вышеизложенных аспектов настоящего изобретения.

Согласно определенным вариантам осуществления полинуклеотид кодирует вариабельный домен легкой цепи фелинанизированного антитела против кошачьего NGF или фрагмента антитела с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 23 или полную легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 25. Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления полинуклеотид кодирует вариабельный домен тяжелой цепи фелинанизированного антитела против кошачьего NGF или фрагмента антитела с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 22 или тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 24.

Согласно определенным вариантам осуществления выделенная нуклеиновая кислота дополнительно кодирует одну или несколько регуляторных последовательностей, функционально связанных с ней.

Согласно дополнительному аспекту предусматривается вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид, кодирующий вариабельный домен тяжелой и/или легкой цепи или константный домен тяжелой и/или легкой цепи согласно настоящему изобретению. Согласно определенным вариантам осуществления вектор экспрессии дополнительно содержит одну или несколько регуляторных последовательностей.

Согласно определенным вариантам осуществления вектор представляет собой плазмидный или ретровирусный вектор.

Еще один дополнительный аспект предусматривает клетку-хозяина, включающую вектор экспрессии согласно вышеизложенному аспекту настоящего изобретения.

Дополнительный аспект настоящего изобретения предусматривает клетку-хозяина, которая вырабатывает антитело согласно любому из вышеизложенных аспектов настоящего изобретения.

Еще один дополнительный аспект настоящего изобретения предусматривает способ получения фелинанизированного нейтрализующего антитела против кошачьего NGF, включающий стадию, на которой культивируют клетку-хозяина согласно вышеизложенному аспекту настоящего изобретения с обеспечением экспрессии клеткой фелинанизированного нейтрализующего антитела против кошачьего NGF.

Еще один дополнительный аспект настоящего изобретения предусматривает способ получения фелинанизированного антитела против кошачьего NGF согласно настоящему

изобретению, включающий стадии, на которых экспрессируют один или несколько из полинуклеотидов / нуклеиновых кислот или векторов согласно вышеизложенным аспектам настоящего изобретения, которые экспрессируют легкие и/или тяжелые цепи антитела согласно настоящему изобретению в подходящей клетке-хозяине, извлекают 5 экспрессированные полипептиды, которые могут экспрессироваться вместе в клетке-хозяине, или отдельно в различных клетках-хозяевах, и выделяют антитела.

Еще один дополнительный аспект настоящего изобретения предусматривает способ 10 лечения, ослабления или подавления боли у кошки, включающий стадию, на которой вводят кошке эффективное количество полинуклеотида согласно любому из вышеизложенных аспектов настоящего изобретения.

Еще один дополнительный аспект настоящего изобретения предусматривает антитело 15 или связывающий фрагмент антитела согласно любому из вышеизложенных аспектов настоящего изобретения, или фармацевтическую композицию согласно вышеизложенным аспектам настоящего изобретения, или нуклеиновую кислоту или вектор, содержащий ее, согласно любому из вышеизложенных аспектов настоящего изобретения для применения при лечении, ослаблении или предупреждении боли у кошки.

Согласно определенным вариантам осуществления боль представляет собой острую 20 боль. Согласно определенным вариантам осуществления боль представляет собой хроническую боль. Более того, боль может представлять собой послеоперационную боль или боль, возникающую в результате любой операционной процедуры, которая у кошек может включать без ограничения ортопедическую операцию, операцию на мягких тканях, процедуры овариогистерэктомии, процедуры кастрации и подобное. Согласно 25 определенным дополнительным вариантам осуществления боль представляет собой хроническую боль, связанную с раком или раковым состоянием. Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления боль связана с или возникает в результате артрита или артритического состояния, которое включает полиартрит, воспаление, зуд, ревматоидный артрит и остеоартрит.

Еще один дополнительный аспект настоящего изобретения предусматривает антитело 30 или связывающий фрагмент антитела согласно любому из вышеизложенных аспектов настоящего изобретения, или фармацевтическую композицию согласно вышеизложенным аспектам настоящего изобретения, или нуклеиновую кислоту или вектор, содержащий ее, согласно любому из вышеизложенных аспектов настоящего изобретения для применения при лечении остеоартрита и/или ревматоидного артрита.

Еще один дополнительный аспект настоящего изобретения предусматривает антитело 35 или связывающий фрагмент антитела согласно любому из вышеизложенных аспектов настоящего изобретения или фармацевтическую композицию согласно вышеизложенным аспектам настоящего изобретения, или нуклеиновую кислоту или вектор, содержащий ее, согласно любому из вышеизложенных аспектов настоящего изобретения для применения при лечении индуцируемой к пролиферации NGF опухоли у субъекта-кошки 40 и состояний, связанных с ней, в частности, остеосаркомы. Согласно определенным вариантам осуществления опухоль индуцируется к пролиферации аутокринным или паракринным NGF.

Еще один дополнительный аспект настоящего изобретения предусматривает 45 применение антитела или связывающего фрагмента антитела согласно любому из вышеизложенных аспектов настоящего изобретения или фармацевтической композиции согласно вышеизложенным аспектам настоящего изобретения, или нуклеиновой кислоты или вектора, содержащего ее, согласно любому из вышеизложенных аспектов

настоящего изобретения при получении лекарственного препарата для лечения или предупреждения боли у кошки.

Согласно определенным вариантам осуществления боль представляет собой острую боль. В дополнительных вариантах осуществления боль представляет собой

5 хроническую боль. Более того, боль может представлять собой послеоперационную боль или боль, возникающую в результате любой операционной процедуры, которая у кошек может включать без ограничения ортопедическую операцию, операцию на мягких тканях, процедуры овариогистерэктомии, процедуры кастрации и подобное. Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления боль представляет

10 собой хроническую боль, связанную с раком или раковым состоянием. Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления боль связана с или возникает в результате воспаления, зуда, ревматоидного артрита или остеоартрита.

Еще один дополнительный аспект настоящего изобретения предусматривает применение антитела или связывающего фрагмента антитела согласно любому из 15 вышеизложенных аспектов настоящего изобретения, или фармацевтической композиции согласно вышеизложенным аспектам настоящего изобретения, или нуклеиновой кислоты или вектора, содержащего ее, согласно любому из вышеизложенных аспектов настоящего изобретения при получении лекарственного препарата для лечения, подавления, ослабления или предупреждения ревматоидного артрита или остеоартрита 20 у кошки.

Еще один дополнительный аспект настоящего изобретения предусматривает применение антитела или связывающего фрагмента антитела согласно любому из вышеизложенных аспектов настоящего изобретения, или фармацевтической композиции согласно вышеизложенным аспектам настоящего изобретения, или нуклеиновой кислоты 25 или вектора, содержащего ее, согласно любому из вышеизложенных аспектов настоящего изобретения при получении лекарственного препарата для лечения индуцируемой к пролиферации NGF опухоли у кошки и состояний, связанных с ней, в частности, остеосаркомы. Согласно определенным вариантам осуществления опухоль индуцируется к пролиферации аутокринным или паракринным NGF.

Согласно еще одному дополнительному аспекту предусматривается клеточная линия, или клетка, происходящая из нее или являющаяся ее потомком, которая вырабатывает 30 нейтрализующие моноклональные антитела против кошачьего NGF или их фрагменты согласно настоящему изобретению. Антитела могут представлять собой фелинизированные или химерные антитела.

Еще один дополнительный аспект настоящего изобретения предусматривает набор 35 для лечения боли у кошек или для лечения состояния, связанного с болью, или для лечения, ослабления или подавления боли, связанной с остеоартритом, ревматоидным артритом или полиартритом, содержащий антитело против кошачьего NGF или связывающий фрагмент согласно любому из вышеизложенных аспектов настоящего 40 изобретения и инструкции по его применению.

Еще один дополнительный аспект настоящего изобретения предусматривает 45 диагностический набор для выявления моноклонального антитела против кошачьего NGF в жидкостях *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* для применения при определении концентрации указанного антитела. Набор может содержать любое из антител согласно настоящему изобретению или его связывающий фрагмент. Набор может содержать инструкции по его применению.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1А представляет собой график, показывающий связывание химерного

кошачьего-крысиного антитела с кошачьим NGF. На фиг. 1 В показан график, указывающий на связывание химерного кошачьего-крысиного антитела с мышевым NGF.

На фиг. 2А показано, что кошачье-крысиное химерное антитело может быть очищено с использованием белка А. На фиг. 2 В показано изображение геля, полосы на котором указывают как на тяжелую, так и на легкую цепи химерного антитела.

Фиг. 3А представляет собой график, показывающий связывание фелинлизированного антитела с кошачьим NGF. На фиг. 3В показан график, указывающий на связывание фелинлизированного антитела с мышевым NGF.

На фиг. 4А показано, что фелинлизированное антитело может быть очищено с использованием белка А. На фиг. 4В показано изображение геля, полосы на котором указывают как на тяжелую, так и на легкую цепи фелинлизированного антитела.

Фиг. 5 представляет собой график, показывающий подавление индуцируемой NGF пролиферации TF-1 клеток фелинлизированным антителом против кошачьего NGF.

На фиг. 6 представлен график, показывающий осаждение комплемента, вызванное захваченными антигенами фелинлизированными антителами.

На фиг. 7 показана аминокислотная последовательность легкой цепи химерного кошачьего-крысиного антитела согласно настоящему изобретению, в том числе лидерную последовательность и двойной стоп-кодон на конце последовательности (SEQ ID NO: 20). Происходящие из крысы остатки в вариабельном домене показаны жирным шрифтом.

Фиг. 8 показана аминокислотная последовательность тяжелой цепи химерного кошачьего-крысиного антитела согласно настоящему изобретению, в том числе лидерную последовательность и двойной стоп-кодон на конце последовательности (SEQ ID NO: 21). Происходящие из крысы остатки в вариабельном домене показаны жирным шрифтом.

На фиг. 9 показаны аминокислотные остатки вариабельного домена легкой цепи (SEQ ID NO: 3) фелинлизированного антитела согласно настоящему изобретению.

Остатки, содержащие остатки 3 CDR (CDR1, CDR2 и CDR3), выделены подчеркиванием. Звездочками указаны различия по остатку с соответствующим остатком в крысином антителе альфаD11 против мышевого NGF. Нумерация остатков соответствует таковой по Kabat.

На фиг. 10 показаны аминокислотные остатки вариабельного домена тяжелой цепи (SEQ ID NO: 4) фелинлизированного антитела согласно настоящему изобретению. Остатки, содержащие остатки 3 CDR (CDR1, CDR2 и CDR3), выделены подчеркиванием.

Звездочками указаны различия по остатку с соответствующим остатком в крысином антителе альфаD11 против мышевого NGF. Нумерация остатков соответствует таковой по Kabat.

На фиг. 11 показана аминокислотная последовательность легкой цепи фелинлизированного антитела согласно настоящему изобретению (SEQ ID NO: 5), в которой выделенные жирным шрифтом остатки представляют собой аминокислотные остатки вариабельного домена, и следующие остатки представляют собой константный домен легкой цепи.

На фиг. 12 показана аминокислотная последовательность тяжелой цепи фелинлизированного антитела согласно настоящему изобретению (SEQ ID NO: 6), в которой выделенные жирным шрифтом остатки представляют собой аминокислотные остатки вариабельного домена, и следующие остатки представляют собой остатки константного домена.

На фиг. 13 показана аминокислотная последовательность альтернативной тяжелой цепи фелинанизированного антитела согласно настоящему изобретению (SEQ ID NO: 22 - feN2 - VH).

На фиг. 14 показана аминокислотная последовательность альтернативной легкой

5 цепи фелинанизированного антитела согласно настоящему изобретению с константным доменом каппа легкой цепи (SEQ ID NO: 23 - feN2 - Vk).

На фиг. 15 показана аминокислотная последовательность альтернативной полной тяжелой цепи фелинанизированного антитела согласно настоящему изобретению (SEQ ID NO: 24 - feN2 - HC2).

10 На фиг. 16 показана аминокислотная последовательность альтернативной легкой цепи фелинанизированного антитела согласно настоящему изобретению с константным доменом каппа легкой цепи (SEQ ID NO: 25 - feN2 - 1LC).

На фиг. 17 показано, что моноклональные антитела против собачьего NGF, полученные с помощью способа, соответствующего способу согласно настоящему 15 изобретению, снижают воспалительную боль у собак.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

После обширных экспериментальных работ авторами настоящего изобретения была взята аминокислотная последовательность крысиного моноклонального антитела (MAb) αD11 против мышиного NGF, и ее использовали для получения неиммуногенных 20 химерных и фелинанизированных антител против NGF. Химерное антитело содержит вариабельные домены тяжелой и легкой цепи, происходящие из крысиного антитела альфаOP против мышного NGF, соединенные с происходящими из кошачьего антитела константными доменами тяжелой и легкой цепи. Еще более неожиданно, что фелинанизированное антитело, которое не получают с использованием стандартных 25 методик CDR-прививки, как показано, проявляет связывание с высокой аффинностью с кошачьим NGF. Неожиданно, что как химерные, так и фелинанизированные антитела нейтрализуют биологическую функцию кошачьего NGF, наиболее конкретно путем подавления связывания кошачьего NGF с клеточными рецепторами NGF TrkA и p75. Более того, было также неожиданно обнаружено, что при введении кошке против них 30 не вырабатываются нейтрализующие антитела. Соответственно, как фелинанизированные, так и химерные антитела согласно настоящему изобретению являются подходящими для длительного облегчения хронической боли у котов.

Способ создания вариабельных доменов тяжелой и легкой цепи для антител согласно 35 настоящему изобретению, который был использован авторами настоящего изобретения, приводит в результате к замене конкретных крысих (донорных) аминокислотных остатков, которые присутствуют в пределах каркасных участков вариабельных доменов легкой и тяжелой цепи на остатки, которые на основании анализа авторами настоящего изобретения будут сохранять конформацию участков CDR и, таким образом, сохранять специфичность связывания и avidность при снижении присутствия иммуногенных 40 эпитопов, которые могут приводить в результате к образованию нейтрализующих антитела против антитела, если бы его вводили кошкам в неизмененном виде. В частности, способ получения антител согласно настоящему изобретению (известный как PETisation) включает оценку последовательности каркасных участков донорного (например, крысого) антитела в отношении пригодности для введения кошке путем 45 сравнения последовательности каркасных участков донорного антитела с последовательностью антитела или группы антител, происходящих из кошек. Хотя сравнение можно проводить между донорной последовательностью и единственным представителем целевой последовательности, будет очевидно, что сравнение с группой

целевых последовательностей является предпочтительным, поскольку оно будет расширять количество встречающихся в естественных условиях вариантов выбора в каждом положении по Kabat у целевого вида. Это не только будет повышать вероятность "совпадения" между донором и целью, но также будет расширять количество вариантов выбора для замены в случаях, когда совпадения не существует. В результате будет возможен выбор замены с характеристиками, максимально близкими донору. В случаях когда донорная последовательность и кошачья последовательность отличаются по любому номеру по Kabat или соответствующему положению, донорную последовательность модифицируют с замещением рассматриваемого аминокислотного остатка аминокислотным остатком, который, как известно, присутствует в этом положении у кошек в естественных условиях.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

После обширных экспериментальных работ авторами настоящего изобретения была взята аминокислотная последовательность крысиного моноклонального антитела

(MAb) α D11 против мышного NGF, и ее использовали для получения неиммуногенных химерных и фелинизованных антител против NGF. Химерное антитело содержит вариабельные домены тяжелой и легкой цепи, происходящие из крысиного антитела альфаD11 против мышного NGF, соединенные с происходящими из кошачьего антитела константными доменами тяжелой и легкой цепи. Еще более неожиданно, что фелинизированное антитело, которое не получают с использованием стандартных методик CDR-прививки, как показано, проявляет связывание с высокой аффинностью с кошачьим NGF. Неожиданно, что как химерные, так и фелинизованные антитела нейтрализуют биологическую функцию кошачьего NGF, наиболее конкретно путем подавления связывания кошачьего NGF с клеточными рецепторами NGF TrkA и p75.

Более того, было также неожиданно обнаружено, что при введении кошке против них не вырабатываются нейтрализующие антитела. Соответственно, как фелинизованные, так и химерные антитела согласно настоящему изобретению являются подходящими для длительного облегчения хронической боли у котов.

Способ создания вариабельных доменов тяжелой и легкой цепи для антител согласно настоящему изобретению, который был использован авторами настоящего изобретения, приводит в результате к замене конкретных крысиных (донорных) аминокислотных остатков, которые присутствуют в пределах каркасных участков вариабельных доменов легкой и тяжелой цепи на остатки, которые на основании анализа авторами настоящего изобретения будут сохранять конформацию участков CDR и, таким образом, сохранять специфичность связывания и авидность при снижении присутствия иммуногенных эпитопов, которые могут приводить в результате к образованию нейтрализующих антитела против антитела, если бы его вводили кошкам в неизмененном виде. В частности, способ получения антител согласно настоящему изобретению (известный как PETisation) включает оценку последовательности каркасных участков донорного (например, крысиного) антитела в отношении пригодности для введения кошке путем сравнения последовательности каркасных участков донорного антитела с последовательностью антитела или пулом антител, происходящих из кошек. Хотя сравнение можно проводить между донорной последовательностью и единственным представителем целевой последовательности, будет очевидно, что сравнение с пулом целевых последовательностей является предпочтительным, поскольку оно будет расширять количество встречающихся в естественных условиях вариантов выбора в каждом положении по Kabat у целевого вида. Это не только будет повышать вероятность "совпадения" между донором и целью, но также будет расширять количество вариантов

выбора для замены в случаях, когда совпадения не существует. В результате будет возможен выбор замены с характеристиками, максимально близкими донору. В случаях когда донорная последовательность и кошачья последовательность отличаются по любому номеру по Kabat или соответствующему положению, донорную

5 последовательность модифицируют с замещением рассматриваемого аминокислотного остатка аминокислотным остатком, который, как известно, присутствует в этом положении у кошек в естественных условиях.

В случаях когда требуется замещение аминокислотного остатка, присутствующего в донорном каркасном участке иммуноглобулина, его, как правило, выполняют с

10 использованием принципа консервативного замещения, при котором аминокислотный остаток заменяют аминокислотным остатком, который присутствует в этом положении по Kabat у кошки в естественных условиях и является максимально родственным в плане размера, заряда и гидрофобности подвергающейся замене аминокислоте в донорной последовательности. Смысл заключается в том, чтобы выбрать замену,

15 которая не вызовет никакой или по меньшей мере вызовет лишь минимальную перестройку или нарушение в трехмерную структуру донорного антитела. В определенных ситуациях не будет явного варианта выбора, и каждый выбор будет характеризоваться преимуществами и недостатками. Окончательное решение может требовать моделирования трехмерной структуры или даже экспрессии различных

20 альтернативных последовательностей. Однако, в целом, будет доступно явное предпочтение. В результате этой процедуры изменение в донорной последовательности будет выполнено только, когда этот остаток будет чужеродным в целевой последовательности, и заменяющая аминокислота является максимально родственной той, которую она заменяет. Следовательно, избегают создания чужеродных эпитопов,

25 а общая трехмерная структура сохраняется, и в результате сохраняется также аффинность и специфичность.

Константные участки легкой и тяжелой цепи получают из происходящих из кошки (целевых) антител. Константные домены тяжелой цепи выбирают или модифицируют так, чтобы они не опосредовали последующие эффекторные функции.

30 В химерных антителах согласно настоящему изобретению вариабельные домены тяжелой и легкой цепей представляют собой полные вариабельные домены, происходящие из антитела α D11.

В фелинизированных антителах согласно настоящему изобретению участки CDR, происходящие из антитела α D11, объединены с последовательностями каркасных 35 участков, которые, хотя в их основе и лежат каркасные участки, присутствующие в антителе α D11, были модифицированы посредством замещения конкретных аминокислотных остатков. Этот процесс приводит в результате к удалению эпитопов, на которые могут нацеливаться Т-клетки после введения антитела кошке. Более того, модификации остатков в каркасных участках выбирают таким образом, чтобы 40 сохранялась третичная структура участков CDR, в то время как эта модификация при введении антитела кошке предотвращает выработку нейтрализующих антител против него.

Каждый из вариабельных участков легкой и тяжелой цепей содержит четыре каркасных участка, называемые FR1-FR4. Для каждого из этих каркасных участков 45 авторами настоящего изобретения был выявлен предпочтительный аминокислотный остаток (так называемый предпочтительный остаток) для каждого конкретного положения, и более того, в этом положении также могут быть предусмотрены альтернативные аминокислотные остатки. В таблицах 1-8 ниже иллюстрируются 4

каркасных участка для каждой из тяжелой и легкой цепей. В этих таблицах представлено положение аминокислоты в этом конкретном каркасном участке и, кроме того, в соответствии с системой нумерации по Kabat, используемой для указания положения конкретного остатка по длине полного вариабельного домена тяжелой или легкой цепи. Остаток или остатки, показанные как остатки группы 1, представляют собой предпочтительные остатки, тогда как остатки группы 2 представляют собой альтернативные остатки. Однако они в основном не будут предпочтительными относительно остатков, показанных в группе 1, в этом конкретном положении. Аминокислотные остатки указаны с использованием однобуквенной системы.

10

Таблица 1.

Остатки FR1 вариабельного домена легкой цепи			
Положение в FR1 легкой цепи	Положение в легкой цепи согласно нумерации по Kabat	Аминокислотные остатки группы 1	Аминокислотные остатки группы 2
	по Kabat		
1	1	D	
2	2	I	
3	3	V	
4	4	M	
5	5	T	
6	6	Q	
7	7	T	
8	8	P	
9	9	L	
10	10	S	
11	11	L	
12	12	S	
13	13	V	
14	14	T	
15	15	P	
16	16	G	
17	17	E	
18	18	P	
19	19	A	
20	20	S	
21	21	A	I
22	22	S	
23	23	C	

15

20

25

30

35

Таблица 2.

Остатки FR2 вариабельного домена легкой цепи			
Положение в FR2 легкой цепи	Положение в легкой цепи согласно нумерации по Kabat	Аминокислотные остатки группы 1	Аминокислотные остатки группы 2
1	35	W	
2	36	Y	
3	37	L	
4	38	Q	
5	39	K	
6	40	P	
7	41	G	
8	42	Q	
9	43	S	
10	44	P	
11	45	R	
12	46	R	
13	47	L	

14	48	I	
15	49	Y	

Таблица 3.

Остатки FR3 вариабельного домена легкой цепи

5	Положение в FR3 легкой цепи	Положение в легкой цепи согласно нумерации по Kabat	Аминокислотные остатки группы 1	Аминокислотные остатки группы 2
10	1	57	G	
10	2	58	V	
10	3	59	P	
10	4	60	D	
15	5	61	R	
15	6	62	F	
15	7	63	S	
15	8	64	G	
15	9	65	S	
15	10	66	G	
15	11	67	S	
15	12	68	G	
15	13	69	T	
15	14	70	D	
15	15	71	F	
20	16	72	T	
20	17	73	L	
20	18	74	R	
20	19	75	I	
20	20	76	S	
20	21	77	R	
20	22	78	V	
20	23	79	E	
20	24	80	A	
20	25	81	D	
20	26	82	D	
20	27	82A	V	
20	28	82B	G	
20	29	82C	V	
20	30	83	Y	
20	31	84	F	Y
20	32	85	C	

35

Таблица 4.

Остатки FR4 вариабельного домена легкой цепи

40	Положение в FR4 легкой цепи	Положение в легкой цепи согласно нумерации по Kabat	Аминокислотные остатки группы 1	Аминокислотные остатки группы 2
40	1	95	F	
40	2	96	G	
40	3	97	P	
40	4	98	G	
40	5	99	T	
40	6	100	K	
40	7	101	L	
40	8	102	E	
40	9	103	I	
40	10	104	K	

45

Таблица 5.

Остатки FR1 вариабельного домена тяжелой цепи

Положение в FR1 тяжелой цепи	Положение в тяжелой цепи согласно нумерации по Kabat	Аминокислотные остатки группы 1	Аминокислотные остатки группы 2
1	1	Q	D, H
2	2	V	E
3	3	Q	L
5	4	L	
6	5	V	
7	6	E	Q
8	7	S	
9	8	G	
10	9	G, A	R
11	10	D, E	
12	11	L	V
13	12	V	R, S
14	13	Q	K
15	14	P	
16	15	G, E	
17	16	G, A	
18	17	S	
19	18	L	V
20	19	R, K	S
21	20	L	I
22	21	T	F, S
23	22	C	
24	23	A, V, M	K
25	24	A	T
26	25	S	
27	26	G	
28	27	F	Y, L
29	28	S	T, N
30	29	L	F, V
	30	T	S, G, R

Таблица 6.

Остатки FR2 вариабельного домена тяжелой цепи

Положение в FR2 тяжелой цепи	Положение в тяжелой цепи согласно нумерации по Kabat	Аминокислотные остатки группы 1	Аминокислотные остатки группы 2
1	36	W	
2	37	V	LWFA
3	38	R	C
4	39	Q	
5	40	A	PT
6	41	P	
7	42	G	EA
8	43	K	QT
9	44	G	
10	45	L	F
11	46	E	Q
12	47	W	ET
13	48	M	VL
14	49	G	ATS

Таблица 7.

Остатки FR3 вариабельного домена тяжелой цепи

Положение в FR3 тяжелой цепи	Положение в тяжелой цепи согласно нумерации по Kabat	Аминокислотные остатки группы 1	Аминокислотные остатки группы 2
1	66	R	
2	67	LF	

3	68	T	A
4	69	I	LV
5	70	ST	
6	71	R	AI
7	72	D	
8	73	TN	S
9	74	AS	GT
10	75	K	TRGQ
11	76	ND	
12	77	T	A
13	78	LA	
14	79	Y	DS
15	80	L	M
16	81	Q	ELR
17	82	M	LT
18	82A	N	SDT
19	82 B	S	INRT
20	82C	L	
21	83	KR	GT
22	84	ST	PA
23	85	E	TAD
24	86	D	
25	87	T	A
26	88	A	
27	89	T	VM
28	90	Y	
29	91	Y	CF
30	92	C	R
31	93	A	GITSV
32	94	R	KSTIVPNG

Таблица 8.

Остатки FR4 вариабельного домена тяжелой цепи

Положение в FR4 тяжелой цепи	Положение в тяжелой цепи согласно нумерации по Kabat	Аминокислотные остатки группы 1	Аминокислотные остатки группы 2
1	103	W	R
2	104	G	R
3	105	Q	PVHR
4	106	G	
5	107	T	AVIS
6	108	LI	Q
7	109	V	
8	110	T	
9	111	V	
10	112	S	T
11	113	S	QAP

40 Фелинизированное антитело согласно настоящему изобретению, таким образом, отличается от химерного моноклонального антитела согласно настоящему изобретению, которое содержит полный вариабельный домен, происходящий из первого вида (крысиного антитела альфаD11 против мышиного NGF), и константные домены, происходящие из второго вида (происходящие из кошки антитела), или от 45 фелинизированного CDR-привитого антитела, в котором гипервариабельные участки (CDR) вариабельных участков тяжелой и легкой цепей содержат аминокислотные остатки, происходящие из донорного антитела и встроенные в каркасные участки (FR), и константные участки (CR), происходящие из целевого антитела или из кошачьих

последовательностей зародышевого типа.

Предпочтительно, чтобы фелинанизированное антитело, главным образом, сохраняло свойства связывания исходного (донорного) антитела, из которого происходят CDR. Это значит, что фелинанизированное антитело будет проявлять такую же или, главным

5 образом, такую же связывающую способность и авидность в отношении антигена, что и донорное антитело, из которого происходят CDR, в этом случае, происходящее из крысы антитело альфаD11 против мышиного NGF. В идеальном случае аффинность фелинанизированного антитела будет составлять не менее 10% аффинности донорного антитела в отношении целевого эпитопа, более предпочтительно не менее

10 приблизительно 30%, и наиболее предпочтительно аффинность будет составлять не менее 50% таковой исходного антитела. Способы анализа связывающей способности в отношении антигена являются хорошо известными из уровня техники и включают анализы полумаксимального связывания, конкурентные анализы и анализ по методу Скэтчарда.

15 Как определено выше в настоящем документе, настоящее изобретение распространяется на связывающие элементы или антигенсвязывающие фрагменты, полученные из химерных или фелинанизированных антител согласно настоящему изобретению. Такие антигенсвязывающие фрагменты относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность к специальному

20 связыванию с кошачьим NGF. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может осуществляться фрагментами антитела полной длины. Согласно определенным вариантам осуществления связывающие элементы или антигенсвязывающие фрагменты могут быть выделенными связывающими элементами. Связывающий элемент или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему

25 изобретению может содержать фрагмент антител согласно настоящему изобретению, например, фрагмент полностью фелинанизированной молекулы антитела, такой как только тяжелая или легкая цепь или, например, вариабельный домен тяжелой и/или легкой цепи. Согласно определенным вариантам осуществления связывающий элемент, как правило, может содержать, состоять из или состоять, по существу, из VH и/или VL

30 домена антитела. VH домены связывающих элементов также предусматриваются как часть настоящего изобретения. В пределах каждого из VH и VL доменов находятся 3 гипервариабельных участка ("CDR"), вместе с 4 связанными каркасными участками ("FR"). VH домен, как правило, содержит 3 HCDR (гипервариабельные участки тяжелой цепи), и VL домен, как правило, содержит 3 LCDR (гипервариабельные участки легкой

35 цепи). Соответственно, связывающий элемент может содержать VH домен, содержащий последовательно участки CDR1 (или HCDR1), CDR2 (HCDR2) и CDR3 (HCDR3) VH вместе с несколькими связанными каркасными участками. Связывающий элемент может дополнительно или альтернативно содержать VL домен, содержащий домены CDR1, CDR2 и CDR3 VL вместе со связанными каркасными участками. VH или VL домены,

40 как правило, содержат четыре каркасных участка, FR1, FR2, FR3 и FR4, с расположеннымми между ними 3 гипервариабельными участками в следующем порядке: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

На фиг. 9 показана аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи антитела против NGF согласно настоящему изобретению. Участки CDR1, 45 CDR2 и CDR3 выделены подчеркиванием. Кроме того, на фиг. 10 показана аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи антитела против NGF согласно настоящему изобретению. Участки CDR1, CDR2 и CDR3 выделены подчеркиванием.

На фиг. 9 и 10 остатки вариабельного домена легкой цепи (фиг. 9) и вариабельного домена тяжелой цепи (фиг. 10) стандартно пронумерованы в соответствии с системой нумерации, разработанной Kabat и соавт.(Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H., Gottesman, K. and Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH

5 Publication No. 91-3242). Система нумерации по Kabat обычно используется, когда речь идет об остатке в вариабельном домене (примерно, остатки 1-104 легкой цепи и остатки 1-113 тяжелой цепи). Эта система нумерации используется в настоящем описании там, где это указано. Обозначения аминокислотного остатка по Kabat не всегда прямо соответствуют линейной последовательной нумерации аминокислотных остатков

10 вариабельных участков тяжелой и легкой цепей согласно настоящему изобретению, представленной в последовательности, приведенной в перечне с соответствующим SEQ ID NO для этой последовательности. В частности, фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество или дополнительные аминокислоты, которые при точной нумерации по Kabat соответствуют укорочению

15 или вставке в структурный компонент, либо каркасный участок, либо гипервариабельный участок (CDR), базовой структуры вариабельного домена тяжелой или легкой цепи. Верный номер остатков по Kabat можно определить для любого заданного антитела с помощью выравнивания остатков в последовательности антитела со стандартной последовательностью, к которой была применена нумерация по Kabat.

20 На фиг. 10 показана аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи фелинанизированного антитела против кошачьего NGF согласно настоящему изобретению. Она также приведена в SEQ ID NO:4. Однако на фиг. 10 используемая нумерация (по Kabat) учитывает аминокислотные остатки 80, 80A, 80 B и 80C, тогда как в SEQ ID NO: 4 нумерация продолжается последовательно, то есть они нумеруются 25 как остатки 80, 81, 82 и 83. То же самое является верным для остатков 100, 100A, 100 B, 100C, 100D, 100E и 100F по Kabat на фиг. 10.

Как описано выше в настоящем документе, связывающий фрагмент антитела можно выбрать из группы, содержащей без ограничения Fab фрагмент, Fab' фрагмент и scFv (одноцепочечный фрагмент вариабельного участка), или из пептидомиметика, диатела 30 или родственного мультивалентного производного.

Согласно определенным вариантам осуществления связывающий фрагмент антитела представляет собой Fab или F(ab')2 фрагмент, который состоит из VL, VH, CL и CH1 доменов антитела. Согласно определенным вариантам осуществления VL домен характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, и VH домен 35 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4. Согласно определенным вариантам осуществления CL и CH1 домены являются таковыми на основе аминокислотной последовательности CL и CH1 домена кошачьего иммуноглобулина.

Методики, используемые для рекомбинантного получения Fab, Fab' и F(ab')2 фрагментов, являются хорошо известными специалисту в настоящей области техники и включают таковые, раскрытые в РСТ публикации международной патентной заявки №WO 92/22324 и у Sawai et al., "Direct Production of the Fab Fragment Derived From the Sperm Immobilizing Antibody Using Polymerase Chain Reaction and cDNA Expression Vectors", 1995, AJRI 34:26-34. Пример методик, которые можно использовать для получения scFv (одноцепочечные Fv фрагменты), раскрыты в Huston et al., "Protein Engineering of Single-Chain Fv Analogs and Fusion Proteins", Methods in Enzymology, vol. 203:46-88 (1991), содержание которой включено в настоящий документ с помощью ссылки.

Согласно определенным вариантам осуществления фрагменты антитела можно

получить из антител полной длины посредством протеолитического расщепления в соответствии со способом по Morimoto (Morimoto et al., "Single-step purification of F(ab')2 fragments of mouse monoclonal antibodies (immunoglobulins G1) by hydrophobic interaction high performance liquid chromatography using TSKgel Phenyl-5PW" Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)).

Фрагменты антитела также можно непосредственно получить с помощью клеток-хозяев (Carter et al., "High level Escherichia coli expression and production of a bivalent humanized antibody fragment" Bio/Technology 10: 163-167 (1992)).

Помимо обеспечения химерных и фелинизованных моноклональных антител,

которые характеризуются специфичностью связывания с кошачьим NGF и которые оказывают антагонистическое воздействие на функцию кошачьего NGF, настоящее изобретение дополнительно распространяется на связывающие элементы, отличные от антител, содержащие пару связывающих доменов на основе аминокислотной последовательности VL участка (вариабельного участка легкой цепи), которая

определенна в SEQ ID NO: 3, и аминокислотной последовательности VH участка (вариабельного участка тяжелой цепи), которая определена в SEQ ID NO: 4. В частности, настоящее изобретение распространяется на отдельные связывающие домены, в основе которых лежат либо VL, либо VH участок фелинизованных антител согласно настоящему изобретению.

Соответственно, согласно определенным дополнительным вариантам осуществления настоящего изобретения предусматривается связывающий элемент, содержащий, состоящий из или состоящий, по существу, из отдельного связывающего домена, полученного из фелинизированного антитела согласно настоящему изобретению.

Согласно определенным вариантам осуществления отдельный связывающий домен получен из аминокислотной последовательности VH (вариабельного домена тяжелой цепи), который определен в SEQ ID NO:4. Такой связывающий домен можно использовать в качестве нацеливающего средства для кошачьего NGF.

Согласно определенным вариантам осуществления дополнительные методики конструирования можно использовать для модификации антител согласно настоящему изобретению, например посредством включения модификаций в Fc участок, которые

могут изменять время полуыведения из сыворотки крови, фиксация комплемента, связывание Fc с рецептором и/или антигензависимую клеточную цитотоксичность. Кроме того, согласно определенным вариантам осуществления можно получать

антитела или фрагменты антитела, которые характеризуются измененными схемами гликозилирования. Согласно определенным вариантам осуществления антитело

согласно настоящему изобретению является измененным с увеличением или уменьшением степени, в которой антитело является гликозилированным.

Гликозилирование полипептидов, как правило, представляет собой либо N-гликозилирование, либо O-гликозилирование. N-гликозилирование относится к

присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагинового остатка. Последовательности-трипептиды аспарагин-X-серин и аспарагин-X- треонин, в которых X представляет собой аминокислоту за исключением пролина, являются

распознаваемыми последовательностями для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Следовательно, присутствие любой из этих последовательностей-трипептидов в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-гликозилирование относится к присоединению одного из Сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксаминокислоте, зачастую серину или треонину, хотя также можно использовать 5-гидроксипролин или 5-

гидроксилизин. Авторами настоящего изобретения была обеспечена аминокислотная последовательность кошачьего агликазилированного константного участка тяжелой цепи, она определена в SEQ ID NO: 7.

Согласно определенным дополнительным вариантам осуществления химерные и

5 фелинизированные антитела против кошачьего NGF согласно настоящему изобретению можно подвергать ПЭГилированию посредством осуществления реакции антитела с производным полиэтиленгликоля (PEG). Согласно определенным вариантам осуществления фелинизированное или химерное антитело является дефукозилированным и, таким образом, не содержит фукозных остатков.

10 Согласно определенным вариантам осуществления модификации биологических свойств антитела можно выполнить посредством выбора замен, которые воздействуют на (а) структуру полипептидного остова в зоне замены, например, в виде листовой или спиральной конформации, (б) заряд или гидрофобность молекулы в целевом сайте или (с) величину боковой цепи. Аминокислоты можно сгруппировать в соответствии с

15 подобием свойств их боковых цепей (A.L. Lehninger, in Biochemistry, 2nd Ed., 73-75, Worth Publishers, New York (1975)): (1) неполярные остатки: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M); (2) незаряженные полярные остатки: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q); (3) кислотные остатки: Asp (D), Glu (E); (4) основные:

20 Lys (K), Arg (R), His (H). В качестве альтернативы, встречающиеся в естественных условиях остатки можно разделить на группы на основе общих свойств боковых цепей:

(1) гидрофобные остатки: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) нейтральные гидрофильные остатки: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) кислотные: Asp, Glu; (4) основные остатки: His, Lys, Arg; (5) остатки, которые оказывают влияние на ориентацию цепей: Gly, Pro; (6) ароматические остатки: Trp, Tyr, Phe. Неконсервативные замены будут влечь за собой смену члена одного из этих классов на остаток, происходящий из другого класса. Такие замещенные остатки можно ввести в сайты консервативных замен или в оставшиеся (например, неконсервативные) сайты.

25 Согласно различным дополнительным аспектам настоящее изобретение распространяется на иммуноконьюгат, содержащий антитело против кошачьего NGF согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающую часть, связанную с молекулой-партнером. Согласно определенным вариантам осуществления такой коньюгат антитело-молекула-партнер получают с помощью химического линкера, такого как пептидильный линкер, гидразиновый линкер или дисульфидный линкер.

30 Согласно определенным вариантам осуществления партнер по сочетанию представляет собой эффекторную молекулу, молекулу метки, лекарственного средства или носителя. Подходящие методики сочетания антител согласно настоящему изобретению как с пептидильными, так и с непептидильными партнерами по сочетанию будут известны специалистам в настоящей области техники. Примеры подходящих меток включают выявляемые метки, такие как радиоактивная метка, или метку-фермент, такую как 35 пероксидаза хрена, или химические частицы, такие как биотин. В качестве альтернативы, метка может представлять собой функциональную метку, например рицин, или 40 пролекарства, которые способны к превращению пролекарств в активные лекарственные средства в сайте связывания антитела.

45 Согласно различным дополнительным аспектам настоящее изобретение распространяется на полинуклеотиды и, в частности, выделенные полинуклеотиды, которые кодируют химерные и фелинизированные антитела согласно настоящему изобретению или к фрагментам антител и связывающим элементам согласно настоящему изобретению. Как определено в настоящем документе, "полинуклеотид" включает

любой полирибонуклеотид или полидезоксирибонуклеотид, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК, в том числе без ограничения двухнитевую РНК, и РНК, которая представляет собой смесь одно- и двухнитевых участков. Полинуклеотид согласно настоящему изобретению, например, полинуклеотид, который кодирует полипептид или полипептиды согласно настоящему изобретению, включает его аллельные варианты и/или их комплементарные последовательности, в том числе полинуклеотид, который гибридизуется с такими нуклеотидными последовательностями в условиях умеренной или высокой жесткости.

10 Настоящее изобретение дополнительно распространяется на миметики антител, такие как доменные антитела, наноантитела (nanobodies), унитела (unibodies), версатела (versabodies) и дуокалины (duocalins), в основе которых лежат химерные и фелинизированные антитела против кошачьего NGF согласно настоящему изобретению. Большое разнообразие технологий создания миметиков-антител известно специалисту 15 в настоящей области техники. Например, так называемые доменные антитела (Domantis, Великобритания) представляют собой небольшие функциональные связывающиеся блоки антител, которые соответствуют вариабельным участкам либо легких, либо тяжелых цепей человеческих антител. Руководство для получения таких доменных антител можно найти в патенте США №6291158, патенте США №6582915 и патенте 20 США №6593081. Наноантитела представляют собой терапевтические белки-производные антител, которые характеризуются уникальными структурными и функциональными свойствами встречающихся в естественных условиях антител, содержащих только тяжелые цепи, обнаруживаемых у верблюдов. Унитела также представляют собой фрагменты антител, полученные с помощью технологии, основанной на удалении 25 шарнирного участка антител IgG4. Удаление шарнирного участка дает в результате молекулу, которая составляет примерно половину от размера традиционного антитела IgG4 и которая характеризуется моновалентным связывающим участком. Унитела сохраняют свойство антител IgG4 оставаться инертными и, таким образом, не вызывать иммунные реакции.

30 Дополнительные связывающие молекулы включают молекулы аффител (affibody) (патент США №5831012), DARPHNbi (сконструированные молекулы белков на основе анкириновых повторов) (РСТ публикация международной заявки №WO 02/20565) и антикалины (anticalins) (патент США №7250297 и WO 99/16873). Версатела представляют собой молекулы, полученные согласно еще одной технологии получения миметиков 35 антител. Версатела (Amunix, публикация заявки на патент США №2007/0191272) представляют собой небольшие белки, называемые микробелками, весом 3-5 кДа, содержащие более 15% цистeinовых остатков, которые образуют остов с высокой плотностью дисульфидных связей, который заменяет гидрофобную внутреннюю часть, которая, как правило, присутствует у белка.

40 Авимеры являются другим типом миметика антитела. Авимеры возникают в результате рекомбинации семейств человеческих сывороточных белков. Они представляют собой отдельные белковые цепи, состоящие из модульных связывающих доменов, каждый из которых предназначен для связывания с конкретным сайтом-мишенью. Авимеры могут связываться одновременно с сайтами на одном белке-мишени 45 и/или сайтами на нескольких белках-мишениях. Известный как многоточечное присоединение или avidность, этот механизм связывания имитирует способ взаимодействия клеток и молекул в организме, помогает в создании antagonистов и агонистов и дает в результате лекарственные средства с несколькими функциями и

сильной активностью. Библиотеки авимеров можно получить в соответствии с WO 2004/044011, включенной в настоящий документ с помощью ссылки. Библиотеки авимеров также коммерчески доступны от Avidia Inc, Маунтин-Вью, Калифорния, США.

5 Получение антитела

Антитела и связывающие элементы согласно настоящему изобретению можно получить полностью или частично с помощью химического синтеза. Например, антитела и связывающие элементы согласно настоящему изобретению можно получить с помощью методик, которые хорошо известны специалисту в настоящей области техники, 10 таких как стандартный жидкофазный пептидный синтез, или с помощью способов твердофазного пептидного синтеза. В качестве альтернативы, антитела и связывающие элементы можно получить в растворе с использованием методик жидкофазного пептидного синтеза или, кроме того, с помощью сочетания твердофазных, жидкофазных химических методов и методов химии растворов.

15 Настоящее изобретение дополнительно распространяется на получение антител или связывающих элементов согласно настоящему изобретению посредством экспрессии нуклеиновой кислоты, которая кодирует по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, которая содержит антитело согласно настоящему изобретению, в подходящий экспрессионной системе так, чтобы необходимый пептид или полипептид 20 мог кодироваться. Например, нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность легкой цепи, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность тяжелой цепи, можно экспрессировать с получением антитела согласно настоящему изобретению.

Соответственно, в определенных дополнительных аспектах настоящего изобретения 25 предусматриваются нуклеиновые кислоты, кодирующие аминокислотные последовательности, которые образуют антитела или связывающие элементы согласно настоящему изобретению.

Как правило, нуклеиновые кислоты, кодирующие аминокислотные 30 последовательности, которые образуют антитела или связывающие элементы согласно настоящему изобретению могут быть обеспечены в выделенной или очищенной форме, или обеспечиваться в форме, которая, главным образом, не содержит материала, который может быть связан с ней в естественных условиях, за исключением одной или нескольких регуляторных последовательностей. Нуклеиновая кислота, которая экспрессирует антитело или связывающий элемент согласно настоящему изобретению, 35 может быть целиком или частично синтетической и может включать без ограничения ДНК, кДНК и РНК.

Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела или связывающие элементы согласно настоящему изобретению, могут быть легко получены специалистом в настоящей области техники с использованием методик, которые хорошо известны 40 специалисту в настоящей области техники, такие как описанные в Sambrook et al. "Molecular Cloning", A laboratory manual, cold Spring Harbor Laboratory Press, Volumes 1-3, 2001 (ISBN-0879695773), и Ausubel et al. Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, 4th Edition, 1999 (ISBN - 0471250929). Указанные методики включают (i) использование полимеразной цепной реакции (ПЦР) для амплификации образцов 45 нуклеиновой кислоты, (ii) химический синтез или (iii) получение последовательностей к ДНК. ДНК, кодирующую антитела или связывающие элементы согласно настоящему изобретению, можно получить и использовать любым подходящим способом, известным специалисту в настоящей области техники, включающим взятие кодирующей ДНК,

определение подходящих сайтов узнавания рестрикционным ферментом с любой стороны от части, которую нужно экспрессировать, и вырезание указанной части из ДНК. Вырезанную часть можно затем функционально связать с подходящим

5 промотором и экспрессировать в подходящей экспрессионной системе, такой как коммерчески доступная экспрессионная система. В качестве альтернативы, соответствующие части ДНК можно амплифицировать с использованием подходящих ПЦР праймеров. Модификации в последовательностях ДНК можно выполнить с использованием сайт-направленного мутагенеза.

10 Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела или связывающие элементы согласно настоящему изобретению могут быть обеспечены в виде конструкций в форме плазиды, вектора, транскрипционной или экспрессионной кассеты, которая содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, описанную выше. Конструкция может содержаться в рекомбинантной клетке-хозяине, которая содержит одну или 15 несколько конструкций, которые упомянуты выше. Экспрессию можно поддающим образом обеспечить с помощью культивирования в соответствующих условиях рекомбинантных клеток-хозяев, содержащих подходящие последовательности нуклеиновой кислоты. После экспрессии антитело или фрагменты антител можно выделить и/или очистить с использованием любой подходящей методики, после чего применять в соответствующих случаях.

20 Системы для клонирования и экспрессии полипептида в ряде различных клеток-хозяев являются хорошо известными. Поддающие клетки-хозяева включают системы на основе бактерий, клеток млекопитающих, дрожжей, насекомых и бакуловирусную систему экспрессии. Доступные из уровня техники линии клеток млекопитающих для экспрессии гетерологичного полипептида включают клетки яичника китайского хомячка 25 (CHO), HeLa клетки, клетки почки новорожденного хомячка и NSO клетки миеломы мыши. Типичным преимущественным хозяином-бактерией является *E. coli*. Экспрессия антител и фрагментов антитела в прокариотических клетках, таких как *E. coli*, является хорошо известной из уровня техники. Экспрессия в эукариотических клетках в культуре также является доступной для специалиста в настоящей области техники как вариант 30 для получения связывающего элемента.

Общие методики получения антител хорошо известны специалисту в настоящей области техники, причем такие способы обсуждаются, например, в Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495-497; патенте США №4376110; Harlow and Lane, *Antibodies: a Laboratory Manual*, (1988) *Cold Spring Harbor*. Методики получения рекомбинантных 35 молекул антител описаны в вышеупомянутых источниках, а также, например, в Европейском патенте №0368684.

Согласно определенным вариантам осуществления согласно настоящему изобретению используются рекомбинантные нуклеиновые кислоты, содержащие вставку, кодирующую вариабельный домен тяжелой цепи и/или вариабельный домен легкой 40 цепи антител или связывающих элементов. В сущности, такие нуклеиновые кислоты содержат кодирующие однонитевые нуклеиновые кислоты, двухнитевые нуклеиновые кислоты, состоящие из указанных кодирующих нуклеиновых кислот и комплементарных им нуклеиновых кислот, или эти комплементарные (однонитевые) нуклеиновые кислоты сами по себе.

45 Более того, нуклеиновые кислоты, кодирующие вариабельный домен тяжелой цепи и/или вариабельный домен легкой цепи антител, могут представлять собой ферментативно или химически синтезированные нуклеиновые кислоты, характеризующиеся аутентичной последовательностью, кодирующей встречающиеся

в естественных условиях вариабельный домен тяжелой цепи и/или вариабельный домен легкой цепи, или их мутанта.

Антитела согласно настоящему изобретению можно получить посредством рекомбинантных методов не только непосредственно, но также в виде слитого 5 полипептида с гетерологичным полипептидом, который предпочтительно представляет собой сигнальную последовательность, или другим полипептидом со специфическим сайтом расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида. Выбранная гетерологичная сигнальная последовательность предпочтительно представляет собой 10 таковую, которая узнается и подвергается процессингу (т.е. расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не узнают и не подвергают процессингу сигнальную последовательность нативного антитела, сигнальная последовательность замещается на прокариотическую сигнальную 15 последовательность, выбранную, например, из группы лидерных последовательностей щелочной фосфатазы, пенициллиназы, Ipp или термостабильного энтеротоксина II.

Выражение "выделенный" при использовании в отношении фелинанизированных 20 антител согласно настоящему изобретению, или связывающих элементов, полученных из них, или полипептидов, которые кодируют их, относится к состоянию, при котором указанные антитела, связывающие элементы или нуклеиновые кислоты (полинуклеотиды) обеспечиваются в выделенной и/или очищенной форме, то есть они 25 были отделены от, выделены из или очищены от их естественного окружения и обеспечиваются, главным образом, в чистой или однородной форме или, в случае нуклеиновой кислоты, не содержат или, главным образом, не содержат нуклеиновой кислоты или генов другого происхождения, нежели последовательность, кодирующая 30 полипептид с необходимой функцией. Соответственно, такие выделенные антитела, связывающие элементы и выделенные нуклеиновые кислоты не будут содержать или, главным образом, не будут содержать материала, с которым они связаны в естественных условиях, такого как другие полипептиды или нуклеиновые кислоты, с которыми они обнаруживаются в их естественном окружении или в среде, в которой их получают (например, клеточная культура), если такое получение выполняется с помощью 35 технологии рекомбинантной ДНК, практически осуществляющей *in vitro* или *in vivo*.

Антитела, связывающие элементы и нуклеиновые кислоты могут быть составлены с разбавителями или вспомогательными веществами и при этом из практических соображений все еще считаться обеспеченными в выделенной форме.

Например, антитела и связывающие элементы можно смешать с желатином или

35 другими носителями при использовании для покрытия микротитровальных планшетов для применения в иммунологических анализах, или их будут смешивать с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями при использовании в диагностике или терапии. Антитела или связывающие элементы могут быть 40 гликозилированными либо с помощью естественных механизмов, либо с помощью систем гетерологичных эукариотических клеток (например, СНО или NSO клетки), либо они могут быть (например, при получении посредством экспрессии в прокариотической клетке) негликозилированными.

Неоднородные препараты, содержащие молекулы фелинанизированных антител против кошачьего NGF, также составляют часть настоящего изобретения. Например, такие 45 препараты могут представлять собой смеси антител с тяжелыми цепями полной длины и тяжелыми цепями, лишенными С-концевого лизина, с различными степенями гликозилирования и/или с аминокислотами, подвергнутыми дериватизации, такой как циклизация N-концевой глутаминовой кислоты с образованием остатка

пироглутаминовой кислоты.

Фармацевтические композиции

Как правило, фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению составляют в виде жидкого состава, лиофилизированного состава, лиофилизированного

5 состава, который восстанавливается в жидкость, или в виде аэрозольного состава.

Согласно определенным вариантам осуществления антитело в составе находится в концентрации от приблизительно 0,5 мг/мл до приблизительно 250 мг/мл, от

приблизительно 0,5 мг/мл до приблизительно 45 мг/мл, от приблизительно 0,5 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл, от приблизительно 100 мг/мл до приблизительно 200 мг/

10 мл или от приблизительно 50 мг/мл до приблизительно 250 мг/мл. Согласно

определенным вариантам осуществления состав дополнительно содержит буфер. Как правило, pH состава составляет от приблизительно pH 5,5 до приблизительно pH 6,5. Согласно определенным вариантам осуществления буфер может содержать от

приблизительно 4 мМ до приблизительно 60 мМ гистидинового буфера, от

15 приблизительно 5 мМ до приблизительно 25 мМ сукцинатного буфера или от

приблизительно 5 мМ до 25 мМ ацетатного буфера. Согласно определенным вариантам осуществления буфер содержит хлорид натрия в концентрации от приблизительно 10 мМ до 300 мМ, как правило в концентрации около 125 мМ, и цитрат натрия в концентрации от приблизительно 5 мМ до 50 мМ, как правило 25 мМ. Согласно

20 определенным вариантам осуществления состав может дополнительно содержать поверхностно-активное вещество в концентрации от немного выше 0% до

приблизительно 0,2%. Согласно определенным вариантам осуществления поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей без ограничения из: полисорбата -

25 20, полисорбата - 40, полисорбата - 60, полисорбата - 65, полисорбата - 80, полисорбата - 85 и их сочетаний. В предпочтительном варианте осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат - 20 и может дополнительно содержать хлорид натрия в концентрации приблизительно 125 мМ и цитрат натрия в концентрации приблизительно 25 мМ. Введение

Антитела или связывающие элементы согласно настоящему изобретению можно

30 вводить сами по себе, но предпочтительно их будут вводить в виде фармацевтической композиции, которая обычно содержит подходящее фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, разбавитель или носитель, выбранные в зависимости от предполагаемого пути введения. Примеры подходящих фармацевтических носителей включают воду, глицерин, этанол и подобное.

35 Моноклональное антитело или связывающий элемент согласно настоящему изобретению можно вводить пациенту-кошке, нуждающейся в лечении, любым подходящим путем. Как правило, композицию можно вводить парентерально путем инъекции или инфузии. Примеры предпочтительных путей для парентерального введения включают без ограничения внутривенное, внутрисердечное, внутриартериальное,

40 внутрибрюшинное, внутримышечное, внутриполостное, подкожное, чресслизистое, ингаляционное или чрескожное. Пути введения могут дополнительно включать местное и кишечное, например, мукозальное (в том числе легочное), пероральное, назальное, ректальное.

В вариантах осуществления в случаях, когда композиция доставляется в виде

45 инъекционной композиции, например, при внутривенном, внутрикожном или подкожном применении, активный ингредиент может присутствовать в форме приемлемого для парентерального введения водного раствора, который является апирогенным и характеризуется подходящими pH, изотоничностью и стабильностью. Специалист в

настоящей области техники способен приготовить подходящие растворы с использованием, например, изотоничных сред, таких как инъекционный раствор хлорида натрия, инъекционный раствор Рингера или инъекционный раствор Рингера с лактатом. Консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки можно включить при необходимости.

5 Композицию также можно вводить с помощью микросфер, липосом, других систем доставки на основе микрочастиц или составов с замедленным высвобождением, помещаемых в определенные ткани, в том числе кровь.

Примеры методик и протоколов, упоминаемых выше, и другие методики и протоколы,

10 которые можно использовать в соответствии с настоящим изобретением, можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, Gennaro, A.R., Lippincott Williams & Wilkins; 20th edition ISBN 0-912734-04-3; и Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems; Ansel, H.C. et al. 7th Edition ISBN 0-683305-72-7, полные раскрытия которых включены в настоящий документ с помощью ссылки.

15 Антитела и композиции согласно настоящему изобретению, как правило, вводят субъекту в "терапевтически эффективном количестве", оно представляет собой количество, достаточное для проявления благоприятного воздействия в отношении субъекта, которому вводят композицию. Фактическая вводимая доза и частота и длительность введения будут зависеть от и могут определяться с должным учетом

20 природы и тяжести состояния, которое подлежит лечению, а также таких факторов, как возраст, пол и вес субъекта, которого лечат, а также пути введения. Также должное внимание следует уделить свойствам композиции, например, ее активности связывания и времени нахождения в плазме крови *in-vivo*, концентрации антитела или связывающего элемента в составе, а также пути, месту и скорости доставки.

25 Схемы приема могут включать однократное введение антитела или композиции согласно настоящему изобретению или введение нескольких доз антитела или композиции. Антитело или содержащие антитело композиции можно также вводить последовательно или раздельно с другими терапевтическими средствами и лекарственными препаратами, которые используют для лечения состояния, при котором

30 для лечения вводят антитело или связывающий элемент согласно настоящему изобретению.

Примеры схем приема, которые можно назначать субъекту, можно выбрать из группы, содержащей без ограничения от 1 мкг/кг/сутки вплоть до 20 мг/кг/сутки, от 1 мкг/кг/сутки вплоть до 10 мг/кг/сутки, от 10 мкг/кг/сутки вплоть до 1 мг/кг/сутки.

35 Согласно определенным вариантам осуществления доза будет такой, чтобы получить концентрацию антитела в плазме крови от 1 мкг/мл до 100 мкг/мл. Однако фактическая доза вводимой композиции и частота и длительность введения будут зависеть от природы и тяжести состояния, подлежащего лечению. Назначение лечения, например, выбор дозировки и т.д., в конечном счете, находится в пределах ответственности и

40 осуществляется по усмотрению практикующих ветеринарных врачей и других врачей-ветеринаров, и для него, как правило, учитывается нарушение, подлежащее лечению, состояние конкретного пациента, место доставки, способ введения и другие факторы, известные практикующим врачам.

Определения

45 Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значение обычно понятное лицу, которое является специалистом в области техники настоящего изобретения.

По всему описанию, если контекст не требует иного, термины "содержат" или

"включают" или варианты, такие как "содержит" или "содержащий", "включает" или "включающий" следует понимать как предполагающие включение указанного целого или группы целых, а не исключение любого другого целого или группы целых.

Используемые в настоящем документе термины, приведенные в формах

5 единственного числа включают соответствующие формы множественного числа, если контекст явно не требует иного. Таким образом, например, ссылка на "активное средство" или "фармацевтически активное средство" включает одно активное средство, а также два или более различных активных средств в сочетании, тогда как ссылки на "носитель" включают смеси двух или более носителей, а также один носитель и т.п.

10 Как определено в настоящем документе, термин "боль" означает неприятное чувственное и эмоциональное переживание, связанное с фактическим или возможным повреждением ткани или описанное в отношении такого повреждения.

15 В отношении операционной или послеоперационной боли Акт о защите прав животных в США (US Animal Welfare Act) (Animal Welfare Act 2002. AWA regulations, CFR, Title 9 (Animals и Animal Products), Chapter 1 (Animal и Plant Health Inspection Service, Department of Agriculture). Subchapter A (Animal Welfare), Parts 1-4) определяет болезненную процедуру как любую процедуру, которая, как обосновано ожидается, вызовет быть сильнее незначительной или кратковременной боли или страдания у человека, в отношении которого применялась эта процедура, то есть, боль, превышающая таковую, 20 вызванную инъекциями или другими несущественными процедурами. Таким образом, если кошка подвергается болезненной хирургической процедуре, животное должно получить послеоперационные анальгезирующие средства.

25 В другом случае кошка может испытывать значительную или хроническую боль в результате связанного медицинского состояния, такого как артрит, например ревматоидный артрит, воспаление, остеоартрит или раковое или злокачественное состояние.

30 Термин "ноцицепция" относится к восприятию болевых стимулов. Как определено в настоящем документе, 'нейропатическая боль' (также известная как 'невралгия') представляет собой боль, которая происходит от проблем с сигналами от нервов. Она может возникать как следствие повреждения или заболевания, поражающего соматосенсорную систему. Существуют причины нейропатической боли, и она может быть связана с ненормальными воспринимаемыми ощущениями, называемыми дисэстезией, которые возникают спонтанно. В качестве альтернативы, она может быть связана с аллодинией, которая проявляется при появлении боли, или, что хуже, при 35 прикосновении или стимуле, который в норме не должен был вызывать боль. Например, легкое прикосновение к лицу может стать причиной возникновения боли при невралгии тройничного нерва, или давление постельного белья может стать причиной возникновения боли при диабетической нейропатии. Нейропатическая боль может также возникать в результате аллодинии при появлении боли, или, что хуже, при 40 прикосновении или стимуле, который в норме не должен был вызывать боль. Например, легкое прикосновение к лицу может стать причиной возникновения боли при невралгии тройничного нерва. Нейропатическая боль, относящаяся к гипералгезии, означает, что сильная боль возникает в результате стимула или прикосновения, который в норме вызвал бы лишь незначительный дискомфорт, тогда как парестезия означает, что 45 некомфортные или болезненные ощущения возникают даже при отсутствии контакта с областью чего либо, вызывающего боль, например, булавки и иглы. Другие формы нейропатической боли включают зуд или чесотку, которые могут быть связаны с аллергической или воспалительной реакциями на коже и воспалительной болью,

возникающей в результате повреждения ткани и процессов заживления.

Как определено в настоящем документе, термин "нейтрализующее NGF антитело" или подобный описывает антитело, которое способно к нейтрализации биологической активации и передачи сигнала NGF. Нейтрализующее антитело, которое также можно назвать антагонистическим антителом или блокирующим антителом, специфично и предпочтительно селективно связывается с NGF и подавляет одну или несколько биологических активностей NGF. Например, нейтрализующее антитело может подавлять связывание NGF с его целевым лигандом, таким как связанные с клеточной мембраной рецепторы TrkA или p75.

Термин "гипервариабельный участок (CDR)", который используется в настоящем документе, относится к аминокислотным последовательностям, которые вместе определяют связывающую способность и специфичность природного Fv участка связывающего сайта нативного иммуноглобулина, которые определены Kabat и соавт. (Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H., Gottesman, K. and Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242).

Термин "каркасный участок (FR)", который используется в настоящем документе, относится к аминокислотным последовательностям, расположенным между CDR. Эти части антитела служат для поддержания CDR в соответствующей ориентации (это дает возможность CDR связывать антиген). Термин "константный участок (CR)", который используется

в настоящем документе, относится к части молекулы антитела, которая предоставляет эффекторные функции. В настоящем изобретении константные участки, как правило, означают кошачьи константные участки, то есть такие константные участки рассматриваемых фелинизированных антител, которые происходят из кошачьих иммуноглобулинов. Константный участок тяжелой цепи может быть выбран из любого кошачьего изотипа константного домена тяжелой цепи.

Термин "химерное антитело", который используется в настоящем документе, относится к антителу, содержащему последовательности, происходящие из двух различных антител, которые, как правило, принадлежат к различным видам. Как правило, химерные антитела содержат вариабельные домены, происходящие из вида-донора, которые специфично связываются с целевым эпитопом, и константные домены, происходящие из антител, полученных из целевого вида, которому нужно вводить это антитело. Химерные антитела согласно настоящему изобретению содержат вариабельные домены тяжелой и легкой цепи, происходящие из крысиного антитела, и константные домены легкой и тяжелой цепи, происходящие из кошачьих антител.

Термин "иммуногенность", который используется в настоящем документе, относится к мере способности нацеливающего белка или терапевтического фрагмента вызывать иммунный ответ (гуморальный или клеточный) при введении реципиенту. Настоящее изобретение относится к иммуногенности рассматриваемых фелинизированных антител. Предпочтительно, антитела согласно настоящему изобретению не обладают иммуногенностью, то есть при введении кошке против них не будут вырабатываться нейтрализующие антитела и, кроме того, Fc участками антитела не будут опосредоваться эффекторные функции.

Термин "идентичность" или "идентичность последовательности", который используется в настоящем документе, означает, что в любом конкретном положении аминокислотного остатка в выравниваемой последовательности аминокислотный остаток является идентичным в выравниваемых последовательностях. Термин "сходство" или "сходство последовательности", который используется в настоящем документе, указывает на то, что в любом конкретном положении в выравниваемых

последовательностях аминокислотный остаток в последовательностях представляет собой таковой подобного типа. Например, лейцин может быть замещен остатком изолейцина или валина. Это может относиться к консервативному замещению.

Предпочтительно, когда аминокислотные последовательности согласно настоящему

изобретению модифицированы посредством консервативного замещения любого из аминокислотных остатков, содержащихся в них, при этом эти изменения не оказывают воздействия на специфичность связывания или функциональную активность получаемого в результате антитела по сравнению с немодифицированным антителом.

Идентичность последовательности в отношении (нативного) полипептида согласно

настоящему изобретению и его функциональных производных относится к проценту аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые являются идентичными остаткам соответствующего нативного полипептида после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если необходимо, для достижения максимальной процентной гомологии и без учета любых консервативных замен как части идентичности

последовательности. Ни N- или C-концевые продолжения, ни вставки не должны рассматриваться как снижение идентичности последовательности или гомологии. Способы и компьютерные программы для проведения выравнивания двух или более аминокислотных последовательностей и определения их идентичности или гомологии последовательности являются хорошо известными специалисту в настоящей области

техники. Например, процент идентичности или сходства 2 аминокислотных последовательностей можно легко рассчитать с использованием алгоритмов, например, BLAST (Altschul et al. 1990), FASTA (Pearson & Lipman 1988) или алгоритма Смита-Вассермана (Smith & Waterman 1981).

Используемая в настоящем документе ссылка на аминокислотный остаток с

"наибольшей гомологией" со вторым аминокислотным остатком относится к аминокислотному остатку, большинство характеристик или свойств которого подобны второму аминокислотному остатку. При определении того, характеризуется ли аминокислотный остаток наибольшей гомологией со вторым аминокислотным остатком, как правило, можно оценивать такие факторы, как, без ограничения, заряд, полярность, гидрофобность, масса боковой цепи и размер боковой цепи.

Термин "соответствующее положение", который используется в настоящем документе в отношении аминокислотного остатка, который присутствует во второй последовательности в положении, соответствующем определенному аминокислотному остатку в первой последовательности, как предполагается, относится к положению во второй последовательности, которое является таким же, как и положение в первой последовательности, когда две последовательности выравнивают с обеспечением максимальной идентичности последовательности в двух последовательностях. Аминокислотные остатки в соответствующих положениях характеризуются одинаковыми номерами по Kabat.

Термин "состоит, по существу, из" или "состоящий, по существу, из", который используется в настоящем документе, означает, что полипептид может характеризоваться дополнительными признаками или элементами, помимо описанных, при условии, что такие дополнительные признаки или элементы не оказывают существенного влияния на способность антитела или фрагмента антитела обладать специфичностью связывания с кошачьим NGF. То есть, антитело или фрагменты антитела, содержащие полипептиды могут характеризоваться дополнительными признаками или элементами, которые не препятствуют способности антитела или фрагментов антитела связываться с кошачьим NGF и оказывать антагонистическое

воздействие на функциональную активность кошачьего NGF. Такие модификации можно ввести в аминокислотную последовательность с целью снижения иммуногенности антитела. Например, полипептид, состоящий, по существу, из определенной последовательности, может содержать одну, две, три, четыре, пять или более

5 присоединенных, удаленных или замещенных аминокислот на любом из концов или на обоих концах последовательности при условии, что эти аминокислоты не препятствуют подавляющей, блокирующей или нарушающей роли антитела или фрагмента при связывании с кошачьим NGF и ограничении его биологической функции. Подобным образом, молекулу полипептида, которая входит в состав антагонистических

10 антител против кошачьего NGF согласно настоящему изобретению, можно химически модифицировать одной или несколькими функциональными группами при условии, что такие функциональные группы не препятствуют способности антитела или фрагмент антитела связываться с кошачьим NGF и оказывать антагонистическое воздействие на его функцию.

15 Используемый в настоящем документе термин "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" означает количество средства, связывающего соединения, малой молекулы или слитого белка согласно настоящему изобретению, которое требуется для устранения связывания кошачьего NGF с рецепторами p75 и/или TrkA.

20 Термины "полипептид", "пептид" или "белок" используются в настоящем документе взаимозаменяющими для обозначения линейного ряда аминокислотных остатков, соединенных друг с другом пептидными связями между альфа-амино- и карбокси-группами смежных остатков. Аминокислотные остатки обычно находятся в природной "L" изомерной форме. Однако, остатки в "D" изомерной форме могут замещать любой

25 L-аминокислотный остаток при условии, что полипептидом сохраняется необходимое функциональное свойство.

Как определено в настоящем документе, "антитело" охватывает антигены связывающие белки, которые специфично связываются с представляющим интерес целевым антигеном, в этом случае кошачьим фактором роста нервов, включающие один или несколько 30 полипептидов, которые могут быть рекомбинантно полученными или которые являются генетически кодируемыми генами иммуноглобулинов или фрагментами генов иммуноглобулинов. Термин "антитело" охватывает моноклональные и химерные антитела, в частности эквинизированные антитела, а также охватывает поликлональные антитела или антитела любого класса или подтипа. "Антитело", кроме того, 35 распространяется на гибридные антитела, биспецифичные антитела, гетероантитела и на их функциональные фрагменты, которые сохраняют способность к связыванию антигена.

Фраза "специфично связывается с" относится к связыванию антитела со специфическим белком или мишенью, которые присутствуют в гетерогенной популяции 40 белков. Следовательно, когда они присутствуют в конкретных условиях иммунологического анализа, антитела связываются с конкретным белком, в этом случае кошачьим NGF, и не связываются в существенном количестве с другими белками, присутствующими в образце.

Как определено в настоящем документе, "кошка" может также называться котом. 45 Кошек можно классифицировать как относящихся к подвиду с биномиальным названием *Felis catus*, который включает *Felis catus domestica* и *Felis silvestris catus*.

Кошки включают любого одомашненного кота и включают домашние породы и разновидности домашней кошки, их также называют домашними животными или

животными-компаньонами.

Настоящее изобретение будет далее описано со ссылкой на следующие примеры, которые обеспечены с целью иллюстрации, и не предполагается, что они будут рассматриваться как ограничивающие настоящее изобретение.

5 ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение химерного антитела и его характеристика

Последовательности легкой цепи (SEQ ID NO: 1 (feN-chi-LC1) и тяжелой цепи (SEQ ID NO: 2 (feN-chi-HC2) коэкспрессировали из векторов pcDNA3.1 в СНО клетках и супернатант исследовали (неразбавленный или в разведении 1:10) в отношении 10 связывания с кошачьим и мышным NGF с помощью ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ) с использованием коньюгата вторичное поликлональное антитело против кошачьего IgG-HRP. Имитирующий супернатант от СНО клеток, трансфицированных только вектором pcDNA3.1, использовали в качестве контроля (имитация).

15 Результаты показаны на фиг. 1 (1A - связывание с кошачьим NGF, 1B - связывание с мышным NGF). Результаты показывают, что четкий сигнал обнаруживали при связывании химерным моноклональным антителом (Mab) против NGF как кошачьего, и так и мышного NGF.

Супернатант очищали с использованием колонки для аффинной хроматографии с 20 белком А, и элюированный пик идентифицировали по поглощению УФ-лучей, и анализировали с помощью SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия). Результаты показаны на фиг. 2. На фиг. 2A показано, что химерное антитело может быть очищено на белке А. На фиг. 2B показано химерное кошачье MAb, идентифицированное по присутствию как тяжелых, так и 25 легких цепей в окрашенном геле.

Пример 2. Получение фелинизированных антител

Последовательности целого антитела получали путем объединения фелинизированных последовательностей вариабельного домена с С-концевыми последовательностями кошачьих константных доменов тяжелой или константных доменов легкой цепи.

30 Объединенные аминокислотные последовательности превращали в экспрессируемую в клетках млекопитающих форму с помощью оптимального выбора кодонов и химического синтеза полного гена и клонирования в вектор экспрессии в клетках млекопитающих pcDNA3.1+.

Полученные в результате кДНК трансфицировали в СНО клетки и супернатанты 35 анализировали, как подробно описано в следующих примерах.

Пример 3. Определение связывания фелинизированных антител с NGF

Комбинации кДНК фелинизированных тяжелых (SEQ ID NO: 6) и легких цепей (SEQ ID NO: 5) трансфицировали в СНО клетки, супернатанты собирали и обеспечивали их реакцию в формате ELISA либо с кошачьим, либо с мышным NGF. После стадий 40 инкубирования и отмычки связанное фелинизированное антитело выявляли по способности реагировать с козьим поликлональным антителом, специфичным к кошачьему IgG, связанным с пероксидазой хрена (HRP) и проявляли с использованием ТМВ (тетраметилбензидин). Оптическую плотность полученного в результате продукта измеряли при 450 нм и сравнивали с таковой у имитирующего супернатанта с 45 трансфекцией пустым вектором (обозначенным "имитация" на фиг. 1).

Результаты показаны на фиг. 3. На фиг. 3A показано, что фелинизированное антитело связывается с кошачьим NGF. На фиг. 3B показано, что фелинизированное антитело связывается с мышным NGF с той же аффинностью, с какой связывается с кошачьим

NGF.

Пример 4. Анализ очищенных фелинизированных антител с использованием SDS-PAGE

Супернатанты от трансфицированных CHO клеток с фелинизированным MAЬ

5 против NGF из примера 3 очищали с использованием колонки для аффинной хроматографии с белком А, и элюированный пик идентифицировали по поглощению в УФ-свете, и анализировали с помощью SDS-PAGE. (LHS) Профиль очистки MAЬ из CHO клеток, котрансфицированных конструкциями экспрессии feN-HC2 и feN-kLC1, с помощью аффинной хроматографии с белком А. (RHS) Результаты SDS-PAGE с 10 окрашиванием кумасси синим для пиковой фракции. Наблюдали некоторую незначительную деградацию легкой цепи.

Результаты показаны на фиг. 4. На фиг. 4А показано, что фелинизированное антитело может быть очищено с помощью белка А. На фиг. 4 В показан гель с полосами, представляющими тяжелую и легкую цепи фелинизированного антитела (feN-chi-HC2 15 тяжелая цепь IgG2) и feN-chi-kLC (легкая цепь)).

Пример 5. Подавление индуцируемой NGF пролиферации TF-1 клеток фелинизированными антителами

Последовательно разведенные супернатанты от трансфицированных CHO клеток из примера 4 ('антагонист') инкубировали с TF-1 клетками в присутствии 0,3 нг/мл NGF.

20 Получаемую в результате пролиферацию измеряли по включению тимицина.

Результаты, показанные на фиг. 5, демонстрируют явное подавление индуцируемой NGF пролиферации супернатантами от трансфицированных CHO клеток с фелинизированным MAЬ против NGF.

Пример 6. Осаждение комплемента, вызванное захваченными антигенами

25 фелинизированными антителами

Супернатанты от трансфицированных CHO клеток из примера 4 инкубировали в планшетах, покрытых 0,1 нг/мл NGF для захвата антител. Планшеты отмывали и затем инкубировали с человеческой сывороткой и связанный комплемент C1q измеряли по связыванию с поликлональным антителом против человеческого C1q с HRP и проявляли 30 как описано выше.

Способ связывания комплемента

Планшеты покрывали 100 мкл/лунку мышного NGF в концентрации 5 мкг/мл и блокировали 5% BSA/PBS (бычий сывороточный альбумин/фосфатный буферный раствор). Покрытые лунки инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре

35 с супернатантами от клеточных культур, содержащими рекомбинантный фелинизированный IgG против NGF, разводили PBS/1% BSA (100 мкл/лунка). Планшеты отмывали и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре со 100 мкл/лунку человеческой сыворотки, разведенной 1/100 в стабилизированном вероналовым буфером солевом растворе, содержащем 0,5 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 0,05% Tween-20,

40 0,1% желатин и 0,5% BSA. После отмычки планшеты инкубировали с 100 мкл овечьего антитела Clq-HRP (Serotec) при разведении 1/800 в PBS/1% BSA. После отмычки планшеты проявляли путем добавления 100 мкл субстрата TMB (Thermo Scientific). Проявку останавливали добавлением 100 мкл 2N H₂SO₄ и поглощение считывали при 450 нм.

45 Результаты показаны на фиг. 6. Результаты неожиданно показывают, что фелинизированные антитела с тяжелой цепью feN-chi-HC2 (IgG2) являются неактивными при фиксации комплемента. Соответственно, в настоящем документе демонстрируется, достаточно неожиданно, что в тех случаях, когда антитело согласно настоящему

изобретению характеризуется происходящей из кошки тяжелой цепью HC2-подтипа, связывание антитела с кошачьим NGF не приводит в результате к активации комплемента или другим последующим эффекторным функциям, таким как ADCC. Следовательно, указанные антитела при антагонистическом воздействии на

5 биологическую функциональную активность кошачьего NGF путем предотвращения связывания кошачьего NGF с мембраносвязанными рецепторами TrkA или p75 подавляют связанный каскад последующей внутриклеточной передачи сигнала. Более того, поскольку экспрессия NGF часто имеет место вблизи нервов и т.п., способность оказывающих антагонистическое или нейтрализующее воздействие на NGF антител

10 согласно настоящему изобретению, которые характеризуются происходящей из HC2 (IgG2) кошки тяжелую цепь, ограничивать биологическую активность кошачьего NGF без вовлечения значительного иммунного ответа является очень желательной и при этом неожиданной.

15 Пример 7. Дополнительные вариантные формы моноклональных антител против кошачьего NGF

В таблицах 1-8 иллюстрируется, что полностью кошачьи версии антител против NGF можно создать с помощью технологии PETisation путем сравнения с ограниченным набором последовательностей кошачьих иммуноглобулинов (особенно кошачьих легких цепей, в этом случае для сравнения использовали одну легкую цепь). Путем

20 прямого секвенирования и поиска информации в базах данных получали дополнительные кДНК каппа легкой и тяжелой цепи кошачьего иммуноглобулина и их использовали для сравнения с последовательностями антитела α D11. В таблицах 9-16 показано, что добавление этих последовательностей к сравнению повышает число

25 гомологичных совпадений между крысиным α D11 и кошачьим IgG и, таким образом, сокращает количество изменений, необходимых для превращения последовательностей каркасных участков вариабельного домена α D11 в фелинизованные варианты.

Таблицы 9-16 включают варианты последовательностей из таблиц 1-8 как последовательности из "набора 1" и дополнительные последовательности от впервые проведенного секвенирования кДНК и поиска в базах данных как кошачьи

30 последовательности из "набора 2". Предпочтительные последовательности каркасных участков фелинизованных антител против NGF из таблиц 1-8 помечены как "feN" и предпочтительные последовательности каркасных участков фелинизованных антител против NGF при сравнении с кошачьими последовательностями из "набора 2" помечены как "feN2". Альтернативные белковые последовательности тяжелой (feN2 - VH) и каппа

35 легкой цепи (feN2-Vk) кошачьего иммуноглобулина против NGF показаны на фиг. 13, 14, 15 и 16 (SEQ ID NO: 22-25).

Таблица 9.

Остатки FR1 вариабельного домена легкой цепи						
Номер остатка в FR1 Vk-аппа	Номер по Kabat	Набор 1 кошачьих FR1 Vk	Набор 2 кошачьих FR1 Vk	Крысиное α D11	feN-kLC	feN2-kLC
40 1	1	D	DEN	D	D	D
2	2	I	VIPT	I	I	I
3	3	V	VEM	Q	V	E
4	4	M	MLI	M	M	M
45 5	5	T	T	T	T	T
6	6	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	T	TS	S	T	S
8	8	P	P	P	P	P
9	9	L	L	A	L	L

10	10	S	SF	S	S	S
11	11	L	L	L	L	L
12	12	S	SPA	S	S	S
13	13	V	V	A	V	V
14	14	T	TIA	S	T	T
15	15	P	P	L	P	P
16	16	G	G	G	G	G
17	17	E	ED	E	E	E
18	18	P	PSA	T	P	S
19	19	A	AV	V	A	V
20	20	S	S	T	S	S
21	21	A	IF	I	I	I
22	22	S	SF	E	S	S
23	23	C	C	C	C	C

Таблица 10.

Остатки FR2 вариабельного домена легкой цепи

Номер остатка в FR2VK	Номер по Kabat	Набор 1 кошачьих FR2V _k	Набор 2 кошачьих FR2V _k	Крысиное aD11	feN-kLC	feN2-kLC
1	36	W	W	W	W	W
2	37	Y	YF	Y	Y	Y
3	38	L	LFR	Q	L	L
4	39	Q	Q	Q	Q	Q
5	40	K	KR	к	K	K
6	41	P	P	P	P	P
7	42	G	G	G	G	G
8	43	Q	QR	K	Q	R
9	44	S	S	S	S	S
10	45	P	P	P	P	P
11	46	R	R	Q	R	R
12	47	R	RL	L	R	L
13	48	L	L	L	L	L
14	49	I	IM	I	I	I
15	50	Y	YHA	Y	Y	Y

Таблица 11.

Остатки FR3 вариабельного домена легкой цепи

Номер остатка в FR3VK	Номер по Kabat	Набор 1 кошачьих FR3V _k	Набор 2 кошачьих FR3V _k	Крысиное aD11	feN-kLC	feN2-kLC
1	66	G	GR	G	G	G
2	67	V	V	V	V	V
3	68	P	P	P	P	P
4	69	D	D	S	D	D
5	70	R	R	R	R	R
6	71	F	FI	F	F	F
7	72	S	ST	S	S	S
8	73	G	G	G	G	G
9	74	S	S	S	S	S
10	75	G	G	G	G	G
11	76	S	S	S	S	S
12	77	G	G	G	G	G
13	78	T	TAS	T	T	T
14	79	D	D	Q	D	D
15	80	F	F	Y	F	F
16	81	T	TIA	S	T	T
17	82	L	L	L	L	L
18	82A	R	RTK	K	R	K

19	82B	I	I	I	I	I
20	82C	S	SAGT	N	S	S
21	83	R	RG	S	R	R
22	84	V	VM	L	V	V
23	85	E	EQ	Q	E	Q
24	86	A	AVPT	S	A	T
25	87	D	DE	E	D	E
26	88	D	D	D	D	D
27	89	V	V	V	V	V
28	90	G	G	A	G	G
29	91	V	VIHL	S	V	V
30	92	Y	Y	Y	Y	Y
31	93	F	YF	F	F	F
32	94	C	C	C	C	C

Таблица 12.

Остатки FR4 вариабельного домена легкой цепи

Номер остатка в FR4VK	Номер по Kabat	Набор 1 кошачьих FR4V _k	Набор 2 кошачьих FR4V _k	Крысиное aD11	feN-kLC	feN2-kLC
1	103	F	FS	F	F	F
2	104	G	G	G	G	G
3	105	P	QP	G	P	Q
4	106	G	G	G	G	G
5	107	T	T	T	T	T
6	108	K	KHQEST	K	K	K
7	109	L	L	L	L	L
8	110	E	ED	E	E	E
9	111	I	IVML	L	I	L
10	112	K	KRDT	K	K	K

Таблица 13.

Остатки FR1 вариабельного домена тяжелой цепи

Номер остатка в FR1 VH	Номер по Kabat	Набор 1 кошачьих FR1 VH	Набор 2 кошачьих FR1VH	VH крысиного aD11	feN-VH	feN2-VH
1	1	QDH	QDE	Q	Q	Q
2	2	VE	VE	V	V	V
3	3	QL	LQR	Q	Q	Q
4	4	L	LV	L	L	L
5	5	V	VM	K	V	V
6	6	EQ	QED	E	E	E
7	7	S	S	S	S	S
8	8	G	G	G	G	G
9	9	GAR	AG	P	G	A
10	10	DE	EDN	G	D	E
11	11	LV	LVR	L	L	L
12	12	VRS	VRK	V	V	V
13	13	OK	KTQENR	Q	Q	Q
14	14	P	PT	P	P	P
15	15	GE	GE	S	G	G
16	16	GA	GATE	Q	G	E
17	17	S	SA	T	S	S
18	18	LV	LV	L	L	L
19	19	RKS	RKE	S	R	R
20	20	LI	ILP	L	L	L
21	21	TFS	FTS	T	T	T
22	22	C	C	C	C	C
23	23	AVMK	KVAQ	T	A	A

24	24	AT	ATD	V	A	A
25	25	S	S	S	S	S
26	26	G	GA	G	G	G

Таблица 14.

Остатки FR2 вариабельного домена тяжелой цепи						
Номер остатка в FR2 VH	Номер по Kabat	Набор 1 кошачьих FR2 VH	Набор 2 кошачьих FR2 VH	VH крьсиного α D11	feN-VH	feN2-VH
1	36	W	W	W	W	W
2	37	VLWFA	VLFI	V	V	V
3	38	RC	RCH	R	R	R
4	39	Q	Q	Q	Q	Q
5	40	APT	ASVT	A	A	A
6	41	P	P	T	P	P
7	42	GEA	GAES	G	G	G
8	43	KQT	QKE	R	K	K
9	44	G	G	G	G	G
10	45	LF	LFP	L	L	L
11	46	EQ	EQ	E	E	E
12	47	WET	WCL	W	W	W
13	48	MVL	VMI	M	M	M
14	49	GATS	GAS	G	G	G

Таблица 15.

Остатки FR3 вариабельного домена тяжелой цепи						
Номер остатка в FR3 VH	Номер по Kabat	Набор 1 кошачьих FR3 VH	Набор 2 кошачьих FR3 VH	VH крьсиного α D11	feN-VH	feN2-VH
1	66	R	RQK	R	R	R
2	67	LF	LF	L	F	L
3	68	TA	TI	T	T	T
4	69	ILV	LIMV	I	I	I
5	70	ST	ST	T	S	T
6	71	RAI	RATKGV	R	R	R
7	72	D	D	D	D	D
8	73	TNS	TNDAS	T	N	T
9	74	ASGT	SADT	S	A	S
10	75	KTRGQ	TKEQNR	K	K	K
11	76	ND	NDK	S	N	N
12	77	TA	TIA	Q	T	T
13	78	LA	ALVG	V	L	V
14	79	YDS	YFASVW	F	Y	F
15	80	LM	LM	L	L	L
16	81	QELR	EQDHV	K	Q	Q
17	82	MLT	LM	M	M	M
18	82A	NSDT	NSTDGRH	H	N	H
19	82 B	SINRT	SN	S	S	S
20	82C	L	L	L	L	L
21	83	KRGT	RKQT	Q	K	Q
22	84	STPA	STIAV	S	T	S
23	85	ETAD	EATDGS	E	E	E
24	86	D	D	D	D	D
25	87	TA	T	T	T	T
26	88	A	AGS	A	A	A
27	89	TVM	TVMIA	T	T	T
28	90	Y	YH	Y	Y	Y
29	91	YCF	YHF	Y	Y	Y
30	92	CR	C	C	C	C

31	93	AGITSV	ATVGLIM	A	A	A
32	94	RKSTIVPNG	R	R	R	R

Таблица 16.

Остатки FR4 вариабельного домена тяжелой цепи

Номер остатка в FR4 VH	Номер по Kabat	Набор 1 кошачьих FR4VH	Набор 2 кошачьих FR4VH	VH крысиного aD11	feN-VH	feN2-VH
1	103	WR	WRCL	W	W	W
2	104	GR	GA	G	G	G
3	105	QPVHR	QHRPV	Q	Q	Q
4	106	G	GD	G	G	G
5	107	TAIS	ATV	T	T	T
6	108	LIQ	LIQMST	T	L	T
7	109	V	VI	V	V	V
8	110	T	TAIR	T	T	T
9	111	V	VG	V	V	V
10	112	ST	SP	S	S	S
11	113	SQP	SQA	A	S	A

Пример 8. Моноклональные антитела против кошачьего NGF -безопасность и гипертермия

Моноклональные антитела против кошачьего NGF согласно настоящему изобретению экспрессируют в СНО клетках и очищают с помощью сочетания хроматографии с белком А и/или гель-хроматографии и подвергают замене буфера на фосфатно-солевой буферный раствор. Антитела вводят инъекцией внутривенно котам в дозе 0,01-10 мг/кг массы тела и оценивают в отношении признаков токсичности при визуальном осмотре ветеринаром, по изменению массы тела, температуры тела и по биохимическому анализу плазмы крови. Как и ожидалось, не наблюдалось каких-либо изменений в них или в любом из анализируемых образцов биохимического анализа плазмы крови.

Пример 9. Фармакокинетика в плазме крови для моноклональных антител против кошачьего NGF *in vivo* - период полувыведения из сыворотки крови и иммуногенность

Моноклональные антитела против кошачьего NGF согласно настоящему изобретению экспрессируют в СНО клетках и очищают с помощью сочетания хроматографии с белком А и/или гель-хроматографии и подвергают замене буфера на фосфатно-солевой буферный раствор. Антитела вводят инъекцией внутривенно котам в дозе в диапазоне 0,01-10 мг/кг массы тела и образцы плазмы крови берут в разные моменты времени в течение следующих 2 недель. Разведенные образцы плазмы крови оценивают в отношении концентрации антитела против кошачьего NGF с помощью ELISA с использованием NGF в качестве мишени и поликлонального антитела против кошачьих антител-пероксидазы хрена в качестве вторичного реагента. Измеренные концентрации в плазме соответствуют двухфазной кинетике с фазой распределения в тканях (альфа) и фазой выведения (бета) в несколько дней.

Ожидается отсутствие резкого падения концентрации антитела против кошачьего NGF в плазме крови между 100 и 300 часами. Это демонстрирует, что не присутствуют ни ранее существовавшие нейтрализующие антитела против рекомбинантных моноклональных антител против NGF в кошачьей крови, ни какие-либо нейтрализующие антитела, образовавшиеся после инфузии.

Пример 10. Моноклональные антитела против кошачьего NGF снижают воспалительную боль *in vivo*

Кошачья модель воспаления

Котам вводили инъекцией (=день -1) провоспалительное средство (например, каолин) в подушечку стопы одной лапы с целью создания саморазрешающегося воспаления,

начинающегося примерно 24 часа спустя, и которое вызывает временную хромоту котов. В этой модели, как только первоначальная воспалительная реакция на каолин пойдет на убыль, коты станут хромать все меньше в течение периода примерно 1-2 недели и затем восстановятся.

5 Группам котов вводили инъекцией внутривенно либо моноклональные антитела против кошачьего NGF по настоящему патенту в дозе 0,01-10 мг/кг массы тела, либо фосфатно-солевой буферный раствор в качестве контроля средой (= день 0). Котов оценивали в отношении хромоты в течение 4-14 дней с помощью способа визуальной оценки (например, оценка 0, нет хромоты (полная нагрузка на ногу); оценка 1, легкая 10 хромота (неполная нагрузка на ногу, но ходит нормально); оценка 2, умеренная хромота (незначительная нагрузка на ногу, и не ходит нормально); оценка 3, тяжелая хромота (без нагрузки на ногу)). Наблюдатели не были осведомлены относительно того, какую инъекцию получали те или иные коты.

15 Как и ожидалось, оценки хромоты снижались у котов, получавших моноклональные антитела против кошачьего NGF, ко 2-4 дню после инъекции в сравнении с контролем средой, указывая на то, что моноклональные антитела против кошачьего NGF будут оказывать воздействие на снижение боли у котов большее, нежели таковое наблюдаемое только со средой самой по себе.

20 Пример 11. Сравнительный пример, показывающий воздействие моноклональных антител против собачьего NGF на снижение воспалительной боли *in vivo*

Антителотерапия

Способ получения антител согласно настоящему изобретению использовали для получения каниницированного антитела, подходящего для применения у собак. Каниницированный VL домен αD11 объединяли с собачьим константным доменом 25 каппа легкой цепи и каниницированный VH домен αD11 объединяли с изотипом собачьей тяжелой цепи. Моноклональные антитела против собачьего NGF, полученные из векторов экспрессии, экспрессирующих тяжелую и легкую цепи, экспрессировали в СНО клетках и очищали с помощью сочетания ионообменной хроматографии, гидрофобной хроматографии и гель-хроматографии и подвергали замене буфера на 30 фосфатно-солевой буферный раствор.

Собачья модель воспаления

Все эксперименты выполняли с предварительным утверждением ведомственного этического комитета (Institutional Ethics Committee) (CRL, Ирландия). Собакам породы бигль вводили инъекцией (= день -1) каолин в подушечку стопы задней конечности с 35 целью создания саморазрешающегося воспаления, начинающегося примерно 24 часа спустя, и которое вызывает временную хромоту собак. В этой модели, как только первоначальная воспалительная реакция на каолин пойдет на убыль, собаки станут хромать все меньше в течение периода примерно 1-2 недели и затем полностью восстановятся.

40 Группам из 3 собак вводили инъекцией внутривенно либо моноклональные антитела против собачьего NGF в дозе 200 мкг/кг массы тела, либо фосфатно-солевой буферный раствор в качестве контроля средой (=день 0). Собак оценивали в отношении хромоты в течение 7 дней с помощью способа визуальной оценки (например, оценка 0, нет хромоты (полная нагрузка на ногу); оценка 1, легкая хромота (неполная нагрузка на ногу, но ходит нормально); оценка 2, умеренная хромота (незначительная нагрузка на ногу, и не ходит нормально); оценка 3, тяжелая хромота (без нагрузки на ногу)). Наблюдатели не были осведомлены относительно того, какую инъекцию получали те или иные собаки.

Результаты показаны на фиг. 17. Оценки хромоты снижались у собак, получавших моноклональные антитела против NGF, к 3 дню после инъекции в сравнении с контролем средой, указывая на то, что моноклональные антитела против NGF оказывают воздействие на снижение боли у собак большее, нежели таковое, наблюдаемое только со средой самой по себе. Отложенная активность соответствует фармакокинетике в плазме крови для моноклональных антител против собачьего NGF, которые демонстрировали медленное распределение в тканях в ходе фазы (альфа), длившейся примерно 30 часов, и относительно слабую вакскуляризацию области подушечки стопы. Результаты, показанные на фиг. 17, показывают, что антитела против собачьего NGF, полученные с помощью способа, соответствующего способу согласно настоящему изобретению, снижают воспалительную боль у собак с вытекающим снижением хромоты.

Все документы, упоминаемые в настоящем описании, включены в настоящий документ с помощью ссылки. Различные модификации и изменения в описанных вариантах осуществления настоящих изобретений будут очевидны специалисту в настоящей области техники без отступления от объема настоящего изобретения. Хотя настоящее изобретение было описано в связи с конкретными предпочтительными вариантами осуществления, следует понимать, что заявленное изобретение не следует излишне ограничивать такими конкретными вариантами осуществления. В действительности, различные модификации описанных методов осуществления изобретения, которые являются очевидными для специалиста в настоящей области техники, как предполагается, охватываются настоящим изобретением.

(57) Формула изобретения

1. Способ получения антитела, подходящего для применения у кошки, включающий стадии:

- получения донорного антитела вида, отличного от кошки, причем донорное антитело характеризуется специфичностью связывания в отношении целевого антигена, присутствующего у кошек;
- сравнения каждого аминокислотного остатка в аминокислотной последовательности каркасных участков донорного антитела с каждым аминокислотным остатком, присутствующим в соответствующем положении в аминокислотной последовательности каркасных участков пула кошачьих антител, для идентификации одного или нескольких аминокислотных остатков в пределах аминокислотной последовательности каркасных участков донорного антитела, которые отличаются от одного или нескольких аминокислотных остатков в соответствующем положении в пределах аминокислотной последовательности каркасных участков пула кошачьих антител; и

- замещения одного или нескольких идентифицированных аминокислотных остатков в донорном антителе одним или несколькими аминокислотными остатками, присутствующими в соответствующем положении в пуле кошачьих антител, для получения модифицированного антитела,

при этом модифицированное антитело не содержит в любом положении в пределах каркасных участков какую-либо аминокислоту, которая будет чужеродной в соответствующем положении у кошек; и

при этом модифицированное антитело способно специфично связываться с кошачьим фактором роста нервов (NGF) и ограничивать способность кошачьего NGF связываться с рецептором кошачьего NGF p75 или TrkA.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые способны специфично

связываться с кошачьим фактором роста нервов (NGF) и ограничивать способность кошачьего NGF связываться с рецептором кошачьего NGF p75 или TrkA, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 5 аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью с ней, и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью с ней;

10 при этом вариабельный участок легкой цепи содержит последовательность CDR1, включающую RASEDIYNA-LA (остатки 24-34 в SEQ ID NO: 3), последовательность CDR2, включающую NTDTLHT (остатки 50-56 в SEQ ID NO: 3), и последовательность CDR3, включающую HYFHYPRT (остатки 90-97 в SEQ ID NO: 3),

15 при этом вариабельный участок тяжелой цепи содержит последовательность CDR1, включающую NNNVN (остатки 31-35 в SEQ ID NO: 4), последовательность CDR2, включающую GVWAGGATDYNALK (остатки 50-64 в SEQ ID NO: 4), и последовательность CDR3, включающую DGGYSSSTLYAMDA (остатки 98-111 в SEQ ID NO: 4), и

20 при этом модифицированное антитело не содержит в любом положении в пределах каркасных участков какую-либо аминокислоту, которая будет чужеродной в соответствующем положении у кошек.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, в которых вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и 25 вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, в которых легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью с ней, и тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или 30 аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с ней.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 4, в которых легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 и тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

35 6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, в которых легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью с ней, и тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% 40 идентичностью последовательности с ней.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, в которых вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью с ней, и вариабельный участок тяжелой цепи содержит 45 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью с ней.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, в которых вариабельный

участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 и вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые способны специфично

5 связываться с кошачьим фактором роста нервов (NGF) и ограничивать способность кошачьего NGF связываться с рецептором кошачьего NGF p75 или TrkA, в которых антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный участок легкой цепи, содержащий:

каркасный участок FR1, состоящий из или содержащий аминокислотную

10 последовательность SEQ ID NO: 26 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью с ней,

каркасный участок FR2, состоящий из или содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью с ней,

15 каркасный участок FR3, состоящий из или содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью с ней, и

каркасный участок FR4, состоящий из или содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29 или аминокислотную последовательность, которая

20 характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью с ней,

при этом вариабельный участок легкой цепи содержит последовательность CDR1, включающую RASEDIYNA-LA (остатки 24-34 в SEQ ID NO: 3), последовательность CDR2, включающую NTDTLHT (остатки 50-56 в SEQ ID NO: 3), и последовательность CDR3, включающую HYFHYPRT (остатки 90-97 в SEQ ID NO: 3),

25 и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий:

каркасный участок FR1, состоящий из или содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью с ней,

каркасный участок FR2, состоящий из или содержащий аминокислотную

30 последовательность SEQ ID NO: 31 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью с ней,

каркасный участок FR3, состоящий из или содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью с ней, и

35 каркасный участок FR4, состоящий из или содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью с ней;

при этом вариабельный участок тяжелой цепи содержит последовательность CDR1, включающую NNNVN (остатки 31-35 в SEQ ID NO: 4), последовательность CDR2,

40 включающую GVWAGGATDYNALK (остатки 50-64 в SEQ ID NO: 4), и

последовательность CDR3, включающую DGGYSSSTLYAMDA (остатки 98-111 в SEQ ID NO: 4), и

45 при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не содержит в любом положении в пределах каркасных участков какую-либо аминокислоту, которая будет чужеродной в соответствующем положении у кошек.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9, содержащие

вариабельный участок легкой цепи, содержащий:

каркасный участок FR1, состоящий из или содержащий аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 26,

каркасный участок FR2, состоящий из или содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27,

каркасный участок FR3, состоящий из или содержащий аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 28, и

каркасный участок FR4, состоящий из или содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29,

и вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий:

каркасный участок FR1, состоящий из или содержащий аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 30,

каркасный участок FR2, состоящий из или содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31,

каркасный участок FR3, состоящий из или содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, и

каркасный участок FR4, состоящий из или содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2 или 9, содержащие константные домены тяжелой цепи, выбранные из модифицированных посредством аминокислотной замены или делеции так, чтобы указанные константные домены не опосредовали последующие эффекторные функции.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 11, при этом антитело имеет кошачий константный домен НС2-типа.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 12, в которых тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с ней.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2 или 9 для применения в лечении боли, или для лечения, ослабления или подавления боли, вызванной иммуноопосредованным полиартритом, остеоартритом или ревматоидным артритом, или для лечения индуцируемой к пролиферации NGF опухоли у кошки.

15. Фармацевтическая композиция для лечения боли у кошек или для лечения, ослабления или подавления боли, связанной с остеоартритом, иммуноопосредованным полиартритом или ревматоидным артритом, или для лечения индуцируемой к пролиферации NGF опухоли у кошки, при этом композиция содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 2-13 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель.

16. Набор для лечения боли у кошек или для лечения, ослабления или подавления боли, связанной с остеоартритом, иммуноопосредованным полиартритом или ревматоидным артритом, или для лечения индуцируемой к пролиферации NGF опухоли у кошки, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 2-13 и инструкцию к его применению.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> NVIP Pty Ltd
 <120> АНТИЕЛА ПРОТИВ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ
 <130> P119712.WO.02
 <150> US61/483488
 <151> 2011-05-06
 <150> US61/531439
 <151> 2011-09-06
 <160> 33
 <170> PatentIn версия 3.5
 <210> 1
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> полная V+C легкая цепь химерного антитела
 <400> 1
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Asp Ala Gln
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Gln Pro Ser Leu Asp Glu Leu His Thr Gly
 115 120 125
 Ser Ala Ser Ile Val Cys Ile Leu Asn Asp Phe Tyr Pro Lys Glu Val
 130 135 140
 Asn Val Lys Trp Lys Val Asp Gly Val Val Gln Thr Lys Ala Ser Lys
 145 150 155 160

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

Ser Thr Leu Thr Met Ser Arg Thr Glu Tyr Gln Ser His Glu Lys Phe
 180 185 190

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

Phe Asn Arg Ser Glu Cys Gln Arg Glu
 210 215

<210> 2
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> полная V+C тяжелая цепь химерного антитела

<400> 2

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
 20 25 30

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

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

Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

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

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
 115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Thr Thr Ser Gly Ala Thr
 130 135 140

Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Leu Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

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

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

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

 His Pro Pro Gly Pro Lys Pro Cys Asp Cys Pro Lys Cys Pro Pro Pro
 225 230 235 240

 Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Ile Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255

 Asp Thr Leu Ser Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Leu Val Val
 260 265 270

 Asp Leu Gly Pro Asp Asp Ser Asp Val Gln Ile Thr Trp Phe Val Asp
 275 280 285

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

 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Leu His Gln Asp
 305 310 315 320

 Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Ser Lys Ser Leu
 325 330 335

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

 Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Ala Gln Glu Glu Leu Ser Arg
 355 360 365

 Asn Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Ile Lys Ser Phe His Pro Pro Asp
 370 375 380

 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ile Thr Gly Gln Pro Glu Pro Glu Asn Asn
 385 390 395 400

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

 Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Arg Ser His Trp Gln Arg Gly Asn Thr
 420 425 430

 Tyr Thr Cys Ser Val Ser His Glu Ala Leu His Ser His His Thr Gln
 435 440 445

Lys Ser Leu Thr Gln Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 3
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> вариабельный домен легкой цепи фелинлизированного антитела

<400> 3

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala
 20 25 30

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

Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Asp Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg
 85 90 95

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

<210> 4
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> вариабельный домен тяжелой цепи фелинлизированного антитела (НС происходит из BAA32229.1)

<400> 4

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

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

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

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50

55

60

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

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

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
 100 105 110

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

<210> 5
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> полная легкая цепь фелинизированного антитела

<400> 5

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala
 20 25 30

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

Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Asp Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg
 85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Leu Phe Gln Pro Ser Leu Asp Glu Leu His Thr Gly
 115 120 125

Ser Ala Ser Ile Val Cys Ile Leu Asn Asp Phe Tyr Pro Lys Glu Val
 130 135 140

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

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

Ser Thr Leu Thr Met Ser Arg Thr Glu Tyr Gln Ser His Glu Lys Phe
 180 185 190

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

Phe Asn Arg Ser Glu Cys Gln Arg Glu
 210 215

<210> 6
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полная тяжелая цепь фелинлизированного антитела (НС происходит из BAA32229.1)
 <400> 6

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

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

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

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

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

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

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
 115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Thr Thr Ser Gly Ala Thr
 130 135 140

Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Leu Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

165	170	175
Ala Val Leu Gln Ala Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr		
180	185	190
Val Pro Ser Ser Arg Trp Leu Ser Asp Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala		
195	200	205
His Pro Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Arg Lys Thr Asp		
210	215	220
His Pro Pro Gly Pro Lys Pro Cys Asp Cys Pro Lys Cys Pro Pro Pro		
225	230	235
Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Ile Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
245	250	255
Asp Thr Leu Ser Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Leu Val Val		
260	265	270
Asp Leu Gly Pro Asp Asp Ser Asp Val Gln Ile Thr Trp Phe Val Asp		
275	280	285
Asn Thr Gln Val Tyr Thr Ala Lys Thr Ser Pro Arg Glu Glu Gln Phe		
290	295	300
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Leu His Gln Asp		
305	310	315
Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Ser Lys Ser Leu		
325	330	335
Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro His		
340	345	350
Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Ala Gln Glu Glu Leu Ser Arg		
355	360	365
Asn Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Ile Lys Ser Phe His Pro Pro Asp		
370	375	380
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ile Thr Gly Gln Pro Glu Pro Glu Asn Asn		
385	390	395
Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Ser Asp Gly Thr Tyr Phe Val		
405	410	415
Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Arg Ser His Trp Gln Arg Gly Asn Thr		
420	425	430
Tyr Thr Cys Ser Val Ser His Glu Ala Leu His Ser His His Gln		

435

440

445

Lys Ser Leu Thr Gln Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 7
<211> 457
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> агликозилированная полная тяжелая цепь фенилизированного антитела
(модифицированная НС ВАА32229.1)

<400> 7

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

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

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

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

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

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

Arg Asp Gly Tyr Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Thr Thr Ser Gly Ala Thr
130 135 140

Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Leu Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

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

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

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

His Pro Pro Gly Pro Lys Pro Cys Asp Cys Pro Lys Cys Pro Pro Pro
 225 230 235 240

Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Ile Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255

Asp Thr Leu Ser Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Leu Val Val
 260 265 270

Asp Leu Gly Pro Asp Asp Ser Asp Val Gln Ile Thr Trp Phe Val Asp
 275 280 285

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

Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Leu His Gln Asp
 305 310 315 320

Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Ser Lys Ser Leu
 325 330 335

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

Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Ala Gln Glu Glu Leu Ser Arg
 355 360 365

Asn Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Ile Lys Ser Phe His Pro Pro Asp
 370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ile Thr Gly Gln Pro Glu Pro Glu Asn Asn
 385 390 395 400

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

Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Arg Ser His Trp Gln Arg Gly Asn Thr
 420 425 430

Tyr Thr Cys Ser Val Ser His Glu Ala Leu His Ser His His Thr Gln
 435 440 445

Lys Ser Leu Thr Gln Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 8
 <211> 23

<212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR1 легкой цепи
 <400> 8
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
 20
 <210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR2 легкой цепи
 <400> 9
 Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr
 1 5 10 15
 <210> 10
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR3 легкой цепи
 <400> 10
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys
 20 25 30
 Gln
 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR4 легкой цепи
 <400> 11
 Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10
 <210> 12
 <211> 30

<212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR1 тяжелой цепи

 <400> 12

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

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

 <210> 13
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR2 тяжелой цепи

 <400> 13

 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

 <210> 14
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR3 тяжелой цепи

 <400> 14

 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

 Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

 <210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR4 тяжелой цепи

 <400> 15

 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

 <210> 16
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>

<223> Химера альтернативной полной V+C тяжелой цепи (химерный константный домен альтернативной HC антитела против NGF BAA32230.1)

<400> 16

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
20 25 30

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

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

Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

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

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Thr Thr Ser Gly Ala Thr
130 135 140

Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Leu Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

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

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

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

His Pro Pro Gly Pro Lys Pro Cys Asp Cys Pro Lys Cys Pro Pro Pro
225 230 235 240

Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Ile Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Ser Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Leu Val Val
 260 265 270

Asp Leu Gly Pro Asp Asp Ser Asp Val Gln Ile Thr Trp Phe Val Asp
 275 280 285

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

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Leu His Gln Asp
 305 310 315 320

Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Ser Lys Ser Leu
 325 330 335

Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Asp Lys Gly Gln Pro His
 340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Ala Gln Glu Glu Leu Ser Arg
 355 360 365

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ile Thr Gly Gln Pro Glu Pro Glu Asn Asn
 385 390 395 400

Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Ser Asp Gly Thr Tyr Phe Leu
 405 410 415

Tyr Ser Arg Leu Ser Val Asp Arg Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asn Thr
 420 425 430

Tyr Thr Cys Ser Val Ser His Glu Ala Leu His Ser His His Thr Gln
 435 440 445

Lys Ser Leu Thr Gln Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 17

<211> 457

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Альтернативная полная тяжелая цепь фелинлизированного антитела (V домен фелинлизированного антитела против NGF, слитый с константным доменом альтернативной HC BAA32230.1)

<400> 17

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

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

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

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

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

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

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
 115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Thr Thr Ser Gly Ala Thr
 130 135 140

Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Leu Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

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

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

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

His Pro Pro Gly Pro Lys Pro Cys Asp Cys Pro Lys Cys Pro Pro Pro
 225 230 235 240

Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Ile Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255

Asp Thr Leu Ser Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Leu Val Val
 260 265 270

Asp Leu Gly Pro Asp Asp Ser Asp Val Gln Ile Thr Trp Phe Val Asp
 275 280 285

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

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Leu His Gln Asp
 305 310 315 320

Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Ser Lys Ser Leu
 325 330 335

Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Asp Lys Gly Gln Pro His
 340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Ala Gln Glu Glu Leu Ser Arg
 355 360 365

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ile Thr Gly Gln Pro Glu Pro Glu Asn Asn
 385 390 395 400

Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Ser Asp Gly Thr Tyr Phe Leu
 405 410 415

Tyr Ser Arg Leu Ser Val Asp Arg Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asn Thr
 420 425 430

Tyr Thr Cys Ser Val Ser His Glu Ala Leu His Ser His His Thr Gln
 435 440 445

Lys Ser Leu Thr Gln Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 18

<211> 457

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Агликазилированная тяжелая цепь фелинлизированного антитела (V домен фелинлизированного антитела против NGF, сплитый с константным доменом альтернативной HC ВАА32230.1 с замещенным сайтом N-гликозилирования)

<400> 18

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

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

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

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

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

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

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
 115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Thr Thr Ser Gly Ala Thr
 130 135 140

Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Leu Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

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

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

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

His Pro Pro Gly Pro Lys Pro Cys Asp Cys Pro Lys Cys Pro Pro Pro
 225 230 235 240

Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Ile Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255

Asp Thr Leu Ser Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Leu Val Val
 260 265 270

Asp Leu Gly Pro Asp Asp Ser Asp Val Gln Ile Thr Trp Phe Val Asp
 275 280 285

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

Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Leu His Gln Asp
 305 310 315 320

Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Ser Lys Ser Leu
 325 330 335

Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Asp Lys Gly Gln Pro His
 340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Ala Gln Glu Glu Leu Ser Arg
 355 360 365

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ile Thr Gly Gln Pro Glu Pro Glu Asn Asn
 385 390 395 400

Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Ser Asp Gly Thr Tyr Phe Leu
 405 410 415

Tyr Ser Arg Leu Ser Val Asp Arg Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asn Thr
 420 425 430

Tyr Thr Cys Ser Val Ser His Glu Ala Leu His Ser His His Thr Gln
 435 440 445

Lys Ser Leu Thr Gln Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 19

<211> 457

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Атликовилированная химерная НС (происходящая из SEQ ID NO:2)

<400> 19

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
 20 25 30

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

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

Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

Lys Met His Ser Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85	90	95
Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp		
100	105	110
Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro		
115	120	125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Thr Thr Ser Gly Ala Thr		
130	135	140
Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Leu Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
145	150	155
160		
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
165	170	175
Ala Val Leu Gln Ala Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr		
180	185	190
Val Pro Ser Ser Arg Trp Leu Ser Asp Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala		
195	200	205
His Pro Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Arg Lys Thr Asp		
210	215	220
His Pro Pro Gly Pro Lys Pro Cys Asp Cys Pro Lys Cys Pro Pro Pro		
225	230	235
240		
Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Ile Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
245	250	255
Asp Thr Leu Ser Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Leu Val Val		
260	265	270
Asp Leu Gly Pro Asp Asp Ser Asp Val Gln Ile Thr Trp Phe Val Asp		
275	280	285
Asn Thr Gln Val Tyr Thr Ala Lys Thr Ser Pro Arg Glu Glu Gln Phe		
290	295	300
Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Leu His Gln Asp		
305	310	315
320		
Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Ser Lys Ser Leu		
325	330	335
Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro His		
340	345	350
Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Ala Gln Glu Glu Leu Ser Arg		

355	360	365
Asn Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Ile Lys Ser Phe His Pro Pro Asp		
370	375	380
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ile Thr Gly Gln Pro Glu Pro Glu Asn Asn		
385	390	395
Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Ser Asp Gly Thr Tyr Phe Val		
405	410	415
Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Arg Ser His Trp Gln Arg Gly Asn Thr		
420	425	430
Tyr Thr Cys Ser Val Ser His Glu Ala Leu His Ser His His Thr Gln		
435	440	445
Lys Ser Leu Thr Gln Ser Pro Gly Lys		
450	455	
<210> 20		
<211> 237		
<212> PRT		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> легкая цепь химерного кошачьего-крысиного антитела с лидерной		
последовательностью		
<400> 20		
Met Gly Val Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp Ile Thr		
1	5	10
Asp Ala Ile Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser		
20	25	30
Ala Ser Leu Gly Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys Arg Ala Ser Glu Asp		
35	40	45
Ile Tyr Asn Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro		
50	55	60
Gln Leu Leu Ile Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser		
65	70	75
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn		
85	90	95
Ser Leu Gln Ser Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe		
100	105	110
His Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg		
115	120	125

Ser Asp Ala Gln Pro Ser Val Phe Leu Phe Gln Pro Ser Leu Asp Glu
 130 135 140

Leu His Thr Gly Ser Ala Ser Ile Val Cys Ile Leu Asn Asp Phe Tyr
 145 150 155 160

Pro Lys Glu Val Asn Val Lys Trp Lys Val Asp Gly Val Val Gln Thr
 165 170 175

Lys Ala Ser Lys Glu Ser Thr Thr Glu Gln Asn Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Met Ser Arg Thr Glu Tyr Gln Ser
 195 200 205

His Glu Lys Phe Ser Cys Glu Val Thr His Lys Ser Leu Ala Ser Thr
 210 215 220

Leu Val Lys Ser Phe Asn Arg Ser Glu Cys Gln Arg Glu
 225 230 235

<210> 21
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> тяжелая цепь химерного кошачьего-крысиного антитела с лидерной последовательностью

<400> 21

Met Ala Val Leu Val Leu Leu Cys Leu Val Thr Phe Pro Thr Cys
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45

Thr Asn Asn Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Arg Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser
 65 70 75 80

Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln
 85 90 95

Val Phe Leu Lys Met His Ser Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met
 115 120 125

Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Thr Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Leu Gly Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ala Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Leu Ser Asp Thr Phe Thr Cys
 210 215 220

Asn Val Ala His Pro Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Arg
 225 230 235 240

Lys Thr Asp His Pro Pro Gly Pro Lys Pro Cys Asp Cys Pro Lys Cys
 245 250 255

Pro Pro Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Ile Phe Ile Phe Pro Pro
 260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Ser Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 275 280 285

Leu Val Val Asp Leu Gly Pro Asp Asp Ser Asp Val Gln Ile Thr Trp
 290 295 300

Phe Val Asp Asn Thr Gln Val Tyr Thr Ala Lys Thr Ser Pro Arg Glu
 305 310 315 320

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Leu
 325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Ser
 340 345 350

Lys Ser Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 355 360 365

Gln Pro His Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Ala Gln Glu Glu
 370 375 380

Leu Ser Arg Asn Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Ile Lys Ser Phe His
 385 390 395 400

Pro Pro Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ile Thr Gly Gln Pro Glu Pro
 405 410 415

Glu Asn Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Ser Asp Gly Thr
 420 425 430

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Arg Ser His Trp Gln Arg
 435 440 445

Gly Asn Thr Tyr Thr Cys Ser Val Ser His Glu Ala Leu His Ser His
 450 455 460

His Thr Gln Lys Ser Leu Thr Gln Ser Pro Gly Lys
 465 470 475

<210> 22
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> альтернативный VH тяжелой цепи фелинлизированного антитела против NGF (feN2-VH)

<400> 22

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

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

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

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

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

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

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 23
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> альтернативный V_k легкой цепи фелинлизированного антитела против NGF (feN2-V_k)

<400> 23

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

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala
 20 25 30

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

Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Gln Thr
 65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg
 85 90 95

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

<210> 24
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Альтернативная полная тяжелая цепь кошачьего IgG против NGF (feN2-HC2)

<400> 24

Met Ala Val Leu Val Leu Leu Cys Leu Val Thr Phe Pro Thr Cys
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Glu Ser Leu Arg Leu Thr Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45

Thr Asn Asn Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser
 65 70 75 80

Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr
 85 90 95

Val Phe Leu Gln Met His Ser Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met
 115 120 125

Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr
 130 135 140

Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Thr Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Leu Gly Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ala Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Leu Ser Asp Thr Phe Thr Cys
 210 215 220

Asn Val Ala His Pro Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Arg
 225 230 235 240

Lys Thr Asp His Pro Pro Gly Pro Lys Pro Cys Asp Cys Pro Lys Cys
 245 250 255

Pro Pro Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Ile Phe Ile Phe Pro Pro
 260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Ser Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 275 280 285

Leu Val Val Asp Leu Gly Pro Asp Asp Ser Asp Val Gln Ile Thr Trp
 290 295 300

Phe Val Asp Asn Thr Gln Val Tyr Thr Ala Lys Thr Ser Pro Arg Glu
 305 310 315 320

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Leu
 325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Ser
 340 345 350

Lys Ser Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 355 360 365

 Gln Pro His Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Ala Gln Glu Glu
 370 375 380

 Leu Ser Arg Asn Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Ile Lys Ser Phe His
 385 390 395 400

 Pro Pro Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ile Thr Gly Gln Pro Glu Pro
 405 410 415

 Glu Asn Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Ser Asp Gly Thr
 420 425 430

 Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Arg Ser His Trp Gln Arg
 435 440 445

 Gly Asn Thr Tyr Thr Cys Ser Val Ser His Glu Ala Leu His Ser His
 450 455 460

 His Thr Gln Lys Ser Leu Thr Gln Ser Pro Gly Lys
 465 470 475

 <210> 25
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Альтернативная полная каппа легкая цепь кошачьего IgG против NGF (feN2-kLC)

 <400> 25

 Met Gly Val Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Ile Thr
 1 5 10 15

 Asp Ala Ile Cys Asp Ile Glu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser
 20 25 30

 Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asp
 35 40 45

 Ile Tyr Asn Ala Leu Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Arg Ser Pro
 50 55 60

 Arg Leu Leu Ile Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Asp
 65 70 75 80

 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser
 85 90 95

 Arg Val Gln Thr Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe

100	105	110
His Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg		
115	120	125
Ser Asp Ala Gln Pro Ser Val Phe Leu Phe Gln Pro Ser Leu Asp Glu		
130	135	140
Leu His Thr Gly Ser Ala Ser Ile Val Cys Ile Leu Asn Asp Phe Tyr		
145	150	155
160		
Pro Lys Glu Val Asn Val Lys Trp Lys Val Asp Gly Val Val Gln Thr		
165	170	175
Lys Ala Ser Lys Glu Ser Thr Thr Glu Gln Asn Ser Lys Asp Ser Thr		
180	185	190
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Met Ser Arg Thr Glu Tyr Gln Ser		
195	200	205
His Glu Lys Phe Ser Cys Glu Val Thr His Lys Ser Leu Ala Ser Thr		
210	215	220
Leu Val Lys Ser Phe Asn Arg Ser Glu Cys Gln Arg Glu		
225	230	235
<210> 26		
<211> 23		
<212> PRT		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> альтернативный FR1 легкой цепи (feN2-kLC)		
<400> 26		
Asp Ile Glu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly		
1	5	10
15		
Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys		
20		
<210> 27		
<211> 15		
<212> PRT		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> альтернативный FR2 легкой цепи (feN2-kLC)		
<400> 27		
Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Arg Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr		
1	5	10
15		
<210> 28		

```

<211> 32
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> альтернативный FR3 легкой цепи (feN2-kLC)

<400> 28

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1           5           10          15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Gln Thr Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys
20          25           30

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> альтернативный FR4 легкой цепи (feN2-kLC)

<400> 29

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
1           5           10

<210> 30
<211> 26
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> альтернативный FR1 тяжелой цепи (feN2-VH)

<400> 30

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

Ser Leu Arg Leu Thr Cys Ala Ala Ser Gly
20          25

<210> 31
<211> 14
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> альтернативный FR2 тяжелой цепи (feN2-VH)

<400> 31

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
1           5           10

<210> 32
<211> 32
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

```

<220>
<223> альтернативный FR3 тяжелой цепи (feN2-VH)

<400> 32

Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Phe Leu Gln
1 5 10 15

Met His Ser Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

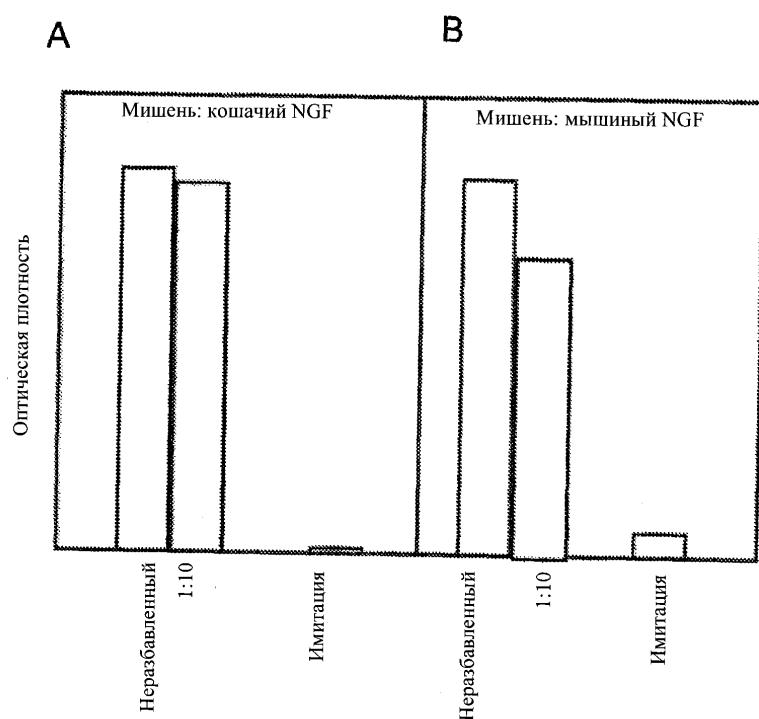
<213> Искусственная последовательность

<220>

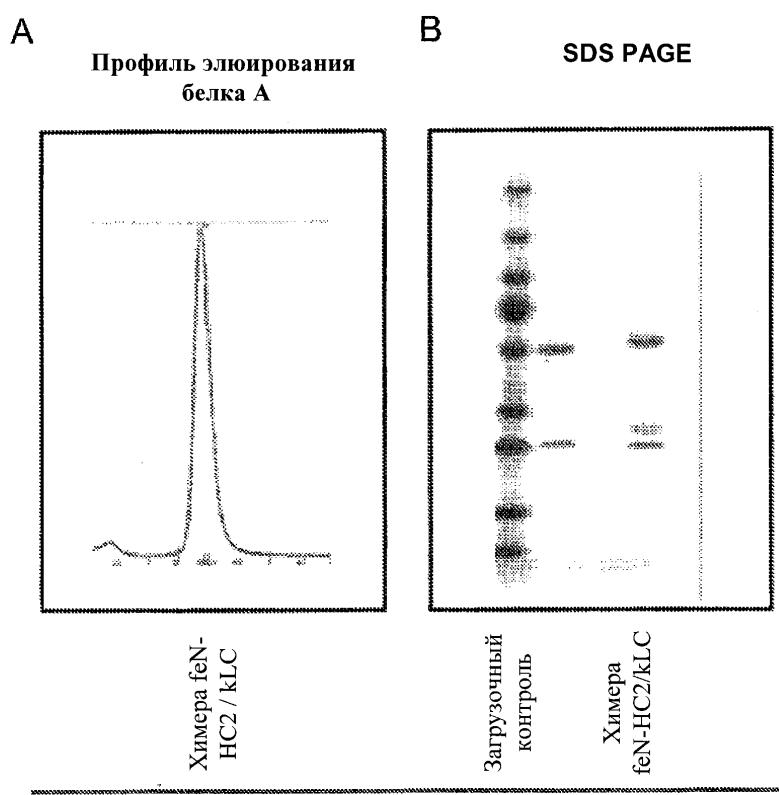
<223> альтернативный FR4 тяжелой цепи (feN2-VH)

<400> 33

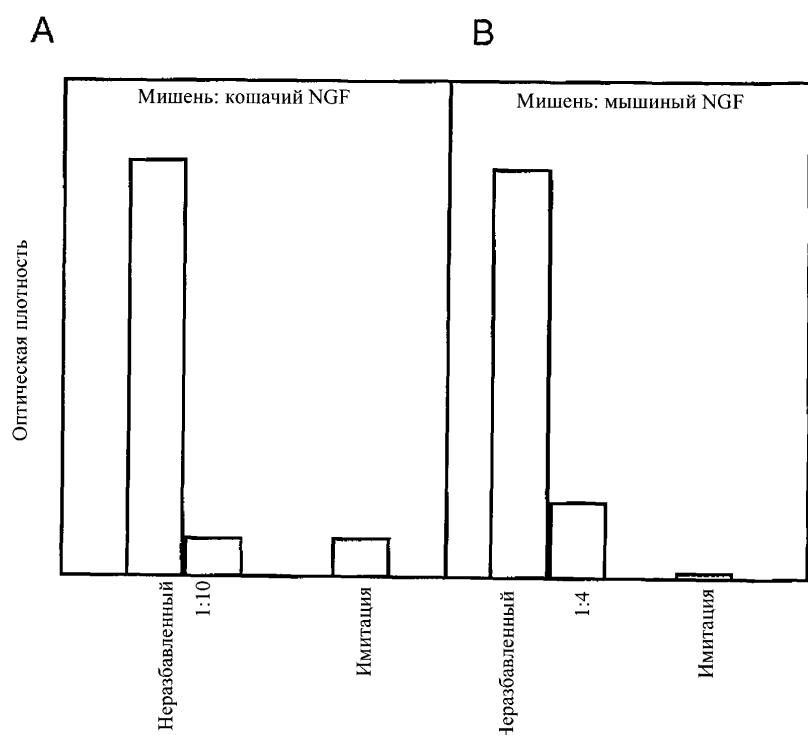
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala
1 5 10



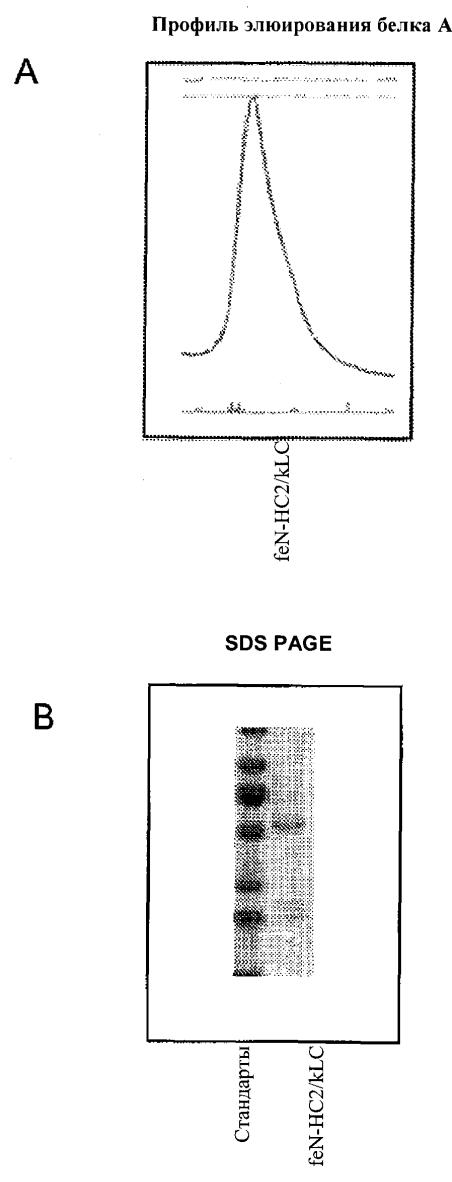
Фиг. 1



Фиг. 2

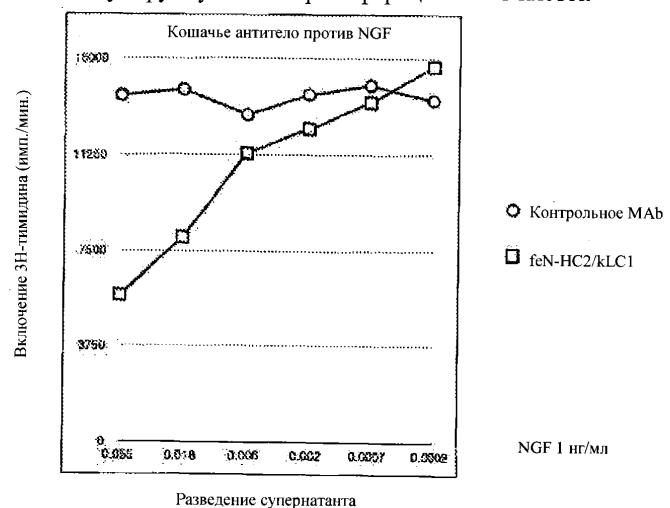


Фиг. 3



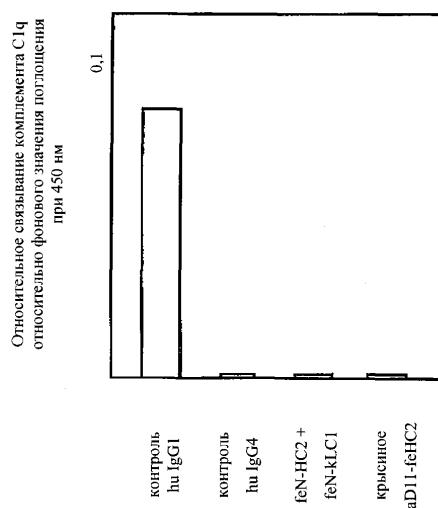
Фиг. 4

Кошачье антитело против NGF на основе HC2 ингибирует индуцируемую NGF пролиферацию TF-1 клеток



Фиг. 5

Кошачьи антитела на основе HC2 являются неактивными в отношении фиксации комплемента



Фиг. 6

MGVPTQLLGLLLWITDAICDIQMTQSPASLSASLGETVTIECR
ASEDIYNALAWYQQKPGKSPQLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSG
SGTQYSLKINSLQSEDVASYFCQHYFYPRTFGGGTKLELKR
SDAQPSVFLFQPSLDELHTGSASIVCILNDFYPKEVNWKVD
GVVQTKASKESTTEQNSKDSTYSLSSLTMSRTEYQSHEKFSC
EVTHKSLASTLVKSFRSECQRE**

Фиг. 7

8/17

MAVLVLLCLVTFPTCVLSQVQLKESGPGLVQPSQTLSLTCTVSGFS
LTNNNVWVRQATGRGLEWMGGVWAGGATDYNALKSRLTITRD
TSKSQVFLKMHSLSQEDTATYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGT
SVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGTTSGATVALACLVLYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQASGLYSSMVTVPSSRWLSDTFTCNVAH
PPSNTKVDKTVRKTDHPPGPKPCDCPKCPPPMLGGPSIFFPPKPK
DTLSISRTPEVTCLVVDLGPDDSDVQITWFVDNTQVYTAKTSPREQ
FNSTYRVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSPIERTISKAKGQP
HEPQVYVLPPAQEELSRNKVSVTCLIKSFHPPDIAVEITGQPEPE
NNYRTTQQQLDSDGTYFVYSKLSVDRSHWQRGNTYTCVSHEALH
SHHTQKSLTQSPGK**

Фиг. 8

9/17

* * * *** *** * *
DIVMTQTPLSLSVTPGEPASISCRASEDIYNALAWYLQKP 40
* ** * * * * * * * *
GQSPRRLIYNTDTLHTGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEA 80
* ** * * *
DDVGVYFCQHYFHYPRTFGPGTKLEIK 107

Фиг. 9

10/17

* * * * *
QVQLVESGGDLVQPGGSLRLTCAASGFSITNNNVNWVRQA 40
* * * * *
PGKGLEWMGGVWAGGATDYNSALKGRFTISRDNAKNTLYL 80
82ABC 100ABCDEF
* * * *
QMNSLKTEDTATYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGTLVTVSS 113

Фиг. 10

DIVMTQTPLSLSVTPGEPAISCRASEDIYNALAWYLQKPGQSP
RRLIYNTDTLHTGVPDFRGSGSGTDFTLRISRVEADDVGVYFC
QHYFHYPRTFGPGTKLEIKRSDAQPSVFLFQPSLDELHTGSASI
VCILNDFYYPKEVNWKVVDGVVQTKASKESTTEQNSKDSTYSL
SSTLTMSRTEYQSHEKFSCDEVTHKSLASTLVKSFNRCQRE

Фиг. 11

12/17

QVQLVESGGDLVQPGGSLRLTCAASGFSLNNNVNWRQAPGK
GLEWMGGWAGGATDYNALKRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKT
EDTATYYCARDGGYSSSTLYAMIDAWGQGTLTVSSASTTAPSVF
PLAPSCGTTSGATVALACLVLYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPA
VLQASGLYSLSSMVTVPSSRWLSDTFTCNVAHPPSNTKVDKTVRK
TDHPPGPKPCDCPKCPPPEMLGGPSIFIFPPPKDLSISRTPEVTC
LVDLGPDDSDVQITWFVDNTQVYTAKTSPREEQFNSTYRVSVLP
ILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSPIERTISKAKGQPHEPQVYVLP
QEELSRNKVSVTCLIKSFHPPDIAVEWEITGQPEPENNYRTTPQLD
SDGTYFVYSKLSVDRSHWQRGNTYTCVSHEALHSHTQKSLTQS
PGK

Фиг. 12

13/17

QVQLVESGAELVQPGESLRLTCAASGFSLT
NNNVNWVRQAPGKGLEWMGGVWAGGATD
YNSALKSRLTITRDTSKNTVFLQMHSIQSED
TATYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGTTV
TVSA

Фиг. 13

14/17

DIEMTQSPLSLSVTPGESVSISCRASEDIYNA
LAWYLQKPGRSRLLIYNTDTLHTGVPDRFS
GSGSGTDFTLKISRQVQTEDVGVYFCQHYFH
YPRTFGQGKLELK

Фиг. 14

15/17

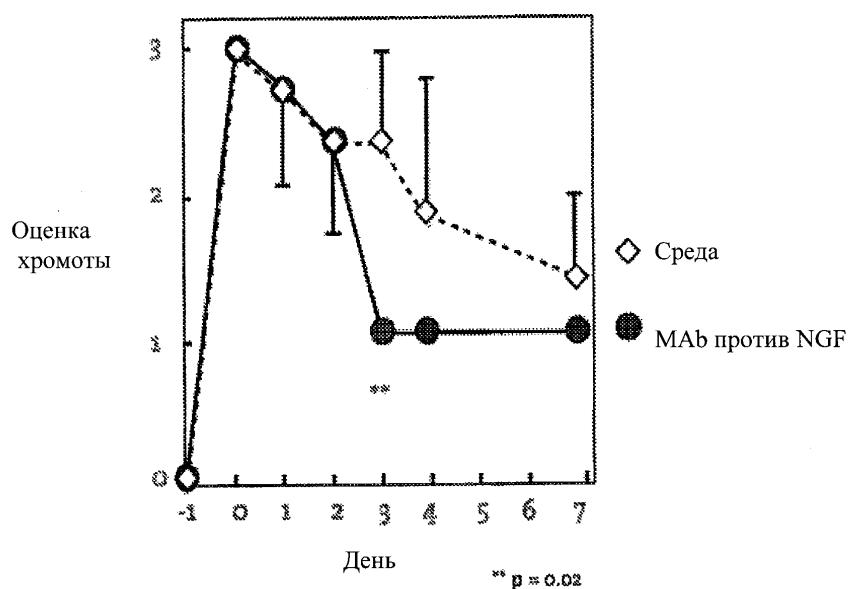
MAVLVLLCLVTFPTCVLSQLVESGAELV
QPGESLRLTCAASGFSLTNNNVWVRQAP
GKGLEWMGGVWAGGATDYNSALKSRLTIT
RDTSKNTVFLQMHSLQSEDTATYYCARDGG
YSSSTLYAMDAWGQGTTVSAASTTAPSV
FPLAPSCGTTSGATVALACLVLYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQASGLYSLSSMV
TVPSSRWLSSDTFTCNVAHPPSNTKVDKTVR
KTDHPPGPKPCDCPKCPPPEMLGGPSIFIFP
PKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLGPDDSDVQIT
WFVDNTQVYTAKTSPREEQFNSTYRVVSVL
PILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSPERTISK
AKGQPHEPQVYVLPPAQEELSRNKVSVTCLI
KSFHPPDIAVEWEITGQPEPENNYRTTPQL
DSDGTYFVYSKLSVDRSHWQRGNTYTCSV
SHEALHSHHTQKSLTQSPGK

Фиг. 15

MGVPTQLLGLLLWITDA/CDIEMTQSPLSLS
VTPGESVSISCRASEDIYNALAWYLQKPGRS
PRLLIYNTDTLHTGVPDFSGSGSGTDFTLKI
SRVQTEDVGVYFCQHYFHYPRTFGQQGTKLE
LKRSDAQPSVFLFQPSLDELHTGSASIVCILN
DFYPKEVNWKVVDGVVQTKASKESTTEQN
SKDSTYSLSSTLTMSRTEYQSHEKFSC
EVTHKSLASTLVKSFNRSECQRE

Фиг. 16

17/17



Фиг. 17