



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **102775** (13) **C2**  
(51) МПК (2013.01)**A61K 39/395** (2006.01)**C07K 16/22** (2006.01)**G01N 33/53** (2006.01)**C12N 5/10** (2006.01)**A61P 25/00****A61P 35/00****A61P 19/02** (2006.01)**A61P 29/02** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2012 05050</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Уайлд Кеннет Д. (US),</b> <b>Трінор Джеймс Дж. С. (US),</b> <b>Хуань Хайчунь (US),</b> <b>Іну Хезер (US),</b> <b>Чжан Тай Дж. (US),</b> <b>Мартін Френк (US)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>08.10.2010</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ЕМДЖЕН, ІНК.,</b> One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA 91320-1799, United States of America (US), <b>МЕДАРЕКС, ІНК.,</b> Route 206 & Province Line Road Princeton, NJ 08543-4000, United States of America (US)
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>12.08.2013</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Шляховецький Ілля Олександрович,</b> <b>реєстр. №190</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>12/576,522</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2005/019266 A2, 03.03.2005 WO 2006/110883 A2, 19.10.2006 Lane N. et al.: "Tanezumab relieves moderate to severe pain due to osteoarthritis (OA) of the knee: a phase 2 trial", American college of rheumatology 2008 annual scientific meeting , 2008, XP007916873
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>09.10.2009</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>25.07.2012, Бюл.№ 14</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>12.08.2013, Бюл.№ 15</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>PCT/US2010/051960, 08.10.2010</b>	

**(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ БОЛЮ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ АНТИ-NGF АНТИТІЛА****(57) Реферат:**

Винахід стосується способу лікування болю, пов'язаного зі станом, який спричинюється підвищеною експресією фактора росту нервової тканини (NGF) або підвищеною чутливістю до NGF, що включає введення пацієнту фармацевтичної композиції, яка містить фармацевтично прийнятний носій та виділене антитіло, яке має легкий ланцюг, який включає послідовність SEQ ID NO: 44, та важкий ланцюг, який включає послідовність SEQ ID NO: 40.

UA 102775 C2



Ця заявка претендує на пріоритет заявки на патент США № 12/576,522, поданої 9 жовтня 2009 року, яка частково продовжує заявку на патент США № 12/277,919, поданої 25 листопада 2008 року, яка є продовженням заявки на патент США № 10/891,658, поданої 15 липня 2004 року, і претендує на пріоритет попередньої заявки на патент США № 60/487,431, поданої 15 липня 2003 року. Ця заявка також стосується заявки на патент США № 11/767,326, поданої 22 червня 2007 року, яка є виділеною заявкою 10/891,658. Розкриття усіх згаданих заявок включено до цього опису шляхом посилання.

Галузь, до якої належить винахід

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

Передумови створення винаходу

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

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

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

"Було показано, що нейротрофні фактори відіграють значну роль у передачі фізіологічного та патологічного болю. Особливо важливим видається фактор росту нервової тканини (NGF) (дивись Макмагон (McMahon), 1996, Phil. Trans. R. Soc. Lond. 351:431-440; та Апфел (Apfel), 2000, The Clinical Journal of Pain 16:S7-S11). Було показано, що як місцеве, так і системне введення NGF викликає гіпералгезію і алодінію (Левін (Lewin) та інші, 1994, Eur. J. Neurosci. 6:1903-1912). Внутрішньовенне вливання NGF викликає у людей міалгію усього тіла, у той час як місцеве введення, крім системних ефектів, спричинює гіпералгезію і алодінію на місці ін'єкції (Апфел (Apfel) та інші, 1998, Neurology 51:695-702). Значний обсяг даних вказує також на причетність ендогенного NGF до станів, головною особливістю яких є біль. Наприклад,

активація NGF спостерігається у шваннівських клітинах гангліїв задніх корінців головного мозку (DRG) протягом щонайменше 2 місяців після пошкодження периферичної нервової тканини. Повідомляли про підвищені рівні NGF у суглобах тварин, які страждають від різноманітних моделей артриту (наприклад, Алоу (Aloe) та інші, 1993, *Growth Factors* 9:149-155). Щодо людей, то рівні NGF підвищені у синовіальній рідині хворих на ревматоїдний артрит або артрити інших типів (наприклад, Алоу (Aloe) та інші, 1992, *Arthritis and Rheumatism* 35:351-355). Крім того, було показано, що антагонізм функції NGF запобігає виникненню гіпералгезії та алодинії, на моделях невропатичного та хронічного запального болю. Наприклад, на тваринних моделях невропатичного болю (наприклад, перев'язка нервового стовбура або спинномозкового нерва) системна ін'єкція NGF-нейтралізуючих антитіл запобігає виникненню як алодинії, так і гіпералгезії (Ремер (Ramer) та інші, 1999, *Eur. J. Neurosci.* 11:837-846; та Ро (Ro) та інші, 1999, *Pain* 79:265-274). Приклади анти-NGF антитіл, відомих у цій галузі, наведені, наприклад, у публікаціях WO 01/78698, WO 01/64247, WO 02/096458 та WO 2004/032870; патентах США № 5,844,092, № 5,877,016 та № 6,153,189; Хонго (Hongo) та інші, 2000, *Hybridoma* 19:215-227; Хонго (Hongo) та інші, 1993, *Cell. Mol. Biol.* 13:559-568; депонуваннях GenBank'у № U39608, № U39609, № L17078 або № L17077.

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

Короткий виклад суті винаходу

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

Цей винахід також пропонує гібридні білки, які містять послідовність Fc-ділянки антитіла і одну або декілька послідовностей, представлених послідовностями SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, and SEQ ID NOs: 79-130. Такі молекули можна одержати із застосуванням способів, описаних, наприклад, у публікації міжнародної заявки WO 00/24782, яку включено до цього опису шляхом посилання. Такі молекули можуть експресуватись, наприклад, у клітинах ссавців (наприклад, у клітинах яєчника китайського хом'ячка) або бактеріальних клітинах (наприклад, у клітинах *E. coli*).

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

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



найбільшу перевагу, приблизно 99 % ідентичність з амінокислотною послідовністю, представленою послідовністю SEQ ID NO: 10, і де згаданий легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, і де варіабельна ділянка згаданого легкого ланцюга містить послідовність, яка має щонайменше 80 %, за варіантом, якому віддають перевагу, щонайменше 85 %, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % і, за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, приблизно 99 % ідентичність з амінокислотною послідовністю, представленою послідовністю SEQ ID NO: 12, де згадане антитіло специфічно зв'язується з NGF.

Цей винахід також пропонує антитіла, які специфічно зв'язуються з NGF, важкий ланцюг яких містить амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 14, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент, а легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 16, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент.

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

Цей винахід також пропонує одностанцюгові антитіла, одностанцюгові Fv антитіла, F(ab) антитіла, F(ab)' антитіла і (Fab')<sub>2</sub> антитіла.

За конкретними аспектами, цей винахід пропонує легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 16, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент.

На додаток до цього, цей винахід пропонує важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, представлену будь-якою з послідовностей SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18 або SEQ ID NO: 22, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент.

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

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

Цей винахід додатково пропонує виділені людські антитіла, що специфічно зв'язують NGF, які містять важкий ланцюг і легкий ланцюг, де згаданий легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, представлену послідовностями SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91 або SEQ ID NO: 131, або її антигензв'язувальний чи імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент.

Антитіла за цим винаходом характеризуються здатністю антагонізувати щонайменше одну *in vitro* та/або *in vivo* активність, пов'язану з NGF поліпептидами. За варіантом, якому віддають перевагу, цей винахід пропонує виділені людські антитіла проти людського NGF з високою спорідненістю зв'язування з NGF поліпептидами, де згадані антитіла зв'язуються з людським NGF поліпептидом і відділяються від людського NGF поліпептиду з константою дисоціації (KD) приблизно  $50 \times 10^{-12}$  М або менше, як визначається із застосуванням KinExA, або які пригнічують NGF-індуковану виживаність у *in vitro* реакції нейтралізації з IC<sub>50</sub> приблизно  $1 \times 10^{-8}$  М або менше.

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

а) пригнічує NGF-індуковану виживаність у *in vitro* реакції нейтралізації з IC<sub>50</sub> приблизно  $1 \times 10^{-9}$  М або менше;

б) має CDR3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 14; і

с) має CDR3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 16.

Цей винахід також пропонує виділені людські антитіла або їх антигензв'язувальні чи імунологічно функціональні імуноглобулінові фрагменти, що специфічно зв'язуються з NGF з високою спорідненістю, де згадані антитіла або фрагменти відділяються від людського NGF поліпептиду з K<sub>D</sub> приблизно  $1 \times 10^{-9}$  або менше і нейтралізують біологічну активність людського NGF у стандартній *in vitro* реакції з IC<sub>50</sub> приблизно  $1 \times 10^{-8}$  М або менше, і де антитіла або фрагменти містять варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить:

а) CDR1 ділянку, яка містить амінокислотну послідовність формули:

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

де:

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

б) CDR2 ділянку, яка містить амінокислотну послідовність формули:

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

де:

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

с) CDR3 ділянку, яка містить амінокислотну послідовність формули:

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

де:

$c^1$  – відсутній або являє собою аліфатичний амінокислотний залишок;  $c^2$  – відсутній або являє собою полярний гідрофільний або ароматичний гідрофобний амінокислотний залишок;  $c^3$  і  $c^4$ , незалежно один від одного, відсутні або являють собою полярні гідрофільні, ароматичні гідрофобні або аліфатичні амінокислотні залишки;  $c^5$  – відсутній або являє собою полярний гідрофільний, аліфатичний або ароматичний амінокислотний залишок;  $c^6$  – відсутній або являє собою полярний гідрофільний або аліфатичний амінокислотний залишок;  $c^7$  – полярний гідрофільний або аліфатичний амінокислотний залишок;  $c^8$  – полярний гідрофільний, гідрофобний або ароматичний амінокислотний залишок;  $c^9$  – полярний гідрофільний, ароматичний гідрофобний або аліфатичний гідрофобний амінокислотний залишок;  $c^{10}$  –

полярний гідрофільний, ароматичний гідрофобний або аліфатичний гідрофобний амінокислотний залишок;  $c^{11}$ - $c^{13}$ , незалежно один від одного, являють собою полярні гідрофільні або ароматичні гідрофобні амінокислотні залишки;  $c^{14}$  – аліфатичний або ароматичний гідрофобний амінокислотний залишок;  $c^{15}$  – полярний гідрофільний або нейтральний гідрофобний амінокислотний залишок;  $c^{16}$  – відсутній або являє собою полярний гідрофільний амінокислотний залишок; і  $c^{17}$  – ароматичний гідрофобний або аліфатичний гідрофобний амінокислотний залишок.

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

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

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

За іншими конкретними аспектами:

а) CDR1 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 22, CDR2 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 18, і CDR3 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 14;

б) CDR1 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 92, CDR2 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену



послідовністю SEQ ID NO: 93, і CDR3 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 94;

5 c) CDR1 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 98, CDR2 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 99, і CDR3 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 100;

10 d) CDR1 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 104, CDR2 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 105, і CDR3 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 106;

e) CDR1 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 110, CDR2 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 111, і CDR3 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 112;

15 f) CDR1 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 116, CDR2 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 117, і CDR3 важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 118.

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

a) CDR1 ділянку, яка містить амінокислотну послідовність формули:

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

де:

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

b) CDR2 ділянку, яка містить амінокислотну послідовність формули:

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

де:

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

c) CDR3 ділянку, яка містить амінокислотну послідовність формули:

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

де:

45  $c^1$  і  $c^2$ , незалежно один від одного, являють собою полярні гідрофільні амінокислотні залишки;  $c^3$  – полярний гідрофільний, аліфатичний або гідрофобний амінокислотний залишок;  $c^4$ ,  $c^5$  і  $c^6$ , незалежно один від одного, являють собою аліфатичні, полярні гідрофільні або гідрофобні амінокислотні залишки;  $c^7$  – відсутній або являє собою полярний гідрофільний або аліфатичний гідрофобний амінокислотний залишок;  $c^8$  – полярний гідрофільний або гідрофобний амінокислотний залишок; і  $c^9$  – полярний гідрофільний амінокислотний залишок; і де згадане антитіло або фрагмент відділяється від людського NGF поліпептиду з  $K_D$  приблизно  $1 \times 10^{-9}$  або менше і нейтралізує біологічну активність людського NGF у стандартній *in vitro* реакції з  $IC_{50}$  приблизно  $1 \times 10^{-8}$  M або менше.

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

являють собою полярні гідрофільні або аліфатичні гідрофобні амінокислотні залишки;  $c^1$  і  $c^2$ , незалежно один від одного, являють собою полярні гідрофільні амінокислотні залишки;  $c^3$  – полярний гідрофільний, аліфатичний або гідрофобний амінокислотний залишок;  $c^4$ ,  $c^5$  і  $c^6$ , незалежно один від одного, являють собою аліфатичні, полярні гідрофільні або гідрофобні амінокислотні залишки;  $c^7$  – відсутній або являє собою аліфатичний гідрофобний амінокислотний залишок;  $c^8$  – гідрофобний амінокислотний залишок; і  $c^9$  – полярний гідрофільний амінокислотний залишок.

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

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

За іншими конкретними аспектами:

a) CDR1 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 24, CDR2 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 20, і CDR3 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 16;

b) CDR1 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 95, CDR2 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 96, і CDR3 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 97;

c) CDR1 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 101, CDR2 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 102, і CDR3 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 103;

d) CDR1 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 107, CDR2 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 108, і CDR3 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 109;

e) CDR1 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 113, CDR2 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 114, і CDR3 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 115;

f) CDR1 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 119, CDR2 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 120, і CDR3 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 121;

g) CDR1 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 122, CDR2 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 123, і CDR3 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 124;

h) CDR1 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 125, CDR2 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 126, і CDR3 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 127;

i) CDR1 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 128, CDR2 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 129, і CDR3 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 130;

j) CDR1 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 132, CDR2 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 133, і CDR3 легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 134.

Частиною цього винаходу також є полінуклеотидні послідовності, які кодують нові людські антитіла проти людського NGF, вектори, що містять полінуклеотидні послідовності, які кодують

людські антитіла проти людського NGF, клітини-хазяї, трансформовані векторами, що містять полінуклеотиди, які кодують людські антитіла проти людського NGF, композиції, що містять людські антитіла проти людського NGF та способи її одержання та застосування.

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

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

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

Короткий опис фігур

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

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

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

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

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

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

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

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

На Фіг. 9 зображений порівняльний аналіз і відсоток ідентичності CDR2 легкого ланцюга анти-NGF антитіл 14D10 (SEQ ID NO: 96), 6H9 (SEQ ID NO: 108), 7H2 (SEQ ID NO: 114), 4G6a (SEQ ID NO: 120), 4G6b (SEQ ID NO: 123), 4G6c (SEQ ID NO: 126), 4G6d (SEQ ID NO: 129), 4G6e (SEQ ID NO: 133), 14D11 (SEQ ID NO: 96) та 4D4 (SEQ ID NO: 20) (антитіло 4G6a на різних Фігурах позначається як 20031028340; антитіло 4G6b на різних Фігурах позначається як 20031028351; антитіло 4G6c на різних Фігурах позначається як 20031071526; антитіло 4G6d на

різних Фігурах позначається як 20031028344; антитіло 4G6e на різних Фігурах позначається як 20031000528).

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

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

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

Докладний опис конкретних варіантів здійснення винаходу, яким віддають перевагу

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

#### Визначення

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

Слід розуміти, що наведені нижче терміни, які вживаються у описі цього винаходу, у разі відсутності інших визначень, мають таке значення: Словосполучення "біологічна властивість", "біологічна характеристика" і термін "активність" відносно антитіла за цим винаходом вживаються у цьому описі взаємозамінно і означають (але не обмежуються) спорідненість і специфічність відносно антигенної детермінанти (наприклад, зв'язування людського антитіла проти людського NGF з людським NGF), здатність до антагонізування активності цільового поліпептиду (наприклад, активності NGF), in vivo стабільність антитіла та імунотоксичності антитіла. Іншими біологічними властивостями або характеристиками антитіла, які піддаються визначенню і визнаються у цій галузі, є, наприклад, перехресна реактивність (тобто з гомологами цільового поліпептиду нелюдського походження або, взагалі, з іншими білками або тканинами) і здатність до збереження високих рівнів експресії білка у клітинах ссавців. Вищезгадані властивості або характеристики можуть спостерігатись або вимірюватись із застосуванням визнаних у цій галузі методів, у тому числі, але без обмеження, із застосуванням твердофазного імуоферментного аналізу (ELISA), конкурентного ELISA, аналізу поверхневого плазмонного резонансу, in vitro та in vivo реакцій нейтралізації (наприклад, Приклад 2) та імуногістохімічних методів зі зрізами тканин із різних джерел, у тому числі від людей, приматів або з будь-якого іншого джерела, відповідно до потреб. Конкретні активності та біологічні властивості людських антитіл проти людського NGF докладно описані у наведених нижче Прикладах.

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

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

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

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

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

Термін “специфічний зв'язувальний агент” означає природну або штучну молекулу, яка специфічно зв'язується з мішенню. Прикладами специфічних зв'язувальних агентів є (але ними не обмежуються) білки, пептиди, нуклеїнові кислоти, вуглеводи і ліпіди. За певними варіантами здійснення специфічним зв'язувальним агентом є антитіло.

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

Термін “імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент”, який вживається у цьому описі, означає фрагмент поліпептиду, що містить щонайменше гіперваріабельні ділянки

важкого і легкого ланцюгів імуноглобуліну. Імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент за цим винаходом є здатним до зв'язування з антигеном. За варіантами, яким віддають перевагу, антиген являє собою ліганд, що специфічно зв'язується з рецептором. За цими варіантами здійснення зв'язування імунологічно функціонального імуноглобулінового

фрагмента за цим винаходом запобігає зв'язуванню ліганду з його рецептором, з перериванням біологічної реакції, що є наслідком зв'язування ліганду з рецептором. За варіантом, якому віддають перевагу, імунологічно функціональний імуноглобуліновий фрагмент за цим винаходом специфічно зв'язується з NGF. За варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, згаданий фрагмент специфічно зв'язується з людським NGF.

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

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

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

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

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

Термін "природні нуклеотиди" означає дезоксирибонуклеотиди і рибонуклеотиди. Термін "модифіковані нуклеотиди" означає нуклеотиди з модифікованими або заміненними цукровими групами тощо. Термін "олігонуклеотидні зв'язки" означає олігонуклеотидні зв'язки, наприклад, фосфоротіоат, фосфородітіоат, фосфороселеноат, фосфородиселеноат, фосфороанілотіоат, фосфороаніладат, фосфороамідат тощо. Дивись, наприклад, Лапланш (LaPlanche) та інші, 1986, Nucl. Acids Res., 14:9081; Стек (Stec) та інші, 1984, J. Am. Chem. Soc., 106:6077; Стейн (Stein) та інші, 1988, Nucl. Acids Res., 16:3209; Зон (Zon) та інші, 1991, Anti-Cancer Drug Design, 6:539; Зон (Zon) та інші, 1991, OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH, стор. 87-108, (редактор Ф. Екстейн (F. Eckstein)), Oxford University Press, Oxford England; Стек (Stec) та інші, патент США № 5,151,510; Ульман (Uhlmann), Пейман (Peymann),

1990, Chemical Reviews, 90:543, розкриття яких наведено у цьому описі шляхом посилання для будь-якої мети. Олігонуклеотид може містити виявну мітку, яка надає можливість виявлення олігонуклеотиду або його гібридизації.

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

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

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

Термін “трансдукція” означає перенесення генів від однієї бактерії до іншої, як правило, із застосуванням фага. “Трансдукція” означає також набуття та перенесення еукаріотних клітинних послідовностей ретровірусами.

Термін “трансфекція” означає захоплення клітиною чужорідної або екзогенної ДНК і клітина є “трансфікованою” у разі, коли екзогенна ДНК була введена досередини клітинної мембрани. У цій галузі добре відомі численні методи трансфекції, які розкриваються у цьому описі. Дивись, наприклад, Грехем (Graham) та інші, 1973, Virology 52:456; Сембрук (Sambrook) та інші, 2001, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratories; Девіс (Davis) та інші, 1986, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Elsevier; Чу (Chu) та інші, 1981, Gene, 13:197. Такі методи можуть застосовуватись для введення до прийнятних клітин-хазяїв однієї або декількох екзогенних ДНК.

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

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

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

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

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

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

Методи визначення ідентичності, яким віддають перевагу, розробляються таким чином, щоб вони забезпечували найбільшу сумісність між послідовностями, які перевіряються. Методи визначення ідентичності описуються у доступних комп'ютерних програмах. Методи комп'ютерних програм із визначення ідентичності двох послідовностей, яким віддають перевагу, включають (але ними не обмежуються) пакет програм GCG, що містить програми GAP (Деверо (Devereux) та інші, 1984, Nucl. Acid Res., 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, штат Вісконсін), BLASTP, BLASTN та FASTA (Алтшул (Altschul) та інші, 1990, J. Mol. Biol., 215:403-410). Програма BLASTX є доступною від Національного центру з біотехнологічної інформації (National Center for Biotechnology Information (NCBI)) та з інших джерел (BLAST Manual, Алтшул (Altschul) та інші, NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Алтшул (Altschul) та інші, 1990, дивись вище). Для визначення ідентичності може застосовуватись також добре відомий алгоритм Сміта Уотермена (Smith Waterman algorithm).

Наслідком застосування певних схем порівняльного аналізу з впорядкованим розміщенням двох амінокислотних послідовностей може виявитись сумісність лише короткої ділянки двох



згаданих послідовностей, і ця невелика впорядковано розміщена ділянка може мати дуже високу ідентичність послідовностей, незважаючи навіть на відсутність значної спорідненості між двома непроцесованими послідовностями. Відповідно, за певними варіантами здійснення наслідком застосування вибраного методу порівняльного аналізу (програма GAP) виявиться

впорядковане розміщення, що охоплює щонайменше 50 суміжних амінокислот цільового поліпептиду.

Наприклад, у разі застосування комп'ютерного алгоритму GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, штат Вісконсін), два поліпептиди, у яких слід визначити відсоток ідентичності послідовностей, впорядковано розміщуються для оптимального співпадіння їх відповідних амінокислот ("суміщений відрізок", як визначається алгоритмом). За певними варіантами здійснення разом з алгоритмом застосовують штрафні бали за розрив (які обчислюються, як потроєна середня діагональ, де "середня діагональ" є середнім значенням діагоналі застосованої порівняльної матриці; "діагональ" являє собою бал або число, що приписується кожному абсолютному співпадінню амінокислоти конкретно порівняльною матрицею) і штрафні бали за довжину розриву (які, як правило, дорівнюють одній десятій штрафних балів за розрив), а також порівняльну матрицю, наприклад, PAM 250 або BLOSUM 62. За певними варіантами здійснення алгоритмом застосовується також стандартна порівняльна матриця (дивись Дейхофф (Dayhoff) та інші, 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure, 5:345-352 щодо порівняльної матриці PAM 250; Хенікофф (Henikoff) та інші, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89:10915-10919 щодо порівняльної матриці BLOSUM 62).

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

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

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

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

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

Відсоток ідентичності може обчислюватись шляхом застосування голки для відбирання програм (пакет програм EMBOSS) або розширювача програм (пакет програм EMBOSS) чи узгоджування програм X, як модуля вектора NTI пакета програм 9.0.0, із застосуванням значень параметрів, за замовчуванням (наприклад, 5 штрафних балів за присутність двониткового розриву, 15 штрафних балів за відкриття двониткового розриву, 6,6 штрафних балів за довжину двониткового розриву).

У цьому описі застосовуються двадцять традиційних амінокислот та їхні скорочені позначення. Див. IMMUNOLOGY – A SYNTHESIS 2 видання, (ред. Е.С.Голуб (E.S. Golub), Д.Р. Грен (D.R. Gren)), Sinauer Associates: Sunderland, штат Массачусетс, 1991, який включено до цього опису шляхом посилання для будь-яких цілей. Стереоізомери (наприклад, D-амінокислоти) двадцяти традиційних амінокислот; штучні амінокислоти, наприклад,  $\alpha$ -,  $\alpha$ -двозаміщені амінокислоти, N-алкіламінокислоти, молочна кислота та інші нетрадиційні

амінокислоти можуть також бути прийнятними складовими для поліпептидів за цим винаходом. Прикладами нетрадиційних амінокислот є: 4-гідроксипролін,  $\gamma$ -карбоксиглутамат,  $\epsilon$ -N,N,N-триметиллізин,  $\epsilon$ -N-ацетиллізин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формілметіонін, 3-метилгістидин, 5-гідроксилізин,  $\sigma$ -N-метиларгінін та інші подібні амінокислоти та імінокислоти (наприклад, 4-гідроксипролін). У позначенні поліпептидів, яке застосовується у цьому описі, лівостороннім напрямом є напрям до амінокінця, а правостороннім напрямом є напрям до карбоксильного кінця, відповідно до стандартного застосування і традиції.

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

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

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

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

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

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

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

Цим амінокислотним залишкам були приписані наведені нижче значення гідрофільності: аргінін (+3,0); лізин (+3,0); аспартат (+3,0 $\pm$ 1); глутамат (+3,0 $\pm$ 1); серин (+0,3); аспарагін (+0,2); глутамін (+0,2); гліцин (0); треонін (-0,4); пролін (-0,5 $\pm$ 1); аланін (-0,5); гістидин (-0,5); цистеїн (-1,0); метіонін (-1,3); валін (-1,5); лейцин (-1,8); ізолейцин (-1,8); тирозин (-2,3); фенілаланін (-2,5); і триптофан (-3,4). При здійсненні замін, виходячи з подібних значень гідрофільності, за певними варіантами здійснення включають заміну амінокислот, значення гідрофільності яких знаходяться у межах  $\pm 2$ , за певними варіантами здійснення включають амінокислоти, значення гідрофільності яких знаходяться у межах  $\pm 1$ , і за певними варіантами здійснення включають амінокислоти, значення гідрофільності яких знаходяться у межах  $\pm 0,5$ . За послідовностями основних амінокислот, на основі гідрофільності, можуть також бути ідентифіковані антигенні детермінанти. Ці ділянки називають також "коровими ділянками антигенних детермінант".

Зразкові амінокислотні заміни наведені у Таблиці 1.

Таблиця 1

## Амінокислотні заміни

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

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

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

20 Фахівець у цій галузі може також проаналізувати об'ємну структуру і амінокислотну послідовність у зв'язку з такою структурою у подібних поліпептидів. Приймаючи до уваги таку інформацію, фахівець у цій галузі може прогнозувати впорядковане розміщення амінокислотних залишків антитіла відповідно до його об'ємної структури. За певними варіантами здійснення фахівець у цій галузі може уникнути варіанта внесення радикальних змін до амінокислотних залишків, які передбачаються на поверхні білка, оскільки такі залишки можуть бути залученими до важливих взаємодій з іншими молекулами. Більше того, фахівець у цій галузі може розробити експериментальні варіанти, які включають заміну однієї амінокислоти на кожному бажаному амінокислотному залишку. Після цього згадані варіанти можуть перевірятись у реакціях визначення активності, відомих фахівцям у цій галузі. Такі варіанти можуть застосовуватись для збирання інформації щодо прийнятних варіантів. Наприклад, у разі визначення того, що наслідком заміни певного амінокислотного залишку є знищення, небажано знижена або невідповідна активність, варіанти з такою заміною можуть виключатись. Іншими словами, виходячи з інформації, зібраної шляхом подібних звичайних експериментів, фахівець

у цій галузі може легко визначити амінокислоти, які слід виключити з процесу заміни або самостійно, або у поєднанні з іншими мутаціями.

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

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

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

За додатковими варіантами здійснення варіанти антитіл можуть включати антитіла, що містять модифікований Fc-фрагмент або модифіковану константну ділянку важкого ланцюга. Fc-фрагмент (де скорочення означає "фрагмент, що кристалізується") або константна ділянка важкого ланцюга можуть бути модифіковані шляхом мутації для надання антитілу змінених характеристик зв'язування. Дивись, наприклад, Бартон (Burton), Вуф (Woof), 1992, *Advances in Immunology* 51:1-84; Равеч (Ravetch), Болланд (Bolland), 2001, *Annu. Rev. Immunol.* 19:275-290; Шілдс (Shields) та інші, 2001, *Journal of Biol. Chem.* 276:6591-6604; Теллман (Tellemann), Джунханс (Junghans), 2000, *Immunology* 100:245-251; Медсан (Medesan) та інші, 1998, *Eur. J. Immunol.* 28:2092-2100; усі ці роботи включено до цього опису шляхом посилання. Такі мутації можуть включати заміни, додання, делеції або будь-яку їх комбінацію, і здійснюються, як правило, сайт-спрямованим мутагенезом із застосуванням одного або декількох мутагенних олігонуклеотидів за методами, опис яких наведено у цьому описі, або за методами, відомими у цій галузі (дивись, наприклад, Сембрук (Sambrook) та інші, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 3 видання, 2001, Cold Spring Harbor, N.Y. та Бергер (Berger), Кімел (Kimmel), *METHODS IN ENZYMOLOGY*, том 152, Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, Inc., San Diego, штат Каліфорнія, які включено до цього опису шляхом посилання).

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

Аналоги пептидів широко застосовують у фармацевтичній промисловості як непептидні лікарські засоби з властивостями, аналогічними властивостям матричного пептиду. Непептидні сполуки такого типу називають "пептидними міметиками" або "пептидоміметиками". Дивись Фошер (Fauchere), 1986, Adv. Drug Res. 15:29; Вебер (Veber), Фрідінгер (Freidinger), 1985, TINS, 392; Еванс (Evans) та інші, 1987, J. Med. Chem. 30:1229; усі ці роботи включено до цього опису шляхом посилання для будь-яких цілей. Такі сполуки часто розробляються із застосуванням комп'ютеризованого молекулярного моделювання. Пептидоміметики, структурно подібні до терапевтично прийнятних пептидів, можуть застосовуватись для одержання подібного терапевтичного або профілактичного ефекту. Взагалі, пептидоміметики є структурно подібними до парадигматичного поліпептиду (тобто поліпептиду, що має біохімічну властивість або фармакологічну активність), наприклад, людського антитіла, але мають один або декілька пептидних зв'язків, факультативно замінені зв'язком, вибраним з групи, що включає:  $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{S}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-$  (цис і транс),  $-\text{COCH}_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$  і  $-\text{CH}_2\text{SO}-$ , методами, добре відомими у цій галузі. Систематична заміна однієї або декількох амінокислот консенсусної послідовності на D-амінокислоту того самого типу (наприклад, D-лізин замість L-лізину) може застосовуватись у певних варіантах здійснення для одержання більш стійких пептидів. На додаток до цього, обмежені пептиди, що містять консенсусну послідовність або по суті ідентичний варіант консенсусної послідовності, можуть одержуватись із застосуванням методів, відомих у цій галузі (Різо (Rizo), Гераш (Gierasch), 1992, Ann. Rev. Biochem. 61:387; ця робота включена до цього опису шляхом посилання для будь-якої мети); наприклад, шляхом додання внутрішніх залишків цистеїну, здатних до утворення міжмолекулярних дисульфідних містків, які циклізують пептид.

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

Термін "важкий ланцюг" включає будь-який імуноглобуліновий поліпептид, що має достатню послідовність варіабельної ділянки для надання специфічності відносно NGF. Термін "легкий ланцюг" включає будь-який імуноглобуліновий поліпептид, що має достатню послідовність варіабельної ділянки для надання специфічності відносно NGF. Непроцесований важкий ланцюг включає варіабельну ділянку важкого ланцюга,  $\text{V}_\text{H}$ -ділянку, та три константні ділянки важкого ланцюга,  $\text{C}_\text{H}1$ ,  $\text{C}_\text{H}2$  і  $\text{C}_\text{H}3$ .  $\text{V}_\text{H}$ -ділянка знаходиться на амінокінці поліпептиду,  $\text{C}_\text{H}3$ -ділянка знаходиться на карбоксильному кінці. Термін "важкий ланцюг", який вживається у цьому описі, означає непроцесований важкий ланцюг та його фрагменти. Непроцесований легкий ланцюг включає варіабельну ділянку легкого ланцюга,  $\text{V}_\text{L}$ -ділянку, та константну ділянку легкого ланцюга,  $\text{C}_\text{L}$ -ділянку. Подібно важкому ланцюгу, варіабельна ділянка легкого ланцюга знаходиться на амінокінці поліпептиду. Термін "легкий ланцюг", який вживається у цьому описі, означає непроцесований легкий ланцюг та його фрагменти.  $\text{F(ab)}$ -фрагмент включає один легкий ланцюг,  $\text{C}_\text{H}1$  і варіабельні ділянки одного важкого ланцюга. Важкий ланцюг молекули  $\text{F(ab)}$  не може утворювати дисульфідний зв'язок з іншою молекулою важкого ланцюга.  $\text{F(ab)'}_2$ -

фрагмент включає один легкий ланцюг і один важкий ланцюг, що містить більшу частину константної ділянки, між ділянками C<sub>H</sub>1 і C<sub>H</sub>2, завдяки чому між двома важкими ланцюгами може утворюватись міжланцюговий дисульфідний зв'язок з утворенням молекули F(ab')<sub>2</sub>. Fv-ділянка включає варіабельні ділянки як важкого, так і легкого ланцюгів, однак їй бракує константних ділянок. Одноланцюгові антитіла є молекулами Fv, у яких варіабельні ділянки важкого і легкого ланцюгів з'єднуються гнучким лінкером з утворенням одного поліпептидного ланцюга, який являє собою антигензв'язувальну ділянку. Одноланцюгові антитіла докладно обговорюються у публікації міжнародної заявки на WO 88/01649 і патентах США № 4,946,778 і № 5,260,203.

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

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

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

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

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

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

Терміни "мітка" або "мічений", які вживаються у цьому описі, означають включення виявного маркера, наприклад, шляхом включення амінокислоти, міченої радіоактивним ізотопом, або приєднання до поліпептиду біотинових складових, які можуть бути виявлені міченим авідином (наприклад, стрептавідином, який, за варіантом, якому віддають перевагу, містить виявний маркер, наприклад, флуоресцентний маркер, хемілюмінесцентний маркер, або який має ферментативну активність, що може бути виявлена оптичними або колориметричними методами). За певними варіантами здійснення згадана мітка може також бути терапевтичною. У цій галузі відомі різні методи мічення поліпептидів і глікопротеїнів, які можуть ефективно бути застосовані у методах, що розкриваються у цьому описі. Прикладами міток для поліпептидів є (але ними не обмежуються) наведені нижче: радіоактивні ізотопи або радіоактивні нукліди

(наприклад,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), флуоресцентні мітки (наприклад, флуоресцинізотіоціанат або FITC, родамін або лантаноїдні люмінофори), ферментативні мітки (наприклад, пероксидаза з хрому,  $\beta$ -галактозидаза, люцифераза, лужна фосфатаза), хемілюмінесцентні мітки, гаптенів мітки, наприклад, біотинільні групи, та попередньо визначені

5 поліпептидні антигенні детермінанти, розпізнані вторинним репортером (наприклад послідовності зі зв'язаними парами залишків лейцину, зв'язувальні сайти вторинних антитіл, ділянки зв'язування металів або мітки антигенних детермінант). За певними варіантами здійснення мітки приєднуються спейсерними групами (наприклад  $(\text{CH}_2)_n$ , де  $n < \text{приблизно } 20$ ) різної довжини для зменшення можливої стеричної невідповідності.

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

15 Термін "фармацевтичний агент або лікарський засіб", що вживається у цьому описі, означає хімічну сполуку або композицію, здатну індукувати бажаний терапевтичний ефект у разі відповідного введення хворому. Слід розуміти, що словосполучення "фармацевтично ефективна кількість" у відношенні фармацевтичної композиції, що містить одне або декілька антитіл за цим винаходом, означає, за цим винаходом, кількість згаданої фармацевтичної

20 композиції, що є здатною до запобігання, у згаданого хворого, зниження порогу чутливості до зовнішніх подразників із поверненням згаданого порогу чутливості до рівня, порівнянного з тим, що спостерігається у здорових суб'єктів.

"Розладом" є будь-який стан, який поліпшується у разі лікування за цим винаходом. Терміни "розлад" та "стан" вживаються у цьому описі взаємозамінно і включають хронічні та гострі NGF-опосередковані розлади або NGF-опосередковані захворювання, у тому числі ті патологічні

25 стани, які сприяють виникненню у ссавця згаданого розладу.

Словосполучення "NGF-опосередковане захворювання" та "NGF-опосередкований стан" означають будь-який медичний стан або розлад, що пов'язується зі зростанням рівнів NGF або підвищенням чутливості до NGF, у тому числі (але без обмеження) гострий біль, зубний біль,

30 біль, викликаний травмою, біль, викликаний хірургічним втручанням, біль унаслідок ампутації або абсцесу, каузалгію, демієлінізаційні захворювання, невралгію трійчастого нерва, рак, хронічний алкоголізм, інсульт, таламічний больовий синдром, діабет, синдром набутого імунodefіциту ("СНІД"), токсини та хіміотерапію, головний біль у цілому, мігрень, сильний нападopodobний головний біль з періодичними рецидивами, змішані серцево-судинні та

35 несерцево-судинні синдроми, головний біль, викликаний гіпер- або гіпотензією, запалення у цілому, артрит, ревматичні захворювання, вовчак, остеоартрит, запальні захворювання кишечника, синдром подразненої товстої кишки, запальні захворювання очей, запальні розлади або нестабільність сечового міхура, псоріаз, скарги на шкірні захворювання із запальними

40 складовими, сонячну еритему, кардит, дерматит, міозит, неврит, дифузну хворобу сполучної тканини судин, хронічні запальні стани, запальний біль та пов'язані з цим гіпералгією та алодинією, невропатичний біль та пов'язані з цим гіпералгією та алодинією, діабетичний невропатичний біль, біль унаслідок пошкодження симпатичних сенсорних нервів, синдроми деаферентації, астму, пошкодження або дисфункцію епітеліальної тканини, простий герпес, порушення вісцеральної рухливості на респіраторних, статевих-сечових, шлунково-кишкових або

45 серцево-судинних ділянках, рани, опіки, алергічні шкірні реакції, прурит, вітіліго, загальні захворювання шлунково-кишкового тракту, коліт, виразки шлунка, виразки дванадцятипалої кишки, вазомоторний або алергічний риніт, бронхіальні розлади, дисменорею, диспепсію, гастроєзофагеальний рефлюкс, панкреатит і вісцералгію.

Словосполучення "ефективна кількість" та "терапевтично ефективна кількість", що

50 вживаються у цьому описі, у разі застосування відносно носія або фармацевтичної композиції, що містить одне або декілька людських антитіл проти людського NGF, означає кількість або дозу, достатню для викликання бажаного результату (тобто у разі лікування із застосуванням носія або фармацевтичної композиції, що містить людські антитіла проти людського NGF за цим винаходом, бажаним результатом є, наприклад, бажане зменшення запалення та/або болю)

55 або підтримання зменшення рівня однієї або декількох біологічних активностей NGF, що спостерігається. Конкретніше, терапевтично ефективною кількістю є кількість людського антитіла(-іл) проти людського NGF, достатня для пригнічення, протягом деякого періоду часу, одного або декількох клінічно визначених патологічних процесів, що пов'язуються зі згаданим станом, наприклад, запалення або болю, у суб'єкта, якого піддають *in vivo* лікуванню із

60 застосуванням згаданого засобу. За цим винаходом, "ефективна кількість" анти-NGF антитіла

може запобігати, припиняти, контролювати або зменшувати відчуття болю, пов'язаного з будь-яким болісним медичним станом. У способах за цим винаходом термін "контроль" та його граматичні варіанти вживаються для позначення запобігання, часткового або повного пригнічення, зменшення, затримки або уповільнення небажаного явища, наприклад, болю.

Ефективна кількість може різнитися у залежності від конкретного вибраного носія або людського антитіла(-ілу) проти людського NGF, і залежить також від різноманітних факторів та станів, пов'язаних із суб'єктом, якого піддають лікуванню, а також тяжкості розладу. Наприклад, у разі, якщо носій або людське антитіло(-а) проти людського NGF повинні вводиться *in vivo*, факторами, які повинні прийматись до уваги, є вік, маса та стан здоров'я хворого, а також криві залежності "доза-ефект" та дані щодо токсичності, одержані у передклінічних дослідках на тваринах. Якщо засіб має контактувати з клітинами *in vitro*, слід розробити також різноманітні передклінічні *in vitro* дослідження для визначення таких параметрів, як поглинання, час напіввиведення, доза, токсичність тощо. Визначення ефективної кількості або терапевтично ефективною кількості даного засобу знаходиться у межах здатності фахівців у цій галузі.

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

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

Термін "хворий" означає людей і тварин.

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

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

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

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

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

Важливим практичним варіантом застосування такої методики є "гуманізація" мишачої гуморальної імунної системи. Введення людських імуноглобулінових (Ig) локусів мишам, у яких



ендогенні Ig гени були інактивовані, надає можливість вивчення механізмів, що лежать у основі програмованої експресії та складання антитіл, а також їх ролі у розвитку В-клітин. На додаток до цього, подібна методика забезпечує джерело продукування повністю людських моноклональних антитіл (MAbs).

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

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

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

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

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

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

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

45 Фахівець у цій галузі може одержати лінії мишей, дефіцитних щодо продукування мишачих антитіл, з великими фрагментами людських Ig локусів, завдяки чому такі миші продукують людські антитіла за відсутності мишачих антитіл. Великі людські Ig фрагменти можуть зберігати велике розмаїття варіабельних генів, а також відповідну регуляцію продукування і експресії антитіл. Завдяки використанню мишачих клітинних механізмів для диверсифікації та добору антитіл і відсутності імунологічної толерантності до людських білків, спектр репродукованих людських антитіл у таких мишачих лініях надає високоспоріднені антитіла проти будь-якого антигену, що становить інтерес, у тому числі людських антигенів. Із застосуванням гібридної технології можуть продукуватись і відбиратись антиген-специфічні людські моноклональні антитіла бажаної специфічності.

50 Можуть застосовуватись трансгенні тварини (наприклад, миші), що є здатними, у разі імунізації, до продукування повного спектру людських антитіл за відсутності продукування ендogenous імуноглобуліну. Наслідком перенесення сукупності людських зародкових імуноглобулінових генів до таких ембріональних мутантних мишей буде продукування людських

антитіл у разі антигенної стимуляції (дивись, наприклад, Джейкобовіц (Jakobovits) та інші, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551-2555, (1993); Джейкобовіц (Jakobovits) та інші, *Nature*, 362:255-258, (1993); Бруггеман (Bruggemann) та інші, *Year in Immun.*, 7:33 (1993); *Nature* 148:1547-1553 (1994), *Nature Biotechnology* 14:826 (1996); Гросс Дж.А. (Gross J.A.) та інші, *Nature*, 404:995-999 (2000); та патенти США № 5,877,397, № 5,874,299, № 5,814,318, № 5,789,650, № 5,770,429, № 5,661,016, № 5,633,425, № 5,625,126, № 5,569,825 та № 5,545,806 (кожен з яких включено до цього опису у повному обсязі шляхом посилання для будь-якої мети)). Людські антитіла можуть також продукуватись у бібліотеках із проявленням у фагах (Хугенбум (Hoogenboom), Вінтер (Winter), *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1992); Маркс (Marks) та інші, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)).

Доступними для одержання людських моноклональних антитіл є також методи Коул (Cole) та інших і Бернер (Boerner) та інших (Коул (Cole) та інші, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therap*, Alan R. Liss, стор. 77 (1985); Бернер (Boerner) та інші, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)).

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

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

Структура природних антитіл

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

Варіабельні ділянки, як правило, демонструють таку саму загальну структуру, що і відносно консервативні остовні ділянки (FR), і сполучаються трьома гіперваріабельними ділянками, які називають також hv-ділянками (CDRs). Гіперваріабельні ділянки двох ланцюгів кожної пари впорядковано розміщуються остовними ділянками, які можуть забезпечити можливість зв'язування зі специфічною антигенною детермінантою. Від N-кінця до C-кінця варіабельні ділянки як легких, так і важких ланцюгів включають, як правило, домени FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 та FR4. Приналежність амінокислот до кожного домену відповідає, як правило, визначенням, наведеним у довіднику *Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest* (1987 та 1991, National Institutes of Health, Bethesda, штат Мериленд) та роботах Чотья (Chothia), Леск (Lesk), 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Чотья (Chothia) та інші, 1989, *Nature* 342:878-883.

Біспецифічні або гетеровалентні антитіла

Біспецифічне або гетеровалентне антитіло, як правило, являє собою штучне гібридне антитіло, яке має дві різні пари важкий ланцюг/легкий ланцюг та два різні зв'язувальні центри. Біспецифічні антитіла можна одержати різноманітними методами, у тому числі (але без обмеження) шляхом злиття гібридом або зв'язування F(ab')<sub>2</sub>-фрагментів. Дивись, наприклад, Сонгсівілаї (Songsivilai), Лахман (Lachmann), 1990, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321; Костелні (Kostelny) та інші, 1992, *J. Immunol.* 148:1547-1553.

## Одержання антитіл

Цей винахід пропонує антитіла, які зв'язуються з людським NGF. Ці антитіла можуть продукуватись шляхом імунізації повномірним NGF або його фрагментами. Антитіла за цим винаходом можуть бути поліклональними або моноклональними та/або можуть бути

рекомбінантними антитілами. За варіантами, яким віддають перевагу, антитілами за цим винаходом є людські антитіла, які одержують, наприклад, шляхом імунізації трансгенних тварин, здатних до продукування людських антитіл (дивись, наприклад, міжнародну патентну заявку, публікація WO 93/12227).

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

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

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

Тваринною системою для одержання гібридом, якій віддають перевагу, є миші. Спосіб продукування гібридом мишачим організмом є добре розробленим, а схеми імунізації та методи виділення імунізованих спленоцитів для злиття є добре відомими у цій галузі. Відомими є також клітини, які зливаються (наприклад, клітини мишачої мієломи) та методики злиття.

За варіантом, якому віддають перевагу, людські моноклональні антитіла, спрямовані проти NGF, можуть одержуватись із застосуванням трансгенних мишей, які, замість мишачої імунної системи, несуть складові частини людської імунної системи. Ці трансгенні миші, яких у цьому описі позначають як "HuMab" мишей, несуть в собі мінілокус людського імунoglobulinового гена, що кодує неаранжовані імунoglobulinові послідовності людського важкого ланцюга (типів  $\mu$  та  $\gamma$ ) і легкого ланцюга типу  $\kappa$ , разом із цільовими мутаціями, які інактивують локуси ендогенних ланцюгів типів  $\mu$  і  $\kappa$  (Лонберг (Lonberg) та інші, 1994, *Nature* 368:856-859). Відповідно, миші демонструють знижену експресію мишачого IgM або  $\kappa$  і, у відповідь на імунізацію, введені трансгени людського важкого ланцюга і легкого ланцюга зазнають зміну класу і соматичну мутацію з продукуванням високоспоріднених людських моноклональних антитіл IgG  $\kappa$  (Лонберг (Lonberg) та інші (дивись вище); Лонберг (Lonberg), Гушар (Huszar), 1995, *Intern. Rev. Immunol.*

13:69-93; Гардінг (Harding), Лонберг (Lonberg), 1995, Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546). Одержання HuMab мишей докладно описано у роботах Тейлор (Taylor) та інші, 1992, Nucleic Acids Res. 20:6287-6295; Чен (Chen) та інші, 1993, International Immunology, 5:647-656; Тайон (Tuailon) та інші, 1994, J. Immunol. 152: 2912-2920; Лонберг (Lonberg) та інші, 1994, Nature 368:856-859; Лонберг (Lonberg), 1994, Handbook of Exp. Pharmacology 113:49-101; Тейлор (Taylor) та інші, 1994, International Immunology 6:579-591; Лонберг (Lonberg), Гушар (Huszar), 1995, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93; Гардінг (Harding), Лонберг (Lonberg), 1995, Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546; Фішвайлд (Fishwild) та інші, 1996, Nature Biotechnology 14:845-851, які у повному обсязі включено до цього опису шляхом посилання. Дивись також патенти США № 5,545,806; № 5,569,825; № 5,625,126; № 5,633,425; № 5,789,650; № 5,877,397; № 5,661,016; № 5,814,318; № 5,874,299; та № 5,770,429 (усі ці патенти видані на ім'я Лонберг (Lonberg) та Кей (Kay)), а також патент США № 5,545,807 (виданий на ім'я Сурані (Surani) та інші); міжнародні заявки WO 93/1227 (опублікована 24 липня 1993 року); WO 92/22646 (опублікована 23 грудня 1992 року); та WO 92/03918 (опублікована 19 березня 1992 року), розкриття яких у повному обсязі включено до цього опису шляхом посилання. За альтернативним варіантом, для одержання людських анти-NGF антитіл можуть застосовуватись трансгенні миші ліній HCo7, HCo12 і KM, опис яких представлено у наведених нижче Прикладах.

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

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

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

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

Людське антитіло проти людського NGF за цим винаходом, якому віддають найбільшу перевагу, позначається як 4D4 і має VL та VH поліпептидні послідовності, представлені послідовностями SEQ ID NO: 12 та SEQ ID NO: 10, відповідно. Полінуклеотидна послідовність, яка кодує VL і VH 4D4 представлена послідовностями SEQ ID NO: 11 та SEQ ID NO: 9, відповідно. Властивості людських антитіл проти людського NGF за цим винаходом розкриваються, зокрема, у Прикладах. Особливої уваги заслуговує показана у цьому описі висока спорідненість до NGF поліпептиду і висока здатність антагонізувати активність NGF поліпептиду.

Константа дисоціації ( $K_D$ ) людського антитіла проти людського NGF може визначатись поверхневим плазмонним резонансом, як у цілому описано у Прикладі 9. Взагалі, аналізом поверхневого плазмонного резонансу (SPR) із застосуванням системи BIAcore (Pharmacia Biosensor, Piscataway, штат Нью-Джерсі) у масштабі реального часу визначають зв'язувальні взаємодії між лігандом (рекомбінантний NGF поліпептид, іммобілізований на біосенсорній матриці) та речовиною, яку піддають аналізу (антитіла у розчині). Аналіз поверхневого плазмонного резонансу може здійснюватись також шляхом іммобілізації речовини, яку піддають аналізу (антитіла на біосенсорній матриці), і представленням ліганду (рекомбінант V у розчині).

Константа дисоціації ( $K_D$ ) людського антитіла проти людського NGF може визначатись також за методикою KinExA. За певними варіантами здійснення цього винаходу антитіла зв'язуються з NGF з  $K_D$  у межах приблизно  $10^{-8}$  М- $10^{-12}$  М. Термін " $K_D$ ", що вживається у цьому описі, означає константу дисоціації конкретної взаємодії антитіла-антигена. Для цілей цього винаходу  $K_D$  визначали як показано у Прикладі 9.

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

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

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

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

Як добре відомо, наслідком незначних заміни у амінокислотній послідовності, наприклад, видалення, додання або заміни однієї, декількох або навіть декількох десятків амінокислот, може бути одержання алельної форми вихідного білка, яка має по суті ідентичні властивості. Таким чином, на додаток до антитіл, опис яких наведено, інші "по суті гомологічні" антитіла можуть легко розроблятись і одержуватись із застосуванням різноманітних методів рекомбінантних ДНК, добре відомих фахівцям у цій галузі. Взагалі, модифікації генів можуть легко здійснюватись різноманітними добре відомими методами, наприклад, сайт-спрямованим мутагенезом. Таким чином, цей винахід передбачає "варіантні" або "мутантні" людські антитіла проти NGF, що мають характеристики по суті подібні характеристикам людських антитіл проти NGF, які розкриваються у цьому описі. (Дивись, наприклад, WO 00/56772, яку у повному обсязі включено до цього опису шляхом посилання). Таким чином, згаданий термін "варіантне" або "мутантне" у відношенні до людського антитіла проти NGF означає будь-яку зв'язувальну молекулу (молекулу X) (i) гіперваріабельні ділянки CDR1, CDR2 і CDR3 важкого ланцюга або гіперваріабельні ділянки CDR1, CDR2 і CDR3 легкого ланцюга якої, взяті у цілому, є щонайменше на 80 % гомологічними, за варіантом, якому віддають перевагу, щонайменше на 90 % гомологічними, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, щонайменше на 95 % гомологічними гіперваріабельним ділянкам, представленим послідовностями SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18 та SEQ ID NO: 22 або послідовностями SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20 та SEQ ID NO: 24, відповідно, і (ii) варіант або мутант якої є здатним до пригнічення активності людського NGF такою самою мірою, що і еталонне людське антитіло проти NGF, яке має остовні ділянки, ідентичні остовним ділянкам молекули X.

За звичайних умов варіант людського антитіла проти NGF буде мати гіперваріабельні ділянки легкого та/або важкого ланцюга, які, взяті у цілому, мають щонайменше приблизно 80 % ідентичність амінокислотних послідовностей, за варіантом, якому віддають перевагу,



якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 92 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 93 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 94 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 95 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 96 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 97 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 98 % ідентичність послідовностей, за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, щонайменше приблизно 99 % ідентичність послідовностей з амінокислотними послідовностями, представленими послідовностями SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85 або SEQ ID NO: 87.

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

За конкретними варіантами здійснення цей винахід пропонує антитіла, що мають відсоток ідентичності з антигеном за цим винаходом або антитіло, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, варіабельну ділянку легкого ланцюга, CDR1, CDR2 або CDR3 ділянку, яка має відсоток ідентичності з варіабельною ділянкою важкого ланцюга, варіабельною ділянкою легкого ланцюга, CDR1, CDR2 або CDR3 ділянкою за цим винаходом, як показано у наведеному у цьому описі Прикладі 10 та Фіг. 5-10.

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







імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 % або 78 % ідентичною амінокислотній послідовності, представлений послідовністю SEQ ID NO: 16, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 70 % або 85 % ідентичною амінокислотній послідовності, представлений послідовністю SEQ ID NO: 109, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; щонайменше на 78 % ідентичною амінокислотній послідовності, представлений послідовністю SEQ ID NO: 134, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту; або щонайменше на 85 % ідентичною амінокислотній послідовності, представлений послідовністю SEQ ID NO: 115, або її антигензв'язувальному чи імунологічно функціональному імуноглобуліновому фрагменту.

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

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

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

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

За факультативним варіантом, згаданий вектор може містити послідовність кодування "мітки", тобто олігонуклеотидну молекулу, розміщену на 5' або 3' кінці поліпептидної кодувальної

послідовності анти-NGF антитіла; згадана олігонуклеотидна послідовність кодує поліHis (наприклад, гексаHis) або іншу "мітку", наприклад, FLAG, HA (гемаглютинін вірусу грипу) або тус, для яких існують комерційно доступні антитіла. Ця мітка, як правило, зливається з поліпептидом при його експресії, і може правити за засіб афінного очищення або виявлення

5 NGF антитіла у клітині-хазяїні. Афінне очищення може здійснюватись, наприклад, шляхом хроматографування на колонках із застосуванням антитіл проти згаданої мітки, як афінної матриці. За факультативним варіантом, згадана мітка може у подальшому видалятися з очищеного анти-NGF антитіла різними способами, наприклад, шляхом застосування певних пептидаз для розщеплення.

10 Фланкуючі послідовності можуть бути гомологічними (тобто від того самого виду та/або штаму, що і клітина-хазяїн), гетерологічними (тобто від інших видів, крім виду клітини-хазяїна або штаму), гібридними (тобто комбінація фланкуючих послідовностей з більше ніж одного джерела), синтетичними або нативними. Як таким, джерелом фланкуючої послідовності може бути будь-який прокаріотний або еукаріотний організм, будь-який хребетний або безхребетний

15 організм або будь-яка рослина, за умови, що згадана фланкуюча послідовність є функціональною у клітинних механізмах клітини-хазяїна і може бути активованою клітинними механізмами клітини-хазяїна.

Фланкуючі послідовності, придатні для згаданих векторів за цим винаходом, можна одержати із застосуванням будь-якого з декількох способів, добре відомих у цій галузі. За

20 типовим варіантом, фланкуючі послідовності, придатні для цього винаходу, будуть попередньо ідентифікуватись шляхом картування та/або рестриктазного розщеплення і можуть, таким чином, виділятися з відповідного тканинного джерела за допомогою із застосуванням відповідних рестриктаз. У деяких випадках, повна нуклеотидна послідовність фланкуючої послідовності може бути відомою. У такому разі, фланкуюча послідовність може бути

25 синтезована за допомогою із застосуванням наведених у цьому описі методів синтезу або клонування нуклеїнових кислот.

Незалежно від того, чи є відомою уся або лише частина фланкуючої послідовності, цю фланкуючу послідовність можна одержати із застосуванням полімеразної ланцюгової реакції (PCR) та/або шляхом скринінгу геномної бібліотеки із застосуванням відповідного зонда,

30 наприклад, олігонуклеотиду та/або фрагмента фланкуючої послідовності від того самого або іншого виду. У разі, коли фланкуюча послідовність є невідомою, фрагмент ДНК, що містить фланкуючу послідовність, може бути виділеним із більшого відрізка ДНК, що може містити, наприклад, кодувальну послідовність або навіть інший ген або гени. Виділення може здійснюватись шляхом рестриктазного розщеплення з одержанням відповідного фрагмента ДНК

35 з подальшим виділенням шляхом очищення на лунках із гелем агарози, хроматографування на колонках Qiagen® (Chatsworth, штат Каліфорнія) або із застосуванням інших методів, відомих досвідченому фахівцю. Вибір відповідних ферментів для досягнення згаданої мети буде очевидним для пересічного фахівця у цій галузі.

Сайт ініціації реплікації являє собою, як правило, частину тих прокаріотних експресійних векторів, які одержують з комерційних джерел, і згаданий сайт допомагає у разі ампліфікації

40 вектора у клітині-хазяїні. Якщо обраний вектор не містить сайту ініціації реплікації, його можна синтезувати хімічним шляхом, виходячи з відомої послідовності, та лігувати до вектора. Наприклад, сайт ініціації реплікації з плазмиди pBR322 (фірма New England Biolabs, Beverly, штат Массачусетс) є придатним для більшості грамнегативних бактерій, а різноманітні вірусні сайти (наприклад, SV40, вірусу полііоми, аденовірусу, вірусу везикулярного стоматиту (VSV) або вірусу папіломи, наприклад, вірусу папіломи людини (HPV) або вірусу папіломи великої рогатої худоби (BPV)) є придатними для клонування векторів у клітинах ссавців. Взагалі, така складова,

45 як сайт ініціації реплікації не є необхідною для експресійних векторів ссавців (наприклад, сайт ініціації реплікації SV40 часто застосовують лише тому, що він містить також ранній промотор вірусу).

Термінатор транскрипції, як правило, знаходиться у прямому (3') напрямку відносно кінця поліпептидної кодувальної ділянки і призначений для закінчення транскрипції. Термінатор у клітинах-прокаріотах являє собою, як правило, G-C-збагачений фрагмент, за яким іде полі(T)-

55 послідовність. Незважаючи на те, що термінатор легко клонується з бібліотеки або навіть одержується з комерційних джерел як частина вектора, він може бути легко синтезованим із застосуванням методів синтезу нуклеїнових кислоти, наприклад, наведених у цьому описі.

Селектований маркерний ген кодує білок, необхідний для виживання та росту клітини-хазяїна, яка вирощується на селективному культуральному середовищі. Типові селектовані маркерні гени кодують білки, які (а) забезпечують стійкість до антибіотиків або інших токсинів,

60 наприклад, ампіциліну, тетрацикліну або канаміцину у разі прокаріотних клітин-хазяїв; (b)

доповнюють ауксотрофні дефіцити клітини; або (с) постачають критичні поживні речовини, недоступні із живильних середовищ повного або певного складу. Переважними селектованими маркерними генами є ген стійкості до канаміцину, ген стійкості до ампіциліну та ген стійкості до тетрацикліну. Перевага полягає у тому, що ген стійкості до неоміцину може також

5 застосовуватись для добору як прокаріотних, так і еукаріотних клітин-хазяїв.

Для ампліфікації гена, який буде експресуватись, можуть застосовуватись інші селектовані гени. Ампліфікація являє собою процес, під час якого гени, необхідні для продукування білка, критичного для росту або виживання клітини, послідовно повторюються у хромосомах наступних генерацій рекомбінантних клітин. Прикладами прийнятих селектованих маркерів для

10 клітин ссавців є дигідрофолатредуктаза (DHFR) та безпромоторні гени тимідинкінази. Клітини-трансформанти ссавців піддаються селекційному тиску, у разі якого лише трансформанти виявляються специфічно пристосованими для виживання завдяки присутності у векторі селектованого гена. Селекційний тиск накладається шляхом культивування трансформованих клітин за умов, при яких концентрація селекційного засобу у живильному середовищі поступово

15 збільшується, наслідком чого є ампліфікація як селектованого гена, так і ДНК, що кодує інший ген, наприклад, антитіло, що зв'язується з NGF поліпептидом. Як наслідок, з ампліфікованої ДНК синтезуються підвищені кількості поліпептиду, наприклад, анти-NGF антитіла.

Сайт зв'язування рибосоми є, як правило, необхідним для ініціювання трансляції мРНК і характеризується присутністю послідовності Шайна-Делгарно (прокаріоти) або послідовності

20 Козака (еукаріоти). Згаданий елемент знаходиться, як правило, у прямому (3') напрямку відносно промотору і зворотному (5') напрямку відносно кодувальної послідовності поліпептиду, що буде експресуватись.

У деяких випадках, наприклад, коли бажаним є глікозилювання експресійної системи, представленої еукаріотною клітиною-хазяїном, для поліпшення глікозилювання або виходу

25 можна здійснювати маніпуляції з різними пре- або пропослідовностями. Наприклад, можна змінити сайт пептидазного розщеплення конкретного сигнального пептиду або додати пропослідовності, які також можуть вплинути на глікозилювання. Кінцевий білковий продукт може мати у -1 положенні (відносно першої амінокислоти зрілого білка) одну або декілька додаткових амінокислот, зв'язаних з експресією, які могли бути неповністю видаленими.

30 Наприклад, кінцевий білковий продукт може мати один або два амінокислотні залишки на сайті пептидазного розщеплення, приєднані до амінокінця. За альтернативним варіантом, наслідком застосування деяких сайтів ферментативного розщеплення може бути дещо укорочена форма бажаного поліпептиду, якщо фермент виявляє свою дію на такій ділянці у межах зрілого поліпептиду.

Вектори експресії та клонування за цим винаходом будуть, як правило, містити промотор, який розпізнається організмом-хазяїном і є функціонально зв'язаним із молекулою, що кодує анти-NGF антитіло. Промоторами є нетранскрибовані послідовності, які знаходяться у зворотному напрямку (тобто 5') відносно стартового кодону структурного гена (як правило, приблизно у межах від 100 п.н. до 1000 п.н.), що контролюють транскрипцію структурного гена.

40 Промотори, за традицією, об'єднують одним або двома класами: індукцибельні промотори і конститутивні промотори. Індукцибельні промотори ініціюють підвищені рівні транскрипції з ДНК під своїм контролем у відповідь на деяку зміну умов культивування, наприклад, присутність або відсутність поживної речовини або зміну температури. Конститутивні промотори, з іншого боку, одностайно транскрибують ген, з яким вони є функціонально зв'язаними, тобто з незначним або

45 повною відсутністю контролю за експресією гена. Добре відомою є велика кількість промоторів, що розпізнаються різноманітними потенційними клітинами-хазяями. Прийнятний промотор функціонально зв'язується з ДНК, що кодує важкий ланцюг або легкий ланцюг, що містить анти-NGF антитіло за цим винаходом, шляхом видалення згаданого промотору з ДНК-джерела рестриктазним розщепленням і введенням бажаної промоторної послідовності до вектора.

У цій галузі добре відомими є також прийнятні промотори для застосування з дріжджовими клітинами-хазяями. Дріжджові енхансери застосовуються переважно з дріжджовими промоторами. Прийнятні промотори для застосування з клітинами-хазяями ссавців є добре відомими і включають (але без обмеження) промотори, одержані з геномів таких вірусів, як вірус полііоми, вірус віспи птиці, аденовірус (наприклад, аденовірус 2), вірус папіломи великої рогатої

50 худоби, вірус саркоми птиці, вірус цитомегалії людини, ретровіруси, вірус гепатиту В і, за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, мавпячий вірус 40 (SV40). До інших прийнятих промоторів ссавців належать гетерологічні промотори ссавців, наприклад, промотори теплового шоку та промотор актину.

Додаткові промотори, які можуть становити інтерес, включають (але не обмежуються):

60 ранній промотор SV 40 (Бернуа (Bernois), Шамбон (Chambon), 1981, Nature 290:304-10);

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

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

Експресійні вектори за цим винаходом можуть конструюватись із вихідного вектора, наприклад, комерційно доступного вектора. Такі вектори можуть містити або можуть не містити усі бажані фланкуючі послідовності. У разі, якщо у згаданому векторі немає однієї або декількох фланкуючих послідовностей, опис яких наведено, вони можуть бути одержані у індивідуальному порядку і ліговані до вектора. Методи, які застосовуються для одержання кожної зі згаданих фланкуючих послідовностей, є добре відомими фахівцю у цій галузі.

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

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

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

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

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

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

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

За певними варіантами здійснення фармацевтична композиція може містити матеріали для модифікування, підтримання або збереження, наприклад, рН, осмотичного тиску, в'язкості, прозорості, кольору, ізотонічності, запаху, стерильності, стабільності, швидкості розчинення або виділення, поглинання або проникнення згаданої композиції. За такими варіантами здійснення до придатних для одержання композицій матеріалів належать (але ними не обмежуються) амінокислоти (наприклад, гліцин, глутамін, аспарагін, аргінін або лізин); протимікробні засоби; антиоксиданти (наприклад, аскорбінова кислота, сульфід натрію або гідросульфід натрію); буфери (наприклад, борат, бікарбонат, трис-HCl, цитрати, фосфати або інші органічні кислоти); наповнювачі (наприклад, маніт або гліцин); хелатоутворювачі (наприклад, етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA)); комплексоутворювачі (наприклад, кофеїн, полівінілпіролідон, бета-циклодекстрин або гідроксипропіл-бета-циклодекстрин); заповнювачі; моносахариди; дисахариди; та інші вуглеводи (наприклад, глюкоза, маноза або декстрини); білки (наприклад, сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни); барвники, коригенти та розріджувачі; емульгатори; гідрофільні полімери (наприклад, полівінілпіролідон); поліпептиди низької молекулярної маси; солетворні протиіони (наприклад, натрій); консерванти (наприклад, бензалконію хлорид, бензойна кислота, саліцилова кислота, тімеросаль, фенетиловий спирт, метилпарабен, пропілпарабен, хлоргексидин, сорбінова кислота або пероксид водню); розчинники (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь або поліетиленгліколь); спирти з цукру (наприклад, маніт або сорбіт); суспендувальні засоби; поверхнево-активні або змочувальні речовини (наприклад, плуроніки, поліетиленгліколь, складні ефіри сорбітану, полісорбати,

наприклад, полісорбат 20, полісорбат 80, тритон, трометамін, лецитин, холестерин, тилоксапал); речовини, що сприяють підвищенню стійкості (наприклад, цукроза або сорбіт); засоби, що сприяють підвищенню ізотонічності (наприклад, галогеніди лужних металів, за варіантом, якому віддають перевагу, хлорид натрію або калію, маніт, сорбіт); носії; розчинники; наповнювачі та/або фармацевтичні ад'юванти. Дивись REMINGRTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18 видання, (редактор А.Р. Геннаро (A.R. Gennaro)), 1990, Mack Publishing Company.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ефективна кількість фармацевтичної композиції, яка містить анти-NGF антитіло, призначеної для терапевтичного застосування, буде залежати, наприклад, від терапевтичного контексту та цілей. Фахівцю у цій галузі буде зрозуміло, що прийнятна доза для лікування буде залежати, частково, від молекули, яка доставляється, показання, за яким застосовується анти-



NGF антитіло, шляху введення і розміру (маса тіла, поверхня тіла або розмір органа) та/або стану (вік та загальний стан здоров'я) хворого. За певними варіантами здійснення лікар може титрувати дозу і модифікувати шлях введення для одержання оптимального терапевтичного ефекту. Типова доза може коливатись у межах від приблизно 0,1 мкг/кг до приблизно 30 мкг/кг або більше, у залежності від згаданих вище факторів. За варіантами, яким віддають перевагу, доза може коливатись у межах від 0,1 мкг/кг до приблизно 30 мкг/кг; за варіантом, якому віддають більшу перевагу, від 1 мкг/кг до приблизно 30 мкг/кг; за варіантом, якому віддають ще більшу перевагу, від 5 мкг/кг до приблизно 30 мкг/кг.

За певними варіантами здійснення, композиції можуть вводитись шляхом підшкірної ін'єкції. Як зазначалось вище, величина дози може визначатись лікарем, однак за певними варіантами здійснення, фармацевтично ефективна кількість анти-NGF антитіла у композиції, призначений для введення шляхом підшкірної ін'єкції, знаходиться у межах від приблизно 0,1 мкг/кг до приблизно 30 мкг/кг. За певними варіантами здійснення, фармацевтично ефективна кількість анти-NGF антитіла становить від приблизно 3 мг до приблизно 30 мг/підшкірну ін'єкцію. За певними варіантами здійснення, введення включає декілька підшкірних ін'єкцій. За ще іншими варіантами здійснення, введення включає одну підшкірну ін'єкцію.

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

Спосіб введення фармацевтичної композиції відповідає відомим методам, наприклад, перорально, шляхом внутрішньовенної, інтраперитонеальної, інтрацеребральної (інтрапаренхиматозної), інтрацеребровентрикулярної, внутрішньом'язової, внутрішньоочної, внутрішньоартеріальної ін'єкції, ін'єкції в ворітну вену або ін'єкції у місце ушкодження, із застосуванням систем пролонгованого вивільнення або імплантаційних засобів. За певними варіантами здійснення композиції можуть вводитись шляхом ін'єкції болюса або безперервно шляхом вливання чи імплантаційним засобом.

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

За певними варіантами здійснення, цей винахід стосується способу лікування стану, який спричинюється підвищеною експресією фактора росту нервової тканини (NGF) або підвищеною чутливістю до NGF, і включає введення пацієнту фармацевтично ефективної кількості анти-NGF антитіла перорально, шляхом внутрішньовенної, інтраперитонеальної, інтрацеребральної (інтрапаренхиматозної), інтрацеребровентрикулярної, внутрішньом'язової, внутрішньоочної, внутрішньоартеріальної ін'єкції, ін'єкції в ворітну вену, ін'єкції у місце ушкодження або підшкірної ін'єкції, із застосуванням систем пролонгованого виділення або імплантаційних засобів, причому згаданий стан являє собою гострий біль, зубний біль, біль, викликаний травмою, біль, викликаний хірургічним втручанням, біль унаслідок ампутації або абсцесу, каузалгії, демієлінізаційних захворювань, невралгії трійчастого нерва, раку, хронічного алкоголізму, інсульту, таламічного больового синдрому, діабету, синдрому набутого імунodefіциту ("СНІД"), токсинів та хіміотерапії, головний біль у цілому, мігрень, сильний нападopodobний головний біль з періодичними рецидивами, біль унаслідок змішаних серцево-судинних та несерцево-судинних синдромів, головний біль, викликаний гіпер- або гіпотензією, біль унаслідок генералізованого запалення, артриту, ревматичних захворювань, вовчака, остеоартриту, фіброміалгії, запальних захворювань кишечника, синдрому подразненої товстої кишки, запальних захворювань очей, запальних розладів або нестабільності сечового міхура, псоріазу, шкірних захворювань із

запальними складовими, сонячної еритеми, кардиту, дерматиту, міозиту, невриту, дифузної хвороби сполучної тканини судин, хронічних запальних станів, запальний біль та пов'язані з ним гіпералгезії та алодинію, невропатичний біль та пов'язані з ним гіпералгезією та алодинію, діабетичний невропатичний біль, біль унаслідок пошкодження симпатичних сенсорних нервів, синдрому деаферентації, астми, пошкодження або дисфункції епітеліальної тканини, простого герпесу, порушення вісцеральної рухливості на респіраторних, статевих, шлунково-кишкових або серцево-судинних ділянках, ран, опіків, алергічних шкірних реакцій, пруриту, вітіліго, загальних захворювань шлунково-кишкового тракту, коліту, укривання виразками шлунка, виразок дванадцятипалої кишки, вазомоторного або алергічного риніту, бронхіальних розладів, дисменореї, диспепсії, гастроєзофагеального рефлюксу, панкреатиту або вісцералгії.

За певними варіантами здійснення, згадані способи включають введення фармацевтично ефективної кількості анти-NGF антитіла і є ефективними для лікування або запобігання остеоартритного болю у коліні. За певними варіантами здійснення, фармацевтично ефективна кількість анти-NGF антитіла становить від приблизно 3 мг до приблизно 30 мг/підшкірну ін'єкцію. За певними варіантами здійснення, введення включає декілька підшкірних ін'єкцій. За деякими варіантами здійснення, композиції та способи за цим винаходом включають анти-NGF антитіло, яке містить легкий ланцюг, представлений послідовністю SEQ ID NO: 44. За певними варіантами здійснення, анти-NGF антитіло містить важкий ланцюг, представлений послідовністю SEQ ID NO: 40. За додатковими варіантами здійснення, анти-NGF антитіло містить легкий ланцюг, представлений послідовністю SEQ ID NO: 44, і важкий ланцюг, представлений послідовністю SEQ ID NO: 40.

Відповідно до вищенаведеного опису цього винаходу, за різними аспектами, цей винахід стосується способів та композицій, які містять анти-NGF антитіло, яке містить легкий ланцюг, представлений послідовністю SEQ ID NO: 44, і важкий ланцюг, представлений послідовністю SEQ ID NO: 40, причому згаданий важкий ланцюг і згаданий легкий ланцюг антитіла є сполученими гнучким лінкером з одержанням одноланцюгового антитіла. За деякими варіантами здійснення цього аспекту, анти-NGF антитіло містить одноланцюгове Fv антитіло, Fab' антитіло, (Fab')<sub>2</sub> антитіло, повністю людське антитіло та/або гуманізоване антитіло. За деякими варіантами здійснення цього аспекту, анти-NGF антитіло пригнічує передачу сигналу NGF.

За певними варіантами здійснення цього аспекту, анти-NGF антитіло відокремлюється від людського NGF поліпептиду з  $K_D$  приблизно  $1 \times 10^{-9}$  або менше, приблизно  $1 \times 10^{-10}$  або менше чи приблизно  $1 \times 10^{-11}$  або менше. За певними варіантами здійснення цього аспекту, анти-NGF антитіло нейтралізує біологічну активність людського NGF у стандартній *in vitro* реакції з IC<sub>50</sub> приблизно  $1 \times 10^{-8}$  М або менше, приблизно  $1 \times 10^{-9}$  М або менше чи приблизно  $0,2 \times 10^{-9}$  М або менше. За певними варіантами здійснення, анти-NGF антитіло відокремлюється від людського NGF поліпептиду з вищевказаним(-и) значенням(-и)  $K_D$  і нейтралізує біологічну активність людського NGF у стандартній *in vitro* реакції з вищевказаними значеннями IC<sub>50</sub>.

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

Зокрема, анти-NGF антитіла можуть доставлятися шляхом імплантування певних клітин, які були піддані генно-інженерним маніпуляціям із застосуванням таких, наприклад, способів, які наводяться у цьому описі, для експресії та секреції поліпептиду. За певними варіантами здійснення такими клітинами можуть бути клітини тварин або людей, і ці клітини можуть бути аутологічними, гетерологічними або ксеногенними. За певними варіантами здійснення згадані клітини можуть бути іморталізовані. За певними варіантами здійснення для зменшення ймовірності імунологічної реакції, клітини можуть бути включені до капсул для запобігання інфільтрації навколишніх тканин. За додатковими варіантами здійснення матеріали для виготовлення згаданих капсул є, як правило, біосумісними, напівпроникними полімерними матеріалами або мембранами, які забезпечують можливість вивільнення білка(-ів), але запобігають знищенню клітин імунною системою хворого або іншими шкідливими факторами з навколишніх тканин.

#### ПРИКЛАДИ

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

## Приклад 1

Одержання людського NGF білка з клітин *E. coli*

Клонування gHu-NGF (1-120)

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

Експресійний вектор pCFM1656 (ATCC № 69576) одержали з експресійної векторної системи, описаної у патенті США № 4,710,473. Плазмиду pCFM1656 можна одержати з описаної плазміди pCFM836 (патент № 4,710,473) таким чином: (а) руйнуванням двох ендегенних NdeI сайтів рестрикції шляхом доповнення кінців ферментом T4 полімеразаю з подальшим лігуванням по "тупих" кінцях; (b) заміною послідовності ДНК між специфічними AatII і ClaI сайтами рестрикції, що містить синтетичний промотор P<sub>L</sub>, на подібний фрагмент, одержаний з pCFM636 (патент № 4,710,473), що містить промотор P<sub>L</sub>, із подальшою (c) заміною невеликої послідовності ДНК між специфічними ClaI і KpnI сайтами рестрикції на олігонуклеотид, який одержали шляхом ренатурації двох зондів, що мають нуклеотидні послідовності, представлені послідовністю SEQ ID NO: 31 і послідовністю SEQ ID NO: 32.

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

Експресія gHu-NGF (1-120)

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

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

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

## Приклад 2

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

Трансгенні HuMab і KM миші

Повністю людські моноклональні антитіла проти NGF одержали із застосуванням трансгенних мишей ліній HCo7, HCo12, HCo7+HCo12 і KM, кожна з яких експресує гени людського антитіла. У кожній з цих ліній мишей ендегенний ген мишачого легкого ланцюга типу каппа гомозиготно руйнували, як описано у Чен (Chen) та інших (1993, EMBO J. 12:811-820), а ендегенний ген мишачого важкого ланцюга гомозиготно руйнували, як описано у Прикладі 1

публікації міжнародної заявки WO 01/09187 (яку включено до цього опису шляхом посилання). Кожна з цих мишачих ліній несе людський трансген легкого ланцюга типу каппа, KCo5, як описано у Фішвайлд (Fishwild) та інших (1996, Nature Biotechnology 14:845-851). Лінія HCo7 несе трансген HCo7 людського важкого ланцюга, як описано у патентах США № 5,545,806, № 5,625,825 і № 5,545,807 (які включено до цього опису шляхом посилання). Лінія HCo12 несе трансген HCo12 людського важкого ланцюга, як описано у Прикладі 2 публікації міжнародної заявки WO 01/09187 (яку включено до цього опису шляхом посилання). Лінія HCo7+HCo12 несе обидва трансгени HCo7 і HCo12 важкого ланцюга і є гемізиготною по кожному трансгену. Миші лінії KM містять трансген SC20 важкого ланцюга, як описано у Томізука (Tomizuka) та інших (1997, Nature Genet. 16, 133-143 і 2000, Proc. Natl. Acad. Sci, 97, 722-727). Цей трансген не інтегрується до мишачої хромосоми, але замість цього розмножується як незалежний хромосомний фрагмент. Цей фрагмент включає приблизно 15 МВ людської хромосоми 14. Він містить повний локус людського важкого ланцюга, у тому числі усі сегменти генів VH, D і JH та усі ізоформи константної ділянки важкого ланцюга. Усі ці лінії позначаються у цьому описі як HuMab миші.

#### Імунізація HuMab:

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

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

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

Одержання гібридом, які продукують людські моноклональні антитіла проти NGF

Мишей готували для продукування моноклональних антитіл шляхом внутрішньовенної реімунізації антигеном за 2 дні до умертвіння з подальшим видаленням селезінок. Мишачі спленоцити виділяли з HuMab мишей і за стандартними методиками, із застосуванням поліетиленгліколю (PEG), зливали з лінією клітин мишачої мієломи. За типовим варіантом, здійснили 10-20 зливань для кожного антигену.

Стисло, суспензії окремих клітин лімфоцитів селезінки імунізованих мишей зливали з однією четвертою кількості несекретуючих клітин мишачої мієломи P3X63-Ag8.653 (ATCC, номер депонування CRL 1580) з 50 % розчином поліетиленгліколю (PEG) (фірма Sigma). Клітини висівали (приблизно  $1 \times 10^5$ /лунку) на титраційні мікропланшети з плоским дном із подальшим приблизно двотижневим інкубуванням у селективному середовищі, яке містило 10 % сироватки зародка великої рогатої худоби, 10 % кондиціонованого живильного середовища P388D1

(ATCC, номер депонування CRL TIB-63), 3-5 % розчин оригену (фірма IGEN) у DMEM (модифіковане за способом Дульбекко середовище Ігла) (фірма Mediatech, номер за каталогом CRL 10013, із високим вмістом глюкози, L-глутаміну і пірувату натрію) плюс 5 мМ розчин ГЕПЕС-буфера, 0,055 мМ розчин 2-меркаптоетанолу, 50 мг/мл гентаміцину і 1×HAT (гіпоксантин-аміноптеринтимідинове середовище) (фірма Sigma, номер за каталогом CRL P-7185). Через 1-2 тижні клітини культивували у середовищі, у якому HAT замінили на HT (гіпоксантин-тимідинове "проміжне" середовище).

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

Добір людських моноклональних антитіл, які зв'язуються з NGF

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

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

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

### Приклад 3

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

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

Культури нейронів гангліїв заднього корінця головного мозку

Ганглії заднього корінця (DRG) головного мозку відрізали один за одним за асептичних умов від усіх спінальних сегментів 19-добових зародків пацюків (E19), хірургічним шляхом видалених із маток термінально анестезованих на певному періоді вагітності пацюків лінії Sprague-Dawley (фірма Charles River, Wilmington, штат Массачусетс). DRG збирали до середовища L-15 (фірма GibcoBRL, Grand Island, штат Нью-Йорк), яке мало температуру танення льоду і містило 5 % інактивованої теплою конячої сироватки (фірма GibcoBRL), з видаленням будь-якої зайвої сполучної тканини і кровоносних судин. DRG двічі промивали фізіологічним розчином, забуференим фосфатом Дульбекко (DPBS) без  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Mg}^{2+}$  (pH 7,4) (фірма GibcoBRL). Після цього з DRG, із застосуванням папаїнової дисоціаційної системи (фірма Worthington Biochemical Corp., Freehold, штат Нью-Джерсі), одержували суспензію поодиноких клітин. Стисло, DRG інкубували у гідролітичному розчині, що містив 20 Од/мл папаїну у збалансованому сольовому розчині Ерла (EBSS) при температурі 37 °C протягом 50 хв. Клітини відділяли шляхом продавлювання через відполіровані опаленням пастерівські піпетки у дисоціативному середовищі, яке містило MEM (мінімальне підтримувальне середовище)/Ham's F12 (неоднорідне штучне живильне середовище F12) (1:1), 1 мг/мл овомукоїдного інгібітора, 1 мг/мл овальбуміну та 0,005 % дезоксирибонуклеази I (ДНКаза).

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

#### Обробка NGF і анти-NGF

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

#### Визначення експресії VR1 у нейронах DRG

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

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

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

Таблиця 2

Анти-hNGF активність у клітинах DRG із застосуванням 0,38 нМ hNGF	
Код №	IC <sub>50</sub>
119 (з 124)	<1,2 нМ
124 (батьківська)	<0,57 нМ
125 (з 124)	<0,3 нМ
167 (з того самого зразка, що і 124)*	0,50 нМ

#### Секвенування N-кінця і мас-спектрометрія

Зразки очищених анти-NGF гібридомних антитіл були підготовлені для секвенування білків та рідинно-хроматографічного і мас-спектрометричного (LC/MS) аналізів. Антитіла очищали з кондиціонованих середовищ шляхом концентрування згаданих середовищ із застосуванням препаративної центрифуги Amicon centrprep-30 доти, доки їх об'єм не ставав меншим за 15 мл.

5 Порцію смоли rProA (фірма Pharmacia) промивали (4×) PBS; після останнього промивання одержали 50 % суспензію у PBS. До зразка антитіл додавали відповідну кількість смоли rProA (приблизно 5 мкг антитіла/мкл смоли, однак застосовувати слід не менше за 50 мкл смоли) та інкубували протягом ночі при температурі 4 °C. Суміш смоли з антитілами центрифугували, і збирали незв'язану фракцію. Після додання 0,5 мл PBS і перенесення до 0,45 мкл

10 центрифугальної пробірки Spin-X (фірма CoStar), зразок центрифугували при 10000 об/хв протягом 3 хв. Після цього смолу промивали щонайменше тричі 0,5 мл PBS, після чого до 1,5× об'єму смоли додавали 0,1 М гліцину (pH 2,7) та інкубували протягом 10 хв при кімнатній температурі з подальшим додатковим центрифугуванням впродовж 3 хв при 10000 об/хв і збиранням супернатанту. Цю стадію елювання повторювали ще двічі, після чого об'єднаний

15 супернатант нейтралізували 1/25-ою об'єму 1,0 М розчину трис-буфера (pH 9,2).

Після завершувальної стадії фільтрування через нову пробірку Spin-x (0,2 мкм), антитіла піддавали кількісному визначенню із застосуванням стандартного аналізу Бредфорда із застосуванням людського IgG як стандарту або, за альтернативним варіантом, шляхом визначення оптичної густини при 280 нм для зразків більшого об'єму. Гель також піддавали

20 аналізу із застосуванням 2 мкг кожного зразка разом із 2 мкг людського IgG1,k (фірма Sigma). Для мас-спектрометрії чотири мікрограми зразків деглікозилювали, відновлювали і завантажували до хроматографічної колонки (HP1090), зв'язаної у реальному масштабі часу з мас-спектрометром Finigan LCQ. Легкий ланцюг відділяли від важкого ланцюга шляхом високоефективного рідинного хроматографування з оберненою фазою. Легкі ланцюги і важкі

25 ланцюги також збирали для секвенування N-кінцевих білків.

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

30 ланцюга анти-NGF антитіла № 167 відповідала визначеній масі (23096) легкого ланцюга анти-NGF антитіла № 119.

Клонування важкого і легкого ланцюгів анти-NGF антитіла

Гібридому, яка експресує найсильніше NGF-зв'язувальне моноклональне антитіло, 4D4.D7, використовували як джерело для виділення тотальної РНК із застосуванням реактиву TRIzol®

35 (фірма Invitrogen). кДНК першої нитки синтезували із застосуванням довільного праймеру з адаптером подовжувального сегменту (5'-GGC CGG ATA GGC CTC CAN NNN NNT-3') (SEQ ID NO: 33); препаративний аналіз 5' RACE (швидка ампліфікація кінців кДНК) здійснили із застосуванням набору GeneRacer™ (фірма Invitrogen) за інструкціями виробника. Прямим праймером, застосованим для одержання кДНК, що кодує повний легкий ланцюг, був праймер, який входив до складу набору GeneRacer™, у той час як зворотним праймером був 5'-GGG GTC

40 AGG CTG GAA CTG AGG-3' (SEQ ID NO: 34). Прямим праймером, застосованим для одержання кДНК, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга, був праймер, який входив до складу набору GeneRacer™, у той час як зворотним праймером був 5'-TGA GGA CGC TGA CCA CAC G-3' (SEQ ID NO: 35). Продукти аналізу RACE клонували у pCR4-TOPO (фірма Invitrogen) із визначенням послідовностей. Для конструювання праймерів для PCR (полімеразна ланцюгова реакція) ампліфікації повномірних ланцюгів антитіла застосовували консенсусні послідовності.

Для одержання кДНК, що кодує легкий ланцюг типу каппа анти-NGF антитіла 4D4.D7, 5' PCR праймер кодував амінокінець сигнальної послідовності, сайт рестрикції XbaI і оптимізовану послідовність Козака (5'-CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GGA CAT GAG GGT GCC CGC

50 TCA GCT CCT GGG -3'; SEQ ID NO: 36). 3'-праймер кодував карбоксильний кінець, стоп-кодон, а також сайт рестрикції Sall (5'-CTT GTC GAC TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT C-3'; SEQ ID NO: 37). Фрагмент, одержаний із застосуванням PCR, очищали, розщеплювали із застосуванням XbaI і Sall, після чого виділяли на лунках із гелем і лігували до експресійного вектора pDSRα20 ссавців (дивись публікацію міжнародної заявки WO 90/14363, яку включено до цього опису шляхом посилання з будь-якою метою. pDSRα20 одержали шляхом заміни

55 нуклеотиду 2563 у pDSRα19 (гуанозин на аденозин) сайт-спрямованим мутагенезом).

Для одержання кДНК, що кодує важкий ланцюг анти-NGF антитіла 4D4.D7, 5' PCR праймер кодував амінокінець сигнальної послідовності, сайт рестрикції XbaI і оптимізовану послідовність Козака (5'-CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GGA GTT GGG GCT GTG CTG GGT TTT CCT

TGT T-3'; SEQ ID NO: 38). 3'-праймер кодував карбоксильний кінець, стоп-кодон, а також сайт рестрикції Sall (5'-GCA TGT CGA CTC ATT TAC CCG GAG ACA GGG AGA G-3'; SEQ ID NO: 39). Одержаний продукт очищали, розщеплювали із застосуванням XbaI і Sall, виділяли на лунках із гелем і лігували до вектора pDSR $\alpha$ 20.

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

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

Таблиця 3

Підсумок мас-спектрометричних даних

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

## Приклад 4

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

Стабільну експресію моноклонального анти-NGF антитіла 4D4 забезпечували шляхом котрансфекції важким ланцюгом 4D4/pDSR $\alpha$ 19 IgG2 або важким ланцюгом 4D4/pDSR $\alpha$ 19 IgG1 та NGF-каппа/pDSR $\alpha$ 19 плазмідами дегідрофолатредуктаза-дефіцитних ((DHFR) безсироваткових адаптованих клітин яєчника китайського хом'ячка (CHO) із застосуванням кальційфосфатного методу. Трансфіковані клітини відбирали у середовищі, що містило діалізовану сироватку, але не містило гіпоксантину-тимідину, для забезпечення росту клітин, що експресують фермент DHFR. Трансфіковані клони піддавали перевірці із застосуванням таких аналізів, як ELISA, для виявлення експресії моноклонального анти-NGF антитіла 4D4 у кондиціонованому середовищі. Клони з найвищим рівнем експресії піддавали впливу підвищених концентрацій метотрексату (MTX) для ампліфікації DHFR. Клони, ампліфіковані із застосуванням MTX, піддавали перевірці із застосуванням таких аналізів, як ELISA, для виявлення підвищеного рівня експресії моноклонального анти-NGF антитіла 4D4 у кондиціонованому середовищі. Клони з найвищими рівнями експресії піддавали субклонуванню для одержання гомогенної популяції та створення банків клітин.

Рекомбінантні анти-NGF антитіла за цим винаходом можуть бути одержані у DHFR-дефіцитних клітинах яєчника китайського хом'ячка за тією самою методикою, яка наведена вище для моноклонального анти-NGF антитіла. Послідовності ДНК, які кодують повний важкий ланцюг або легкий ланцюг кожного анти-NGF антитіла за цим винаходом, клонують у експресійних векторах. DHFR-дефіцитні клітини яєчника китайського хом'ячка котрансфікують експресійним вектором, здатним експресувати повний важкий ланцюг та експресійним вектором, що експресує повний легкий ланцюг відповідного анти-NGF антитіла. Наприклад, для одержання анти-NGF антитіла, клітини котрансфікують вектором, здатним експресувати повний важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 40 і вектором, здатним експресувати повний легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 44. Таблиця 4 підсумовує повні важкі і повні легкі ланцюги для 4D4 антитіл, що мають різні константні ділянки важкого ланцюга IgG.



Таблиця 4

Антитіло	Варіабельна ділянка важкого ланцюга + константна ділянка важкого ланцюга	Повний важкий ланцюг
4D4 (IgG2)	SEQ ID NO: 10+SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 40
4D4 (IgG1)	SEQ ID NO: 10+SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 41
4D4 (IgG4)	SEQ ID NO: 10+SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 42
4D4 (IgG3)	SEQ ID NO: 10+SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 43
Антитіло	Варіабельна ділянка легкого ланцюга + константна ділянка легкого ланцюга	Повний легкий ланцюг
4D4	SEQ ID NO: 12+SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 44

## Приклад 5

## Визначення активності анти-NGF антитіла 4D4

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

10 Анти-NGF антитіла тимчасово експресувались у адаптованих до безсироваткової суспензії клітинах 293T. Трансфекцію здійснювали на 500 мл або 1 л культурах. Стисло, клітинний інокулят ( $5,0 \times 10^5$  клітин/мл  $\times$  об'єм культури) центрифугували при 2500 об/хв протягом 10 хв при температурі 4 °C для видалення кондиціонованого середовища. Клітини ресуспендували у безсироватковому DMEM і знову центрифугували при 2500 об/хв протягом 10 хв при температурі 4 °C. Після відсмоктування промивного розчину, клітини ресуспендували у

15 середовищі для вирощування [DMEM/F12 (3:1)+1 $\times$ додаток інсулін-трансферин-селен+1 $\times$ Pen Strep Glut+2 мМ розчин L-глутаміну+20 мМ розчин ГЕПЕС-буфера+0,01 % розчин плуронік F68] у 1 л або 3 л ролерній колбі. Культуру у ролерній колбі встановлювали на стіл магнітної мішалки (125 об/хв), яку вносили до вологої камери (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Плазмідну ДНК об'єднували з трансфекційним реактивом у 50 мл конічній колбі. Комплекс ДНК-трансфекційний реактив

20 одержували у 5 % кінцевого об'єму культури у безсироватковому DMEM. До безсироваткового DMEM спочатку додавали 1 мкг плазмідної ДНК/мл культури, потім 1 мкл X-TremeGene RO-1539/мл культури. Згадані комплекси інкубували при кімнатній температурі протягом приблизно 30 хв, після чого додавали до клітин у ролерній колбі. Трансфекцію/експресію здійснювали протягом 7 днів, після чого кондиціоноване середовище збирали шляхом центрифугування при

25 4000 об/хв протягом 60 хв при температурі 4 °C.

Для тимчасової трансфекції ролерних колб ми застосовували адгезивні клітини 293T, які виросли і підтримувались у DMEM, доповненому 5 % FBS+1 $\times$ замінних амінокислот+1 $\times$ Pen Strep Glut+1 $\times$ пірувату натрію. Приблизно  $4-5 \times 10^7$  клітин 293T висівали у ролерних колбах (850 см<sup>2</sup>) протягом ночі. Наступного дня попередньо висіяні клітини трансфікували із застосуванням

30 трансфекційного реактиву FuGene6. Суміш ДНК-трансфекційний реактив одержували у приблизно 6,75 мл безсироваткового DMEM. Спочатку додавали 675 мкл трансфекційного реактиву FuGene6, потім 112,5 мкг плазмідної ДНК. Одержаний комплекс інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хв. Після цього суміш у цілому вносили до ролер-флакона. Ролер-флакон заповнювали газовою сумішшю (5 % CO<sub>2</sub>), щільно закривали і вміщували до термостата (37 °C) на ролерний штатив, який обертався зі швидкістю 0,35 об/хв. Трансфекцію здійснювали протягом 24 год, після чого згадане середовище замінювали 100 мл

35 DMEM+1 $\times$ додаток інсулін-трансферин-селен+1 $\times$ Pen Strep Glut+1 $\times$ замінних амінокислот+1 $\times$ пірувату натрію. За типовим варіантом, з кожного ролер-флакона одержали два 100 мл 48 год врожаю. Зібрані безсироваткові кондиціоновані середовища об'єднували, і центрифугували при 4000 об/хв протягом 30 хв при температурі 4 °C.

40 Як 4D4.IgG1, так і 4D4.IgG2 продемонстрували високу активність проти людського NGF зі значеннями IC<sub>50</sub> від приблизно 0,14 нМ до приблизно 0,2 нМ (Фіг. 2). Результати аналізу активності підсумовані у Таблиці 5. Згадані антитіла продемонстрували низьку активність проти паючого NGF (Фіг. 3). Одержані результати нагадують активність антитіл, які перевірялись безпосередньо з гібридом, як описувалось вище.

45

Таблиця 5

Антитіло	IC <sub>50</sub> hNGF (нМ)	IC <sub>50</sub> rNGF (нМ)
4D4.IgG1.R	0,1488	>34 нМ
4D4.IgG1.S	0,1587	>45 нМ
4D4.IgG2.R	0,2047	>59 нМ
4D4.IgG2.S	0,2063	>37 нМ

hNGF=людський NGF, rNGF=пацючий NGF, R=ролерна культура, S=спін-культура

#### Приклад 6

##### Продуктування анти-NGF антитіла

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

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

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

#### Приклад 7

- Перехресна реактивність з іншими нейротрофінами

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

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

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

##### Визначення експресії MAP2 у нейронах DRG

- Культури фіксували 4 % розчином параформальдегіду у збалансованому сольовому розчині Хенкса протягом 15 хв, блокували із застосуванням Superblock (фірма Pierce) протягом 1 год і підвищували коефіцієнт проникності із застосуванням 0,25 % розчину Nonidet P-40 (фірма Sigma) у фізіологічному розчині, забуференому трис-HCl (фірма Sigma) (TBS) протягом 1 год при кімнатній температурі (RT). Культури один раз промивали TBS, що містив 0,1 % Твін-20 (фірма Sigma) і інкубували з мишачим анти-MAP2 IgG (фірма Chemicon, Temecula, штат Каліфорнія) протягом 1,5 год при кімнатній температурі з подальшим інкубуванням з Eu-міченим антимишачим "другим" антитілом (фірма Wallac Oy, Turku, Фінляндія) протягом 1 год при кімнатній температурі. Після інкубування з кожним антитілом, культури промивали TBS (3×5 хв з обережним струшуванням). До культур додавали підсилювальний розчин (150 мкл/лунку, фірма Wallac Oy). Після цього із застосуванням флуориметра з часовим розділенням (фірма Wallac Oy) вимірювали інтенсивність флуоресценції.

##### Культура клітин середнього мозку зародка

- Застосовували 19-добові зародки (E19) пацюків лінії Sprague-Dawley (фірма Jackson Labs). Вентральну тканину середнього мозку, збагачену допамінергічними нейронами, видалляли і

переносили до холодного фізіологічного розчину, забуференого фосфатом Дульбекко (DPBS) без  $\text{Ca}^{++}$  і  $\text{Mg}^{++}$  (pH 7,4) (фірма Gibco). Із застосуванням папаїнової дисоціаційної системи (фірма Worthington Biochemical Corp., Freehold, штат Нью-Джерсі) з фрагментів тканини одержали суспензію окремих клітин. Стисло, фрагменти тканин інкубували у гідролітичному розчині, який містив 20 Од/мл папаїну у збалансованому сольовому розчині Ерла (EBSS) при температурі 37 °C протягом 50 хв. Клітини відділяли шляхом продавливання через відполіровані опаленням пастерівські піпетки у дисоціативному середовищі, що містило MEM (мінімальне підтримувальне середовище)/Ham's F12 (неоднорідне штучне живильне середовище F12) (1:1), 1 мг/мл овомукоїдного інгібітора, 1 мг/мл овальбуміну та 0,005 % дезоксирибонуклеази I (ДНКаз). Відділені клітини осаджували при 200 ×g протягом 5 хв і ресуспендували у EBSS, що містив 1 мг/мл овомукоїдного інгібітора, 1 мг/мл овальбуміну та 0,005 % ДНКаз. Суспензію клітин центрифугували у градієнтному розчині, що містив 10 мг/мл овомукоїдного інгібітора, 10 мг/мл овальбуміну при 200 ×g протягом 6 хв для видалення дебрису, після чого фільтрували через 25 мкг нейлонову сітку Nitex (фірма Tetko, Inc.) для видалення скупчень. Відділені клітини висівали (100000/см<sup>2</sup>) на планшети для культури тканин. Згадані планшети попередньо сенсibiliзували поліорнітином (100 мкг/мл) (фірма Sigma) та мишачим ламініном (1 мкг/мл) (фірма Gibco BRL), як описувалось раніше (Луїс Дж.К. (Louis J.C.) та інші, J. Pharmacol. Exp. Ther. 1992; 262:1274-1283). Культуральне середовище містило мінімальне підтримувальне середовище (MEM) і Ham's F12 (1:1), 12 % конячу сироватку (фірма Gibco), трансферин (100 мкг/мл) та інсулін (2,5 мкг/мл) (фірма Sigma). Культури витримували при температурі 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> і 100 % вологості протягом 6 днів.

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

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

Поглинання DA нейронами середнього мозку

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

Таблиця 6

Антитіло	IC <sub>50</sub> hNT-3 (нМ)	IC <sub>50</sub> hBDNF (нМ)
4D4 (IgG2)	>13,75	>13,75

#### Приклад 8

Ідентифікація антигенної детермінанти для анти-NGF антитіл

Картування антигенної детермінанти обмеженим протеолізом

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

Таблиця 7

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

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

Відділення розщеплених пептидів із застосуванням мікроцентрифуги

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

S1(4.4) ----SRKAVRR (113-119) (SEQ ID NO: 49), С-кінцевий; і

S2(28.3) ----EVMVL (35-39) (SEQ ID NO: 50), ділянка петлі.

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

K1(37.6) ----SSSHPIFHRGEFSVCDVSVWVGDK (SEQ ID NO: 21)

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

K2(39.5) ----QAAWRFIRIDTACVCLSRK (SEQ ID NO: 52)

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

Попередні експерименти з картування антигенних детермінант показали, що щонайменше три ділянки були можливими антигенними детермінантами для антитіл 4D4, у тому числі N-кінець (1-9), внутрішня (46-57) та С-кінцева (96-98) ділянки. На додаток до цього, розщеплення AspN показало, що фрагмент пептиду, який містив ---SSHPIFHRGEFSVC--- (SEQ ID NO: 53), був захищеним антитілом 4D4, у той час як розщеплення трипсином показало, що фрагмент пептиду, який містив ---SSHPIFHR--- (SEQ ID NO: 54), не був захищеним антитілом 4D4. Таким чином, на N-кінці, послідовність GEFSVC (SEQ ID NO: 55) є найважливішою для зв'язування антитіл 4D4.

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

Таблиця 8

Пептид №	Послідовність	SEQ ID NO
33582-27-01	SSSHPIFHRGEFSVC (1-15)	56
33582-27-02	IFHRGEFSVADSVSVC (6-20)	57
33582-27-03	EFVADSVSVWVGDKC (11-25)	58
33582-27-04	DSVSVWVGDKTTATDC (16-30)	59
33582-27-05	WVGDKTTATDIKGKEC (21-35)	60
33582-27-06	TTATDIKGKEVMVLGC (26-40)	61
33582-27-07	IKGKEVMVLGEVNIN (31-45)	62
33582-27-08	VMVLGEVNINNSVFKC (36-50)	63
33582-27-09	EVNINNSVFKQYFFEC (41-55)	64
33582-27-10	NSVFKQYFFETKARDC (46-60)	65
33582-27-11	QYFFETKARDPNPVDC (51-65)	66
33582-27-12	TKARDPNPVDSGARDC (56-70)	67
33582-27-13	PNPVDSGARDIDSKHC (61-75)	68
33582-27-14	SGARDIDSKHWNSYC (66-80)	69
33582-27-15	IDSKHWNSYATTTHTC (71-85)	70
33582-27-16	WNSYATTTHTFVKALC (76-90)	71
33582-27-17	TTTHTFVKALTMDGKC (81-95)	72
33582-27-18	FVKALTMDGKQAAWRC (86-100)	73
33582-27-19	TMDGKQAAWRFIRIDC (91-105)	74
33582-27-20	QAAWRFIRIDTAAVC (96-110)	75
33582-27-21	FIRIDTAAVAVLSRKC (101-115)	76
33582-27-22	TAAVAVLSRKAVRRAC (106-120)	77
33582-27-23	CAAVAVLSRKAVRRA (107-120)	78

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

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

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

Таблиця 9

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

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

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

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

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

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

#### Приклад 9

Визначення спорідненості моноклональних антитіл із застосуванням KinExA

Зв'язування антитіла 4D4 (38859-80) з huNGF (29714-91) перевіряли із застосуванням KinExA. Стикло, Reacti-Gel 6x (фірма Pierce) попередньо сенсibilізували із застосуванням huNGF і блокували із застосуванням BSA. Проби антитіла 4D4 (10 pM і 30 pM) інкубували з різними концентраціями huNGF (фірма Amgen) при кімнатній температурі протягом 8 год перед пропусканням через гранули, сенсibilізовані huNGF. Кількість антитіла, зв'язану з гранулами, визначали із застосуванням козячого антилюдського-IgG антитіла, міченого флуоресцентною міткою (Cy5) (фірма Jackson Immuno Research). Сигнал зв'язування був пропорційним концентрації вільного антитіла у стані рівноваги. Константу дисоціації у стані рівноваги ( $K_D$ )

визначали шляхом нелінійного регресійного аналізу кривих конкурентного зв'язування із застосуванням моделі гомогенного одностайтового зв'язування з двома кривими (програма KinEx™).  $K_D$  зв'язування антитіла 4D4 з huNGF становила приблизно 4 нМ.

#### Приклад 10

##### 5 Ідентифікація додаткових анти-NGF антитіл

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

Таблиця 10

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

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

20

Таблиця 11

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

Таблиця 12

	V4D4 VK	14D11 LC	4G6a LC	4G6b LC	4G6c LC	14D10 LC	6H9 LC	4G6d LC	7H2 LC	4G6e
V4D4 VK	100 %	89 %	91 %	72 %	74 %	69 %	71 %	71 %	70 %	73 %
14D11LC		100 %	94 %	68 %	71 %	67 %	68 %	68 %	65 %	70 %
4G6a LC			100 %	69 %	74 %	68 %	70 %	70 %	69 %	71 %
4G6b LC				100 %	87 %	83 %	86 %	86 %	86 %	96 %
4G6c LC					100 %	91 %	94 %	94 %	94 %	91 %
14D10 LC						100 %	91 %	94 %	94 %	86 %
6H9 LC							100 %	99 %	98 %	89 %
4G6d LC								100 %	99 %	89 %
7H2 LC									100 %	
4G6e										100 %

#### Приклад 11

25 Безпечність та прийнятність анти-NGF антитіла при введенні шляхом підшкірних ін'єкцій у організм людини

Мета цього дослідження полягала у визначенні безпечності та прийнятності декількох підшкірних (SC) доз антитіла проти фактору росту нервової тканини (анти-NGF антитіло) для суб'єктів, які страждають на остеоартритний (OA) біль у коліні, та вивченні сироваткової фармакокінетики (PK) анти-NGF антитілу після введення числених SC доз анти-NGF антитілу суб'єктам, які страждають на остеоартритний (OA) біль у коліні. Клінічні переваги числених SC доз оцінювали за індексом Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index [WOMACTM3.1].

На суб'єктах, які страждають на остеоартритний біль у коліні, була здійснена перша фаза послідовного рандомізованого, подвійного сліпого, плацебо-контрольованого дослідження з певними зростаючими дозами. План дослідження включав 4 групи суб'єктів, причому до складу кожної групи входило 8 суб'єктів (n=32). Були застосовані дози анти-NGF антитіла трьох рівнів (3 мг, 10 мг, 20 мг). Анти-NGF антитіла, застосовані при проведенні цього дослідження, являли собою повністю людські моноклональні антитіла, які одержали за методиками, подібними до описаних вище.

Незважаючи на велику мінливість даних з ефективності і на те, що це дослідження не призначалось для оцінки статистичної значущості заходів з ефективності, ефекти лікування, пов'язані з болем, видавались очевидними. Середні загальні бали за індексом WOMAC, середні бали за підкатегоріями індексу WOMAC, середня глобальна оцінка захворювання пацієнтами і середні глобальні оцінки захворювання лікарями демонстрували загальну тенденцію поліпшення у першій часовій точці після ведення першої дози у експериментальних групах із збереженням ефекту протягом періоду введення доз. Ці тенденції не були настільки очевидними у групі, яка одержувала плацебо. Після останньої дози анти-NGF антитіла лікувальні ефекти з перебігом часу демонстрували тенденцію до зниження до вихідного рівня.

Після введення одноразової або певних SC доз суб'єктам, які страждають на остеоартритний біль у коліні, вплив анти-NGF антитіла, як виявилось, зростав приблизно пропорційно з дозою у діапазоні доз від 3 мг до 20 мг. Середній T<sub>max</sub> коливався у межах від 7,5 днів до 11,5 днів. Про негативні явища (AEs), пов'язані з лікуванням, було повідомлено у 10 суб'єктів (56 %) у експериментальній групі, і у 2 суб'єктів у групі, яка одержувала плацебо. Будь-який суб'єкт не був виключений з дослідження на початковому етапі з приводу AEs. Однак, унаслідок нейросенсорних AEs другого ступеню, набуло чинності визначене методикою правило припинення, завдяки чому 5 суб'єктів у групі (2 з групи, яка одержувала плацебо, 3 з експериментальної групи) не одержали четвертої і останньої дози експериментального продукту. Як виявилось, нейросенсорні AEs були дозозалежними.

Серед суб'єктів (чоловіків і жінок) віком від 36 років до 63 років, що страждали на OA, певні SC дози, як виявилось, добре переносились при дозах, які вводили при проведенні цього дослідження, за виключенням нейросенсорних явищ (можливо, дозозалежних), які виникали у процесі лікування (від слабких до помірних за тяжкістю), про які було повідомлено у 4 суб'єктів з 6 суб'єктів, які одержали 20 мг антитіла. Вплив анти-NGF антитіла, як виявилось, зростав приблизно пропорційно з дозою у діапазоні доз від 3 мг до 20 мг. Період напіввиведення ( $t_{1/2,z}$ ) у кінцевій фазі коливався у межах від 20,3 дня до 26,4 дня.

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



## ЛІСТИНГ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

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

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

<130> 02-1240

<150> US 60/487,431

<151> 2003-07-15

<160> 138

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 990

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg      60
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg    120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtctgtct acagtcctca     180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc      240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc     300
aaatcttgtg aaaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga      360
ccgtcagtc tctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct     420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg     480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac     540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag     600
gagtacaagt gcaagggtct caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc     660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag     720
ctgaccaaga accagggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc     780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg     840
ctggactccg acggctcctt ctctctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg     900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg     960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa                                990
```

<210> 2

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	1	5	10	15
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	20	25	30	
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	35	40	45	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	50	55	60	
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	65	70	75	80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	100	105	110	
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	115	120	125	
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	130	135	140	
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	145	150	155	160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	165	170	175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	180	185	190	
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	195	200	205	
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	210	215	220	
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	225	230	235	240
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	245	250	255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	260	265	270	
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	275	280	285	
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	290	295	300	
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	305	310	315	320

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

<210> 3

<211> 978

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

gctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag      60
agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg    120
tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtcctca    180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc     240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc     300
aaatgttgtg tcgagtgcgc accgtgcca gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc     360
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc     420
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc     480
gtggagggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt     540
gtggtcagcg tcctcacctg tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc     600
aaggtctcca acaaaggcct ccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaaggg     660
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac     720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg     780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac     840
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac     900
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc     960
tccctgtctc cgggtaaa

```

<210> 4

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1          5          10          15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
          20          25          30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
          35          40          45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
          50          55          60

```

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110  
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 115 120 125  
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 130 135 140  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 145 150 155 160  
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn  
 165 170 175  
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp  
 180 185 190  
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
 195 200 205  
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 210 215 220  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 225 230 235 240  
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 245 250 255  
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 260 265 270  
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 275 280 285  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 290 295 300  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 305 310 315 320  
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325

<210> 5

<211> 981

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 5

gccagcacca agggggccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60

agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg 120

tggaactcag ggcgcctgac cagcggcgctg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180

```

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 300
aaatatggtc ccccatgccc atcatgccc gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 360
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 420
tgcggtggtg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 720
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgcctgggag 780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc 840
gacggctcct tcttctctta cagcaggcta accgtgraca agagcaggtg gcaggagggg 900
aatgtcttct catgctccgt gacgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960
ctctccctgt ctctgggtaa a 981

```

<210> 6

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1          5          10         15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20         25         30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35         40         45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50         55         60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65         70         75         80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85         90         95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100        105        110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115        120        125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130        135        140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145        150        155        160

```

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
165 170 175  
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
180 185 190  
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
195 200 205  
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
210 215 220  
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
225 230 235 240  
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
245 250 255  
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
260 265 270  
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
275 280 285  
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
290 295 300  
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
305 310 315 320  
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
325

<210> 7

<211> 321

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

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

<210> 9

<211> 369

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 9

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggcctt caccttaaga agttatagca tgaactgggt tcgccagggt 120  
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtcgta gtagtcatac catattctac 180  
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ttcactgtat 240  
 ctgcaaatgg acagcctgag agacgaggac acggctatgt attactgtgc gagagtatat 300  
 agcagtggct ggcacgtctc tgattatattt gactactggg gccaggggaat cctgggtcacc 360  
 gtttcctca 369

<210> 10

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

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

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

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

<210> 11

<211> 321

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 11  
gccatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc agtgctttag cctgggtatca gcagaaacca 120  
gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240  
gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt acccgctcac tttcggcgga 300  
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

<210> 13

<211> 42

<212> ДНК



```

<213> Homo sapiens
<400> 13
gtatatagca gtggctggca cgtctctgat tattttgact ac 42

<210> 14
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 14
Val Tyr Ser Ser Gly Trp His Val Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr
1          5          10

<210> 15
<211> 27
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 15
caacagttta atagttaccc gctcact 27

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 16
Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1          5

<210> 17
<211> 51
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 17
tacattagtc gtagtagtca taccatattc tacgcagact ctgtgaaggg c 51

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 18
Tyr Ile Ser Arg Ser Ser His Thr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1          5          10          15

```

Gly

<210> 19

<211> 21

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 19

gatgcctcca gtttggaag t

21

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser  
1 5

<210> 21

<211> 15

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 21

agttatagca tgaac

15

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Ser Tyr Ser Met Asn  
1 5

<210> 23

<211> 33

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 23

cgggcaagtc agggcattag cagtgttta gcc

33

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

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

<210> 25

<211> 1131

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 25

```
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctctggg      60
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgctg    120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgctg cacaccttcc cggtctgctt acagtcctca    180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc      240
tacacctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagctc     300
aaaacccac ttggtgacac aactcacaca tgcccacggg gccagagcc caaatcttgt      360
gacacacctc ccccggtgcc acggtgccc gagcccaaatt cttgtgacac acctcccccg     420
tgcccacggg gccagagcc caaatcttgt gacacacctc ccccatgccc acggtgccc      480
gcacctgaac tcctgggagg accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggatacc     540
cttatgattt cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggagg tggacgtgag ccacgaagac     600
cccgaggtcc agttcaagtg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag     660
ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgttc cgtgtgggtc gcgtcctcac cgtcctgcac     720
caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaagggtc ccaacaaagc cctcccagcc     780
cccatcgaga aaaccatctc caaaaccaa ggacagcccc gagaaccaca ggtgtacacc     840
ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag aaccaggtca gctgacctg cctgggtcaaa     900
ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca gcgggcagcc ggagaacaac     960
tacaacacca cgctcccat gctggactcc gacggctcct tcttctcta cagcaagctc    1020
accgtggaca agagcagggt gcagcagggg aacatcttct catgctccgt gatgcatgag    1080
gctctgcaca accgcttcac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a              1131
```

<210> 26

<211> 376

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	1	5	10	15
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	20	25	30	
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	35	40	45	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	50	55	60	
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	65	70	75	80
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95	
Arg	Val	Glu	Leu	Lys	Thr	Pro	Leu	Gly	Asp	Thr	Thr	His	Thr	Cys	Pro	100	105	110	
Arg	Cys	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	115	120	125	
Cys	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	130	135	140	
Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	145	150	155	160
Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	165	170	175	
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	180	185	190	
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Lys	Trp	Tyr	195	200	205	
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	210	215	220	
Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	225	230	235	240
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	245	250	255	
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	260	265	270	
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	275	280	285	
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	290	295	300	
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	305	310	315	320
Tyr	Asn	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	325	330	335	
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Ile	340	345	350	

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
370 375

<210> 27

<211> 29

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> PCR праймер для людського NGF

<400> 27

acaccacata tgtcatcatc ccaccccat

29

<210> 28

<211> 40

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> PCR праймер для людського NGF

<400> 28

accacaggat cctccttatg caccagcgac agctttacgg

40

<210> 29

<211> 375

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

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

<400> 29

catatgtcat catcccatcc catcttcac aggggcgaat tctcgggtgtg tgacagtgtc

60

agcgtgtggg ttggggataa gaccaccgcc acagacatca agggcaagga ggtgatgggtg

120

ttgggagagg tgaacattaa caacagtgtg ttcaaacagt acttttttga gaccaagtgc

180

cgggacccaa atcccgttga cagcgggtgc cggggcattg actcaaagca ctggaactca

240

tattgtacca cgactcacac ctttgtcaag gcgctgacca tggatggcaa gcaggctgcc

300

tggcgggttta tccggataga tacggcctgt gtgtgtgtgc tcagccgtaa agctgtgcgt

360

cgtgcataag gatcc

375

<210> 30

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

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

<400> 30

```

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

```

<210> 31

<211> 55

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> послідовність 5'-праймера для генерування експресійного вектора pCFM1656 (ATCC # 69576)

<400> 31  
cgatttgatt ctagaaggag gaataacata tggtaacgc gttggaattc ggtac 55

<210> 32

<211> 49

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> послідовність 3'-праймера для генерування експресійного вектора pCFM1656 (ATCC # 69576)

<400> 32  
taaactaaga tcttctcct tattgtatac caattgcgca accttaagc 49

<210> 33  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна  
 <220>  
 <223> PCR праймер  
 <220>  
 <221> Невизначена  
 <222> (18) .. (23)  
 <223> n - a, c, t або g  
 <400> 33  
 ggccggatag gcctccannn nnnt 24  
  
 <210> 34  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна  
 <220>  
 <223> PCR праймер  
 <400> 34  
 ggggtcaggc tggaactgag g 21  
  
 <210> 35  
 <211> 19  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна  
 <220>  
 <223> PCR праймер  
 <400> 35  
 tgaggacgct gaccacacg 19  
  
 <210> 36  
 <211> 54  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна  
 <220>

<223> PCR праймер

<400> 36  
cagcagaagc ttctagacca ccatggacat gaggggtgcc gctcagctcc tggg 54

<210> 37

<211> 34

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> PCR праймер

<400> 37  
cttgctcgact caaactctc ccctgttgaa gctc 34

<210> 38

<211> 55

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> PCR праймер

<400> 38  
cagcagaagc ttctagacca ccatggagtt ggggctgtgc tgggttttcc ttgtt 55

<210> 39

<211> 34

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> PCR праймер

<400> 39  
gcatgtcgac tcatttacct ggagacaggg agag 34

<210> 40

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

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



```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Arg Ser Tyr
      20                25                30
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35                40                45
Ser Tyr Ile Ser Arg Ser Ser His Thr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val
      50                55                60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
      65                70                75                80
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
      85                90                95
Ala Arg Val Tyr Ser Ser Gly Trp His Val Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr
      100               105               110
Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
      115               120               125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
      130               135               140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
      145               150               155               160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
      165               170               175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
      180               185               190
Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val
      195               200               205
Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys
      210               215               220
Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
      225               230               235               240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
      245               250               255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
      260               265               270
Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
      275               280               285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
      290               295               300
Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
      305               310               315               320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
      325               330               335
Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
      340               345               350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
      355               360               365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
      370               375               380

```

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu  
 385 390 395 400  
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 405 410 415  
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420 425 430  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 435 440 445

Lys

<210> 41

<211> 453

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Arg Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Tyr Ile Ser Arg Ser Ser His Thr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Val Tyr Ser Ser Gly Trp His Val Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr  
 100 105 110  
 Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 115 120 125  
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 130 135 140  
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 145 150 155 160  
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 165 170 175  
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 180 185 190  
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 195 200 205  
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 225 230 235 240  
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 260 265 270  
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 275 280 285  
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 290 295 300  
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 305 310 315 320  
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 325 330 335  
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 340 345 350  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
 355 360 365  
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 370 375 380  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 385 390 395 400  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 405 410 415  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 420 425 430  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 Leu Ser Pro Gly Lys  
 450  
 <210> 42  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 42  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Arg Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Tyr Ile Ser Arg Ser Ser His Thr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Val Tyr Ser Ser Gly Trp His Val Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr  
 100 105 110  
 Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 115 120 125  
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser  
 130 135 140  
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 145 150 155 160  
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 165 170 175  
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 180 185 190  
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val  
 195 200 205  
 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys  
 210 215 220  
 Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu  
 260 265 270  
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu  
 325 330 335  
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350  
 Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp  
 405 410 415  
 Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430

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

Gly Lys  
450

<210> 43

<211> 499

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
 275 280 285  
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 290 295 300  
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 305 310 315 320  
 His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 325 330 335  
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr  
 340 345 350  
 Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 355 360 365  
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
 370 375 380  
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 385 390 395 400  
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
 405 410 415  
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 420 425 430  
 Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro  
 435 440 445  
 Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
 450 455 460  
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val  
 465 470 475 480  
 Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 485 490 495

Ser Pro Gly

<210> 44

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80  
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu  
85 90 95  
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110  
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125  
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140  
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160  
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175  
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190  
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205  
Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 45

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Phe Phe Glu Thr Lys  
1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg  
1 5

<210> 47

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

His Trp Asn Ser Tyr  
1 5

```

<210> 48
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 48
Asn Ser Val Glu Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys
1          5          10
<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 49
Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg
1          5
<210> 50
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 50
Glu Val Met Val Leu
1          5
<210> 51
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 51
Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp
1          5          10          15
Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp Lys
          20          25
<210> 52
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 52
Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val
1          5          10          15

```



Leu Ser Arg Lys  
20

<210> 53

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

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

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg  
1 5

<210> 55

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Gly Glu Phe Ser Val Cys  
1 5

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

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

<210> 57

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

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

<210> 58

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

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

<210> 59

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

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

<210> 60

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

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

<210> 61

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

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

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

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

<210> 63

```

<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 63
Val Met Val Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Cys
1          5          10          15
<210> 64
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 64
Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Cys
1          5          10          15
<210> 65
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 65
Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Ala Arg Asp Cys
1          5          10          15
<210> 66
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 66
Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Ala Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Cys
1          5          10          15
<210> 67
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 67
Thr Lys Ala Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Ser Gly Ala Arg Asp Cys
1          5          10          15
<210> 68
<211> 16
<212> PRT

```

<213> Homo sapiens

<400> 68

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

<210> 69

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

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

<210> 70

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

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

<210> 71

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

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

<210> 72

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

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

<210> 73

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

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

<210> 74

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

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

<210> 75

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

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

<210> 76

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

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

<210> 77

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

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

<210> 78

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

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

<210> 79

<211> 125

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 79

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 80

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 80

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

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

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

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

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

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

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

<210> 81

<211> 127

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 81

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Glu Asp Tyr
          20          25          30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Ser Gly Ile Ser Trp Asn Arg Gly Ile Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Lys Glu Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Arg Pro Gly Tyr Phe Tyr Tyr
          100          105          110
Val Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115          120          125

```

<210> 82

<211> 108

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 82

```

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

```

<210> 83

<211> 127

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 83

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
          20          25          30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Ser Gly Ile Ser Trp Asn Arg Gly Ile Ile Gly Tyr Ala Gly Ser Val
          50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
          65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Val Lys Glu Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Arg Pro Gly Tyr Phe Tyr Tyr
          100          105          110
Val Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115          120          125

```

<210> 84

<211> 108

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 84

```

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

```

<210> 85

<211> 121

<212> PRT



<213> homo sapien

<400> 85

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

<210> 86

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 86

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

<210> 87

<211> 124

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 87

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

<210> 88

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 88

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

<210> 89

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 89

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

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

<210> 90

<211> 108

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 90

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

<210> 91

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 91

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15  
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
20 25 30  
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

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

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

<210> 92

<211> 5

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 92

Thr Tyr Trp Ile Gly  
1 5

<210> 93

<211> 17

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 93

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe Gln  
1 5 10 15

Gly

<210> 94

<211> 16

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 94

Asn Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asn Val  
1 5 10 15

<210> 95

<211> 11

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 95

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

<210> 96

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 96

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
1 5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 97

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp Thr  
1 5

<210> 98

<211> 5

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 98

Asp Tyr Ala Met His  
1 5

<210> 99

<211> 17

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 99

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

Gly

<210> 100

<211> 17

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 100

Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Arg Pro Gly Tyr Phe Tyr Tyr Val Met Asp  
1 5 10 15

Val

<210> 101

<211> 12

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 101

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Gly Phe Leu Ala  
1 5 10

<210> 102

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 102

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 103

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 104

<211> 5

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 104

Asp Tyr Ala Met His  
1 5

<210> 105

<211> 17

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 105

Gly Ile Ser Trp Asn Arg Gly Ile Ile Gly Tyr Ala Gly Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 106

<211> 17

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 106

Gly	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Tyr	Phe	Tyr	Tyr	Val	Met	Asp
1				5					10					15	

Val

<210> 107

<211> 12

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 107

Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala
1				5					10		

<210> 108

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 108

Val	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr
1				5		

<210> 109

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 109

Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro	Tyr	Thr
1				5				

<210> 110

<211> 5

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 110

Asp Tyr Ala Met His  
1 5

<210> 111

<211> 17

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 111

Gly Ile Thr Trp Asn Ser Gly Ile Leu Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 112

<211> 11

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 112

Glu Gly Ser Gly Arg Tyr Tyr Asn Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 113

<211> 12

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 113

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 114

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 114

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

<210> 115

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 115



Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr Thr  
1 5

<210> 116

<211> 5

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 116

Asp Tyr Gly Met Asn  
1 5

<210> 117

<211> 17

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 117

Asp Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 118

<211> 15

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 118

Glu Gln Trp Leu Asp Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
1 5 10 15

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 119

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

<210> 120

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 120

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
1 5

<210> 121

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 121

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp Thr  
1 5

<210> 122

<211> 11

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 122

Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 123

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 123

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
1 5

<210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 124

Gln Gln Arg Ser Asn Trp His Arg Thr  
1 5

<210> 125

<211> 12

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 125

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 126

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 126

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

<210> 127

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 127

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp Thr  
1 5

<210> 128

<211> 11

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 128

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 129

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 129

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
1 5

<210> 130

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 130

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp Thr  
1 5

<210> 131

<211> 108

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 131

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 132

<211> 11

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 132

Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 133

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 133

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

<210> 134

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 134

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 135

<211> 120

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 135

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

<210> 136

<211> 120

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 136

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

<210> 137

<211> 126

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 137

```

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu
1          5          10          15
Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys
          20          25          30
Lys Thr Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys
          35          40          45
Val Pro Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys
          50          55          60
Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys
65          70          75          80
Arg His Trp Asn Ser Gln Cys Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala
          85          90          95
Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile
          100          105          110
Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Arg Gly Arg
          115          120          125

```

<210> 138

<211> 119

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 138

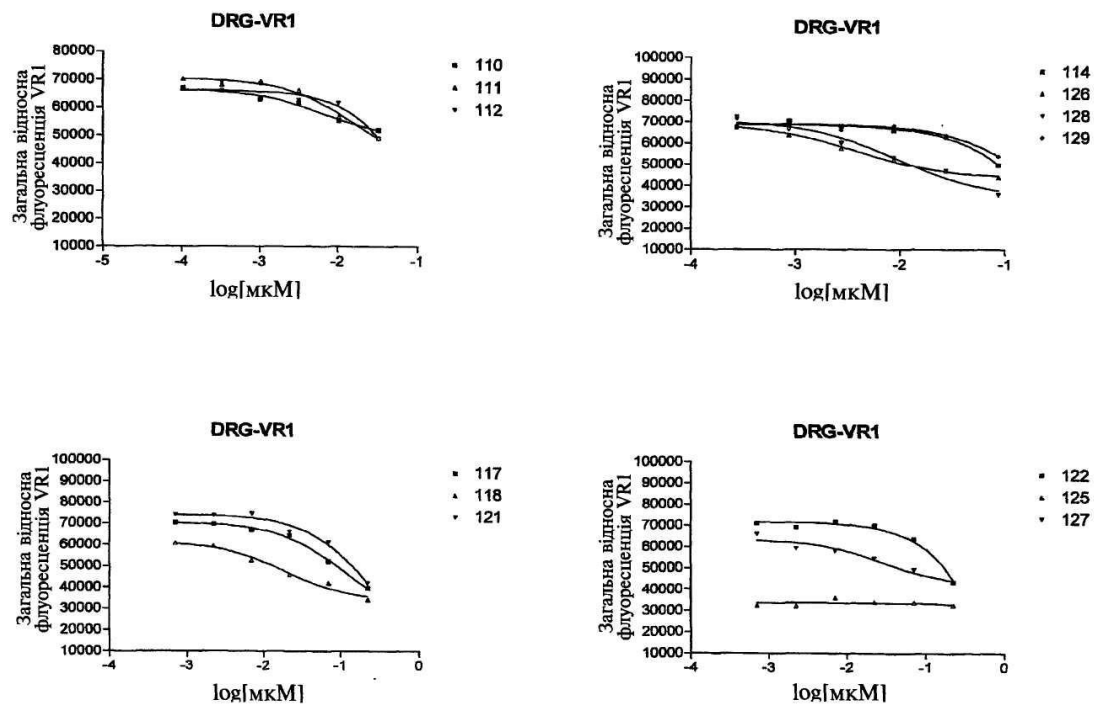
```

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

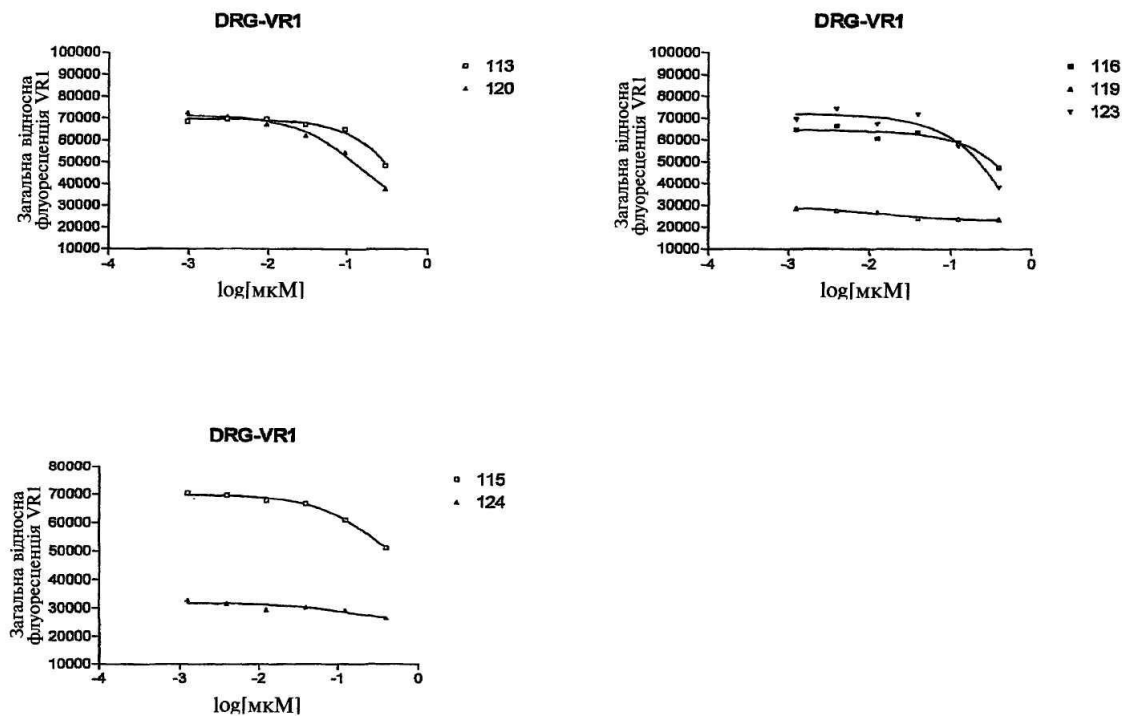
```

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб лікування болю, пов'язаного зі станом, який спричинюється підвищеною експресією фактора росту нервової тканини (NGF) або підвищеною чутливістю до NGF, який включає введення пацієнту фармацевтичної композиції, яка містить фармацевтично прийнятний носій та виділене антитіло, яке має легкий ланцюг, який включає послідовність SEQ ID NO: 44, та важкий ланцюг, який включає послідовність SEQ ID NO: 40, перорально, шляхом внутрішньовенної, інтраперитонеальної, інтрацеребральної (інтрапаренхіматозної), інтрацеребровентрикулярної, внутрішньом'язової, внутрішньоочної, внутрішньоартеріальної ін'єкції, ін'єкції в ворітну вену, ін'єкції у місце ушкодження або підшкірної ін'єкції, із застосуванням систем пролонгованого виділення або імплантаційних засобів, причому згаданий біль являє собою:
  - (а) гострий біль, зубний біль, біль, викликаний травмою, невропатичний біль та пов'язану з ним гіпералгезію та алодинію, діабетичний невропатичний біль, біль унаслідок пошкодження симпатичних сенсорних нервів, таламічний больовий синдром, запальний біль або біль, викликаний хірургічним втручанням; або
  - (б) біль унаслідок ампутації або абсцесу, каузалгії, демієлінізаційних захворювань, невралгії трійчастого нерва, раку, хронічного алкоголізму, інсульту, діабету, синдрому набутого імунodefіциту ("СНІДу"), токсинів, хіміотерапії, головний біль у цілому, мігрень, кластерний головний біль, біль унаслідок змішаних серцево-судинних та несерцево-судинних синдромів, головний біль, викликаний гіпер- або гіпотензією, біль унаслідок запалення в цілому, артрити, ревматичних захворювань, вовчака, остеоартриту, фіброміалгії, запальних захворювань кишечника, синдрому подразненого кишечника, запальних захворювань очей, запальних розладів або нестабільності сечового міхура, псоріазу, шкірних захворювань із запальними складовими, сонячних опіків, кардиту, дерматиту, міозиту, неврити, дифузної хвороби сполучної тканини судин, хронічних запальних станів та пов'язаних із ними гіпералгезії та алодинії, синдрому деаферентації, астми, пошкодження або дисфункції епітеліальної тканини, простого герпесу, порушення вісцеральної рухливості на респіраторних, статевих-сечових, шлунково-кишкових або серцево-судинних ділянках, ран, опіків, алергічних шкірних реакцій, пруриту, вітиліго, захворювань шлунково-кишкового тракту в цілому, коліту, укривання виразками шлунка, виразок дванадцятипалої кишки, вазомоторного або алергічного риніту, бронхіальних розладів, дисменореї, диспепсії, гастроєзофагеального рефлюксу, панкреатиту або вісцералгії.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що біль, пов'язаний з остеоартритом, являє собою остеоартритний біль у коліні.
3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що важкий ланцюг та легкий ланцюг антитіла сполучені гнучким лінкером з утворенням одноланцюгового антитіла.
4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що антитіло являє собою:
  - (а) Fab' антитіло;
  - (б) (Fab')<sub>2</sub> антитіло;
  - (с) повністю людське антитіло;
  - (д) гуманізоване антитіло.
5. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що антитіло пригнічує передачу сигналу NGF.
6. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що антитіло відокремлюється від людського NGF поліпептиду з K<sub>D</sub> від  $1 \times 10^{-9}$  М до  $1 \times 10^{-11}$  М і нейтралізує біологічну активність людського NGF у стандартній in vitro реакції з IC<sub>50</sub> від  $1 \times 10^{-8}$  М до  $0,2 \times 10^{-9}$  М.
7. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що антитіло відокремлюється від людського NGF поліпептиду з K<sub>D</sub> від  $1 \times 10^{-10}$  М до  $1 \times 10^{-11}$  М і нейтралізує біологічну активність людського NGF у стандартній in vitro реакції з IC<sub>50</sub> від  $1 \times 10^{-8}$  М до  $1 \times 10^{-9}$  М.
8. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що біль являє собою діабетичний невропатичний біль.
9. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що біль являє собою невропатичний біль.

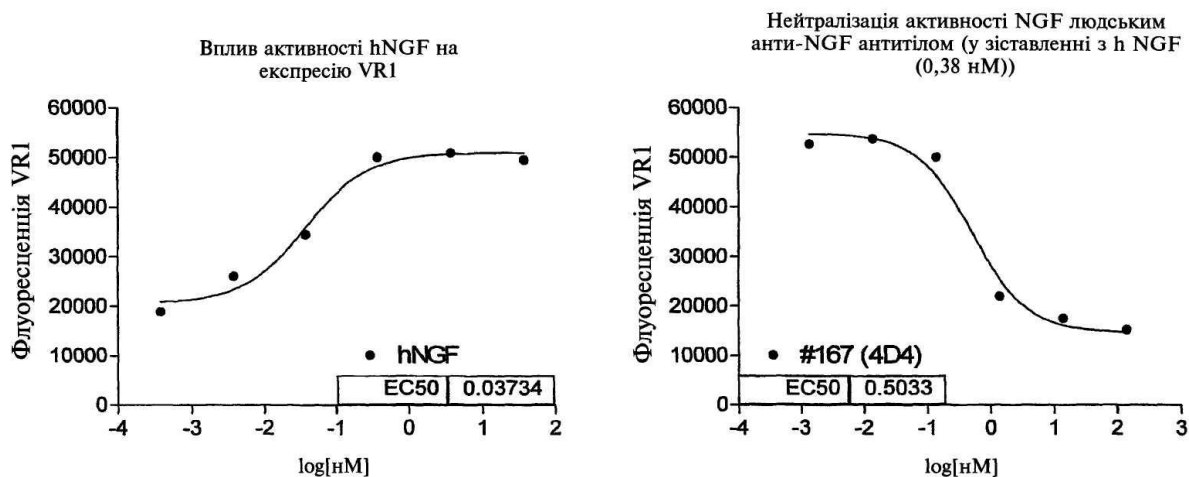


ФІГ. 1(a)

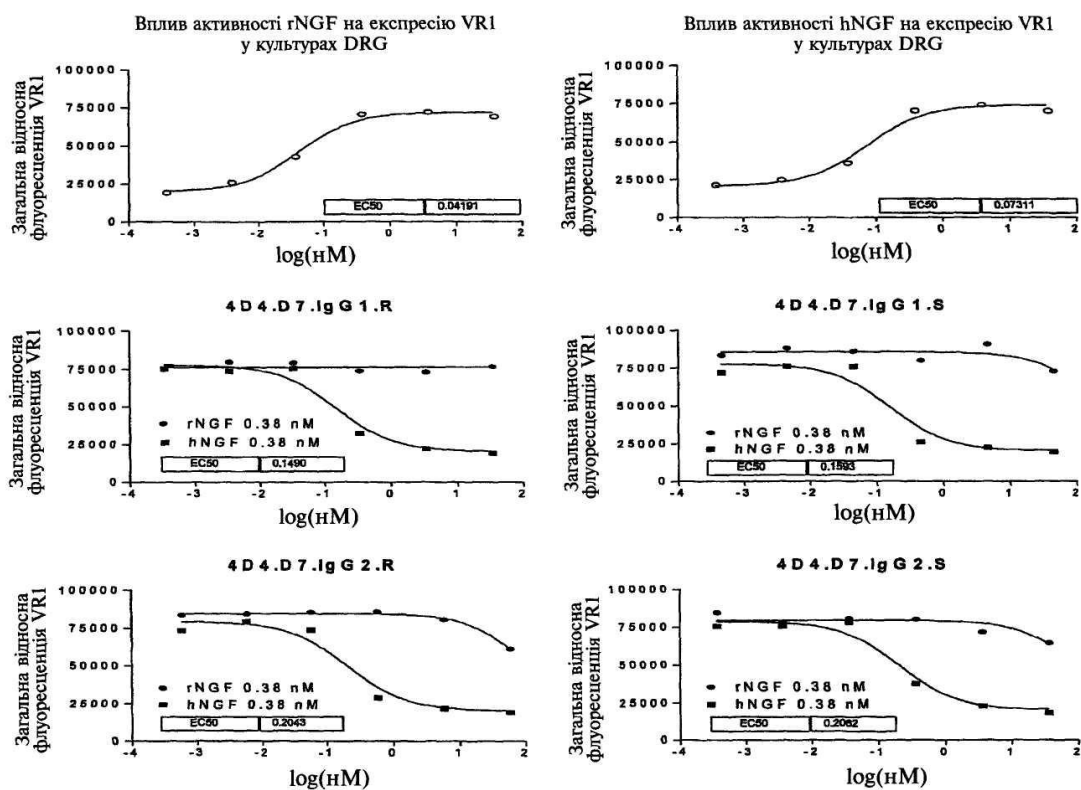


ФІГ. 1(b)

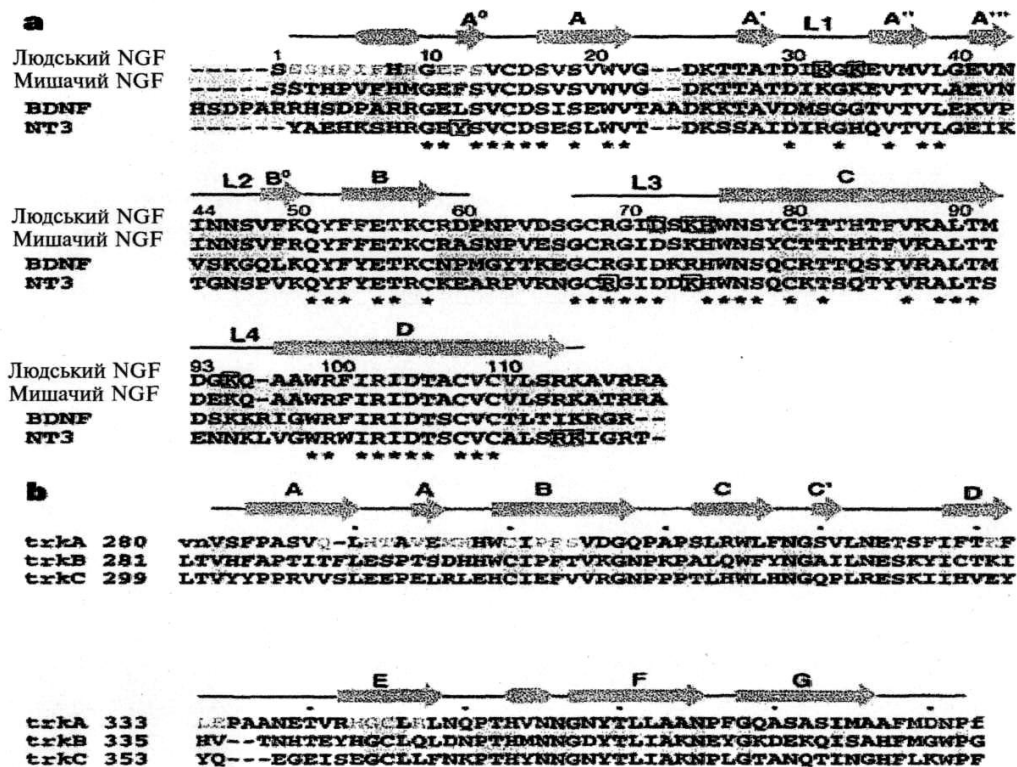




ФІГ. 2



ФІГ. 3



ФІГ. 4

Порівняльний аналіз/відсоток ідентичності CDR1 важкого ланцюга NGF

	(1)	1	5
14D10 HC CDR1	(1)	DYAMH	
6H9 HC CDR1	(1)	DYAMH	
7H2 HC CDR1	(1)	DYAMH	
4G6 HC CDR1	(1)	DYGMN	
14D11 HC CDR1	(1)	TYWIG	
4D4 HC CDR1	(1)	SYSMN	

	14D10 HC CDR1	6H9 HC CDR1	7H2 HC CDR1	4G6 HC CDR1	14D11 HC CDR1	4D4 HC CDR1
14D10 HC CDR1	100	100	100	60	20	40
6H9 HC CDR1		100	100	60	20	40
7H2 HC CDR1			100	60	20	40
4G6 HC CDR1				100	20	60
14D11 HC CDR1					100	20
4D4 HC CDR1						100

ФІГ. 5

## Порівняльний аналіз/відсоток ідентичності CDR2 важкого ланцюга NGF

	(1)	1	17
14D10 HC CDR2	(1)	GISWNRGIIGYADSVKG	
6H9 HC CDR2	(1)	GISWNRGIIGYAGSVKG	
7H2 HC CDR2	(1)	GITWNSGILGYADSVKG	
4G6 HC CDR2	(1)	DINWNGGSTGYADSVKG	
4D4 HC CDR2	(1)	YISRSSHTIFYADSVKG	
14D11 HC CDR2	(1)	IIFPGDSDTKYSPSFQG	

	14D10 HC CDR2	6H9 HC CDR2	14D11 HC CDR2	4D4 HC CDR2	4G6 HC CDR2	7H2 HC CDR2
14D10 HC CDR2	100	94	24	59	70	82
6H9 HC CDR2		100	24	53	65	76
14D11 HC CDR2			100	24	29	24
4D4 HC CDR2				100	47	53
4G6 HC CDR2					100	70
7H2 HC CDR2						100

ФІГ. 6

## Порівняльний аналіз/відсоток ідентичності CDR3 важкого ланцюга NGF

	(1)	1	17
14D10 HC CDR3	(1)	GYGSGRPGYFYVMDV	
6H9 HC CDR3	(1)	GYGSGRPGYFYVMDV	
14D11 HC CDR3	(1)	NYGSGTYGYFYVMDV	
4G6 HC CDR3	(1)	EQWLDEYGYFYVMDV	
4D4 HC CDR3	(1)	VLS-SGNHVSDFDY	
7H2 HC CDR3	(1)	EGSGR--YVNFQY	

	14D10 HC CDR3	6H9 HC CDR3	14D11 HC CDR3	4G6 HC CDR3	4D4 HC CDR3	7H2 HC CDR3
14D10 HC CDR3	100	100	35	41	18	18
6H9 HC CDR3		100	35	41	18	18
14D11 HC CDR3			100	53	29	35
4G6 HC CDR3				100	18	29
4D4 HC CDR3					100	41
7H2 HC CDR3						100

ФІГ. 7

## Порівняльний аналіз/відсоток ідентичності CDR1 легкого ланцюга NGF

				(1) 1	12
	14D11 LC CDR1	(1) RASQGI9IWLA-			
4G6 LC CDR1 20031028340	(1) RASQGI9SWLA-				
4D4 LC CDR1	(1) RASQGI9SALA-				
4G6 LC CDR1 20031028351	(1) RASQGV8SYLA-				
14D10 LC CDR1	(1) RASQSV8SGFLA				
4G6 LC CDR1 20031000528	(1) RASQSV8SYLA-				
4G6 LC CDR1 20031071526	(1) RASQSV8SSYLA				
6H9 LC CDR1	(1) RASQSV8SSYLA				
7H2 LC CDR1	(1) RASQSV8SSYLA				
NGF 4G6 LC CDR1 20031028344	(1) RASQSV8SSYLA				

	14D11 LC CDR1	4G6 LC CDR1 20031028340	4D4 LC CDR1	4G6 LC CDR1 20031028351	14D10 LC CDR1	4G6 LC CDR1 20031000528	4G6 LC CDR1 20031071526	6H9 LC CDR1
14D11 LC CDR1	100	92	83	75	42	67	42	42
4G6 LC CDR1 20031028340		100	92	83	50	75	50	50
4D4 LC CDR1			100	83	50	75	50	50
4G6 LC CDR1 20031028351				100	58	92	58	58
14D10 LC CDR1					100	67	83	83
4G6 LC CDR1 20031000528						100	67	67
4G6 LC CDR1 20031071526							100	100
6H9 LC CDR1								100
7H2 LC CDR1								
NGF 4G6 LC CDR1 20031028344								

ФІГ. 8

## Порівняльний аналіз/відсоток ідентичності CDR2 легкого ланцюга NGF

				(1) 1	7
	14D11 LC CDR2	(1) RASQGI9IWLA-			
4G6 LC CDR2 20031028340	(1) RASQGI9SWLA-				
4D4 LC CDR2	(1) RASQGI9SALA-				
4G6 LC CDR2 20031000528	(1) RASQGV8SYLA-				
4G6 LC CDR2 20031028351	(1) RASQSV8SGFLA				
6H9 LC CDR2	(1) RASQSV8SYLA-				
14D10 LC CDR2	(1) RASQSV8SSYLA				
4G6 LC CDR2 20031071526	(1) RASQSV8SSYLA				
7H2 LC CDR2	(1) RASQSV8SSYLA				
NGF 4G6 LC CDR2 20031028344	(1) RASQSV8SSYLA				

	14D11 LC CDR2	4G6 LC CDR2 20031028340	4D4 LC CDR2	4G6 LC CDR2 20031000528	4G6 LC CDR2 20031028351	6H9 LC CDR2	14D10 LC CDR2	4G6 LC CDR2 20031071526	7H2 LC CDR2	NGF 4G6 LC CDR2 20031028344
14D11 LC CDR2	100	100	71	28	28	43	43	43	43	43
4G6 LC CDR2 20031028340		100	71	28	28	43	43	43	43	43
4D4 LC CDR2			100	43	43	43	43	43	43	43
4G6 LC CDR2 20031000528				100	100	71	71	71	71	71
4G6 LC CDR2 20031028351					100	71	71	71	71	71
6H9 LC CDR2						100	86	86	86	86
14D10 LC CDR2							100	100	100	100
4G6 LC CDR2 20031071526								100	100	100
7H2 LC CDR2									100	100
NGF 4G6 LC CDR2 20031028344										100

ФІГ. 9

## Порівняльний аналіз/відсоток ідентичності CDR3 легкого ланцюга NGF

(1) 1 9

14D10 LC CDR3 (1) QQYGSSEPYT

7H2 LC CDR3 (1) QQYGSSE-YT

6H9 LC CDR3 (1) QQYGSSEPYT

4G6 LC CDR3 20031000528 (1) QQRSNWEPWT

4G6 LC CDR3 20031028351 (1) QQRSNWHRIT

14D11 LC CDR3 (1) QQANSFEPWT

4D4 LC CDR3 (1) QQFNSEYPLT

4G6 LC CDR3 20031028340 (1) QQYNSEYEPWT

4G6 LC CDR3 20031071526 (1) QQYNSEYEPWT

NGF 4G6 LC CDR3 20031028344 (1) QQYGSSEPYT

	14D10 LC CDR3	7H2 LC CDR3	6H9 LC CDR3	4G6 LC CDR3 20031000528	4G6 LC CDR3 20031028351	14D11 LC CDR3	4D4 LC CDR3	4G6 LC CDR3 20031028340	4G6 LC CDR3 20031071526	NGF 4G6 LC CDR3 20031028344
14D10 LC CDR3	100	89	100	44	33	56	56	67	67	100
7H2 LC CDR3		100	89	33	33	44	44	56	56	89
6H9 LC CDR3			100	44	33	56	56	67	67	100
4G6 LC CDR3 20031000528				100	78	56	44	56	56	44
4G6 LC CDR3 20031028351					100	33	33	33	33	33
14D11 LC CDR3						100	67	78	78	56
4D4 LC CDR3							100	78	78	56
4G6 LC CDR3 20031028340								100	100	67
4G6 LC CDR3 20031071526									100	67
NGF 4G6 LC CDR3 20031028344										100

ФІГ. 10

## Порівняльний аналіз варіабельних ділянок легкого ланцюга моноклональних антитіл 4G6, 7H2, 14D10, 14D11, 6H9, 4D4

	(1) 1	10	20	30	40	50	67	Сегмент 1
4D4 VK	(1) AIQLTQSPSSLSASVGDRTVTTCRASQGIS-ALAWYQKPKAPKLLIYDASSLQSGVSRFSGSG							
NGF 4G6 kappa 20031071526 rc V region	(1) EIVLTQSPGTLISLSPGERAT[CDR1]QSVSSSYLAWYQKPKGQAP[CDR2]ASSRATGIPDRFSGSG							
NGF 4G6 LC 20031028344rv region	(1) EIVLTQSPGTLISLSPGERATISCRASQSVSSSYLAWYQKPKGQAPRLIYGAASSRATGIPDRFSGSG							
NGF 4G6 LC 20031028340rv region	(1) DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTTCRASQGIS-WLAWYQKPKAPKSLIYAASSLQSGVSRFSGSG							
NGF 4G6 LC 20031028351rv region	(1) EIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASQSVSS-YLAWYQKPKGQAPRLIYIASNRAITGIPARFSGSG							
NGF LC 4G6 GR5 pCR4 20031000528V region#2	(1) EIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASQSVSS-YLAWYQKPKGQAPRLIYIASNRAITGIPARFSGSG							
NGF 14D10 LC 20031028366 rc v region	(1) EIVLTQSPGTLISLSPGERATISCRASQSVSSGFLAWFQKPKGQAPRLIYGAASSRATAIPDRFSGSG							
NGF 14D11 lc 20031028405 rc v region	(1) DIQMTQSPSSVSAVGDRTVTTCRASQGISI-WLAWYQKPKAPKLLIYAASSLQSGVSRFSGSG							
NGF 6H9 Hu kappa V region no sp 2002120980	(1) EIVLTQSPGTLISLSPGERATISCRASQSVSSSYLAWYQKPKGQAPRLIYVASSRATGIPDRFSGSG							
NGF 7H2 Hu kappa 2002120984 V region no sp	(1) EIVLTQSPGTLISLSPGERATISCRASQSVSSSYLAWYQKPKGQAPRLIYGAASSRATGIPDRFSGSG							
	(68) 68	80	CDR 3	108				Сегмент 2
4D4 VK	(67) SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPTFGGQTKVEIK							
NGF 4G6 kappa 20031071526 rc V region	(68) SGTGFTLTISLQPEDFAVYYCQQYNSYPTFGGQTKVEIK							
NGF 4G6 LC 20031028344rv region	(68) SGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYGSSEYPTFGGQTKLEIK							
NGF 4G6 LC 20031028340rv region	(67) SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPTFGGQTKVEIK							
NGF 4G6 LC 20031028351rv region	(67) SGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWHRITFGGQTKVEIK							
NGF LC 4G6 GR5 pCR4 20031000528V region#2	(67) SGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPTFGGQTKVEIK							
NGF 14D10 LC 20031028366 rc v region	(68) SGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYGSSEYPTFGGQTKLEIK							
NGF 14D11 lc 20031028405 rc v region	(67) SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPTFGGQTKVEIK							
NGF 6H9 Hu kappa V region no sp 2002120980	(68) SGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYGSSEYPTFGGQTKLEIK							
NGF 7H2 Hu kappa 2002120984 V region no sp	(68) SGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYGSSEYPTFGGQTKLEIK							

region — ділянка; kappa — каппа

ФІГ. 11

Порівняльний аналіз варіабельних ділянок важкого ланцюга моноклональних  
антитіл 4D4, 4G6, 14D10, 14D11, 7H2, 6H9

		Сегмент 1									
		(1)	1	10	20	30	CDR1	40	50	CDR2	66
4D4 VH	(1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTLR	SYSMNWVRQAPGKLEWVS	YISRSSTIF	YADSVK					
NGF 14D10 HC 20031071581 v region	(1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CTASGFTPE	DYAMHWVRQAPGKLEWVS	GISWNRGII	GYADSVK					
NGF 6H9 HC Hu-Rat 2002120864 final V region	(1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTPE	DYAMHWVRQAPGKLEWVS	GISWNRGII	GYAGSVK					
NGF 7H2 Hu-Rat IgG2b.b 2002118141 final V region	(1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTPE	DYAMHWVRQAPGKLEWVS	GITWNSGIL	GYADSVK					
NGF 14D11 HC race 20031028394rc V region	(1)	EVQLVQSGAEVVKPGE	SLKISCKGSGYNFT	TYWIGWVRQMPGKLEWVS	GIYPGSDTK	YSPSFQ					
NGF 4G6 HC pCR4TOPO 20031028328r V region	(1)	EVQLVESGGGVVRPGGSLRLS	CAASGFTPE	DYGMNWVRQAPGKLEWVS	DINWNGGST	GYADSVK					
		Сегмент 2									
		(67)	67	80	90	100	CDR3	110	127		
4D4 VH	(67)	RFTISRDNAKNSLYLQMD	SLADEDTAMYYCAR	---	VYSSGWHVSDYFD	---	YWGQGLVTVSS				
NGF 14D10 HC 20031071581 v region	(67)	RFTVSRDNAKNSLYLOMNS	LRAEDTALYYCAKE	---	GYGSGRPGYFYVMD	---	YWGQGTITVTVSS				
NGF 6H9 HC Hu-Rat 2002120864 final V region	(67)	RFTISRDNAKNSLYLOMNS	LRAEDTALYYCAKE	---	GYGSGRPGYFYVMD	---	YWGQGTITVTVSS				
NGF 7H2 Hu-Rat IgG2b.b 2002118141 final V region	(67)	RFTISRDNAKNSLYLOMNS	LRAEDTALYYCAKE	---	EGSGRYYNFD	---	YWGQGTITVTVSS				
NGF 14D11 HC race 20031028394rc V region	(67)	QVTISADKSI	STAYLOWSSLKASDTAMYYCAR	---	NYYGSGTYYYYGMNV	---	YWGQGTITVTVSS				
NGF 4G6 HC pCR4TOPO 20031028328r V region	(67)	RFTISRDNAKNSLYLOMNS	LRAEDTALYYCAR	---	EQWLDPYYYYYGMNV	---	YWGQGTITVTVSS				

region — ділянка

ФІГ. 12

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ — 42, 01601