



(51) МПК
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2007147625/15**, **07.06.2006**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
07.06.2006

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
07.06.2005 IT RM 2005 A 000290

(43) Дата публикации заявки: **27.06.2009** Бюл. № 18

(45) Опубликовано: **27.08.2011** Бюл. № 24

(56) Список документов, цитированных в отчете о
 поиске: **WO 2005/061540 A2**, **07.07.2005. US 6881719**
B1, **19.04.2005. WO 2005/019266 A2**, **03.03.2005.**

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
 национальной фазе: **20.12.2007**

(86) Заявка РСТ:
IT 2006/000426 (07.06.2006)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2006/131951 (14.12.2006)

Адрес для переписки:
**129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
 ООО "Юридическая фирма Городиский и
 Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной**

(72) Автор(ы):

**ПАВОНЕ Фламиния (IT),
 МАРТИНЕЛЛИ Сара (IT),
 КАТТАНЕО Антонино (IT),
 УГОЛИНИ Габриеле (IT)**

(73) Патентообладатель(и):

ПАНДЖЕНЕТИКС 110 Б.В. (NL)

**(54) МОЛЕКУЛЫ, СПОСОБНЫЕ ИНГИБИРОВАТЬ СВЯЗЫВАНИЕ МЕЖДУ NGF И
 РЕЦЕПТОРОМ TrkA, В КАЧЕСТВЕ АНАЛЬГЕТИКОВ С ПРОЛОНГИРОВАННЫМ
 ЭФФЕКТОМ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и касается молекул, способных ингибировать связывание между NGF и рецептором TrkA, в качестве анальгетиков с пролонгированным эффектом. Сущность изобретения включает применение анти-NGF антитела, изотипа IgG4, способного ингибировать связывание между NGF и TrkA и способного блокировать

биологическую активность TrkA, для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики хронической боли. Заявлен также способ лечения хронической боли. Преимущество изобретения заключается в пролонгировании анальгезирующего эффекта. 3 н. и 38 з.п. ф-лы, 1 табл., 6 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2007147625/15, 07.06.2006**

(24) Effective date for property rights:
07.06.2006

Priority:

(30) Priority:
07.06.2005 IT RM 2005 A 000290

(43) Application published: **27.06.2009 Bull. 18**

(45) Date of publication: **27.08.2011 Bull. 24**

(85) Commencement of national phase: **20.12.2007**

(86) PCT application:
IT 2006/000426 (07.06.2006)

(87) PCT publication:
WO 2006/131951 (14.12.2006)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj**

(72) Inventor(s):

**PAVONE Flaminija (IT),
MARTINELLI Sara (IT),
KATTANEO Antonino (IT),
UGOLINI Gabriele (IT)**

(73) Proprietor(s):

PANDZHENETIKS 110 B.V. (NL)

(54) NGF AND TrkA RECEPTOR BINDING INHIBITING MOLECULES AS PROLONGED ANALGESICS

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to medicine, and concerns NGF and TrkA receptor binding inhibiting molecules as prolonged analgesics. Substance of the invention involves application of anti-NgF antibodies, isotype IgG4 inhibiting NGF and TrkA binding and

blocking biological TrkA activity for preparing a drug for treatment and/or prevention of chronic pain. A method of treatment of chronic pain is declared also.

EFFECT: analgesic effect prolongation.

41 cl, 1 tbl, 6 dwg

Уровень техники изобретения

Настоящее изобретение относится к применению молекул, способных ингибировать связывание между NGF и его рецептором, TrkA. В частности, оно относится к антителам к одной из двух молекул, которые посредством блокирования биологической активности NGF оказывают пролонгированный анальгезический эффект. Вследствие их продолжительного анальгезического эффекта они являются эффективным средством для лечения патологий с постоянными формами боли, известными также как хроническая боль, такими как, но не ограничиваясь ими, нейропатическая или онкологическая боль.

Состояние уровня техники

Афферентные ноцицептивные сигналы проводятся к спинному мозгу по волокнам Ad и C, клеточные тела которых (первичные чувствительные нейроны) расположены в дорсальных спинальных ганглиях (DRG). Первичные чувствительные нейроны высвобождают глутамат вместе с АТФ в качестве возбуждающего нейромедиатора и различные другие вещества, такие как вещество P и CGRP ("кальцитонин-ген-связанный-пептид") (Hunt and Mantyh, 2001). Высвобождение этих возбуждающих нейромедиаторов регулируется различными классами рецепторов, присутствующих на афферентных окончаниях, включая чувствительные к капсаицину (ваниллоидные рецепторы, VR1), активируемые GABA, активируемые непосредственно АТФ и активируемые каннабиноидами (CB1) (Sivilotti and Nistri, 1991; Hunt and Mantyh, 2001; Khakh, 2001; Morisset et al., 2001). Одним из патофизиологических механизмов, посредством которых возникает постоянная боль, является аллодиния, то есть трансформация стимулов, которые в норме не являются болевыми, в болевые ощущения. Этот феномен включает различные ионные потоки и, таким образом, различные каналы "лигандзависимого" типа, включая рецептор к капсаицину, VR1, и ионотропные рецепторы к АТФ (Khakh, 2001). Одновременная активация рецепторов к VR1 и к АТФ на спинальных ноцицептивных интернейронах вызывает значительное накопление возбуждающих синаптических сигналов с усилением передачи болевого стимула (Nakatsuka et al., 2002). Исходя из этого ясно, что рецепторы АТФ (особенно те, которые принадлежат классу P2X3) играют фундаментальную роль в болевых нервных путях (Burnstock, 2001). Эти рецепторы присутствуют на периферических нервных окончаниях, активируемых болевыми стимулами, на клеточных телах нейронов в DRG и на их пресинаптических окончаниях, а также обязательно на постсинаптических окончаниях в спинном мозге (Khakh, 2001). Существует большое число доказательств, которые показывают, что система, состоящая из фактора роста нервов (NGF) и его высокоаффинного рецептора TrkA (Levi-Montalcini, 1987; Levi-Montalcini et al., 1996; Frade and Barde, 1998; Kaplan, 1998), играет фундаментальную роль в молекулярных процессах, лежащих в основе основных форм "постоянной" боли. Это указывает на главную область терапевтического применения (лечения боли с конкретным указанием на "тонические" формы) антител, которые блокируют систему NGF/TrkA (Levine, 1998). Развитие чувствительных ноцицептивных нейронов в значительной степени зависит от NGF, и реакции болевых рецепторов взрослых модулируются тем же фактором (Julius and Basbaum, 2001). В частности, NGF вызывает острое повышение чувствительности к болезненным стимулам капсаицина (Shu and Mendell, 1999). С функциональной точки зрения, при хроническом воспалении у ноцицептивных нейронов наблюдаются изменения частоты и продолжительности потенциала действия. Этот феномен регрессирует при блокировании эндогенного NGF, что приводит к значительному ослаблению повышенной возбудимости, которая

является типичной для состояний, сопровождающихся хронической болью (Djouhri et al., 2001). Действие NGF на определение болевого порога в болевых рецепторах взрослых опосредуется рецептором TrkA, а также посредством модуляции реакции, опосредованной рецептором VR1, присутствующим на ноцицептивных окончаниях.

5 Полагают, что TrkA-зависимое потенцирование реакции VR1 осуществляется посредством внутриклеточного пути трансдукции гамма версии фосфолипазы C (PLC γ , Chuang et al., 2001). При воспалительных процессах уровни периферического NGF повышены, тогда как введение экзогенного NGF вызывает

10 гипералгезический эффект у крыс и вызывает боль в мышцах у людей. Кроме того, NGF вызывает повышенную чувствительность к тепловой стимуляции у людей и млекопитающих. NGF высвобождается мастоцитами, фибробластами и другими типами клеток в периферических участках, где развиваются воспалительные процессы. В частности, основную роль, по-видимому, играют мастоциты (Woolf et al., 1996).

15 Поскольку эти клетки продуцируют NGF и одновременно экспрессируют функциональные рецепторы TrkA на своей поверхности (Nilsson et al., 1997), они способны самостоятельно отвечать на NGF в присутствии лизофосфатидилсерина (Horigome et al., 1993; Kawamoto et al., 2002). В результате

20 система NGF/TrkA, по-видимому, опосредует активацию мастоцитов через аутокринный механизм положительной обратной связи, допуская местное усиление аллогенного воспалительного сигнала. Высокие уровни NGF также обнаружены в нейронах, где этот нейротрофин очевидно ответственен за модификацию нервных волокон, ассоциированных с болью (Harpf et al., 2002). При некоторых формах рака

25 избыток NGF облегчает рост и инфильтрацию нервных волокон с индукцией онкологической боли (Zhu et al., 1999). Последние экспериментальные исследования показали, что с помощью блокирования NGF можно значительно уменьшить образование невром, ответственных за нейропатическую боль, без повреждения

30 клеточных тел пораженных нейронов (Kryger et al., 2001). Эти результаты вызвали значительный интерес к терапевтическим методам, основанным на уменьшении эффектов NGF, для лечения постоянной боли (Saragovi and Gehring, 2000). В последние годы участие системы NGF/TrkA в молекулярных процессах передачи боли также демонстрировалось на генетическом уровне. В частности, мутации гена TrkA

35 (локализованного на хромосоме Iq21-q22) ответственны за наследственный рецессивный аутосомный синдром, известный как CIPA ("врожденная нечувствительность к боли с ангидрозом"), характеризующийся рецидивной эпизодической лихорадкой, ангидрозом, отсутствием реакции на стимулы, которые

40 вызывают боль, олигофренией и склонностью к нанесению себе увечий (Indo et al., 1996; Saragovi and Gehring, 2000; Indo, 2001; Indo et al., 2001). Дополнительное подтверждение участия NGF в ноцицептивной реакции было недавно получено в работе по определению характеристик фенотипа анти-NGF трансгенных

45 мышей (AD11). У этих животных эктопическая экспрессия анти-NGF антитела α D11 вызывает функциональный блок NGF у взрослых особей. Этот блок последовательно трансформируется в увеличение латентного времени реакции на повреждающие тепловые стимулы (Capsoni et al., 2000; Ruberti et al., 2000). Антитела, способные

50 нейтрализовать биологическую активность системы NGF/TrkA, блокируя лиганд или рецептор, могут представлять важный ресурс в лечении боли, в частности постоянных форм боли. В этом контексте в новейшей публикации показано, что лечение нейтрализующим анти-NGF антителом вызывает значительное уменьшение боли на мышинной модели онкологической боли (Sevcik et al., 2005). Однако в протоколе

5 введения, используемом Sevcik et al., максимальный промежуток времени между
последней инъекцией анти-NGF и наблюдением поведения не превышает 4 дня, таким
образом, это не долговременный эффект. Продолжительный или долговременный
эффект может быть определен как эффект, который остается выраженным в течение
10 по меньшей мере 1-2 недель, после последнего введения антитела, предполагая, что
нет необходимости в корреляции между эффектом и концентрацией в кровотоке
самого антитела. Продолжительный эффект может требовать новой экспрессии гена и
может представлять постоянную или пролонгированную модификацию

15 Авторы настоящего изобретения располагают панелью антител (направленных
против лиганда NGF), которые способны блокировать биологические эффекты NGF,
которые опосредованы лигандом TrkA. Особенно интересны два реагента: α D11
(анти-NGF) и MNAC13 (анти-TrkA). Значительный интерес представляет сравнение
20 двух антител, одного, направленного против лиганда, и другого, направленного
против рецептора, поскольку ингибирование лиганда NGF функционально не
эквивалентно ингибированию рецептора TrkA. Фактически необходимо рассмотреть
три момента:

25 i) стехиометрические причины, в контексте той же системы, доступность лиганда и
рецептора может значительно изменяться и изменяться с течением времени различным
образом;

ii) наличие второго рецептора для NGF (p75), который совместно используется
всеми нейротрофинами и опосредует различные биологические функции в
30 отношении TrkA (Hempstead, 2002);

iii) наличие в природе "незрелых" форм NGF (пре-про-NGF), характеризующихся
различными свойствами, в отношении биоактивности, и связывающиеся
предпочтительно с рецептором p75 (Lee et al., 2001). α D11 является крысиным
моноклональным антителом, направленным против NGF мышей (но также способное
35 распознавать крысиный и человеческий NGF). Его взаимодействие с NGF ингибирует
его связывание с TrkA, блокируя его физиологическую активность (Cattaneo et al.,
1988). α D11 также ингибирует связывание NGF с рецептором p75. Это анти-NGF
антитело абсолютно уникально в отношении его специфичности связывания со своим
40 антигеном (по сравнению со всеми другими нейротрофинами), посредством средства
связывания с антигеном (пикомолярный) и посредством нейтрализации свойств, что
показано как *in vitro*, так и *in vivo* (Cattaneo et al., 1988; Berardi et al., 1994; Molnar et
al., 1997; Molnar et al., 1998). Эпитоп альфаD11 расположен на уровне I петли NGF
и/или II петли NGF, которые выставлены на наружную часть молекулы и
45 пространственно очень близки друг к другу. Кроме того, сохраненная реакционная
способность альфаD11 в различных видах совместима с распределением эпитопа, так
как аминокислотные остатки этих двух петель высоко консервативны. Сильная
нейтрализующая активность альфаD11 показывает, что распознаваемый эпитоп
50 находится очень близко к участку связывания рецептора NGF. Кроме того, отсутствие
перекрестной реактивности альфаD11 с другими членами семейства нейротрофинов
предполагает, что: i) эпитоп расположен в областях NGF, которые не используются
совместно с другими нейротрофинами, ii) сам эпитоп может включиться в "путь

специфичности", опосредуя распознавание NGF-TrkA. Эпитоп, распознаваемый антителом альфаD11 на молекуле NGF, был идентифицирован с помощью тестирования активности связывания антитела относительно широкой панели мутантов NGF. На основе этого систематического скрининга была идентифицирована область (41-49 аминокислот, петля I) молекулы NGF, которая экспрессируется на высоком уровне на поверхности молекулы NGF и которая ответственна (хотя не исключительно) за связывание антитела с его антигеном (Gonfloni, 1995). Фактически область аминокислот 23-35 NGF (петля II) может также участвовать в связывании.

Антитело MNAC13 является мышинным моноклональным антителом, направленным против рецептора TrkA человека (Cattaneo et al., 1999; Pesavento et al., 2000), которое особенно эффективно в ингибировании процесса активации TrkA посредством NGF и последующих биологических функций, как *in vitro*, так и *in vivo* (Cattaneo et al., 1999; Pesavento et al., 2000). Антитела были подробно охарактеризованы с точки зрения структуры (Covaceuszach et al., 2001) и относительно молекулярного взаимодействия с рецептором TrkA (Covaceuszach et al., 2005).

На основе такого всестороннего знания структуры посредством новаторского способа были генерированы гуманизированные версии как α D11, так и MNAC13 (Hu- α D11 и Hu-MNAC13), проявляющие такие же антигенсвязывающие свойства, как и у исходных версий (заявка на патент WO 05/061540).

Установлено, что методы лечения, которые в настоящее время доступны для лечения боли нейропатического происхождения (вызванной первичным поражением или дисфункцией нервной системы, например боли, связанной с поражением спинного мозга), для лечения онкологической боли и для многих других форм постоянной боли (также воспалительной природы) имеют ограниченную эффективность. Поэтому существует очевидная потребность в выявлении и разработке новых молекул, которые обладают анальгезической активностью и которые действуют посредством механизма действия, отличного от механизма действия применяемых в настоящее время анальгезических лекарственных средств, для решения проблем, связанных с побочными эффектами. В международной заявке на патент WO 02/20479 раскрыт синтез малых молекул, которые ингибируют рецептор TrkA, обладая потенциальной анальгезической активностью. Однако эффект этих молекул на некоторых моделях боли не был продемонстрирован. Кроме того, по сравнению с антителами малые молекулы имеют недостаток, выражающийся в том, что они с большей вероятностью могут проникать через гематоэнцефалический барьер с возможностью развития серьезных побочных эффектов. Фактически холинергические нейроны базального отдела переднего мозга, нейронная популяция, которая подвержена различным формам прогрессирующей нейродегенерации, включая болезнь Альцгеймера (Saper et al., 1985), экспрессируют рецептор TrkA, и их правильное функционирование зависит от NGF (Holtzman et al., 1992). В международной заявке на патент WO 01/78698 предлагается применение антагониста NGF для профилактики или лечения хронической висцеральной боли, но не нейропатической или онкологической боли. Несмотря на то что в заявке указано, что антагонист может связывать как NGF, так и рецептор TrkA, в ней не показано, что после связывания антагониста с рецептором TrkA рецептор блокируется функционально. На основе способности этих двух антител MNAC13 и α D11 блокировать биологическую активность NGF/TrkA эти два антитела, MNAC13 и α D11, и их соответствующие гуманизированные версии были протестированы на различных животных моделях (грызунах) постоянной боли, в частности в модели ССИ ("Повреждение посредством хронического сдавливания", повреждение седалищного

нерва посредством хронического сдавливания), одной из моделей, доступных для исследования хронической боли нейропатической природы (Bennett and Xie, 1988).

Сущность изобретения

Целью настоящего изобретения является применение анти-NGF, который способен ингибировать связывание между NGF и TrkA, для получения лекарственного средства для лечения хронической боли.

Молекула анти-NGF, которая блокирует биологическую активность TrkA, определена как молекула, которая действует как антагонист в отношении NGF, связываясь с рецептором TrkA, и содержит: синтетическую молекулу, или моноклональное антитело, или их биологическое/синтетическое производное, которое:

i) связывается с TrkA;

ii) ингибирует связывание NGF с "нативным" рецептором TrkA, экспрессируемым на поверхности живых клеток ("нативный" означает "в природной *in vivo* конформации"),

и
iii) блокирует биологическую активность, которая возникает вследствие связывания NGF с тем же рецептором TrkA.

Термин "блокирование биологической активности" не означает просто блокирование активации рецептора, а определяется как блокирование процесса конверсии самого рецептора в "активное" состояние, а также как функциональная нейтрализация биологических последствий, которые являются следствием этого процесса активации: вторичных мессенджеров, новой экспрессии гена, фенотипических и функциональных модификаций. Молекула способна не только блокировать TrkA в классическом *in vitro* тесте (тест невритического роста в клетках PC12), но также и *in vivo* (функциональное блокирование холинергических нейронов базального отдела переднего мозга и блокирование ноцицепции в классическом тесте "горячей пластинки").

В качестве аспекта изобретения представляется применение анти-NGF антитела изотипа IgG4, способного ингибировать связывание между NGF и TrkA, для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики хронической боли.

Предпочтительно антитело способно распознавать и связываться с доменом молекулы NGF, содержащим область аминокислот 41-49 человеческого или крысиного NGF: EVNINNSVF (SEQ ID No. 9), более предпочтительно домен содержит также область аминокислот 23-35: GDKTTATDIKGKE (SEQ ID No. 10). Более предпочтительно антитело способно блокировать биологическую активность TrkA.

В качестве аспекта изобретения также предоставляется способ лечения и/или профилактики хронической боли у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества анти-NGF антитела для лечения и/или профилактики посредством этого хронической боли у указанного субъекта. Также предоставляется набор, включающий композицию, содержащую анти-NGF антитело вместе с инструкциями, указывающими как вводить указанную композицию субъекту, нуждающемуся в лечении и/или профилактике хронической боли, для лечения и/или профилактики посредством этого хронической боли у указанного субъекта.

В предпочтительном аспекте переменная область легкой цепи антитела содержит по меньшей мере одну, более предпочтительно две, наиболее предпочтительно три, из определяющих комплементарность областей (CDR), имеющих последовательность, выбранную из аминокислот 24-34 SEQ ID No. 1; аминокислот 50-56 SEQ ID No. 1; аминокислот 89-97 SEQ ID No. 1.

В следующем предпочтительном аспекте переменная область легкой цепи

антитела по существу содержит последовательность SEQ ED No. 1.

(VL, SEQ ID No. 1):

L CDR1

L CDR2

5 DIQMTQSPASLSASLGETVTTECRASEDIYNALAWYQOKPGKSPQLLIYNTDTLHTGVP

L CDR3

SRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDVASYFCQHYPRTFFGGGTKLELK

10 В предпочтительном аспекте переменная область тяжелой цепи антитела содержит по меньшей мере одну, более предпочтительно две, наиболее предпочтительно три, из определяющих комплементарность областей (CDR), имеющих последовательность, выбранную из аминокислот 26-35 SEQ ID No. 2; аминокислот 50-65 SEQ ID No. 2; аминокислот 98-111 SEQ ID No. 2.

15 В следующем предпочтительном аспекте переменная область тяжелой цепи антитела по существу содержит последовательность SEQ ID No. 2.

(VH, SEQ ID No. 2):

H CDR1

H CDR2

20 QVQLKESGPGGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTNNVNWVRQATGRGLEWMMGGVWAGGATDY

H CDR3

NSALKSRLTITRDTSKSQVFLKMHSLQSEDTATYYCARDGGYSSSTLYAMD~~AW~~QGGTTV

25 Антитело может быть в форме одиночной цепи и содержать переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, соединенные линкером.

В альтернативном варианте антитело может содержать две легкие цепи и две тяжелые цепи.

30 В предпочтительном аспекте изобретения анти-NGF антителом является человеческое или гуманизованное антитело. Специалист в данной области выберет подходящий способ гуманизации для создания антитела, предпочтительным способом является способ, раскрытый в WO 2005/061540.

35 Вкратце, "гуманизованный" вариант переменной области антитела был получен с помощью пересадки определяющих комплементарность областей (CDR) крысиного антитела на каркас иммуноглобулина человека. Для выбора акцепторного каркаса человеческого происхождения использовали полную структурную информацию, полученную от исследований с помощью дифракции рентгеновских лучей, относительно Fab фрагмента антитела α D11. Для сведения к минимуму структурных различий между крысиным α D11 и акцепторным человеческим антителом были приняты два различных критерия: i) уровень гомологии первичной структуры, ii) уровень подобия трехмерной структуры. После выбора каркаса было сведено к минимуму замещение человеческих остатков крысиными эквивалентами, чтобы снизить потенциальную иммуногенность полученного гуманизованного антитела.

45 Иллюстративные гуманизованные антитела содержат переменную область легкой цепи, которая является гуманизованным производным SEQ ID No. 1 (последовательность крысиного происхождения). Иллюстративные гуманизованные антитела содержат переменную область тяжелой цепи, которая является гуманизованным производным SEQ ID No. 2 (последовательность крысиного происхождения).

50 В предпочтительном аспекте изобретения переменная область легкой цепи гуманизованного антитела по существу содержит последовательность SEQ ID No. 3.

SEQ ID No. 3 (VL, вариабельная область легкой цепи Hu-αD11):

L CDR1

L CDR2

DIQMTQSPSSLSASVGVDRVTITCRASEDIYNALAWYQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVP

5

L CDR3

SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGTKVEIK

В предпочтительном аспекте изобретения вариабельная область тяжелой цепи гуманизированного антитела по существу содержит последовательность SEQ ID No. 4.

10

SEQ ID No. 4 (VH, вариабельная область тяжелой цепи Hu-αD11):

H CDR1

H CDR2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDY

H CDR3

15

NSALKSRFTISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGLV

Вышеописанные гуманизированные вариабельные области были клонированы в подходящие векторы экспрессии в человеческий формат изотипа IgG1 или IgG4 и трансфицированы в линии клеток млекопитающих для возможности экспрессии, очистки и фармакологического исследования.

20

В результате были получены различные варианты Hu-αD11 (полный IgG: тяжелая цепь + легкая цепь), (различающиеся из-за различных константных частей).

В предпочтительном аспекте изобретения легкая цепь гуманизированного антитела имеет по существу последовательность SEQ ID No. 8.

25

SEQ ID No. 8, Hu-αD11 Vk человеческий Ck

DIQMTQSPSSLSASVGVDRVTITCRASEDIYNALAWYQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVP

SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF

30

PPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS

TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(Курсив = вариабельные области; жирный = мутации в крысиной последовательности в процессе гуманизации; подчеркнуто = CDR.)

35

В предпочтительном варианте осуществления тяжелая цепь гуманизированного анти-NGF имеет по существу одну из следующих 3 последовательностей:

SEQ ID No. 5, Hu-антиNGF (VH) человеческий IgG1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDY

NSALKSRFTISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGLV

40

TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA

VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPA

PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK

45

PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVY

TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS

KLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

50

SEQ ID No. 6, Hu-αD11 (VH) человеческий IgG1* (IgG1 с мутацией N297A, как описано Bolt et al., 1993.)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDY
NSALKSRFTISRDN SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGLV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 5 **VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA**
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
 10 **TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS**
KLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

SEQ ID No. 7, Hu- α D11 (VH) человеческий IgG4

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDY
 15 **NSALKSRFTISRDN SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGLV**
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPSCPAPEF
 20 **LGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE**
EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL P
PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT
VDKSRWQEGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSLGK

25 (Курсив = переменные области; жирный = мутации в крысиной последовательности в процессе гуманизации; подчеркнутый = CDR; мутация N297A для удаления участка гликозилирования.)

30 В предпочтительном аспекте молекулы по изобретению применяют для получения лекарственного средства для лечения боли хронического воспалительного типа, предпочтительно вызванной панкреатитом, почечными камнями, головными болями, дисменореей, скелетно-мышечной болью, растяжениями связок, висцеральной болью, кистами яичника, простатитом, циститом, интерстициальным циститом, послеоперационной болью, мигренью, невралгией тройничного нерва, болью от ожогов и/или ран, болью, связанной с травмой, нейропатической болью, болью, связанной со скелетно-мышечными заболеваниями, ревматоидным артритом, остеоартритом, анкилозирующим спондилитом, патологиями околосуставных тканей, онкологической болью, болью от костных метастазов, болью от ВИЧ.

40 В альтернативном варианте боль является нейропатической болью или онкологической болью.

45 Согласно Международной Ассоциации по Исследованию Боли (IASP, www.iasp-pain.org <<http://www.iasp-pain.org/>>) боль в основном определяется как "неприятное сенсорное и эмоциональное восприятие, связанное с имеющимся или потенциальным повреждением ткани или описываемое в контексте такого повреждения или обоих". Существенным элементом во всех формах боли является активация специализированных высокопороговых рецепторов и нервных волокон для предупреждения организма о потенциальном повреждении ткани. Участие воспалительных клеток и процессов является общим элементом при многих состояниях боли. Термин "острая боль" означает немедленную, в основном высокопороговую, боль, вызванную повреждением, таким как порез, раздавливание, ожог или химическая стимуляция. Используемый в данном описании термин

"хроническая боль" означает боль, отличную от острой боли. Понимается, что хроническая боль часто имеет относительно длительную продолжительность, например месяцы или годы, и может быть непрерывной или периодической.

5 Анти-NGF антитело соответственно вводят системно. Системное введение анти-NGF антитела может быть выполнено в виде инъекции, например непрерывной внутривенной инфузии, болюсной внутривенной инфузии, подкожной или внутримышечной инъекции. В альтернативном варианте могут также применяться другие формы введения (например пероральный, относящийся к слизистой оболочке, 10 ингаляционный, сублингвальный и т.д.). Местная доставка антитела может быть выполнена с помощью местного введения, например внутрисуставной или подкожной инъекции, внутримышечной инъекции вблизи пораженных тканей.

Соответственно, анти-NGF антитело будет входить в состав фармацевтической композиции, подходящей для предполагаемого пути введения. Растворы для инъекции 15 будут соответственно содержать антитело, растворенное или диспергированное в водной среде (например, воде для инъекций), содержащей подходящие буферы и модификаторы мольной концентрации, например фосфат, соль и/или декстрозу.

Режим лечения, то есть доза, расписание введения и повторение, может быть 20 представлен однократными или повторными введениями (например, инъекциями) продукта посредством выбранного пути введения. Интервал для введения дозы может быть подвержен модификациям в зависимости от широты и продолжительности клинической реакции, а также конкретного индивидуума и конкретной истории 25 болезни. Соответственно, анти-NGF антитело имеет длительную продолжительность действия. В частности, клинический эффект антитела продолжается после введения до 21 дня, как определено в экспериментальном исследовании на животных. Кроме того, предварительные данные показывают, что анти-NGF антитела могут вызывать клиническое выздоровление на более длительный период, чем когда его наличие 30 может быть обнаружено после его введения в подходящей биологической матрице, такой как сыворотка или плазма.

С учетом предполагаемой длительной продолжительности действия (то есть эффекта, соответственно длящегося по меньшей мере одну неделю или 35 предпочтительно по меньшей мере две недели, например, по меньшей мере три недели или по меньшей мере четыре недели), соответственно, антитело можно вводить субъектам с частотой не более одного раза в неделю, например не более одного раза в две недели, или одного раза в три недели, или одного раза в четыре недели.

Подходящая доза анти-NGF антитела обычно составляет от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг 40 веса тела.

Раскрытые здесь новые антитела и содержащие их композиции заявлены как аспект изобретения.

Теперь будут раскрыты неограничивающие варианты осуществления настоящего изобретения с конкретной ссылкой на следующие фигуры:

45 Фигура 1: ВИА score анализ связывания α D11 анти-NGF антитела с мышинным NGF (m-NGF) и рекомбинантным мышинным proNGF (rm-proNGF). α D11 анти-NGF антитело иммобилизовали на проточной кювете 2, тогда как проточная кювета 1 была оставлена в качестве контроля. Каждую кривую получали с помощью вычитания 50 фонового сигнала (определенного в кювете 1) из сигнала, определенного в кювете 2. Поверхностный плазмонный резонансный сигнал дает количество компонента, связанного с поверхностью, на каждой стадии и выражается в резонансных единицах (RU).

Для связывания m-NGF иммобилизация антитела имела 3000 резонансных единиц (RU) в эксперименте на панели А и 6000 RU в эксперименте на панели В. Введенные концентрации m-NGF показаны сверху каждой кривой. Из полного анализа данных были определены параметры сродства, и результаты были следующими: $K_A = 3,55 \cdot 10^{11}$ 1/М; $K_D = 2,81 \cdot 10^{12}$ М (χ^2 значение 0,123).

Для связывания gm-proNGF (панель С) иммобилизация антитела составляла 3000 RU. Введенные концентрации gm-proNGF показаны над каждой кривой. Кинетический анализ данных позволил определить следующие параметры: $K_A = 1,2 \cdot 10^9$ 1/М; $K_D = 1,9 \cdot 10^{-9}$ М (χ^2 значение 0,09).

Фигура 2: Влияние Fab α D11 (альфаD11) и Fab Ну- α D11 (Ну-альфаD11) анти-NGF антител на вызванную формалином боль (2 фаза теста с формалином: 15-40 мин. 2 фаза соответствует боли, связанной с воспалением). Мышам подкожно вводили 5% формалин в дорсальную часть правой задней лапы.

Лечение состояло в инъекции антитела (Fab альфаD11 или Fab Ну-альфаD11 против ложного Fab или против солевого раствора), выполненной (в ту же лапу, в которую вводили формалин) за 45 минут до инъекции формалина и тестирования (однократная доза каждого антитела: 12,5 мкг). Каждая экспериментальная группа включала по меньшей мере 8 животных. Статистический анализ данных показал значительный анальгезический эффект при лечении анти-NGF (как для исходной, так и для гуманизированной версии антитела), который был явно специфичным для второй фазы (воспалительной) болевой реакции (время, потраченное на облизывание): эффект анти-NGF антител (как парентеральных, так и гуманизированных версий) статистически отличается (ANOVA) от любого солевого раствора (** $p < 0,01$) или лечения ложным Fab ($\#p < 0,05$).

Фигура 3: Влияние анти-TrkA моноклонального антитела MNAC13 (1,4 мг/кг) и анти-NGF моноклонального антитела α D11 (1,4 мг/кг) на нейропатическую боль: механическую аллодинию измеряли с помощью плантарного динамического эстеziометра; мышцы CD1 подвергались хроническому сдавливанию седалищного нерва; антитела вводили внутрибрюшинно на 3, 4, 5, 6 день после повреждения седалищного нерва. Период наблюдения: с 3 дня до 14 дня. В качестве подтверждающего контроля использовали солевой раствор (соль) и мышинные иммуноглобулины (IgG, 1,4 мг/кг). Результаты выражали в абсолютных значениях (граммы) пороговой силы для задней лапы, ипсилатеральной к пораженной. Значения были подвергнуты статистическому анализу посредством анализа колебания (ANOVA) для повторных измерений, в котором как фактор "лечения", так и повторное измерение (дни) были значимыми с $p < 0,01$. Животные, которым проводили лечение с анти-TrkA или анти-NGF, достоверно отличались от контрольных с 4 дня до 14 дня.

Фигура 4: Влияние анти-TrkA моноклонального антитела MNAC13 (1,4 мг/кг) и анти-NGF α D11 антитела (1,4 мг/кг) на нейропатическую боль: механическую аллодинию измеряли с помощью плантарного динамического эстеziометра; мышцы CD1 подвергались хроническому сдавливанию седалищного нерва; антитела вводили внутрибрюшинно на 3, 4, 5, 6 дни после повреждения седалищного нерва. Период наблюдения: с 3 дня до 14 дня. В качестве контроля использовали солевой раствор (соль) и мышинные иммуноглобулины (IgG, 1,4 мг/кг). Результаты выражали в процентах, % (соотношение между пороговой силой задней лапы, ипсилатеральной к поражению, и пороговой силой, соответствующей контралатеральной задней лапе). Соответствующие абсолютные значения были подвергнуты статистическому анализу посредством анализа колебания (ANOVA) для повторных измерений, в котором как

фактор "лечения", так и повторное измерение (дни) были значимыми с $p < 0,01$ (не менее). Животные, которым проводили лечение с использованием анти-TrkA или анти-NGF, достоверно отличались от контрольных с 4 дня до 14 дня.

5 Фигура 5: Сравнение влияния анти-TrkA моноклонального антитела MNAC13 (2 дозы: 0,9 и 2 мг/кг) и анти-NGF моноклонального антитела α D11 (доза 2 мг/кг) на
нейропатическую боль: механическую аллодинию измеряли с помощью плантарного
динамического эстезиометра; мышцы CD1 подвергались хроническому сдавливанию
седалищного нерва; антитела вводили внутривентрально на 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 дни
10 после повреждения седалищного нерва. Период наблюдения: с 3 дня до 31 дня. В
качестве подтверждающего контроля использовали мышинные
иммуноглобулины (IgG, 2 мг/кг). Результаты выражали в процентах % (соотношение
между пороговой силой задней лапы, ипсилатеральной к поражению, и пороговой
силы, соответствующей контралатеральной задней лапе). Соответствующие
15 абсолютные значения были подвергнуты статистическому анализу посредством
анализа колебаний (ANOVA) для повторных измерений, в котором как фактор
"лечения", так и повторное измерение (дни) были значимыми с $p < 0,01$ (не менее).
Животные, лечение которых проводили с использованием MNAC13, достоверно
20 отличались от контрольных до последнего дня наблюдения (31), с 5 дня (большая
доза MNAC13) или с 7 дня (меньшая доза MNAC13). Животные, лечение которых
проводили с использованием α D11, достоверно отличались от контрольных до
последнего дня наблюдения (31), с 4 дня до 14 дня и с 21 дня до 31 дня.

25 Фигура 6: Сравнение влияния исходной (α D11) и гуманизированной (Hu- α D11,
формат IgG4 человека) версии анти-NGF нейтрализующего антитела (1 тестируемая
доза: 2 мг/кг) на нейропатическую боль: механическую аллодинию измеряли с
помощью динамического плантарного эстезиометра; мышцей CD1 подвергали CCI
(хроническое повреждение посредством сдавливания) седалищного нерва; антитела
30 вводили внутривентрально на 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 дни после повреждения седалищного
нерва. Период наблюдения: с 3 дня до 31 дня. Для подтверждающего контроля
использовали крысиные иммуноглобулины (IgG, 2 мг/кг). Результаты выражали в %
(соотношение между пороговой силой задней лапы, ипсилатеральной к поражению и
контралатеральной задней лапы). Анализ колебаний (ANOVA) для повторных
35 измерений соответствующих абсолютных значений, в котором как фактор "лечения",
так и повторное измерение (дни) были значимы с (не менее) $p < 0,01$. Животные, лечение
которых проводили с использованием как α D11, так и Hu- α D11, достоверно
отличались от контрольных до последнего дня наблюдения (31), с 4 дня до 14 дня, а
40 также с 21 дня до 31 дня.

МЕТОДЫ

Получение моноклональных антител

Моноклональные антитела MNAC13 и α D11 получали из супернатанта гибридомы
согласно стандартным методам, раскрытым выше (Galfre and Milstein, 1981; Cattaneo et
45 al., 1988; Cattaneo et al., 1999). Супернатант, содержащий каждое антитело, подвергали
преципитации (29% сульфат аммония), с последующим диализом против PBS IX
(Spectra-Por 12/14K мембрана, Spectrum), и аффинной хроматографии на колонке с
белком G сефарозы (4-Fast Flow, Amersham Biosciences). Элюирование осуществляли с
50 помощью раствора с низким pH (HCl 5 mM), который нейтрализовали после забора.
Конечный элюат концентрировали (Amicon Ultra-15, 50K, Millipore) с получением
препаратов очищенного антитела в концентрациях от 1 до 5 мг/мл.

Fab (фрагменты, связывающие антиген) версию α D11 получали, как предварительно

описано (заявка на патент WO 05/061540, Covaceuszach et al., 2004). Кратко, Fab фрагменты получали из соответствующих целых моноклональных антител (формат IgG) папаиновым протеолизом с последующей стадией очистки методом ионообменной хроматографии и концентрации Fab фрагментов, собранных в потоке.

Для отделения Fab фрагментов от очень небольшого количества нерасщепленного IgG, который все еще присутствовал, осуществляли гель-проникающую хроматографию на колонке Superdex G75 (Pharmacia), используя систему FPLC (Pharmacia), с последующей конечной стадией концентрирования.

Поскольку рассматривались гуманизированные версии (IgG1/IgG1*/IgG4) 2 антител (Hu- α D11 и Hu-MNAC13), их также очищали, как раскрыто выше, начиная с супернатантов, устойчиво инфицированных вирусом линий клеток, которые были устойчивыми котрансфектантами для тяжелой цепи (pVH/CMVexpress) и легкой цепи (pVL/CMVexpress) каждого антитела. Используемые векторы были раскрыты ранее (заявка на патент WO 05/061540). Устойчивые котрансфицированные клоны получали посредством двойной селекции с G418 и микофеноловой кислотой. Для получения варианта IgG4 Hu- α D11, поскольку вектор pVH/CMVexpress включает константную часть IgG1 человека, он был замещен соответствующей Fc областью IgG4 (клонированной с помощью ОТ-ПЦР (RT-PCR) от РНК лимфоцита человека). Вариант IgG1* (=IgG1 с мутацией N297A, описанной Bolt et al., 1993) получали сайт-направленным мутагенезом.

Исследования поверхностного плазмонного резонанса

Эксперименты выполняли на чипах CM5 со связыванием амина, используя аппарат BIAcore 2000. Связывание выполняли со специфическим набором, поставляемым BIAcore, и реакцию связывания осуществляли согласно инструкциям изготовителя. Антитела анти-NGF иммобилизовали на чипе, тогда как мышинный NGF (m-NGF, Alomone) или рекомбинантный мышинный proNGF (rm-proNGF) вводили в уменьшающихся концентрациях для получения кривых связывания.

Поток, применяемый в экспериментах, составлял 30 мкл/мин, если не указано иное. Регенерацию чипа проводили во всех случаях с пульсом (10 мкл) на 10 мМ глицина pH 1,5. Полученные данные анализировали, применяя Package BIAevaluation 3.0. Константу кажущегося равновесия K_D определяли как соотношение k_a/k_d .

Эксперименты на мышинных моделях боли

Животных обрабатывали и обслуживали в соответствии с рекомендациями Этического Комитета IASP и итальянского федерального законодательства (DL116/92, заявка Европейского Направления 86/609/ЕЕС) по использованию животных в исследовании. Было предпринято каждое необходимое усилие, чтобы минимизировать страдание животных и использовать минимальное количество животных, требуемых для получения достоверных научных данных.

Тест с формалином

Для предварительных тестов с формалином (Porro and Cavazzuti, 1993) использовали самцов мышей CD1 (Charles River Labs, Como, Italy), имеющих вес в начале экспериментов 35-40 г. При их доставке в лабораторию (по меньшей мере за 2 недели до экспериментов) мышей помещали в стандартную прозрачную пластиковую клетку (4 на клетку) при постоянной температуре ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) и относительной влажности (60%), под регулярным режимом освещения-темноты (освещение 7.00-19.00). Пища и вода были в неограниченном количестве. Эксперименты проводили между 09.00 и 14.00 часами. Для теста с формалином одно животное за один раз помещали в прозрачную клетку из плексигласа (30×12×13 см) и позволяли свободно

двигаться в течение 30 минут перед началом теста. После этого периода адаптации в дорсальную поверхность правой задней лапы мышей подкожно (sc) вводили 20 мкл раствора формалина (5% в солевом растворе), используя микрошприц с иглой 26 размера, и начинали период наблюдения. Позади клетки помещали зеркало, а перед клеткой видеокамеру для возможности беспрепятственного обзора задних лап животного. Активность облизывания, то есть общее количество времени, которое животное тратило на облизывание и/или захватывание лапы, в которую произвели инъекцию, использовали как индекс боли. Активность облизывания регистрировали непрерывно в течение 40 минут и вычисляли в блоках последовательных 5-минутных периодов (фаза 2 соответствует блоку 15-40 минут и может быть идентифицирована болью, связанной с воспалением). Кроме того, чтобы оценить влияние инъекции формалина на спонтанное поведение, на протяжении теста с формалином также непрерывно в течение 40 мин записывали общую активность (время, затраченное на исследование окружающей территории во время ходьбы, подъема на задние лапы и наклонов) и самостоятельный уход (время, потраченное на умывание и чистку тела). После лечения анти-NGF антителами не наблюдалось никаких значимых различий этих параметров. В этой серии экспериментов антитела вводили в виде Fab (фрагменты, связывающие антиген; однократная доза каждого антитела: 12,5 мкг на животное).

Каждой мышке за 45 минут перед тестом подкожно (sc) вводили анти-NGF антитело (либо исходное, либо гуманизованное) или несоответствующий Fab в дорсальную поверхность правой задней лапы, используя микрошприц Hamilton с иглой 26 размера (вводимый объем = 20 мкл). Каждое животное подвергали только одному лечению. Тестирование выполняли вслепую, как для группы лечения, к которой принадлежал каждый субъект. Эти две фазы, характеризующие тест с формалином, отдельно анализировали с помощью односторонних ANOVA.

Хирургическая обработка седалищного нерва

Самцов мышей CD1, имеющих вес приблизительно 35 г, обезболивали (интраперитонеальная инъекция 500 мг/кг хлоральгидрата), седалищный нерв правой задней конечности подвергали воздействию свободной лигатуры с помощью наложения нити согласно модели хронического поражения посредством сдавливания (CCI) седалищного нерва, раскрытой Bennett и Xie (1988). Свободная лигатура седалищного нерва на уровне верхнего отдела бедра индуцировала периферическую мононейропатию, характеризующуюся тепловой/механической аллодинией и гипералгезией. При перевязке нерва в 3 различных, но близко расположенных местах невропатия полностью развивалась через 3 дня после поражения и длилась в течение 2-3 месяцев.

Фармакологическое лечение

Фармакологическое лечение начинали с третьего дня после повреждения, анти-NGF (α D11) блокирующие антитела или анти-TrkA (MNA13) антитела вводили в полной форме (Mab), которые были разбавлены в физиологическом растворе (носитель), как показано в таблице 1. В качестве контролей использовали мышинные или крысиные несоответствующие иммуноглобулины (IgG) в той же дозе, что и блокирующие антитела (в большей дозе, если применяли 2 дозы), или физиологический раствор. Каждая экспериментальная группа включала 10 животных (если явно не указано иное).

Таблица 1 Протоколы введения и определение механической аллодинии
--

Антитело	Доза	Внутрибрюшинное введение	Измерение аллодинии
MNAC13 α D11	50 мкг/мышь = 1,4 мг/кг	4, в дни 3, 4, 5, 6 после повреждения	Дни с 3 по 14
MNAC13 α D11	70 мкг/мышь = 2 мг/кг	8, в дни 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 после повреждения	Дни с 3 по 31
MNAC13	30 мкг/мышь = 0,9 мг/кг		

5

Механическую аллодинию измеряли с помощью плантарного динамического эстезиометра (Ugo Basile), как указано в таблице 1. День 3 считали началом отсчета.

Те же протоколы применяли для оценки анальгезического действия гуманизированных версий двух антител MNAC13 и α D11.

10

Статистический анализ результатов (эксперименты ССИ)

Результаты выражали 2 различными способами, оба в виде абсолютного значения порогового значения силы (в граммах), которой было достаточно для животного, чтобы оттянуть заднюю конечность, которая является ипсилатеральной к поражению, или в процентном значении в виде соотношения между абсолютными значениями задних конечностей (ипсилатеральных/контралатеральных). Значения были подвергнуты статистическому анализу посредством анализа колебания (ANOVA) для повторных измерений, в котором как фактор "лечения", так и повторное измерение (дни) были значимыми с $p < 0,01$.

15

20

РЕЗУЛЬТАТЫ

Связывание

Было выполнено исследование BIACORE, направленное на дальнейшее получение характеристик связующих свойств α D11 анти-NGF антитела (и его гуманизированного варианта), посредством оценки сродства связывания этого антитела с мышинным NGF и рекомбинантным мышинным pro-NGF. На фиг.1 показаны результаты этих экспериментов: α D11 антитело связывается с NGF и proNGF с различной кинетикой. Подобные результаты были также получены с Hu- α D11.

25

30

Очень малая константа диссоциации с NGF является показателем очень прочного связывания антитела с его антигеном и является весьма уникальным примером среди кинетик связывания антител. При сравнении связывания анти-NGF антитела с NGF и с proNGF можно определить, что в последнем случае сродство почти на три порядка величины ниже (наномолярное вместо пикомолярного). Поскольку proNGF отличается от NGF только коротким участком дополнительных аминокислот, это различие в сродстве связывания является абсолютно неожиданным и удивительным.

35

40

Поскольку proNGF предпочтительно связывается с p75 (Lee, 2001), тогда как зрелый NGF имеет более высокое сродство к рецептору TrkA, α D11 и Hu α D11 можно рассматривать как новые ингибиторы TrkA-опосредованного пути, действующие селективно, что является замечательным свойством, которое имеет специфическую значимость ввиду клинического применения анти-NGF нейтрализующих антител.

Воспалительная боль

Первая серия экспериментов *in vivo*, выполненных на мышах и затрагивающих боль, вызванную формалином (воспалительная боль), демонстрирует, что:

45

- (i) α D11 анти-NGF антитело (в формате Fab) способно значительно уменьшать болевую реакцию (тест с формалином: 2 фаза) по сравнению с несоответствующим Fab;
- (ii) похожий результат мог быть получен с помощью замены α D11 его гуманизированным вариантом (Hu- α D11, фиг.2).

50

Это означает, что Hu- α D11 проявляет такие же мощные анальгезические свойства, как и α D11 в соответствующей модели воспалительной боли.

Нейропатическая боль

Результаты на модели ССИ показали, что два блокирующих антитела MNAC13 и

α D11 (фиг.3 и фиг.4) оказывают значительный анальгезический эффект. В частности, подобный результат наблюдался для этих двух антител в дозе 1,4 мг/кг. Как показано на фиг.3 и фиг.4, они начинают оказывать анальгезический эффект со второго дня после введения (день 4), достигая максимального эффекта около 6 дня, сохраняя в основном такую же анальгезическую эффективность в течение всей продолжительности наблюдения до 14 дня. Выражая результат в процентах (соотношение между пороговой силой задней лапы, ипсилатеральной к повреждению, и соответствующей контралатеральной задней лапы), как на фиг.4, можно утверждать, что для каждого из двух блокирующих антител максимальное значение в процентах составляло приблизительно 60%, составляя приблизительно 40% для контрольных групп (IgG и солевой раствор).

При наблюдении животных в течение 4 недель, до 31 дня, введение антител, блокирующих систему NGF-TrkA (фиг.5 и фиг.6), показало двухфазный эффект. Первая фаза анальгезического эффекта (с 3 дня по 17 день, то есть в течение недели после последней инъекции) характеризовалась максимальным эффектом на 11-12 дни. После снижения эффекта (до дня 17) наблюдалась вторая анальгезическая фаза с увеличением эффекта до 31 дня. Таким образом, можно различить две фазы в анальгезическом воздействии блокирующих антител NGF/TrkA: первая ("фармакологический" эффект), которая включает период лечения и первую неделю после последней инъекции антитела (неделя, в течение которой эффект уменьшается параллельно с концентрацией антитела в крови); вторая, которая определяет продолжительный эффект, вероятно, требующая новой генной экспрессии, которая является эффектом, который придает этим антителам уникальное свойство (в области нейропатической боли), выражающееся в том, что они являются "модифицирующим заболеванием" действующим началом, то есть способным глубоко изменять течение заболевания, в отличие от продуктов, применяемых в этом терапевтическом контексте в настоящее время, которые демонстрируют простое фармакологическое воздействие на симптомы. На фиг.5 анальгезический эффект 2 доз MNAC13 анти-TrkA (2 и 0,9 мг/кг) сравнивается с таковым для α D11 (2 мг/кг). Результаты выражены в процентах. Темпоральный профиль эффективности α D11 подобен таковому для MNAC13 несмотря на то, что на 17 день животные, которых подвергали лечению с применением α D11, были неотличимы от контрольных (IgG), тогда как все, которые подвергались лечению с применением MNAC13, все еще значительно отличались ($p < 0,01$). На 21 день анальгезический эффект α D11 сохранялся и достигал конечного уровня (день 31), который был подобен таковому для MNAC13 (более 60% по сравнению с 40% для контролей).

По существу идентичные показанным выше результаты были получены, когда вместо антитела α D11 применяли варианты его гуманизированной версии (Hu- α D11) (применяемая доза: 2 мг/кг для каждого антитела), подтверждая, что последние обладают такими же анальгезическими свойствами, как и исходная версия. Антитело было гуманизировано по способу WO 2005/061540, варьируемыми областями как легких (SEQ ID No. 3), так и тяжелых цепей (SEQ ID No. 4). Для создания целых гуманизированных антител использовали различные константные области, как описано выше (SEQ ID No. 5-8).

В качестве типичного примера эквивалентности относительно анальгезической активности (CCI) исходных и гуманизированных антител на фиг.6 показано сравнение между α D11 и Hu- α D11 (формат IgG4).

Исходя из этого можно утверждать, что Hu- α D11 имеет такой же продолжительный

эффект, как и его исходная версия.

БИБЛИОГРАФИЯ

Bennett GJ, Xie YK (1988). *Pain* 33:87-107.

Berardi N, Cellerino A, Domenici L, Fagiolini M, Pizzorusso T, Cattaneo A, Maffei L (1994)
5 Proc Natl Acad Sci U S A 91:684-688.

Bolt S, Routledge E, Lloyd I, Chatenoud L, Pope H, Gorman SD, Clark M, Waldmann H
(1993) *Eur J Immunol* 23: 403-411.

Burnstock G (2001) *Trends Pharmacol Sci* 22:182-188.

10 Capsoni S, Ugolini G, Comparini A, Ruberti F, Berardi N, Cattaneo A (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6826-6831.

Cattaneo A, Rapposelli B, Calissano P (1988) *J Neurochem* 50:1003-1010.

Cattaneo A, Capsoni S, Margotti E, Righi M, Kontsekova E, Pavlik P, Filipcik P, Novak M
(1999) *J Neurosci* 19:9687-9697.

15 Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D
(2001) *Nature* 411:957-962.

Covaceuszach S, Cattaneo A, Lamba D (2001) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57:1307-1309.

20 Covaceuszach S, Cassetta, A., Cattaneo A, Lamba D (2004) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60:1323-1327.

Covaceuszach S, Cattaneo A, Lamba D (2005) *Proteins* 58:717-727.

Djoughri L, Dawbarn D, Robertson A, Newton R, Lawson SN (2001) *J Neurosci* 21:8722-8733.

Frade JM, Barde YA (1998) *Bioessays* 20:137-145.

25 Galfre G, Milstein C (1981) *Methods Enzymol* 73:3-46.

Gonfloni S (1995) *Recombinant antibodies as structural probes for neurotrophins*. SISSA PhD Thesis.

Harpf C, Dabernig J, Humpel C (2002) *Muscle Nerve* 25:612-615.

30 Hempstead BL (2002) *Curr Opin Neurobiol* 12:260-267.

Holtzman DM, Li Y, Parada LF, Kinsman S, Chen CK, Valletta JS, Zhou J, Long JB, Mobley WC (1992) *Neuron* 9:465-478.

Horigome K, Pryor JC, Bullock ED, Johnson EM, Jr. (1993) *J Biol Chem* 268:14881-14887.

Hunt SP, Mantyh PW (2001) *Nat Rev Neurosci* 2:83-91.

35 Indo Y (2001) *Hum Mutat* 18:462-471.

Indo Y, Tsuruta M, Hayashida Y, Karim MA, Ohta K, Kawano T, Mitsubuchi H, Tonoki H, Awaya Y, Matsuda I (1996) *Nat Genet* 13:485-488.

Indo Y, Mardy S, Miura Y, Moosa A, Ismail EA, Toscano E, Andria G, Pavone V, Brown DL,
40 Brooks A, Endo F, Matsuda I (2001) *Hum Mutat* 18:308-318.

Julius D, Basbaum AI (2001) *Nature* 413:203-210.

Kaplan DR (1998) *Prog Brain Res* 117:35-46.

Kawamoto K, Aoki J, Tanaka A, Itakura A, Hosono H, Arai H, Kiso Y, Matsuda H (2002) *J Immunol* 168:6412-6419.

45 Khakh BS (2001) *Nat Rev Neurosci* 2:165-174.

Kryger GS, Kryger Z, Zhang F, Shelton DL, Lineaweaver WC, Buncke HJ (2001) *J Hand Surg [Am]* 26:635-644.

Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001) *Science* 294:1945-1948.

50 Levi-Montalcini R (1987) *Science* 237:1154-1162.

Levi-Montalcini R, Skaper SD, Dal Toso R, Petrelli L, Leon A (1996) *Trends Neurosci* 19: 514-520.

Levine JD (1998) *Neuron* 20:649-654.

- Molnar M, Ruberti F, Cozzari C, Domenici L, Cattaneo A (1997) *Neuroreport* 8:575-579.
- Molnar M, Tongiorgi E, Avignone E, Gonfloni S, Ruberti F, Domenici L, Cattaneo A (1998) *Eur J Neurosci* 10:3127-3140.
- Morisset V, Ahluwalia J, Nagy I, Urban L (2001) *Eur J Pharmacol* 429:93-100.
- 5 Nakatsuka T, Furue H, Yoshimura M, Gu JG (2002) *J Neurosci* 22:1228-1237.
- Nilsson G, Forsberg-Nilsson K, Xiang Z, Hallbook F, Nilsson K, Metcalfe DD (1997) *Eur J Immunol* 27:2295-2301.
- Porro CA, Cavazzuti M (1993) Spatial and temporal aspects of spinal cord and brainstem
10 activation in the formalin pain model. *Prog Neurobiol* 41: 565-607.
- Pesavento E, Margotti E, Righi M, Cattaneo A, Domenici L (2000) *Neuron* 25:165-175.
- Ruberti F, Capsoni S, Comparini A, Di Daniel E, Franzot J, Gonfloni S, Rossi G, Berardi N, Cattaneo A (2000) *J Neurosci* 20:2589-2601.
- Saper CB, German DC, White CL, 3rd (1985) *Neurology* 35:1089-1095.
- 15 Saragovi HU, Gehring K (2000) *Trends Pharmacol Sci* 21:93-98.
- Sevcik MA, Ghilardi JR, Peters CM, Lindsay TH, Halvorson KG, Jonas BM, Kubota K, Kuskowski MA, Boustany L, Shelton DL, Mantyh PW (2005) *Pain* 115:128-141.
- Shu X, Mendell LM (1999) *Neurosci Lett* 274:159-162.
- 20 Sivilotti L, Nistri A (1991) *Prog Neurobiol* 36:35-92.
- Woolf CJ, Ma QP, Allchorne A, Poole S (1996) *J Neurosci* 16:2716-2723.
- Zhu Z, Friess H, diMola FF, Zimmermann A, Graber HU, Korc M, Buchler MW (1999) *J Clin Oncol* 17:2419-2428.

25 Формула изобретения

1. Применение анти-NGF антитела изотипа IgG4, способного ингибировать связывание между NGF и TrkA, для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики хронической боли.

30 2. Применение по п.1, в котором антитело способно распознавать и связываться с доменом молекулы NGF, содержащим область аминокислот 41-49 человеческого или крысиного NGF:

EVNINNSVF (SEQ ID No. 9).

35 3. Применение по п.1, в котором антитело способно распознавать и связываться с доменом молекулы NGF, содержащим область аминокислот 23-35: GDKTTATDIKGKE (SEQ ID No. 10).

40 4. Применение по п.2, в котором антитело способно распознавать и связываться с доменом молекулы NGF, содержащим область аминокислот 23-35: GDKTTATDIKGKE (SEQ ID No. 10).

5. Применение по любому из предыдущих пунктов, в котором антитело способно блокировать биологическую активность TrkA.

6. Применение по любому из пп.1-4, в котором переменная область легкой цепи антитела содержит по меньшей мере одну из определяющих комплементарность
45 областей (CDR), имеющих следующие последовательности: от аминокислоты 24 до аминокислоты 34 SEQ ID No. 1; от аминокислоты 50 до аминокислоты 56 SEQ ID No. 1; и от аминокислоты 89 до аминокислоты 97 SEQ ID No. 1.

50 7. Применение по любому из пп.1-4, в котором переменная область легкой цепи антитела содержит по меньшей мере две из определяющих комплементарность областей (CDR), имеющих следующие последовательности: от аминокислоты 24 до аминокислоты 34 SEQ ID No. 1; от аминокислоты 50 до аминокислоты 56 SEQ ID No. 1; и от аминокислоты 89 до аминокислоты 97 SEQ ID No. 1.

8. Применение по любому из пп.1-4, в котором переменная область легкой цепи антитела содержит все три определяющих комплементарность области (CDR), имеющие следующие последовательности: от аминокислоты 24 до аминокислоты 34 SEQ ID No. 1; от аминокислоты 50 до аминокислоты 56 SEQ ID No. 1; и от аминокислоты 89 до аминокислоты 97 SEQ ID No. 1.

9. Применение по любому из пп.1-4, в котором переменная область легкой цепи антитела содержит последовательность SEQ ID No. 1.

10. Применение по любому из пп.1-4, в котором переменная область тяжелой цепи антитела содержит по меньшей мере одну из определяющих комплементарность областей (CDR), имеющих следующие последовательности: от аминокислоты 26 до аминокислоты 35 SEQ ID No. 2; от аминокислоты 50 до аминокислоты 65 SEQ ID No. 2; и от аминокислоты 98 до аминокислоты 111 SEQ ID No. 2.

11. Применение по любому из пп.1-4, в котором переменная область тяжелой цепи антитела содержит по меньшей мере две из определяющих комплементарность областей (CDR), имеющих следующие последовательности: от аминокислоты 26 до аминокислоты 35 SEQ ID No. 2; от аминокислоты 50 до аминокислоты 65 SEQ ID No. 2; и от аминокислоты 98 до аминокислоты 111 SEQ ID No. 2.

12. Применение по любому из пп.1-4, в котором переменная область тяжелой цепи антитела содержит все три определяющих комплементарность области (CDR), имеющие следующие последовательности: от аминокислоты 26 до аминокислоты 35 SEQ ID No. 2; от аминокислоты 50 до аминокислоты 65 SEQ ID No. 2; и от аминокислоты 98 до аминокислоты 111 SEQ ID No. 2.

13. Применение по любому из пп.1-4, в котором переменная область тяжелой цепи антитела содержит последовательность SEQ ID No. 2.

14. Применение по п.1, в котором переменная область легкой цепи антитела содержит последовательность SEQ ID No. 1, и переменная область тяжелой цепи антитела содержит последовательность SEQ ID No. 2.

15. Применение по п.14, в котором антитело находится в форме одиночной цепи и содержит переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, соединенные линкером.

16. Применение по п.14, в котором антитело содержит две легких цепи и две тяжелых цепи.

17. Применение по любому из пп.1-4, в котором анти-NGF антитело является человеческим или гуманизированным антителом.

18. Применение по п.14, в котором анти-NGF антитело является человеческим или гуманизированным антителом.

19. Применение по п.15, в котором анти-NGF антитело является человеческим или гуманизированным антителом.

20. Применение по п.16, в котором анти-NGF антитело является человеческим или гуманизированным антителом.

21. Применение по пп.18-20, в котором переменная область легкой цепи гуманизованного антитела содержит последовательность SEQ ID No. 3.

22. Применение по пп.18-20, в котором переменная область тяжелой цепи гуманизованного антитела содержит последовательность SEQ ID No. 4.

23. Применение по пп.18-20, в котором переменная область легкой цепи гуманизованного антитела содержит последовательность SEQ ID No. 3, и переменная область тяжелой цепи гуманизованного антитела содержит последовательность SEQ ID No. 4.

24. Применение по п.23, в котором легкая цепь гуманизованного антитела имеет последовательность SEQ ID No. 8.

25. Применение по п.23, в котором тяжелая цепь гуманизованного антитела имеет последовательность SEQ ID No. 7.

26. Применение по п.23, в котором легкая цепь гуманизованного антитела имеет последовательность SEQ ID No. 8, и тяжелая цепь гуманизованного антитела имеет последовательность SEQ ID No. 7.

27. Применение по любому из пп.1-4, 14-16 или 18-20, в котором боль имеет хронический воспалительный тип.

28. Применение по п.26, в котором боль имеет хронический воспалительный тип.

29. Применение по п.27, в котором хроническая боль вызвана панкреатитом, почечными камнями, головными болями, дисменореей, скелетно-мышечной болью, растяжениями связок, висцеральной болью, кистами яичника, простатитом, циститом, интерстициальным циститом, послеоперационной болью, мигренью, невралгией тройничного нерва, болью от ожогов и/или ран, болью, связанной с травмой, нейропатической болью, болью, связанной со скелетно-мышечными заболеваниями, ревматоидным артритом, остеоартритом, анкилозирующим спондилитом, патологиями околосуставных тканей, онкологической болью, болью от костных метастазов, болью от ВИЧ.

30. Применение по п.28, в котором хроническая боль вызвана панкреатитом, почечными камнями, головными болями, дисменореей, скелетно-мышечной болью, растяжениями связок, висцеральной болью, кистами яичника, простатитом, циститом, интерстициальным циститом, послеоперационной болью, мигренью, невралгией тройничного нерва, болью от ожогов и/или ран, болью, связанной с травмой, нейропатической болью, болью, связанной со скелетно-мышечными заболеваниями, ревматоидным артритом, остеоартритом, анкилозирующим спондилитом, патологиями околосуставных тканей, онкологической болью, болью от костных метастазов, болью от ВИЧ.

31. Применение по любому из пп.1-4, 14-16, 18-20 или 29, в котором боль является нейропатической болью.

32. Применение по любому из пп.26, 28 или 30, в котором боль является нейропатической болью.

33. Применение по любому из пп.1-4, 14-16, 18-20 или 29, в котором боль является онкологической болью.

34. Применение по любому из пп.26, 28 или 30, в котором боль является онкологической болью.

35. Применение по п.33, в котором онкологическая боль является болью от костных метастазов.

36. Применение по п.34, в котором онкологическая боль является болью от костных метастазов.

37. Применение по любому из пп.1-4, 14-16, 18-20 или 29, в котором указанное антитело имеет длительную продолжительность действия, которое остается выраженным в течение по меньшей мере одной недели после последнего введения антитела.

38. Применение по любому из пп.26, 28 или 30, в котором антитело имеет длительную продолжительность действия, которое остается выраженным в течение по меньшей мере одной недели после последнего введения антитела.

39. Способ лечения или профилактики хронической боли у субъекта, нуждающегося

в таком лечении, включающий введение указанному субъекту эффективного количества анти-NGF антитела, как раскрыто в любом из пп.1-38, для лечения посредством этого хронической боли у указанного субъекта.

5 40. Способ по п.39, в котором указанное антитело вводят с частотой не более одного раза в неделю.

41. Способ лечения или профилактики хронической боли у субъекта, нуждающегося в таком лечении, включающий введение указанному субъекту эффективного количества анти-NGF антитела, способного ингибировать связывание между NGF
10 и TrkA, где указанное антитело вводят указанному субъекту с частотой не более одного раза в четыре недели.

15

20

25

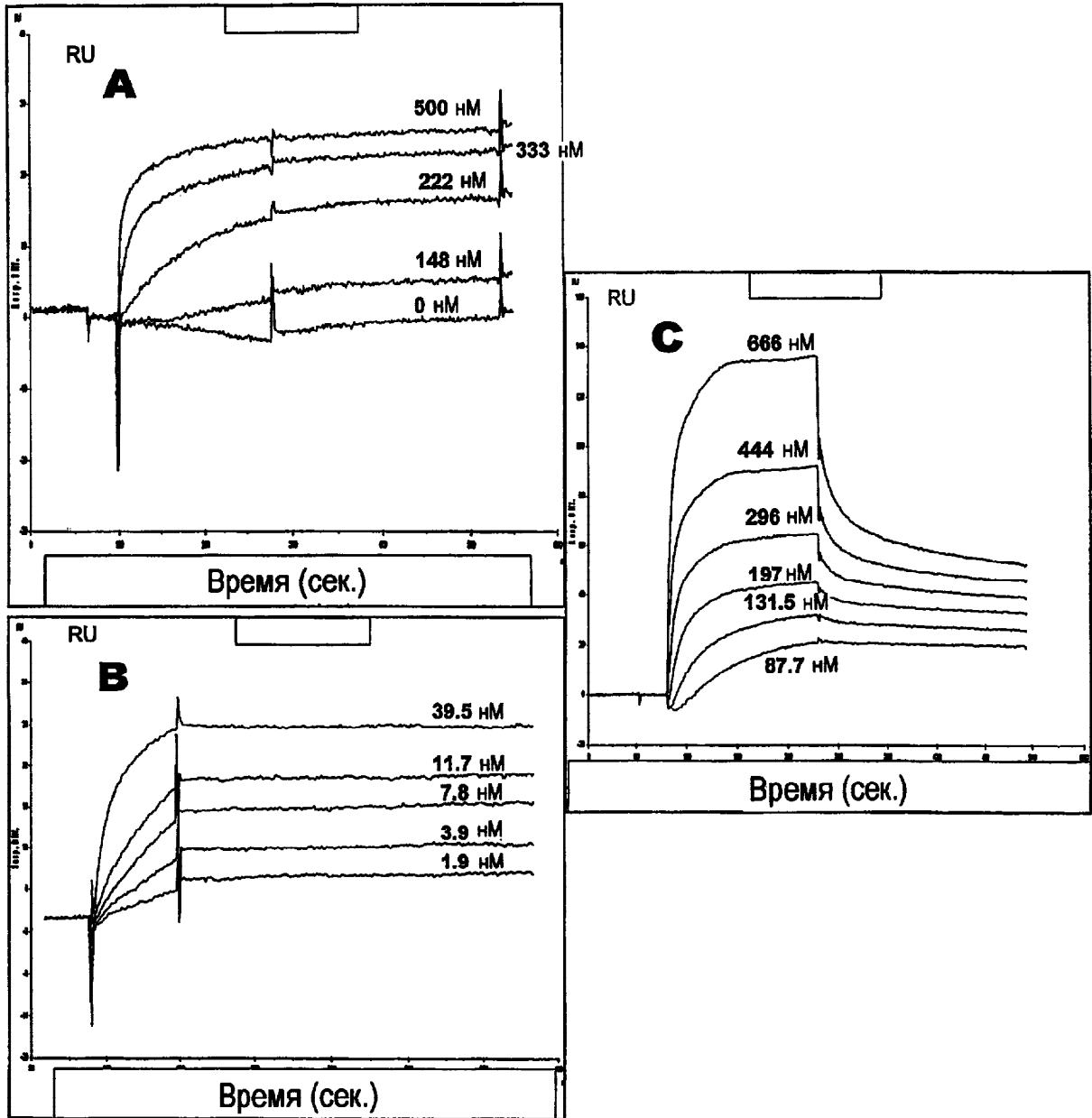
30

35

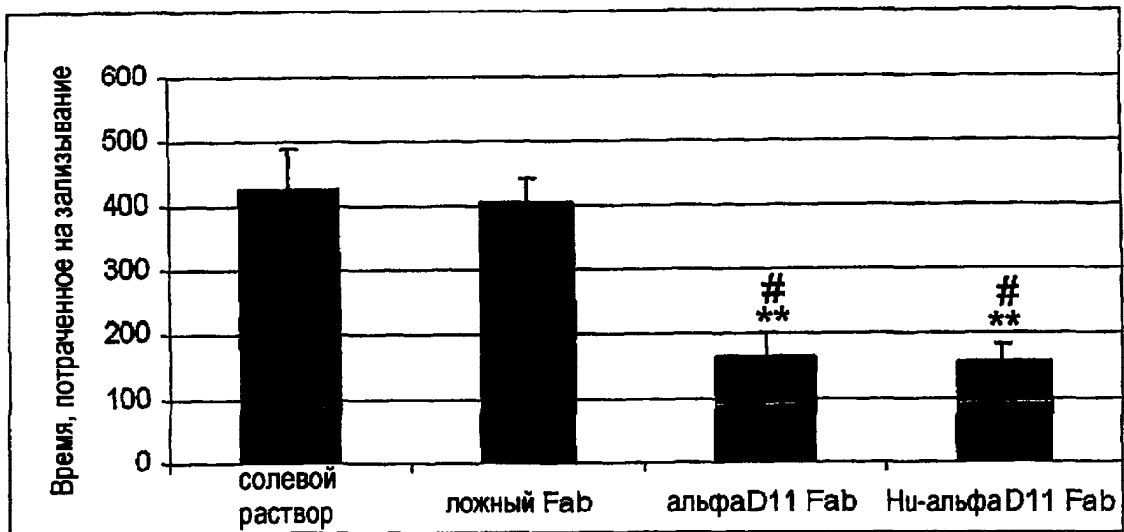
40

45

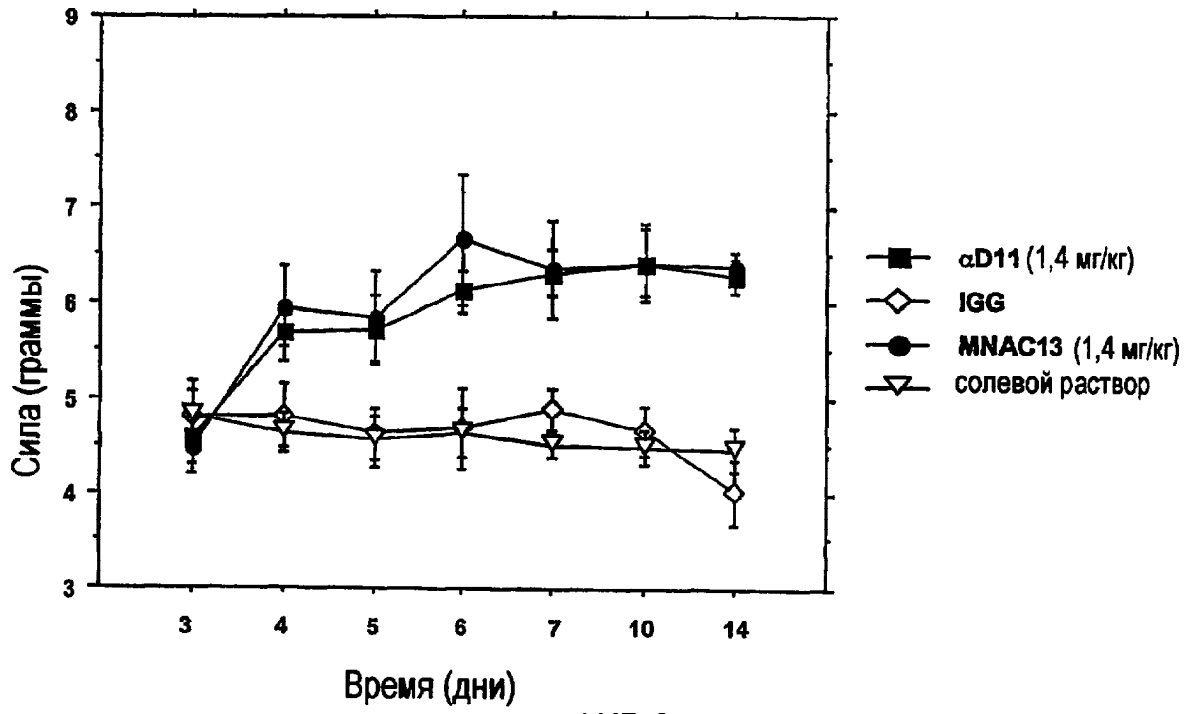
50



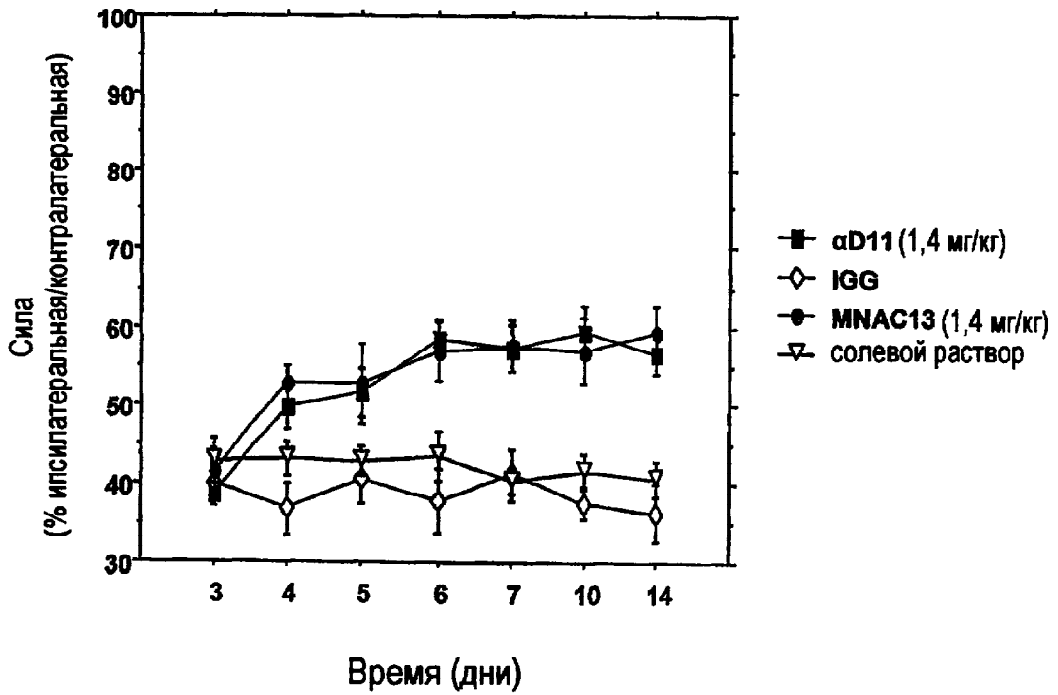
ФИГ. 1



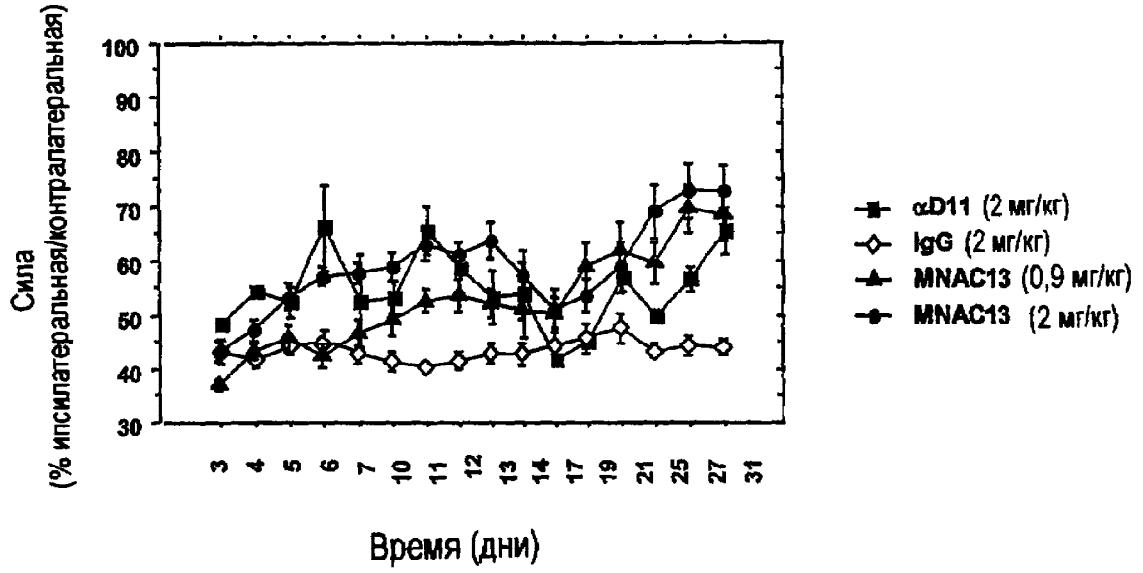
ФИГ. 2



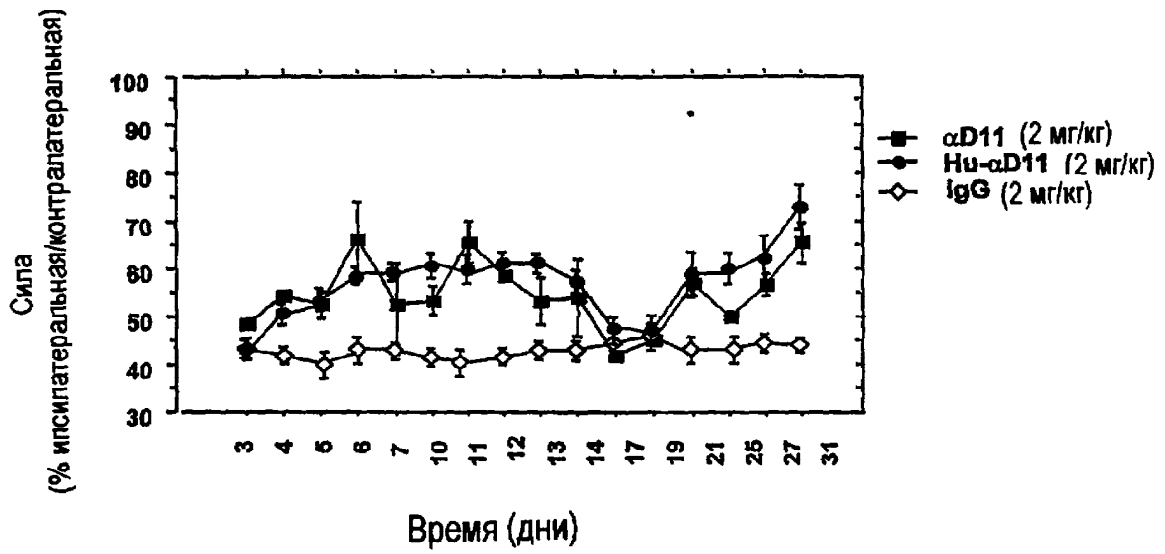
ФИГ. 3



ФИГ. 4



ФИГ. 5



ФИГ. 6