



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 123209

(13) C2

(51) МПК

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/04 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО  
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ"

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2017 12706	(72) Винахідник(и):	Танака Хіроцугу (JP), Фудзіта Хіроада (JP), Аокі Тосіакі (JP)
(22) Дата подання заявки:	20.05.2016	(73) Володілець (володільці):	АСТЕЛЛАС ФАРМА ІНК., 5-1, Nihonbashi-Honcho 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 1038411, Japan (JP)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	04.03.2021	(74) Представник:	Кузьменко Сергій Юрійович, реєстр. №283
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	2015-104806	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2013022083 A1, 14.02.2013 JP 2014150761 A, 25.08.2014 JP 2012504106 A, 16.02.2012 Liu H. et al. Heterogeneity of monoclonal antibodies. J. pharm. sci., 2008, vol. 97, no. 7, p. 2426 - 2447 Humphreys D. P. et al. Formation of dimeric Fabs in Escherichia coli: effect of hinge size and isotype, presence of interchain disulphide bond, Fab' expression levels, tysl piece sequences and growth conditions. J. immunol. methods, 1997, vol. 209, no. 2, p. 193 - 202 US 2014227287 A1, 14.08.2014 EP 2743348 A1, 18.06.2014 Callegaro L. et al. Purification and characterization of fab fragments from anti - mouse NGF polyclonal antibodies. Journal of molecular recognit, 1990, vol. 3, no. 5-6, p.187 - 191
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	22.05.2015		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	JP		
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.04.2018, Бюл.№ 8		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	03.03.2021, Бюл.№ 9		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/JP2016/065099, 20.05.2016		

## (54) Fab-ФРАГМЕНТ АНТИТІЛА ДО ЛЮДСЬКОГО NGF

### (57) Реферат:

Винахід стосується Fab-фрагмента антитіла до людського NGF, полінуклеотиду, що його кодує, експресуючого вектора, клітини-хазяїна, способу одержання даного Fab-фрагмента. Винахід також стосується застосування Fab-фрагмента антитіла до людського NGF для створення фармацевтичної композиції для місцевого введення для лікування післяопераційного болю та фармацевтичної композиції, що містить такий Fab-фрагмент.

UA 123209 C2



## ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

Даний винахід належить до нового Fab-фрагмента антитіла до людського NGF. Даний винахід також належить до полінуклеотиду, який містить послідовність основ, що кодує Fab-фрагмент антитіла до людського NGF, експресуючого вектора, що включає полінуклеотид, і клітини-хазяїна, трансформованої експресуючим вектором, і до способу одержання Fab-фрагмента антитіла до людського NGF. Даний винахід додатково належить до фармацевтичної композиції, що містить Fab-фрагмент антитіла до людського NGF, і до способу лікування післяопераційного болю з використанням Fab-фрагмента антитіла до людського NGF.

## ПОПЕРЕДНІЙ РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Фактор росту нервів (NGF) є одним з гуморальних факторів, як правило, що називаються "нейротрофічні фактори", і відіграє важливу роль в утворюванні і диференціюванні нейронів і в підтримці функцій нейронів в організмі. Високоафінний trkA (тропоміозин-рецепторна кіназа A) і низькоафінний p75NTR (рецептор p75 нейротрофіну) відомі як рецептори NGF. Відносно до них, є дані, в яких повідомляють, що p75NTR зв'язується з усіма нейротрофічними факторами і бере участь в апоптозі в процесі утворювання нейронів. Однак, роль p75NTR ще недостатньо пояснена. Крім того, відомо, що миші, нокаутні по NGF і trkA, експресують такий же фенотип (NPL1), і вважається, що фізіологічна дія NGF виражається, в основному, через trkA.

Повідомлялося, що введення NGF викликає біль у щурів (NPL 2), і що внутрішньовенне введення NGF людині викликає м'язовий біль в усьому тілі, а місцеве нанесення NGF викликає гіпералгезію і алодінію в місці введення NGF, а також біль в усьому тілі (NPL 3). Відомо, що кількість NGF, що експресується у тварин, підвищується, коли тканини ушкоджені при розсіченні м'язової тканини (NPL 4) і шкірної тканини (NPL 5) у тварин, таких як щурині моделі післяопераційного болю. Що стосується патологічного стану болю у людини, було підтверджено, що експресія NGF і trkA прискорюється в суглобовому хрящі при остеоартриті (OA) (NPL6), що рівень NGF підвищується в ексудатах з ділянки розрізу, коли проводять кесарів розтин (NPL 7), і що рівень NGF підвищується у пацієнтів з ревматоїдним артритом (NPL 8) або інтерстиціальним циститом (NPL 9).

До теперішнього часу повідомлялося, що біль приглушується у різних моделей болю на тваринах, коли інгібується сигнал NGF (NPL 10, PTL з 1 до 3).

Дотепер були описані антитіла до NGF людини, REGN475 (PTL 2), 1-15(N52D-A)-Fab'-PEG (PTL 3), фультранумаб (PTL 4), і MEDI-578 (PTL 5) як повністю людські антитіла до NGF людини, і танезумаб (PTL 6) і PG110 (PTL 7) як гуманізовані антитіла до NGF людини. Відносно до них описано, що підшкірне введення танезумабу на додаток до його внутрішньовенного введення демонструє поширений аналгетичний вплив на біль, такий як артралгія, що супроводжує остеоартрит, хронічний хребетний біль, і цисталгія, що супроводжує інтерстиціальний цистит (NPL з 11 до 13) в клінічних умовах.

Було описано, що множина медичних препаратів демонструє побічні ефекти, і антитіла до NGF не є виключенням. У зв'язку з клінічними дослідженнями танезумабу (NPL 11) повідомлялося про побічні явища, пов'язані з введенням людині антитіла до NGF, такі як головні болі, інфекція верхніх дихальних шляхів, і парестезія; у зв'язку з клінічними дослідженнями фультранумабу (NPL 14 - сприйняття порушення, головні болі і ринофарингіт; і артралгія, гіперестезія, м'язовий біль, периферичний набряк, і суглобова грижа у зв'язку з клінічними дослідженнями REGN475 (NPL 15).

Загалом, коли лікарський засіб впливає на тканини, інші, ніж тканина-мішень, він викликає небажані для організму людини побічні ефекти в тканинах.

Звичайно розробляють фармацевтичні засоби для місцевого введення для профілактики або зниження побічних ефектів за рахунок підвищення концентрації в тканині в місці введення і за рахунок зниження впливу на інші тканини за допомогою системного кровотоку через безпосереднє введення в тканину-мішень.

Є багато терапевтичних антитіл, які можна вводити підшкірно або внутрішньом'язово на додаток до антитіл, які вводять шляхом внутрішньосудинного введення у вени і т. д. Після підшкірного або внутрішньом'язового введення, антитіла відразу ж переносяться у кров через лімфатичну систему, а потім циркулюють на всьому протязі тіла. Багато терапевтичних антитіл після перенесення у кров циркулюють у кровотоку для доставки в тканину-мішень, де вони проявляють фармакологічні ефекти. Додатково, багато терапевтичних антитіл демонструють переважне розподілення у крові, і низьке проникнення в тканину-мішень (співвідношення концентрацій в тканині/крові). Таким чином, висока концентрація багатьох терапевтичних антитіл у крові має бути істотною для підтримки ефективної концентрації в тканині-мішені (NPL 16). Крім того, багато терапевтичних антитіл мають напіввиведення у крові в діапазоні від декількох діб до місяця, і підтримують довгострокову стійку концентрацію у крові для

збереження фармакологічного впливу протягом тривалого періоду. Таким чином, навіть якщо звичайне терапевтичне антитіло вводять місцево, як підшкірне або внутрішньом'язове введення, воно все ще буде виробляти системний фармакологічний вплив/побічний ефект, залишаючись у крові і циркулюючи по всьому тілу.

5 Мультимеризація, включаючи димеризацію, стає серйозною проблемою при спробі гарантувати стабільну і однорідну якість в галузі біологічних препаратів, таких як терапевтичні антитіла.

Відомо, що  $F(ab')_2$ , який є димером  $Fab'$ , має фармакокінетику, що відрізняється від  $Fab'$  (NPL 17 і 18).

10 Повідомлялося, що природне антитіло проти  $F(ab')_2$ , який є димером  $Fab'$ , викликає видалення антитіла (NPL 19). Цей тип реакції антиген-антитіло порушує фармакокінетику фармацевтичного засобу таким чином, що антитіло видаляється набагато швидше, і також створює ризики реакції анафілаксії, і т. д. Як можна бачити, існують деякі ризики, пов'язані з  $F(ab')_2$ .

15 ДЖЕРЕЛА ІНФОРМАЦІЇ:

ПАТЕНТНА ЛІТЕРАТУРА

PTL 1: WO 2013/183032

PTL 2: WO 2009/023540

PTL 3: WO 2013/022083

20 PTL 4: WO 2005/019266

PTL 5: WO 2006/077441

PTL 6: WO 2004/058184

PTL 7: патент США № 8435523

НЕПАТЕНТНА ЛІТЕРАТУРА

25 NPL 1: "Reviews in the Neurosciences", 1997, Vol. 8, p.13-27

NPL 2: "The Journal of Neuroscience", 1993, Vol. 13, p. 2136-2148

NPL 3: "Annals of Neurology", 1994, Vol. 36, p. 244-246

NPL 4: "Anesthesiology", 2009, Vol. 110, p. 140-149

NPL 5: "Pain", 2005, Vol. 117, p. 68-76

30 NPL 6: "Rheumatology", 2002, Vol. 41, p. 1413-1418

NPL 7: "The Journal of Pain", 2008, Vol. 9, p. 650-657

NPL 8: "Clinical and Experimental Rheumatology", 1997, Vol. 15, p. 433-438

NPL 9: "British Journal of Urology", 1997, Vol. 79, p. 572-577

NPL 10: "Trends in Pharmacological Sciences", 2006, Vol. 27, p. 85-91

35 NPL 11: "The New England Journal of Medicine", 2010, Vol. 363, p. 1521-1531

NPL 12: "The Journal of Urology", 2011, Vol. 185, p. 1716-1721

NPL 13: "Pain", 2011, Vol. 152, p. 2248-2258

NPL 14: "Pain", 2013, Vol. 154, p. 1910-1919

NPL 15: "Pain", 2014, Vol. 155, p. 1245-1252

40 NPL 16: "Bioanalysis", 2013, Vol. 5, p. 2003-2014

NPL 17: "The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics", 1997, Vol. 281, p. 1-8

NPL 18: "Cancer Research", 1986, Vol. 46, p. 3969-3978

NPL 19: "European Journal of Immunology", 1995, Vol. 25, p. 3128-3133

СУТЬ ВІНАХОДУ

45 ТЕХНІЧНЕ ЗАВДАННЯ

Метою даного винаходу є створення кращого  $Fab$ -фрагмента антитіла до людського NGF, який зберігає високу нейтралізуючу активність, і який знижує системні побічні ефекти, що виникають через системний вплив, з одночасною демонстрацією місцевого фармакологічного впливу.

50 РОЗВ'ЯЗАННЯ ЗАВДАННЯ

Даний винахід належить до наступних винаходів, що належать до продуктів і способів, які мають медичну і промислову придатність.

Інакше кажучи, варіант здійснення даного винаходу може бути у наступній формі:

55 (1)  $Fab$ -фрагмент антитіла до людського NGF, вибраний з групи, що складається з (a) і (b) нижче:

(a)  $Fab$ -фрагмент антитіла до людського NGF, що містить фрагмент важкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 5, і легкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 8; і,

60 (b)  $Fab$ -фрагмент антитіла до людського NGF, отриманий шляхом посттрансляційної модифікації  $Fab$ -фрагмента антитіла до людського NGF з (a).

(2) Fab-фрагмент антитіла до людського NGF згідно з (1), що містить фрагмент важкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 5, і фрагмент легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 8.

5 (3) Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за п. (1), де вказана посттрансляційна модифікація являє собою піроглутамінування на N-кінці варіабельної ділянки важкого ланцюга.

(4) Fab-фрагмент антитіла до людського NGF згідно з (1), що містить фрагмент важкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 5, де глутамін в амінокислотному положенні 1 SEQ ID NO: 5 модифікований у піроглутамінову кислоту, і фрагмент легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 8.

(5) Полінуклеотид, що містить послідовність основ, що кодує фрагмент важкого ланцюга з Fab-фрагмента антитіла до людського NGF згідно з (1).

(6) Експресуючий вектор, вибраний з групи, що складається з (a) і (b), показаних нижче:

15 (a) експресуючий вектор, що включає полінуклеотид, що містить послідовність основ, що кодує фрагмент важкого ланцюга Fab-фрагмента антитіла до людського NGF згідно з (1), і полінуклеотид, що містить послідовність основ, що кодує легкий ланцюг вказаного Fab-фрагмента антитіла до людського NGF; і

(b) експресуючий вектор, що включає полінуклеотид, що містить послідовність основ, що кодує фрагмент важкого ланцюга Fab-фрагмента антитіла до людського NGF згідно з (1).

20 (7) Клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором згідно з (6).

(8) Клітина-хазяїн за п. (7), вибрана з групи, що складається з (a) і (b), показаних нижче:

25 (a) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що включає полінуклеотид, що містить послідовність основ, що кодує фрагмент важкого ланцюга Fab-фрагмента антитіла до людського NGF згідно з (1), і полінуклеотид, що містить послідовність основ, що кодує легкий ланцюг вказаного Fab-фрагмента антитіла до людського NGF; і

(b) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що включає полінуклеотид, що містить послідовність основ, що кодує фрагмент важкого ланцюга Fab-фрагмента антитіла до людського NGF згідно з (1), і експресуючим вектором, що включає полінуклеотид, що містить послідовність основ, що кодує легкий ланцюг вказаного Fab-фрагмента антитіла до людського NGF.

(9) Спосіб для одержання Fab-фрагмента антитіла до людського NGF, що включає культивування клітини-хазяїна згідно з (8) для експресії Fab-фрагмента антитіла до людського NGF.

(10) Fab-фрагмент антитіла до людського NGF, здатний вироблятися по способу згідно з (9).

35 (11) Фармацевтична композиція, що містить Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за будь-яким з (1)-(4) і (10) і фармацевтично прийнятний носій.

(12) Фармацевтична композиція згідно з (11), яка являє собою фармацевтичну композицію для місцевого введення для лікування післяопераційного болю.

40 (13) Фармацевтична композиція, що містить Fab-фрагмент антитіла до людського NGF згідно з (2), Fab-фрагмент антитіла до людського NGF згідно з (4), і фармацевтично прийнятний носій.

(14) Фармацевтична композиція згідно з (13), яка являє собою фармацевтичну композицію для місцевого введення для лікування післяопераційного болю.

45 (15) Застосування Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за будь-яким з (1)-(4) і (10) для одержання фармацевтичної композиції для місцевого введення для лікування післяопераційного болю.

(16) Застосування Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за будь-яким з (1)-(4) і (10) для лікування післяопераційного болю шляхом місцевого введення.

50 (17) Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за будь-яким з (1)-(4) і (10) для застосування для місцевого введення для лікування післяопераційного болю.

(18) Спосіб лікування післяопераційного болю, що включає місцеве введення індивідууму ефектної кількості Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за будь-яким з (1)-(4) і (10).

#### КОРИСНИЙ ЕФЕКТ ЗА ВИНАХОДОМ

55 Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за даним винаходом ефективний для лікування післяопераційного болю, який як патологічний стан розвивається під впливом людського NGF. Таким чином, Fab-фрагмент антитіла до людського NGF, що характеризується, за даним винаходом відрізняється чудовою фармакокінетикою, такою як висока нейтралізуюча активність і місцеве утримування, а також швидким видаленням з крові, що, таким чином, знижує дозу і продовжує дію лікарського засобу, а також знижує системні побічні ефекти від системного впливу і, таким чином, очікується, що буде забезпечувати помітне покращення як впливу, так і

безпеки лікарського засобу для клінічного застосування. Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за даним винаходом вносить значний вклад у лікування післяопераційного болю, який пов'язаний з людським NGF.

#### ОПИС ВАРІАНТІВ ЗДІЙСНЕННЯ

Даний винахід далі описаний докладно, але ці описи не обмежують обсяг винаходу. Якщо в даному описі не визначено інше, наукові терміни і технічні терміни, застосовувані у зв'язку з даним винаходом, мають значення, як правило, що розуміється фахівцем в даній галузі. Автори даного винаходу провели великі дослідження того, як одержати антитіла до людського NGF або їх антигензв'язувальні фрагменти, і успішно одержали чудовий Fab-фрагмент антитіла до людського NGF, який зберігав високу нейтралізуючу активність, а також демонстрував місцевий вплив лікарського засобу, з одночасним зниженням системних побічних ефектів, що виникають через системний вплив.

Основна структура молекули антитіла широко поширена серед відповідних класів антитіл і складається з важких ланцюгів з молекулярною масою від 50000 до 70000 і легких ланцюгів з молекулярною масою від 20000 до 30000. Важкий ланцюг, як правило, складається з поліпептидного ланцюга, що включає приблизно 440 амінокислот, і кожний клас має свою характерну структуру. Важкі ланцюги називаються ланцюгами  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ , і  $\epsilon$ , що відповідають IgG, IgM, IgA, IgD, і IgE. Крім того, IgG має підкласи, такі як IgG1, IgG2, IgG3, і IgG4, і ці ланцюги називаються  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ , і  $\gamma_4$ , відповідно. Легкий ланцюг, як правило, складається з поліпептидного ланцюга, що включає приблизно 220 амінокислот, і відомі два типи легкого ланцюга, що включають L-тип і K-тип, які називаються ланцюгами  $\lambda$  і  $\kappa$ , відповідно. Що стосується будови пептиду основної структури молекули, два гомологічних важких ланцюги і два гомологічних легких ланцюги зв'язані дисульфідними зв'язками (зв'язками S-S) і нековалентними зв'язками, і їх молекулярна маса становить від 150000 до 190000. Два типи легких ланцюгів можуть бути спарені з будь-яким важким ланцюгом. Кожна молекула антитіла завжди складається з двох ідентичних легких ланцюгів і двох ідентичних важких ланцюгів.

Існують чотири внутрішньоланцюжкові зв'язки S-S у важкому ланцюзі (п'ять зв'язків для ланцюгів  $\mu$  і  $\epsilon$ ) і два - у легкому ланцюзі. Одна петля утворена з 100-110 амінокислотних залишків, і ця стерична структура подібна серед відповідних петель і називається структурна одиниця або домен. Як для важких ланцюгів, так і для легких ланцюгів, амінокислотна послідовність домена, розташованого на них N-кінці, не є постійною, навіть у референсному стандарті з того ж самого класу (підкласу) того ж самого роду тварини, і цей домен називається варіабельною ділянкою. Кожний з доменів називається варіабельною ділянкою важкого ланцюга (VH) і варіабельною ділянкою легкого ланцюга (VL), відповідно. Оскільки амінокислотна послідовність C-кінцевого боку від варіабельної ділянки практично постійна в кожному класі або підкласі, ця ділянка називається константною ділянкою, і кожний з доменів описується як CH1, CH2, CH3 і CL, відповідно.

Ділянка антигенної детермінанти антитіла складається з VH і VL, і специфічність зв'язування залежить від амінокислотної послідовності цієї ділянки. З іншого боку, види біологічної активності, такі як зв'язування з комплементом або різними клітинами відображають відмінності в структурі константної ділянки серед різних класів Ig. Відомо, що мінливість у варіабельних ділянках важкого ланцюга і легкого ланцюга переважно обмежена трьома невеликими гіперваріабельними ділянками, що є присутніми на обох ланцюгах, і ці ділянки називаються ділянками, що визначають комплементарність (CDR; CDR1, CDR2 і CDR3, починаючи з N-кінцевої ділянки). Частина варіабельної ділянки, що залишилася, називається каркасною ділянкою (FR) і є відносно постійною.

Ділянка між доменом CH1 і доменом CH2 константної ділянки важкого ланцюга антитіла називається шарнірною ділянкою. Ця ділянка містить множину залишків проліну і має множину міжланцюжкових зв'язків S-S, що з'єднують два важкі ланцюги. Наприклад, кожна шарнірна ділянка людини IgG1, IgG2, IgG3, і IgG4 включає 2, 4, 11, і 2 цистеїнових залишки, відповідно, які складають зв'язки S-S між важкими ланцюгами. Шарнірна ділянка являє собою ділянку з високою чутливістю до протеолітичного ферменту, такого як папаїн або пепсин. Коли антитіло розщеплюють папаїном, його важкий ланцюг розщеплюється в положенні, яке розташовано ближче до N-кінцевого боку, ніж до зв'язку S-S між важкими ланцюгами в шарнірній ділянці, за допомогою чого антитіло розділяється на два Fab-фрагменти і один Fc-фрагмент. Fab-фрагмент складається з легкого ланцюга і фрагмента важкого ланцюга, включаючи варіабельну ділянку важкого ланцюга (VH), домен CH1 і частину шарнірної ділянки. Коли антитіло розщеплюють пепсином, його важкий ланцюг розщеплюється в положенні, яке розташовано ближче до C-кінцевого боку, ніж до зв'язку S-S між важкими ланцюгами в шарнірній ділянці, за допомогою чого одержують F(ab')<sub>2</sub>-фрагменти. F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент являє собою фрагмент з

димерною структурою, в якому два фрагменти Fab' зв'язані один з одним за допомогою зв'язку S-S між важкими ланцюгами в шарнірній ділянці. Фрагмент Fab' складається з легкого ланцюга і фрагмента важкого ланцюга, включаючи варіабельну ділянку важкого ланцюга (VH), домен CH1 і частину шарнірної ділянки. Залишки цистеїну, що складають зв'язок S-S між важкими ланцюгами, включені в частину шарнірної ділянки. Усі з Fab-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, і

фрагмента Fab' включають варіабельну ділянку і мають антигензв'язувальну активність. Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за даним винаходом, успішно отриманий авторами даного винаходу, являє собою Fab-фрагмент з наступними характеристиками:

Fab-фрагмент антитіла до людського NGF, що містить фрагмент важкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 5, і легкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 8.

Конкретно, автори даного винаходу модифікували 1-15 (N52D-A)-Fab'-фрагмент людського антитіла до NGF людини (PTL 3; який також називається "1-15 (N52D-A)-Fa" у вказаному документі) і шляхом скринінгу антитіл за допомогою різних тестів на біологічну активність і фізичні властивості успішно ідентифікували Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за даним винаходом як Fab-фрагмент антитіла до людського NGF, який є стабільним і зберігає високу нейтралізуючу активність і місцеве накопичення.

Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за даним винаходом може бути легко отриманий фахівцем в даній галузі з використанням загальновідомого способу на основі інформації про послідовність, розкриту в даному описі. Наприклад, Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за даним винаходом можна одержувати шляхом синтезу полінуклеотиду, що містить послідовність основ, що кодує його фрагмент важкого ланцюга, і полінуклеотиду, що містить послідовність основ, що кодує його легкий ланцюг, і з'єднання їх з придатними експресуючими векторами. Потім, експресуючі вектори вводять в культуру клітин. Нарешті, коли клітини культивують, фахівець в даній галузі може одержувати моноклональні Fab-фрагменти з культурального супернатанту.

Полінуклеотид, що містить послідовність основ, що кодує фрагмент важкого ланцюга Fab-фрагмента за даним винаходом, і полінуклеотид, що містить послідовність основ, що кодує легкий ланцюг Fab-фрагмента за даним винаходом можна синтезувати, наприклад, на основі послідовності основ, сконструйованої згідно з амінокислотними послідовностями фрагмента важкого ланцюга і легкого ланцюга з використанням способів синтезу генів, загальновідомих в даній галузі. Наприклад, як такі способи синтезу генів можна використовувати спосіб синтезу генів антитіла, викладений в WO 90/07861, і інші способи, загальновідомі фахівцю в даній галузі.

В одному з варіантів здійснення як полінуклеотид, що містить послідовність основ, що кодує фрагмент важкого ланцюга Fab-фрагмента антитіла до NGF людини, що складається з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 5, для прикладу можна вказати полінуклеотид, що містить послідовність основ, показану в SEQ ID NO: 1. Як полінуклеотид, що містить послідовність основ, що кодує легкий ланцюг Fab-фрагмента антитіла до NGF людини, що складається з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 8, для прикладу можна вказати полінуклеотид, що містить послідовність основ, показану в SEQ ID NO: 4.

Процеси після одержання полінуклеотиду, що містить послідовність основ, що кодує фрагмент важкого ланцюга Fab-фрагмента за даним винаходом, і полінуклеотиду, що містить послідовність основ, що кодує легкий ланцюг Fab-фрагмента за даним винаходом, такі як введення полінуклеотиду в експресуючий вектор, введення експресуючого вектора в культуру клітин, інкубація культури клітин і очищення Fab-фрагмента, можна проводити за допомогою різних способів, загальновідомих в даній галузі.

Експресуючі вектори, які можна використовувати, включають, наприклад, вектори GS рEE6.4 або рEE12.4 (Lonza), без конкретних обмежень за умови, що вектор здатний експресувати полінуклеотид, що містить послідовність основ, що кодує фрагмент важкого ланцюга Fab-фрагмента за даним винаходом, і/або полінуклеотид, що містить послідовність основ, що кодує легкий ланцюг Fab-фрагмента за даним винаходом, і, таким способом, здатний виробляти поліпептиди, що ними кодуються.

Вищеописані експресуючі вектори вводять в культуру клітин такими способами, як трансфекція за допомогою фосфату кальцію або електропорація.

Клітини, що культивуються, в які можна вводити експресуючі вектори, можуть бути, наприклад, клітинами CHO-K1SV, клітинами CHO-DG44, і клітинами 293, і їх можна культивувати шляхом загальноприйнятого способу.

Після вищевказаного культивування, Fab-фрагменти, що накопичилися в культуральному супернатанті, можна очищати різними способами хроматографії на колонках, такими як способи з використанням CaptaSelect.

Приклад Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за даним винаходом належить до антитіла h1f.6, описаного в розділі Приклади далі.

Коли антитіло експресується в клітинах, відомо, що антитіло піддається посттрансляційним модифікаціям. Приклад посттрансляційних модифікацій включає розщеплення лізину на С-кінці важкого ланцюга за допомогою карбоксипептидази, модифікацію глутаміну або глутамінової кислоти на N-кінці важкого ланцюга або легкого ланцюга піроглутамінової кислоти шляхом піроглутамінування, глікозилювання, окиснення, деамідування, глікування, і т. п. В даній галузі відомо, що такі посттрансляційні модифікації відбуваються з різними антитілами [J. Pharm. Sci., 2008, Vol. 97, p. 2426-2447].

Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за даним винаходом може включати Fab-фрагмент антитіла до людського NGF, який піддається посттрансляційній модифікації/модифікаціям. Приклад Fab-фрагмента антитіла до людського NGF, який може піддаватися посттрансляційній модифікації/модифікаціям, включає Fab-фрагмент антитіла до людського NGF, у якого N-кінець варіабельної ділянки важкого ланцюга піроглутамінований. Така посттрансляційна модифікація шляхом піроглутамінування на N-кінці відома в даній галузі, як така, що не впливає на активність антитіла [Anal. Biochem., 2006, Vol. 348, p. 24-39].

Наприклад, Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за даним винаходом належить до наступного Fab-фрагмента антитіла до людського NGF:

Fab-фрагмент антитіла до людського NGF, що містить фрагмент важкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 5, де глутамін в амінокислотному положенні 1 SEQ ID NO:5 модифікований до піроглутамінової кислоти, і легкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 8.

Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за даним винаходом зв'язується з NGF людини. Активність зв'язування отриманого Fab-фрагмента антитіла до людського NGF з NGF людини можна вимірювати шляхом ELISA, FACS, і т. д. Наприклад, при використанні ELISA, людський NGF іммобілізують на планшеті для ELISA і додають у цей планшет для ELISA Fab-фрагмент, а після цього додають вторинне антитіло, таке як антитіло до каппа, мічене біотином, і т. д. і стрептавідин, мічений лужною фосфатазою додають. Потім вимірюють активність з використанням реагенту для детекції активності (наприклад, хемілюмінесцентний субстрат для лужної фосфатази для міток з лужною фосфатазою) для виявлення зв'язування вторинного антитіла. Крім того, Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за даним винаходом може зв'язуватися з іншим NGF, отриманим від тварини (наприклад, мишиним NGF) на додаток до людського NGF, і також можна вимірювати активність зв'язування з цими білками.

Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за даним винаходом має нейтралізуючу активність проти людського NGF. Як застосовують в даному описі, термін "нейтралізуюча активність" Fab-фрагмента антитіла до людського NGF належить до активності, яка інгібує будь-яку біологічну активність, що індукується за допомогою людського NGF, шляхом зв'язування з людським NGF, і її можна оцінювати за допомогою одного або декількох видів біологічної активності людського NGF як показник. Така нейтралізуюча активність включає, наприклад, інгібування зв'язування між людським NGF і його рецептором людським trkA, і її можна оцінювати з використанням способів, описаних в розділі Приклади далі.

Для того щоб оцінити вплив Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за даним винаходом більш докладно, також можливо проводити дослідження *in vivo*. Наприклад, можливо проводити, як показано далі в розділі ПРИКЛАДИ, дослідження знеболювальних ефектів з використанням щуриної моделі післяопераційного болю після підшовного розрізу, для оцінювання *in vivo* впливу лікарського засобу з Fab-фрагментом антитіла до людського NGF. Також можливо підтверджувати фармакологічну активність Fab-фрагмента антитіла до людського NGF у тканину, проводячи дослідження для оцінювання активності зв'язування NGF або дослідження для оцінювання інгібування зв'язування між людським NGF і його рецептором trkA, з використанням гомогенату тканини, отриманого після місцевого введення Fab-фрагмента антитіла до людського NGF у стегновий м'яз щурів. Додатково, також можливо проводити дослідження для оцінювання концентрації Fab-фрагмента в плазмі або тканинах для оцінювання збереження локального рівня впливу Fab-фрагмента, а також зниження системного впливу в крові.

Як інший спосіб, способи для оцінювання стабільності Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за даним винаходом (наприклад, термостабільність, стабільність при тривалому зберіганні, і стабільність високої концентрації) включають спосіб, який вимірює агрегацію під час зберігання за допомогою гель-фільтраційної хроматографії.



Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за даним винаходом можна формулювати шляхом загальноприйнятого способу після очищення, що проводиться в міру необхідності, для використання для лікування післяопераційного болю.

Термін "післяопераційний біль" належить до болю, який викликаний або виникає у результаті травматичних ушкоджень таких як різана рана, колота рана, розсічення, рвана рана або ушкодження тканини індивідуума (включаючи ушкодження, викликані всіма видами хірургічного лікування, інвазивного або неінвазивного). Термін "післяопераційний біль", застосовуваний в даному описі, не включає біль, що виникає без якого-небудь фізичного ушкодження від зовнішніх причин (тобто, біль, який не викликаний ушкодженням або не є результатом ушкодження). Післяопераційний біль являє собою внутрішній або зовнішній (у тому числі, периферичний) біль, і рана, різана рана, ушкодження, рвана рана або розріз можуть бути заподіяні випадково (у випадку зовнішнього ушкодження/рани) або навмисно (у випадку розрізу або операції). Біль можна оцінювати об'єктивно або суб'єктивно за допомогою шкали болю і інших способів, добре відомих в даній галузі. Післяопераційний біль, як застосовують в даному описі, включає алодинію (тобто, як правило, підвищення величини відповіді на больовий або неприємний стимул) і гіперпатію (тобто, як правило, підвищення величини відповіді на больовий або неприємний стимул), і вони можуть бути термальної або механічної природи. Болі характеризуються термочутливістю, чутливістю до механічного стимулу і/або болем у спокої. Післяопераційний біль включає біль, що індукується механічним стимулом, і біль у спокої.

Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за даним винаходом можна використовувати як терапевтичний засіб для післяопераційного болю. Приклади складу терапевтичного засобу включають парентеральні засоби, такі як ін'єкції, краплі і препарати пролонгованого дії, і переважним є введення шляхом внутрішньом'язової ін'єкції або підшкірних ін'єкцій в локальну тканину-мішень. Також можливо при формуванні фармацевтичного складу використовувати носії і домішки, які підходять для складу за умови, що вони є фармацевтично прийнятними.

Кількість Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за даним винаходом, яку додають при складанні вищевказаного фармацевтичного складу, варіює залежно від ступеня симптому і віку пацієнта, використовуваної форми фармацевтичного складу, або валентності антитіла, але можна використовувати кількість приблизно від 0,001 до 100 мг/кг.

Даний винахід також належить до фармацевтичної композиції, що містить Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за даним винаходом. Фармацевтична композиція за даним винаходом може містити фармацевтично прийнятні носії або домішки. Такі фармацевтично прийнятні носії або домішки конкретно не обмежені, і можна використовувати носії або домішки, добре відомі фахівцю в даній галузі. Даний винахід також належить до Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за даним винаходом для застосування для лікування післяопераційного болю і до застосування Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за даним винаходом для виробництва фармацевтичної композиції для лікування післяопераційного болю. Даний винахід також належить до способу лікування післяопераційного болю, що включає місцеве введення індивідууму ефективної кількості Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за даним винаходом. Слід зазначити, що "індивідуум" є людиною або іншими ссавцями, яким необхідно лікування, і один з варіантів здійснення є людиною, якій необхідно лікування. Ефективна кількість Fab-фрагмента антитіла до людського NGF в способі лікування за даним винаходом може бути кількістю, аналогічною до кількості Fab-фрагмента, доданого при формуванні фармацевтичного складу, як зазначено вище. Крім того, фармацевтична композиція для місцевого застосування за даним винаходом належить до фармацевтичної композиції, яку вводять або застосовують на ділянці, що вимагає лікування, або ділянках, прилеглих до цієї ділянки, зокрема, на тканині-мішені, такий як тканина, розсічена у хірургічній операції або на навколишній ділянці. Наприклад, фармацевтичну композицію можна вводити шляхом внутрішньом'язової ін'єкції або підшкірних ін'єкцій місцево в тканину-мішень, як зазначено вище. Даний винахід належить до випадку, коли Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за даним винаходом зберігається в локальній тканині-мішені протягом визначеного часу, переважно, 72 години, і, більш переважно, 24 години.

Фармацевтична композиція за даним винаходом може містити множину типів Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за даним винаходом. Наприклад, даний винахід також належить до фармацевтичної композиції, що містить Fab-фрагмент антитіла до людського NGF, який не піддається посттрансляційній модифікації і Fab-фрагмент антитіла до людського NGF, отриманий шляхом посттрансляційної модифікації.

В одному з варіантів здійснення фармацевтична композиція за даним винаходом включає фармацевтичну композицію, що містить Fab-фрагменти антитіла до людського NGF, як показано в (a) і (b) нижче:

(a) Fab-фрагмент антитіла до людського NGF, що містить фрагмент важкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 5, і легкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 8; і

5 (b) Fab-фрагмент антитіла до людського NGF, отриманий шляхом посттрансляційної модифікації Fab-фрагмента антитіла до людського NGF з (a).

В одному з варіантів здійснення фармацевтична композиція за даним винаходом включає фармацевтичну композицію, що містить Fab-фрагменти антитіла до людського NGF, як показано в (a) і (b) нижче:

10 (a) Fab-фрагмент антитіла до людського NGF, що містить фрагмент важкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 5, і легкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 8; і

(b) Fab-фрагмент антитіла до людського NGF, що містить фрагмент важкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 5, де глутамін в амінокислотному положенні 1 SEQ ID NO:5 модифікований до піроглутамінової кислоти, і  
15 фрагмент легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO:8.

Даний винахід також належить до полінуклеотиду, що містить послідовність основ, що кодує фрагмент важкого ланцюга Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за даним винаходом, і до полінуклеотиду, що містить послідовність основ, що кодує легкий ланцюг Fab-фрагмента  
20 антитіла до людського NGF за даним винаходом (які можуть далі спільно позначатися в даному документі як "полінуклеотид за даним винаходом"), і до експресуючого вектора, що містить один або обидва таких полінуклеотиди (який може далі в даному документі позначатися як "експресуючий вектор за даним винаходом").

Експресуючий вектор за даним винаходом не обмежений конкретним типом за умови, що він експресує полінуклеотид, що містить послідовність основ, що кодує фрагмент важкого ланцюга Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за даним винаходом і/або полінуклеотид, що містить послідовність основ, що кодує легкий ланцюг Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за даним винаходом, у різних клітинах-хазяїнах, які являють собою прокаріотичні клітини і/або еукаріотичні клітини, і здатний виробляти поліпептид(-и), що кодується вказаним  
30 нуклеотидом/нуклеотидами. Приклади експресуючих векторів, які можна використовувати, включають плазмідний вектор, вірусний вектор (наприклад, аденовірусний, ретровірусний), наприклад, можна використовувати вектор GS рEE6.4 і рEE12.4 (Lonza). В одному з варіантів здійснення експресуючий вектор за даним винаходом являє собою експресуючий вектор, який включає полінуклеотид, що містить послідовність основ, що кодує фрагмент важкого ланцюга Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за даним винаходом. В іншому варіанті здійснення експресуючий вектор за даним винаходом являє собою експресуючий вектор, який включає полінуклеотид, що містить послідовність основ, що кодує фрагмент важкого ланцюга Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за даним винаходом, і полінуклеотид, що містить послідовність основ, що кодує легкий ланцюг такого Fab-фрагмента антитіла до людського NGF.

40 Експресуючий вектор за даним винаходом може містити промотор, функціонально зв'язаний з полінуклеотидом за даним винаходом. Промотори, які дозволяють експресуватися гену, що кодує Fab-фрагмент за даним винаходом або його варіабельну ділянку важкого ланцюга і/або варіабельну ділянку легкого ланцюга в бактерії, включають промотор Trp, промотор lac, промотор recA, промотор λPL, промотор lpp, і промотор tac, коли бактерія-хазяїн належить до  
45 роду Escherichia. Промотори, які дозволяють експресуватися в дріжджах, включають, наприклад, промотор PH05, промотор PGK, промотор GAP, і промотор ADH, і промотори, які дозволяють експресуватися в бактерії роду Bacillus, включають промотор SL01, промотор SP02, і промотор repP. Промотори для клітини-хазяїна, яка є еукаріотичною клітиною, такою як клітини ссавців, включають промотор, отриманий з SV40, промотор ретровірусу або промотор  
50 теплового шоку.

Коли як клітину-хазяїна використовують бактерію, зокрема, E. coli, експресуючий вектор за даним винаходом може додатково містити кодон ініціації, стоп-кодон, кодон термінації і реплікативну одиницю. Коли як хазяїна використовують дріжджі, клітину тварини або клітину  
55 комах, експресуючий вектор за даним винаходом може включати кодон ініціації і стоп-кодон. В цьому випадку, він може включати енхансерну послідовність, ділянки, що не транскрибуються, на 5'-кінці і 3'-кінці гена, який кодує Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за даним винаходом, сигнальна послідовність для секреції, точку сплайсингу, ділянку поліаденілювання, реплікативну одиницю або т. п. Також, він може включати селективний маркер, який широко використовується (наприклад, ген стійкості до тетрацикліну, ген стійкості до ампіциліну, ген

стійкості до канаміцину, ген стійкості до неоміцину, ген редуктази дигідрофолієвої кислоти), згідно з передбачуваним застосуванням.

Даний винахід також належить до клітини-хазяїна, трансформованої експресуючим вектором за даним винаходом. Клітина-хазяїн, яку використовують для одержання трансформанта, не обмежена конкретним типом за умови, що вона відповідає вказаному вище експресуючому вектору і її можна трансформувати; приклади клітини-хазяїна включають різні клітини, такі як природні клітини або клітини, отримані штучним шляхом, які широко використовуються в галузі техніки за даним винаходом (наприклад, бактерії (бактерії роду *Escherichia*, бактерії роду *Bacillus*), дріжджі (роду *Saccharomyces*, роду *Pichia* і т. п.), клітини тварин (клітина CHO-K1SV, клітина CHO-DG44, клітина 293 і т. п.) або клітини комах (наприклад, Sf9) і т. п. Трансформацію як таку можна проводити будь-яким відомим способом.

Клітина-хазяїн за даним винаходом включає наступні (a) і (b):

(a) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що включає полінуклеотид, який містить послідовність основ, що кодує фрагмент важкого ланцюга Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за даним винаходом, і полінуклеотид, який містить послідовність основ, що кодує легкий ланцюг вказаного Fab-фрагмента антитіла до людського NGF; і

(b) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що включає полінуклеотид, який містить послідовність основ, що кодує фрагмент важкого ланцюга Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за даним винаходом, і експресуючим вектором, що включає полінуклеотид, який містить послідовність основ, що кодує легкий ланцюг вказаного Fab-фрагмента антитіла до людського NGF.

Даний винахід також належить до способу одержання Fab-фрагмента антитіла до людського NGF, що включає етапи культивування клітини-хазяїна за даним винаходом і експресування Fab-фрагмента антитіла до людського NGF. Переважно, клітина-хазяїн, яку використовують у вищевказаному способі, включає вказану вище клітину-хазяїна (a) і (b) за даним винаходом.

Для одержання Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за даним винаходом, трансформовану клітину-хазяїна можна культивувати в живильному середовищі. Живильне середовище переважно містить джерело вуглецю і джерело неорганічного азоту або джерело органічного азоту, який необхідний для росту клітини-хазяїна. Приклади джерела вуглецю включають глюкозу, декстран, розчинний крохмаль, сахарозу і т. п.; приклади джерела неорганічного азоту або джерела органічного азоту включають амонійні солі, нітрати, амінокислоти, рідкий кукурудзяний екстракт, пептон, казеїн, м'ясний екстракт, соєву макуху, картопляний екстракт і т. п. За бажанням, можна включати інші поживні речовини (наприклад, неорганічні солі (наприклад, хлорид кальцію, дигідрогенфосфат натрію, хлорид магнію), вітаміни, і т. п.), антибіотики (наприклад, тетрациклін, неоміцин, ампіцилін, канаміцин і т. п.).

Клітину-хазяїна культивують загальновідомим способом. Умови культивування, наприклад, температуру, pH середовища, і час культивування підбирають відповідним чином. Наприклад, коли хазяїном є клітина тварини, як середовище можна використовувати середовище MEM, що містить приблизно від 5 до 20 % ембріональної телячої сироватки [Science, Vol. 122, p. 501, 1952], середовище DMEM [Virology, Vol. 8, p. 396, 1959], середовище RPMI1640 [J. Am. Med. Assoc., Vol. 199, p. 519, 1967], середовище 199 [Proc. Soc. Exp. Biol. Med., Vol. 73, p. 1, 1950] і т. п. pH середовища переважно становить приблизно від 6 до 8, культивування звичайно проводять при температурі приблизно від 30 до 40 °C протягом приблизно від 15 до 72 годин, і можна проводити в міру необхідності аерацію або перемішування. Коли хазяїном є клітини комах, можна використовувати, наприклад, середовище Грейса, що містить ембріональну телячу сироватку [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, p. 8404, 1985] і т. п., і pH середовища переважно становить приблизно від 5 до 8. Культивування звичайно проводять при температурі приблизно від 20 до 40 °C протягом від 15 до 100 годин, і можна проводити в міру необхідності аерацію або перемішування. Коли хазяїном є бактерія, актиноміцет, дріжджі, або ниткоподібний гриб, придатним є, наприклад, рідке середовище, що містить вищевказані джерела поживних речовин. Переважним є середовище з pH від 5 до 8. Коли хазяїном є *E. coli*, переважні приклади середовища включають середовище LB, середовище M9 [Miller et al., Exp. Mol. Genet, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 431, 1972] і т. п. У цьому випадку, культивування звичайно проводять при температурі приблизно від 14 до 43 °C протягом приблизно від 3 до 24 годин, при цьому аерацію або перемішування проводять в міру необхідності. Коли хазяїном є бактерія роду *Bacillus*, культивування звичайно проводять при температурі приблизно від 30 до 40 °C протягом приблизно від 16 до 96 годин, при цьому аерацію або перемішування проводять в міру необхідності. Коли хазяїном є дріжджі, приклади середовища включають мінімальне середовище Буркхолдер [Bostian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 77, p. 4505, 1980], і pH середовища бажано становить від 5 до 8. Культивування звичайно проводять при температурі

приблизно від 20 до 35 °C протягом приблизно від 14 до 144 годин, і аерацію або перемішування можна проводити в міру необхідності.

Спосіб одержання Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за даним винаходом додатково включає, на додаток до стадій культивування клітини-хазяїна за даним винаходом і експресування Fab-фрагмента антитіла до людського NGF, стадію виділення, і переважно, виділення і очищення, Fab-фрагмента антитіла до людського NGF з вказаної клітини-хазяїна. Приклади способу виділення і очищення включають способи, основані на відмінностях у розчинності, такі як висолювання і осадження розчинником; способи, основані на відмінностях у молекулярній масі, такі як діаліз, ультрафільтрація, гель-фільтрація, і електрофорез в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (SDS); способи, основані на відмінностях в електричному заряді, такі як іонообмінна хроматографія і хроматографія з гідроксилапатитом; способи, основані на специфічній афінності, такі як афінна хроматографія; способи, основані на відмінностях у гідрофобності, такі як обернено-фазова вискоефективна рідинна хроматографія; способи, основані на відмінностях в ізоелектричній точці, такий як ізоелектрофокусування; і т. п.

Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за даним винаходом також включає Fab-фрагмент антитіла до людського NGF, який можна одержувати способом для одержання Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за даним винаходом.

Хоча даний винахід в основному був описаний вище, конкретні приклади наведені в даному документі тільки для кращого розуміння даного винаходу. Ці приклади призначені тільки для ілюстративних цілей і не обмежують обсяг даного винаходу.

#### ПРИКЛАДИ

На стадіях з використанням комерційно доступного набору або реагенту, експерименти проводили згідно з протоколами, що прикладаються, якщо не зазначено інше.

#### <ПРИКЛАД 1: Одержання Fab-фрагментів антитіла до людського NGF>

Три типи генетичних фрагментів ампліфікували за допомогою ДНК-полімерази Phusion High-Fidelity (Finnzymes, F-530L) з використанням як матрицю експресуючого вектора, який включав поліпептид, що кодує важкий ланцюг з 1-15 (N52D) Fab'-фрагмента (PTL 3), і праймерів, сконструйованих так, щоб вони були здатні ампліфікувати кожний з трьох типів генетичних фрагментів від ділянки VH до шарнірної ділянки (SEQ ID NO: 1, 2 і 3). Ампліфіковані ділянки містили HindIII на 5'-кінці і EcoRI на 3'-кінці. Отримані генетичні фрагменти важкого ланцюга розщеплювали HindIII і EcoRI (обидва ферменти від NEB) і вставляли в експресуючий вектор pEE6.4.

Ці експресійні плазміди вводили в E.coli загальноприйнятим способом для одержання трансформованих клонів, і використовували систему для очищення ДНК Wizard Plus SV Minipreps (Promega, A1460) для виділення плазмідної ДНК. При цьому, ген легкого ланцюга мав таку саму послідовність основ (SEQ ID NO: 4), що і ген легкого ланцюга з 1-15 (N52D) Fab'-фрагмента, і амінокислотна послідовність, що кодується геном, являє собою SEQ ID NO:8. Використовували pEE12.4, що кодує фрагмент гена легкого ланцюга.

Вектор GS (pEE6.4), що кодує фрагмент гена важкого ланцюга з Fab-фрагмента антитіла до людського NGF, і вектор GS (pEE12.4), що кодує фрагмент гена легкого ланцюга з Fab-фрагмента антитіла до людського NGF, розщеплювали рестрикційними ферментами NotI і PvuI (обидва від NEB). Потім проводили лігування з використанням DNA Ligation Mix (Takara Bio Inc., 6023) для конструювання векторів GS, що кодують генетичні фрагменти і важкого ланцюга, і легкого ланцюга з Fab-фрагментів антитіла до людського NGF. Отриману плазмідну ДНК використовували як матриці для реакцій секвенування, і продемонстрували, що плазмідна ДНК містить послідовності основ клонованого важкого ланцюга від ділянки VH до шарнірної ділянки і легкого ланцюга від ділянки VL до ділянки CL. Послідовності основ від ділянки VH до шарнірної ділянки з трьох типів важких ланцюгів показані у вигляді SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 3. Крім того, амінокислотні послідовності, що кодуються цими послідовностями основ, показані у вигляді SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 і SEQ ID NO: 7, відповідно. Три типи Fab-фрагментів антитіла до людського NGF одержували шляхом поєднання важкого ланцюга з SEQ ID NO: 1 і легкого ланцюга з SEQ ID NO: 4, важкого ланцюга з SEQ ID NO: 2 і легкого ланцюга з SEQ ID NO: 4, і важкого ланцюга з SEQ ID NO: 3 і легкого ланцюга з SEQ ID NO: 4, і позначали їх як антитіло h1f.6, антитіло h1f.7 і антитіло h1f.8, відповідно.

Fab-фрагменти антитіла до людського NGF експресували двома способами транзитornoї експресії і конститутивної експресії з використанням векторів GS. Для транзитornoї експресії векторами GS трансфікували клітини CHO-K1SV (Lonza), що культивуються в середовищі CD-CHO (Invitrogen), з використанням способу електропорації MaxCyte (MaxCyte), а потім інкубували протягом 7 діб. Fab-фрагменти антитіла до людського NGF виділяли з культуральних

супернатантів з використанням KappaSelect (GE Healthcare, 17-5458-02). Для конститутивної експресії, векторами GS, розщепленими рестрикційним ферментом PvuI трансфікували клітини CHO-K1SV клітини з використанням способу електропорації спосіб для експресії Fab-фрагментів антитіла до людського NGF. Fab-фрагменти антитіла до людського NGF виділяли з культуральних супернатантів з використанням KappaSelect і підтверджували гель-фільтраційною хроматографією і електрофорезом в поліакриламідному гелі з SDS. Для підтвердження посттрансляційної модифікації очищеного антитіла h1f.6 проводили мас-спектрометрію. У результаті для більшості антитіл одержували пік, який розглядали як N-кінцеве піроглутамінування.

<ПРИКЛАД 2: Оцінювання активності, що інгібує зв'язування, для Fab-фрагментів антитіла до людського NGF проти людського NGF

Для оцінювання активності, що інгібує зв'язування, для Fab-фрагментів антитіла до людського NGF проти людського NGF, проводили конкурентний аналіз ELISA для людського NGF-trkA, який спрямований на інгібування зв'язування між людським NGF і його рецептором trkA як індикатор. Людський trkA (R&D Systems, 175-TK-050), розведений фосфатно-сольовим буфером (PBS) до концентрації 2000 нг/мл додавали в білий 96-лунковий планшет Nunc MaxiSorp (Nunc, 436110) по 50 мкл/лунку і іммобілізували інкубуванням протягом ночі при 4 °C. Розчин людського trkA видаляли центрифугуванням у переверненому вигляді і додавали Blocker Caseine в TBS (Thermo, 37532) по 200 мкл/лунку. Після цього планшет інкубували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, Blocker Caseine в TBS видаляли центрифугуванням у переверненому вигляді. Очищені зразки антитіл, розведені в 7-11 етапів приблизно від 200000 нг/мл до приблизно 2 нг/мл за допомогою PBS, що містить 0,1 % бичачого сироваткового альбуміну (BSA), змішували з 700 нг/мл біотинільованого людського NGF у однакових кількостях, інкубували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, і отримані зразки додавали по 100 мкл/лунку. Біотинільований людський NGF, застосовуваний у даному документі, одержували шляхом біотинілювання людського NGF (R&D Systems, 256-GF-100/CF) за допомогою EZ-Link NHS-PEG4-Biotine (Thermo Scientific, 21329). Біотинілювання людського NGF проводили, додаючи 1,25 мкл 5 мМ розчину NHS-PEG4-Biotine до 250 мкл 0,4 мг/мл людського NGF, інкубуючи протягом 2 годин на льоду у темряві, і замінюючи розчин реакційної суміші на PBS з використанням Amicon Ultra 3K на 0,5 мл (Millipore, UFC500324) двічі згідно з посібником. PBS, що містить 0,1 % BSA, одержували як контроль. Після інкубації протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, планшет відмивали три рази розчином для відмивання (фізіологічний розчин, який забуферений Трис (TBS) і містить 0,05 % Tween-20) і додавали 100 мкл на лунку розведеного у 1000 разів і міченого лужною фосфатазою стрептавідину (Thermo, 21324) в розведеному у 20 разів Blocking One (NacalaiTesque Inc., 03953-95) в PBS. Після інкубації протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, планшет відмивали розчином для відмивання три рази і додавали 100 мкл/лунку розведеного у 5 разів субстрату для лужної фосфатази (Хемілюмінесцентний субстрат для ЛФ для мікролунок/мембран, суперчутливий, 450 нм; SurModics, APU4-0100-01) у 2 мМ буфері Трис (pH 9,8), що містить 0,1 мМ хлорид магнію. Після інкубації протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, величину сигналу вимірювали лічильником EnVision (Perkin Elmer).

Тести для 1-15 (N52D-A) Fab'-фрагмента, антитіла h1f.6, антитіла h1f.7, і антитіла h1f.8 проводили двічі. Для розрахунку рівня інгібування зв'язування людського NGF-trkA для кожного антитіла, виміряну величину для PBS, що містить 0,1 % BSA, приймали за 0 % і виміряну величину максимальної концентрації кожного антитіла приймали за 100 %. Аналізували розрахований рівень інгібування зв'язування людського NGF-trkA і величину IC<sub>50</sub> для антитіла розраховували за допомогою алгоритму підбору з три- або чотирипараметричною логістичною кривою. Розраховували геометричні середні для значень IC<sub>50</sub> для двох повторів, значення IC<sub>50</sub> для 1-15 (N52D-A) Fab'-фрагмента, антитіла h1f.6, антитіла h1f.7, і антитіла h1f.8 для інгібування зв'язування людського NGF-trkA склали 0,30 мкг/мл, 0,32 мкг/мл, 0,30 мкг/мл, і 0,28 мкг/мл, відповідно, показуючи, що їх активність інгібування людського NGF-trkA була приблизно однаковою.

<ПРИКЛАД 3: Оцінювання утворювання димерів Fab-фрагментів антитіла до людського NGF після інкубації протягом 14 діб при 50 °C>

Розчини 1-15 (N52D-A) Fab'-фрагмента, антитіла h1f.6, антитіла h1f.7, і антитіла h1f.8 заміняли на буфери з pH 5, 6 і 7 (20 мМ лимонної кислоти/120 мМ NaCl в pH 5 або 6, PBS в pH 7), і коригували до 10 мг/мл, потім інкубували протягом 14 діб при 50 °C для оцінювання стабільності.

Утворювання димерів до і після інкубування протягом 14 діб при 50 °C оцінювали за допомогою LC1100 (Agilent Technologies) з гель-фільтраційною хроматографією з гелем TSK

Super Sw3000 (TOSOH, 2 мм ID×300 мм). Вимірювання проводили з розчином рухомої фази з 0,1 М динатрію гідрофосфату і 0,2 М кислоти солі L(+)-аргініну з рН, скоригованим до 6,8 за допомогою соляної кислоти, швидкість потоку 0,075 мл/хв при 25 °С, з детектуванням довжини хвилі 280 нм і референсною довжиною хвилі 360 нм. Вимірювання проводили двічі для одержання арифметичного середнього, і рівень росту димерів одержували шляхом віднімання рівня росту димерів до інкубації з рівня росту димерів після інкубації. Таким чином, рівні росту димерів 1-15 (N52D-A) Fab'-фрагмента при рН 5, 6 і 7 склали 5,4 %, 17,0 % і 18,2 %, відповідно, демонструючи, що в цих умовах утворювалася значна кількість димерів. Рівні росту димерів антитіла h1f.6 при рН 5, 6 і 7 склали 0,1 %, 0,3 % і 0,5 %, відповідно, для антитіла h1f.7 при рН 5, 6 і 7 склали 0,1 %, 0,3 % і 0,4 %, відповідно, і для h1f.8 при рН 5, 6 і 7 склали 0,1 %, 0,5 % і 0,7 %, відповідно. Таким чином, показано, що антитіло h1f.6, антитіло h1f.7, і антитіло h1f.8 мали значно більш низький рівень утворення димерів і були більш стабільні, ніж 1-15 (N52D-A) Fab'-фрагмент.

<ПРИКЛАД 4: Оцінювання активності, що інгібує зв'язування, Fab'-фрагментів антитіла до людського NGF проти людського NGF після інкубації протягом 14 діб при 50 °С>

Оцінювали зміну активності, що інгібує зв'язування, для 1-15 (N52D-A) Fab'-фрагмента, антитіла h1f.6, антитіла h1f.7, і антитіла h1f.8 проти людського NGF після інкубації протягом 14 діб при рН 6 і 50 °С за допомогою конкурентного ELISA з людським NGF-trkA, описаного в прикладі 2. Розраховували геометричні середні для значень IC<sub>50</sub> для двох повторів, величина IC<sub>50</sub> для 1-15 (N52D-A) Fab'-фрагмента, антитіла h1f.6, антитіла h1f.7, і антитіла h1f.8 відносно інгібування зв'язування людського NGF-trkA склали 0,47 мкг/мл, 0,38 мкг/мл, 0,56 мкг/мл, і 0,47 мкг/мл, відповідно, після інкубації протягом 14 діб при 50 °С. Рівень росту значення IC<sub>50</sub> для антитіл після інкубації протягом 14 діб при 50 °С відносно значення до інкубації склав 59 %, 21 %, 87 % і 68 %, відповідно.

Згідно з результатами, антитіло h1f.6, антитіло h1f.7, і антитіло h1f.8 являють собою Fab'-фрагменти антитіла до NGF, які мають значно більш низький рівень росту димерів, ніж 1-15 (N52D-A) Fab'-фрагмент після інкубації протягом 14 діб при 50 °С. Показано, що антитіло h1f.6 мало тільки незначне зниження активності, що інгібує зв'язування, під час інкубації і зберігає високу стабільність.

<ПРИКЛАД 5: Оцінювання за допомогою ELISA активності зв'язування для антитіл до людського NGF з людським NGF>

Аналіз ELISA застосовували для вимірювання активності зв'язування антигену для антитіла h1f.6. Для оцінювання зв'язувальної здатності антитіл до людського NGF, проводили тест з використанням планшета з іммобілізованим людським NGF. Як контроль використовували антитіло порівняння Танезумаб.

Людський NGF (R&D Systems, 256-GF-100/CF), розведений PBS до концентрації 1000 нг/мл додавали в білий 96-лунковий планшет Nunc MaxiSorp (Nunc, 436110) по 100 мкл/лунку і іммобілізували інкубуванням протягом ночі при 4 °С. Розчин людського NGF видаляли центрифугуванням у переверненому вигляді і додавали по 200 мкл/лунку Blocker Caseine в TBS (Thermo, 37532), і планшет інкубували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Blocker Caseine в TBS видаляли центрифугуванням у переверненому вигляді і очищені зразки антитіла, розведені в 11 етапів від 1000 до 0,01 нг/мл за допомогою PBS, що містить 0,1 % BSA, додавали по 100 мкл/лунку, і планшет інкубували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. PBS, що містить 0,1 % BSA, одержували як контроль. Планшет відмивали три рази розчином для відмивання (TBS, що містить 0,05 % Tween-20), додавали на лунку 100 мкл розведеного в 1000 разів біотинільованого антитіла до людського легкого ланцюга каппа (IBL, 17249) в розведеному у 20 разів Blocking One (Nacalai Tesque, Inc., 03953-95) в PBS, і планшет інкубували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Планшет відмивали три рази розчином для відмивання, і додавали 100 мкл на лунку розведеного у 1,000 разів і міченого лужною фосфатазою стрептавідину (Thermo, 21324) в розведеному у 20 разів Blocking One в PBS, і планшет інкубували протягом 0,5 години при кімнатній температурі. Планшет відмивали розчином для відмивання три рази і додавали 100 мкл/лунку розведеного у 5 разів субстрату для лужної фосфатази (Хемілюмінесцентний субстрат для ЛФ для мікролунок/мембран, суперчутливий, 450 нм; SurModics, APU4-0100-01) в 2 мМ буфері Трис (рН 9,8), що містить 0,1 мМ хлорид магнію. Після інкубації протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, величину сигналу вимірювали лічильником EnVision (Perkin Elmer).

Тести для кожного антитіла проводили двічі і одержували арифметичне середнє. Для розрахунку рівня інгібування людського NGF для кожного антитіла, виміряну величину для PBS, що містить 0,1 % BSA, приймали за 0 % і виміряну величину максимальної концентрації кожного антитіла приймали за 100 %. Аналізували розрахований рівень інгібування зв'язування

людського NGF-trkA і величину  $EC_{50}$  для антитіла розраховували за допомогою алгоритму підбору з трипараметричною логістичною кривою. Розраховували геометричні середні для значень  $EC_{50}$  для двох повторів, значення  $EC_{50}$  для антитіла h1f.6 склало 73,0 нг/мл, у той час як значення  $EC_{50}$  Танезумабу склало 146 нг/мл.

5 <ПРИКЛАД 6: Оцінювання активності, що інгібує зв'язування, антитіл до людського NGF проти людського NGF>

Конкурентний аналіз ELISA, використаний в прикладі 2 для оцінювання інгібування зв'язування NGF-trkA, застосовували для вимірювання активності, що інгібує зв'язування, антитіла h1f.6 проти людського NGF. Як контроль використовували антитіло порівняння  
10 Танезумаб.

Тест проводили чотири рази для антитіла h1f.6 і три рази для танезумабу, і брали геометричні середні розрахованих значень  $IC_{50}$ . У результаті, значення  $IC_{50}$  для антитіла h1f.6 відносно інгібування зв'язування людського NGF-trkA склало 0,31 мкг/мл, у той час як значення  $IC_{50}$  для Танезумабу відносно інгібування зв'язування людського NGF-trkA склало 0,86 мкг/мл.

15 <ПРИКЛАД 7: Оцінювання антитіла на місцеве утримування в тканині, активність зв'язування з людським NGF, і активність, пов'язану з функціональним інгібуванням людського NGF>

Після місцевого введення антитіла h1f.6 оцінювали концентрацію антитіла в тканині, в яку вводили, для оцінювання місцевого утримування. Антитіло h1f.6 місцево вводили в стеговий м'яз здорових щурів у дозах 0,3 і 3 мг/кг з  $n=4$  для кожної дози, і вимірювали концентрації антитіла в стеговому м'язі через 6 годин після введення за допомогою електрохемілюмінесцентного аналізу (ECL). Місцеве введення проводили шляхом ін'єкції антитіла в стеговий м'яз з об'ємною дозою 0,2 мл/кг з використанням PBS як розчинника.

Гомогенат стегового м'яза одержували, додаючи 2,5-кратний об'єм розчину для гомогенату тканини (10 мМ Трис, 137 мМ NaCl, cOmplete, Mini (Roche), pH 8,0) до зібраної тканини стегового м'яза. Два типи антитіл до 1-15, АНК-IBL-13A і біотинільоване АНК-IBL-52A, які одержували при імунізації миші антитілом 1-15 (PTL 3), отриманим при імунізації миші VelocImmune людським NGF, використовували для вимірювання в аналізі ECL. На додаток, одержували біотинільоване АНК-IBL-52A шляхом біотинілювання АНК-IBL-52A згідно з  
30 технічним посібником для Biotin Labeling Kit-NH2 (Dojindo Laboratories, LK03).

Спосіб аналізу ECL показаний далі. Антитіло до 1-15, АНК-IBL-13A, розводили TBS до концентрації 1000 нг/мл і додавали до 96-лункового планшету Multi-array (Meso Scale Discovery, L15XA-6) по 25 мкл/лунку. Планшет інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі, щоб іммобілізувати АНК-IBL-13A. Розчин АНК-IBL-13A видаляли центрифугуванням у переверненому вигляді, планшет відмивали три рази розчином для відмивання (TBS, що містить 0,05 % Tween-20), і додавали по 150 мкл/лунку Blocker Caseine в TBS (Thermo, 37532). Після інкубації протягом 1 години при кімнатній температурі, Blocker Caseine в TBS видаляли центрифугуванням у переверненому вигляді, і планшет відмивали три рази, потім додавали 25 мкл/лунку розведеного у 100 разів гомогенату стегового м'яза у розріджувачі (Blocker Caseine в TBS, що містить 0,05 % Tween-20) і, для зразків, які потрібно було розвести додатково, розведеного розріджувачем, що містить 1 % гомогенату стегового м'яза без антитіла, щоб потрапити у діапазон калібрувальної кривої. Для одержання калібрувальної кривої гомогенату стегового м'яза, антитіло h1f.6, розведене у 10 етапів у діапазоні від 10000 нг/мл до 0,51 нг/мл з використанням розріджувача, було розведене у 100 разів розріджувачем, що містить 1 % гомогенату стегового м'яза без антитіла. Розріджувач, що містить 1 % гомогенату стегового м'яза без антитіла, використовували як контроль. Після інкубації протягом 1 години при кімнатній температурі, розчин видаляли центрифугуванням у переверненому вигляді, планшет відмивали три рази розчином для відмивання, і додавали в лунку 25 мкл біотинільованого АНК-IBL-52A, розведеного до 300 нг/мл розріджувачем. Після інкубації протягом 1 години при  
50 кімнатній температурі, розчин видаляли центрифугуванням у переверненому вигляді, планшет відмивали три рази розчином для відмивання, і додавали в лунку 25 мкл стрептавідину MSD SULFO-TAG (Meso Scale Discovery, R32AD-1), розведеного до 1000 нг/мл розріджувачем. Після інкубації протягом 1 години при кімнатній температурі, розчин видаляли центрифугуванням у переверненому вигляді і планшет відмивали три рази розчином для відмивання. Після цього додавали в лунку 150 мкл MSD Read Buffer T(4x) з поверхнево-активною речовиною (Meso Scale Discovery, R92TC-2), розведеного у два рази ультрачистою водою (MilliQ (zareєстрована торговельна марка), Merck), електрохемілюмінесценцію зразків вимірювали за допомогою SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Discovery).

Була побудована калібрувальна крива для розрахунку концентрації антитіла. Рівняння регресії аналізували за допомогою алгоритму підбору з чотирипараметричною логістичною  
60

кривою. З використанням калібрувальної кривої розраховували концентрації антитіла в стегновому м'язі для кожної точки. Кожний тест проводили у двох повтореннях, і розраховували арифметичне середнє концентрацій.

Після місцевого введення антитіла h1f.6 по 0,3 і 3 мг/кг в стеговий м'яз, концентрації в стегновому м'язі склали 2,66 і 67,9 мкг/мл, відповідно, через 6 годин після введення.

Для оцінювання кількості антитіла h1f.6, яке має активність зв'язування з людським NGF, в стегновому м'язі, проводили аналіз зв'язування з людським NGF за допомогою ELISA.

Людський NGF (R&D Systems, 256-GF/CF), розведений PBS до концентрації 1000 нг/мл додавали в білий 384-лунковий планшет Nunc MaxiSorp (Nunc, 460372) по 20 мкл/лунку і іммобілізували шляхом інкубації протягом ночі при 4 °C. Розчин людського NGF видаляли центрифугуванням у переверненому вигляді, у планшет додавали по 80 мкл/лунку Blocking One (Nacalai Tesque, Inc., 03953-95), і планшет інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі. Планшет відмивали три рази розчином для відмивання (TBS, що містить 0,05 % Tween-20), і додавали в лунку по 20 мкл гомогенату стегового м'яза з групи з введенням 0,3 мг/кг і групи з введенням 3 мг/кг, які розводили у 10 і 100 разів, відповідно, з розведеним у 10 разів Blocking One в TBS, що містить 0,05 % Tween-20.

Для побудови калібрувальної кривої для гомогенату стегового м'яза з групи з введенням 0,3 мг/кг і групи з введенням 3 мг/кг, антитіла h1f.6 розводили у 11 етапів у діапазоні від 3000 до 0,03 нг/мл розріджувачем, приготуванням шляхом додавання гомогенату стегового м'яза без антитіла у концентрації 10 і 1 %, відповідно, до Blocking One, який був розведений у 10 разів TBS, що містить 0,05 % Tween-20, і додавали по 20 мкл/лунку.

Після інкубації протягом 1 години при кімнатній температурі, планшет відмивали три рази розчином для відмивання і додавали в лунку 20 мкл розведеного у 2500 разів біотинільованого антитіла до людського легкого ланцюга каппа (IBL, 17249) в розведеному у 10 разів Blocking One в TBS, що містить 0,05 % Tween-20. Після інкубації протягом 1 години при кімнатній температурі, планшет відмивали три рази розчином для відмивання, додавали в лунку 20 мкл розведеного у 8000 разів високочутливого стрептавідину-HRP (Thermo, 21130) в розведеному у 10 разів Blocking One в TBS, що містить 0,05 % Tween-20, і планшет інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі. Планшет відмивали три рази розчином для відмивання і додавали в лунку 20 мкл хемілюмінесцентної речовини (BM Chemiluminescence ELISA Substrate (POD); Roche, 11582950001), потім вимірювали величину сигналу за допомогою лічильника EnVision (Perkin Elmer). Кожний тест проводили у двох повтореннях, і побудували калібрувальну криву, щоб розрахувати кількість антитіла h1f.6, яке має активність зв'язування з людським NGF. Рівняння регресії аналізували за допомогою алгоритму підбору з чотирипараметричною логістичною кривою, і розраховували кількість антитіла, яке має активність зв'язування з людським NGF, для кожної точки на основі калібрувальної кривої. Кількість антитіла h1f.6, яке має активність зв'язування з людським NGF, в стегновому м'язі розраховували, помножуючи отримані значення для групи з введенням 0,3 мг/кг і групи з введенням 3 мг/кг на 35 і 350, відповідно, і одержували арифметичне середнє.

Таким чином, кількість антитіла h1f.6, яке має активність зв'язування з людським NGF, для групи з введенням 0,3 мг/кг склала 2,12 мкг/мл і для групи з введенням 3 мг/кг склала 77,9 мкг/мл.

Ці результати, які належать до концентрації антитіла h1f.6 і кількості антитіла h1f.6, що має активність зв'язування з людським NGF, в стегновому м'язі, показали, що майже усе антитіло, що знаходиться в стегновому м'язі, є антитілом, яке має активність зв'язування з людським NGF.

Далі, для оцінювання активності, пов'язаної з інгібуванням зв'язування відносно людського NGF в стегновому м'язі, проводили конкурентний аналіз ELISA з людським NGF-trkA, який спрямований на інгібування зв'язування між людським NGF і його рецептором trkA як індикатор.

Людський trkA (R&D Systems, 175-TK-050), розведений PBS до концентрації 2000 нг/мл, додавали в білий 384-лунковий планшет Nunc MaxiSorp по 20 мкл/лунку і іммобілізували інкубуванням протягом ночі при 4 °C. Розчин людського trkA видаляли центрифугуванням у переверненому вигляді і додавали Blocker Caseine в TBS по 80 мкл/лунку, і планшет інкубували протягом 30 хв при кімнатній температурі. Планшет відмивали три рази розчином для відмивання (TBS, що містить 0,05 % Tween-20) для видалення Blocker Caseine в TBS. Гомогенат стегового м'яза щура, розведений у 5 разів для групи з введенням 0,3 мг/кг і розведений у 50 разів для групи з введенням 3 мг/кг за допомогою PBS, що містить 0,1 % BSA, змішували кожний з 0,4 мкг/мл біотинільованого людського NGF у однакових кількостях, і інкубували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, і додавали отримані зразки по 20 мкл/лунку. Оскільки зібрані м'язові тканини розводили розчином для гомогенату тканини, який у 2,5 рази



перевищував кількість м'язових тканин, концентрації антитіла в стегновому м'язі для групи з введенням 0,3 мг/кг і групи з введенням 3 мг/кг оцінювали з використанням розчинів з розведенням у 35 разів і 350 разів, відповідно.

Біотинілюваний людський NGF, застосовуваний у даному документі, одержували шляхом біотинілювання людського NGF (R&D Systems, 256-GF-100/CF) за допомогою EZ-Link NHS-PEG4-Biotine (Thermo Scientific, 21329). Біотинілювання людського NGF проводили, додаючи 5 мкл 5 мМ розчину NHS-PEG4-Biotine до 1 мл 0,4 мг/мл людського NGF, інкубуючи протягом 2 годин на льоду у темряві, і замінюючи розчин реакційної суміші на PBS з використанням Amicon Ultra 3K на 0,5 мл (Millipore, UFC500324) двічі згідно з посібником.

PBS, що містить 0,1 % BSA, і 10 мкг/мл антитіла h1f.6, розведеного PBS, що містить 0,1 % BSA, використовували як контроль. Контрольні зразки для групи з введенням 0,3 мг/кг і групи з введенням 3 мг/кг розводили PBS, що містить 0,1 % BSA, який містив 10 і 1 % гомогенату стегового м'яза без антитіла, відповідно. Після інкубації протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, планшет відмивали три рази розчином для відмивання і додавали в лунку 20 мкл розведеного у 1000 разів і міченого лужною фосфатазою стрептавідину (Thermo, 21324) в розведеному у 20 разів Blocking One в TBS, що містить 0,05 % Tween-20. Після інкубації протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, планшет відмивали три рази розчином для відмивання і додавали 20 мкл/лунку субстрату для лужної фосфатази (Хемілюмінесцентний субстрат для ЛФ для мікролунок/мембран, суперчутливий, 450 нм; SurModics, APU4-0100-01), змішаного у співвідношенні 1:1 з розведеним у 10 разів розчином 200 мМ буфера Трис (pH 9,8), що містить 10 мМ хлориду магнію. Після інкубації протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, величину сигналу вимірювали лічильником EnVision (Perkin Elmer).

Для розрахунку активності антитіла, пов'язаної з інгібуванням зв'язування людського NGF для кожної концентрації, виміряну величину для PBS, що містить 0,1 % BSA, приймали за 0 % і виміряну величину максимальної концентрації кожного антитіла приймали за 100 %. Тест проводили у двох повтореннях (з 4 або 8 лунками для контролю), і одержували арифметичне середнє.

Таким чином, група з введенням 0,3 мг/кг показала активність, пов'язану з інгібуванням зв'язування, 21,2 % навіть в умовах, коли концентрація антитіла в стегновому м'язі розведена у 35 разів. Далі, група з введенням 3 мг/кг показала активність, пов'язану з інгібуванням зв'язування, 59,9 % в умовах, коли концентрація антитіла в стегновому м'язі розведена у 350 разів. Це підтверджує, що в тканинах стегового м'яза в групах, де антитіло h1f.6 вводять по 0,3 і 3 мг/кг, антитіло має активність, пов'язану з інгібуванням зв'язування проти людського NGF шляхом інгібування зв'язування між людським NGF і його рецептором trkA.

Вищевказане ясно демонструє, що Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за даним винаходом, антитіло h1f.6, зберігає свою концентрацію в тканині-мішені і активність зв'язування з людським NGF при місцевому введенні, і, таким чином, інгібує зв'язування між людським NGF і його рецептором. Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за даним винаходом, антитіло h1f.6, має високий потенціал для забезпечення чудового лікарського засобу, який проявляє бажані ефекти лікарського засобу для місцевого впливу в тканині-мішені з меншим рівнем місцевої дози.

<ПРИКЛАД 8: Оцінювання аналгетичних ефектів на моделі післяопераційного болю у щурів після розсічення підшви>

Аналгетичні впливи антитіла h1f.6 на післяопераційний біль при місцевому введенні в ділянку операції оцінювали на щуриній моделі післяопераційного болю з розсіченням підшви [Banik RK et al. Pain 2005; 117. р. 68-76], яка розглядається як відображення післяопераційного болю в клінічній моделі. Патентний документ 3 показує, що системне внутрішньовенне введення повністю людського антитіла 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG до людського NGF демонструє аналгетичний ефект на цій моделі. В цьому дослідженні, 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG застосовували для порівняння післяопераційного болю при місцевому і системному введенні для оцінювання аналгетичних ефектів при місцевому введенні антитіла h1f.6.

Конкретно, усього було п'ять груп, кожна група з операцією включала 10 щурів, і кожна група без операції включала 5 щурів, групи являли собою групу без операції, групу з розчинником (20 мМ цитрату, 120 мМ NaCl, pH6), групу, якій місцево вводили 900 мкг антитіла h1f.6 у підшву, групу, якій місцево вводили 900 мкг 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG у підшву, і групу, якій вводили 1 мг/кг 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG внутрішньовенно. Місцеве введення в підшву проводили, імплантуючи в розрізану частину підшовного м'яза шматочок листа Spongel (zareєстрована торговельна марка) (Astellas Pharma) приблизно в 2 мг, який був змочений і просочений 30 мкл 30 мг/мл розчину антитіла. Групі з розчинником і групі, якій вводили 1 мг/кг 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG внутрішньовенно, імплантували листи Spongel, які були змочені і просочені

розчинниками. В цьому оцінюванні, підошва лівої задньої лапи була розрізана приблизно на 10 мм у довжину прямою лінією, яка починалася від точки приблизно на 5 мм від кінця п'яти у напрямку до пальців, під анестезією ізофлураном, і підошовний м'яз, що відкрився, був розрізаний вертикально перед поверненням м'яза в його положення і імплантацією листа Spongel, потім м'яз був зшитий матрацим швом у двох точках з використанням нейлонової нитки. Больовий поріг вимірювали через 24 години, 48 годин і 72 години після операції. Больовий поріг досліджували з використанням динамічного підошовного естезіометра (Ugo Basile) для вимірювання тиску, що вказує на поведінку для відвертання тиску на щурину підошву.

Як больовий поріг розраховували арифметичне середнє трьох значень порога тиску, які викликали поведінку уникнення у окремих щурів в кожній групі, і ступінь покращення больового порога в кожній групі, якій вводили фармацевтичний засіб, розраховували, встановлюючи больовий поріг в групі без операції як 100 %, і больовий поріг в групі з розчинником як 0 %. У результаті, через 24 години після операції, рівні покращення больового порога в групі, якій місцево вводили 900 мкг антитіла h1f.6 у підошву, в групі, якій місцево вводили 900 мкг 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG у підошву, і в групі, якій вводили 1 мг/кг 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG внутрішньовенно, склали 34 %, 49 %, і 46 %, відповідно, і больовий поріг в кожній групі, якій вводили фармацевтичний засіб, показав значуще покращення з  $p < 0,05$  з t-критерієм Ст'юдента у порівнянні з групою з розчинником. Додатково, через 48 годин після операції, рівні покращення больового порога в групі, якій місцево вводили 900 мкг антитіла h1f.6 у підошву, в групі, якій місцево вводили 900 мкг 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG у підошву, і в групі, якій вводили 1 мг/кг 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG внутрішньовенно, склали 38 %, 31 %, і 34 %, відповідно, і больовий поріг в кожній групі, якій вводили фармацевтичний засіб, показав значуще покращення з  $p < 0,05$  з t-критерієм Ст'юдента у порівнянні з групою з розчинником. Додатково, через 72 години після операції, рівні покращення больового порога в групі, якій місцево вводили 900 мкг антитіла h1f.6 у підошву, в групі, якій місцево вводили 900 мкг 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG у підошву, і в групі, якій вводили 1 мг/кг 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG внутрішньовенно, склали 26 %, 33 %, і 28 %, відповідно, і больовий поріг в кожній групі, якій вводили фармацевтичний засіб, показав значуще покращення з  $p < 0,05$  з t-критерієм Ст'юдента у порівнянні з групою з розчинником. Коли проводили тест множинних порівнянь Тьюкі, ніяких значущих відмінностей з  $p < 0,05$  не спостерігали в больовому порозі в трьох групах, а саме, в групі, якій місцево вводили 900 мкг антитіла h1f.6 у підошву, в групі, якій місцево вводили 900 мкг 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG у підошву, і в групі, якій вводили 1 мг/кг 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG внутрішньовенно, ні через 24 години, ні через 48 годин, ні через 72 години після операції. Це показує, що анагетичні ефекти, спостережувані між цими трьома групами, є фармакологічно однаковими через 24 години, 48 годин і 72 години після операції, відповідно.

<ПРИКЛАД 9: Оцінювання концентрації лікарського засобу в плазмі або тканині при місцевому введенні>

Для оцінювання концентрації кожного антитіла в підошовному м'язі або в плазмі з оцінювання в прикладі 8, групу, якій місцево вводили 900 мкг антитіла h1f.6 у підошву, групу, якій місцево вводили 900 мкг 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG у підошву, і групу, якій вводили 1 мг/кг 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG внутрішньовенно виділяли у щурів з  $n=3$  способом, аналогічним до способу в прикладі 8, і вимірювали концентрацію антитіл в підошовному м'язі або в плазмі через 24 години після операції за допомогою електрохемілюмінесцентного аналізу (ECL). Місцеве введення в підошву проводили аналогічно до прикладу 8, імплантуючи в розрізану частину підошовного м'яза шматочок листа Spongel (zareєстрована торговельна марка) (Astellas Pharma) приблизно в 2 мг, який був змочений і просочений 30 мкл 30 мг/мл розчину антитіла.

Концентрацію антитіл в підошовному м'язі одержували, вимірюючи концентрацію зразків, які були гомогенізовані з 9-кратним об'ємом розчину гомогенату підошовної тканини (10 мМ Трис, 137 мМ NaCl, 1 % тритон X-100, 10 % гліцерин, cOmplete, Mini (Roche), pH 8,0), і помножуючи цю концентрацію на 10. Вимірювання за допомогою аналізу ECL проводили з використанням двох типів антитіл до 1-15, АНК-IBL-13A і біотинільованого АНК-IBL-52A. Крім того, біотинільоване АНК-IBL-52A одержували шляхом біотинільовання АНК-IBL-52A згідно з технічним посібником для Biotin Labeling Kit-NH2 (Dojindo Laboratories, LK03).

Спосіб аналізу ECL показаний далі. Антитіло до 1-15, АНК-IBL-13A, розведене TBS до концентрації 5000 нг/мл, додавали до 96-лункового планшету Multi-array (Meso Scale Discovery, L15XA-6) по 25 мкл/лунку. Планшет інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі, щоб іммобілізувати АНК-IBL-13A. Розчин АНК-IBL-13A видаляли центрифугуванням у переверненому вигляді, планшет відмивали три рази розчином для відмивання (TBS, що містить 0,05 % Tween-20), і додавали по 150 мкл/лунку Blocker Caseine в TBS (Thermo, 37532).

Після інкубації протягом 1 години при кімнатній температурі, Blocker Caseine в TBS видаляли центрифугуванням у переверненому вигляді. Планшет відмивали три рази розчином для відмивання, потім додавали 25 мкл/лунку розведеного у 10 разів зразка плазми гомогенату підшовного м'яза в розріджувачі (Blocker Caseine в TBS, що містить 0,05 % Tween-20).

Для одержання калібрувальної кривої для зразка плазми, одержували антитіло h1f.6 і 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG, розведені у 10 етапів у діапазоні від 333 нг/мл до 0,017 нг/мл розріджувачем, що містить 10 % плазму без антитіла, і розріджувач, що містить 10 % плазму без антитіла, використовували як контроль. Для одержання калібрувальної кривої для гомогенату підшовного м'яза, антитіло h1f.6 і 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG розведені у 10 етапів у діапазоні від 333 нг/мл до 0,017 нг/мл розріджувачем, що містить 10 % гомогенат підшовного м'яза без антитіла. Розріджувач, що містить 10 % гомогенат підшовного м'яза без антитіла, використовували як контроль. Після інкубації протягом 1 години при кімнатній температурі, розчин видаляли центрифугуванням у переверненому вигляді. Планшет відмивали три рази розчином для відмивання, і додавали в лунку 25 мкл біотинільованого АНК-IBL-52A, розведеного до 1000 нг/мл розріджувачем, і планшет інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі. Розчин видаляли центрифугуванням у переверненому вигляді, планшет відмивали три рази розчином для відмивання, і додавали в лунку 25 мкл стрептавідину MSD SULFO-TAG (Meso Scale Discovery, R32AD-1), розведеного у 500 разів розріджувачем. Планшет інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі, розчин видаляли центрифугуванням у переверненому вигляді, і планшет відмивали три рази розчином для відмивання. Після цього додавали в лунку 150 мкл MSD Read Buffer T(4x) (Meso Scale Discovery, R92TC-1), розведеного у два рази ультрочищеною водою (MilliQ (zareestrovana torovel'na marka), Merck), електрохемілюмінесценцію зразків вимірювали за допомогою SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Discovery).

Була побудована калібрувальна крива для розрахунку концентрації антитіла. Рівняння регресії аналізували за допомогою алгоритму підбору з чотири- або п'ятипараметричною логістичною кривою, концентрації антитіла в плазмі і підшовному м'язі розраховували для кожної точки. Кожний тест проводили в трьох повтореннях, і одержували арифметичне середнє розрахованих концентрацій. Границя визначення антитіла h1f.6 в цьому тесті склала 0,2 нг/мл для концентрації в плазмі, і 2 нг/мл для концентрації в підшовному м'язі, і границя визначення повністю людського антитіла до NGF 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG склала 0,5 нг/мл для концентрації в плазмі, і 2 нг/мл для концентрації в підшовному м'язі.

Концентрація в підшовному м'язі в групі, якій місцево вводили 900 мкг антитіла h1f.6 у підшову, групі, якій місцево вводили 900 мкг 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG у підшову, і групі, якій вводили 1 мг/кг 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG внутрішньовенно, через 24 години після введення склала 132 нг/мл, 46,2 нг/мл, і 24,1 нг/мл, відповідно. Концентрація в підшовному м'язі була найбільшою для введення антитіла h1f.6 у підшову. З іншого боку, концентрація в плазмі через 24 години після введення була менше ніж 0,230 нг/мл (з трьох прикладів, один був 0,230 нг/мл, і два були менше ніж 0,2 нг/мл), 65,1 нг/мл, 396 нг/мл, відповідно, і концентрація в плазмі була найбільш низькою для місцевого введення антитіла h1f.6 у підшову.

На основі концентрації кожного антитіла в підшовному м'язі і в плазмі, розраховували співвідношення концентрацій в підшовному м'язі/плазмі через 24 години після введення для групи, якій місцево вводили 900 мкг антитіла h1f.6 у підшову, групи, якій місцево вводили 900 мкг 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG у підшову, і групи, якій вводили 1 мг/кг 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG внутрішньовенно. Концентрація в плазмі через 24 години після введення для індивідуумів, яким вводили 900 мкг антитіла h1f.6 у підшову була призначена величиною границі визначення, 0,2 нг/мл, оскільки вона була нижче границі визначення в цих умовах.

Співвідношення концентрацій в підшовному м'язі/плазмі через 24 години після введення для групи, якій місцево вводили 900 мкг антитіла h1f.6 у підшову, групи, якій місцево вводили 900 мкг 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG у підшову, і групи, якій вводили 1 мг/кг 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG внутрішньовенно, склали 628, 0,71, і 0,061, відповідно. Співвідношення концентрацій в підшовному м'язі/плазмі для 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG, яке вводили у підшову, було більше ніж і 10 разів вище, ніж для внутрішньовенного введення. Антитіло h1f.6 продемонструвало співвідношення концентрацій в підшовному м'язі/плазмі більше ніж у 800 разів високе, ніж 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG, при порівнянні їх місцевого введення у підшову.

Вищеописані результати вказують на те, що місцеве введення антитіла h1f.6, яке являє собою Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за даним винаходом, може знижувати концентрацію лікарського засобу у системному кровотоку, з одночасним збереженням концентрації лікарського засобу у цільовому місцевому осередку, і додатково демонструють, що воно знижує концентрацію лікарського засобу у системному кровотоку з одночасним

збереженням концентрації лікарського засобу у цільовому місцевому осередку більш ефективно ніж повністю людське антитіло до NGF 1-15 (N52D-A)-Fab'-10k PEG. Як такий, Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за даним винаходом, має високий потенціал для забезпечення чудового лікарського засобу, який знижує системні побічні ефекти, одночасно проявляючи бажані ефекти лікарського засобу у місцевому осередку.

#### ПРОМИСЛОВА ПРИДАТНІСТЬ

Очікується, що Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за даним винаходом буде корисним для лікування післяопераційного болю. Очікується, що Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за даним винаходом буде особливо корисним як покращений фармацевтичний засіб, який знижує системні побічні ефекти від системного впливу у крові, одночасно проявляючи бажані ефекти лікарського засобу у місцевому осередку.

#### СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ У ДОВІЛЬНІЙ ФОРМІ

Пояснення наведені для "Штучної Послідовності", описаної для кожного числового показника <223> зі списку послідовностей, показаного далі. Конкретно, послідовність основ, показана в SEQ ID NO:1 зі списку послідовностей, являє собою послідовність основ фрагмента важкого ланцюга з антитіла h1f.6, і амінокислотна послідовність, показана в SEQ ID NO:5 зі списку послідовностей, являє собою амінокислотну послідовність фрагмента важкого ланцюга, що кодується SEQ ID NO:1. Послідовність основ, показана в SEQ ID NO:2 зі списку послідовностей, являє собою послідовність основ фрагмента важкого ланцюга з антитіла h1f.7, і амінокислотна послідовність, показана в SEQ ID NO:6 зі списку послідовностей, являє собою амінокислотну послідовність фрагмента важкого ланцюга, що кодується SEQ ID NO:2. Послідовність основ, показана в SEQ ID NO:3 зі списку послідовностей, являє собою послідовність основ фрагмента важкого ланцюга з антитіла h1f.8, і амінокислотна послідовність, показана в SEQ ID NO:7 зі списку послідовностей, являє собою амінокислотну послідовність фрагмента важкого ланцюга, що кодується SEQ ID NO:3. Послідовність основ, показана в SEQ ID NO:4 зі списку послідовностей, являє собою послідовність основ легкого ланцюга з 1-15(N52D-A) Fab'-фрагмента, і амінокислотна послідовність, показана в SEQ ID NO:8 зі списку послідовностей, являє собою амінокислотну послідовність легкого ланцюга, що кодується SEQ ID NO:4. Послідовність основ, показана в SEQ ID NO:9 зі списку послідовностей, являє собою послідовність основ варіабельної ділянки важкого ланцюга з Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за даним винаходом, і амінокислотна послідовність, показана в SEQ ID NO:10 зі списку послідовностей, являє собою амінокислотну послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, що кодується SEQ ID NO:9. Послідовність основ, показана в SEQ ID NO:11 зі списку послідовностей, являє собою послідовність основ варіабельної ділянки легкого ланцюга з Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за даним винаходом, і амінокислотна послідовність, показана в SEQ ID NO:12 зі списку послідовностей, являє собою амінокислотну послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, що кодується SEQ ID NO:11.

#### СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Astellas Pharma Inc.

<120> НОВИЙ ФАВ-ФРАГМЕНТ АНТИТІЛА ДО ЛЮДСЬКОГО NGF

<130> FA1535-16021

<150> JP2015-104806

<151> 2015-05-22

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 675

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ДНК, що кодує фрагмент важкого ланцюга h1f.6

<400> 1  
caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc  
60

5 acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctgggt ccgccagccc  
120

ccaggggaagg ggctggagtg gattggggaa atcgaccata gtggaagcac caacaacaac  
180

10 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtaggcacgt ccaagaacca gttctccctg  
240

15 aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgttcgag agatgggggc  
300

cccgaatcgg ggatgggggc ttttgatata tggggccaag ggacaatggg caccgtctcc  
360

20 tcagcctcca ccaagggccc atcgggtcttc ccctggcac cctcctcaa gagcacctct  
420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg  
480

25 tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc  
540

30 tcaggactct actcccttag tagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag  
600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag  
660

35 cccaaatctt gtgac  
675

<210> 2  
40 <211> 672  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
45 <223> ДНК, що кодує фрагмент важкого ланцюга hlf.7

<400> 2  
caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc  
60

50 acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctgggt ccgccagccc  
120

ccaggggaagg ggctggagtg gattggggaa atcgaccata gtggaagcac caacaacaac  
180

55 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtaggcacgt ccaagaacca gttctccctg  
240

aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgttcgag agatgggggc  
300

5 cccgaatcgg ggatgggggc ttttgatata tggggccaag ggacaatggt caccgtctcc  
360

tcagcctcca ccaagggccc atcgggtcttc cccttggcac cctcctccaa gagcacctct  
420

10 gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg  
480

15 tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc  
540

tcaggactct actcccttag tagcgtgggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccacg  
600

20 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag  
660

cccaaattctt gt  
672

25

<210> 3  
<211> 678  
<212> ДНК  
30 <213> Штучна послідовність

<220>  
<223> ДНК, що кодує фрагмент важкого ланцюга hlf.8

35 <400> 3  
caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc  
60

40 acctgcgctg tctatgggtg gtccttcagt ggttactact ggagctgggt cggccagccc  
120

ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcgaccata gtggaagcac caacaacaac  
180

45 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtaggcacgt ccaagaacca gttctccctg  
240

aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgttcgag agatgggggc  
300

50 cccgaatcgg ggatgggggc ttttgatata tggggccaag ggacaatggt caccgtctcc  
360

tcagcctcca ccaagggccc atcgggtcttc cccttggcac cctcctccaa gagcacctct  
420

55 gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg  
480

tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc  
540

5 tcaggactct actcccttag tagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccacg  
600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag  
660

10 cccaaatctt gtgcagcc  
678

15 <210> 4  
<211> 657  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

20 <220>  
<223> ДНК, що кодує легкий ланцюг 1-15 (N52D-A)-Fab'-фрагмента

<400> 4  
gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc  
25 60

atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg catagtaatg gattcaacta tttgggttgg  
120

30 tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atttgggttc taatcggggc  
180

tccgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac tctgaaaatc  
240

35 agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaagctct acaaactccg  
300

tacacttttg gccaggggac caagctggag atcaaacgga ctgtggctgc accatctgtc  
40 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg  
420

45 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa  
480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc  
540

50 agcagacccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcttgcgaa  
600

gtcaccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt  
55 657

<210> 5

<211> 225  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність

5 <220>  
 <223> фрагмент важкого ланцюга hlf.6

<400> 5

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

15 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr  
 20 25 30

20 Tyr Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Glu Ile Asp His Ser Gly Ser Thr Asn Asn Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60

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

30 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser  
 85 90 95

35 Arg Asp Gly Gly Pro Glu Ser Gly Met Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly  
 100 105 110

40 Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125

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

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

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

55 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His



# UA 123209 C2

	195		200		205
5	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys				
	210		215		220
10	Asp				
	225				
	<210> 6				
	<211> 224				
	<212> Білок				
15	<213> Штучна послідовність				
	<220>				
	<223> фрагмент важкого ланцюга hlf.7				
20	<400> 6				
	Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu				
	1 5 10 15				
25	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr				
	20 25 30				
30	Tyr Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile				
	35 40 45				
35	Gly Glu Ile Asp His Ser Gly Ser Thr Asn Asn Asn Pro Ser Leu Lys				
	50 55 60				
	Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Gly Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu				
40	65 70 75 80				
	Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser				
	85 90 95				
45	Arg Asp Gly Gly Pro Glu Ser Gly Met Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly				
	100 105 110				
50	Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser				
	115 120 125				
55	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala				
	130 135 140				
	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val				

145 150 155 160

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

10 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
180 185 190

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
210 215 220

20 <210> 7  
<211> 226  
<212> Білок  
<213> Штучна послідовність

25 <220>  
<223> фрагмент важкого ланцюга h1f.8  
  
<400> 7

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

35 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr  
20 25 30

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

40 Gly Glu Ile Asp His Ser Gly Ser Thr Asn Asn Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

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

50 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser  
85 90 95

55 Arg Asp Gly Gly Pro Glu Ser Gly Met Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

# UA 123209 C2

	115		120		125														
5	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala			
	130						135					140							
10	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val			
	145					150					155					160			
15	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala			
					165					170					175				
20	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val			
				180					185					190					
25	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His			
			195					200					205						
30	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys			
	210						215					220							
35	Ala	Ala																	
	225																		
	<210>	8																	
	<211>	219																	
	<212>	Білок																	
	<213>	Штучна послідовність																	
	<220>																		
	<223>	легкий ланцюг 1-15 (N52D-A) -Fab'-фрагмента																	
40	<400>	8																	
45	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly			
	1				5					10					15				
50	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser			
				20					25					30					
55	Asn	Gly	Phe	Asn	Tyr	Leu	Gly	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser			
		35						40					45						
60	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Pro			
	50						55					60							
	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile			

# UA 123209 C2

	65		70		75		80									
5	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Ala
				85					90						95	
10	Leu	Gln	Thr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
				100					105					110		
15	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
			115					120					125			
20	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
		130					135					140				
25	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
	145					150					155				160	
30	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
				165						170					175	
35	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
			180					185						190		
40	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
			195					200					205			
45	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys					
		210					215									
50	<210>	9														
	<211>	363														
	<212>	ДНК														
	<213>	Штучна послідовність														
55	<220>															
	<221>	кодуюча послідовність														
	<222>	(1)..(363)														
	<400>	9														
	cag	gtg	cag	cta	cag	cag	tgg	ggc	gca	gga	ctg	ttg	aag	cct	tcg	gag
	48															
	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Trp	Gly	Ala	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Glu
	1			5					10					15		

acc ctg tcc ctc acc tgc gct gtc tat ggt ggg tcc ttc agt ggt tac  
96  
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr  
20 25 30

5 tac tgg agc tgg gtc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag tgg att  
144  
Tyr Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

10 ggg gaa atc gac cat agt gga agc acc aac aac aac ccg tcc ctc aag  
192  
Gly Glu Ile Asp His Ser Gly Ser Thr Asn Asn Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

15 agt cga gtc acc ata tca gta ggc acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg  
240  
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Gly Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

20 aag ctg agc tct gtg acc gcc gcg gac acg gct gtg tat tac tgt tcg  
288  
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser  
85 90 95

25 aga gat ggg ggc ccc gaa tcg ggg atg ggg gct ttt gat atc tgg ggc  
336  
Arg Asp Gly Gly Pro Glu Ser Gly Met Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly  
100 105 110

30 caa ggg aca atg gtc acc gtc tcc tca  
363  
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120

35 <210> 10  
<211> 121  
<212> Білок  
40 <213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетична конструкція

45 <400> 10

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

50 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr  
20 25 30

55 Tyr Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

# UA 123209 C2

Gly Glu Ile Asp His Ser Gly Ser Thr Asn Asn Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60

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

10 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser  
 85 90 95

15 Arg Asp Gly Gly Pro Glu Ser Gly Met Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

20 <210> 11  
 <211> 339  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

25 <220>  
 <223> Ген VL антитіла до людського NGF

30 <220>  
 <221> кодує послідовність  
 <222> (1)..(339)

35 <400> 11  
 gat att gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga  
 48  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15

40 gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agt cag agc ctc ctg cat agt  
 96  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30

45 aat gga ttc aac tat ttg ggt tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct  
 144  
 Asn Gly Phe Asn Tyr Leu Gly Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

50 cca cag ctc ctg atc tat ttg ggt tct aat cgg gcc tcc ggg gtc cct  
 192  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

55 gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt act ctg aaa atc  
 240  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc atg caa gct  
 288  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
 5 85 90 95  
  
 cta caa act ccg tac act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa  
 336  
 Leu Gln Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 10 100 105 110  
  
 cgg  
 339  
 Arg  
 15  
  
 <210> 12  
 <211> 113  
 20 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> Синтетична конструкція  
 25  
 <400> 12  
  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 30  
  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 35  
 Asn Gly Phe Asn Tyr Leu Gly Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 40 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 45 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
 85 90 95  
 50  
  
 Leu Gln Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 55  
 Arg

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Fab-фрагмент антитіла до людського NGF, вибраний з групи, що складається з (а) і (b) нижче:  
 (а) Fab-фрагмент антитіла до людського NGF, що містить фрагмент важкого ланцюга, що  
 5 складається з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 5, і легкий ланцюг, що  
 складається з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 8; і,  
 (b) Fab-фрагмент антитіла до людського NGF, отриманий шляхом посттрансляційної  
 модифікації Fab-фрагмента антитіла до людського NGF з (а).
2. Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за п. 1, що містить фрагмент важкого ланцюга, що  
 10 складається з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 5, і фрагмент легкого  
 ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 8.
3. Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за п. 1, де вказана посттрансляційна модифікація  
 являє собою піроглутамінування на N-кінці варіабельної ділянки важкого ланцюга.
4. Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за п. 1, що містить фрагмент важкого ланцюга, що  
 15 складається з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 5, де глутамін в  
 амінокислотному положенні 1 SEQ ID NO: 5 модифікований у піроглутамінову кислоту, і  
 фрагмент легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID  
 NO: 8.
5. Полінуклеотид, що містить послідовність основ, що кодує фрагмент важкого ланцюга з Fab-  
 20 фрагмента антитіла до людського NGF за п. 1.
6. Експресуючий вектор, вибраний з групи, що складається з (а) і (b), показаних нижче:  
 (а) експресуючий вектор, що включає полінуклеотид, що містить послідовність основ, що кодує  
 фрагмент важкого ланцюга Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за п. 1, і полінуклеотид,  
 що містить послідовність основ, що кодує легкий ланцюг вказаного Fab-фрагмента антитіла до  
 25 людського NGF; і  
 (b) експресуючий вектор, що включає полінуклеотид, що містить послідовність основ, що кодує  
 фрагмент важкого ланцюга Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за п. 1.
7. Клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором за п. 6.
8. Клітина-хазяїн за п. 7, вибрана з групи, що складається з (а) і (b), показаних нижче:  
 30 (а) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що включає полінуклеотид, що  
 містить послідовність основ, що кодує фрагмент важкого ланцюга Fab-фрагмента антитіла до  
 людського NGF за п. 1, і полінуклеотид, що містить послідовність основ, що кодує легкий ланцюг  
 вказаного Fab-фрагмента антитіла до людського NGF; і  
 (b) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що включає полінуклеотид, що  
 35 містить послідовність основ, що кодує фрагмент важкого ланцюга Fab-фрагмента антитіла до  
 людського NGF за п. 1, і експресуючим вектором, що включає полінуклеотид, що містить  
 послідовність основ, що кодує легкий ланцюг вказаного Fab-фрагмента антитіла до людського  
 NGF.
9. Спосіб одержання Fab-фрагмента антитіла до людського NGF, що включає культивування  
 40 клітини-хазяїна за п. 8 для експресії Fab-фрагмента антитіла до людського NGF.
10. Fab-фрагмент антитіла до людського NGF, здатний вироблятися за способом за п. 9.
11. Фармацевтична композиція, що містить Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за будь-  
 яким з пп. 1-4 і 10 і фармацевтично прийнятний носій.
12. Фармацевтична композиція за п. 11, яка являє собою фармацевтичну композицію для  
 45 місцевого введення для лікування післяопераційного болю.
13. Фармацевтична композиція, що містить Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за п. 2,  
 Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за п. 4, і фармацевтично прийнятний носій.
14. Фармацевтична композиція за п. 13, яка являє собою фармацевтичну композицію для  
 місцевого введення для лікування післяопераційного болю.
15. Застосування Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за будь-яким з пп. 1-4 і 10 для  
 50 одержання фармацевтичної композиції для місцевого введення для лікування  
 післяопераційного болю.
16. Застосування Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за будь-яким з пп. 1-4 і 10 для  
 лікування післяопераційного болю шляхом місцевого введення.
17. Fab-фрагмент антитіла до людського NGF за будь-яким з пп. 1-4 і 10 для застосування для  
 55 місцевого введення для лікування післяопераційного болю.
18. Спосіб лікування післяопераційного болю, що включає місцеве введення індивідууму  
 ефективного кількості Fab-фрагмента антитіла до людського NGF за будь-яким з пп. 1-4 і 10.



