

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090031** (13) **A2**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.04.30

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

(22) Дата подачи заявки
2013.08.21

(54) ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ GFR α 3 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **61/692,029**

(32) **2012.08.22**

(33) **US**

(62) **201590402; 2013.08.21**

(71) Заявитель:
**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛС,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Кролл Съюзан Д., Макдоналд Линн,
Мерфи Эндрю Джей (US)**

(74) Представитель:
**Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Глухарёва А.О., Гизатуллина
Е.М., Строкова О.В., Лебедев В.В.,
Костюшенкова М.Ю., Гизатуллин
Ш.Ф., Парамонова К.В. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с человеческим GFR α 3, и к способам их применения. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антителами являются полностью человеческие антитела, которые связываются с человеческим GFR α 3. Антитела в соответствии с настоящим изобретением применимы для лечения заболеваний и расстройств, ассоциированных с одной или несколькими биологическими активностями GFR α 3, в том числе для лечения состояний острой или хронической боли или воспалительных состояний.

A2

202090031

202090031

A2

ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ GFR α 3 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к человеческим антителам и антиген-связывающим фрагментам человеческих антител, которые специфично связываются с семейством рецепторов-альфа-3 (GFR α 3) человеческого нейротрофического фактора линии глиальных клеток (GDNF), и к терапевтическим способам применения таких антител.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Связанное с нейротрофическим фактором линии глиальных клеток семейство состоит из нейротрофического фактора линии глиальных клеток (GDNF), нейротуринина (NRTN), артемина (ARTN) и персефина (PSPN). Каждый представитель семейства GDNF связывается с гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-заякоренным рецептором, ассоциированным с плазматической мембраной. Это семейство рецепторов называют семейством GDNF рецепторов-альфа (GFR α). Это семейство рецепторов состоит из четырех различных рецепторов GFR α - GFR α 1–4. GDNF преимущественно связывается с GFR α 1, NRTN преимущественно связывается с GFR α 2, ARTN преимущественно связывается с GFR α 3, а PSPN преимущественно связывается с GFR α 4. Каждый лиганд семейства GDNF передает сигнал через RET («реаранжированную во время трансфекции») рецепторную тирозинкиназу, которую впервые открыли как протоонкоген. RET активируется представителями семейства GDNF, только если сначала связывается лиганд с ее рецептором GFR α (Airaksinen, M.S., *et al.* Nature Reviews Neuroscience (2002), 3:383-394).

И ARTN, и GFR α 3 интенсивно экспрессируются в ходе развития и вовлечены в развитие симпатической нервной системы. У взрослых экспрессия GFR α 3 в значительной степени ограничивается сенсорными нейронами дорсальных корешковых ганглиев (DRG) (Orozco, O.E., *et al.*, European J. Neuroscience, (2001), 13:2177-2182). У взрослой мыши артемин экспрессируется в яичке, матке, щитовидной железе, предстательной железе и придатке яичка, а также в обонятельных луковицах и артериолах в кишечнике и мезентерии (Airaksinen, M.S., *et al.* Nature Reviews

Neuroscience (2002), 3:383-394; Airaksinen, M.S. *et al.*, Brain, Behavior and Evolution, (2006), 68:181-190).

В некоторых исследованиях была показана возможная роль GFR α 3 и артемина в гипералгезии. Например, было показано, что инъекция белка артемина в заднюю лапу грызуна вызывала тепловую гипералгезию, и эта ноцицепция усиливалась при совместном введении артемина с NGF (Malin, S.A., *et al.*, J. Neuroscience, (2006), 26(33): 8588-8599). В других исследованиях показали, что экспрессия mRNA артемина была повышена у мышинной модели воспаления (Elitt, C.M., *et al.*, J. Neuroscience, (2006), 26(33): 8578-8587). Кроме того, другие исследования показали, что у трансгенных по артемину мышей наблюдалась повышенная экспрессия TRPV1 и TRPA1, а также наблюдалась повышенная поведенческая чувствительность к теплу и холоду (Elitt, C.M., *et al.*, J. Neuroscience, (2006), 26(33): 8578-8587). Кроме того, возможную роль GFR α 3 в висцеральной гиперчувствительности показали в исследованиях на нокаутных по GFR α 3 мышах, в результате чего эти мыши демонстрировали ослабление висцеральной гиперчувствительности после внутритолстокишечной обработки с помощью TNBS (2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты) по сравнению с мышами C57BL/6 дикого типа (Tanaka, T., *et al.*, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. (2011), 300:G418-G424). Возможную роль артемина и его рецептора GFR α 3 в ассоциированной с панкреатитом боли показали в исследовании, выполненном на пациентах, подвергшихся резекции головки поджелудочной железы (Ceyhan, G.O., *et al.*, Gut, (2007), 56:534-544). Как следует из вышеизложенного, необходимы дальнейшие исследования для определения того, может ли лечение ингибитором активности GFR α принести пользу пациентам, страдающим болью/гипералгезией и/или гиперчувствительностью.

Антитела, которые связываются с GFR α 3, описаны в патенте США № 6861509. Кроме того, в патенте США № 6677135 раскрывается непротессированная последовательность GFR α 3, тогда как варианты сплайсинга молекулы GFR α 3 раскрываются в патенте США № 7026138, в заявках США № 2007/0232535 и № 2006/0216289. В патенте США № 7138251 раскрываются последовательности, обладающие 99% идентичностью к непротессированному GFR α 3, а также в этом патенте описано получение гуманизированных моноклональных антител против этой молекулы.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Первый аспект настоящего изобретения относится к полностью человеческим моноклональным антителам (mAb) и их антиген-связывающим фрагментам, которые связываются с человеческим GFR α 3 и ингибируют или блокируют его активность, например, блокируют связывание GFR α 3 с нейротрофическим фактором линии глиальных клеток артемином, а также, возможно, блокируют последующую активацию RET рецепторной тирозинкиназы и/или блокируют передачу сигнала через RET, и/или блокируют передачу сигнала через медиатор, отличный от RET. Антитела или их антиген-связывающие фрагменты могут быть применимы для лечения гипералгезии, аллодинии и/или гиперчувствительности к какому-либо сенсорному раздражителю, в том числе без ограничения к давлению, теплу и/или холоду. Антитела также могут быть использованы для лечения боли/гиперчувствительности, ассоциированной с широким диапазоном состояний и расстройств, при которых желательно блокирование взаимодействия GFR α 3 с артемином. Антитела также могут быть использованы для ингибирования роста, пролиферации и/или метастазирования опухолевых клеток.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антиген-связывающему фрагменту, которые специфично связываются с человеческим GFR α 3 и обладает одной или несколькими из следующих характеристик:

- (i) проявляют K_D , варьирующую от приблизительно 10^{-8} М до приблизительно 10^{-13} М, как измерено поверхностным плазмонным резонансом;
- (ii) демонстрируют способность блокировать приблизительно 50-100% связывания GFR α 3 с его лигандом артемином, при этом значение IC_{50} варьирует от приблизительно 40 пМ до приблизительно 15 нМ;
- (iii) демонстрируют способность блокировать от приблизительно 20% до приблизительно 100% связывания GFR α 3 с твердой подложкой, покрытой смесью артемина и RET;
- (iv) блокируют или ингибируют артемин-зависимую активацию RET, при этом IC_{50} варьирует от приблизительно 200 пМ до приблизительно 50 нМ;
- (v) ингибируют или снижают одну или несколько ноцицептивных реакций на *in vivo* модели боли при раке кости;
- (vi) ингибируют или снижают артемин-сенситизированную тепловую гипералгезию *in vivo*;
- (vii) ингибируют или снижают аллодинию на *in vivo* модели остеоартрита;

- (viii) не реагируют перекрестно с другими корцепторами GFR для RET;
- (ix) содержат вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 381 и 397; или
- (x) содержат вариабельную область легкой цепи (LCVR) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 389 и 405.

Согласно одному варианту осуществления выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из мышиного, химерного, гуманизированного и человеческого антитела.

Согласно одному варианту осуществления выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент не реагирует перекрестно с человеческим GFR α 1 или человеческим GFR α 2.

Согласно одному варианту осуществления выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержит (a) вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 381 и 397, и (b) вариабельную область легкой цепи (LCVR) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 389 и 405.

Согласно одному варианту осуществления выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент демонстрирует способность блокировать приблизительно 50-95% связывания человеческого GFR α 3 с его лигандом артемином, при этом значение IC₅₀ варьирует от приблизительно 40 пМ до приблизительно 750 пМ.

Согласно одному варианту осуществления выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент блокирует приблизительно 75-100% связывания человеческого GFR α 3 с его лигандом артемином, при этом значение IC₅₀ варьирует от приблизительно 400 пМ до приблизительно 15 нМ.

Согласно одному варианту осуществления выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент блокирует или ингибирует артемин-

зависимую активацию человеческой RET, при этом IC_{50} варьирует от приблизительно 300 пМ до приблизительно 5 нМ.

Согласно одному варианту осуществления выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент блокирует или ингибирует артемин-зависимую активацию RET яванского макака, при этом IC_{50} варьирует от приблизительно 0,7 нМ до приблизительно 2,5 нМ.

Согласно одному варианту осуществления выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащихся в аминокислотной последовательности HCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 381 и 397; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащихся в аминокислотной последовательности LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 389 и 405.

Согласно одному варианту осуществления выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 381 и 397.

Согласно одному варианту осуществления выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи (LCVR) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 389 и 405.

Согласно одному варианту осуществления выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:/SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 381/389 и 397/405.

Согласно одному варианту осуществления выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержит пару аминокислотных

последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 50/58, 146/154, 210/218 и 290/298.

Согласно одному варианту осуществления выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержит:

(a) домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324, 340, 356, 383 и 399;

(b) домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326, 342, 358, 385 и 401;

(c) домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344, 360, 387 и 403;

(d) домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332, 348, 364, 391 и 407;

(e) домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334, 350, 366, 393 и 409; и

(f) домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336, 352, 368, 395 и 411.

Согласно одному варианту осуществления выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент конкурирует за специфическое связывание с человеческим GFR α 3 с антителом или антиген-связывающим фрагментом, включающим в себя пары последовательностей тяжелой и легкой цепей, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346 и 354/362, 381/389 и 397/405.

Согласно одному варианту осуществления выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент связывается с тем же эпитопом в человеческом GFR α 3, который распознается антителом, содержащим пары последовательностей тяжелой и легкой цепей, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170,

178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346 и 354/362, 381/389 и 397/405.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть непроцессированными (например, антитело IgG1 или IgG4) или могут содержать только антиген-связывающую часть (например, фрагмент Fab, F(ab')₂ или scFv), а также могут быть модифицированы с повреждением функциональности, например, для устранения остаточных эффекторных функций (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933).

Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с человеческим GFR α 3, содержат HCVR, включающую в себя три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащихся в аминокислотных последовательностях HCVR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 381 и 397; и/или LCVR, включающую в себя три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащихся в аминокислотных последовательностях LCVR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 389 и 405. Способы и методики для идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в уровне техники и могут быть использованы для идентификации CDR в определенных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, раскрытых в настоящем документе. Типичные правила, которые могут быть использованы для идентификации границ CDR, включают в себя, например, определение по Kabat, определение по Chothia и определение по AbM. В общих чертах, определение по Kabat основано на вариабельности последовательностей, определение по Chothia основано на локализации областей структурной петли, а определение по AbM является компромиссом между подходами Kabat и Chothia. См., например, Kabat, «Sequences of Proteins of Immunological Interest», National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); а также Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Также доступны базы данных общего пользования для идентификации последовательностей CDR в антителе.

Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело или антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с человеческим GFR α 3, содержат:

(a) домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344, 360, 387 и 403; и

(b) домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336, 352, 368, 395 и 411.

Согласно одному варианту осуществления выделенное антитело или антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с человеческим GFR α 3, как описано выше в (a) и (b), дополнительно содержат:

(c) домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324, 340, 356, 383 и 399;

(d) домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326, 342, 358, 385 и 401;

(e) домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332, 348, 364, 391 и 407; и

(f) домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334, 350, 366, 393 и 409.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к полностью человеческому моноклональному антителу или его антиген-связывающему фрагменту, которые специфично связываются с человеческим GFR α 3, при этом антитело или его фрагмент обладает одной или несколькими из следующих характеристик:

(i) содержит HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 381 и 397;

(ii) содержит LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 389 и 405;

(iii) содержит домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152,

168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344, 360, 387 и 403, или существенно подобной ей последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; и домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336, 352, 368, 395 и 411, или существенно подобной ей последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей;

(iv) содержит домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324, 340, 356, 383 и 399, или существенно подобной ей последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326, 342, 358, 385 и 401, или существенно подобной ей последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332, 348, 364, 391 и 407, или существенно подобной ей последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; и домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334, 350, 366, 393 и 409, или существенно подобной ей последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей;

(v) проявляет K_D , варьирующую от приблизительно 10^{-8} М до приблизительно 10^{-13} М, как измерено поверхностным плазмонным резонансом;

(vi) демонстрирует способность блокировать приблизительно 50-100% связывания GFR α 3 с его лигандом артемином, при этом значение IC₅₀ варьирует от

приблизительно 40 пМ до приблизительно 15 нМ;

(vii) демонстрирует способность блокировать от приблизительно 20% до приблизительно 100% связывания GFR α 3 с твердой подложкой, покрытой смесью артемина и RET;

(viii) блокирует или ингибирует артемин-зависимую активацию RET, при этом IC₅₀ варьирует от приблизительно 200 пМ до приблизительно 50 нМ;

(ix) ингибирует или снижает одну или несколько ноцицептивных реакций на *in vivo* модели боли при раке кости;

(x) ингибирует или снижает артемин-сенситизированную тепловую гипералгезию *in vivo*;

(xi) ингибирует или снижает аллодинию на *in vivo* модели остеоартрита;

(xii) не реагирует перекрестно с другими корецепторами GFR для RET.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к антителу или антиген-связывающему фрагменту антитела, содержащему домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из любых показанных в таблице 1, или существенно подобной ей последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; и домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из любых показанных в таблице 1, или существенно подобной ей последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его фрагменту, дополнительно содержащему домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью из любых показанных в таблице 1, или существенно подобной ей последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью из любых показанных в таблице 1, или существенно подобной ей последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью из любых показанных в таблице 1, или существенно подобной ей последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью

последовательностей; и домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью из любых показанных в таблице 1, или существенно подобной ей последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или антиген-связывающая часть антитела, которые специфично связываются с человеческим GFR α 3, содержат пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, показанных в таблице 1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или антиген-связывающая часть антитела содержат пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8/16, 24/32, 40/48, 56/64, 72/80, 88/96, 104/112, 120/128, 136/144, 152/160, 168/176, 184/192, 200/208, 216/224, 232/240, 248/256, 264/272, 280/288, 296/304, 312/320, 328/336, 344/352, 360/368, 387/395 и 403/411.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 4, 6 и 8, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 12, 14 и 16, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 20, 22 и 24, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 28, 30 и 32, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 36, 38 и 40, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 44, 46 и 48, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 52, 54 и 56, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 60, 62 и 64, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 68, 70 и 72, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 76, 78 и 80, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 84, 86 и 88, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 92, 94 и 96, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 100, 102 и 104, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 108, 110 и 112, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 116, 118 и 120, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 124, 126 и 128, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 132, 134 и 136, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 140, 142 и 144, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 148, 150 и 152, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 156, 158 и 160, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 164, 166 и 168, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 172, 174 и 176, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 180, 182 и 184, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 188, 190 и 192, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 196, 198 и 200, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 204, 206 и 208, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из

SEQ ID NO: 212, 214 и 216, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 220, 222 и 224, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 228, 230 и 232, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 236, 238 и 240, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 244, 246 и 248, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 252, 254 и 256, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 260, 262 и 264, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 268, 270 и 272, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 276, 278 и 280, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 284, 286 и 288, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 292, 294 и 296, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 300, 302 и 304, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 308, 310 и 312, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 316, 318 и 320, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 324, 326 и 328, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 332, 334 и 336, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 340, 342 и 344, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 348, 350 и 352, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 356, 358 и 360, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 364, 366 и 368, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 383, 385 и 387, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 391, 393 и 395, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из SEQ ID NO: 399, 401 и 403, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из SEQ ID NO: 407, 409 и 411, соответственно.

Некоторые неограничивающие типичные антитела и антиген-связывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением содержат домены HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, соответственно, выбранные из любой из аминокислотных последовательностей, показанных в таблице 1.

Второй аспект настоящего изобретения относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим антитела против GFR α 3 или их фрагменты. Рекомбинантные векторы экспрессии, несущие нуклеиновые кислоты в соответствии с настоящим изобретением, и клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы, также охватываются настоящим изобретением, как и способы получения антител путем культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих продуцирование антител и выделение продуцированных антител.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его фрагменту, содержащему HCVR, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 17, 33, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 161, 177, 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289, 305, 321, 337, 353, 380 и 396, или существенно идентичной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% гомологией к ней. Согласно одному варианту осуществления HCVR кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 49, 145, 209 и 289.

Согласно одному варианту осуществления антитело или его фрагмент дополнительно содержит LCVR, кодируемую последовательностью нуклеиновой

кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 25, 41, 57, 73, 89, 105, 121, 137, 153, 169, 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281, 297, 313, 329, 345, 361, 388 и 404, или существенно идентичной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% гомологией к ней. Согласно одному варианту осуществления LCVR кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 57, 153, 217 и 297.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение также относится к антителу или антиген-связывающему фрагменту антитела, содержащему домен HCDR3, кодируемый нуклеотидной последовательностью, локализованной в переменных областях любого из антител, показанных в таблице 1, или существенно подобной ей последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; и домен LCDR3, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из любых показанных в таблице 1, или существенно подобной ей последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его фрагменту, дополнительно содержащему домен HCDR1, кодируемый нуклеотидной последовательностью из любых показанных в таблице 1 или существенно подобной ей последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; домен HCDR2, кодируемый нуклеотидной последовательностью из любых показанных в таблице 1 или существенно подобной ей последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; домен LCDR1, кодируемый нуклеотидной последовательностью из любых показанных в таблице 1 или существенно подобной ей последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; и домен LCDR2, кодируемый нуклеотидной последовательностью, показанной в таблице 1, или существенно подобной ей последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Третий аспект настоящего изобретения относится к человеческому антителу против hGFR α 3 или антиген-связывающему фрагменту антитела, содержащему HCVR, кодируемый сегментами нуклеотидной последовательности, полученными из зародышевых последовательностей V_H, D_H и J_H, и LCVR, кодируемый сегментами нуклеотидной последовательности, полученными из зародышевых последовательностей V_K и J_K, с комбинациями, показанными в таблице 2.

Настоящее изобретение относится к антителам против hGFR α 3, характеризующимся паттерном модифицированного гликозилирования. Согласно некоторым применениям может использоваться модификация с удалением нежелательных сайтов гликозилирования или, например, с удалением фукозного фрагмента для усиления функции антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). Согласно другим применениям может быть выполнена модификация галактозилирования для модификации комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC).

Четвертый аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантное человеческое антитело или его фрагмент, которые специфично связываются с hGFR α 3, и фармацевтически приемлемый носитель. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к композиции, которая является комбинацией антитела или антиген-связывающего фрагмента антитела в соответствии с настоящим изобретением и второго терапевтического средства. Вторым терапевтическим средством может быть любое средство, которое успешно комбинируется с антителом или его фрагментом в соответствии с настоящим изобретением, например, средство, способное снижать боль, такое как без ограничения опиоиды, морфин, ингибитор COX-2, аспирин или другие нестероидные противовоспалительные средства, ацетаминофен, дулоксетин, местные анестетики, модуляторы NMDA, агонисты каннабиноидных рецепторов, модуляторы семейства P2X, антагонисты VR1 и антагонисты вещества P. Вторым терапевтическим средством может быть ингибитор интерлейкина-1 (IL-1), например, слитый белок (патент США № 6927044); или противоэпилептическое/противосудорожное лекарственное средство, такое как габапентин, прегабалин, топирамат; или трициклический антидепрессант, такой как амитриптилин; ингибитор или антагонист цитокина, такой как антагонист IL-6, IL-6R, IL-18 или IL-18R, или ингибитор потенциал-зависимого натриевого канала, такой как ингибитор Na_v1.7, или ингибитор Na_v1.8, или ингибитор Na_v1.9; ингибитор калиевого канала или кальциевого канала; или

ингибитор NGF (низкомолекулярный ингибитор или антитело против NGF), или второй ингибитор или антагонист $\text{GFR}\alpha 3$, ингибитор фактора некроза опухоли (TNF) или рецептора TNF, ингибитор TWEAK (родственного TNF слабого индуктора апоптоза), ингибитор RET, ингибитор семейства лигандов GDNF, ингибитор $\text{GFR}\alpha 1$, $\text{GFR}\alpha 2$ или $\text{GFR}\alpha 4$, ингибитор чувствительного к кислоте ионного канала (например, ASIC1 или ASIC3), или селективный ингибитор обратного захвата серотонина (SSRI), или ингибитор обратного захвата серотонина-норэпинефрина (SNRI), или ингибитор прекинетицинового рецептора (например, PROK1 и PROK2), или ингибитор каспазы, ингибитор p38, ингибитор IKK1/2, CTLA-4Ig, или кортикостероид. Вторым терапевтическим средством может быть низкомолекулярное лекарственное средство или белковый/полипептидный ингибитор. Второе терапевтическое средство может быть синтетическим или природного происхождения. Вторым терапевтическим средством может быть второе антитело, специфическое к $\text{GFR}\alpha 3$, полипептидный антагонист, siRNA или антисмысловая молекула, специфическая к $\text{GFR}\alpha 3$. Также следует понимать, что антитела и фармацевтически приемлемые композиции в соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы в комбинированных терапевтических средствах, а именно антитела и фармацевтически приемлемые композиции могут быть введены одновременно с одной или несколькими другими желаемыми терапевтическими средствами или медицинскими процедурами, до таковых или после таковых. Для использования конкретной комбинации терапевтических средств (терапевтических средств или процедур) в комбинированном режиме следует учитывать совместимость желаемых терапевтических средств и/или процедур и желаемый терапевтический эффект, которого следует достичь. Также следует понимать, что используемые терапевтические средства могут достигать желаемого эффекта для одного и того же расстройства (например, антитело может быть введено одновременно с другим средством, используемым для лечения того же расстройства), или они могут достигать разных эффектов (например, контроль каких-либо побочных эффектов). Используемые в настоящем документе дополнительные терапевтические средства, которые обычно вводят для лечения или предупреждения конкретного заболевания или состояния, являются приемлемыми для заболевания или состояния, подлежащего лечению.

Пятый аспект настоящего изобретения относится к способам ингибирования активности $\text{hGFR}\alpha 3$ с использованием антитела против $\text{hGFR}\alpha 3$ или антиген-связывающей части антитела в соответствии с настоящим изобретением, при этом

способы предусматривают введение терапевтически эффективного количества одного или нескольких антител в соответствии с настоящим изобретением, или их антиген-связывающих фрагментов, или фармацевтической композиции, содержащей одно или несколько антител в соответствии с настоящим изобретением или их антиген-связывающих фрагментов.

Шестой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения связанных с $\text{GFR}\alpha 3$ состояния или заболевания, или боли, ассоциированной со связанными с $\text{GFR}\alpha 3$ состоянием или заболеванием, при этом способ предусматривает введение антитела против $\text{GFR}\alpha 3$ или антиген-связывающей части антитела в соответствии с настоящим изобретением, или композиции, содержащей антитело против $\text{GFR}\alpha 3$ или его фрагмент, нуждающемуся в этом пациенту, при этом связанные с $\text{GFR}\alpha 3$ состояние или заболевание предупреждаются, облегчаются, или снижаются их тяжесть или частота возникновения, или боль, ассоциированная с состоянием или заболеванием, предупреждается, облегчается, или снижается ее тяжесть или частота возникновения.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антиген-связывающему фрагменту или к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело или его антиген-связывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением, для применения в лечении связанных с $\text{GFR}\alpha 3$ состояния или заболевания, или боли, ассоциированной со связанными с $\text{GFR}\alpha 3$ состоянием или заболеванием, при этом связанные с $\text{GFR}\alpha 3$ состояние или заболевание предупреждаются, облегчаются, или снижаются их тяжесть или частота возникновения, или боль, ассоциированная с состоянием или заболеванием, предупреждается, облегчается, или снижается ее тяжесть или частота возникновения.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к применению выделенного антитела или его антиген-связывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело в соответствии с настоящим изобретением, для получения лекарственного средства для лечения связанных с $\text{GFR}\alpha 3$ состояния или заболевания или боли, ассоциированной со связанными с $\text{GFR}\alpha 3$ состоянием или заболеванием, при этом связанные с $\text{GFR}\alpha 3$ состояние или заболевание предупреждаются, облегчаются, или снижаются их тяжесть или частота возникновения, или боль, ассоциированная с состоянием или заболеванием, предупреждается, облегчается, или снижается ее тяжесть или частота возникновения.

Согласно одному варианту осуществления связанное с $GFR\alpha 3$ состояние или заболевание выбрано из группы, состоящей из острой боли, хронической боли, нейропатической боли, воспалительной боли, синдрома функциональной боли, артрита, панкреатита, остеоартрита, кластерных головных болей, невралгии тройничного нерва, герпетической невралгии, общих невралгий, нейродегенеративных расстройств, нарушений движения, нейроэндокринных нарушений, атаксии, висцеральной боли, острой подагре, постгерпетической невралгии, диабетической нейропатии, ишиалгии, боли в спине, боли головы или шеи, тяжелой или неутрачиваемой боли, обострения боли, послеоперационной боли, врожденной эритромелалгии, зубной боли, ринита, боли, связанной со злокачественным заболеванием, комплексного регионарного болевого синдрома (CRPS), воспалительного заболевания кишечника (например, болезни Крона или язвенного колита) и расстройств мочевого пузыря.

Согласно одному варианту осуществления синдром функциональной боли выбран из группы, состоящей из хронической боли в нижней части спины, синдрома раздраженного кишечника (IBS), фибромиалгии (FM), синдрома хронического утомления, абдоминальной боли, нарушения височно-нижнечелюстного сустава (TMJD), синдрома раздраженного мочевого пузыря (интерстициального цистита), функциональных желудочно-кишечных нарушений/синдромов, синдрома функциональной боли в груди, мигреней и головных болей напряжения, синдрома хронической тазовой боли, синдрома болезненной предстательной железы (хронического простатита), синдрома множественной химической чувствительности и синдрома войны в Персидском заливе.

Согласно одному варианту осуществления боль, связанная со злокачественным заболеванием, ассоциируется со злокачественным заболеванием, выбранной из группы, состоящей из рака эндометрия, рака предстательной железы, рака молочной железы, рака шейки матки, рака печени, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, рака желудка, рака матки, рака яичника, рака почки, немелкоклеточного рака легкого, рака головного мозга, лейкоза, лимфомы, рака кости, а также боль ассоциируется с метастазированием при злокачественном заболевании.

Согласно одному варианту осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент вводят пациенту в комбинации со вторым терапевтическим средством.

Согласно одному варианту осуществления второе терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из опиоида, ингибитора COX-2, местного анестетика, модулятора NMDA, агониста каннабиноидных рецепторов, модулятора семейства P2X,

антагониста VR1, антагониста вещества P, второго антагониста GFR α 3, антагониста цитокина или цитокинового рецептора, ингибитора фактора роста нервов (NGF) (низкомолекулярного ингибитора или антитела против NGF), аспирина, NSAID, стероида, морфина, селективного ингибитора обратного захвата серотонина (SSRI), ингибитора обратного захвата серотонина-норэпинефрина (SNRI), трициклического соединения, ингибитора потенциал-зависимого натриевого канала (Na_v), ингибитора кальциевого канала, ингибитора калиевого канала, ингибитора фактора некроза опухоли (TNF) или рецептора TNF, ингибитора TWEAK (родственного TNF слабого индуктора апоптоза), ингибитора RET, ингибитора семейства лигандов GDNF, ингибитора чувствительного к кислоте ионного канала (ASIC1 или ASIC3), противосудорожного средства (габапентина или прегабалина), ингибитора прекинетицинового рецептора (PROK1 и PROK2), ингибитора каспазы, ингибитора p38, ингибитора IKK1/2, CTLA-4Ig и кортикостероида.

Согласно одному варианту осуществления вторым антагонистом GFR α 3 является малая органическая молекула, второе антитело, специфичное по отношению к GFR α 3, полипептидный антагонист, siRNA или антисмысловая молекула, специфичная по отношению к GFR α 3.

Согласно одному варианту осуществления антагонистом цитокина или цитокинового рецептора является антагонист интерлейкина-1 (IL-1), антагонист IL-6 или антагонист IL-18.

Расстройством, подлежащим лечению, является любое заболевание или состояние, которое улучшается, облегчается, ингибируется или предупреждается путем устранения, ингибирования или снижения активности hGFR α 3. Конкретные группы, которые лечатся терапевтическими способами в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя заболевание, расстройство или состояние, выбранные из острой, хронической, ишемической, нейропатической или воспалительной боли, гиперчувствительности, такой как висцеральная, тепловая или механическая гиперчувствительность, хронического панкреатита, артрита, мигрени, кластерных головных болей, невралгии тройничного нерва, герпетической невралгии, общих невралгий, эпилепсии или эпилептических состояний, миотонии, аритмии, нарушений движения, нейроэндокринных нарушений, атаксии, воспалительного заболевания кишечника, воспаления селезенки, боли в желудке, тригонита, фиброидов, перитонита, позывов к дефекации, недержания, ректальной гиперчувствительности, висцеральной боли, остеоартритической боли, постгерпетической невралгии, диабетической

нейропатии, радикулита, ишиалгии, боли в спине, боли головы или шеи, обострения боли, послеоперационной боли, боли, связанной со злокачественным заболеванием, или вызванной химиотерапией боли. Другие состояния, которые лечатся терапевтическими способами в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя болезнь Хиршспрунга, врожденную эритромелалгию, расстройства мочевого пузыря, ринит, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак шейки матки, рак печени, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, рак желудка, рак матки, рак яичника, рак почки, гематологический (гемопозитический) рак, такой как лейкоз или лимфома, рак кости, или боль, ассоциированную с метастазированием злокачественного заболевания, например, боль, ассоциированную с метастазированием злокачественного заболевания в кость. Антитела в соответствии с настоящим изобретением или их антиген-связывающие фрагменты также могут быть использованы для лечения следующих состояний: незлокачественной острой, хронической или боли при переломе кости; ревматоидного артрита, спинального стеноза; нейропатической боли в нижней части спины; болевого мышечно-лицевого синдрома; боли поджелудочной железы; хронической головной боли; головной боли напряжения; диабетической нейропатии; HIV-ассоциированной нейропатии; нейропатии Шарко-Мари-Тута; врожденных сенсорных нейропатий; повреждения периферических нервов; болезненной нейромии; эктопических проксимальных и дистальных разрядов; радикулопатии; вызванной химиотерапией нейропатической боли; вызванной лучевой терапией нейропатической боли; боли после удаления молочной железы; центральной боли; боли при повреждении спинного мозга; постинсультной боли; таламической боли; комплексного регионарного болевого синдрома (CRPS, также известного как рефлекторная симпатическая дистрофия); фантомной боли; неутрачиваемой боли; острой мышечноскелетной боли; боли суставов; боли при острой подагре; механической боли в нижней части спины; боли шеи; тендинита; боли при физическом напряжении/повреждении; абдоминальной боли; пиелонефрита; аппендицита; холецистита; непроходимости кишечника; грыжи и т.п.; боли в груди, в том числе сердечной боли; тазовой боли, боли при почечных коликах, острой боли при родах, в том числе боли при родовых схватках; боли при кесаревом сечении; боли при травмах и ожогах; эндометриоза; боли при опоясывающем герпесе; серповидноклеточной анемии; острого панкреатита; обострения боли; орофациальной боли, в том числе боли при синусите, зубной боли; боли при рассеянном склерозе; боли при лепре; боли при болезни Бехчета; адипозалгии; боли при флебите; боли при синдроме Гийена-Барре; болезненного

синдрома беспокойных ног и пальцев; синдрома Хаглунда; боли при болезни Фабри; заболевания мочевого пузыря и мочеполовой системы, а также гиперактивности мочевого пузыря. Согласно одному варианту осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы для лечения синдрома функциональной боли, при этом синдром функциональной боли выбран из группы, состоящей из хронической боли в нижней части спины, синдрома раздраженного кишечника (IBS), фибромиалгии (FM), синдрома хронического утомления, абдоминальной боли, нарушения височно-нижнечелюстного сустава (TMJD), синдрома раздраженного мочевого пузыря (интерстициального цистита), функциональных желудочно-кишечных нарушений/синдромов, синдрома функциональной боли в груди, мигреней и головных болей напряжения, синдрома хронической тазовой боли, синдрома болезненной предстательной железы (хронического простатита), синдрома множественной химической чувствительности и синдрома войны в Персидском заливе.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением или их антиген-связывающие фрагменты также могут быть использованы для ингибирования роста/пролиферации опухолевых клеток или метастазирования опухолевых клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением или их антиген-связывающие фрагменты могут быть использованы для лечения злокачественного заболевания или «боли, ассоциированной со злокачественным заболеванием» или «ассоциированной со злокачественным заболеванием боли», в том числе, например, без ограничения рака эндометрия, рака предстательной железы, рака молочной железы, рака шейки матки, рака печени, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, рака желудка, рака матки, рака яичника, рака почки, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, рака головного мозга, гематологического (гемопозитического) рака, такого как лейкоза или лимфома, рака кости, или боли, ассоциированной с метастазированием злокачественного заболевания, например, боли, ассоциированной с метастазированием злокачественного заболевания в кость. Термин «ассоциированная со злокачественным заболеванием боль» также включает в себя боль, как правило, более ассоциированную со злокачественными состояниями, такими как, например, почечно-клеточная карцинома, карцинома поджелудочной железы, рак головы и шеи, злокачественная глиома, остеосаркома, рак толстой и прямой кишок, рак желудка, злокачественная мезотелиома, множественная миелома, синовиальная саркома, рак щитовидной железы или меланома. Антитела в соответствии с настоящим изобретением также применимы

для лечения или предупреждения боли, вызванной или ассоциированной с противораковой терапией или противораковыми медицинскими средствами лечения, например, вызванной химиотерапией нейропатической боли, такой как боль, вызванная или ассоциированная с лечением паклитакселом (Taxol™), доцетакселом (Taxotere®); нитрозомочевинной, циклофосфамидом, доксорубицином, эпирубицином, 5-флуороурацилом, топотеканом, иринотеканом, кармустином, эстрамустином и химиотерапевтическими соединениями на основе платины, такими как цисплатин, карбоплатин и ипроплатин.

Другие варианты осуществления станут понятными при рассмотрении следующего подробного описания.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показано ингибирование артемин-сенситизированной вызванной капсаицином тепловой гипералгезии у животных, инъецированных антителами против мышинового GFR α 3 (косвенным блокатором M1M6977N или прямым блокатором M1M6986N, n = 8 каждый) или изотипным (отрицательным) контрольным антителом (M2M180N, n = 8) при 30 мг/кг подкожно за 2 дня до получения капсаицина (за 1 день до получения 0,5 мкг артемина).

На фиг. 2A и 2B. показано измерение тактильной аллодинии с помощью теста фон Фрея с использованием нитей в двух экспериментах (A и B) у животных, инъецированных фибросаркомой и обработанных изотипным (отрицательным) контрольным антителом (M2M180N) или антителами против мышинового GFR α 3 M1M6977N или M1M6986N (n = 8-11 на группу). *p < 0,05, **p < 0,01 или ***p < 0,001 по сравнению с изотипным контролем в одной и той же точке времени.

На фиг. 3A и 3B показана ипсилатеральная весовая нагрузка в процентах в двух экспериментах (A и B) у животных, инъецированных фибросаркомой и обработанных изотипным (отрицательным) контрольным (M2M180N) или антителами против мышинового GFR α 3 M1M6977N или M1M6986N (n = 8-11 на группу).

На фиг. 4A и 4B показаны оценки защиты в двух экспериментах (A и B) у животных, инъецированных клетками фибросаркомы и обработанных изотипным (отрицательным) контрольным (M2M180N) или антителами против мышинового GFR α 3 M1M6977N или M1M6986N (n = 8-11 на группу). **p < 0,01 по сравнению с изотипным контролем в одной и той же точке времени.

На фиг. 5. показано измерение тактильной аллодинии с помощью теста фон Фрея с использованием нитей у животных, инъецированных карциномой и обработанных изотипным (отрицательным) контрольным (M2M180N) или антителами против мышиногo GFR α 3 M1M6977N или M1M6986N (n = 9-10 на группу). *p < 0,05, **p < 0,01 или ***p < 0,001 по сравнению с изотипным (отрицательным) контролем в одной и той же точке времени.

На фиг. 6A и 6B показана ипсилатеральная весовая нагрузка в процентах в двух точках времени (A = 11 дней и B = 18 дней) при инъецировании карциномой и обработке изотипным (отрицательным) контрольным (M2M180N) или антителами против мышиногo GFR α 3 M1M6977N или M1M6986N (n = 9-10 на группу). *p < 0,05 по сравнению с изотипным контрольным антителом с помощью апостериорного анализа Дуннетта.

На фиг. 7 показаны оценки защиты у животных, инъецированных карциномой и обработанных изотипным (отрицательным) контрольным (M2M180N) или антителами против мышиногo GFR α 3 M1M6977N или M1M6986N (n = 9-10 на группу). *p < 0,05, ***p < 0,001 по сравнению с изотипным контролем в одной и той же точке времени.

На фиг. 8 показано измерение тактильной аллодинии с помощью теста фон Фрея с использованием нитей у животных с DMM, обработанных изотипным (отрицательным) контрольным (M2M180N) или антителами против мышиногo GFR α 3 M1M6977N или M1M6986N (n = 10 на группу). **p < 0,01 или ***p < 0,001 по сравнению с изотипным контролем в одной и той же точке времени.

На фиг. 9 показан перекрестный конкурентный анализ антител против GFR α 3 по отношению к связыванию с биотин-hGFR α 3-mmH.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Перед описанием способов в соответствии с настоящим изобретением следует упомянуть, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными способами и описываемыми экспериментальными условиями, как таковые способы и условия могут варьировать. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология служит исключительно цели описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только приложенной формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно подразумевается

рядовым специалистом в области, к которой относится настоящее изобретение. Хотя при осуществлении или тестировании настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, далее описываются предпочтительные способы и материалы.

Определения

Используемый в настоящем документе термин «GFR α 3» или «hGFR α 3» относится к гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-заякоренному белковому рецептору для артемина, который принадлежит семейству нейротрофических факторов линии глиальных клеток (GDNF). Это один из белков рецепторов-альфа семейства GDNF, который, как только связывается с его лигандом артемином, опосредует активацию рецепторной тирозинкиназы RET («реаранжированной во время трансфекции»). В настоящее время различают четыре представителя семейства GFR α - GFR α -1-4 (Lindsay RM *et al.*, Neuron, (1996), 17:571-574; Airaksinen, MS, *et al.*, Mol. Cell Neurosci., (1999), 13:313-325). GFR α 3 также известен в уровне техники как GPI-связанный рецептор из рецепторов-альфа-3 семейства GDNF или рецептор-альфа-3 нейротрофического фактора линии глиальных клеток. Используемая в настоящем документе экспрессия «GFR α 3», или «hGFR α 3», или их фрагментов относится к человеческому белку GFR α 3 или к его фрагменту, если не указано, что походит из отличных от человека видов, например, «мышинный GFR α 3», «крысиный GFR α 3» или «обезьяний GFR α 3». Более того, используемый в настоящем документе термин «GFR α 3» или «hGFR α 3» относится к человеческому GFR α 3, кодируемому последовательностью нуклеиновой кислоты, показанной в SEQ ID NO: 374 (номер доступа в Genbank NM_001496), и имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 375 (номер доступа в Genbank NP_001487.2), или к его биологически активному фрагменту. Сигнальная последовательность охватывает аминокислотные остатки 1-31 из SEQ ID NO: 375, зрелый белок охватывает аминокислотные остатки 32-382 из SEQ ID NO: 375, тогда как С-концевая область Pro охватывает аминокислотные остатки 383-400 из SEQ ID NO: 375. Сайт расщепления GPI обнаруживается на аминокислотном остатке 374 из SEQ ID NO: 375 (аспарагин). Аминокислотная последовательность человеческого артемина находится в Genbank под номером доступа Q5T4W7, а аминокислотная последовательность человеческого артемина (из аминокислот A108-G220 под номером доступа Q5T4W7) с тус-тус-гексагистиридиновой меткой показана как SEQ ID NO: 369 (при этом аминокислотные остатки 114-141 из SEQ ID NO: 369 являются тус-тус-

гексагистидиновой меткой).

Хотя GFR α 3 структурно и функционально подобен другим представителям семейства GFR α , GFR α 3 является наименее родственным членом семейства. GFR α 1 и GFR α 2 обладают приблизительно 50% идентичностью (Sanicola, M. et al., PNAS, USA, (1997), 94:6238-43; Klein, RD, et al., (1997), Nature, 387:717-21; Buj-Bello, A. et al., Nature (1997), 387:721-4; Baloh, RH, et al., Neuron, (1997), 18:793-802), тогда как GFR α 3 обладает только 32% и 37% идентичностью, соответственно, по отношению к этим белкам (Masure, S. et al., Eur. J. Biochem., (1998), 251:622-30; Nomoto, S. et al., BBRC, (1998), 244:849-53). Аминокислотная последовательность мышинового GFR α 3 характеризуется следующим номером доступа в Genbank: NP_034410.3. Аминокислотная последовательность человеческого GFR α 1 характеризуется следующим номером доступа в Genbank: NP_005255.1, а также находится как SEQ ID NO: 376. Аминокислотная последовательность GFR α 3 яванского макака показана в SEQ ID NO: 377, а аминокислотная последовательность RET яванского макака показана в SEQ ID NO: 378.

Используемый в настоящем документе термин «антитело» предназначен для обозначения иммуноглобулиновых молекул, состоящих из четырех полипептидных цепей - двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями (*m.e.* «полные молекулы антитела»), а также их мультимеров (например, IgM) или их антиген-связывающих фрагментов. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи («HCVR» или «V_H») и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C_H1, C_H2 и C_H3). Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи («LCVR» или «V_L») и константной области легкой цепи (C_L). Области V_H и V_L можно дополнительно разделить на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующимися с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждые V_H и V_L состоят из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения FR антитела против GFR α 3 (или его антиген-связывающего фрагмента) могут быть идентичными человеческим зародышевым последовательностям или могут быть естественно или искусственно модифицированными. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основании «side-by-side» анализа двух или более CDR.

Также возможны замена одного или нескольких остатков CDR или пропуск одного или нескольких CDR. Антитела были описаны в научной литературе, откуда известно, что один или два CDR могут обходиться без связывания. Padlan et al. (1995 FASEB J. 9:133-139) проанализировали контактные области между антителами и их антигенами на основе опубликованных кристаллических структур и заключили, что только приблизительно от одной пятой до одной третьей остатков CDR действительно контактируют с антигеном. Padlan также обнаружил множество антител, в которых один или два CDR не содержали аминокислот, контактирующих с антигеном (см. также Vajdos et al. 2002 J Mol Biol 320:415-428).

Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, могут быть идентифицированы на основе предшествующих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 часто не требуются) из областей CDR по Kabat, лежащих вне CDR по Chothia, с помощью молекулярного моделирования и/или эмпирически. Если CDR или его остаток(ки) пропускается, он, как правило, замещается аминокислотой, занимающей соответствующее положение в последовательности другого человеческого антитела или в консенсусе таких последовательностей. Положения для замены в CDR и аминокислоты для замены также могут быть выбраны эмпирически. Эмпирические замены могут быть консервативными или неконсервативными заменами.

Полностью человеческие антитела против hGFR α 3, раскрытые в настоящем документе, могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасной и/или CDR областях переменных доменов тяжелой и легкой цепи по сравнению с соответствующими зародышевыми последовательностями. Такие мутации могут быть легко определены сравнением аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, с зародышевыми последовательностями, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает в себя антитела и их антиген-связывающие фрагменты, которые получены из каких-либо аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, при этом одна или несколько аминокислот в одной или нескольких каркасных и/или CDR областях обратно мутируют до соответствующего зародышевого остатка(ов) или до консервативной аминокислотной замены (встречающейся в природе или не встречающейся в природе) соответствующего зародышевого остатка(ов) (такие изменения последовательностей называются в настоящем документе «зародышевыми обратными мутациями»). Рядовой специалист в данной области, исходя из последовательностей переменной области

тяжелой и легкой цепей, раскрытых в настоящем документе, сможет легко получить множество антител и их антиген-связывающих фрагментов, которые содержат одну или несколько индивидуальных зародышевых обратных мутаций или их комбинаций. Согласно некоторым вариантам осуществления все из каркасных и/или CDR остатков в доменах V_H и/или V_L обратно мутируют до зародышевой последовательности. Согласно другим вариантам осуществления только некоторые остатки мутируют обратно до зародышевой последовательности, например, только мутантные остатки, обнаруживаемые в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или до зародышевых обратных мутаций во всех каркасных областях FR1, FR2, FR3, FR4, или только мутантные остатки, обнаруживаемые в CDR1, CDR2 или CDR3. Кроме того, антитела в соответствии с настоящим изобретением могут содержать любую комбинацию двух или более зародышевых обратных мутаций в каркасных и/или CDR областях, *т.е.* в которых некоторые отдельные остатки мутируют обратно до зародышевой последовательности, тогда как некоторые другие остатки, которые отличаются от зародышевой последовательности, сохраняются. При получении антитела и антиген-связывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько зародышевых обратных мутаций, можно легко тестировать на предмет одного или нескольких желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в соответствующих случаях), пониженная иммуногенность и т.д. Антитела и антиген-связывающие фрагменты, полученные таким общим способом, охватываются настоящим изобретением.

Используемый в настоящем документе термин «человеческое антитело» предназначен для включения в себя антител, имеющих переменные и константные области, происходящие от человеческих зародышевых иммуноглобулиновых последовательностей. Человеческие mAb в соответствии с настоящим изобретением могут включать в себя аминокислотные остатки, неcodируемые человеческими зародышевыми иммуноглобулиновыми последовательностями (например, мутации, введенные произвольным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro*, или соматические мутации *in vivo*), например, в CDR, в частности, в CDR3. Однако используемый в настоящем документе термин «человеческое антитело» не предназначен для включения в себя mAb, в которых последовательности CDR, происходящие от зародышевой линии других видов млекопитающих (например, мыши), были привиты на человеческие последовательности FR. Антитела против

GFR α 3 человека в соответствии с настоящим изобретением могут быть определены как «антитело против hGFR α 3» или «антитело против GFR α 3».

Термин «специфично связывается» или подобный означает, что антитело или его антиген-связывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который является относительно стабильным при физиологических условиях. Специфическое связывание может быть охарактеризовано равновесной константой диссоциации по меньшей мере приблизительно 1×10^{-6} М или меньше (например, меньшая K_D означает более сильное связывание). Способы определения специфического связывания двух молекул хорошо известны в уровне техники и включают в себя, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Выделенное антитело, которое специфично связывается с hGFR α 3, однако, может проявлять перекрестную реакционную способность по отношению к другим антигенам, таким как молекулы GFR α 3 других видов. Более того, мультиспецифические антитела, которые связываются с hGFR α 3 и одним или несколькими дополнительными антигенами, или биспецифические, которые связываются с двумя различными областями hGFR α 3, тем не менее, считаются антителами, которые «специфично связываются» с hGFR α 3, как используется в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин «не связывается» по отношению к определенной целевой молекуле (например, конкретному пептиду GFR α 3) означает, что антитело при тестировании на предмет связывания с целевой молекулой при 25°C в анализе с использованием плазмонного резонанса проявляет K_D более 500 нМ, или при тестировании на предмет связывания с целевой молекулой при 25°C в иммуносорбентном анализе с применением фиксированных ферментов (ELISA) проявляет EC_{50} более 50 нМ, или не проявляет какое-либо связывание в любом типе анализа или его эквивалента.

Термин «высокая аффинность» антитела относится к mAb, характеризующимся аффинностью связывания с hGFR α 3 по меньшей мере 10^{-9} М; предпочтительно 10^{-10} М; более предпочтительно 10^{-11} М, еще более предпочтительно 10^{-12} М, как измерено поверхностным плазмонным резонансом, например, BIACORE™ или ELISA с определением аффинности в растворе.

Термин «медленная скорость диссоциации», «Koff» или «Kd» означает, что антитело, которое диссоциирует от hGFR α 3 с константой скорости 1×10^{-3} с⁻¹ или меньше, предпочтительно 1×10^{-4} с⁻¹ или меньше, как определено поверхностным плазмонным резонансом, например, BIACORE™.

Используемые в настоящем документе термины «антиген-связывающая часть» антитела, «антиген-связывающим фрагмент» антитела и т.п. включают в себя любой встречающийся в природе, ферментативно получаемый, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфично связывает антиген с образованием комплекса. Используемые в настоящем документе термины «антиген-связывающая часть» антитела или «фрагмент антитела» относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфичного связывания с hGFR α 3.

Согласно конкретным вариантам осуществления антитело или фрагменты антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть конъюгированы с терапевтической частью («иммуноконъюгат»), такой как опиоид, ингибитор COX-2, местное анестезирующее средство, антагонист цитокина, такой как ингибитор IL-1 или IL-6, второй ингибитор GFR α 3, модулятор NMDA, агонист каннабиноидного рецептора, модулятор семейства P2X, антагонист VR1, антагонист вещества P, химиотерапевтическое средство или радиоизотоп.

Используемый в настоящем документе термин «выделенное антитело» предназначен обозначать антитело, которое, по сути, не предусматривает других антител (Ab), обладающих различными антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфично связывается с hGFR α 3, или его фрагмент, по сути, не предусматривает Ab, которые специфично связывают антигены, отличные от hGFR α 3).

Используемый в настоящем документе термин «нейтрализующее антитело» (или «антитело, которое нейтрализует активность GFR α 3») предназначен обозначать антитело, связывание которого с hGFR α 3 приводит к ингибированию по меньшей мере одной биологической активности GFR α 3. Такое ингибирование биологической активности GFR α 3 может быть оценено с помощью измерения одного или нескольких индикаторов биологической активности GFR α 3 одним или несколькими из некоторых стандартных *in vitro* или *in vivo* анализов, известных в уровне техники (см. нижеприведенные примеры).

Используемый в настоящем документе термин «поверхностный плазмонный резонанс» относится к оптическому явлению, которое позволяет анализировать в режиме реального времени биомолекулярные взаимодействия путем выявления изменений в концентрациях белков в биосенсорной матрице, например, с использованием системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden и

Piscataway, N.J.).

Используемый в настоящем документе термин « K_D » предназначен обозначать равновесную константу диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует с сайтом специфического связывания антигена в варибельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Отдельный антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными зонами на антигене и могут оказывать разные биологические эффекты. Термин «эпитоп» также относится к сайту на антигене, на который реагируют В- и/или Т-клетки. Он также относится к области антигена, которая связывается антителом. Эпитопы могут быть определены как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы, как правило, являются подгруппой структурных эпитопов и содержат такие остатки, которые непосредственно способствуют аффинности взаимодействия. Эпитопы также могут быть конформационными, то есть состоящими из нелинейных аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления эпитопы могут включать в себя детерминанты, которые представляют собой химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, сахарные боковые цепи, фосфорильные группы или сульфонильные группы, а также согласно некоторым вариантам осуществления могут обладать специфическими характеристиками трехмерной структуры и/или специфическими характеристиками заряда.

Термин «существенная идентичность» или «существенно идентичный» по отношению к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту означает, что при оптимальном выравнивании с приемлемыми нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или с комплементарной ей нитью), наблюдается идентичность нуклеотидных последовательностей по меньшей мере приблизительно 90% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, как измерено с помощью любого хорошо известного алгоритма идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, обладающая существенной идентичностью с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, в определенных случаях может кодировать полипептид, имеющий такую же или существенно подобную аминокислотную последовательность как у полипептида, кодируемого эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

По отношению к полипептидам термин «существенное подобие» или «существенно подобный» означает, что две пептидных последовательности при оптимальном выравнивании, таком как с помощью программ GAP или BESTFIT, с использованием принимаемого по умолчанию штрафа за открытие гэпа обладают по меньшей мере 90% идентичностью последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 95%, 98% или 99% идентичностью последовательностей. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. Термин «консервативная аминокислотная замена» означает замену, при которой аминокислотный остаток замещается другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с подобными химическими свойствами (например, заряд или гидрофобность). Как правило, консервативная аминокислотная замена не будет существенно изменять функциональные свойства белка. В случае, если две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процент или степень подобия могут повышаться для коррекции консервативной природы замены. Средства для осуществления такого регулирования хорошо известны специалистам в данной области (см., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331). Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи с подобными химическими свойствами, включают в себя 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; 3) содержащие амид боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат, и 7) содержащие серу боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы, консервативным замещением является любое изменение, имеющее положительное значение на матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой у Gonnet *et al.* (см. Gonnet *et al.*, *Science*, (1992), 256:1443-45). Термин «умеренно консервативное» замещение представляет собой любое изменение, имеющее отличное от отрицательного значение на матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Подобие последовательностей для полипептидов, как правило, измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей.

Программное обеспечение для анализа белков совмещает подобные последовательности с использованием измерений подобия, относящегося к различным заменам, делециям и другим модификациям, в том числе к консервативным аминокислотным заменам. Например, программное обеспечение GCG предусматривает программы, такие как GAP и BESTFIT, которые могут быть использованы с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от различных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, версию 6.1. GCG. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с использованием FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендуемыми параметрами; программа в версии 6.1 GCG FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и идентичность последовательностей в процентах областей наилучшего перекрытия между запрашиваемой и рассматриваемой последовательностями (Pearson (2000) *supra*). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности в соответствии с настоящим изобретением с базой данных, содержащей большое число последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, в частности BLASTP или TBLASTN, использующая параметры по умолчанию (см., например, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403 410, и (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389 402).

Согласно конкретным вариантам осуществления антитело или фрагмент антитела для применения в способе в соответствии с настоящим изобретением может быть моноспецифическим, биспецифическим или мультиспецифическим. Мультиспецифические антитела могут быть специфичными по отношению к разным эпитопам одного целевого полипептида или могут содержать антиген-связывающие домены, специфичные по отношению к эпитопам более чем одного целевого полипептида. Формат типичного биспецифического антитела, который может быть использован в контексте настоящего изобретения, предусматривает применение первого домена C_H3 иммуноглобулина (Ig) и второго домена C_H3 Ig, при этом первый и второй домены C_H3 Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, и при этом различие по меньшей мере по одной аминокислоте снижает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, не имеющим различия по аминокислотам. Согласно одному варианту осуществления первый домен C_H3 Ig связывает белок А, а второй домен C_H3 Ig

содержит мутацию, которая снижает или аннулирует связывание белка А, такую как модификация Н95R (по нумерации экзонов IMGT; Н435R по нумерации EU). Второй СнЗ может дополнительно содержать модификацию Y96F (по IMGT; Y436F по EU). Дополнительные модификации, которые могут быть выявлены во втором СнЗ, включают в себя D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I по EU) в случае mAb IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I по EU) в случае mAb IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EU) в случае mAb IgG4. Вариации в формате биспецифического антитела, описанном выше, предусматриваются объемом настоящего изобретения.

Фраза «терапевтически эффективное количество» означает количество, которое производит желаемый эффект, для которого его вводят. Точное количество будет зависеть от цели лечения и будет устанавливаться специалистом в данной области с использованием известных методик (см., например, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

Термин «синдром(ы) функциональной боли» относится к хроническим основанным на симптомах синдромам, которые поражают до 15% населения всего мира. Они характеризуются хронической болью и дискомфортом, относящимися к разным участкам организма. В целом не были выявлены обусловленные структурные, воспалительные или биохимические патологии, которые могли бы полностью объяснить симптомы. У пациентах значительно снижается качество жизни, но варианты лечения ограничены, а разработка новых терапевтических подходов разочаровывает. Некоторые из общих расстройств, которые попадают в эту категорию, включают в себя хроническую боль в нижней части спины, синдром раздраженного кишечника (IBS), фибромиалгию (FM), синдром хронического утомления, синдром функциональной абдоминальной боли, нарушение височно-нижнечелюстного сустава (TMJD), синдром раздраженного мочевого пузыря (интерстициальный цистит), функциональные желудочно-кишечных нарушения/синдромы, синдром функциональной ректальной боли, синдром функциональной боли в груди, мигрени и головные боли напряжения, синдром хронической тазовой боли, синдром болезненной предстательной железы (хронический простатит), синдром множественной химической чувствительности и синдром войны в Персидском заливе.

Общее описание

Родственное нейротрофическому фактору линии глиальных клеток семейство включает в себя нейротрофический фактор линии глиальных клеток (GDNF), нейротурин (NRTN), персефин (PSPN) и артемин (ARTN). Семейство белков GDNF дифференциально вовлекается в развитие и поддержание чувствительных, кишечных, симпатических и парасимпатических нейронов, а также ряда отличных от нервной тканей (Henderson, C.E., *et al.*, (1994), *Science* 266:1062-1064; Kotzbauer, P.T. *et al.*, (1996), *Nature* 384:467-470; Springer, J.E., *et al.* (1994), *Exp. Neurol.* 127:167-170; Schaar. D.G., *et al.*, (1993), *Exp. Neurol.* 124:368-371). GDNF является особенно эффективным фактором выживания для дофаминергических, норадренергических и двигательных нейронов спинного мозга (Yan, Q. *et al.* (1995), *Nature*, 373:341-344; Henderson, C.E., *et al.*, (1994), *Science*, 266:1062-1064; Buj-Bello, A. *et al.*, (1995), *Neuron*, 15:821-828). Другие представители ростового семейства GDNF обладают функциями вне нервной системы (Trupp, M. *et al.*, (1995), *J. Cell Biol.* 130:137-148; Kotzbauer, P.T. *et al.*, (1996), *Nature* 384:467-470; Springer, J.E., *et al.* (1994), *Exp. Neurol.* 127:167-170; Schaar. D.G., *et al.*, (1993), *Exp. Neurol.* 124:368-371). Например, NRTN, ARTN и PSPN также экспрессируются в развивающейся почке. GDNF также играет важную роль вне нервной системы в регуляции почечного морфогенеза и сперматогенеза (Airaksinen, M.S. *et al.*, (2002), *Nature Reviews* 3:383-392).

Каждый представитель семейства GDNF преимущественно связывается с гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-заякоренным белковым рецептором, динамически ассоциированным с плазматической мембраной (*m.e.* является лигандом для него). Семейство рецепторов-альфа семейства GDNF состоит из четырех разных рецепторов: GFRalpha1 (GFR α 1, GDNFR-alpha); GFRalpha2 (GFR α 2/TnR2/GDNFR-beta/NTNR-alpha/RETL2); GFRalpha3 (GFR α 3) и GFRalpha4 (GFR α 4). GDNF преимущественно связывается с GFR α 1, NRTN преимущественно связывается с GFR α 2, ARTN преимущественно связывается с GFR α 3, а PSPN преимущественно связывается с GFR α 4 (Airaksinen, M.S., *et al.* *Nature Reviews Neuroscience* (2002), 3:383-394).

GFR α 2 на высоком уровне экспрессируется в коре головного мозга, базальных отделах переднего мозга и особых слоях обонятельной луковицы, а также на низком уровне экспрессируется в черном веществе, мозжечке и двигательных ядрах. GFR α 3 экспрессируется в нервах эмбриона и взрослой мыши, симпатических и сенсорных ганглиях, кишечнике, сердце, головном мозге, легком и почке. GFR α 4 экспрессируется на низких уровнях в различных отделах головного мозга у взрослого, а также в

некоторых периферических тканях, в том числе в яйчке и сердце. Несмотря на то, что предпочтения связывания представителей семейства GDNF, представляющие собой GDNF с GFR α 1; нейротурин с GFR α 2; артемин с GFR α 3 и персефин с GFR α 4, показаны выше, спаривание лиганда и рецептора не является строгим (Airaksinen, M.S., *et al.* Nature Reviews Neuroscience (2002), 3:383-394). Например, GDNF связывается с GFR α 2 и GFR α 3 с более низкой эффективностью, чем он связывается с GFR α 1.

Лиганды семейства GDNF, как правило, но не исключительно, передают их сигналы через многокомпонентные комплексы, состоящие из лиганда, его рецептора GFR-альфа и рецепторной тирозинкиназы, с-RET. RET является общим элементом таких лигандных комплексов передачи сигнала. RET представляет собой протоонкоген, который строго активирует антиапоптотические сигналы через активацию фосфоинозитол-3-киназ (PI3-K)/PDK/АКТ(ПКВ) и пути Ras/Raf/MEK/ERK. RET также способна активировать фосфолипазу-С-гамма (PLCgamma), которая повышает внутриклеточный кальций и облегчает активацию представителей традиционного и нового семейства протеинкиназы С (PKC). Комплексы лигандов и рецепторов семейства GDNF не ограничиваются передачей сигнала через RET. GDNF:GFRalpha1 может связываться с NCAM в клетках, не имеющих RET, и активировать Fyn и FAK. При некоторых условиях комплексы GDNF:GFRalpha непосредственно активируют киназу Src.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения какой-либо один или несколько из трех глобулярных богатых цистеином доменов (1, 2 или 3) из GFR α 3 или их фрагментов могут быть использованы для получения антител, которые связывают GFR α 3 и ингибируют его функцию или ингибируют его способность связываться со своим лигандом, таким как артемин. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением, специфическое к GFR α 3, может связываться со связывающим лиганд доменом в GFR α 3 и в таком виде может блокировать связывание комплекса лиганд (артемин)-GFR α 3 с RET. Непроцессированная аминокислотная последовательность человеческого GFR α 3 показана как SEQ ID NO: 375. Нуклеиновая кислота, кодирующая человеческий GFR α 3, показана в SEQ ID NO: 374. Домен 1 охватывает остатки 44-124 из SEQ ID NO: 375; домен 2 охватывает остатки 162-239 из SEQ ID NO: 375; домен 3 охватывает остатки 248-340 из SEQ ID NO: 375 (см. либо SEQ ID NO 375 или NP_001487.2 в Genbank).

Любой из этих доменов 1, 2 или 3 или полученных из них фрагментов могут быть использованы для получения антител, которые специфично связываются с GFR α 3

и ингибируют его активность или по меньшей мере одну функцию, ассоциированную с GFR α 3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением специфично связываются с GFR α 3 и могут предотвращать передачу сигнала, опосредованную GFR α 3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела, которые специфично связываются с GFR α 3, могут предотвращать связывание GFR α 3 с его лигандом, таким как артемин (Wang, X. *et al.* Structure, (2006), 14:1083-1092). Согласно некоторым вариантам осуществления антитела, которые специфично связываются с GFR α 3, могут предотвращать активацию рецепторной тирозинкиназы RET. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением могут специфично связываться с GFR α 3 без предотвращения активации рецепторной тирозинкиназы RET. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением могут специфично связываться с GFR α 3 и предотвращать передачу сигнала через RET или через медиатор, отличный от RET. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы для ингибирования роста опухолевых клеток/пролиферации и как таковые могут быть применимы для лечения некоторых злокачественных заболеваний/злокачественных опухолей, или боли, ассоциированной с такими злокачественными заболеваниями/злокачественными опухолями, или боли, ассоциированной с метастазированием таких злокачественных заболеваний/злокачественных опухолей (см. Tang, J-Z, *et al.* Mol Cancer Ther (2010), 9(6): 1697-1708; Kang, J. *et al.* Oncogene, (2009), 28:2034-2045; Ceyhan, G.O. *et al.* Annals of Surgery, (2006), 244(2):274-281; Banerjee, A., *et al.* Breast Cancer Res (2011), 13:R112; Pandey, V. *et al.*, Endocrinology, (2010), 151(3):909-920; Kang, J. *et al.*, Oncogene, (2010), 29:3228-3240; Li, S. *et al.* J Biomed Sci (2011), 18:24). Согласно некоторым вариантам осуществления антитела, которые специфично связываются с GFR α 3, могут быть получены с использованием фрагментов вышеупомянутых областей или пептидов, которые выходят за пределы обозначенных областей на приблизительно 10 - приблизительно 50 аминокислотных остатков либо с N- или C-конца, либо с обоих концов областей, описанных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления любая комбинация вышеупомянутых областей или их фрагментов может быть использована в получении специфических по отношению к GFR α 3 антител. Как отмечено выше, для получения специфических антител против hGFR α 3 длина или число аминокислотных остатков, охватывающих три домена hGFR α 3, могут

варьировать от приблизительно десяти до пятидесяти аминокислотных остатков, выходящих либо от N- или С-конца, либо от обоих концов непротессированного домена или его фрагмента.

Антиген-связывающие фрагменты антител

Если конкретно не указано иное, используемый в настоящем документе термин «антитело» следует понимать как охватывающий молекулы антител, содержащие две тяжелых цепи иммуноглобулина и две легких цепи иммуноглобулина (*т.е.* «полные молекулы антител»), а также их антиген-связывающие фрагменты. Используемые в настоящем документе термины «антиген-связывающая часть» антитела, «антиген-связывающий фрагмент» антитела и т.п. включают в себя любой встречающийся в природе, ферментативно получаемый, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, которые специфично связываются с антигеном с образованием комплекса. Используемые в настоящем документе термины «антиген-связывающая часть» антитела или «фрагмент антитела» относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфично связываться с hGFR α 3. Фрагмент антитела может включать в себя Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, Fv-фрагмент, dAb-фрагмент, фрагмент, содержащий CDR или выделенную CDR. Антиген-связывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полных молекул антител с использованием каких-либо приемлемых стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или методики рекомбинантной генетической инженерии, предусматривающие манипуляцию с ДНК и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и (необязательно) константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легкодоступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (в том числе, например, фаговых библиотек антител), или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и подвергнуть химическим манипуляциям или методикам молекулярной биологии, например, размещению одного или нескольких переменных и/или константных доменов в приемлемой конфигурации или введению кодонов, созданию цистеиновых остатков, модификации, добавлению или делеции аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антиген-связывающих фрагментов включают в себя (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')₂-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют

гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR)). Другие сконструированные молекулы, такие как диатела, триатела, тетратела и минитела, также охватываются используемым в настоящем документе выражением «антиген-связывающий фрагмент».

Антиген-связывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может характеризоваться любым размером или аминокислотным составом и, как правило, будет содержать по меньшей мере одну CDR, которая расположена рядом с одной или несколькими каркасными последовательностями или в рамке с таковыми. В антиген-связывающих фрагментах, имеющих домен V_H , ассоциированный с доменом V_L , домены V_H и V_L могут быть расположены друг относительно друга в любом приемлемом положении. Например, вариабельная область может быть димерной и может содержать димеры $V_H - V_H$, $V_H - V_L$ или $V_L - V_L$. В качестве альтернативы, антиген-связывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

Согласно некоторым вариантам осуществления антиген-связывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один вариабельный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие типичные конфигурации вариабельных и константных доменов, которые могут быть обнаружены в антиген-связывающем фрагменте антитела в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя: (i) V_H-C_{H1} ; (ii) V_H-C_{H2} ; (iii) V_H-C_{H3} ; (iv) $V_H-C_{H1}-C_{H2}$; (v) $V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$; (vi) $V_H-C_{H2}-C_{H3}$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_{H1} ; (ix) V_L-C_{H2} ; (x) V_L-C_{H3} ; (xi) $V_L-C_{H1}-C_{H2}$; (xii) $V_L-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$; (xiii) $V_L-C_{H2}-C_{H3}$ и (xiv) V_L-C_L . В любой конфигурации вариабельных и константных доменов, в том числе в любой из типичных конфигураций, перечисленных выше, вариабельные и константные домены либо могут быть непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны с помощью полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между соседними вариабельными и/или константными доменами в отдельной полипептидной молекуле. Более того, антиген-связывающий фрагмент антитела в соответствии с настоящим изобретением может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из перечисленных выше конфигураций вариабельных и константных доменов с нековалентной связью между ними и/или с одним или несколькими мономерными

доменами V_H или V_L (например, с дисульфидной связью(ями)).

Как и в случае полных молекул антител, антиген-связывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антиген-связывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере два разных переменных домена, при этом каждый переменный домен способен специфично связываться с отдельным антигеном или с особым эпитопом в одном и том же антигене. Формат мультиспецифического антитела, в том числе типичные форматы биспецифического антитела, раскрытые в настоящем документе, могут быть адаптированы для применения в контексте антиген-связывающего фрагмента антитела в соответствии с настоящим изобретением с использованием обычных методик, доступных в уровне техники.

Получение человеческих антител

В уровне техники известны способы создания человеческих антител у трансгенных мышей. Любые такие известные способы могут быть использованы в контексте настоящего изобретения для получения человеческого антитела, которое специфично связывается с человеческим $GFR\alpha 3$.

С использованием технологии VELOCIMMUNE™ или любого другого известного способа создания моноклональных антител сначала выделяют химерные антитела против $GFR\alpha 3$ с высокой аффинностью, имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Как в нижеприведенном экспериментальном разделе, антитела характеризуют и отбирают по желаемым характеристикам, в том числе по аффинности, селективности, эпитопу и т.д. Мышинные константные области замещают желательной человеческой константной областью для создания полностью человеческого антитела в соответствии с настоящим изобретением, например, дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4. Тогда как отобранная константная область может варьировать в зависимости от конкретного применения, переменной области присущи характеристики высоко аффинного связывания антигена и целевой специфичности.

Как правило, антитела в соответствии с настоящим изобретением обладают очень высокими аффинностями, как правило, характеризуемыми K_D от приблизительно 10^{-13} до приблизительно 10^{-8} М или от приблизительно 10^{-12} до приблизительно 10^{-9} М при измерении с помощью связывания с антигеном, иммобилизованным либо в твердой

фазе, либо в фазе раствора. Мышинные константные области замещают желательными человеческими константными областями для создания полностью человеческих антител в соответствии с настоящим изобретением. Тогда как отобранная константная область может варьировать в зависимости от конкретного применения, вариабельной области присущи характеристики высоко аффинного связывания антигена и целевой специфичности.

Биоэквиваленты

Антитела против GFR α 3 и фрагменты антител в соответствии с настоящим изобретением охватывают белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от таковых у желательных антител, но сохраняют способность связываться с человеческим GFR α 3. Такие варианты антитела и фрагменты антител содержат одну или несколько добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая, по сути, эквивалентна таковой у желательных антител. Подобным образом, кодирующие антитела против GFR α 3 последовательности ДНК в соответствии с настоящим изобретением охватывают последовательности, которые содержат одну или несколько добавлений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело против GFR α 3 или фрагмент антитела, которые, по сути, биоэквивалентны антителу против GFR α 3 или фрагменту антитела в соответствии с настоящим изобретением.

Два антиген-связывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и степень абсорбции которых не показывают существенной разницы при введении при одной и той же молярной дозе в подобных экспериментальных условиях, либо в виде одной дозы, либо в виде нескольких доз. Некоторые антитела будут считаться фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по своей степени абсорбции, но не по своей скорости абсорбции, и все же могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются намеренными и отражаются в мечении, не являются существенными для достижения эффективных концентрации лекарственного средства в организме, например, при хроническом применении, и считаются в медицинском отношении незначительными для конкретного исследуемого лекарственного продукта.

Согласно одному варианту осуществления два антиген-связывающих белка являются биоэквивалентными, если отсутствуют клинически значимые различия в их безопасности, чистоте и эффективности.

Согласно одному варианту осуществления два антиген-связывающих белка являются биоэквивалентными, если пациент может быть переведен один или несколько раз с эталонного продукта на биологический продукт без ожидаемого повышения риска побочных эффектов, в том числе клинически значимого изменения иммуногенности, или уменьшения эффективности, по сравнению с продолжаемой терапией без такого перевода.

Согласно одному варианту осуществления два антиген-связывающих белка являются биоэквивалентными, если они действуют по общему механизму или механизмам действия при состоянии или состояниях, для которых применяются, в той степени, в которой такие механизмы известны.

Биоэквивалентность может быть продемонстрирована способами *in vivo* и/или *in vitro*. Измерения биоэквивалентности предусматривают, например, (a) *in vivo* тест для людей или других млекопитающих, у которых измеряют концентрацию антитела или его метаболитов в крови, плазме, сыворотке крови или другой биологической жидкости как функцию времени; (b) *in vitro* тест, который был коррелирован с данными *in vivo* биодоступности у человека и обоснованно предсказывает таковые; (c) *in vivo* тест для людей или других млекопитающих, у которых приемлемый острый фармакологический эффект антитела (или его цели) измеряют как функцию времени; и (d) хорошо контролируемое клиническое испытание, при котором устанавливают безопасность, эффективность, или биодоступность, или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты антител против GFR α 3 в соответствии с настоящим изобретением могут быть сконструированы, например, путем осуществления различных замен остатков или последовательностей или делецией концевых или внутренних остатков или последовательностей, не являющихся необходимыми для биологической активности. Например, цистеиновые остатки, несущественные для биологической активности, могут быть удалены или замещены другими аминокислотами для предотвращения образования ненужных или некорректных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать в себя варианты антител против GFR α 3, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые элиминируют или устраняют

гликозилирование.

Антитела против GFR α 3, содержащие варианты Fc

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения представлены антитела против GFR α 3, содержащие Fc-домен, имеющий одну или несколько мутаций, которые усиливают или ослабляют связывание антител с FcRn-рецептором, например, при кислотном pH по сравнению с нейтральным pH. Например, настоящее изобретение предусматривает антитела против GFR α 3, имеющие мутацию в области C_H2 или C_H3 Fc-домена, при этом мутация(и) повышает аффинность Fc-домена по отношению к FcRn в кислотных окружающих условиях (например, в эндосоме, где pH варьирует от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению времени полужизни в сыворотке крови антитела при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают в себя, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K), и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. Согласно одному варианту осуществления модификация предусматривает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 4 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

Например, настоящее изобретение предусматривает антитела против GFR α 3, содержащие Fc-домен, имеющий одну или несколько пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций Fc-домена и другие мутации в переменных доменах антител, раскрытых в настоящем документе, предусматриваются объемом настоящего изобретения.

Биологические характеристики антител

Как правило, антитела в соответствии с настоящим изобретением могут функционировать путем связывания с каким-либо одним или несколькими из трех глобулярных богатых цистеином доменов (1, 2 или 3) в hGFR α 3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением могут связываться с эпитопом, расположенным по меньшей мере в одном из богатых цистеином доменов в hGFR α 3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением может связываться с аминокислотными остатками домена 1 в GFR α 3, варьирующими от приблизительно остатка 44 до приблизительно остатка 124 из SEQ ID NO: 375. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением может связываться с аминокислотными остатками домена 2 в GFR α 3, варьирующими от приблизительно остатка 162 до приблизительно остатка 239 из SEQ ID NO: 375. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением может связываться с аминокислотными остатками домена 3 в GFR α 3, варьирующими от приблизительно остатка 248 до приблизительно остатка 340 из SEQ ID NO: 375. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением могут функционировать путем блокирования или ингибирования активности GFR α 3 связыванием с областью в каком-либо одном из доменов, который действует как домен связывания лиганда, что таким образом предотвращает связывание лиганда, такого как артемин, с этим сайтом. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением может связываться с сайтом связывания лиганда в одном из доменов GFR α 3 и предотвращать последующее связывание комплекса артемин-GFR α 3 с RET. Согласно одному варианту осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением может связываться с каким-либо одним или несколькими из эпитопов в комплексе артемин-GFR α 3, который может определять специфичность между лигандом и GFR α 3 или играть в ней роль, например, в области, варьирующей от остатка 167 до остатка 184 из SEQ ID NO: 375. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением может связываться с одним или несколькими из остатков домена 2, которые отвечают за специфичность между артемином и GFR α 3, например, аминокислотных остатков в положениях 167 (met), 176 (asp) и/или в положении 184 (glu) из SEQ ID NO: 375, и связываясь таким образом может предотвращать связывание лиганда с его рецептором, а затем может

предотвращать передачу сигнала через рецепторную тирозинкиназу RET или через медиатор или модулятор передачи сигнала, отличный от RET. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением могут связываться со связанной с мембраной формой GFR α 3 или с растворимой формой GFR α 3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением могут связываться с GFR α 3, но не могут перекрестно реагировать с GFR α 1, GFR α 2 или GFR α 4. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть биспецифическими антителами. Биспецифические антитела в соответствии с настоящим изобретением могут связывать один эпитоп в одной богатой цистеином области одного домена, а также могут связывать одну богатую цистеином область во втором домене hGFR α 3. Согласно некоторым вариантам осуществления биспецифические антитела в соответствии с настоящим изобретением могут связываться с двумя разными областями в одном и том же домене. Согласно некоторым вариантам осуществления одно плечо биспецифического антитела в соответствии с настоящим изобретением может связываться с одной богатой цистеином областью одного домена в hGFR α 3, а другое плечо может связываться с RET или с модулятором, отличным от RET. Согласно некоторым вариантам осуществления биспецифические антитела могут связываться с одним доменом в GFR α 3 и одним доменом в GFR α 1 или GFR α 2.

Более конкретно, антитела против GFR α 3 в соответствии с настоящим изобретением могут обладать одной или несколькими из следующих характеристик:

проявлять K_D , варьирующую от приблизительно 10^{-8} М до приблизительно 10^{-13} М, как измерено поверхностным плазмонным резонансом;

демонстрировать способность блокировать на приблизительно 50-100% связывание GFR α 3 с его лигандом артемином, при этом значение IC_{50} варьирует от приблизительно 40 пМ до приблизительно 15 нМ;

демонстрировать способность блокировать на приблизительно 20% - приблизительно 100% связывание GFR α 3 с твердой подложкой, покрытой смесью артемина и RET;

блокировать или ингибировать артемин-зависимую активацию RET, при этом IC_{50} варьирует от приблизительно 200 пМ до приблизительно 50 нМ;

ингибировать или снижать одну или несколько ноцицептивных реакций на *in vivo* модели боли при раке кости;

ингибировать или снижать артемин-сенсibilизированную тепловую гипералгезию *in vivo*;

ингибировать или снижать аллодинию на *in vivo* модели остеоартрита;

не реагировать перекрестно с другими корецепторами GFR для RET;

содержать вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 381 и 397; или

содержать вариабельную область легкой цепи (LCVR) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 389 и 405.

Некоторые антитела против GFR α 3 в соответствии с настоящим изобретением способны ингибировать или ослаблять активность GFR α 3 в *in vitro* анализе. Способность антител в соответствии с настоящим изобретением связываться и ингибировать связывание GFR α 3 с его лигандом артемином отдельно или в присутствии RET может быть измерена с использованием любого стандартного способа, известного специалистам в данной области, в том числе анализами связывания или анализами для определения блокирования антителом активации RET путем ингибирования связывания GFR α 3 с его рецепторным артемином, такими как описанные в настоящем документе. Неограничивающие, типичные *in vitro* анализы для измерения активности GFR α 3 иллюстрируются в нижеприведенных примерах 4 и 5.

Настоящее изобретение относится к антителам против GFR α 3 и их антиген-связывающим фрагментам, которые связываются с одним или несколькими из богатых цистеином глобулярных доменов GFR α 3, как показано в SEQ ID NO: 375, или с их фрагментом. Специфические к GFR α 3 антитела могут не содержать дополнительных меток или частей или могут содержать N-концевую или C-концевую метку или часть. Согласно одному варианту осуществления метка или часть представляет собой биотин. В анализе связывания локализация метки (если таковая имеется) может определять ориентацию пептида относительно поверхности, на которой пептид связывается. Например, если поверхность покрывается авидином, то пептид, содержащий N-концевой биотин, будет ориентироваться так, что C-концевая часть пептида будет дистальной по отношению к поверхности.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к

полностью человеческому моноклональному антителу или его антиген-связывающему фрагменту, которые специфично связываются с hGFR α 3 и нейтрализуют активность hGFR α 3, при этом антитело или его фрагмент обладает одной или несколькими из следующих характеристик:

(i) содержит HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 381 и 397;

(ii) содержит LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 389 и 405;

(iii) содержит какую-либо одну или несколько из последовательностей тяжелой или легкой цепи CDR1, CDR2 и CDR3, приведенных в таблице 1, и их комбинации;

(iv) является специфическим при связывании и/или блокировании активности GFR α 3 без связывания и/или блокирования других рецепторов-альфа GFR, в том числе GFR α 1, GFR α 2 и GFR α 4;

(v) демонстрирует специфичность связывания для какого-либо одного или нескольких богатых цистеином глобулярных доменов GFR α 3;

(vi) блокирует активацию и передачу сигнала посредством рецепторной тирозинкиназы RET;

(vii) ингибирует или снижает артемин-сенситизированную тепловую гипералгезию *in vivo*;

(viii) ингибирует или снижает аллодинию на *in vivo* модели остеоартрита; или ингибирует или снижает одну или несколько ноцицептивных реакций на *in vivo* модели боли при раке кости.

Картирование эпитопа и соответствующие технологии

Различные методики, известные рядовым специалистам в данной области, могут быть использованы для определения того, что антитело «взаимодействует с одной или несколькими аминокислотами» в полипептиде или белке. Могут быть выполнены типичные методики, включающие в себя, например, обычный анализ перекрестного блокирования, такой как описанный Harlow и Lane в Antibodies (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY). Другие способы включают в себя мутационный анализ со сканированием аланином, пептидный блот-анализ (Reineke (2004) *Methods Mol Biol* 248:443-63), анализ пептидного расщепления, кристаллографические исследования и

анализ ЯМР. Кроме того, могут быть использованы способы, такие как исключение эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) *Protein Science* 9: 487-496). Другим способом, который может быть использован для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым антитело взаимодействует, является выявление замены водород/дейтерий, выявляемой масс-спектрометрией. В общих чертах, способ замены водород/дейтерий предусматривает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с меченным дейтерием белком. Далее комплекс белок/антитело переносят в воду и заменяемые протоны в аминокислотах, которые защищены комплексом антитела, подвергают обратной замене дейтерия на водород при более медленной скорости, чем заменяемые протоны в аминокислотах, которые не являются частью области контакта. В результате аминокислоты, которые формируют часть области контакта белок/антитело, могут удерживать дейтерий и, поэтому, показывать относительно более высокую массу по сравнению с аминокислотами, не включенными в область контакта. После диссоциации антитела целевой белок подвергают протеазному расщеплению и масс-спектрометрическому анализу с выявлением тем самым меченных дейтерием остатков, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Термин «эпитоп» относится к сайту в антигене, на который отвечают В- и/или Т-клетки. В-клеточные эпитопы могут быть сформированы как из смежных аминокислот, так и из несмежных аминокислот, располагающихся рядом благодаря третичной укладке белка. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные третичной укладкой, как правило, утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, включает в себя по меньшей мере 3, а чаще по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Определение профиля с помощью модификации (MAP), также известное как определение профиля антитела на основе структуры антигена (ASAP), представляет собой способ, который классифицирует большое число моноклональных антител (mAb), направленных против одного и того же антигена согласно подобиям профиля связывания каждого антитела химически или ферментативно модифицированным антигенным поверхностям (см., например, заявку на выдачу патента США

№ 2004/0101920). Каждая категория может отражать уникальный эпитоп, который либо совершенно отличается от эпитопа, представленного другой категорией, либо частично перекрывается с таковым. Эта технология обеспечивает быстрый отбор генетически идентичных антител так, что классификация может быть сфокусирована на генетически отличающихся антителах. При использовании для гибридного скрининга MAP может облегчать идентификацию редких гибридных клонов, которые продуцируют mAb, обладающие нужными характеристиками. MAP может быть использована для сортировки антител в соответствии с настоящим изобретением по группам антител, связывающих различные эпитопы.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело против GFR α 3 или антиген-связывающим фрагмент антитела связывает эпитоп по меньшей мере в одном из богатых цистеином доменов 1, 2 или 3 GFR α 3 или их фрагменте, при этом домен 1 варьирует от приблизительно числа остатков 44 до приблизительно числа остатков 124 из SEQ ID NO: 375; домен 2 варьирует от приблизительно числа остатков 162 до приблизительно числа остатков 239 из SEQ ID NO: 375; домен 3 варьирует от приблизительно числа остатков 248 до приблизительно числа остатков 340 из SEQ ID NO: 375.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело против GFR α 3 или антиген-связывающим фрагмент антитела связывает эпитоп в домене 1 или его фрагменте человеческого GFR α 3.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело против GFR α 3 или антиген-связывающим фрагмент антитела связывает эпитоп в домене 2 или его фрагменте человеческого GFR α 3.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело против GFR α 3 или антиген-связывающим фрагмент антитела связывает эпитоп в домене 3 или его фрагменте человеческого GFR α 3.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент антитела связывает эпитоп, который включает в себя более чем один из приведенных эпитопов GFR α 3 в домене 1, 2 или 3 и/или в двух различных доменах (например, эпитопы в доменах 1 и 2, или в доменах 2 и 3, или в доменах 1 и 3).

Согласно некоторым вариантам осуществления антителом является биспецифическое антитело, которое связывает один эпитоп в одном домене GFR α 3, а другой эпитоп в другом домене GFR α 3. Согласно одному варианту осуществления антителом является биспецифическое антитело, которое связывает один эпитоп в

домене 1 GFR α 3, а другой эпитоп в домене 2 GFR α 3. Согласно одному варианту осуществления антителом является биспецифическое антитело, которое связывает один эпитоп в домене 1 GFR α 3, а другой эпитоп в домене 3 GFR α 3. Согласно одному варианту осуществления антителом является биспецифическое антитело, которое связывает один эпитоп в домене 2 GFR α 3, а другой эпитоп в домене 3 GFR α 3.

Настоящее изобретение относится к антителам против GFR α 3, которые связываются с одним и тем же эпитопом, таким как какое-либо из конкретных типичных антител, описанных в настоящем документе (например, H4H2207N, H4H2212N, H4H2236N3, H4H2243N2, H4H2210N, H4H2234N, H4H2291S, H4H2292S, H4H2293P, H4H2294S, H4H2295S, H4H2296S, H4H2341S, H4H2342P, H4H2344S, H4H2345S, H4H2346S, H4H2350P, H4H2352S, H4H2354S, H4H2355S, H4H2357S, H4H2364S, H1M2243N и H1M2236N). Подобным образом, настоящее изобретение также относится к антителам против GFR α 3, которые конкурируют за связывание с GFR α 3 или с фрагментом GFR α 3 с каким-либо из конкретных типичных антител, описанных в настоящем документе.

С помощью обычных известных в уровне техники способов можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело против GFR α 3, или конкурирует за связывание с таковым. Например, для определения того, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело против GFR α 3 в соответствии с настоящим изобретением, обеспечивают связывание эталонного антитела с белком или пептидом GFR α 3 в условиях насыщения. Далее оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой GFR α 3. Если тестируемое антитело способно связываться с GFR α 3 после насыщающего связывания с эталонным антителом против GFR α 3, можно заключить, что тестируемое антитело связывается с иным эпитопом, чем эталонное антитело против GFR α 3. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с молекулой GFR α 3 после насыщающего связывания с эталонным антителом против GFR α 3, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, с которым связывается эталонное антитело против GFR α 3 в соответствии с настоящим изобретением.

Для определения того, конкурирует ли антитело за связывание с эталонным антителом против GFR α 3, описанный выше метод связывания выполняют в двух ориентациях. В первой ориентации обеспечивают связывание эталонного антитела с молекулой GFR α 3 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой GFR α 3. Во второй ориентации обеспечивают

связывание тестируемого антитела с молекулой GFR α 3 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой GFR α 3. Если в обеих ориентациях только первое (при насыщении) антитело способно связываться с молекулой GFR α 3, то заключают, что тестируемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с GFR α 3. Рядовому специалисту в данной области будет понятно, что антитело, конкурирующее за связывание с эталонным антителом, не обязательно может связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела путем связывания перекрывающегося или соседнего эпитопа.

Два антитела связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждое конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном. То есть 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или даже 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 1990 50:1495-1502). В качестве альтернативы, два антитела обладают одинаковыми эпитопами, если, по сути, все аминокислотные мутации в антигене, которые снижают или устраняют связывание одного антитела, снижают или устраняют связывание другого. Два антитела обладают перекрывающимися эпитопами, если некоторые аминокислотные мутации, которые снижают или устраняют связывание одного антитела, снижают или устраняют связывание другого.

Затем могут быть выполнены дополнительные обычные эксперименты (например, анализы пептидных мутаций и связывания) для подтверждения того, обуславливается ли наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела фактически связыванием с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, или отвечает ли стерическое блокирование (или другие явление) за отсутствие наблюдаемого связывания. Эксперименты такого рода могут быть выполнены с использованием ELISA, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или какого-либо другого количественного или качественного анализа связывания антитела, доступного в уровне техники.

Видовая селективность и видовая перекрестная реакционная способность

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антитела против GFR α 3 связываются с человеческим GFR α 3, но не с GFR α 3 других видов. В качестве альтернативы, антитела против GFR α 3 в соответствии с настоящим

изобретением согласно некоторым вариантам осуществления связываются с человеческим $\text{GFR}\alpha 3$ и с $\text{GFR}\alpha 3$ одного или нескольких отличных от человека видов. Например, антитела против $\text{GFR}\alpha 3$ в соответствии с настоящим изобретением могут связываться с человеческим $\text{GFR}\alpha 3$ и могут связываться или не связываться, в соответствующих случаях, с одним или несколькими $\text{GFR}\alpha 3$ мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мармозетки, макака-резуса или шимпанзе.

Иммуноконъюгаты

Настоящее изобретение относится к человеческому моноклональному антителу против $\text{GFR}\alpha 3$, конъюгированному с терапевтической частью («иммуноконъюгат»), такой как средство, которое способно снижать боль и/или воспаление, химиотерапевтическое лекарственное средство или радиоизотоп. Тип терапевтической части, которая может быть конъюгирована с антителом против $\text{GFR}\alpha 3$, будет зависеть от состояния, подлежащего лечению, и от желаемого терапевтического эффекта, который необходимо достичь. Например, для лечения острой или хронической боли средство, такое как NSAID, опиоид или ингибитор COX-2, или местное анестезирующее средство, или второй ингибитор $\text{GFR}\alpha 3$, может быть конъюгировано с антителом против $\text{GFR}\alpha 3$. В качестве альтернативы, если желаемый терапевтический эффект заключается в лечении воспаления, ассоциированного с болезненным состоянием, то с антителом против $\text{GFR}\alpha 3$ можно эффективно сконъюгировать противовоспалительное средство, такое как без ограничения целекоксиб, или антагонист цитокина, такой как ингибитор IL-1 или IL-6. Если состоянием, подлежащим лечению, является злокачественное состояние, то с антителом против $\text{GFR}\alpha 3$ можно успешно сконъюгировать химиотерапевтическое средство или радиоизотоп. Примеры приемлемых средств для формирования иммуноконъюгатов известны в уровне техники, см., например, WO 05/103081.

Мультиспецифические антитела

Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть моноспецифическими, биспецифическими или мультиспецифическими. Мультиспецифические антитела могут быть специфическими по отношению к различным эпитопам одного целевого полипептида или могут содержать антиген-связывающие домены, специфические по отношению к более чем одному целевому

полипептиду. См., например, Tutt *et al.*, 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Антитела против GFR α 3 в соответствии с настоящим изобретением могут быть связаны или совместно экспрессированы с другой функциональной молекулой, например, с другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально связаны (например, химическим соединением, генетическим слиянием, нековалентной связью или иным путем) с одним или несколькими другими молекулярными объектами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, с получением биспецифического или мультиспецифического антитела со второй специфичностью связывания. Например, настоящее изобретение относится к биспецифическим антителам, у которых одно плечо иммуноглобулина является специфическим по отношению к человеческому GFR α 3 или его фрагменту, а другое плечо иммуноглобулина является специфическим по отношению ко второй терапевтической цели или сконъюгировано с терапевтической частью. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения одно плечо иммуноглобулина является специфическим по отношению к эпитопу в одном домене hGFR α 3 или его фрагменте, а другое плечо иммуноглобулина является специфическим по отношению к эпитопу во втором домене hGFR α 3. Согласно некоторым вариантам осуществления одно плечо иммуноглобулина является специфическим по отношению к одному эпитопу в одном домене hGFR α 3, а другое плечо является специфическим по отношению ко второму эпитопу в одном и том же домене hGFR α 3.

Формат типичного биспецифического антитела, который может быть использован в контексте настоящего изобретения, предусматривает применение первого домена C_H3 иммуноглобулина (Ig) и второго домена C_H3 Ig, при этом первый и второй домены C_H3 Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, и отличие по меньшей мере одной аминокислоты снижает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, не имеющим отличия в аминокислотах. Согласно одному варианту осуществления первый домен C_H3 Ig связывает белок А, а второй домен C_H3 Ig имеет мутацию, которая снижает или аннулирует связывание с белком А, такую как модификация Н95R (по нумерации экзонов IMGT; H435R по нумерации EU). Второй C_H3 может дополнительно содержать модификацию Y96F (по IMGT; Y436F по EU). Следующие модификации, которые могут быть обнаружены во втором C_H3, включают в себя D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I по EU), в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I по EU), в

случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EU) в случае антител IgG4. Описанные выше вариации в формате биспецифического антитела предусматриваются объемом настоящего изобретения.

Терапевтическое введение и составы

Настоящее изобретение относится к терапевтическим композициям, содержащим антитела против GFR α 3 или их антиген-связывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением. Введение терапевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением, будет осуществляться с приемлемыми носителями, наполнителями и другими средствами, которые включают в составы для обеспечения улучшения передачи, доставки, переносимости и т.п. Множество приемлемых составов может быть найдено в известном всем фармацевтам справочнике Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают в себя, например, порошки, пасты, мази, гели, воски, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN™), конъюгаты с ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии «масло-в-воде» и «вода-в-масле», эмульсии карбовакса (полиэтиленгликоли с различными молекулярными массами), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. «Compendium of excipients for parenteral formulations» PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Доза антитела может варьировать в зависимости от возраста и размера субъекта, нуждающегося во введении, целевых заболевания, состояний, пути введения и т.п. Если антитело в соответствии с настоящим изобретением используют для лечения боли, ассоциированной с активностью GFR α 3 при различных состояниях и заболеваниях, и при этом состояние или заболевание вызывает острую или хроническую боль, воспалительную боль, нейропатическую боль и т.п., у взрослого пациента, полезно внутривенно вводить антитело в соответствии с настоящим изобретением, как правило, одной дозой от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг веса тела, более предпочтительно от приблизительно 0,02 до приблизительно 7, от приблизительно 0,03 до приблизительно 5 или от приблизительно 0,05 до приблизительно 3 мг/кг веса тела. В зависимости от тяжести состояния можно регулировать частоту и продолжительность лечения.

Известны различные системы доставки, которые могут быть использованы для

введения фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением, например, инкапсулирование в липосомах, макрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают в себя без ограничения внутридермальный, внутримышечный, внутриперитонеальный, внутривенный, подкожный, внутриназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композиция может быть введена любым традиционным путем, например, инфузией или болюсной инъекцией, абсорбцией через эпителиальную или слизисто-кожную выстилку (например, через слизистую оболочку ротовой полости, ректальную и желудочно-кишечную слизистую оболочку и т.д.), и может быть введена вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или локальным.

Фармацевтическая композиция также может быть доставлена в везикуле, в частности, липосоме (см., например, Langer (1990) Science 249:1527-1533).

В некоторых ситуациях фармацевтическая композиция может быть доставлена в системе контролируемого высвобождения. Согласно одному варианту осуществления может быть использован насос. Согласно другому варианту осуществления могут быть использованы полимерные материалы. Согласно следующему варианту осуществления система контролируемого высвобождения размещена в непосредственной близости от цели композиции, таким образом, требуется только часть системной дозы.

Инъекционные препараты могут включать в себя дозированные формы для внутривенной, подкожной, внутрикожной и внутримышечной инъекций, капельных инфузий и т.д. Такие инъекционные препараты могут быть получены общеизвестными способами. Например, инъекционные препараты могут быть получены растворением, суспендированием или эмульгированием антигена или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, традиционно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций используют, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу, другие вспомогательные средства и т.д., которые могут быть использованы в комбинации с приемлемым солюбилизующим средством, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное средство [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (50 мол.) аддукт гидрогенизированного касторового

масла)] и т.д. В качестве масляной среды используют, например, сезамовое масло, соевое масло и т.д., которые могут быть использованы в комбинации с солюбилизующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Полученной таким образом инъекцией предпочтительно заполняют приемлемую ампулу.

Фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может быть доставлена подкожно или внутривенно стандартными иглой и шприцем. Кроме того, для подкожной доставки легко находит применение устройство для доставки в виде шприца-ручки при доставке фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением. Такое устройство для доставки в виде шприца-ручки может быть многоразовым или одноразовым. Во многоразовом устройстве для доставки в виде шприца-ручки обычно используется заменяемый картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Как только вся фармацевтическая композиция в картридже введена, и картридж становится пустым, пустой картридж можно легко снять и поместить новый картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Затем устройство для доставки в виде шприца-ручки можно использовать повторно. В одноразовом устройстве для доставки в виде шприца-ручки нет заменяемого картриджа. Вместо этого одноразовое устройство для доставки в виде шприца-ручки предварительно заполняют фармацевтической композицией, находящейся в резервуаре устройства. Как только фармацевтическая композиция в резервуаре заканчивается, все устройство выбрасывают.

Множество многоразовых устройств для доставки в виде шприца-ручки и автоинъектора находят применение при подкожной доставке фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением. Примеры включают в себя, конечно, без ограничения AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Switzerland), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly и Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany), и это только некоторые из них. Примеры одноразовых устройств для доставки в виде шприца-ручки находят применение при подкожной доставке фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением включают в себя, конечно, без

ограничения шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинъектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL), и это только некоторые из них.

Преимущественно, фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описываемые выше, получают в дозированных формах в виде однократной дозы, приемлемой для обеспечения дозы активных ингредиентов. Такие дозированные формы в виде однократной дозы включают в себя, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество вышеупомянутого содержащегося антитела, как правило, составляет от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг на дозированную форму в виде однократной дозы; в частности, для формы инъекции предпочтительно, чтобы вышеупомянутое антитело составляло от приблизительно 5 до приблизительно 100 мг, и от приблизительно 10 до приблизительно 250 мг для других дозированных форм.

Терапевтические применения антител

Антитела в соответствии с настоящим изобретением применимы для лечения, предотвращения и/или облегчения какого-либо заболевания, расстройства или состояния, ассоциированных с активностью GFR α 3, или для облегчения по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с заболеванием, расстройством или состоянием, или для ослабления боли, ассоциированной с таким заболеванием, расстройством или состоянием. Типичные состояния, заболевания и/или расстройства, и/или боль, ассоциированная с такими состояниями, заболеваниями или расстройствами, которые можно лечить антителами против GFR α 3 в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя острую, хроническую, нейропатическую или воспалительную боль, артрит, интерстициальный цистит, панкреатит, мигрень, кластерные головные боли, невралгию тройничного нерва, герпетическую невралгию, общие невралгии, эпилепсию или эпилептические состояния, миотонию, аритмию, нарушения движения, нейроэндокринные нарушения, атаксию, синдром раздраженного кишечника, синдром воспалительного кишечника, позыв к дефекации, недержание, ректальную гиперчувствительность, висцеральную боль, остеоартритическую боль, подагру, постгерпетическую невралгию, диабетическую нейропатию, радикулит, ишиалгию, боль в спине, боль головы или шеи, приступ неконтролируемой боли, послеоперационную боль, боль, связанную со злокачественным заболеванием, в том

числе боль, ассоциированную с раком кости или раком поджелудочной железы.

Другие состояния, которые лечатся терапевтическими способами в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя врожденную эритромелалгию, ринит, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак кости, рак шейки матки или расстройства мочевого пузыря. Антитела в соответствии с настоящим изобретением или их антиген-связывающие фрагменты также могут быть использованы для лечения следующих состояний: злокачественная острая, хроническая или боль при переломе кости; ревматоидный артрит, спинальный стеноз; нейропатическая боль в нижней части спины; болевой мышечно-лицевой синдром; фибромиалгия; боль височно-нижнечелюстного сустава; висцеральная боль, в том числе абдоминальная; боль поджелудочной железы; хроническая головная боль; головная боль напряжения, в том числе кластерные головные боли; диабетическая нейропатия; HIV-ассоциированная нейропатия; нейропатия Шарко-Мари-Тута; врожденные сенсорные нейропатии; повреждение периферических нервов; болезненный нейрома; эктопические проксимальные и дистальные разряды; радикулопатия; вызванная химиотерапией нейропатическая боль; вызванная лучевой терапией нейропатическая боль; боль после удаления молочной железы; центральная боль; боль при повреждении спинного мозга; постинсультная боль; таламическая боль; комплексный регионарный болевой синдром (CRPS); фантомная боль; неутрачиваемая боль; мышечно-скелетная боль; боль суставов; боль при острой подагре; механическая боль в нижней части спины; боль шеи; тендинит; боль при физическом напряжении/повреждении; абдоминальная боль; пиелонефрит; аппендицит; холецистит; непроходимость кишечника; грыжи т.п.; боль в груди, в том числе сердечная боль; тазовая боль, боль при почечных коликах, острая боль при родах, в том числе боль при родовых схватках; боль при кесаревом сечении; боль при травмах и ожогах; эндометриоз; боль при опоясывающем герпесе; серповидноклеточная анемия; острый панкреатит; приступ неконтролируемой боли; орофациальная боль, в том числе боль при синусите, зубная боль; боль при рассеянном склерозе; боль при лепре; боль при болезни Бехчета; адипозалгия; боль при флебите; боль при синдроме Гийена-Барре; болезненный синдром беспокойных ног и пальцев; синдром Хаглунда; боль при болезни Фабри; заболевание мочевого пузыря и мочеполовой системы; гиперактивность мочевого пузыря.

Согласно одному варианту осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы для лечения синдрома функциональной боли, при этом синдром функциональной боли выбран из группы, состоящей из хронической

боли в нижней части спины, синдрома раздраженного кишечника (IBS), фибромиалгии (FM), синдрома хронического утомления (CFS), абдоминальной боли, нарушения височно-нижнечелюстного сустава (TMJD), синдрома раздраженного мочевого пузыря (интерстициального цистита), функциональных желудочно-кишечных нарушений/синдромов, синдрома функциональной боли в груди, мигреней и головных болей напряжения, синдрома хронической тазовой боли, синдрома болезненной предстательной железы (хронического простатита), синдрома множественной химической чувствительности и синдрома войны в Персидском заливе.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением или их антиген-связывающие фрагменты также могут быть использованы для ингибирования роста опухолевых клеток/пролиферации или метастазирования опухолевых клеток. Следовательно, согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением или их антиген-связывающие фрагменты, могут быть использованы для лечения злокачественного заболевания, в том числе без ограничения рака эндометрия, рака предстательной железы, рака молочной железы, рака шейки матки, рака печени, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, рака желудка, рака матки, рака яичника, рака почки, немелкоклеточного рака легкого, рака головного мозга, лейкоза, лимфомы, рака кости, или боли, ассоциированной с метастазированием злокачественного заболевания, например, метастазированием злокачественного заболевания в кость (см. Tang, J-Z, *et al.* Mol Cancer Ther (2010), 9(6): 1697-1708; Kang, J. *et al.* Oncogene, (2009), 28:2034-2045; Ceyhan, G.O. *et al.* Annals of Surgery, (2006), 244(2):274-281; Banerjee, A., *et al.* Breast Cancer Res (2011), 13:R112; Pandey, V. *et al.*, Endocrinology, (2010), 151(3):909-920; Kang, J. *et al.*, Oncogene, (2010), 29:3228-3240; Li, S. *et al.* J Biomed Sci (2011), 18:24).

Антитела в соответствии с настоящим изобретением также применимы для лечения или предотвращения ассоциированной со злокачественным заболеванием боли. Термин «ассоциированная со злокачественным заболеванием боль» включает в себя, например, боль при раке кости, в том числе боль при злокачественном заболевании, при котором проявляется метастазирование в кость (например, при раке молочной железы, раке предстательной железы, раке легкого, саркоме, раке почки, множественной миеломе и т.д.). Термин «ассоциированная со злокачественным заболеванием боль» также включает в себя боль, в более общем смысле ассоциированную со злокачественными состояниями, такими как, например, почечно-клеточная карцинома, карцинома поджелудочной железы, рак молочной железы, рак

головы и шеи, рак предстательной железы, злокачественная глиома, остеосаркома, рак толстой и прямой кишок, рак желудка, злокачественная мезотелиома, множественная миелома, рак яичника, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, синовиальная саркома, рак щитовидной железы или меланома. Антитела в соответствии с настоящим изобретением также применимы для лечения или предотвращения боли, вызванной или ассоциированной с противораковой терапией или видами противоракового медицинского лечения, например, вызванной химиотерапией нейропатической боли, такой как боль, вызванная или ассоциированная с лечением паклитакселом (Taxol™), доцетакселом (Taxotere®); нитрозомочевинной, циклофосфамидом, доксорубицином, эпирубицином, 5-флуороурацилом, топотеканом, иринотеканом, кармустином, эстрамустином и химиотерапевтическими соединениями на основе платины, такими как цисплатин, карбоплатин и ипроплатин.

Комбинированные терапевтические средства

Комбинированные терапевтические средства могут включать в себя антитело против hGFR α 3 в соответствии с настоящим изобретением и, например, другой антагонист GFR α 3 (например, антитело против GFR α 3 или низкомолекулярный ингибитор GFR α 3); ингибитор COX-2; местное анестезирующее средство; модулятор NMDA; агонист каннабиноидного рецептора; модулятор семейства P2X; антагонист VR1; антагонист вещества P; ингибитор потенциал-зависимого натриевого канала (Na_v), например, антагонист Na_v1.7 или антагонист Na_v1.8 (например, антитело против Na_v1.7 или против Na_v1.8 или низкомолекулярный ингибитор таковых), антагонист Na_v1.9 (например, антитело против Na_v1.9 или низкомолекулярный ингибитор Na_v1.9); ингибитор кальциевого канала; ингибитор калиевого канала; цитокиновый ингибитор или антагонист цитокинового рецептора (например, ингибитор интерлейкина-1 (IL-1) (такой как рилонацепт («IL-1 trap», Regeneron) или анакинра (KINERET®, Amgen), низкомолекулярный антагонист IL-1 или антитело против IL-1); ингибитор IL-18 (такой как низкомолекулярный антагонист IL-18 или антитело против IL-18); ингибитор IL-6 или IL-6R (такой как низкомолекулярный антагонист IL-6, антитело против IL-6 или антитело против рецептора IL-6); противоэпилептическое/противосудорожное лекарственное средство (например, габапентин, прегабалин); ингибитор фактора роста нервов (NGF) (например, низкомолекулярный антагонист NGF или антитело против NGF); ингибитор BDNF, TrkA, TrkB или p75; опиоид; морфин; низкодозированный кохицин; аспирин или другой NSAID; стероиды (например, преднизон, метотрексат и

т.д.); низкодозированный циклоспорин А; селективный ингибитор обратного захвата серотонина (SSRI); ингибитор обратного захвата серотонина-норэпинефрина (SNRI); трициклическое соединение; ингибитор фактора некроза опухоли (TNF) или рецептора TNF (например, низкомолекулярный антагонист TNF или TNFR, или антитело против TNF или TNFR); ингибитор TWEAK (TNF-родственный слабый индуктор апоптоза); ингибитор RET; ингибитор семейства лигандов GDNF; ингибитор GFR α 1, GFR α 2 или GFR α 4; ингибитор чувствительного к кислоте ионного канала (например, ASIC1 или ASIC3; ингибиторы синтеза мочевой кислоты (например, аллопуринол); промоторы выведения мочевой кислоты (например, пробенецид, сульфинпиразон, бензбромарон и т.д.); ингибитор прекинетицинового рецептора (PROK1 и PROK2); другие ингибиторы воспаления (например, ингибиторы каспазы-1, p38, IKK1/2, CTLA-4Ig и т.д.) и/или кортикостероиды.

Режимы введения

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения многократные дозы антитела против GFR α 3 могут быть введены субъекту за определенный период времени. Способы согласно данному аспекту настоящего изобретения предусматривают последовательное введение субъекту многократных доз антитела против GFR α 3. Используемый в настоящем документе термин «последовательное введение» означает, что каждую дозу антитела против GFR α 3 вводят субъекту в определенную точку времени, например, в определенные сутки, отделенные предварительно определенным интервалом (например, часы, сутки, недели или месяцы). Настоящее изобретение относится к способам, которые предусматривают последовательное введение пациенту однократной начальной дозы антитела против GFR α 3, затем одной или нескольких вторичных доз антитела против GFR α 3, а затем необязательно одной или нескольких третичных доз антитела против GFR α 3.

Используемые в настоящем документе термины «начальная доза», «вторичные дозы» и «третичные дозы» относятся к временной последовательности введения антитела против GFR α 3. Таким образом, «начальной дозой» является доза, которую вводят в начале режим лечения (также называемая «исходной дозой»); «вторичными дозами» являются дозы, которые вводят после начальной дозы; а «третичными дозами» являются дозы, которые вводят после вторичных доз. Все дозы, начальная, вторичные и третичные, могут содержать одинаковое количество антитела против GFR α 3, но, как правило, отличаются друг от друга в отношении частоты введения. Согласно

некоторым вариантам осуществления, однако, количество антитела против GFR α 3, содержащееся в начальной, вторичных и/или третичных дозах, в курсе лечения варьирует от одной к другой (например, увеличивается или уменьшается при необходимости). Согласно некоторым вариантам осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводят в начале режима лечения как «нагружающие дозы», а затем последующие дозы, которые вводят менее часто (например, «поддерживающие дозы»).

Согласно одному типичному варианту осуществления настоящего изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят 1-26 (например, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Используемая в настоящем документе фраза «непосредственно предшествующая доза» означает последовательность многократных введений дозы антитела против GFR α 3, которую вводят пациенту перед введением непосредственно следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

Способы согласно данному аспекту настоящего изобретения могут предусматривать введение пациенту любого числа вторичных и/или третичных доз антитела против GFR α 3. Например, согласно некоторым вариантам осуществления пациенту вводят только однократную вторичную дозу. Согласно другим вариантам осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Подобным образом, согласно некоторым вариантам осуществления пациенту вводят только однократную третичную дозу. Согласно другим вариантам осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

Согласно вариантам осуществления, предусматривающим многократные вторичные дозы, каждая вторичная доза может быть введена с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждая вторичная доза может быть введена пациенту через 1-2 недели после непосредственно предшествующей дозы. Подобным образом, согласно вариантам осуществления, предусматривающим многократные третичные дозы, каждая третичная доза может быть введена с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждая третичная доза может быть введена пациенту через 2-4 недели после непосредственно предшествующей дозы. В качестве альтернативы, частота введения вторичных и/или третичных доз пациенту может

варьировать в ходе режима лечения. Частота введения также может регулироваться врачом в курсе лечения в зависимости от потребностей отдельного пациента.

Диагностические применения антител

Антитела против GFR α 3 в соответствии с настоящим изобретением также могут быть использованы для выявления и/или измерения GFR α 3 в образце, например, для диагностических целей. Например, антитело против GFR α 3 или его фрагмент могут быть использованы для диагностики состояния или заболевания, характеризующегося aberrантной экспрессией (например, надэкспрессией, недостаточной экспрессией, отсутствием экспрессии и т.д.) GFR α 3. Типичные диагностические анализы GFR α 3 могут предусматривать, например, контакт образца, полученного от пациента, с антителом против GFR α 3 в соответствии с настоящим изобретением, при этом антитело против GFR α 3 метят выявляемой меткой или репортерной молекулой. В качестве альтернативы, немеченое антитело против GFR α 3 может быть использовано при диагностических применениях в комбинации со вторичным антителом, которое метят выявляемой меткой. Выявляемая метка или репортерная молекула может представлять собой радиоизотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентную или хемилюминесцентную часть, такую как флуоресцеина изотиоцианат или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные типичные анализы, которые могут быть использованы для выявления или измерения GFR α 3 в образце, включают в себя иммуносорбентный анализ с применением фиксированных ферментов (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) и клеточную сортировку с активацией флуоресценции (FACS).

Образцы, которые могут быть использованы в диагностических анализах GFR α 3 в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя образец какой-либо ткани или жидкости, получаемый от пациента, который содержит выявляемые количества белка GFR α 3 или его фрагментов, при нормальных или патологических состояниях. Как правило, содержание GFR α 3 в конкретном образце, получаемом от здорового пациента (например, пациента, не страдающего заболеванием или состоянием, ассоциированным с патологическим содержанием GFR α 3 или активностью такового), будут измерять как начально установленное исходное или стандартное содержание GFR α 3. Это исходное содержание GFR α 3 затем можно будет сравнивать с содержаниями GFR α 3, измеренными в образцах, получаемых от индивидуумов, предположительно страдающих связанным с GFR α 3 заболеванием или состоянием, или

болью, ассоциированной с таким заболеванием или состоянием.

Примеры

Следующие примеры изложены для разъяснения рядовому специалисту в данной области, как с помощью полного раскрытия и описания осуществить и применить способы и композиции в соответствии с настоящим изобретением, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы считают своим настоящим изобретением. Были предприняты попытки обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количеств, температуры и т.д.), но должны учитываться некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части являются весовыми частями, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура представлена в градусах Цельсия, а давление равняется атмосферному или близко к таковому.

Пример 1. Создание человеческих антител против человеческого GFR α 3

Для создания антител против человеческого GFR α 3 может быть использован иммуноген, содержащий любой из пептидов GFR α 3 с аминокислотными последовательностями, показанными как SEQ ID NO: 370, 371, 372 и 373, или их фрагментов. Эти пептиды конъюгировали с носителем, например, KLH, затем вводили с адъювантом для стимуляции иммунной реакции мыши VELOCIMMUNE[®], содержащей ДНК, кодирующую человеческое переменную область тяжелой и легкой карра-цепи иммуноглобулина. Иммунную реакцию с антителом контролировали с помощью GFR α 3-специфического иммуноанализа. Если достигали желаемой иммунной реакции, спленоциты собирали и сливали с клетками миеломы мыши для сохранения их жизнеспособности и получения линий гибридомных клеток. Линии гибридомных клеток скринировали и отбирали для идентификации клеточных линий, которые продуцировали GFR α 3-специфические антитела. С использованием этой методики получали некоторые химерные антитела против GFR α 3 (*m.e.* антитела, обладающие человеческими переменными доменами и мышиными константными доменами). С помощью этого способа были разработаны следующие антитела против GFR α 3: H1M2207N, H1M2212N, H1M2236N, H1M2236N3, H1M2243N, H1M2243N2, H1M2210N и H1M2234N.

Также выделяли антитела против GFR α 3 непосредственно из антиген-положительных В-клеток без слияния с миеломными клетками, как описано в заявке на

выдачу патента США № 2007/0280945A1. С использованием этого способа получали несколько полностью человеческих антител против GFR α 3 (*т.е.* антител, обладающих человеческими вариабельными доменами и человеческими константными доменами); разработаны следующие типичные антитела, созданные этим способом: H4H2207N, H4H2212N, H4H2236N, H4H2243N, H4H2210N, H4H2234N, H4H2291S, H4H2292S, H4H2293P, H4H2294S, H4H2295S, H4H2296S, H4H2341S, H4H2342P, H4H2344S, H4H2345S, H4H2346S, H4H2350P, H4H2352S, H4H2354S, H4H2355S, H4H2357S и H4H2364S.

Биологические свойства типичных антител против GFR α 3, созданных согласно способам этого примера, подробно описаны в примерах, изложенных ниже.

Пример 2. Аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей

В таблице 1 изложены пары аминокислотных последовательностей вариабельной области тяжелой и легкой цепей отобранных антител против GFR α 3 и соответствующие им идентификаторы антител. Антитела в настоящем документе называют, как правило, согласно следующей номенклатуре: приставка Fc (например, «H4H», «H1M», «H2M»), затем числовой идентификатор (например «2207», как показано в таблице 1), затем суффикс «P», «S» или «N». Таким образом, согласно этой номенклатуре, антитело может быть названо, например, «H4H2207N». Приставки H4H, H1M и H2M в названии антитела, используемом в настоящем документе, указывает на конкретную Fc-область антитела. Например, антитело «H2M» содержит мышиный Fc IgG2, тогда как антитело «H4H» содержит человеческий Fc IgG4. Рядовому специалисту в данной области будет понятно, что антитело H1M или H2M может быть превращено в антитело H4H и наоборот, но в любом случае вариабельные домены (в том числе CDR), которые указываются числовыми идентификаторами, показанными в таблице 1, будут сохраняться теми же. Антитела, имеющие одинаковое числовое обозначение антитела, но отличающиеся буквенным суффиксом N, B, S или P, относятся к антителам, содержащим тяжелую и легкую цепи с идентичными последовательностями CDR, но с вариациями последовательностей в областях, которые выходят за пределы последовательностей CDR (*т.е.* в каркасных областях). Таким образом, варианты N, B, S и P конкретного антитела содержат идентичные последовательности CDR в своих вариабельных областях тяжелой и легкой цепей, но отличаются друг от друга своими каркасными областями.

Таблица 1

Обозначение антитела	Аминокислотные SEQ ID NO:							
	HCV R	HCDR 1	HCD R2	HCDR 3	LCV R	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H2207N	2	4	6	8	10	12	14	16
H4H2212N	18	20	22	24	26	28	30	32
H4H2236N3	34	36	38	40	42	44	46	48
H4H2243N2	50	52	54	56	58	60	62	64
H4H2210N	66	68	70	72	74	76	78	80
H4H2234N	82	84	86	88	90	92	94	96
H4H2291S	98	100	102	104	106	108	110	112
H4H2292S	114	116	118	120	122	124	126	128
H4H2293P	130	132	134	136	138	140	142	144
H4H2294S	146	148	150	152	154	156	158	160
H4H2295S	162	164	166	168	170	172	174	176
H4H2296S	178	180	182	184	186	188	190	192
H4H2341S	194	196	198	200	202	204	206	208
H4H2342P	210	212	214	216	218	220	222	224
H4H2344S	226	228	230	232	234	236	238	240
H4H2345S	242	244	246	248	250	252	254	256
H4H2346S	258	260	262	264	266	268	270	272
H4H2350P	274	276	278	280	282	284	286	288
H4H2352S	290	292	294	296	298	300	302	304
H4H2354S	306	308	310	312	314	316	318	320
H4H2355S	322	324	326	328	330	332	334	336
H4H2357S	338	340	342	344	346	348	350	352
H4H2364S	354	356	358	360	362	364	366	368
H1M2243N	381	383	385	387	389	391	393	395
H1M2236N	397	399	401	403	405	407	409	411

Пример 2. Анализ использования переменных генов

Для анализа структуры полученных антител нуклеиновые кислоты клонировали и секвенировали кодирующие переменные области антител. Из последовательности нуклеиновой кислоты и предполагаемой аминокислотной последовательности антител идентифицировали частоту использования гена для каждой переменной области тяжелой цепи (HCVR) и переменной области легкой цепи (LCVR). В таблице 2 изложена частота использования гена для отобранных антител в соответствии с настоящим изобретением.

Таблица 2

ID AbP	HCVR			LCVR	
	V _H	D _H	J _H	V _K	J _K
H1M2207N	3-9	6-6	4	1-5	2
H1M2212N	3-23	1-26	4	4-1	1

H1M2236N	3-23	3-3	6	1-16	4
H4H2236N3	3-23	3-3	6	1-16	4
H1M2243N	1-18	6-6	6	1-16	3
H4H2243N2	1-18	6-6	6	1-16	3
H2M2210N	3-23	1-20	3	3-20	4
H2M2234N	3-23	5-18	4	4-1	1
H4H2291S	3-23	6-6	6	1D-12	4
H4H2292S	3-33	1-7	3	1-39	3
H4H2293P	3-33	2-15	3	1-39	2
H4H2294S	3-23	6-6	6	1D-12	3
H4H2295S	3-23	6-6	6	1D-12	3
H4H2296S	3-23	6-6	6	1D-12	3
H4H2341S	1-69	3-10	5	1-39	5
H4H2342P	3-23	1-26	4	1-27	3
H4H2344S	3-33	2-15	3	1-39	2
H4H2345S	3-9	1-26	4	1-27	4
H4H2346S	3-33	2-15	3	1-39	2
H4H2350P	4-59	2-21	4	1-9	1
H4H2352S	1-18	3-3	3	3-20	2
H4H2354S	3-33	2-15	3	1-39	2
H4H2355S	3-23	6-6	4	1-5	4
H4H2357S	3-23	3-10	6	1-12	4
H4H2364S	3-23	6-6	6	1D-12	3

Пример 3. Аффинность связывания антител GFR α 3

Определяли константы скорости ассоциации и диссоциации связывания (k_a и k_d , соответственно), а также рассчитанные равновесные константы диссоциации и периоды полувыведения при диссоциации (K_D и $t_{1/2}$, соответственно) для связывания антигена с антителами против GFR α 3 анализом поверхностным плазмонным резонансом с использованием биосенсора в режиме реального времени (Biacore T200) при 25°C и 37°C. Антитела тестировали на связывание с человеческим GFR α 3, экспрессируемым либо с С-концевой мус-мус-гексагистидиновой меткой (hGFR α 3-mmh; SEQ ID: 370), С-концевой меткой hFc (hGFR α 3-hFc; SEQ ID: 371), либо с С-концевой меткой mFc (hGFR α 3-mFc; SEQ ID: 372), а также с GFR α 3 обезьяны, экспрессируемым с С-концевой мус-мус-гексагистидиновой меткой (MfGFR α 3-mmh; SEQ ID: 373). Антитела против GFR α 3 захватывали на поверхности либо с поликлональным антителом козы против IgG мыши (GE Healthcare, # BR-1008-38), либо с моноклональным антителом мыши против человеческого IgG (GE Healthcare, #BR-1008-39), созданной путем непосредственного аминного присоединения к сенсорному чипу Biacore CM5.

Кинетические эксперименты выполняли с использованием HBS-EP (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% поверхностно-активного средства P20, при pH 7,4) или PBS буфера, содержащего 0,05% объем/объем поверхностно-активного средства P20, в качестве и подвижного буфера и буфера для образца. Связывание с человеческим GFR α 3-mmh или с GFR α 3-mmh обезьяны оценивали путем введения нескольких концентраций, варьирующих от 200 до 7,4 нМ (3-кратных разведений), на всю поверхность с захваченным антителом. Связывание с человеческим GFR α 3-mFc или человеческим GFR α 3-hFc оценивали путем введения нескольких концентраций, варьирующих от 100 до 3,7 нМ (3-кратных разведений), на всю поверхность с захваченным антителом. Ассоциацию антитело-антиген контролировали до 4 минут, тогда как диссоциацию в буфер контролировали до 20 минут. Кинетические константы скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) определяли путем обработки и подгонки данных к модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения Scrubber 2.0c для подбора кривой. Равновесные константы диссоциации связывания (K_D) и периодов полувыведения при диссоциации ($t_{1/2}$) вычисляли по кинетическим константам скорости: K_D (M) = k_d / k_a , и $t_{1/2}$ (минуты) = $[\ln 2 / (60 * k_d)]$.

Как показано в таблице 3, при 25°C все 25 антител против GFR α 3 связывались с hGFR α 3-mmh со значениями K_D , варьирующими от 82,0 пМ до 29,7 нМ. При 37°C все 25 антител против GFR α 3 связывались с hGFR α 3-mmh со значениями K_D , варьирующими от 118 пМ до 47,3 нМ. Как показано в таблице 4, при 25°C все 23 антитела против GFR α 3 связывались с MfGFR α 3-mmh со значениями K_D , варьирующими от 2,90 пМ до 97,2 нМ. При 37°C все 23 антитела против GFR α 3 связывались с MfGFR α 3-mmh со значениями K_D , варьирующими от 11,7 пМ до 145 нМ. Как показано в таблице 5, при 25°C и 37°C 6 из 23 антител против GFR α 3 тестировали на связывание с hGFR α 3-hFc, тогда как другие 17 антител тестировали на связывание с hGFR α 3-mFc. При 25°C 6 антител против GFR α 3, тестируемых на связывание с hGFR α 3-hFc, связывались со значениями K_D , варьирующими от 7,50 пМ до 220 пМ. При 37°C 6 антител против GFR α 3, тестируемых на связывание с hGFR α 3-hFc, связывались со значениями K_D , варьирующими от 41,3 пМ до 531 пМ. При 25°C 17 антител против GFR α 3, тестируемых на связывание с hGFR α 3-mFc, связывались со значениями K_D , варьирующими от 0,467 пМ до 58,4 пМ. При 37°C 17 антител против GFR α 3, тестируемых на связывание с hGFR α 3-mFc, связывались со значениями K_D , варьирующими от 13,2 пМ до 106 пМ.

Таблица 3: Кинетические показатели связывания hGFR α 3-mmH C различными антителами против GFR α 3 при 25°C и при 37°C

	25°C				37°C			
ID AbP	k _a (1/Мс)	k _d (1/с)	K _D (М)	t _{1/2} (минуты)	k _a (1/Мс)	k _d (1/с)	K _D (М)	t _{1/2} (минуты)
H4H2291S	4,18E+05	1,64E-04	3,93E-10	70	5,58E+05	3,23E-04	5,80E-10	36
H4H2292S	1,08E+05	5,19E-05	4,83E-10	223	1,28E+05	2,49E-04	1,94E-09	46
H4H2293P	5,81E+05	1,27E-04	2,19E-10	91	7,81E+05	2,44E-04	3,13E-10	47
H4H2294S	5,63E+05	7,99E-05	1,42E-10	145	7,73E+05	2,61E-04	3,38E-10	44
H4H2295S	4,75E+05	2,56E-04	5,40E-10	45	6,69E+05	1,19E-03	1,77E-09	10
H4H2296S	5,63E+05	1,87E-04	3,32E-10	62	7,65E+05	6,14E-04	8,02E-10	19
H4H2341S	1,59E+05	2,67E-04	1,68E-09	43	2,48E+05	7,37E-04	2,98E-09	16
H4H2342P	1,86E+05	2,04E-04	1,10E-09	57	3,30E+05	6,71E-04	2,03E-09	17
H4H2344S	1,83E+05	2,40E-04	1,31E-09	48	2,80E+05	7,24E-04	2,58E-09	16
H4H2345S	1,09E+05	3,23E-03	2,97E-08	4	1,84E+05	8,70E-03	4,73E-08	1
H4H2346S	1,86E+05	7,99E-05	4,30E-10	145	4,19E+05	5,89E-04	1,41E-09	20
H4H2350P	1,03E+05	2,07E-04	2,01E-09	56	1,34E+05	1,28E-03	9,61E-09	9
H4H2352S	7,09E+05	5,81E-05	8,20E-11	199	1,18E+06	1,39E-04	1,18E-10	83
H4H2354S	2,00E+05	1,10E-04	5,48E-10	105	2,81E+05	6,49E-04	2,31E-09	18
H4H2355S	1,86E+05	1,52E-04	8,21E-10	76	2,81E+05	1,23E-03	4,37E-09	9
H4H2357S	2,30E+05	5,57E-04	2,42E-09	21	2,95E+05	2,10E-03	7,12E-09	6
H4H2364S	3,53E+05	3,67E-05	1,04E-10	315	3,38E+05	2,73E-04	8,09E-10	42
H1M2207N	5,61E+04	9,00E-04	1,60E-08	13	1,33E+05	1,44E-03	1,08E-08	8
H2aM2210N	6,73E+04	8,63E-04	1,28E-08	13	2,12E+05	3,35E-03	1,58E-08	3
H1M2212N	8,00E+05	1,58E-04	1,97E-10	73	1,02E+06	3,03E-04	2,97E-10	38
H2aM2234N	6,57E+05	7,11E-04	1,08E-09	16	7,93E+05	2,72E-03	3,43E-09	4
H1M2236N	7,60E+05	2,08E-04	2,75E-10	56	1,03E+06	5,50E-04	5,32E-10	21
H4H2236N3	9,22E+05	2,33E-04	2,53E-10	50	1,96E+06	7,48E-04	3,82E-10	15
H4H2243N2	2,67E+05	7,80E-04	2,92E-09	15	4,69E+05	2,44E-03	5,20E-09	5
H1M2243N	1,28E+05	2,61E-04	2,04E-09	44	1,37E+05	5,95E-04	4,35E-09	19

Таблица 4: Кинетические показатели связывания MfGFR α 3-mmH с различными антителами против GFR α 3 при 25°C и при 37°C

	25°C				37°C			
ID AbP	k _a (1/Мс)	k _d (1/с)	K _D (М)	t _{1/2} (минуты)	k _a (1/Мс)	k _d (1/с)	K _D (М)	t _{1/2} (минуты)
H4H2291S	1,51E+05	2,79E-04	1,85E-09	41	3,57E+05	6,93E-04	1,94E-09	17
H4H2292S	7,76E+04	1,22E-04	1,57E-09	95	8,95E+04	1,95E-04	2,18E-09	59
H4H2293P	2,90E+05	4,17E-05	1,44E-10	277	4,41E+05	1,58E-04	3,58E-10	73
H4H2294S	3,25E+05	2,04E-04	6,27E-10	57	4,33E+05	9,74E-04	2,25E-09	12
H4H2295S	1,83E+05	9,73E-04	5,32E-09	12	2,76E+05	5,61E-03	2,04E-08	2
H4H2296S	1,93E+05	6,51E-04	3,37E-09	18	2,77E+05	2,85E-03	1,03E-08	4
H4H2341S	9,38E+04	1,30E-04	1,39E-09	89	1,44E+05	5,08E-04	3,53E-09	23
H4H2342P	9,37E+04	5,50E-04	5,87E-09	21	1,50E+05	1,66E-03	1,11E-08	7
H4H2344S	1,04E+05	1,15E-04	1,10E-09	101	1,61E+05	5,75E-04	3,57E-09	20
H4H2345S	9,75E+04	2,79E-03	2,87E-08	4	1,34E+05	3,53E-03	2,63E-08	3
H4H2346S	1,08E+05	5,98E-05	5,56E-10	193	1,53E+05	5,11E-04	3,34E-09	23
H4H2350P	6,47E+04	1,11E-04	1,71E-09	104	7,48E+04	8,96E-04	1,20E-08	13
H4H2352S	3,45E+05	1,00E-06	2,90E-12	11550	5,57E+05	6,53E-05	1,17E-10	177
H4H2354S	1,09E+05	6,23E-05	5,74E-10	185	1,57E+05	4,35E-04	2,78E-09	27
H4H2355S	1,05E+05	6,78E-05	6,49E-10	170	1,73E+05	9,13E-04	5,29E-09	13
H4H2357S	1,40E+05	3,15E-04	2,26E-09	37	1,72E+05	1,35E-03	7,86E-09	9
H4H2364S	1,22E+05	1,30E-04	1,06E-09	89	1,68E+05	8,61E-04	5,14E-09	13
H1M2207N	3,99E+04	3,88E-03	9,72E-08	3	4,58E+04	6,63E-03	1,45E-07	2
H2aM2210N	4,16E+04	1,20E-03	2,89E-08	10	8,09E+04	6,18E-03	7,64E-08	2
H1M2212N	3,84E+05	1,12E-04	2,93E-10	103	8,84E+05	2,60E-04	2,94E-10	44
H2aM2234N	4,27E+05	5,71E-04	1,34E-09	20	4,29E+05	2,11E-03	4,91E-09	5
H1M2236N	2,96E+05	2,86E-04	9,70E-10	40	4,34E+05	1,12E-03	2,58E-09	10
H1M2243N	6,46E+04	6,58E-04	1,02E-08	18	5,02E+04	2,75E-03	5,47E-08	4

Таблица 5: Кинетические показатели связывания hGFR α 3-hFc или hGFR α 3-mFc с различными антителами против GFR α 3 при 25°C и при 37°C

	25°C				37°C			
ID AbP	k _a (1/Мс)	k _d (1/с)	K _D (М)	t _{1/2} (минуты)	k _a (1/Мс)	k _d (1/с)	K _D (М)	t _{1/2} (минуты)
H4H2291S	1,03E+06	4,78E-06	4,63E-12	2417	1,33E+06	3,84E-05	2,89E-11	301
H4H2292S	5,34E+05	1,00E-06	1,87E-12	11550	5,96E+05	2,57E-05	4,32E-11	449
H4H2293P	1,22E+06	1,93E-06	1,59E-12	5988	1,71E+06	5,13E-05	2,99E-11	225
H4H2294S	1,22E+06	5,63E-06	4,63E-12	2052	1,66E+06	3,46E-05	2,09E-11	334
H4H2295S	1,08E+	1,69E-	1,57E-12	6822	1,62E+06	4,88E-05	3,01	237

	06	06					E-11	
H4H2296S	1,24E+06	4,17E-06	3,37E-12	2770	1,61E+06	4,74E-05	2,94E-11	244
H4H2341S	5,96E+05	1,00E-06	1,68E-12	11550	9,61E+05	7,58E-05	7,89E-11	152
H4H2342P	6,61E+05	1,00E-06	1,51E-12	11550	1,21E+06	4,28E-05	3,54E-11	270
H4H2344S	5,79E+05	1,56E-06	2,69E-12	7409	1,01E+06	8,96E-05	8,91E-11	129
H4H2345S	5,16E+05	3,01E-05	5,84E-11	384	7,00E+05	7,44E-05	1,06E-10	155
H4H2346S	6,47E+05	1,44E-05	2,22E-11	803	1,75E+06	1,37E-04	7,81E-11	84
H4H2350P	5,09E+05	2,12E-05	4,16E-11	545	2,56E+06	1,26E-04	4,92E-11	92
H4H2352S	2,14E+06	1,00E-06	4,67E-13	11550	2,28E+06	3,00E-05	1,32E-11	385
H4H2354S	5,80E+05	1,09E-05	1,89E-11	1056	1,02E+06	9,11E-05	8,95E-11	127
H4H2355S	6,11E+05	1,00E-06	1,64E-12	11550	1,10E+06	3,39E-05	3,10E-11	341
H4H2357S	7,79E+05	2,52E-05	3,24E-11	458	1,19E+06	9,40E-05	7,93E-11	123
H4H2364S	7,71E+05	1,00E-06	1,30E-12	11550	1,26E+06	4,14E-05	3,28E-11	279
H1M2207N*	1,59E+05	2,60E-05	1,63E-10	444	2,03E+05	1,08E-04	5,31E-10	107
H2aM2210N*	1,68E+05	3,69E-05	2,20E-10	313	3,16E+05	7,66E-05	2,42E-10	151
H1M2212N*	1,12E+06	1,44E-05	1,28E-11	800	1,49E+06	6,17E-05	4,13E-11	187
H2aM2234N*	9,50E+05	9,60E-05	1,01E-10	120	1,26E+06	1,46E-04	1,16E-10	79
H1M2236N*	1,28E+06	1,76E-05	1,37E-11	658	1,58E+06	9,65E-05	6,10E-11	120
H1M2243N*	1,34E+05	1,00E-06	7,50E-12	11550	1,86E+05	2,18E-05	1,17E-10	529

*Тестировали на связывание с hGFR α 3-hFc, все другие антитела тестировали на связывание с hGFR α 3-mFc.

Пример 4. Блокирование связывания человеческого GFR α 3 с человеческим артемином с помощью антител против GFR α 3

Способность антител против GFR α 3 блокировать связывание человеческого GFR α 3 с человеческим артемином в присутствии или отсутствии корцепторной человеческой RET определяли с использованием двух разных форматов блокирующего

ELISA.

При первом формате рекомбинантным человеческим белком артемином с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой (hARTEMIN-mmH; SEQ ID: 369) покрывали 96-луночные микротитрационные планшеты при 2 мкг/мл в PBS буфере в течение ночи при 4°C, а затем блокировали раствором 0,5% (вес/объем) BSA. Константное количество человеческого GFR α 3, слитого с С-концевой меткой человеческого Fc (hGFR α 3-hFc; SEQ ID: 371) при 120 пМ, предварительно смешивали с количествами антител, варьирующими от 0 до ~10 нМ в серийных разведениях, а затем инкубировали 1 час при комнатной температуре (RT) для обеспечения достижения равновесия связывания антитело-hGFR α 3-hFc. Затем уравновешенные растворы образцов переносили в покрытый hARTEMIN-mmH планшет. Через 1 час после связывания планшет промывали, затем связанные hGFR α 3-hFc выявляли с использованием конъюгированного с HRP специфического антитела против человеческого Fc IgG (Jackson Immunochemical, #109-035-098), а сигналы при колориметрии получали с использованием субстрата TMB HRP (BD Biosciences, #51-2606KC и #51-2607KC). Поглощение регистрировали при 450 нм на устройстве для чтения планшетов Victor X5 (Perkin Elmer) для определения количества свободных hGFR α 3-hFc в предварительно уравновешенных растворах hGFR α 3-hFc-антитело, которые были способны к связыванию с планшетом, покрытым hARTEMIN-mmH. Значения IC₅₀, определяемые как концентрация антитела, необходимая для уменьшения сигнала от константной концентрации hGFR α 3-hFc на 50%, вычисляли по данным с использованием программного обеспечения Prism от GraphPad. Поглощение, измеренное при константном количестве 120 пМ hGFR α 3-hFc в отсутствии антитела против GFR α 3, определяли как 0% блокирование, а поглощения без добавления hGFR α 3-hFc определяли как 100% блокирование. Наблюдаемое поглощение в лунках, содержащих самую высокую концентрацию антитела, использовали для вычисления максимального процента блокирования, показанного в таблице. Результаты приведены в таблице 6.

При втором формате ELISA планшеты, образцы и данные обрабатывали подобно первому формату, за исключением того, что покрывали и hARTEMIN-mmH, и человеческой RET с С-концевой меткой 10 гистидинов (hRET-10His; R&D Systems, #1168-CR/CF) для блокирования при эксперименте ELISA. 96-луночные микротитрационные планшеты покрывали смесью белков 1,2 мкг/мл hARTEMIN-mmH и 6,9 мкг/мл hRET-10His в PBS в течение ночи при 4°C, а затем блокировали раствором

0,5% (вес/объем) BSA. Константное количество биотинилированного человеческого GFR α 3 с С-концевой тус-тус-гексагистиридиновой меткой (биотин-hGFR α 3-mmH; SEQ ID: 370) при 1 нМ предварительно смешивали с переменными количествами антител против GFR α 3, варьирующими от 0 до ~100 нМ в серийных разведениях, а затем инкубировали 1 час при RT для обеспечения достижения равновесия связывания антитело-биотин-hGFR α 3-mmH. Затем уравновешенные образцы переносили в покрытый планшет. После связывания в течение 1 часа планшет промывали, затем связанный биотин-hGFR α 3-mmH выявляли с использованием конъюгированного с HRP стрептавидина (Pierce, #N200) и сигналы при колориметрии получали с использованием субстратов TMB HRP. Значения IC₅₀ и максимальное блокирование каждым антителом показаны в таблице 6.

Как показано в таблице 6, 9 из 23 антител против GFR α 3 блокировали 51-94% связывание hGFR α 3-hFc с покрытым hARTEMIN-mmH со значениями IC₅₀, варьирующими от 43,8 пМ до 723 пМ при первом формате ELISA. Восемь из 23 антител против GFR α 3 вызывали усиление сигнала связывания hGFR α 3-hFc («энхансер» в таблице 6) при многих более высоких концентрациях тестируемых антител при первом формате ELISA. Шесть из 23 антител, тестируемых при первом формате ELISA, не блокировали или не усиливали сигнал связывания hGFR α 3-hFc с покрытым hARTEMIN-mmH. Как показано в таблице 6, при втором формате ELISA 17 из 23 антител против GFR α 3 блокировали 75-100% связывания биотин-hGFR α 3-mmH с дважды покрытым hARTEMIN-mmH и hRET-10His со значениями IC₅₀, варьирующими от 403 пМ до 14,6 нМ. Также при втором формате ELISA пять из 23 антител против GFR α 3 вызывали усиление сигнала связывания биотин-hGFR α 3-mmH при более низких концентрациях антител, но блокировали на 28-95% связывание биотин-hGFR α 3-mmH с hARTEMIN-mmH и hRET-10His при концентрациях антител 1 нМ и выше («энхансер» в таблице 6). При втором формате ELISA одно антитело против GFR α 3 вызывало усиление сигнала связывания биотин-hGFR α 3-mmH («энхансер» в таблице 6) при более высоких концентрациях тестируемых антител при отсутствии блокирования при любой концентрации.

Таблица 6: ELISA с блокированием связывания человеческого GFR α 3 с человеческим артемином отдельно или с человеческим артемином и человеческой RET

Формат 1 ELISA: Блокирование Ab при 120 пМ связывания hGFR α 3-hFc с покрытым hARTEMIN-mmH планшетом			Формат 2 ELISA: Блокирование Ab при 1 нМ связывания биотин-hGFR α 3-mmH с покрытым hARTEMIN-mmH и hRET-10His планшетом	
ID AbP	IC ₅₀ (M)	% максимального блокирования	IC ₅₀ (M)	% максимального блокирования
H4H2207N	энхансер	О.Б.	7,30E-09	85
H4H2210N	энхансер	О.Б.	энхансер	О.Б.
H4H2212N	4,38E-11	81	4,03E-10	99
H4H2234N	8,29E-11	70	3,42E-09	97
H4H2236N3	энхансер	О.Б.	энхансер	68
H4H2243N2	энхансер	О.Б.	1,12E-09	95
H4H2291S	О.Б.	О.Б.	энхансер	28
H4H2292S	7,23E-10	89	1,76E-09	100
H4H2293P	2,60E-10	93	7,38E-09	95
H4H2294S	О.Б.	О.Б.	9,52E-10	95
H4H2295S	энхансер	О.Б.	энхансер	44
H4H2296S	О.Б.	О.Б.	энхансер	91
H4H2341S	энхансер	О.Б.	1,62E-09	98
H4H2342P	энхансер	О.Б.	1,08E-09	97
H4H2344S	1,33E-10	94	4,59E-10	100
H4H2345S	энхансер	О.Б.	1,46E-08	75
H4H2346S	9,78E-11	92	7,971E-10	99
H4H2350P	4,96E-10	93	1,29E-09	91
H4H2352S	6,58E-11	51	7,61E-10	100
H4H2354S	1,16E-10	92	1,32E-09	97
H4H2355S	О.Б.	О.Б.	энхансер	95
H4H2357S	О.Б.	О.Б.	3,28E-09	86
H4H2364S	О.Б.	О.Б.	1,45E-09	100

О.Б. = отсутствие блокирования

Пример 5. Измерение способности антител против GFR α 3 блокировать активацию GFR α 3 и RET с помощью лигандного артемина *in vitro*

Способность антител против GFR α 3 блокировать активацию GFR α 3 и RET с помощью их лигандного артемина *in vitro* определяли с использованием клеточного анализа. Создавали клетки HEK293, модифицированные со стабильной экспрессией и человеческого GFR α 3 (аминокислоты 1-400 под номером доступа NP_001487.2), и человеческой RET (аминокислоты 1-1072 под номером доступа NP_065681), а затем

трансдуцировали с реагирующим на люциферазу репортером SRE (SRE-luc; Sabiosciences, CCS-010L) (клетки HEK293/hGFR α 3/hRET).

Двадцать тысяч клеток HEK293/hGFR α 3/hRET/SRE-luc высевали в покрытые Poly D-лизином 96-луночные планшеты (Greiner, #35-4620) со средой Optimem (GIBCO, #31985), содержащей 0,5% FBS, а затем выращивали в течение ночи в 5% CO₂ при 37°C. Затем клетки инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при серийных разведениях антител против GFR α 3, варьирующих от 5 пМ до 300 нМ. Затем к клеткам добавляли константную дозу (100 пМ) человеческого артемина, экспрессируемого с С-концевой мус-мус-гексагистидиновой меткой (SEQ ID: 369), и инкубировали еще 6 часов. Люциферазную активность измеряли как относительные световые единицы (RLU) на люцинометре Victor (Perkin Elmer) после добавления реагента OneGlo (Promega, #E6051). Значения EC₅₀ и IC₅₀ вычисляли с помощью четырех-параметрового логистического уравнения по 12-точечной кривой ответа с использованием программного обеспечения для анализа данных Prism от GraphPad.

Двадцать три антитела против GFR α 3 тестировали на их способность ингибировать артемин-зависимую активацию клеток HEK293/hGFR α 3/hRET/SRE-luc. Как показано в таблице 7, все 23 тестируемых антитела блокировали люциферазную активность со значениями IC₅₀, варьирующими от 0,2 нМ до 48,3 нМ, а 19 из 23 антител блокировали до исходного значения при концентрации 300 нМ. Четыре из 23 антител (H4H2344S, H4H2345S, H4H2346S и H4H2354S-1) не блокировали до исходного значения ни при какой из тестируемых концентраций антитела.

Таблица 7: Ингибирование артемин-зависимой стимуляции клеток HEK293/hGFR α 3/hRET/ SRE-luc антителами против GFR α 3

ID AbP	IC ₅₀ (нМ)
H4H2294S	0,27
H4H2342P	1,0
H4H2212N	0,80
H4H2292S	4,6
H4H2243N2	0,30
H4H2352S	0,92
H4H2207N	2,4
H4H2210N	2,9
H4H2234N	2,3

H4H2236N3	1,5
H4H2291S	1,3
H4H2293P	20
H4H2294S	1,7
H4H2295S	1,5
H4H2296S	1,4
H4H2341S	7,1
H4H2344S	48
H4H2345S	26
H4H2346S	26
H4H2354S	22
H4H2355S	2,3
H4H2357S	4,9
H4H2364S	2,3

Пример 6. Ингибирование артемин-сенситизированной вызванной капсаицином тепловой гипералгезии

Для индуцирования артемин-сенситизированной тепловой гипералгезии у мышей каждую мышь предварительно обрабатывали инъекцией внутрь подошвы 0,5 микрограмма мышинового рекомбинантного артемина (R&D Systems, #1085-AR) за 24 часа до введения внутрь подошвы инъекции 0,5 микрограмма капсаицина (субоптимальная доза) из 100 mM раствора в DMSO (Sigma-Aldrich, #M-2028). Тепловую гипералгезию оценивали с использованием теста Харгрейвса, при котором луч света направляли на инъецированную лапу до тех пор, пока животное не отдернет свою лапу. Латентный период до отдергивания регистрировали как поведенческую меру ноцицепции. Затем тепловую гипералгезию сенситизировали артемином через 3 дня после введения капсаицина на основании значительно пониженных латентных периодов до отдергивания лапы. В ходе этих исследований измеряли исходное значение латентного периода до отдергивания перед введением дозы либо артемина, либо капсаицина, а затем проводили второе измерение через три дня после обработки капсаицином. Экспериментатор, выполняющий эти анализы, не знал о том, какая из групп животных была группой обработки.

Во всех экспериментах для оценки эффективности человеческих антител против GFR α 3 при артемин-сенсibilизированной гипералгезии использовали взрослых мышей, гомозиготных по экспрессии человеческого GFR α 3 вместо мышинового GFR α 3 («гуманизированный GFR α 3»). В каждом анализе использовали и самцов, и самок мышей с равномерным распределением полов в группах обработки (всего 8 мышей на группу обработки или контрольную группу). У мышей с гуманизированными GFR α 3 предварительно определяли наличие индуцированных артемином латентных реакций на вызванную капсаицином тепловую гипералгезию, подобных наблюдаемым у мышей дикого типа.

Тестировали шесть антител против GFR α 3 (H4H2212N, H4H2243N2, H4H2292S, H4H2294S, H4H2342P и H4H2352S-1) на модели. Все антитела разбавляли в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS) и вводили подкожно при 25 мг/кг в объеме 1 мл/100 г веса тела за 24 часа до инъекции артемина в заднюю лапу. В каждом эксперименте одна группа животных получала изотипное контрольное антитело.

Болевую чувствительность для каждой группы обработки или контрольной группы определяли как процентное отношение исходного латентного периода до отдергивания (%BWL), рассчитанного как фракционное изменение для временного латентного периода до отдергивания (WL) каждого животного через три дня после обработки капсаицином, по сравнению с их исходным латентным периодом до отдергивания без обработки капсаицином:

$$\% \text{ BWL} = [(WL_{\text{(капсаицин)}} - WL_{\text{(без капсаицина)}}) / WL_{\text{(без капсаицина)}}] \times 100.$$

С использованием % BWL бóльшие отрицательные значения указывают на бóльшую тепловую гипералгезию.

В таблице 8 представлено краткое описание среднего по группе (полужирным шрифтом) и стандартной ошибки среднего (курсивом) для процентного отношения исходного латентного периода до отдергивания (% BWL) на модели артемин-сенсibilизированной вызванной капсаицином тепловой гипералгезии, оцениваемой через три дня после инъекции капсаицина.

Как показано в таблице 8, у мышей, обработанных антителами против hGFR α 3, наблюдали повышение % BWL (более низкие отрицательные или положительные значения) по сравнению с мышами, обработанными изотипным контрольным антителом. Четыре антитела H4H2352S, H4H2243N2, H4H2294S и H4H2342P обеспечивали наибольшую устойчивость к тепловой гипералгезии во всех выполняемых экспериментах.

Таблица 8: Краткое описание данных модели артемин-сенсibilизированной вызванной капсаицином тепловой гипералгезии, оцениваемой через три дня после инъекции капсаицина

ID AbP	% BWL			
	Эксп. 323	Эксп. 361	Эксп. 367	Эксп. 380
Изотипный контроль	$-17 \pm 7,6$	$-32 \pm 6,8$	$-40 \pm 4,8$	$-35 \pm 3,5$
H4H2292S	$0,72 \pm 19$	н.т.	н.т.	$-26 \pm 5,9$
H4H2352S	27 ± 15	н.т.	$-5,6 \pm 9,4^{**}$	н.т.
H4H2243N2	20 ± 18	н.т.	н.т.	$21 \pm 6,4^{***}$
H4H2294S	н.т.	$-9,0 \pm 12$	$2,3 \pm 12^{**}$	н.т.
H4H2342P	н.т.	$-12 \pm 9,3$	$18 \pm 8,3^{***}$	н.т.
H4H2212N	н.т.	$-22 \pm 6,9$	н.т.	н.т.

Значимо отличается от изотипного контроля, $^{**}p < 0,01$; $^{***}p < 0,001$

(н.т. = не тестировали в данном эксперименте).

Пример 7. Тестирование антител против GFR α 3 на способность к перекрестной реакции с GFR α 1 и GFR α 2

Способность антител против GFR α 3 связываться с рецепторами семейства GDNF оценивали с использованием биосенсора Octet Red (Fortebio, Inc.). Антитела тестировали на связывание или человеческого GFR α 1, экспрессируемого с С-концевой меткой человеческого Fc и гексагистиридиновой меткой (hGFR α 1-hFc-6His, R&D Systems # 714-GR), человеческого GFR α 1, экспрессируемого только с С-концевой меткой человеческого Fc (hGFR α 1-hFc; SEQ ID: 376), человеческого GFR α 2, экспрессируемого с С-концевой меткой человеческого Fc и гексагистиридиновой меткой (hGFR α 2-hFc-6His, R&D Systems #613-FR), человеческого GFR α 3, экспрессируемого с С-концевой меткой человеческого Fc (hGFR α 3-hFc, SEQ ID: 371), или иррелевантного меченного человеческим Fc белка. Антигены захватывали наконечниками датчика, покрытыми антителами против человеческого Fc, из раствора 10 мкг/мл в течение 5 минут. Затем покрытые наконечники датчика блокировали раствором 100 мкг/мл иррелевантных антител против человеческого Fc в течение 5 минут. Затем заблокированные наконечники датчика погружали в лунки, содержащие по 667 мкМ каждого антитела против GFR α 3 или только буфер, на 10 минут. Эксперимент выполняли при 25°C со скоростью потока 1000 оборотов в минуту с использованием буфера HBST+BSA (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% вес/объем поверхностно-активного средства P20, 0,1 мг/мл

BSA, pH 7,4). Контролировали и регистрировали реакцию связывания (измеренную в единицах нМ) на каждой стадии эксперимента.

Все шесть из тестируемых антител против GFR α 3 демонстрировали связывание приблизительно 1,0 нМ с белком hGFR α 3-hFc, но не демонстрировали какое-либо измеримое связывание с другими рецепторами семейства GDNF или с иррелевантным меченным человеческим Fc белком, как показано в таблице 9.

Таблица 9. Способность антител против GFR α 3 к реакции с GFR α 1, GFR α 2 и GFR α 3

Антиген	Уровень захвата (нМ) +/- стандартное отклонение	100 мкг/мл связанного H4H22 94S (нМ)	100 мкг/мл связанного H4H23 42P (нМ)	100 мкг/мл связанного H4H22 43N2 (нМ)	100 мкг/мл связанного H4H22 12N (нМ)	100 мкг/мл связанного H4H23 52S (нМ)	100 мкг/мл связанного H4H22 92S (нМ)	Буфер
hGFR α 1-hFc	1,89 $\pm$ 0,14	0,04	0,06	0,03	0,00	0,02	0,05	-0,07
hGFR α 1-hFc-6his	1,66 $\pm$ 0,10	0,03	0,08	0,03	-0,01	0,03	0,03	-0,07
hGFR α 2-hFc-6his	1,49 $\pm$ 0,09	0,06	0,12	0,06	0,02	0,04	0,05	-0,06
hGFR α 3-hFc	1,68 $\pm$ 0,10	1,17	1,59	1,11	1,18	1,25	1,04	-0,09
Иррелевантный меченный hFc белок	1,00 $\pm$ 0,06	0,03	0,07	0,03	0,00	0,03	0,02	-0,08

Пример 8. Измерение способности антител против GFR α 3 блокировать стимуляцию артемином при биоанализе HEK293/MfGFR α 3/MfRet/SRE-Luc

Способность антител против GFR α 3 блокировать активацию GFR α 3 яванского макака и RET яванского макака с помощью их лигандного артемина *in vitro* определяли с использованием клеточного анализа. Создавали клетки HEK293, модифицированные со стабильной экспрессией и GFR α 3 яванского макака (MfGFR α 3; SEQ ID: 377), и RET яванского макака (MfRET; SEQ ID: 378), а затем трансдуцировали их репортером Signal Lenti SRE (SA Biosciences, #CLS-010L), экспрессирующим ген люциферазы светлячка под контролем минимального промотора CMV и tandemных повторов

элемента ответа сыворотки крови, для создания клеточной линии HEK293/MfGFR α 3/MfRet/SRE-Luc.

Для биоанализа высевали 20000 клеток HEK293/MfGFR α 3/MfRet/SRE-Luc в покрытые Poly D-лизином 96-луночные планшеты (Greiner, #35-4620) на среду Optimem (GIBCO, #31985), содержащую 0,5% FBS, а затем выращивали в течение ночи при 5% CO₂ и 37°C. Затем клетки инкубировали в течение 1 часа при серийных разведениях антител против GFR α 3, варьирующих от 5 пМ до 300 нМ. Затем в клетки добавляли константную дозу (500 пМ) человеческого артемина, экспрессируемого с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой, (человеческого артемина-ММН; SEQ ID: 369) и инкубировали еще 6 часов. Для определения значения EC₅₀ человеческого артемина-ММН по кривым доза-ответ в клетки добавляли серийные разведения человеческого артемина-ММН, варьирующие от 0,5 пМ до 10 нМ, без антител и инкубировали в течение 6 часов при 37°C. Люциферазную активность измеряли как относительные световые единицы (RLU) на люцинометре Victor (Perkin Elmer) после добавления реагента OneGlo (Promega, # E6051). Значения EC₅₀ и IC₅₀ вычисляли с помощью четырех-параметрового логистического уравнения по 12-точечной кривой ответа с использованием программного обеспечения для анализа данных Prism от GraphPad.

Шесть антител против GFR α 3 тестировали на их способность ингибировать артемин-зависимую активацию клеток HEK293/MfGFR α 3/MfRET/SRE-luc. Как показано в таблице 10, все шесть тестируемых антител блокировали люциферазную активность со значениями IC₅₀, варьирующими от 0,7 нМ до 2,5 нМ. Человеческий артемин-ММН стимулировал SRE-зависимую люциферазную активность в линии клеток HEK293/mfGFR α 3/mfRet/SRE-LUC со значением EC₅₀ 70 пМ.

Таблица 10: Ингибирование артемин-зависимой стимуляции клеток HEK293/MfGFR α 3/MfRET/ SRE-luc антителами против GFR α 3

Антитело	IC ₅₀ (нМ)
H4H2294S	0,7
H4H2342P	2,5
H4H2212N	1,8
H4H2292S	1,5
H4H2243N2	0,8

H4H2352S	1,3
----------	-----

Пример 9. Создание биспецифического антитела против GFR α 3

Создавали различные биспецифические антитела для применения в осуществлении способов в соответствии с настоящим изобретением. Например, создавали GFR α 3-специфические антитела в биспецифическом формате («биспецифические»), в которых переменные области связывания с определенными эпитопами в GFR α 3 связываются вместе для обеспечения двойной эпитопной специфичности в одной связывающей молекуле. Надлежащим образом разработанные биспецифичности могут усиливать эффективность блокирования GFR α 3 в целом посредством усиления и GFR α 3 специфичности, и авидности связывания. Переменные области со специфичностью по отношению к отдельным различным эпитопам в любом из трех цистеиновых повторов или те, которые могут связываться с различными областями в одном эпитопе любого из трех цистеиновых повторов, спаривали на структурном скелете, что обеспечивает одновременное связывание каждой переменной области с отдельными эпитопами или с разными областями в одном эпитопе. В одном примере биспецифичности, переменные области тяжелой цепи (V_H) из биндера со специфичностью по отношению к одному эпитопу в одном цистеиновом повторе рекомбинируют с переменными областями легкой цепи (V_L) из ряда биндеров, обладающих специфичностью по отношению ко второму эпитопу в любом из других двух цистеиновых повторов, для идентификации некогнатных V_L -партнеров, которые могут быть спарены с оригинальной V_H без нарушения оригинальной специфичности по отношению к этой V_H . Таким образом, отдельный сегмент V_L (например, V_{L1}) можно комбинировать с двумя различными доменами V_H (например, с V_{H1} и V_{H2}) для создания биспецифического антитела, содержащего два связывающих «плеча» (V_{H1} - V_{L1} и V_{H2} - V_{L1}). Применение одного сегмента V_L уменьшает сложность системы и, тем самым, обеспечивает простоту и повышает эффективность процессов клонирования, экспрессии и очистки, используемых для создания биспецифических антител (см., например, заявку на выдачу патента США № 2013/022759 и заявку на выдачу патента США № 2010/0331527).

В качестве альтернативы, антитела, которые связывают и GFR α 3, и вторую цель, такую как без ограничения, например, RET, могут быть получены в биспецифическом формате с использованием методик, описанных в настоящем документе, или других

методик, известных специалистам в данной области. Вариабельные области антител, связывающиеся с определенными областями GFR α 3, которые находятся вне клетки, связываются вместе с вариабельными областями, которые связываются с соответствующими сайтами, например, на лиганде артемина, других рецепторах GFR α , или с RET, с обеспечением двойной антигенной специфичности в одной связывающей молекуле. Вариабельные области со специфичностью по отношению к отдельным эпитопам в GFR α 3 комбинировали с вариабельной областью со специфичностью, например, по отношению к артемину, спаривали на структурном скелете, что обеспечивает связывание каждой вариабельной области с отдельными антигенами.

Биспецифические биндеры тестировали на связывание и функциональное блокирование целевых антигенов, например, GFR α 3 и/или артемина, других рецепторов GFR α или RET, любым из описанных выше анализов для антител. Например, использовали стандартные способы измерения связывания растворимого белка для оценки биспецифического взаимодействия с его антигеном(ами), такие как Biacore, ELISA, эксклюзионная хроматография, многоугловое лазерное светорассеяние, прямая сканирующая калориметрия и другие способы. Связывание биспецифических антител с клетками, экспрессирующими GFR α 3, определяли посредством проточной цитометрии с использованием флуоресцентно меченного вторичного антитела, распознающего целевой антиген на клетках. Эксперименты со связыванием пептидов также могут быть выполнены с использованием экспериментов с поверхностным плазмонным резонансом, при которых взаимодействие со связыванием пептида с антителом в режиме реального времени измеряли с помощью протекания пептида или биспецифического антитела сквозь поверхность датчика, на которой захватывались биспецифическое антитело или пептид, соответственно. Функциональное *in vitro* блокирование рецептора GFR α 3 биспецифическим антителом определяли с использованием какого-либо биоанализа, такого как описанные в настоящем документе, или с помощью *in vivo* определения реакции на боль на приемлемых животных моделях, таких как описанные в настоящем документе. Функциональное *in vitro* блокирование GFR α 3 или его лиганда артемина биспецифическим антителом определяли с использованием какого-либо биоанализа, такого как описанные в публикации международной заявки WO2010/077854 или в заявке на выдачу патента США № 2010/0166768, или с помощью *in vivo* определения гиперчувствительности на тепловой раздражитель на приемлемых животных моделях, таких как описанные в настоящем документе.

Пример 10. Измеренные с помощью поверхностного плазмонного резонанса аффинности связывания и кинетические константы моноклональных антител против мышинового GFR α 3

Константы скорости ассоциации и диссоциации связывания (k_a и k_d , соответственно), рассчитанные равновесные константы диссоциации и периоды полувыведения при диссоциации (K_D и $t_{1/2}$, соответственно) для антигена, связывающегося с антителами против мышинового GFR α 3, определяли с использованием анализа с биодатчиком поверхностного плазмонного резонанса в режиме реального времени (Biacore 3000) при 25°C. Антитела тестировали на связывание с мышинным GFR α 3, экспрессируемым с мус-мус-гексагистиридиновой меткой (mGFR α 3-MMH; SEQ ID: 379). Антитела против GFR α 3 захватывали на поверхности с поликлональным антителом козы против IgG мыши (GE Healthcare, # BR-1008-38), созданной с помощью прямого аминного присоединения к сенсорному чипу Biacore CM5. Кинетические эксперименты выполняли с использованием HBS-EP (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% поверхностно-активного средства P20, при pH 7,4) в качестве как подвижного буфера, так и буфера для образца. Связывание с мышинным GFR α 3-MMH оценивали путем инъекции нескольких концентраций, варьирующих от 100 нМ до 6,25 нМ (2-кратные разведения) через поверхность с захваченными антителами. Ассоциацию антитело-антиген контролировали до 5 минут, тогда как диссоциацию в буфере контролировали до 10 минут. Кинетические константы скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) определяли путем обработки и подгонки данных к модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения Scrubber 2.0с для подбора кривой. Равновесные константы диссоциации связывания (K_D) и периодов полувыведения при диссоциации ($t_{1/2}$) вычисляли по кинетическим константам скорости: K_D (M) = k_d / k_a , и $t_{1/2}$ (минуты) = $[\ln 2 / (60 * k_d)]$.

Как показано в таблице 11, два тестируемых антитела против мышинового GFR α 3 M1M6986N и M1M6977N связывались с mGFR α 3-MMH при 25°C со значениями K_D 23,1 пМ и 107 пМ, соответственно.

Таблица 11: Кинетические показатели связывания mGFR α 3-MMH с различными антителами против мышинового GFR α 3 при 25°C

ID AbP	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (минуты)
M1M6986N	1,02E+06	2,35E-05	2,31E-11	491
M1M6977N	3,84E+05	4,1E-05	1,07E-10	282

Пример 11. ELISA с блокированием связывания мышинового GFR α 3

Способность антител против мышинового GFR α 3 блокировать связывание мышинового GFR α 3 с мышинным артемином в присутствии или отсутствии корецепторной мышиной RET определяли с использованием двух различных форматов блокирующего ELISA. При первом формате рекомбинантным мышинным белком артемином (№ по каталогу R&D 1085-AR/CF) покрывали 96-луночные микротитрационные планшеты при 2 мкг/мл в PBS буфере в течение ночи при 4°C, а затем блокировали раствором 0,5% (вес/объем) BSA. Константное количество (3,5 нМ) биотинилированного мышинового GFR α 3 с С-концевой мус-мус-гексагистидиновой меткой (биотин-mGFR α 3-MMH, SEQ ID: 379) предварительно смешивали с переменными количествами антител, варьирующими от 100 нМ до 1,6 пМ в серийных разведениях, а затем инкубировали 1 час при комнатной температуре (RT) для обеспечения достижения равновесия связывания антитело-биотин-mGFR α 3-MMH. Затем уравновешенные растворы образцов переносили в покрытый мышинным артемином планшет. Через 1 час после связывания планшет промывали, затем связанные биотин-mGFR α 3-MMH выявляли с использованием стрептавидин-HRP (Pierce, #N200), а сигналы при колориметрии получали с использованием субстрата HRP TMB (BD Biosciences, #51-2606KC и #51-2607KC). Поглощение регистрировали при 450 нм на устройстве для чтения планшетов Victor X5 (Perkin Elmer) для определения количества несвязанного биотин-mGFR α 3-MMH в предварительно уравновешенных растворах биотин-mGFR α 3-MMH-антитело, которые были способны связываться с покрытым мышинным артемином планшетом. Значения IC₅₀, определяемые как концентрация антитела, необходимая для снижения сигнала от константной концентрации биотин-mGFR α 3-MMH на 50%, вычисляли по данным с использованием программного обеспечения Prism от GraphPad. Поглощение, измеряемое при константном количестве биотин-mGFR α 3-MMH в отсутствии антитела против мышинового GFR α 3, определяли как 0% блокирования, а поглощение без добавленного биотин-mGFR α 3-MMH, определяли как 100% блокирования. Наблюдаемое поглощение в лунках, содержащих наивысшую концентрацию антитела, использовали для вычисления максимального процента блокирования, показанного в таблице. Результаты кратко описаны в таблице 12.

При втором формате ELISA планшеты, образцы и данные обрабатывали подобно первому формату, за исключением того, что покрывали и мышиной RET, экспрессируемой с С-концевыми метками hFc и гексагистидина (mRET-hFc-6His; № по

каталогу R&D 482-RT/CF), и мышинным артемином (№ по каталогу R&D 1085-AR/CF) для блокирования при эксперименте ELISA. 96-луночные микротитрационные планшеты покрывали смесью белков мышинового артемина 1,2 мкг/мл (100 нМ) и mRET-hFc-6His 9,5 мкг/мл (100 нМ) в PBS в течение ночи при 4°C, а затем блокировали раствором 0,5% (вес/объем) BSA. Константное количество (350 пМ) биотин-mGFR α 3-MMH предварительно смешивали с переменными количествами антител против мышинового GFR α 3, варьирующими от 100 нМ до 1,6 пМ в серийных разведениях, а затем инкубировали 1 час при RT для обеспечения достижения равновесия связывания антитело-биотин-mGFR α 3-MMH. Затем уравновешенные образцы переносили в покрытый планшет. После связывания в течение 1 часа планшет промывали, затем связанный биотин-mGFR α 3-MMH выявляли с использованием конъюгированного с HRP стрептавидина и сигналы при колориметрии получали с использованием субстратов HRP TMB. Значения IC₅₀ и максимальное блокирование каждым антителом показаны в таблице 12.

Как показано в таблице 12, только одно тестируемое антитело против мышинового GFR α 3 - M1M6986N демонстрировало способность блокировать связывание биотин-mGFR α 3-MMH с покрытым мышинным артемином планшетом со значением IC₅₀ 69,1 пМ. Другое тестируемое антитело против мышинового GFR α 3 - M1M6977N не демонстрировало какого-либо поддающегося измерению блокирования при данном формате ELISA. Оба тестируемых антитела против мышинового GFR α 3, M1M6986N и M1M6977N, демонстрировали способность полностью блокировать связывание биотин-mGFR α 3-MMH с планшетами, покрытыми и мышинным артемином, и mRET-hFc-6His, со значениями IC₅₀ 47,2 пМ и 366 пМ, соответственно.

Таблица 12: ELISA с блокированием связывания мышинового GFR α 3 с мышинным артемином отдельно или с мышинным артемином и мышинной RET

Формат 1 ELISA: Блокирование антителом при 3,5 нМ связывания биотин-mGFR α 3-MMH с покрытым мышинным артемином планшетом			Формат 2 ELISA: Блокирование антителом при 350 пМ связывания биотин-mGFR α 3-MMH с покрытым мышинным артемином и mRET-hFc-6His планшетом	
ID AbP	IC ₅₀ (M)	% максимального блокирования	IC ₅₀ (M)	% максимального блокирования
M1M6986N	6,91E-11	100%	4,72E-11	100%
M1M6977N	О.Б.		3,66E-10	100%
О.Б. = отсутствие блокирования				

Пример 12. Клеточный биоанализ с люциферазой

Способность антител против мышинового GFR α 3 блокировать активацию мышинового GFR α 3 и мышиной RET его лигандным мышинным артемином определяли *in vitro* с использованием клеточного анализа. Создавали клетки HEK293, модифицированные со стабильной экспрессией и мышинового GFR α 3 (аминокислоты 1-397 под номером доступа AAN66202.1), и мышиной RET (аминокислоты 1-1115 под номером доступа NP_033076.2), а затем трансдуцировали с реагирующим на люциферазу репортером SRE (SRE-luc; Sabiosciences, CCS-010L) (клетки 293/mGFR α 3/mRET/SRE-luc).

Двадцать тысяч клеток 293/mGFR α 3/mRET/SRE-luc высевали в покрытые Poly D-лизином 96-луночные планшеты (Greiner, #35-4620) со средой Optimem (GIBCO, #31985), содержащей 0,5% FBS, а затем выращивали в течение ночи в 5% CO₂ при 37°C. Затем клетки инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при серийных разведениях антител против GFR α 3, варьирующих от 3 нМ до 44 нМ.

Затем к клеткам добавляли константную дозу (100 пМ) мышинового артемина (R&D, # 1085-AR/CF) и инкубировали еще 6 часов. Люциферазную активность измеряли как относительные световые единицы (RLU) на люцинометре Victor (Perkin Elmer) после добавления реагента OneGlo (Promega, #E6051). Значения EC₅₀ и IC₅₀ вычисляли с помощью четырех-параметрового логистического уравнения по 12-точечной кривой ответа с использованием программного обеспечения для анализа данных Prism от GraphPad.

Как показано в таблице 13, оба тестируемых антитела против мышинового GFR α 3, M1M6986N и M1M6977N, демонстрировали способность ингибировать зависимость от мышинового артемина стимуляцию клеток 293/mGFR α 3/mRET/SRE-luc со значениями IC₅₀ приблизительно 44 нМ и 3 нМ, соответственно.

Таблица 13: Ингибирование зависимой от артемина стимуляции клеток 293/mGFR α 3/mRET/SRE-luc антителами против мышинового GFR α 3

Антитело	IC ₅₀ (нМ)
M1M6986N	44 ± 3 (n = 2)
M1M6977N	3 ± 1 (n = 3)

Примеры 13, 14 и 15: Эффект антител против мышинового GFR α 3 на животных моделях боли при раке кости и остеоартритической боли

Описанные в настоящем документе антитела представляют собой высокоаффинные человеческие антитела против связанного с GPI рецептора-альфа для артемина - GFR α 3. Поскольку такие антитела против человеческого GFR α 3 перекрестно не реагируют с мышинным GFR α 3, *in vivo* анализы с такими антителами можно выполнять только на мышах, генетически измененных с замещением последовательности мышинового GFR α 3 на последовательность человеческого GFR α 3. В начальных *in vivo* экспериментах на таких GFR α 3^{hu/hu} мышах с использованием фармакологического ингибирования артемин-сенсibilизированной вызванной капсаицином тепловой гипералгезии выявляли эффективность четырех человеческих антител в данном *in vivo* анализе. Для облегчения получения данных эффективности создавали антитела против мышинового GFR α 3, которые служили имитаторами человеческих антител. Мышей смешанной линии C57BL6/129Sv, которые были гомозиготными по делеции эндогенного гена GFR α 3, иммунизировали внеклеточным доменом рекомбинантного мышинового GFR α 3, экспрессируемого в клетках яичника китайского хомячка. Специфическую иммунную реакцию против GFR α 3 подтверждали иммуноанализами сыворотки крови от иммунизированных мышей. Собирали селезенки от мышей, проявляющих высокоспецифическую иммунную реакцию, и создавали продуцирующие антитела гибридные клетки путем слияния с выделенными спленоцитами с клетками мышинной миеломы согласно стандартным процедурам получения гибридомы. Затем скринировали гибридные супернатанты в иммуноанализах связывания с GFR α 3 и их способности блокировать связывание GFR α 3 либо с артемином, либо с покрытой артемином/Ret твердой поверхностью в формате иммуноанализа. Супернатанты также скринировали по их способности блокировать стимуляцию артемином пути GFR α 3/корцепторной RET в клеточном биоанализе. Получали последовательности вариабельной области антитела с помощью PCR-амплификации отобранных гибридных клонов, белки-антитела которых демонстрируют эффективное блокирование в клеточном анализе, и эти последовательности использовали для получения непротессированных рекомбинантных антител против мышинового GFR α 3 с мышинным изотипом IgG1. Отбирали два антитела для *in vivo* тестирования, которые эффективно ингибировали артеминовую передачу сигнала в клеточном анализе. В *in vitro* иммуноанализе связывания антитело M1M6986N, блокирующее связывание GFR α 3 с покрытой

артемином и/или артемином/RET твердой поверхностью, в настоящем документе назвали прямым блокатором. Антитело M1M6977N, блокирующее связывание GFR α 3 с покрытой артемином/RET, но не артемином отдельно, в *in vitro* иммуноанализе, в настоящем документе назвали косвенным блокатором. Эти два мышинных антитела, M1M6986N и M1M6977N, отбирали для тестирования на модели артемин-сенсibilизированной вызванной капсаицином тепловой гипералгезии (описанной в примере 6), поскольку эти два антитела демонстрировали подобные профили связывания и блокирования с эффективными человеческими антителами. Эти два антитела скринировали по их способности блокировать индуцированную артемином сенсibilизацию гипералгезии *in vivo* у мышей дикого типа. Подобно их аналогам - человеческим антителам оба антитела существенно ингибировали эффект сенсibilизации артемином вызванной капсаицином тепловой гипералгезии через трое суток после инъекции капсаицина (фиг. 1).

Пример 13: Фибросаркомная модель боли при раке кости

Метод

Субъекты

Использовали взрослых самцов мышей исходной линии C57Bl6 возрастом приблизительно 12 недель для двух экспериментов с фибросаркомой. Экспериментаторы, измеряющие итоговые данные этого эксперимента, не знали о том, какая из групп животных была группой обработки, при сборе, преобразовании и анализе данных.

Модель рака кости

Для индуцирования боли при раке кости мышей анестезировали, а затем интрафеморально инъектировали $1,0 \times 10^6$ клетками фибросаркомы MC57G. Эти клетки получали от линии мышей C57Bl/6 с фибросаркомовой опухолью. Опухоли, как правило, на этой модели растут агрессивно, так, что разрушение кости становится очевидным через 14 дней после имплантации опухоли. Делали рентгенограммы в дни 7, 10 и 14 после имплантации для проверки роста опухоли и разрушения кости. Разрушение кости оценивали по трехбалльной шкале так, что 0 соответствует отсутствию разрушения, а 3 соответствует полному разрушению бедренной кости в области опухоли.

Обработка антителами

Каждое животное получало подкожно инъекции антител 30 мг/кг, вводимые за день до имплантации раковых клеток и вновь в день 7. Животных псевдослучайно распределяли в одну из двух или трех групп обработки: 1) изотипным (отрицательным) контрольным антителом M2M180N в двух отдельных экспериментах, 2) антителом против мышинового GFR α 3 M1M6977N в двух отдельных экспериментах или 3) антителом против мышинового GFR α 3 M1M6986N только во втором эксперименте. M1M6986 блокирует взаимодействие артемина с GFR α 3, и, поэтому, его считают «прямым» блокатором действия артемина. Наоборот, M1M6977N ингибирует действие артемина через комплекс GFR α 3/RET, и, поэтому, его считают «косвенным» ингибитором.

Измерения ноцицепции

Ноцицептивные реакции на опухоль кости измеряли с помощью теста фон Фрея с использованием нитей для провоцирования механической (тактильной) аллодинии, теста динамической весовой нагрузки (DWB) на готовность переносить вес на конечность и защитного поведения. Результаты теста фон Фрея выражали в граммах давления, необходимого для отдергивания лапы. Результаты весовой нагрузки выражали в проценте веса тела, перенесенного на ипсилатеральную конечность. Защитное поведение выражали как время, затраченное на защиту конечности в течение двухминутного периода.

Результаты

Разрушение кости

Обработка антителами не оказывала значимого эффекта на балл разрушения кости в каждом эксперименте, из чего можно заключить, что обработка антителами самими по себе не оказывала влияния на тяжесть рака кости (данные не показаны).

Ноцицептивное поведение

Наблюдали статистически значимое уменьшение тактильной аллодинии при обработке антителами против GFR α 3 после фибросаркомовой инъекции в первом эксперименте ($F(1,20) = 9,189$, $p = 0,007$, фиг. 2A) и статистическую тенденцию к эффективности в целом во втором эксперименте ($F(2,29) = 3,069$, $p < 0,062$, фиг. 2B),

при этом отдельные сравнения иногда достигали значимости во втором исследовании (фиг. 2B).

Не наблюдали статистически значимого эффекта антител против GFR α 3 на динамическую весовую нагрузку на ипсилатеральной конечности, измеренной через 14 дней после имплантации в кость фибросаркомовых клеток в каждом эксперименте, хотя в первом эксперименте наблюдали статистическую тенденцию к эффективности обработки с M1M6977N ($t(10) = 2,047$, $p = 0,068$, фиг. 3A; $F(2,28) = 1,598$, $p = 0,220$, фиг. 3B).

Антитела против GFR α 3 значимо снижали защиту конечности после имплантации раковых клеток в кость в обоих экспериментах с фибросаркомой ($F(1,20) = 12,270$, $p = 0,002$, фиг. 4A; $F(2,29) = 3,576$, $p = 0,041$, фиг. 4B).

Заключение

Обработка антителами против мышинового GFR α 3 значимо снижала ноцицептивное поведение на данной модели боли при раке кости, как измеряли с помощью оценивания защиты и теста фон Фрея с тактильной аллодинией. Кроме того, наблюдали статистическую тенденцию к эффективности антитела M1M6977N в дифференциале весовой нагрузки в одном эксперименте. Баллы разрушения кости не отличались в группах, получающих антитела против мышинового GFR α 3, из чего можно заключить, что различия в связанных с болью измерениях не может быть объяснено различиями в тяжести злокачественного заболевания. Поэтому, данные в соответствии с настоящим изобретением свидетельствуют о том, что нейтрализующие антитела против GFR α 3 могут быть эффективными против боли при раке кости. Поскольку клетки саркомы чаще являются клетками первичных опухолей, чем клетками метастаз в кости, и поскольку большинство злокачественных заболеваний кости происходят от метастаз первичных опухолей от других участков, эти антитела также тестировали на модели вызванной карциномой молочной железы (маммарной) боли при раке кости. Опухоли молочной железы и предстательной железы являются одними из самых распространенных опухолей, которые, как обнаружено, метастазируют в кость.

Пример 14: Модель боли при вызванном карциномой молочной железы раке кости

Метод

Субъекты

Использовали взрослых самцов мышей исходной линии Balb/c возрастом приблизительно 12 недель для эксперимента с вызванным маммарной карциномой раком кости. Экспериментаторы, измеряющие итоговые данные этого эксперимента, не знали о том, какая из групп животных была группой обработки, при сборе, преобразовании и анализе данных.

Модель рака кости

Для индуцирования боли при раке кости мышей анестезировали, а затем интрафеморально инъецировали 10000 клетками маммарной карциномы 4T-1. Эти клетки получали от линии мышей Balb/c с маммарной карциномой. Опухоли, как правило, на этой модели растут агрессивно, так, что опухоли становятся серьезными через 18 дней после имплантации. Делали рентгенограммы в дни 10, 14 и 19 после имплантации для проверки роста опухоли и разрушения кости. Разрушение кости оценивали по трехбалльной шкале так, что 0 соответствует отсутствию разрушения, а 3 соответствует полному разрушению бедренной кости в области опухоли.

Обработка антителами

Каждое животное получало подкожно инъекции антител 30 мг/кг, вводимые за день до имплантации раковых клеток и два раза в неделю после этого. Животных псевдослучайно распределяли в одну из двух или трех групп обработки: 1) изотипным (отрицательным) контрольным антителом M2M180N, 2) антителом против мышинового GFR α 3 M1M6977N или 3) антителом против мышинового GFR α 3 M1M6986N. M1M6986 блокирует взаимодействие артемина с GFR α 3, и, поэтому, его считают «прямым» блокатором действия артемина. Наоборот, M1M6977N ингибирует действие артемина через комплекс GFR α 3/RET, и, поэтому, его считают «косвенным» ингибитором.

Измерения ноцицепции

Ноцицептивные реакции на опухоль кости измеряли с помощью теста фон Фрея с использованием нитей для провоцирования механической (тактильной) аллодинии, теста динамической весовой нагрузки (DWB) на готовность переносить вес на

конечность и защитного поведения. Результаты теста фон Фрея выражали в граммах давления, необходимого для отдергивания лапы. Результаты весовой нагрузки выражали в проценте веса тела, перенесенного на ипсилатеральную конечность. Защитное поведение выражали как время, затраченное на защиту конечности, в течение двухминутного периода.

Результаты

Разрушение кости

Обработка антителами не оказывала значимого эффекта на балл разрушения кости в этой модели, из чего можно заключить, что обработка антителами самими по себе не оказывала влияния на тяжесть рака кости.

Ноцицептивное поведение

Наблюдали статистически значимое уменьшение тактильной аллодинии при обработке антителами против GFR α 3 после обработки карциномой ($F(2,25) = 8,626$, $p = 0,001$, фиг. 5).

Не наблюдали статистически значимых общих эффектов антител против GFR α 3 на динамическую весовую нагрузку на ипсилатеральной конечности, хотя общий эффект обработки достигал статистической тенденции, и M1M6977N достигал значимой эффективности на апостериорное сравнение через 11 дней (A), а не 18 дней (B), после имплантации в кость клеток карциномы (через 11 дней $F(2,25) = 2,939$, $p = 0,071$, фиг. 6A; через 18 дней $F(2,25) = 0,149$, $p = 0,862$, фиг. 6B).

Антитела против GFR α 3 значимо снижали защиту конечности после имплантации раковых клеток в кость в этой модели ($F(2,25) = 4,222$, $p = 0,026$, фиг. 7).

Заключение

Обработка антителами против мышинового GFR α 3 значимо снижала ноцицептивное поведение на данной модели боли при раке кости, как измеряли с помощью оценивания защиты и теста фон Фрея с тактильной аллодинией. Кроме того, доказывали эффективность антитела REGN1967 в дифференциале весовой нагрузки в одну временную точку. Баллы разрушения кости не отличались в группах, получающих антитела против мышинового GFR α 3, из чего можно заключить, что различия в связанных с болью измерениях не может быть объяснено различиями в тяжести злокачественного заболевания. Поэтому, данные в соответствии с настоящим

изобретением свидетельствуют о том, что нейтрализующие антитела против GFR α 3 могут быть эффективными против боли при раке кости на этой модели боли при метастатическом раке кости.

Пример 15. Модель остеоартритической боли при дестабилизации медиального мениска (DMM)

Метод

Субъекты

Использовали взрослых самцов мышей исходной линии C57Bl6 возрастом приблизительно 12 недель на начало эксперимента для эксперимента с DMM. Экспериментаторы, измеряющие итоговые данные этого эксперимента, не знали о том, какая из групп животных была группой обработки, при сборе, преобразовании и анализе данных.

Модель DMM

В модели DMM медиальный мениск одного колена дестабилизовали и обеспечивали у животного развитие заболевания в течение 16 недель. Во время 16-недельного периода у животных развивалась тактильная аллодиния, а в поврежденном колене увеличивались объем кости и содержание минеральных веществ в кости, подобно раннему остеоартриту у человека. Тактильную аллодинию проверяли у животных с помощью теста фон Фрея за 16 недель до начала обработки антителами.

Обработка антителами

Каждое животное получало подкожно инъекции антител 30 мг/кг, вводимые еженедельно, начиная с 16 недели после хирургической DMM. Животных псевдослучайно распределяли в одну из двух или трех групп обработки: 1) изотипным (отрицательным) контрольным антителом M2M180N, 2) антителом против мышинового GFR α 3 M1M6977N или 3) антителом против мышинового M1M6986N. M1M6986N блокирует взаимодействие артемина с GFR α 3, и, поэтому, его считают «прямым» блокатором действия артемина. Наоборот, M1M6977N ингибирует действие артемина через комплекс GFR α 3/RET, и, поэтому, его считают «косвенным» ингибитором.

Измерения ноцицепции

Ноцицептивные реакции на патологию колена измеряли с помощью теста фон Фрея с использованием нитей для провоцирования механической (тактильной) аллодинии.

Результаты

Ноцицептивное поведение

Наблюдали статистически значимое уменьшение тактильной аллодинии при обработке антителами против GFR α 3 после DMM ($F(2,27) = 21,68$, $p = 0,0001$, фиг. 8).

Заключение

Обработка антителами против мышинового GFR α 3 показывала статистически значимый эффект на тактильную аллодинию так, что группы, последовательно обработанные двумя антителами против GFR α 3, демонстрировали меньшую аллодинию, чем группа изотипного контроля, начиная с 14 дня после начала еженедельной обработки. Эти данные дают возможность предположить, что антитела против GFR α 3 будут эффективными против хронической остеоартритической боли у человека.

Пример 16. Перекрестный конкурентный анализ антител против GFR α 3

Перекрестный конкурентный анализ выполняли для оценивания способности отобранных антител конкурировать друг с другом за связывание с человеческим GFR α 3 с использованием биодатчика Octet RED384 (Fortebio Inc.). Весь эксперимент выполняли при 25°C со скоростью потока 1000 оборотов в минуту в буфере Octet HBST (0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% объем/объем поверхностно-активного средства P20, 0,1 мг/мл BSA). Для оценивания способности 2 антител конкурировать друг с другом за связывание с соответствующими им эпитопами на биотинилированном рекомбинантном человеческом GFR α 3, экспрессируемом с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой (биотин-hGFR α 3-mmH; SEQ ID: 370), сначала захватывали приблизительно ~1,2 нм биотин-hGFR α 3-mmH на покрытых стрептавидином наконечниках датчика Octet (Fortebio Inc, # 18-5019) путем погружения наконечников на 1 минуту в раствор 10 мкг/мл биотин-hGFR α 3-mmH. Затем покрытые антигеном наконечники датчика помещали в лунки, содержащий раствор 25 мкг/мл первого моноклонального антитела против GFR α 3, на 4 минуты для насыщения

поверхности биотин-hGFR α 3-mmH. Затем наконечники датчика последовательно окунали в лунки, содержащие раствор 25 мкг/мл второго моноклонального антитела против GFR α 3. Наконечники датчика промывали в буфере Octet HBST между каждой стадией эксперимента. Реакцию связывания в режиме реального времени контролировали в ходе эксперимента и регистрировали реакцию связывания в конце каждой стадии, как показано на фиг. 9. Сравнивали реакцию связывания mAb-2 с биотин-hGFR α 3-mmH, предварительно объединенного с первым антителом, и определяли конкурентное/неконкурентное поведение различных моноклональных антител против GFR α 3.

Как показано на фиг. 9, темно-серые квадраты с черным шрифтом представляют реакцию связывания при самоконкуренции. Антитела, конкурирующие в обоих направлениях, независимо от порядка связывания, представлены черными квадратами и белым шрифтом. Отсутствие конкуренции между антителами, что предполагает определенный эпитоп связывания, представлено белым квадратом с черным шрифтом.

Девять антител (H4H2236N3, H4H2342P, H4H2295S, H4H2294S, H4H2291S, H4H2357S, H4H2355S, H4H2296S и H4H2243N2) двунаправленно конкурируют друг с другом за связывание с биотин-hGFR α 3-mmH. Восемь из 9 (H4H2236N3, H4H2342P, H4H2295S, H4H2294S, H4H2291S, H4H2357S, H4H2355S и H4H2296S) не конкурируют с любым другим тестируемым антителом против GFR α 3, тогда как H4H2243N2 также двунаправленно конкурирует с двумя дополнительными тестируемыми антителами против GFR α 3 (H4H2212N и H4H2352S). H4H2212N и H4H2352S двунаправленно конкурируют друг с другом и с H4H2243N2 за связывание с биотин-hGFR α 3-mmH, но при этом H4H2212N не конкурирует с любыми другими тестируемыми антителами против GFR α 3, H4H2352S также двунаправленно конкурирует с дополнительным тестируемым антителом против GFR α 3 (H4H2292S). Одно тестируемое антитело против GFR α 3, H4H2350P, не конкурирует с каким-либо из тестируемых антител против GFR α 3 за связывание с биотин-hGFR α 3-mmH.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с $GFR\alpha 3$, содержащие аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области 1 тяжелой цепи (HCDR1) SEQ ID NO: 148, аминокислотную последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 150, аминокислотную последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 152, аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области 1 легкой цепи (LCDR1) SEQ ID NO: 156, аминокислотную последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 158 и аминокислотную последовательность LCDR3 SEQ ID NO: 160.

2. Выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п. 1, содержащие переменную область тяжелой цепи (HCVR), обладающую по меньшей мере 95% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 146, и переменную область легкой цепи (LCVR), обладающую по меньшей мере 95% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 154.

3. Выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п. 2, содержащие HCVR, обладающую по меньшей мере 98% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 146, и LCVR, обладающую по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей по отношению к SEQ ID NO: 154.

4. Выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п. 3, содержащие HCVR, обладающую по меньшей мере 99% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 146, и LCVR, обладающую по меньшей мере 99% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 154.

5. Выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п. 4, содержащие HCVR, имеющую последовательность SEQ ID NO: 146, и LCVR, имеющую последовательность SEQ ID NO: 154.

6. Выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из пп. 1-5, при этом антитело или его антиген-связывающий фрагмент специфически связывается с человеческим $GFR\alpha 3$ и не связывается с мышиным $GFR\alpha 3$.

7. Выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из пп. 1-6, при этом антитело или его антиген-связывающий фрагмент не реагирует перекрестно с человеческим GFR α 1 или человеческим GFR α 2.

8. Выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из пп. 1-7, при этом антитело выбрано из группы, состоящей из химерного антитела, гуманизированного антитела и человеческого антитела.

9. Выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п. 8, при этом антитело представляет собой человеческое антитело.

10. Выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфически связываются с GFR α 3, при этом антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержит HCVR, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью по отношению к SEQ ID NO: 145, и LCVR, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью по отношению к SEQ ID NO: 153.

11. Выделенное моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфически связываются с GFR α 3, при этом антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержит HCVR, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, обладающей по меньшей мере 95% идентичностью по отношению к SEQ ID NO: 145, и LCVR, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, обладающей по меньшей мере 95% идентичностью по отношению к SEQ ID NO: 153.

12. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из пп 1-9.

13. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 12.

14. Способ получения антитела против GFR α 3 или его антиген-связывающего фрагмента, включающий стадии введения вектора экспрессии по п. 13 в выделенную клетку-хозяина, выращивания клетки в условиях, обеспечивающих продуцирование

антитела или его антиген-связывающего фрагмента, и извлечения полученного таким образом антитела или его антиген-связывающего фрагмента.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из пп. 1-11 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

16. Способ лечения связанного с $GFR\alpha 3$ состояния, или заболевания, или боли, ассоциированной со связанным с $GFR\alpha 3$ состоянием или заболеванием, предусматривающий введение антитела или его антиген-связывающего фрагмента по любому из пп. 1-11 или фармацевтической композиции по п. 15 субъекту со связанным с $GFR\alpha 3$ состоянием, или заболеванием, или болью, ассоциированной со связанным с $GFR\alpha 3$ состоянием или заболеванием.

17. Способ по п. 16, при котором связанное с $GFR\alpha 3$ состояние или заболевание выбрано из группы, состоящей из острой боли, хронической боли, нейропатической боли, воспалительной боли, синдрома функциональной боли, артрита, панкреатита, остеоартрита, мигрени, кластерных головных болей, невралгии тройничного нерва, герпетической невралгии, общих невралгий, нейродегенеративных расстройств, нарушений движения, нейроэндокринных нарушений, атаксии, висцеральной боли, подагры, постгерпетической невралгии, диабетической нейропатии, ишиалгии, боли в спине, боли головы или шеи, тяжелой или неутрачиваемой боли, обострения боли, послеоперационной боли, врожденной эритромегалгии, зубной боли, ринита, боли, связанной со злокачественным заболеванием, комплексного регионарного болевого синдрома (CRPS), воспалительного заболевания кишечника (например, болезни Крона или язвенного колита) и расстройств мочевого пузыря.

18. Способ по п. 16 для лечения боли, которая ассоциирована со злокачественным заболеванием или метастазированием при злокачественном заболевании, при этом злокачественное заболевание выбрано из группы, состоящей из рака эндометрия, рака предстательной железы, рака молочной железы, рака шейки матки, рака печени, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, рака желудка, рака матки, рака яичника, рака почки, мелкоклеточного рака легкого, рака головного мозга, лейкоза, лимфомы и рака кости.

19. Способ по п. 16 для лечения боли, ассоциированной с остеоартритом.

20. Способ по п. 16 для лечения мигрени или кластерных головных болей.

21. Способ по п. 16 для лечения хронической боли.

22. Применение антитела или его антиген-связывающего фрагмента по любому из пп 1-11 или фармацевтической композиции по п. 15 для лечения связанного с $GFR\alpha 3$ состояния, или заболевания, или боли, ассоциированной со связанным с $GFR\alpha 3$ состоянием или заболеванием.

23. Применение по п. 22, при котором связанное с $GFR\alpha 3$ состояние или заболевание выбрано из группы, состоящей из острой боли, хронической боли, нейропатической боли, воспалительной боли, синдрома функциональной боли, артрита, панкреатита, остеоартрита, мигрени, кластерных головных болей, невралгии тройничного нерва, герпетической невралгии, общих невралгий, нейродегенеративных расстройств, нарушений движения, нейроэндокринных нарушений, атаксии, висцеральной боли, подагры, постгерпетической невралгии, диабетической нейропатии, ишиалгии, боли в спине, боли головы или шеи, тяжелой или неутрачиваемой боли, обострения боли, послеоперационной боли, врожденной эритромелалгии, зубной боли, ринита, боли, связанной со злокачественным заболеванием, комплексного регионарного болевого синдрома (CRPS), воспалительного заболевания кишечника (например, болезни Крона или язвенного колита) и расстройств мочевого пузыря.

24. Применение по п. 22 для лечения боли, ассоциированной с остеоартритом.

25. Применение по п. 22 для лечения мигрени или кластерных головных болей.

26. Применение по п. 22 для лечения хронической боли.

27. Способ по любому из пп. 16-21 или применение по любому из пп. 22-26, при котором антитело или его антиген-связывающий фрагмент вводят внутривенно или подкожно.

28. Способ по любому из пп. 16-21 или применение по любому из пп. 22-26, при котором антитело или его антиген-связывающий фрагмент вводят больному в комбинации со вторым терапевтическим средством, выбранным из группы, состоящей из опиоида, ингибитора COX-2, местного анестезирующего средства, модулятора NMDA, агониста каннабиноидного рецептора, модулятора семейства P2X, антагониста VR1, антагониста

вещества P, второго антагониста GFR α 3, антагониста цитокина или цитокинового рецептора, ингибитора фактора роста нервов (NGF), ингибитора BDNF, TrkA, TrkB или p75, аспирина, NSAID, стероида, морфина, селективного ингибитора обратного захвата серотонина (SSRI), ингибитора обратного захвата серотонина-норэпинефрина (SNRI), трициклического соединения, ингибитора потенциал-зависимого натриевого канала (Na_v), ингибитора кальциевого канала, ингибитора калиевого канала, ингибитора фактора некроза опухоли (TNF) или ингибитора рецептора TNF, ингибитора TWEAK (родственного TNF слабого индуктора апоптоза), ингибитора RET, ингибитора семейства лигандов GDNF, ингибитора GFR α 1, GFR α 2 или GFR α 4, ингибитора чувствительного к кислоте ионного канала (ASIC1 или ASIC3), противосудорожного средства, ингибитора прокинетического рецептора (PROK1 и PROK2), ингибитора каспазы, ингибитора p38, ингибитора IKK1/2, CTLA-4Ig и кортикостероида.

29. Применение антитела или его антиген-связывающего фрагмента по любому из пп. 1-11 или фармацевтической композиции по п. 15 в изготовлении медикамента для лечения связанного с GFR α 3 состояния, или заболевания, или боли, ассоциированной со связанным с GFR α 3 состоянием или заболеванием.

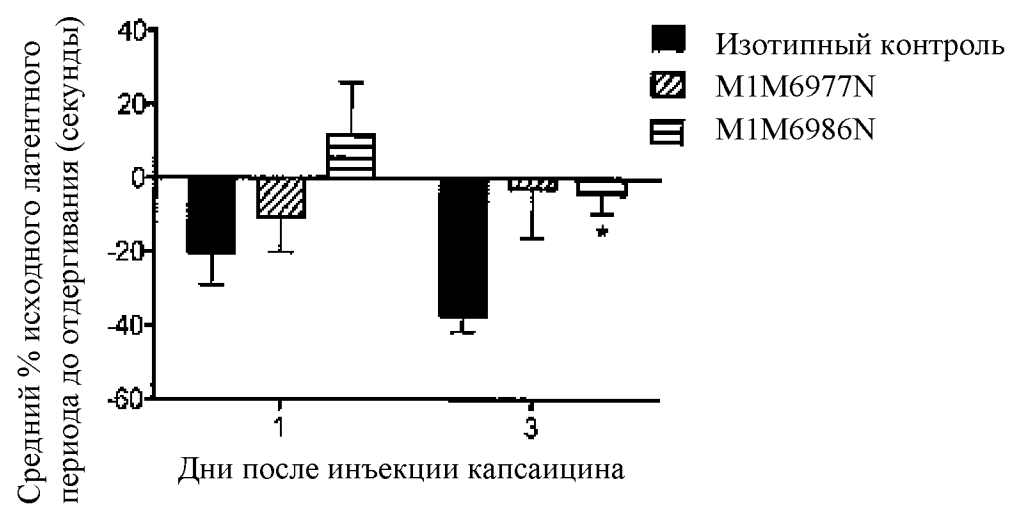
30. Применение по п. 29, при котором связанное с GFR α 3 состояние или заболевание выбрано из группы, состоящей из острой боли, хронической боли, нейропатической боли, воспалительной боли, синдрома функциональной боли, артрита, панкреатита, остеоартрита, мигрени, кластерных головных болей, невралгии тройничного нерва, герпетической невралгии, общих невралгий, нейродегенеративных расстройств, нарушений движения, нейроэндокринных нарушений, атаксии, висцеральной боли, подагры, постгерпетической невралгии, диабетической нейропатии, ишиалгии, боли в спине, боли головы или шеи, тяжелой или неутрачиваемой боли, обострения боли, послеоперационной боли, врожденной эритромелалгии, зубной боли, ринита, боли, связанной со злокачественным заболеванием, комплексного регионарного болевого синдрома (CRPS), воспалительного заболевания кишечника (например, болезни Крона или язвенного колита) и расстройств мочевого пузыря.

31. Применение по п. 29 в изготовлении медикамента для лечения боли, ассоциированной с остеоартритом.

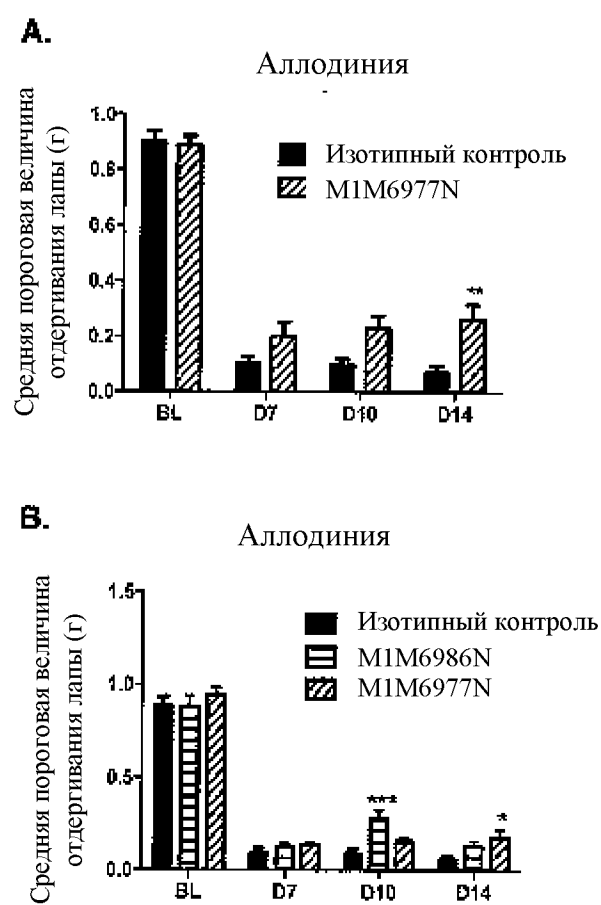
32. Применение по п. 29 в изготовлении медикамента для лечения мигрени или кластерных головных болей.

33. Применение по п. 29 в изготовлении медикамента для лечения хронической боли.

34. Применение выделенного моноклонального антитела или его антиген-связывающего фрагмента, которые специфически связываются с $\text{GFR}\alpha 3$, в изготовлении медикамента для лечения боли, ассоциированной с остеоартритом, при этом антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR), обладающую по меньшей мере 95% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 146, и переменную область легкой цепи (LCVR), обладающую по меньшей мере 95% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 154.

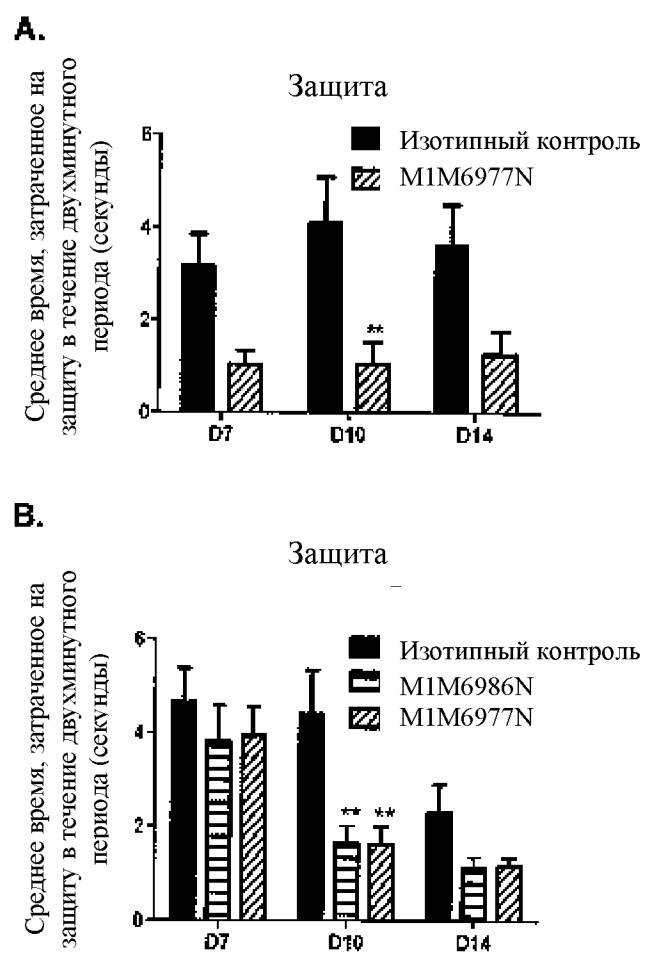


Фиг. 1

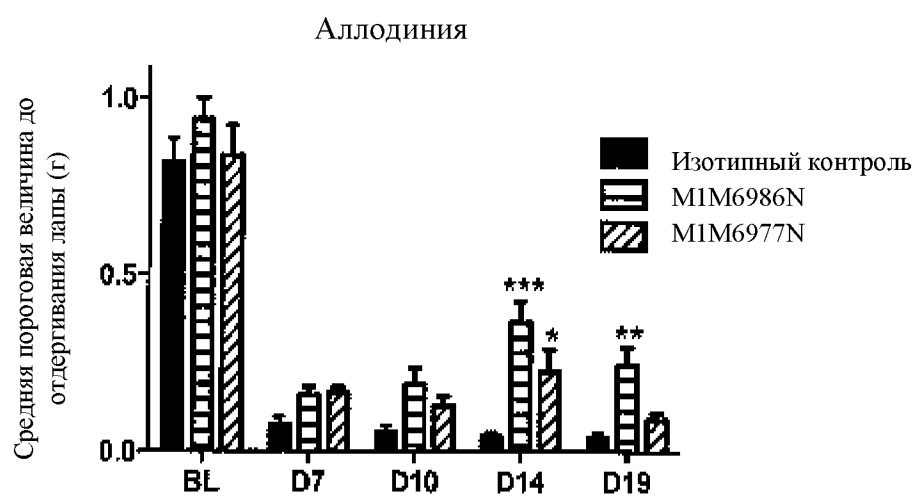


Фиг. 2

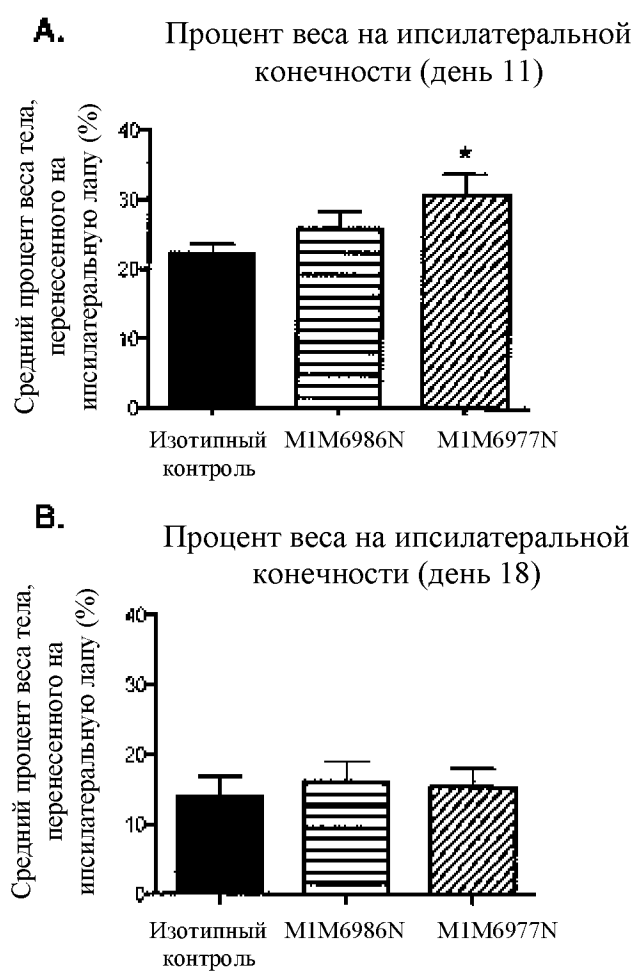
А.**Б.****Фиг. 3**



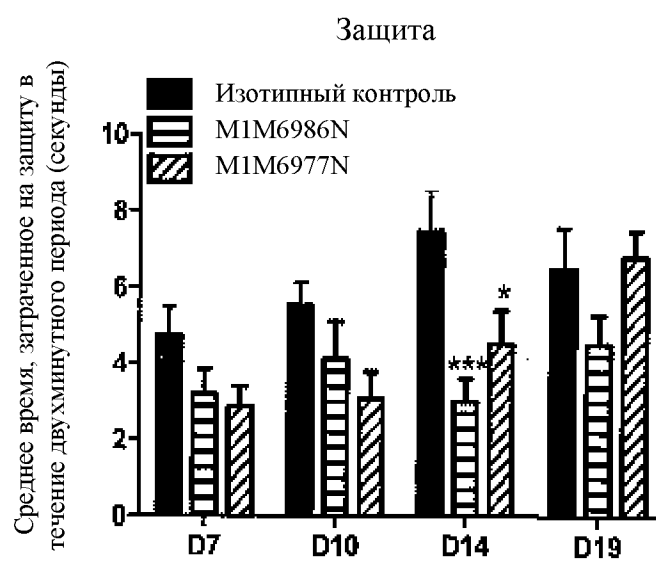
Фиг. 4



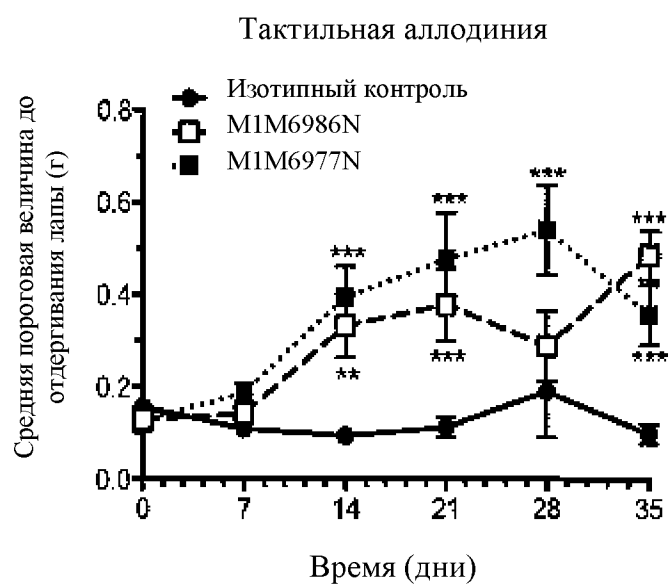
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

Фиг. 9

Антитело	Захваченные биотин- человеческие GFRα3 (нм)	Количество связанного антитела 1 (нм)	H4H2236N3	H4H2342P	H4H2295S	H4H2294S	H4H2291S	H4H2357S	H4H2355S	H4H2298S	H4H2243N2	H4H2212N	H4H2362S	H4H2292S	H4H2350P
H4H2236N3	1.07 ± 0.08	2.54 ± 0.18	0.00	-0.01	0.43	0.00	0.06	0.04	0.00	0.02	0.02	1.79	1.91	1.81	1.35
H4H2342P	1.08 ± 0.08	2.69 ± 0.17	0.20	0.00	0.31	0.23	0.45	0.25	0.16	0.28	0.11	1.76	1.72	1.85	1.48
H4H2295S	1.14 ± 0.15	2.83 ± 0.27	0.01	0.01	0.00	0.02	0.20	0.05	0.02	0.07	0.01	1.81	1.85	1.80	1.35
H4H2294S	1.22 ± 0.04	2.91 ± 0.09	0.05	0.01	0.04	0.00	0.12	0.03	0.00	0.04	0.03	1.92	1.99	1.92	1.42
H4H2291S	1.16 ± 0.04	2.89 ± 0.08	0.01	-0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.01	0.00	1.96	2.03	1.94	1.44
H4H2357S	1.16 ± 0.03	2.82 ± 0.07	0.04	-0.01	0.12	0.05	0.10	0.00	0.00	0.08	0.01	1.80	2.00	1.92	1.35
H4H2355S	1.15 ± 0.03	2.73 ± 0.07	0.19	0.05	0.20	0.16	0.31	0.10	0.00	0.18	0.09	1.35	1.87	1.92	1.44
H4H2296S	1.29 ± 0.13	2.88 ± 0.23	0.07	0.03	0.05	0.04	0.18	0.06	0.02	0.00	0.06	1.76	2.01	1.87	1.27
H4H2243N2	1.10 ± 0.08	2.42 ± 0.17	0.00	0.15	0.39	0.23	0.52	0.32	0.24	0.33	0.00	0.22	0.46	1.70	1.20
H4H2212N	1.08 ± 0.08	2.32 ± 0.15	2.14	2.17	2.18	2.12	2.59	2.38	2.05	2.36	0.16	0.00	0.08	1.76	1.36
H4H2362S	1.15 ± 0.03	2.74 ± 0.16	2.18	2.08	2.31	2.25	2.83	2.46	2.12	2.35	0.13	0.05	0.00	0.15	1.43
H4H2292S	1.17 ± 0.04	2.82 ± 0.08	2.24	2.16	2.31	2.31	2.81	2.43	2.07	2.36	1.31	1.78	0.34	0.00	1.53
H4H2350P	1.03 ± 0.07	3.31 ± 0.15	1.98	1.80	2.05	2.00	2.57	2.23	1.77	2.10	1.72	1.57	2.06	1.74	0.00