

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037416**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.03.25

(21) Номер заявки
201690469

(22) Дата подачи заявки
2014.09.18

(51) Int. Cl. **C07K 14/705** (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

(54) СЛИТЫЙ БЕЛОК ДЛЯ ОБЕЗБОЛИВАНИЯ И/ИЛИ ПРОФИЛАКТИКИ ВОЗНИКНОВЕНИЯ БОЛИ

(31) **1316592.3**

(32) **2013.09.18**

(33) **GB**

(43) **2016.12.30**

(86) **PCT/GB2014/052833**

(87) **WO 2015/040398 2015.03.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЛЕВИСЕПТ ЛТД (GB)

(72) Изобретатель:
Уэстбрук Саймон (GB)

(74) Представитель:
Соболев М.М. (RU)

(56) **US-A1-2009232808**
WO-A1-2012101664

GUO JINGJING ET AL.: "proNGF inhibits proliferation and oligodendrogenesis of postnatal hippocampal neural stem/progenitor cells through p75NTR in vitro", STEM CELL RESEARCH, vol. 11, no. 2, 21 May 2013 (2013-05-21), pages 874-887, XP028686601, ISSN: 1873-5061, DOI: 10.1016/J.SCR.2013.05.004, abstract

CN-A-102233128

MARCAI VILAR ET AL.: "Activation of the p75 Neurotrophin Receptor through Conformational Rearrangement of Disulphide-Linked Receptor Dimers", NEURON, vol. 62, no. 1, 1 April 2009 (2009-04-01), pages 72-83, XP055157667, ISSN: 0896-6273, DOI: 10.1016/j.neuron.2009.02.020, cited in the application, the whole document
WO-A1-2013136078

(57) Изобретение относится к области медицины и касается слитого белка для обезболивания и/или профилактики возникновения боли, содержащего фрагмент (a), включающий нейротрофин-связывающий белок, представляющий собой внеклеточный домен нейротрофинового рецептора p75NTR; фрагмент (b), включающий Fc-область иммуноглобулина, причем фрагмент (a) и фрагмент (b) соединены линкером, включающим пептид формулы Gx, где x равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Изобретение также касается соответствующих молекулы нуклеиновой кислоты, реплицируемого вектора экспрессии, клетки-хозяина, фармацевтической композиции, набора и способа обезболивания и/или профилактики возникновения боли.

B1**037416****037416 B1**

Предпосылки к созданию изобретения

Вещества, именуемые нейротрофинами - фактор роста нервов ("нейротрофический фактор роста", или NGF), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), нейротрофин 3 (NT-3), а также нейротрофин 4/5 (NT-4/5), - оказывают влияние при посредничестве четырех рецепторов: низкоаффинного рецептора нейротрофинов p75 (p75NTR), а также семейства высокоаффинных тирозиновых рецепторов киназы (TrkA, TrkB, TrkC). Низкоаффинный рецептор нейротрофинов p75NTR связывает все четыре нейротрофина и активируется ими; имеются опубликованные данные в пользу того, что активность этого рецептора не зависит от других рецепторов. Вместе с тем активация семейства рецепторов Trk отличается большей селективностью - имеется в виду, что NGF является селективным лигандом для рецептора TrkA, BDNF - для рецептора TrkB и NT-3, 4/5 - для рецептора TrkC. Кроме того, имеются опубликованные данные в пользу того, что при совместной экспрессии белков p75NTR и Trk они образуют комплексы, изменяющие тип передачи сигнала для обоих рецепторов (Huang and Reichardt, 2003, *Annu Rev Biochem.* 72:609-42). Суть в том, что было высказано предположение, будто рецептор p75NTR способствует повышению селективности каждого из нейротрофинов по отношению к соответствующему рецептору семейства Trk.

Рецептор p75NTR принадлежит к надсемейству рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR-SF) и был первым членом этого надсемейства, характеристики которого удалось определить полностью. Надсемейство, для которого перечень кодирующих генов у человека насчитывает около 30 генов, определяется по наличию лигандсвязывающих областей (доменов), состоящих из однократно или несколько раз (как правило, четыре раза) повторяющихся участков (последовательностей из 40 аминокислот, обогащенных цистеином, или CRD). Указанная особенность впервые была выявлена у рецептора p75NTR (Johnson et al., 1986, *Cell*, 47:545-554; Radeke et al., 1987, *Nature*, 325:593-597). В противоположность этому, внутриклеточные домены всех рецепторов надсемейства TNFR-SF не несут признаков такого повторения генетических последовательностей. Отсюда следует, что механизмы передачи сигнала с участием белков TNFR-SF существенно различаются.

Одна из необычных структурных особенностей рецептора p75NTR - это существование димера p75NTR, связанного дисульфидным мостиком, который образован с участием цистеиновых фрагментов в пределах трансмембранного домена. Такая связь через дисульфидный мостик необходима для эффективной передачи сигнала рецептором p75NTR в зависимости от природы нейротрофина и играет важную роль в формировании как внутриклеточного, так и внеклеточного доменов (Vilar et al., 2009, *Neuron*, 62:72-83). С физиологической точки зрения нейротрофины существуют в виде ассоциированных димеров, связанных нековалентными связями (Bothwell and Shooter, 1977, *J. Biol. Chem.* 252(23):8532-6), с периодом полураспределения около 5 мин (Tria et al., 1994, *Exp. Neurol.* 127(2):178-83). Нейротрофин-зависимая активация рецептора p75NTR включает ассоциацию димера нейротрофина с участками CRD 2-4 двух внеклеточных доменов димера p75NTR (He and Garcia, 2004, *Science*, 304:870-875). Результаты недавних исследований свидетельствуют в пользу модели, в рамках которой связывание нейротрофина вызывает сближение двух внеклеточных доменов димера p75NTR; в связи с этим внутриклеточные домены димера p75NTR вынуждены расходиться, смещаясь по типу тигельных щипцов, две половинки которых соединены в месте расположения дисульфидного мостика, и обеспечивая возможность связывания внутриклеточных доменов с адапторными белками NRIF и TRAF6, участвующими в передаче сигнала (Vilar et al., 2009, *J. Cell Sci.* 122:3351-3357, Vilar et al., 2009, *Neuron*, 62:72-83). Дисульфидные мостики внутри трансмембранных доменов (наподобие тех, что имеются в рецепторе p75NTR), ранее не были описаны ни в рецепторах-представителях надсемейства TNFR-SF, ни каком-либо ином из мембранных белков.

Рецептор p75NTR подвергается последовательному протеолитическому расщеплению действием α -секретазы, γ -секретазы, а также матричных металлопротеаз (MMP), при этом внутриклеточный домен (ICD) высвобождается в цитоплазму наподобие того, как это происходит при передаче сигнала с участием Notch и белка-предшественника β -амилоида (Jung et al., 2003, *J. Biol. Chem.* 278:42161-42169; Kanning et al., 2003, *J. Neurosci.* 23:5425-5436). Высвобождение в цитоплазму ICD рецептора p75NTR ICD согласно такому механизму инициирует передачу сигнала при участии ассоциированного NRIF (Kenchappa et al., 2006, *Neuron*, 50:219-232). Роль внеклеточного домена рецептора p75NTR после протеолитического расщепления действием α -секретазы, γ -секретазы и MMP до сих пор не вполне ясна.

В публикациях отмечалось, что NGF и другие нейротрофины (BDNF, NT-3, NT-4/5) играют существенную роль в патологических состояниях, к примеру в развитии болевых ощущений при остеоартрите, панкреатите, ревматоидном артрите, псориазе и рассеянном склерозе (Watanabe et al., 2008, *J. Neurosci. Res.* 86(16):3566-74; Raychaudhuri et al., 2011, *Arthritis Rheum.* 63(11):3243-52; Barthel et al., 2009, *Arthritis Res Ther.* 11(3):R82; Truzzi et al., 2011, *Cell Death Differ.* 18:948-58; McDonald et al., 2011, *Curr. Med. Chem.* 18:234-44; Yamaoka et al., 2007, *J. Dermatol. Sci.* 46(1):41-51). Было показано, что избирательные антитела к какому-либо из нейротрофинов (NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5) существенно ослабляют болевые ощущения. Далее, было показано, что антитела, действие которых направлено на нейротрофиновые рецепторы p75NTR (Trk A, Trk B или Trk C), проявляют эффект в моделях развития болевых ощущений

(Orita S. et al., 2010, J. Orthop. Res. 28:1614-20; Svensson P. et al., 2010, Pain. 148:473-80; Iwakura et al., 2010, J. Hand Surg Am. 35:267-73; Cirilio et al., 2010, Cell Mol. Neurobiol. 30:51-62; Pezet et al., 2010, Pain. 90:113-25; Hayashi et al., 2011, J. Pain. 12:1059-68; Chu et al., 2011, Pain. 152:1832-7; Ueda et al., 2010, J. Pharmacol Sci.; 112:438-43; Ghilardi et al., 2010, Bone. 48:389-98; Fukui et al., 2010, J. Orthop Res. 2010; 28:279-83). Так, Фукуи с соавт. (Fukui et al., (2010)) в рамках модели развития болевых ощущений (механическая аллодиния после защемления седалищного нерва) продемонстрировали статистически значимый эффект по отношению к болевоспособным нервным окончаниям после воздействия антитела к p75NTR. По результатам данного исследования был сделан вывод, что под действием антитела, ингибирующего рецептор p75NTR, происходит ослабление экспрессии CGRP и p75NTR и, как результат, статистически значимое ослабление болевых ощущений.

Изобретение относится к рекомбинантному белку p75NTR - гибриду нейротрофин-связывающего белка (NBP) и Fc ((NBP)-Fc). Дается описание аффинности и кинетики этого соединения *in vivo*, а также эффективности купирования болевых ощущений на животной модели. Рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc находит применение при купировании болевых ощущений и в лечении других патологических состояний, имеющих отношение к нейротрофическому фактору - в частности, псориаза, экземы, ревматоидного артрита, цистита, эндометриоза и остеоартрита.

Краткое описание изобретения

Согласно первой задаче изобретения предлагается слитый белок для обезболивания и/или профилактики возникновения боли, содержащий

фрагмент (а), включающий нейротрофин-связывающий белок, представляющий собой внеклеточный домен нейротрофинового рецептора p75NTR;

фрагмент (б), включающий Fc-область иммуноглобулина, причем фрагмент (а) и фрагмент (б) соединены линкером, включающим пептид формулы G_x, где x равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В особо предпочтительном варианте фрагмент (а) представляет собой белок p75NTR человека. В другом особо предпочтительном варианте фрагмент (б) представляет собой фрагмент Fc-область иммуноглобулина человека.

Еще в одном предпочтительном варианте реализации изобретения слитый белок p75NTR(NBP)-Fc (предмет изобретения) включает аминокислотную последовательность, установленную в SEQ ID NO: 3, или образован такой последовательностью. В другом предпочтительном варианте реализации изобретения слитый белок p75NTR(NBP)-Fc (предмет изобретения) представляет собой аминокислотную последовательность, установленную в SEQ ID NO: 15.

В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения слитый белок p75NTR(NBP)-Fc (предмет изобретения) связывается с любым из фрагментов NGF, BDNF, NT3 или NT4/5 с относительной силой связывания ("аффинностью") (K_d) от (приблизительно) 0,01 до (приблизительно) 50 нМ (по данным резонанса поверхностных плазмонов при 20°C).

Согласно второй задаче изобретения предлагается слитый белок p75NTR(NBP)-Fc, описание которого соответствует любой другой задаче изобретения, предназначенный для обезболивания и/или профилактики возникновения боли.

Согласно третьей задаче изобретения предлагается молекулярная форма нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок p75NTR(NBP)-Fc (предмет изобретения) согласно первой или второй задаче изобретения, при этом возможно, но необязательно кодирование сигнальной аминокислотной последовательности.

Согласно четвертой задаче изобретения предлагается реплицируемый вектор экспрессии для трансфицирования клетки, возможно, но необязательно клетки млекопитающих, при этом вектор представляет собой молекулярную форму нуклеиновой кислоты согласно третьей задаче изобретения.

В предпочтительном варианте реализации изобретения реплицируемый вектор экспрессии представляет собой вирусный вектор.

Согласно пятой задаче изобретения предлагается клетка-хозяин, внутри которой размещается молекулярная форма нуклеиновой кислоты согласно третьей задаче изобретения.

Согласно шестой задаче изобретения молекулярная форма нуклеиновой кислоты согласно третьей задаче изобретения или вектор согласно четвертой задаче изобретения предназначены для обезболивания и/или профилактики возникновения боли.

Термины "боль" или "болевые ощущения" включают, без ограничения, следующие виды боли: острая боль; хроническая боль; боль от воспаления; ноцицептивная боль; невропатическая боль; повышенная болевая чувствительность (гипералгезия); аллодиния; центральная боль; боль, связанная с онкологическим заболеванием; послеоперационная боль; боль внутренних органов; костно-мышечная боль; сердечная или сосудистая боль; головная боль, в том числе мигрень; ротолицевая боль, в том числе зубная боль; боль в спине.

Термин "обезболивание" включает, без ограничения, следующие приемы: профилактика, смягчение, купирование, снижение частоты приступов либо замедление развития или нарастания боли и/или болевых ощущений.

Согласно седьмой задаче изобретения предлагается слитый белок p75NTR(NBP)-Fc согласно первой или второй задаче изобретения либо молекулярная форма нуклеиновой кислоты или вектор согласно третьей или четвертой задаче изобретения, где слитый белок p75NTR(NBP)-Fc, либо молекулярная форма нуклеиновой кислоты, либо вектор рассчитаны на использование отдельно, последовательно или одновременно со вторым фармакологически активным соединением.

Согласно восьмой задаче изобретения предлагается лекарственный препарат ("фармацевтическая композиция"), включающий(ая) слитый белок p75NTR(NBP)-Fc согласно любой задаче изобретения либо молекулярную форму нуклеиновой кислоты или вектор согласно любой задаче изобретения, а также фармакологически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество.

В предпочтительном варианте реализации изобретения "фармацевтическая композиция" предназначена для использования с какой-либо одной (или несколькими) из перечисленных целей: для профилактики, смягчения, купирования, снижения частоты приступов либо замедления развития или нарастания боли и/или болевых ощущений.

Согласно еще одной задаче изобретения предлагается набор для обезболивания, либо для смягчения или снижения частоты приступов боли, либо замедления развития или нарастания боли, либо для профилактики возникновения боли у человека, включающий:

(а) слитый белок p75NTR-Fc по любому из пп.1-6, либо молекулу нуклеиновой кислоты по п.8, либо вектор по любому из пп.9 или 10, либо фармацевтическую композицию по п.17; и

(б) инструкцию по применению эффективного количества указанного слитого белка p75NTR-Fc, молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или фармацевтической композиции.

Согласно еще одной задаче изобретения предлагается способ обезболивания и/или профилактики возникновения боли и/или болевых ощущений у индивидов, предусматривающий назначение индивидам в терапевтической дозе слитого белка p75NTR(NBP)-Fc согласно любой задаче изобретения, либо молекулярной формы нуклеиновой кислоты или вектора согласно любой задаче изобретения, как необязательный вариант, в сочетании с фармакологически приемлемым носителем, либо назначение "фармацевтической композиции" согласно восьмой задаче изобретения.

Описание чертежей

Фиг. 1. Аминокислотная последовательность рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc (предмета изобретения) (SEQ ID NO: 1). Жирным шрифтом выделены места расщепления действием α - и γ -секретазы; курсивом выделен фрагмент иммуноглобулина IgG1 Fc.

Фиг. 2. Продукт трансляции (SEQ ID NO: 2) аминокислотной последовательности, представленной на фиг. 4 (SEQ ID NO: 4). Показан участок от иницирующего до терминирующего кодона.

Фиг. 3. Аминокислотная последовательность рекомбинантного белка p75NTR(NBP) (предмета изобретения) в одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения (SEQ ID NO: 3). Курсивом выделен фрагмент иммуноглобулина IgG1 Fc. Подчеркиванием выделен участок последовательности, соответствующий линкеру между фрагментами p75NTR(NBP) и Fc.

Фиг. 4. Аминокислотная последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующей полному гену продукта трансляции, на участке клонирования от "сайта встраивания" 5' до "сайта встраивания" 3' (SEQ ID NO: 4)

Фиг. 5. Генетические варианты рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc: 1) p75_NTR - аминокислотная последовательность фрагмента p75-NTR (SEQ ID NO: 6); 2) рекомбинантный белок p75-NTR-Fc, имеющийся в продаже (SEQ ID NO: 7); 3) p75_Fc - рекомбинантный белок p75-NTR-Fc, имеющийся в продаже, у которого последовательность фрагмента Fc изменена на "С-домен" IgG1za (Lonza) (SEQ ID NO: 8); 4) p75_Fc_C222S - рекомбинантный белок p75-NTR-Fc, имеющийся в продаже, у которого последовательность фрагмента Fc изменена на "С-домен" Lonza IgG1za, а в дополнение к этому произведена замена цистеина на серин в положении 222 (SEQ ID NO: 9); 5) p75_Fc_G4x1 - вариант 1: предлагаемый рекомбинантный белок p75-NTR-Fc, у которого имеется линкер с четырьмя остатками глицина (SEQ ID NO: 10); 6) p75_Fc_G4Sx1 - вариант 2: предлагаемый рекомбинантный белок p75-NTR-Fc, у которого имеется один линкер с четырьмя остатками глицина и остатком серина (SEQ ID NO: 11); 7) p75_Fc_G4Sx2 - вариант 3: предлагаемый рекомбинантный белок p75-NTR-Fc, у которого имеются два линкера, каждый с четырьмя остатками глицина и остатком серина (SEQ ID NO: 12); 8) "С-домен" IgG1za (Lonza) (SEQ ID NO: 13).

В рамках сравнительного анализа первичной структуры используется схема форматирования, призванная выделить участки, где проявляется подобие между предполагаемыми рецепторами, Fc-сшитым рекомбинантным белком и "С-доменом" Fc, а именно: взятие в рамку используется для обозначения участков с идентичной последовательностью между изменчивой частью (белками) и рецептором p75-NTR; одинарное подчеркивание используется для обозначения участков с идентичной последовательностью между всей структурой Fc-сшитых рекомбинантных белков и "С-доменом" IgG1za Fc (Lonza); курсив используется для обозначения участков сшивки в месте соединения рецептора p75-NTR и "С-домена" Fc; двойное подчеркивание и выделение жирным используется для указания положения неидентичной последовательности вне области сшивки, в положении, эквивалентном 222 в родоначальном

рекомбинантном белке p75-NTR-Fc.

Фиг. 6. Иллюстрация того, как гибрид p75NTR-Fc существенно ослабляет болевые ощущения в рамках моделирования на грызунах остеоартрита (ОА), индуцированного моноиодатетом (МІА). *P<0,1; **P<0,05

Фиг. 7: Аминокислотная последовательность рекомбинантного белка p75NTR(NBP) (предмета изобретения) в одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения (SEQ ID NO: 15). Курсивом выделен фрагмент иммуноглобулина IgG1 Fc. Подчеркиванием выделен участок последовательности, соответствующий линкеру между фрагментами p75NTR(NBP) и Fc.

Подробное описание сущности изобретения

Согласно первой задаче изобретения предлагается рекомбинантный белок p75NTR - гибрид нейротрофин-связывающего белка (NBP) и Fc ((NBP)-Fc), включающий:

- (a) фрагмент, относящийся к p75NTR(NBP);
- (b) фрагмент, относящийся к иммуноглобулину Fc.

В предпочтительном варианте реализации изобретения фрагменты p75NTR(NBP) и Fc связаны линкером. В более предпочтительном варианте реализации изобретения линкер представляет собой белок формулы G_x, где x равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В особо предпочтительном варианте рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc (предмета изобретения) фрагмент p75NTR(NBP) представляет собой фрагмент p75NTR(NBP) человека. В другом особо предпочтительном варианте рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc (предмета изобретения) фрагмент Fc представляет собой фрагмент Fc человека.

Еще в одном предпочтительном варианте реализации изобретения рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc (предмет изобретения) представляет собой аминокислотную последовательность, представленную на схеме SEQ ID NO: 3, или образован такой последовательностью. В другом предпочтительном варианте реализации изобретения рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc (предмет изобретения) представляет собой аминокислотную последовательность, установленную в SEQ ID NO: 15.

В предпочтительном варианте реализации изобретения нейротрофин-связывающий белок p75NTR(NBP) пегилирован; в еще более предпочтительном варианте реализации изобретения он подвергнут гликозилированию.

В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc (предмет изобретения) связывается с любым из фрагментов или несколькими фрагментами NGF, BDNF, NT3 или NT4/5 с относительной силой связывания ("аффинностью") (K_d) от (приблизительно) 0,01 до (приблизительно) 50 нМ. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения аффинность (K_d) находится в диапазоне от (приблизительно) 0,01 до (приблизительно) какого-либо из перечисленных значений: 0,1, 0,2, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 нМ (найденно по данным количественного анализа связывания *in vitro* для NGF, BDNF, NT3 или NT4/5 согласно описанию в тексте настоящего документа, а в предпочтительном варианте реализации изобретения - по данным резонанса поверхностных плазмонов при 20°C). В некоторых других предпочтительных вариантах реализации изобретения аффинность (K_d) меньше или равна (приблизительно) какому-либо из перечисленных значений: 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 950 пМ или 1 нМ (найденно по данным количественного анализа связывания *in vitro* рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc с нейротрофинами согласно описанию в тексте настоящего документа, а в предпочтительном варианте реализации изобретения - по данным резонанса поверхностных плазмонов при 20°C). В одном из еще более предпочтительных вариантов реализации изобретения аффинность (K_d) равна (приблизительно) 0,3 или (приблизительно) 1 нМ (найденно по данным количественного анализа связывания *in vitro* рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc с нейротрофинами согласно описанию в тексте настоящего документа, а в предпочтительном варианте реализации изобретения - по данным резонанса поверхностных плазмонов при 20°C).

В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc (предмет изобретения) предназначен для использования при обезболивании и купировании болевых ощущений. Поскольку у авторов изобретения нет намерений ограничивать сущность изобретения какими-либо теоретическими соображениями, они полагают, что эффект от применения рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc при обезболивании и купировании болевых ощущений достигается благодаря влиянию на функциональную активность вышеупомянутых нейротрофинов (что определяется как опосредованное влияние или прямое регулирование (в сторону повышения или понижения) функциональной активности нейротрофинов) NGF, BDNF, NT3 или NT4/5, к примеру, на функциональную активность вышеупомянутых нейротрофинов, обусловленную их взаимодействием с соответствующими рецепторами.

В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc оказывает влияние на функциональную активность BDNF, оцениваемую количественно по любой из перечисленных методик: оценка роста или дифференцировки нейронов и синапсов, выживаемость и дифференцировка клеточной культуры нейронов, передача сигнала по каналу тирозинкиназы (Trk), стимуляция "почкования" аксонов *in vitro* либо *in vivo*.

В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc оказывает влияние на функциональную активность NGF, оцениваемую количественно по измерению силы связывания NGF с TrkA и активации TrkA (показано классическим количественным анализом выживаемости нейронов, см., например, Cowan et al. *Annu. Rev. Neurosci.* 2001;24:551-600).

В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc оказывает влияние на функциональную активность NT3, оцениваемую количественно по измерению силы связывания NT3 с эндогенной Trk и активации эндогенной Trk (показано фосфорилированием рецептора Trk, количественным анализом фосфорилирования митоген-активируемой протеинкиназы по гену-репортеру или количественным анализом выживаемости клеток и растяжения нейритов).

В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc оказывает влияние на функциональную активность NT4/5, оцениваемую количественно по измерению фосфорилирования и активации NT4/5 *in vitro* или *in vivo*, к примеру количественным анализом фосфорилирования основного белка миелина (myelin basic protein, или MBP) либо как альтернативный вариант количественным анализом ангиогенеза *in vivo* в трубках Matrigel по фактору роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, или VEGF) либо ангиогенеза, индуцированного основным фактором роста фибробластов.

В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc связывается с одним или несколькими нейротрофинами NGF, NT3, BDNF и/или NT4/5, как показано в работе He and Garcia (2001), *Science*, 301, p. 870-805.

В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc растворим в жидких средах, предпочтительно растворим в водном растворе, а наиболее предпочтительно растворим в биологических жидкостях, примерами которых служат сыворотка, кровь и плазма крови.

В контексте настоящего документа термин "Fc", или "иммуноглобулин Fc", или "Ig Fc" следует понимать как обозначающий концевой фрагмент "С-домена" полипептидной цепи иммуноглобулина, несущий карбоксильную группу, в предпочтительном варианте реализации изобретения концевой фрагмент "С-домена" "тяжелой цепи" иммуноглобулина, несущий концевую карбоксильную группу, или часть такого фрагмента. В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения в состав иммуноглобулина Fc входят 1) домен CH1, домен CH2 и домен CH3, как необязательный вариант - включающий область "тали" иммуноглобулина; 2) домен CH1 и домен CH2, как необязательный вариант - включающий область "тали" иммуноглобулина; 3) домен CH1 и домен CH3, как необязательный вариант - включающий область "тали" иммуноглобулина; 4) домен CH2 и домен CH3, как необязательный вариант - включающий область "тали" иммуноглобулина; 5) комбинацию двух или большего числа доменов, выбранных, без ограничения, из числа доменов CH1, CH2 и CH3, возможно, но необязательно - в сочетании с областью "тали" иммуноглобулина. В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения в состав иммуноглобулина Fc входят, по меньшей мере, область "тали" иммуноглобулина, домен CH2 и домен CH3, а как необязательный вариант - домен CH1. В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения иммуноглобулин Fc содержит следующие части или состоит из следующих частей: собственно иммуноглобулин Fc или фрагмент иммуноглобулина Fc, принадлежащий, без ограничения, к одному из изоформ IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, в более предпочтительном варианте - IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, sIgA, в еще более предпочтительном варианте - IgG1, IgG2 или IgG4 и в наиболее предпочтительном варианте - IgG1. В дополнение к этому иммуноглобулин Fc возможно, но необязательно содержит участки изменений (мутаций), а также делеций, замещения или химической трансформации аминокислотного остова, призванные свести к минимуму связывание комплемента или антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность, либо повышающие аффинность по отношению к рецептору Fc.

В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения иммуноглобулин Fc содержит следующие части или состоит из следующих частей: (a) домен CH2 или его часть, а также домен CH3 или его часть; (b) домен CH2 или его часть или (c) домен CH3 или его часть, где собственно иммуноглобулин Fc или фрагмент иммуноглобулина Fc принадлежит, без ограничения, к одному из изоформ IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, в более предпочтительном варианте IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, sIgA, в еще более предпочтительном варианте - IgG, IgG2 или IgG4 и в наиболее предпочтительном варианте - IgG1.

В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения иммуноглобулин Fc представляет собой концевой фрагмент "С-домена" тяжелой цепи иммуноглобулина, несущий концевую карбоксильную группу, или образован таким фрагментом и может включать домен(ы) CH2, и/или CH3, и/или CH4 или их части, каждый(ая) из которых принадлежит к одному из изоформ (для антител) IgG, IgA или IgD, либо домен(ы) CH2, и/или CH3, и/или CH4 или их части, каждый(ая) из которых принадлежит к одному из изоформ IgM или IgE. В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения иммуноглобулин Fc представляет собой фрагмент Fc или образован фрагментом Fc, содержащим в первую очередь домен CH3, а также малый участок домена CH2, наподобие структуры, которая может образоваться при ферментативном гидролизе иммуноглобулина действием пепсина. В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения иммуноглобулин Fc представляет собой полную область Fc или образован

такой областью Fc, которая, в свою очередь, содержит домены CH2 и CH3, дополнительно присоединенные к области "талии", представляющей собой короткое звено "тяжелой цепи", соединяющей домены CH1 и CH2 нативного иммуноглобулина, наподобие структуры, которая может образоваться при ферментативном гидролизе иммуноглобулина действием папаина. В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения область "талии" представляет собой собственно область "талии" или ее часть, производную от иммуноглобулина изотипа IgG, в предпочтительном варианте иммуноглобулина изотипа IgG человека; в более предпочтительном варианте область "талии" выбрана, без ограничения, из перечня изотипов IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, в более предпочтительном варианте IgG1 либо как альтернативный вариант представляет собой разновидность или аллельный вариант упомянутых ранее реализаций области "талии" в контексте настоящего изобретения. Область "талии" или часть области "талии" иммуноглобулина может располагаться у C- или N-конца фрагмента Fc, в предпочтительном варианте реализации изобретения у N-конца.

Согласно одному из предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения иммуноглобулин Fc предпочтительно содержит следующие части или состоит из следующих частей: собственно иммуноглобулин Fc или фрагмент иммуноглобулина Fc, содержащий, в свою очередь, один или несколько участков мутации аминокислотной цепи относительно последовательности "дикого" типа в пределах домена CH2, благодаря чему ослабляется эффекторная функция фрагмента Fc. В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения указанные мутации соответствуют переходу от A330, P331 к S330, S331 (нумерация аминокислот производится относительно последовательности IgG1 "дикого" типа, при этом домен расположен в пределах "С-домена" "тяжелой цепи" иммуноглобулина IgG1 человека [см. Eur. J. Immunol. (1999), 29:2613-2624]. В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения иммуноглобулин Fc гликозилирован и несет большой заряд при "физиологическом" значении pH, что способствует растворению p75NTR(NBP). Кроме того, фрагмент Fc дает возможность проводить идентификацию рецептора p75NTR(NBP) по методике твердофазного иммуноферментного анализа с антителами к Fc ELISA (например, с диагностической целью). Белок p75NTR(NBP) (предмет изобретения) в предпочтительном варианте реализации изобретения синтезируется в клетке, где протекает гликозилирование иммуноглобулина Fc (в предпочтительном варианте - по обычному месту гликозилирования).

В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения иммуноглобулин Fc представляет собой некоторую область иммуноглобулина Fc человека или образован этой областью.

Согласно изобретению рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc в предпочтительном варианте реализации изобретения проявляет биологические свойства, благоприятствующие повышению растворимости и/или устойчивости белка p75NTR(NBP) и/или увеличению периода полураспада белка p75NTR(NBP) в сыворотке крови. Повышение растворимости желательнее с точки зрения достижения максимальной биодоступности рецептора p75NTR(NBP) при его введении в организм; тем самым становится возможным точный расчет и поддержание оптимальной дозы p75NTR(NBP). Лучшая растворимость обладает тем преимуществом, что позволяет решить проблему агрегации (образование агрегатов является нежелательным, поскольку чревато появлением болезненных ощущений и возможным развитием воспалительного процесса при поступлении препарата *in vivo*). Преимущество более длительного периода полураспада белка в сыворотке крови состоит в том, что для достижения одного и того же или заданного терапевтического эффекта p75NTR(NBP) после введения можно довольствоваться меньшими концентрациями и реже вводить препарат в организм во время курса лечения. Более длительный период полураспада и повышенная устойчивость белка в крови или сыворотке крови имеют то преимущество, что делает возможным режим дозирования, при котором введение в организм производится реже и/или используются более низкие концентрации препарата и тем самым снижается потенциальная токсичность или вероятность побочных эффектов *in vivo*. В этом случае рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc проявляет более выраженный терапевтический эффект и/или большую устойчивость в кровеносной системе. Более низкие дозы или менее частое введение препарата, которое достигается в результате, благоприятны с точки зрения минимизации любых потенциальных проявлений токсичности или побочных эффектов, которые могут коррелировать с приемом препарата p75NTR(NBP). Кроме того, молекулярная масса рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc больше, чем у отдельно взятого p75NTR(NBP); этот факт имеет то преимущество, что при внутривенном введении препарата его молекула хорошо удерживается кровотоком, благодаря чему уменьшается риск проникновения вещества в ненадлежащее место, к примеру в центральную нервную систему, и такая молекулярная форма вещества как нельзя лучше подходит для поддержания концентрации препарата в тканях на заданном уровне.

В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc характеризуется лучшей растворимостью p75NTR(NBP), и/или повышенной устойчивостью p75NTR(NBP), и/или более выгодным периодом полураспада p75NTR(NBP) в составе гибрида, чем у отдельно взятого p75NTR(NBP). В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения лучшая растворимость - это растворимость в водном растворе, к примеру в воде, предпочтительно с добавками вспомогательных веществ (к примеру, буферных веществ и/или солей), в предпочтительном варианте при "физиологическом" pH, предпочтительно при pH5-8, более предпочтительно при pH7, либо

растворимость в биологической жидкости, примерами которой служат кровь и сыворотка крови. В предпочтительном варианте реализации изобретения повышенная устойчивость предполагает стабильную активность или структурную целостность белка р75NTR(NBP) по отношению к эффектам денатурации, окисления, фрагментации или агрегации в течение некоторого промежутка времени, на срок хранения или после заморозки и оттаивания. О структурной устойчивости можно судить по результатам стандартных количественных исследований денатурации, окисления, фрагментации или агрегации; оценка постоянства активности возможна по результатам измерения силы связывания или функциональных тестов, предлагаемых в тексте настоящего документа, а методы определения периода полураспада белка в сыворотке крови общеизвестны.

В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения рекомбинантный белок р75NTR(NBP)-Fc характеризуется высокой экспрессией в клетках-хозяевах млекопитающих, при этом самые разные клетки-хозяева продуцируют одну и ту же разновидность белка, эффективная очистка которой возможна методом аффинной хроматографии, к примеру, благодаря связыванию с белком *A Staphylococcus aureus*. В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения рекомбинантный белок р75NTR(NBP)-Fc способен димеризоваться, при этом димер предпочтительно характеризуется повышенной аффинностью к нейротрофинам NGF, BDNF, NT3 или NT4/5 в сравнении с мономерным белком р75NTR(NBP). Более тесное связывание обладает тем преимуществом, что обеспечивает более сильное действие и повышенную терапевтическую эффективность, если взять за отправную точку характеристики изолированной молекулы белка р75NTR(NBP) (к примеру, по результатам функционального анализа нейротрофинов, как предлагается в тексте настоящего документа). Более сильное действие обладает тем преимуществом, что дает возможность применять рекомбинантный белок р75NTR(NBP)-Fc меньшими дозами для достижения того же терапевтического эффекта, добиваясь тем самым снижения потенциальной токсичности или вероятности побочных эффектов *in vivo*.

В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения рекомбинантный белок р75NTR(NBP)-Fc (предмет изобретения) характеризуется периодом полураспада *in vivo*, приблизительно равным или превышающим любое из перечисленных значений: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208 или 210 ± 1 ч, а в более предпочтительном варианте реализации изобретения рекомбинантный белок р75NTR(NBP)-Fc (предмет изобретения) характеризуется периодом полураспада *in vivo*, приблизительно равным или превышающим 24 ч.

В следующем предпочтительном варианте реализации изобретения рекомбинантный белок р75NTR(NBP)-Fc (предмет изобретения) характеризуется периодом полураспада *in vitro*, приблизительно равным или превышающим любое из перечисленных значений: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208 или 210 ± 1 сутки, а в более предпочтительном варианте реализации изобретения рекомбинантный белок р75NTR(NBP)-Fc (предмет изобретения) характеризуется периодом полураспада *in vitro*, приблизительно равным или превышающим 6 суток. В предпочтительном варианте реализации изобретения устойчивость белка оценивают при pH, приблизительно равным "физиологическому" значению pH, в водном буферном растворе, предпочтительно при 20 или при 37°C.

Согласно предпочтительным вариантам реализации изобретения, рассмотренным выше, период полураспада белка *in vivo* предпочтительно относится к организму крысы или к организму человека, более предпочтительно к организму человека. В предпочтительном варианте реализации изобретения период полураспада белка находят по результатам измерения концентрации рекомбинантного белка р75NTR(NBP)-Fc (предмета изобретения) в сыворотке крови после введения его в организм (*in vivo*), к примеру, путем внутривенной или подкожной инъекции.

Белковый фрагмент р75NTR(NBP) и фрагмент иммуноглобулина Fc рекомбинантного белка р75NTR(NBP)-Fc могут быть связаны линкером. В предпочтительном варианте реализации изобретения линкер представляет собой совокупность из одной или большего числа аминокислот или образован этой совокупностью либо представляет собой полипептидную последовательность аминокислот или образован этой последовательностью, которая в предпочтительном варианте реализации изобретения насчитывает от (приблизительно) 1 до (приблизительно) 25 аминокислот: в одном из предпочтительных вариантов 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 аминокислот, в другом предпочтительном варианте (приблизительно) 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 аминокислоты, а в предпочтительном варианте реализации изобретения 13 аминокислот.

В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения линкер представляет собой полипептидную последовательность аминокислот либо образован этой последовательностью, у которой от-

сутствует какая-либо устойчивая вторичная структура, примерами которой являются альфа-спираль, бета-тяж, 3_{10} -спираль и пи-спираль, полипролиновая спираль и альфа-складка. В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения линкер представляет собой полипептидную последовательность аминокислот либо образован этой последовательностью, строение которой характеризуется наличием гибкой, либо динамически изменяемой, либо неструктурированной полипептидной цепи, к примеру гибкой петлеобразной структуры, статистического клубка или гибкого витка; подобные неструктурированные спирали нередко встречаются в виде линкеров, соединяющих участки вторичной структуры в больших белковых молекулах.

В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения линкер представляет собой полипептидную последовательность аминокислот либо образован этой последовательностью, которая характеризуется содержанием глицина, и/или аланина, и/или серина в составе белка p75NTR(NBP), приблизительно равным или превышающим 50%, в еще более предпочтительном варианте реализации изобретения содержанием глицина, и/или аланина, и/или серина в составе белка p75NTR(NBP), приблизительно равным или превышающим 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100%. В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения область сшивки представляет собой полипептидную последовательность аминокислот либо образована этой последовательностью, содержащей одновременно глицин и серин, при этом в предпочтительном варианте содержание глицина превышает содержание серина, а сама область сшивки представляет собой одну или несколько гибких линкеров или образована такими линкерами.

Поскольку у авторов изобретения нет намерений ограничивать сущность изобретения какими-либо теоретическими соображениями, они полагают, что свойство гибкости линкеров дает возможность преодолеть стерические затруднения, которые могут повлиять на способность рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc к связыванию нейротрофинов или на его биологическую активность по сравнению с отдельно взятым белком p75NTR(NBP), либо избежать таких стерических затруднений. А именно, в предпочтительном варианте реализации изобретения область сшивки допускает некоторую гибкость сочленения между фрагментом p75NTR(NBP) и фрагментом иммуноглобулина Fc и обеспечивает возможность сохранения или улучшения вышеупомянутых характеристик биологической активности рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc по сравнению со свободным (несвязанным) или нативным белком p75NTR(NBP) (по данным количественного анализа связывания с нейротрофинами согласно описанию в тексте настоящего документа).

В более предпочтительном варианте реализации изобретения линкер иммунологически инертен, т.е. не запускает механизм комплемент-опосредованного лизиса, не стимулирует антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и не вызывает активации микроглии или Т-лимфоцитов. В предпочтительном варианте реализации изобретения область сшивки редуцирована с таким расчетом, чтобы исключить один или несколько видов подобной активности.

В еще более предпочтительном варианте реализации изобретения линкер представляет собой полипептид либо образован этим полипептидом, для которого известно или предсказано по результатам структурного анализа или структурного прогнозирования, что он представляет собой гибкий, либо динамически изменяемый, либо неструктурированный полипептид, либо не имеет устойчивой вторичной структуры.

В наиболее предпочтительном варианте реализации изобретения линкер представляет собой белок формулы G_x , где x равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или образован таким белком.

Кроме того, в структуре рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc (предмета изобретения) может присутствовать участок протеолитического расщепления, возможно, но необязательно занимающий промежуточное положение между фрагментом p75NTR(NBP) и фрагментом иммуноглобулина Fc. Участок протеолитического расщепления может располагаться в пределах линкера или в месте сочленения линкера как с фрагментом p75NTR(NBP), так и/или с фрагментом иммуноглобулина Fc. Как необязательный вариант, по данному участку возможно расщепление рекомбинантного белка на фрагмент p75NTR(NBP) и фрагмент иммуноглобулина Fc перед тем, как готовить препарат и вводить его в организм в терапевтических целях.

Как альтернативный вариант рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc (предмет изобретения) может быть сконструирован с таким расчетом, чтобы удалить при этом участки протеолитического расщепления. В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения удаляются участки, где происходит расщепление действием альфа- и гамма-секретазы. В одном из особо предпочтительных вариантов реализации изобретения удаляется участок последовательности GSSQPVVTRGTTDNDIEGRMD (SEQ ID NO: 5).

Еще в одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения некоторые аминокислоты в структуре рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc могут быть заменены на другие с целью улучшения некоторых свойств, к примеру выхода при получении или растворимости. Один из особо предпочтительных вариантов реализации изобретения состоит в том, что остаток цистеина в положении 222 заменен на остаток серина благодаря чему, как было показано, снижается степень агрегации белка при его экспрессии в клетках яичника китайского хомячка (CHO/ЯКХ) в процессе производства белка.

В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения линкер и/или фрагмент иммуноглобулина Fc не сказывается или существенным образом не сказывается на перечисленных ниже свойствах фрагмента p75NTR(NBP):

(а) влияние на функциональную активность нейротрофинов (определяемое как опосредованное влияние или прямое регулирование (в сторону повышения или понижения) функциональной активности нейротрофинов) NGF, BDNF, NT3 или NT4/5;

(b) относительная сила связывания ("аффинность") по отношению к любому из нейротрофинов NGF, BDNF, NT3 или NT4/5, где аффинность связывания лежит в диапазоне от (приблизительно) 0,01 до (приблизительно) 50 нМ;

(с) способность к связыванию с каждым из нейротрофинов NGF, BDNF, NT3 или NT4/5, предпочтительно с любым из нейротрофинов человека NGF, NT3, BDNF и NT4/5.

Согласно еще одной задаче изобретения молекулярная форма нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc (предмет изобретения) согласно первой или второй задаче изобретения. В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения молекулярная форма нуклеиновой кислоты предназначена для использования при обезболивании.

Согласно одному из предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения молекулярная форма нуклеиновой кислоты может дополнительно включать участок, кодирующий сигнальную аминокислотную последовательность, в предпочтительном варианте сигнальную последовательность p75NTR, к примеру последовательность ДНК или РНК.

Согласно еще одной задаче изобретения предлагается реплицируемый вектор экспрессии для трансфицирования клетки, при этом вектор представляет собой молекулярную форму нуклеиновой кислоты согласно третьей задаче изобретения; в предпочтительном варианте вектор представляет собой вирусный вектор. В предпочтительном варианте реализации изобретения вектор предназначен для использования при обезболивании.

Далее, согласно предыдущим задачам изобретения предлагается способ экспрессирования молекулярной формы нуклеиновой кислоты или вектора (предмета изобретения) с целью производства или секреции рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc. В предпочтительном варианте реализации изобретения способ предусматривает введение молекулярной формы нуклеиновой кислоты или вектора внутрь клетки и экспрессирование нуклеиновой кислоты в клетке с целью производства или секреции рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc. В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения молекулярная форма нуклеиновой кислоты или вектор вводится внутрь клетки *in vitro* либо, как альтернативный вариант, *in vivo*. В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения экспрессирование рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc осуществляется *in vitro*, при этом возможно, но необязательно, выделение белка с последующей очисткой, а в качестве альтернативного варианта экспрессирование рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc предпочтительно осуществляется *in vivo*, при этом экспрессирование *in vivo*, по сути, предпочтительно относится к методам генной терапии. В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения вектор представляет собой реплицируемый вектор экспрессии, как возможный, но необязательный вариант - вектор, предназначенный для трансфицирования клеток млекопитающих, а еще в одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения вектор представляет собой вирусный вектор.

Согласно еще одной задаче изобретения предлагается клетка-хозяин, внутри которой размещается молекулярная форма нуклеиновой кислоты или вектор согласно третьей или четвертой задаче изобретения; в предпочтительном варианте реализации изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающих.

Согласно еще одной задаче изобретения, предлагается рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc для использования при обезболивании и купировании болевых ощущений, либо молекулярная форма нуклеиновой кислоты или вектор для использования при обезболивании и купировании болевых ощущений. Термины "боль" или "болевые ощущения" могут включать, без ограничения, следующие виды боли:

- (a) острая боль и/или самопроизвольная боль;
- (b) хроническая боль и/или не проходящая боль;
- (с) боль от воспаления, в том числе любая из таких разновидностей, как боль при артрите (артрогенная); боль, возникающая при остеоартрите или ревматоидном артрите, а также при воспалительных заболеваниях кишечника, псориазе и экземе;
- (d) ноцицептивная боль;
- (е) невропатическая боль, в том числе болезненная диабетическая нейропатия или боль, приписываемая постгерпетической невралгии;
- (f) повышенная болевая чувствительность (гипералгезия);
- (g) аллодиния;
- (h) центральная боль, боль при таламическом синдроме; боль, возникающая при рассеянном склерозе; боль, возникающая при травматическом поражении спинного мозга; боль при болезни Паркинсона или при эпилепсии;
- (i) боль, связанная с онкологическим заболеванием;

(j) послеоперационная боль;

(k) боль внутренних органов, в том числе боль, имеющая отношение к желудочно-кишечному тракту (ЖКТ), и боль, не имеющая отношения к ЖКТ; боль при нарушениях со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ); боль, возникающая при расстройстве функции кишечника (FBD); боль, возникающая при воспалительных заболеваниях кишечника (IBD); боль при дисменорее, боль в тазовой области, боль при цистите, интерстициальном цистите или панкреатите;

(l) костно-мышечная боль, боль в мышцах (миалгия), фибромиалгия; боли при следующих заболеваниях: воспаление позвоночника (спондилит); серонегативная артропатия (неревматоидного происхождения); фиброзит, дистрофинопатия, гликогенолиз, полимиозит (болезнь Вагнера), межмышечный абсцесс (пиомиозит);

(m) сердечная или сосудистая боль; боль при стенокардии, инфаркте миокарда, стенозе митрального клапана, перикардите, венозаболевании ("феномен Рейно"), склеродермии или костно-мышечная ишемия;

(n) головная боль, в том числе мигрень, мигрень с аурой, мигрень без ауры, приступообразная рецидивирующая головная боль, головная боль напряжения;

(o) ротолицевая боль, в том числе зубная боль, височно-челюстная боль, миофасциальный болевой синдром, болезненный звон в ушах (тиннитус);

(p) боль в спине, бурсит, менструальная боль, мигрень, реперкуссионная боль, невралгия тройничного нерва, повышенная болевая чувствительность; боль при травме позвоночника и/или перерождении спинного мозга или остром нарушении спинномозгового кровообращения.

Термин "обезболивание" включает, без ограничения, следующие приемы: профилактика, смягчение, купирование, снижение частоты приступов либо замедление развития или нарастания боли и/или болевых ощущений.

Согласно любой из задач изобретения предлагается рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc согласно первой или второй задаче изобретения или предпочтительным вариантам реализации изобретения либо молекулярная форма нуклеиновой кислоты или вектор согласно третьей или четвертой задаче изобретения, где рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc, либо молекулярная форма нуклеиновой кислоты, либо вектор рассчитаны на использование отдельно, последовательно или одновременно со вторым фармакологически активным соединением. В предпочтительном варианте реализации изобретения перечень вторых фармакологически активных соединений включает, без ограничения:

аналгетик ряда опиоидов, к примеру морфин, героин, гидроморфон, оксиморфон, леворфанол, леваллорфан, метадон, меперидин, фентанил, кокаин, кодеин, дигидрокодеин, оксикодон, гидрокодон, пропоксифен, налмефен, налорфин, налоксон, налтрексон, бупренорфин, буторфанол, налбуфин, пентазоцин;

нестероидное противовоспалительное средство (NSAID/НПВС), к примеру аспирин, диклофенак, дифлунисал, этодолак, фенбуфен, фенопрофен, флуфенисал, флурбипрофен, ибупрофен, индометацин, кетопрофен, кеторолак, меклофенамовая кислота, мефенамовая кислота, мелоксикам, набуметон, напроксен, нимесулид, нитрофлурбипрофен, олсалазин, оксапрозин, фенилбутазон, пироксикам, сульфасалазин, сулиндак, толметин, зомепирак;

седативное/болеутоляющее средство ряда барбитуратов, к примеру амобарбитал, апробарбитал, бутабарбитал, бутабитал, мефобарбитал, метарбитал, метогекситал, пентобарбитал, фенобарбитал, секобарбитал, талбутал, теамилал, тиопентал;

производное бензодиазепина, оказывающее седативное действие, к примеру хлордиазепоксид, хлоразепат, диазепам, флуразепам, лоразепам, оксазепам, темазепам, триазолам;

антагонист H_1 , оказывающий седативное действие, к примеру дифенгидрамин, пириламид, прометазин, хлорфенирамин, хлорциклизин;

иное седативное/болеутоляющее средство, к примеру глутетимид, мепробамат, метаквалон, дихлоралфеназон;

релаксант скелетной мускулатуры, к примеру баклофен, каризопродол, хлорзоксазон, циклобензаприн, метокарбамол, орфенадрин;

антагонист рецептора NMDA, к примеру декстрометорфан ((+)-3-метокси-N-метилморфинан) или его метаболит декстрорфан ((+)-3-гидрокси-N-метилморфинан), кетамин, мемантин, пирролохинолинхинон, цис-4-(фосфонометил)-2-пиперидинкарбоновая кислота, будипин, EN-3231 (MorphiDex® - комбинированный препарат, в рецептуру которого входят морфин и декстрометорфан), топирамат, нерамексан или перцинфотел, в том числе антагонист NR2B, к примеру ифенпродил, траксопродил, а также (-)-(R)-6-{2-[4-(3-фторфенил)-4-гидрокси-1-пиперидил]-1-гидроксиэтил}-3,4-дигидро-2(1H)-хинолин-он;

альфа-адреноблокатор или агонист, к примеру доксазозин, тамсулозин, клонидин, гуанфацин, дексметатомидин, модафинил, а также 4-амино-6,7-диметокси-2-(5-метан-сульфонамидо-1,2,3,4-тетрагидро-изохинолин-2-ил)-5-(2-пиридил) хиназолин;

трициклический антидепрессант, к примеру дезипрамин, имипрамин, амитриптилин, нортриптилин; противосудорожное средство (антиконвульсант), к примеру карбамазепин, ламотригин/ламотриджин, топирамат, валпроат;

антагонист тахикининовых рецепторов (NK) (в частности, один из антагонистов NK-3, NK-2 или

NK-1), к примеру (α R,9R)-7-[3,5-бис-(трифторметил)бензил]-8,9,10,11-тетрагидро-9-метил-5-(4-метилфенил)-7Н-[1,4]диазино[2,1-*g*][1,7]нафтиридин-6-13-дион (ТАК-637), 5-[(2R,3S)-2-[(1R)-1-[3,5-бис-(трифторметил)фенил]этокси-3-(4-фторфенил)-4-морфолил]метил]-1,2-дигидро-3Н-1,2,4-триазол-3-он (МК-869), апрепитант, ланепитант, дапитант, а также 3-[[2-метокси-5-(трифторметокси)фенил]-метиламино]-2-фенилпиперидин (2S,3S);

антагонист мускариновых рецепторов, к примеру оксибутинин, толтеродин, пропиверин, тропсий хлорид, дарифенацин, солифенацин, темиверин, ипратропий;

селективный ингибитор ЦОГ-2, к примеру цефекоксиб, рофекоксиб, парекоксиб, валдекоксиб, деракоксиб, эторикоксиб, люмиракоксиб;

аналгетик, являющийся производным анилина, в частности парацетамол;

нейролептическое/антипсихотическое средство, к примеру дроперидол, хлорпромазин, галоперидол, перфеназин, тиоридазин, мезоридазин, трифлуоперазин, флуфеназин, клозапин, оланзапин, риспериридон, ципразидон, кветиапин, сертиндол, арипипразол, sonapirazole (зонепипразол), blonanserin (блонансерин), илоперидон, пероспирон, раклоп्राид, зотепин, бифепрунокс, азенапин, луразидон, амисульприд, balaperidone (балаперидон), palindore (палиндор), eplivanserin (эпливансерин), osanetant (осанетант), rimonabant (римонабант), meclinetant (меклинертант), Miraxion®, а также sarizotan (саризотан);

агонист (к примеру, ресинифератоксин) или антагонист (к примеру, capsazepine (капсазепин)) ваниллоидных рецепторов;

бета-адреноблокатор или агонист, к примеру пропранолол;

местный анестетик, к примеру мексилетин;

кортикостероид, к примеру дексаметазон;

агонист или антагонист рецептора 5-HT- в частности агонист рецептора 5-HT_{1B/1T}, к примеру элетриптан, суматриптан, наратриптан, золмитриптан, ризатриптан;

антагонист рецептора 5-HT_{2A}, к примеру R(+)-альфа-(2,3-диметоксифенил)-1-[2-(4-фторфенилэтил)]-4-пиперидинметанол (MDL-100907);

аналгетик, взаимодействующий с никотиновым холинергическим рецептором, к примеру ispronidine (испрониклин) (ТС-1734), (Е)-N-метил-4-(3-пиридил)-3-бутен-1-амин (RJR-2403), (R)-5-(2-азетидилметокси)-2-хлорпиридин (ABT-594), а также никотин;

Tramadol® (трамадол);

ингибитор фосфодиэстеразы тип V (PDEV), к примеру 5-[2-этокси-5-(4-метил-1-пиперазилсульфонил)фенил]-1-метил-3-н-пропил-1,6-дигидро-7Н-пиразоло[4,3-*d*]пиримидин-7-он (силденафил), (6R,12aR)-2,3,6,7,12,12a-гексагидро-2-метил-6-(3,4-метилendioксифенил)пиразино[2',1':6,1]-пиридо[3,4-*b*]индол-1,4-дион (IC-351, или тадалафил), 2-[2-этокси-5-(4-этилпиперазин-1-ил-1-сульфонил)фенил]-5-метил-7-пропил-3Н-имидазо[5,1-*f*][1,2,4]триазин-4-он (варденафил), 5-(5-ацетил-2-бутокси-3-пиридил)-3-этил-2-(1-этил-3-азетидил)-2,6-дигидро-7Н-пиразоло[4,3-*d*]пиримидин-7-он, 5-(5-ацетил-2-пропокси-3-пиридил)-3-этил-2-(1-изопропил-3-азетидил)-2,6-дигидро-7Н-пиразоло[4,3-*d*]пиримидин-7-он, 5-[2-этокси-5-(4-этилпиперазин-1-ил-сульфонил)пиридин-3-ил]-3-этил-2-[2-метокси-этил]-2,6-дигидро-7Н-пиразоло[4,3-*d*]пиримидин-7-он, 4-[(3-хлор-4-метоксибензил)амино]-2-[(2S)-2-(гидроксиметил)пирролидин-1-ил]-N-(пиримидин-2-илметил)пиримидин-5-карбоксамид, 3-(1-метил-7-оксо-3-пропил-6,7-дигидро-1Н-пиразоло[4,3-*d*]пиримидин-5-ил)-N-[2-(1-метилпирролидин-2-ил)этил]-4-пропоксибензолсульфон-амид;

каннабиноид;

антагонист метаболитного рецептора глутамата подтип 1 (mGluR1);

ингибитор обратного захвата серотонина, к примеру сертралин, дезметилсертралин (деметилованный метаболит сертралина), флуоксетин, норфлуоксетин (деметилованный метаболит флуоксетина), флувоксамин, пароксетин, циталопрам, дезметилциталопрам (деметилованный метаболит циталопрама), эсциталопрам, d,l-фенфлурамин, фемоксетин, ифоксетин, cyanodothiepin (цианодотиепин), литоксетин, дапоксетин, нефазодон, церикламин, тразодон;

ингибитор обратного захвата норадреналина (норэпинефрина), к примеру мапротилин, лофепрамин, миртазапин, оксапротилин, фезоламин, томоксетин/атомоксетин, миансерин, бупропион, гидроксипропион (метаболит бупропиона), номифензин и виллоксазин (Vivalan®/вивалан), а в особенности селективный ингибитор обратного захвата норадреналина, к примеру reboxetine (ребоксетин), в частности (S,S)-ребоксетин;

ингибитор обратного захвата серотонина и норадреналина (двойного действия), к примеру венлафаксин, О-дезметилвенлафаксин (деметилованный метаболит венлафаксина), кломипрамин, дезметилкломипрамин (деметилованный метаболит кломипрамина), дулоксетин, милнаципран, имипрамин;

ингибитор индуцируемой NO-синтетазы (iNOS), к примеру S-[2-[(1-иминоэтил)амино]этил]-L-гомоцистеин, S-[2-[(1-иминоэтил)амино]этил]-4,4-диоксо-L-цистеин, S-[2-[(1-иминоэтил)амино]этил]-2-метил-L-цистеин, (2S,5Z)-2-амино-2-метил-7-[(1-иминоэтил)амино]-5-гептеновая кислота, 2-[[[(1R,3S)-3-амино-4-гидрокси-1-(5-тиазолил)бутил]тио]-5-хлор-3-пиридинкарбонитрил, 2-[[[(1R,3S)-3-амино-4-гидрокси-1-(5-тиазолил)бутил]тио]-4-хлорбензонитрил, (2S,4R)-2-амино-4-[[2-хлор-5-(трифторметил)-

фенил]тио]-5-тиазолобутанол, 2-[[[(1R,3S)-3-амино-4-гидрокси-1-(5-тиазолил)бутил]тио]-6-(трифторметил)-3-пиридинкарбонитрил, 2-[[[(1R,3S)-3-амино-4-гидрокси-1-(5-тиазолил)бутил]тио]-5-хлорбензонитрил, N-[4-[2-(3-хлорбензиламино)этил]фенил]тиофен-2-карбоксаимидин либо гуанидинэтилдисульфид;

ингибитор ацетилхолинэстеразы - к примеру, донепезил;

антагонист простагландина E₂ подтип 4 (EP4), к примеру N-[(2-[4-(2-этил-4,6-диметил-1H-имидазо[4,5-с]пиридин-1-ил)фенил]этил}амино)карбонил]-4-метилбензолсульфонамид, а также 4-[(15)-1-({[5-хлор-2-(3-фторфенокси)пиридин-3-ил]карбонил}амино)этил] бензойная кислота;

антагонист рецепторов лейкотриена B₄, к примеру 1-(3-дифенил-4-илметил-4-гидрокси-хроман-7-ил)циклопентанкарбоновая кислота (CP-105696), 5-[2-(2-карбоксиэтил)-3-[6-(4-метоксифенил)-5E-гексенил]оксифенокси]валериановая кислота (ONO-4057), а также DPC-11870;

ингибитор 5-липоксигеназы, к примеру зилейтон, 6-[(3-фтор-5-[4-метокси-3,4,5,6-тетрагидро-2H-пиран-4-ил])феноксиметил]-1-метил-2-хинолон (ZD-2138), а также 2,3,5-триметил-6-(3-пиридилметил), 1,4-бензохинон (CV-6504);

блокатор натриевых каналов, к примеру лидокаин;

блокатор серотониновых рецепторов 5-HT₃, к примеру ондансетрон,

а также фармакологически приемлемые соли и сольваты указанных соединений.

Согласно следующей задаче изобретения предлагается способ обезболивания, профилактики, смягчения, купирования, снижения частоты приступов либо замедления развития или нарастания боли и/или болевых ощущений у индивидов, предусматривающий назначение индивидам в терапевтической дозе рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc согласно первой или второй задаче изобретения или предпочтительным вариантам реализации изобретения, либо молекулярной формы нуклеиновой кислоты или вектора согласно третьей или четвертой задаче изобретения.

Настоящее изобретение применимо в практике как обычной медицины, так и ветеринарии. В предпочтительном варианте реализации изобретения индивидом считается особь млекопитающего, к примеру особь домашнего животного-спутника человека (лошадь, кошка, собака и т.д.), либо особь сельскохозяйственного животного (овца, корова, свинья и т.д.). В наиболее предпочтительном варианте реализации изобретения индивидом считается человеческая особь.

Согласно восьмой задаче изобретения предлагается лекарственный препарат ("фармацевтическая композиция") для использования с какой-либо одной (или несколькими) из перечисленных целей: для обезболивания, профилактики, смягчения, купирования, снижения частоты приступов либо замедления развития или нарастания боли, а также любых упомянутых ранее разновидностей боли и/или болевых ощущений, включающий(ая) рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc согласно первой или второй задаче изобретения или предпочтительным вариантам реализации изобретения, либо молекулярной формы нуклеиновой кислоты или вектора согласно третьей или четвертой задаче изобретения, а также фармакологически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество.

В предпочтительном варианте реализации изобретения рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc согласно первой или второй задаче изобретения или предпочтительным вариантам реализации изобретения, либо молекулярная форма нуклеиновой кислоты или вектор согласно третьей или четвертой задаче изобретения, либо "фармацевтическая композиция" согласно восьмой задаче изобретения готовится с расчетом на введение в организм, либо пригоден (на) для введения в организм следующими способами: перорально, сублингвально (под язык), трансбуккально (через щеку), наружно, ректально, через ингаляцию, трансдермально (чрескожно), подкожно, внутривенно, внутриартериально, внутримышечно, интракардиально (в полость сердца), внутрикостно, интрадермально (внутрикожно), интраперитонеально (внутрибрюшинно), трансмукозально (через слизистые), вагинально, интравитреально (через стекловидное тело), интраатрикулярно (внутрь сустава), перисуставно, локально (по месту) или на кожно.

В предпочтительном варианте реализации изобретения рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc согласно первой или второй задаче изобретения или предпочтительным вариантам реализации изобретения, либо молекулярная форма нуклеиновой кислоты или вектор согласно третьей или четвертой задаче изобретения, либо "фармацевтическая композиция" согласно восьмой задаче изобретения готовится с расчетом на введение в организм, либо пригоден(на) для введения в организм заблаговременно и/или во время и/или после начала приступа боли, либо рассчитан(а) на такое применение.

В одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc согласно первой или второй задаче изобретения или предпочтительным вариантам реализации изобретения, либо молекулярная форма нуклеиновой кислоты или вектор согласно третьей или четвертой задаче изобретения, либо "фармацевтическая композиция" согласно восьмой задаче изобретения рассчитан (а) на введение в организм, либо готовится с расчетом на введение в организм с периодичностью от 1 до 7 раз в неделю, еще в одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения с периодичностью от 1 до 4 раз в месяц, еще в одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения с периодичностью от 1 до 6 раз в полгода, а еще в одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения с периодичностью от 1 до 12 раз в год. В предпочтительном варианте реализации изобретения терапевтическое средство рассчитано на периферическое введение в организм либо готовится с

расчетом на периферическое введение в организм с указанной ниже периодичностью (без исключения): ежедневно; раз в два, три, четыре, пять или шесть дней; еженедельно; раз в две недели; раз в три недели; ежемесячно; раз в два месяца, раз в три месяца (ежеквартально), раз в четыре месяца, раз в пять месяцев, раз в шесть месяцев (раз в полгода), раз в семь месяцев, раз в восемь месяцев, раз в девять месяцев, раз в десять месяцев, раз в одиннадцать месяцев или раз в год (ежегодно).

Еще в одном из предпочтительных вариантов реализации изобретения рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc согласно первой или второй задаче изобретения или предпочтительным вариантам реализации изобретения, либо молекулярная форма нуклеиновой кислоты или вектор согласно третьей или четвертой задаче изобретения, либо "фармацевтическая композиция" согласно восьмой задаче изобретения рассчитан (а) на периферическое введение в организм либо готовится с расчетом на периферическое введение в организм одним или несколькими следующими способами (без исключения): перорально, сублингвально (под язык), трансбуккально (через щеку), наружно, ректально, через ингаляцию, трансдермально (чрескожно), подкожно, внутривенно, внутриартериально, внутримышечно, интракардиально (в полость сердца), внутрикостно, интрадермально (внутрикожно), интраперитонеально (внутрибрюшинно), трансмукозально (через слизистые), вагинально, интравитреально (через стекловидное тело), интраатрикулярно (внутрь сустава), перисуставно или локально (по месту).

В предпочтительном варианте реализации изобретения рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc согласно первой или второй задаче изобретения или предпочтительным вариантам реализации изобретения, либо молекулярная форма нуклеиновой кислоты или вектор согласно третьей или четвертой задаче изобретения, либо "фармацевтическая композиция" согласно восьмой задаче изобретения рассчитан (а) на введение в организм либо готовится с расчетом на введение в организм в концентрации от (приблизительно) 0,05 до (приблизительно) 200 мг/мл, в более предпочтительном варианте реализации изобретения в одной из концентраций (мг/мл, приблизительно): 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70; 75; 80; 85; 90; 95; 100; 110; 120; 130; 140; 150; 160; 170; 180; 190; 200 мг/мл с относительной погрешностью (приблизительно $\pm 10\%$), а в наиболее предпочтительном варианте реализации изобретения в концентрации (приблизительно) 3 мг/мл при использовании в ветеринарии и (приблизительно) 0,1 мг/мл при использовании в медицине.

В предпочтительном варианте реализации изобретения рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc согласно первой или второй задаче изобретения или предпочтительным вариантам реализации изобретения, либо молекулярная форма нуклеиновой кислоты или вектор согласно третьей или четвертой задаче изобретения, либо "фармацевтическая композиция" согласно восьмой задаче изобретения рассчитан (а) на введение в организм либо готовится с расчетом на введение в организм в удельной дозе от (приблизительно) 0,1 до (приблизительно) 200 мг/кг массы тела, в более предпочтительном варианте реализации изобретения в одной из удельных доз (мг/кг массы тела, приблизительно): 0,5; 1; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70; 75; 80; 85; 90; 95; 100; 110; 120; 130; 140; 150; 160; 170; 180; 190; 200 мг/кг массы тела с относительной погрешностью (приблизительно $\pm 10\%$), а в наиболее предпочтительном варианте реализации изобретения - в удельной дозе (приблизительно) 10 мг/кг массы тела при использовании в ветеринарии и (приблизительно) 0,3 мг/кг массы тела при использовании в медицине.

Согласно девятой задаче изобретения предлагается аптечка, укомплектованная следующими позициями:

(а) рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc согласно первой или второй задаче изобретения или предпочтительным вариантам реализации изобретения, либо молекулярная форма нуклеиновой кислоты или вектор согласно третьей или четвертой задаче изобретения, либо "фармацевтическая композиция" согласно восьмой задаче изобретения;

(б) инструкции по применению действенного количества указанного рекомбинантного белка, молекулярной формы нуклеиновой кислоты, вектора или "фармацевтической композиции" в медицинской практике при лечении индивидов с какой-либо одной (или несколькими) из перечисленных целей: для профилактики боли и/или болевых ощущений, либо для обезболивания, либо для смягчения, купирования, снижения частоты приступов, либо замедления развития или нарастания боли и/или болевых ощущений.

Аптечка может быть укомплектована одним или несколькими контейнерами, содержащими рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc, молекулярную форму нуклеиновой кислоты, вектор или "фармацевтическую композицию" согласно описанию настоящего изобретения, а также инструкции по применению, согласно любым методикам и областям применения настоящего изобретения. Кроме того, к аптечке могут прилагаться рекомендации по подбору индивида для предполагаемого лечения на основе таких критериев, как наличие боли или болевых ощущений либо вероятность их развития. В инструкциях по медицинскому применению "фармацевтической композиции" могут содержаться сведения о выборе дозы, режиме приема и способах введения препарата в организм для того или иного курса лечения.

Согласно еще одной задаче изобретения предлагается рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc согласно первой или второй задаче изобретения или предпочтительным вариантам реализации изобретения, либо молекулярная форма нуклеиновой кислоты или вектор согласно третьей или четвертой задаче

изобретения, либо "фармацевтическая композиция" согласно восьмой задаче изобретения для использования с какой-либо одной (или несколькими) из перечисленных целей: для профилактики и/или лечения, либо для смягчения, купирования, снижения частоты приступов, либо замедления развития или нарастания любого (одного или нескольких) из заболеваний или признаков заболеваний, так или иначе связанных с любым (одним или несколькими) нейротрофинами NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5.

NGF (Nerve Growth Factor - фактор роста нервов) связывается по меньшей мере с двумя классами рецепторов: p75NTR и TrkA, где TrkA - рецептор трансмембранной тирозинкиназы, участвующей в процессах роста, ветвления и растяжения аксонов. Перечень заболеваний и их признаков, коррелирующих с активностью NGF, хорошо известен. NGF экспрессирован при воспалительных заболеваниях и болевых ощущениях, а его активность коррелирует с их развитием [аминокислотная последовательность белка NP_002497.2, NP_038637]. Кроме того, для NGF была показана важная роль в развитии многих сердечно-сосудистых заболеваний, в частности атеросклероза коронарных сосудов, а также ожирения, сахарного диабета 2-го типа и метаболического синдрома, а также рассеянного склероза. Для пониженного содержания в плазме крови NGF (а также BDNF) отмечалась корреляция с развитием острого коронарного синдрома и метаболических синдромов. Кроме того, NGF имеет отношение к различным психическим заболеваниям и расстройствам психики, примерами которых служат слабоумие, депрессия, шизофрения, аутизм, синдром Ретта, нервная анорексия, а также нейрогенная булимия; отмечено участие NGF в развитии болезни Альцгеймера и нейродегенеративных расстройств. Кроме того, показано, что NGF способен ускорять заживление ран; имеются свидетельства в пользу его благотворного влияния при лечении кожных язв и язв роговицы. На крысах обнаружен эффект торможения дистрофии нервных окончаний и стимулирования регенерации периферических нервов.

BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor - нейротрофический фактор головного мозга) - это нейротрофин, способствующий росту и выживаемости нейронов в ходе развития нервной системы [аминокислотная последовательность белка NP_001137277.1, NP_001041604]. BDNF связывается с рецепторами клеточной поверхности TrkB и p75NTR и, кроме того, опосредованно участвует в регуляции активности никотинового рецептора Альфа-7. Перечень заболеваний и их признаков, коррелирующих с активностью BDNF, хорошо известен. Для BDNF была показана важная роль в распространении болевых ощущений как в пределах нормы, так и выходящих за пределы нормы. в частности, на моделях развития острой боли, боли при воспалительном процессе и невропатической боли, в которых обнаружена значительная интенсификация синтеза BDNF; кроме того, показан повышенный уровень экспрессии BDNF на фоне хронической боли, а также при таких заболеваниях, как псориаз и экзема. И наоборот, пониженная экспрессия BDNF обнаружена при депрессии, шизофрении, синдроме навязчивых состояний, болезни Альцгеймера, хоре Хантингтона, синдроме Ретта и слабоумии, а также нервной анорексии и нейрогенной булимии.

Neurotrophin-4 (NT-4 - нейротрофин-4), известный также как нейротрофин-5 (NT-5), - это нейротрофический фактор, осуществляющий передачу сигнала главным образом через рецепторы p75NTR и TrkB и способствующий выживаемости периферических нейронов симпатической нервной системы. Пептидная цепь этого белка с полностью сформировавшейся структурой идентична у всех изученных млекопитающих, в том числе у человека, свиньи, мыши и крысы [аминокислотная последовательность белка NP_006170, NP_937833]. К синтезу NT-4 способны большинство нейронов ганглия заднего корешка (dorsal root ganglion, или DRG), а также нейроны, локализованные в пределах окологлозвоночного и предпозвоночного симпатических ганглиев, переднего и заднего рога серого вещества спинного мозга; экспрессия NT-4/5 выявлена во многих тканях, в том числе тканях предстательной железы, вилочковой железы, плаценты и в скелетных мышцах. Перечень заболеваний и их признаков, коррелирующих с активностью NT-4/5, хорошо известен. Имеется корреляция дефектов структуры NT4/5 с предрасположенностью к первичной открытоугольной глаукоме. Также показано, что нейротрофин 4 вносит определенный вклад в выживаемость злокачественных клеток при раке молочной железы и служит одной из мишеней, на которую направлено воздействие при подавлении роста опухоли. Известно, что NT-4/5 участвует в передаче сигнала по цепи распространения болевых ощущений, в частности при ноцицептивной боли. Повышенная экспрессия NT-4/5 наблюдается также при хронических воспалительных заболеваниях кожных покровов, например, при дерматите, экземе, очаговом пруриго ("почесухе") и атопическом дерматите. Пониженная экспрессия NT-4/5 отмечена при болезни Альцгеймера и хоре Хантингтона.

Neurotrophin-3 (NT-3 - нейротрофин-3) - это нейротрофин, в структурном отношении подобный бета-NGF, BDNF и NT-4, отвечающий за регуляцию выживаемости и дифференцировки нейронов у млекопитающих и поддержание в норме функций нервной системы у взрослых особей и, возможно, оказывающий влияние на развитие нейронов у плода в тех случаях, когда он экспрессирован в плаценте человека. Перечень заболеваний и их признаков, коррелирующих с активностью NT-3, хорошо известен. Так, у линии NTF3-дефицитных мышей, полученной направленной генной инженерией, обнаружены явно выраженные пороки движения конечностей. NT-3 осуществляет передачу сигнала через рецепторы Trk и способен способствовать росту и выживаемости нейронов и клеток нейроглии [аминокислотная последовательность белка NP_001096124.1, NP_032768]. Аминокислотная последовательность белка NT-3 идентична у человека, мыши и крысы. Известно, что NT-3 в сочетании с распознающим рецептором тирозинкиназой C

(TrkC) принимает участие в регуляции невропатической боли, ноцицептивной боли, а также в реализации механизма ноцицепции (болевого возбуждения нервных волокон) и проприорецепции (тактильного ощущения ориентации тела в пространстве), к примеру экспрессия NT-3 повышена в мелких клетках ганглия (DRG) у животных, страдающих расстройством нервной системы. Кроме того, экспрессия NT-3 коррелирует с такими нервными заболеваниями, как диабетическая полинейропатия, ВИЧ-обусловленная нейропатия, крупноволокнистая нейропатия вплоть до атрофии; помимо этого, NT-3 участвует в развитии гипералгезии (когда понижается порог неприятия болезненного раздражителя), аллодинии (когда легко переносимый раздражитель становится неприятным) и невынужденной боли (т.е. боли, не связанной с воздействием явных раздражителей); также известна его роль в опосредованной регуляции боли в мышцах.

Далее сущность изобретения иллюстрируется со ссылкой на примеры, которые даны исключительно для наглядности и не преследуют целей ограничивать предмет изобретения.

Примеры

Компьютерное (*in silico*) испытание иммуногенности аминокислотных последовательностей белка p75NTR-Fc.

Технология рекомбинантных ДНК нашла широкое применение в производстве широкого ассортимента биофармацевтических препаратов, в том числе и относящихся к новейшей категории многофункциональных рекомбинантных белков, оказывающих терапевтическое действие ("лечебных") и построенных на основе фрагмента Fc (fragment crystallisable = кристаллизующийся фрагмент) моноклональных антител (mAbs) (Huang, 2009, *Curr Opin. Biotechnol.*, 20(6), 692-9). Слияние (гибридизация) белка, оказывающего терапевтическое действие, с доменом Fc усиливает совокупный терапевтический эффект от применения биофармацевтического препарата в силу того, что удлиняется период полураспада молекулы, причем это достигается двояким образом. Во-первых, реализация метаболического цикла гибридизация Fc-fusion благодаря зависимости связывания с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) от pH уменьшает степень разрушения белка в эндосомах. Во-вторых, рост размера молекулы (как благодаря присоединению Fc-доменов, так и благодаря димеризации в целевой белок под влиянием Fc) способствует ограничению почечного клиренса препарата в отношении действующего начала.

Синтез рекомбинантных белков возможен путем непосредственного связывания двух или большего числа фрагментов. Тем не менее, при этом образующаяся молекула белка может приобретать нежелательные свойства, к примеру терять биологическую активность (Bai et al., 2005, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 7292-7296), неправильно укладываться в третичную структуру (Zhao et al., 2008, *Protein Exp. Purif.* 61, 73-77); возможно также снижение выхода белка при синтезе (Amet et al., 2009, *Pharm. Res.* 26, 523-528). Для устранения подобных нежелательных последствий между отдельными доменами можно вставлять соединительный олигопептидный мостик - "линкер"; но при этом важно правильно выбрать подходящий линкер, учитывая несколько факторов. Во-первых, линкер должен соответствовать общему назначению доменов в молекуле рекомбинантного белка. В отдельных случаях необходимо, чтобы домены могли оказывать действие независимо друг от друга, поэтому от линкера требуется гибкость. И наоборот, бывают случаи, когда домены должны располагаться компактно, тогда линкер должен быть жестким. Во-вторых, линкер не должен придавать каких-либо нежелательных функциональных характеристик рекомбинантному белку (что возможно при наличии посттрансляционной модификации (ПТМ)). И наконец, следует учитывать возможную иммуногенность (антигенность) как самого линкера, так и прилегающих к нему участков, - это тем более важно, что линкер может представлять собой продукт компьютерной генной инженерии ("de novo"), т.е. последовательность, не встречающуюся естественным образом в организме человека.

Большинство "лечебных" белков в той или иной степени иммуногенны (Van Walle et al., 2007, *Expert Opin. Biol. Ther.* 7(3):405-18, Stas et al., 2009, *Immunogenicity assessment of antibody therapeutics* ("Оценка иммуногенных характеристик терапевтических средств на основе антител"). Cambridge University Press, Cambridge), и даже в составе так называемых "полностью человеческих антител" и препаратов на их основе могут присутствовать иммуногенные области (Harding et al., 2010, *MAbs.* 2, 256-265). Иммуногенность определяется как способность инициировать реакцию Т-хелпера (Th) в тот момент, когда специфический рецептор Т-клетки распознает пептид, связанный с молекулами человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) класса II, обнаруживаемые на поверхности антиген-представляющих клеток. Пептиды синтезируются из белков, поглощенных антиген-представляющей клеткой, в результате эндосомального расщепления. На поверхности клетки могут отображаться лишь пептиды, обладающие достаточной аффинностью для отнесения их к классу II HLA, и лишь они с определенной вероятностью могут инициировать реакцию Th.

Следовательно, потенциальная иммуногенность может быть снижена путем удаления из последовательности Th-эпитопов (антигенных детерминант) - данная процедура известна как "деиммунизация" (Chamberlain, 2002, *The Regulatory Review* 5, 4-9, Baker and Jones, 2007, *Curr. Opin Drug Discov. Devel.* 10, 219-227). Порядок действий такой, что вначале составляют прогноз, какие из пептидных цепочек в составе "лечебного" белка способны связываться с молекулами HLA класса II, после чего вводят заместители, устраняющие или ослабляющие аффинность молекул HLA класса II по отношению к пептидам.

Известен целый ряд генов HLA класса II, и почти все они отличаются высокой степенью полиморфизма. К тому же молекулы HLA класса II построены из альфа- и бета-цепей, каждая из которых берет начало от отдельного гена, в свою очередь обладающего полиморфизмом, что еще более умножает число возможных вариантов. При этом каждый индивид экспрессирует следующие гены: DRA/DRB, DQA/DQB и DPA/DPB, из которых только DRA не обладает полиморфизмом. В дополнение к этому, возможно присутствие DRB гена-"дублера" (DRB3, DRB4 или DRB5), продукт которого также ассоциирован с цепью DRA.

В процессе "деиммунизации" основной акцент делается на аллотипах DR, о которых известно, что их экспрессия значимо выше, чем у аллотилов DQ и DP (Laupreze et al., 1999, Hum. Immunol. 60, 591-597, Gansbacher and Zier, 1988, Cell Immunol. 117, 22-34, Berdoz et al., 1987, J. Immunol. 139, 1336-1341, Stunz et al., 1989, J. Immunol. 143, 3081-3086). При указании аллотилов DR обычно ссылаются на ген DRB (изменчивую часть), поскольку ген DRA остается неизменным - к примеру, это выглядит как DRB 1*01:01, где числовые обозначения аллельспецифичны.

Оценка весовых коэффициентов (вкладов) отдельных эпитопов основана, во-первых, на "критерии разнородности", т.е. числе аллотилов HLA, с которыми связывается тот или иной эпитоп; кроме того, оценивается статистический вес (частота повторения) аллотилов в пределах популяции и дается количественная оценка прочности связывания в комплекс гена HLA и пептида. Поскольку популяцию Т-клеток индивида выбирают с таким расчетом, чтобы исключить распознавание аутологичных пептидов, оказывается возможным провести скрининг белка в процессе его "деиммунизации" на наличие пептидов, соответствующих заранее известным аутологичным пептидам, которые, как правило, не должны индуцировать реакцию Th. Хотя в точности и не известно, какие из эндогенных белков поглощаются в процессе созревания Т-клеток и тем самым продуцируют аутологичные пептиды, среди них имеются антитела (Kirschmann et al., 1995, J. Immunol. 155, 5655-5662, Verreck et al., 1996, Immunogenetics, 43, 392-397, Harding et al., 2010, MAbs. 2, 256-265).

Конструирование рекомбинантного белка p75-NTR Fc.

Специфическим аллотипом фрагмента Fc рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc послужил вектор IgG pCon с обозначением IgGza (см. выше).

Конструирование рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc осуществлялось в несколько стадий.

Определение точной генно-инженерной конструкции последовательности p75-NTR, предназначенной для введения в структуру рекомбинантного белка после образования связи с Fc. Приняты во внимание следующие факторы.

Продукт слияния (The p75-NTR Fc) должен обладать способностью к связыванию нескольких разновидностей нейротрофинов, в том числе, по меньшей мере, NGF, BDNF, NT-3 и NT-4; структура рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc должна сохранять гибкость.

Во внеклеточном домене белка p75-NTR-Fc присутствуют нежелательные участки рестрикции действием альфа-секретазы (см. SEQ ID NO: 1). Эти участки необходимо удалить из последовательности, в противном случае по ним будет происходить расщепление с ослаблением биологической активности и ухудшением фармакокинетического профиля продукта слияния p75-Fc in vivo. В нативном продукте слияния p75-Fc (см. SEQ ID NO: 1) присутствовали участки рестрикции действием альфа-секретазы; в результате период полураспада белка был существенно короче, а биологическая активность (PK/PD) - существенно ниже, чем у структуры SEQ ID NO: 3 (см. ниже).

Был очерчен круг приемлемых линкеров, которые, согласно экспериментальным данным, могут использоваться для связывания внеклеточного домена p75-NTR с фрагментом Fc в рекомбинантный белок p75NTR(NBP)-Fc. Из выборки линкеров были исключены последовательности, которые с определенной вероятностью могут принимать участие в посттрансляционной модификации (ПТМ).

Методом компьютерного моделирования (in silico) были построены несколько вариантов структуры рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc с использованием ранее определенной генно-инженерной конструкции p75-NTR, подходящего фрагмента области Fc и нескольких разных последовательностей для возможных линкеров. Был предпринят ряд попыток и выполнен анализ конечного участка внеклеточного домена p75-NTR, ограниченного атомом С, а также области "тали" Fc и возможного линкера (см. табл. 1).

Скрининг вариантов с различными последовательностями для линкеров осуществляли при помощи базы данных EpiBase™, задавая в качестве модели поиска вероятные эпитопы Th.

С учетом прогнозируемого риска иммуногенности для рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc была предложена структура последовательности 3 (SEQ ID NO: 3).

Анализ последовательности рекомбинантного белка - продукта слияния с фрагментом Fc.

Аминокислотные последовательности 13 доступных на данный момент "лечебных" рекомбинантных белков - продуктов слияния с фрагментом Fc были получены с Интернет-сайта Перечня наименований лекарств, официально присвоенных соответствующими организациями и зарегистрированных в США (USAN) (<http://www.ama-assn.org/ama/pub/physician-resources/medical-science/>). По возможности выполнялась перепроверка последовательностей с привлечением других онлайн ресурсов, к примеру сайтов поиска патентной информации. Для Fc-слитых гибридных белков, имеющих в продаже в виде

образцов для исследовательских целей, структуры последовательностей были получены от независимых поставщиков через онлайн ресурсы.

Для идентификации предположительно родоначальной последовательности, из которой были выведены всевозможные рекомбинантные белки - продукты слияния с фрагментом Fc, было проведено выравнивание последовательностей Fc-слитых гибридных белков по транслированным белковым продуктам лабораторного назначения - векторам IgG pCon (Lonza) при помощи прикладного ПО MAFFT (Kato et al., 2002, *Nucleic Acids Res.* 30, 3059-3066). Затем выравненные последовательности Fc-слитых гибридных белков были усечены в том положении, где начинается гибридный участок Fc-слитого белка, идентичный последовательности иммуноглобулина IgG. Для установления точного места, с которого начинается последовательность IgG, был задействован критерий совпадения трех последовательных аминокислотных остатков IgG.

Далее был проведен поиск BLAST (Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25 3389-3402) по корпоративной копии базы данных Uniprot (The UniProt Consortium, UniProt release 2012-09 - Oct 3, 2012) с целью выявления последовательностей, наиболее близких по первичной структуре; за модель поиска принимали усеченные последовательности Fc-слитых гибридных белков за вычетом последовательностей IgG. После этого каждую последовательность Fc-слитого гибридного белка повторно выравнивали вручную как по результатам поиска по базе данных Uniprot (последовательности, наиболее близкие по первичной структуре), так и по максимально близким по структуре векторам IgG pCon (Lonza). Затем из структур были выделены области сочленения белка и фрагмента Fc и объединены в два множества: одно для 13 "лечебных" Fc-слитых гибридных белков и одно для Fc-слитых гибридных белков, имеющих в продаже. Данные этих двух множеств послужили в дальнейшем основой для построения областей сшивки.

После этого последовательности из множества Fc-слитых гибридных белков, имеющих в продаже, подвергали усечению со стороны конечного участка, ограниченного атомом N, в том месте, где было выявлено максимальное сходство с последовательностью вектора IgG pCon (Lonza). Далее производилась сортировка усеченных последовательностей и по ним генерировался неизбыточный (статистически однозначный) набор последовательностей.

Анализ иммуногенного профиля в системе Epibase™ Immunoprofiling.

Анализ иммуногенного профиля в системе Epibase™ Immunoprofiling выполняли на множестве вариантов структуры Fc-слитого рекомбинантного белка при помощи 85 аллотипов HLA класса II из совокупности Global set.

Сопоставление вариантов структуры Fc-слитого гибридного белка по критерию "риск проявления иммуногенности", используя одно лишь прогнозирование характеристик связывания с HLA, сопряжен со значительными трудностями. Это вызвано учетом ряда важных факторов.

Возможна ситуация, при которой структура пептида, пригодная для образования связи, будет упущена из виду при автоматической генерации структур и тем самым пептид не будет проявлен на поверхности антиген-представляющих клеток в виде комплекса пептид-HLA, доступного для Т-хелперов.

Возможна ситуация, при которой комплекс пептид-HLA не будет распознан Т-хелпером.

С учетом этих соображений в системе Epibase™ immunoprofiling можно проводить количественное сопоставление вариантов последовательностей тремя разными способами. Во-первых, можно провести сравнение по такому критерию: сколько значимых антигенных детерминант имеется в каждом из наборов аллотипов DRB1, DRB3/4/5, DQ и DP; при этом пептиды, связывающиеся с несколькими аллотипами из одной группы, учитываются как один пептид (кумулятивно). Такой подсчет эпитопов показывает, сколько уникальных эпитопов (унитопов) имеется в каждом из наборов, а количественное различие между вариантами соответствует полному удалению или, наоборот, добавлению потенциальных Th-эпитопов.

Поскольку многие эпитопы, и в особенности разнородные ("промискуитетные") эпитопы, связываются с множеством аллотипов, может так случиться, что внесение изменений в Th-унитоп внесет фактор неопределенности в фактическую картину уменьшения или роста вероятной иммуногенности при переходе от одного варианта к другому. Таким образом, целесообразно второе количественное сопоставление - на уровне каждого аллотипа HLA с подсчетом по всем Th-эпитопам; при этом для вариантов проводят подсчет числа связываемых белков на каждый аллотип и рассматривают результат в совокупности с серотипом и частотой появления в популяции, что дает возможность проводить сопоставление как на уровне серотипа, так и на уровне аллотипа. И в-третьих, можно рассчитать полуколичественную оценку, дающую представление о величине максимально возможного риска проявления иммуногенности, а именно:

Оценка риска = Σ (результат подсчета эпитопов x частота повторяемости).

Для каждого аллотипа, затронутого модификацией, вычисляется указанное произведение, исходя из прогнозируемого числа эпитопов, связывающих данный аллотип, и "аллельной частоты" аллотипа, затронутого модификацией. Затем производится суммирование произведений для всех затронутых аллотипов DRB1, DRB3/4/5, DQ и DP, охватываемых исследованием. Следует отметить, что индивидуальные

оценки риска, полученные для аллотипов, нельзя считать абсолютной мерой риска проявления иммуногенности, поскольку для получения подобной меры пришлось бы учесть все отобранные аллотипы HLA (DRB1, DRB3/4/5, DQ и DP).

В отношении последовательностей зародышевых антител человека (к примеру, выведенных на основе фрагментов Fc векторов IgG pCon (Lonza)) было принято допущение об отсутствии у них иммуногенности, поскольку они встречаются в депо циркулирующих антител человеческого организма, видны в иммунной системе и могут считаться аутологичными пептидами. Аналогичные соображения позволяют исключить изначальную иммуногенность у белка p75-NTR, поскольку белок экспрессирован естественным образом в организме человека. Таким образом, при подсчете и получении представленных ниже оценок риска проявления иммуногенности не учитывались значимые эпитопы, полученные из пептидов, выведенных из последовательностей зародышевых антител человека или из последовательностей белка p75-NTR.

Моделирование структуры.

Структурные модели предлагаемого рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc получали при помощи инструментов моделирования Lonza. Возможным вариантам структуры шаблонов для фрагментов p75-NTR и Fc давали полуколичественную оценку, классифицировали их по этому признаку и проводили отбор как по корпоративной базе антител, так и по базе данных белковых структур (Protein Data Bank, или PDB), руководствуясь критерием идентичности последовательностей; кроме того, учитывали количественные характеристики кристаллографических исследований структуры шаблона, к примеру разрешение (в единицах ангстрем (Å)).

Затем для структурных фрагментов шаблона и рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc проводили выравнивание последовательностей. Фрагменты шаблона и продукт выравнивания последовательностей вводили для дальнейшей работы в программу MODELLER (Sali et al., 1993, J. Mol. Biol. 234, 779-815). Интерфейс программы позволяет задавать конформационные ограничения, исходя при этом из набора шаблонов с выравненной структурой. Затем создается ансамбль структур, удовлетворяющих конформационным ограничениям; в качестве алгоритма оптимизации используется алгоритм сопряженных градиентов и моделированный отжиг. Из ансамбля выбирают одну или несколько структур, основываясь на оценке энергии системы, полученной из оценки структуры белка в баллах, и того, насколько она удовлетворяет конформационным ограничениям. Был проведен анализ модельных структур, в ходе которого отыскивали боковые цепи в тех местах, которые отличаются у целевой структуры и шаблонов, после чего применяли к ним специальный алгоритм оптимизации боковых цепей в сочетании с минимизацией энергии. Для большей наглядности использовали пакет инструментов визуализации и соответствующее ПО, что позволило получить полное представление о конформационной изменчивости вторичной структуры, а также о возможностях пространственной упаковки как центрального ядра, так и локальных периферических участков доменов, тем самым облегчая задачу отбора самых предпочтительных моделей.

Конструирование рекомбинантного белка p75-NTR-Fc.

Для рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc были сконструированы три варианта линкеров. Ограничения при конструировании были обусловлены попыткой сохранения гибкости областей p75-NTR в окончательной структуре Fc-слитых гибридных белков, а также стремлением избежать нежелательных участков рестрикции действием альфа- и гамма-секретазы. Из этих соображений внеклеточная последовательность p75-NTR была усечена в положении G237. Изначальная последовательность № 1 p75NTR-Fc (SEQ ID NO: 1) была усечена в положении A250. Во внеклеточном фрагменте p75NTR ранее были выявлены участки рестрикции действием альфа-секретазы в местах между положениями 241-242 и между положениями 244-245 (Zampieri et al., 2005, J. Biol. Chem. 280, 14563-71), а что касается участков рестрикции действием гамма-секретазы, то один из вероятных участков рестрикции предположительно находится вблизи положения 282 (на это указывает гомология последовательностей). Из отношения PK/PD для последовательности № 1 следует, что PK и биологическая активность в случае последовательности № 1 (SEQ ID NO: 1) существенно ниже, чем для последовательности № 3 (SEQ ID NO: 3). На основании этих экспериментальных данных был сделан вывод, что участки рестрикции действием альфа- и гамма-секретазы вносят заметный вклад в общее уменьшение активности *in vivo*.

Главные требования к линкерам, отбираемым для генетических вариантов, следующие: линкер должен обеспечивать гибкость второго фрагмента в составе Fc-слитого гибридного белка, по возможности не содержать заместителей, способных подвергаться посттрансляционной модификации (склонных к PTM), а риск проявления иммуногенности должен быть сведен к минимуму.

В наличии имеются два типа линкеров, обеспечивающих сшивку фрагмента p75NTR с "С-доменом" фрагмента Fc: "искусственные" линкеры, полученные эмпирическим путем, и линкеры, выделенные из природных белков. Линкеры, выделенные из природных белков, могут привносить участки, склонные к PTM, и по самой своей природе несут повышенный риск проявления иммуногенности. По этой причине предпочтение в дальнейшей работе отдавалось "искусственным" линкерам, полученным эмпирическим путем, которые дополнительно изучали, подразделяя на гибкие и жесткие. Ниже дан перечень последовательностей повторяющихся единиц для линкеров, полученных эмпирическим путем, с указанием того, к какой категории гибкости они относятся:

(G₄S)_X - гибкий,
 G_X - гибкий,
 A(EAAAK)_XA - жесткий (SEQ ID NO: 14),
 (PA)_X - жесткий.

Поскольку требование гибкости важно для обеспечения возможности связывания с множеством лигандов-нейротрофинов, в том числе, по меньшей мере, NGF, BDNF, NT3 и NT4 в окончательной структуре Fc-слитого гибридного белка, далее рассматривали лишь гибкие линкеры.

Исходя из этих соображений, были сконструированы три генетических варианта, при этом в одном из вариантов использован линкер на основе полиглицина, а в двух других вариантах использован линкер на основе тетраглицин-серина. Для всех генетических вариантов предполагалось, что положение G209 (для экспрессированного белка см. последовательность № 3 (SEQ ID NO: 3)) в изначальной последовательности p75-NTR одновременно является частью последовательности линкера. Дополнительно все варианты содержат мутацию с заменой цистеина на серию в положении, эквивалентном положению 222 в изначальной последовательности № 1 (SEQ ID NO: 1) рекомбинантного белка p75NTR(NBP)-Fc. Области сшивки для генетических вариантов представлены на фиг. 5.

Был проведен анализ вероятности проявления иммуногенности для каждого из генетических вариантов и других последовательностей, представленных на фиг. 5, в системе Epibase™. В табл. 1 даны прогностические оценки риска проявления иммуногенности для значимых эпитопов, способных оказывать влияние на 85 аллотипов HLA класса II из совокупности Global set. Помимо этого, в табл. 1 даны сведения о числе аллотипов, затронутых не столь значимыми эпитопами.

Таблица 1

Сводка рассчитанных оценок для значимых эпитопов

Молекулярное соединение	Оценка для значимого эпитопа				Менее значимые эпитопы
	DRB1	DRB3/4/5	DQ	DP	
Коммерческий	167,7	53,6	0	0	-
p75- Fc					
p75-Fc	55,1	24,2	0	0	-
p75-Fc (C222S)	75	24,2	0	0	-
p75-Fc (G4x1) (SEQ ID № 3)	0	0	0	0	
p75-Fc (G4Sx1)	2,4	0	0	0	
p75-Fc (G4Sx2)	2,4	0	42.2	0	3 сильных DQ,
SEQ ID № 15	0	0	0	0	-
Apollo p75NTR-Fc	167,7	53,6	0	0	-

На основании критериев минимальной предсказанной иммуногенности и отсутствия участков, склонных к PTM, наилучшими характеристиками из трех рассмотренных вариантов обладает Вариант 1 (p75_Fc_G4x1), который и был наработан для дальнейших испытаний *in vivo*.

Аффинность последовательности № 1 (SEQ ID NO: 1) и последовательности № 3 (SEQ ID NO: 3) белка p75NTR-Fc по отношению к NGF.

Подготовка сенсорного чипа Biacore проводилась в ходе эксперимента, при котором белок А через аминокислотную группу был иммобилизован на проточных кюветах 1 и 2. Измеряли кинетические характеристики связывания нейротрофического фактора роста (NGF) с иммобилизованным рекомбинантным белком p75-Fc с усреднением по одному циклу.

Связывающая способность ($R_{\max}$) поверхности сенсорного чипа зависит от того, на каком уровне иммобилизован лиганд (рекомбинантный белок). Для кинетических исследований оптимальным представляется $R_{\max}$ порядка 50-100 усл. ед. Расчет предпочтительного уровня иммобилизации возможен, если знать молекулярные массы белка p75-Fc и NGF:

$R_{\max} = (\text{молекулярная масса NGF} / \text{молекулярная масса рекомбинантного белка}) \times (\text{уровень иммобилизации}) \times (\text{отношение стехиометрических коэффициентов})$: $50 = (13500/102000) \times (\text{уровень иммобилизации}) \times 1$.

Отсюда следует, что требуемый уровень иммобилизации равен $(102000/13500) \times 50 = 378$ усл. ед. для последовательности № 1 (SEQ ID NO: 1) и последовательности № 3 (SEQ ID No. 3). Иммобилизацию белков p75NTR-Fc и NTR-Fc на сенсорном чипе с белком А проводили до начала измерения кинетических характеристик с усреднением по одному циклу.

В ручном режиме проводили иммобилизацию последовательности № 3 белка p75-Fc (SEQ ID NO: 3) на проточной кювете 2 сенсорного чипа с белком А до достижения требуемого уровня иммобилизации (около 380 усл. ед.). С этой целью в течение 22 с вводили раствор последовательности № 3 белка p75-Fc (SEQ ID NO: 3) концентрации 10 мкг/мл при объемном расходе 10 мкл/мин; получали рекомбинантный белок, иммобилизованный на поверхности белка А при уровне иммобилизации 418 усл. ед.

Для начала испытывали NGF в концентрациях 10, 5, 2,5, 1,25 и 0,625 нмоль/л. В ходе испытаний поддерживали K_D для рекомбинантного белка примерно в том же диапазоне, что и концентрации NGF.

Основные операции при измерении кинетических характеристик с усреднением по одному циклу перечислены ниже:

введение NGF в концентрации 0,625 нмоль/л в кювету с иммобилизованным белком p75-Fc в течение 120 с при объемном расходе 30 мкл/мин;

указанную операцию повторяли, вводя последовательно NGF в концентрациях 1,25 нмоль/л, затем 2,5, 5 и 10 нмоль/л;

после введения NGF в последней из указанных концентраций давали выдержку на диссоциацию 600 с, в течение которых через кювету над чипом пропускали в проточном режиме буферный раствор (HBS-EP).

По окончании цикла поверхность сенсорного чипа регенерировали, возвращая в исходное состояние, для чего в кювету в течение 60 с при объемном расходе 30 мкл/мин вводили раствор гидрохлорида глицина (10 ммоль/л).

После этого на поверхности сенсорного чипа проводили иммобилизацию последовательности № 1 белка p75-Fc (SEQ ID NO: 1), для чего в течение 38 с вводили раствор последовательности № 1 концентрации 10 мкг/мл при объемном расходе 10 мкл/мин. Таким способом достигали желаемого уровня иммобилизации 430 усл. ед. После этого повторяли весь цикл измерения кинетических характеристик, как указано выше.

Анализ данных.

Анализ данных по связыванию лигандов NGF с рекомбинантным белком проводили указанным ниже способом, используя прикладное ПО Biacore T200 vl:

Регистрировали данные по связыванию NGF с рекомбинантным белком, иммобилизованным в проточной кювете 2 (Fc=2) по сравнению с контрольным опытом, когда NGF вводили в проточную кювету 1, в которой находился контрольный сенсорный чип (Fc=1; только белок А).

Из данных опыта Fc=2 вычитали данные опыта Fc=1, получали данные для "чистого" связывания ("2-1").

Затем из всех данных для "чистого" связывания ("2-1") вычитали данные "2-1" контрольного опыта, при котором в кювету "вводили" NGF в концентрации 0 нмоль/л (т.е. промывали кювету одним буферным раствором HBS-EP); контрольный опыт нужен для учета любых возможных смещений "нулевой линии" в ходе опыта.

В заключение полученные данные аппроксимируют зависимостью в рамках модели связывания 1:1 и рассчитывают характеристики связывания, в том числе константы скорости ассоциации (k_a), диссоциации (k_d), а также аффинность (K_D).

Кинетические характеристики (усредненные по одному циклу) связывания NGF с иммобилизованными последовательностями № 1 (SEQ ID NO: 1) и № 3 (SEQ ID NO: 3) рекомбинантных белков p75-NTR-Fc.

Профили связывания лигандов NGF для двух рекомбинантных белков таковы: 400 пМ (SEQ ID NO: 1) и 360 пМ (SEQ ID NO: 3). Из этих результатов ясно, что последовательность № 3 (SEQ ID NO: 3) обладает большей аффинностью к NGF, чем последовательность № 1 (SEQ ID NO: 1).

Фармакокинетика *in vivo* последовательностей № 1 (SEQ ID NO: 1) и № 3 (SEQ ID NO: 3) рекомбинантных белков p75NTR-Fc.

В данном исследовании участвовали самцы крысы линии Вистар (поставщик - Charles River UK (Великобритания)) с массой тела при поступлении 120-150 г. При поступлении каждую особь осматривали, следя за тем, чтобы она выглядела внешне здоровой. После этого животных случайным образом рассаживали по клеткам (две особи на клетку) и каждой особи присваивали индивидуальный идентификационный номер, который наносили в виде татуировки на хвост животного. Далее животным давали время на акклиматизацию (не менее 10 суток), прежде чем начинать исследование в день, обозначенный как "день 0".

Как только крысы адаптировались к условиям содержания, их перемещали в накопитель (манипуляционный кабинет), где над ними проводили все манипуляции *in vivo*. Животных содержали при свете люминесцентных ламп, дающих 12-часовой цикл день/ночь (начало светового дня 07:00, конец 19:00),

согласно рекомендациям по содержанию домашних и лабораторных животных (см. Постановление Home Office Animals Act 1986 (для научных исследований)). Микроклимат в помещениях поддерживали при помощи кондиционеров, контролируя обычными способами температуру ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) и относительную влажность воздуха.

Крысам на протяжении всего исследования давали корм, подвергнутый ионизирующему облучению (поставщик - Scientific Animal Food and Engineering, Ожи (Франция)) и давали неограниченно пить (*ad libitum*) воду, прогретую в автоклаве. Для каждой партии корма проводили стандартный входной контроль состава и проверку на наличие посторонних примесей. Индивидуальные гнезда и клетки прогревали в автоклаве и каждую клетку проветривали отдельно, применяя систему IVC - клетки с индивидуальной вентиляцией.

Планом исследования было предусмотрено пять "терапевтических" групп, получавших активный препарат (см. табл. 2).

Таблица 2

Терапевтические группы подопытных животных

Номер особи крысы	Действующее вещество	Доза, мг/кг	Способ введения	Дни, когда вводился препарат	n
1-4	Послед. №1 p75-Fc	1	Подкожно	0, 5, 10	4
5-8	Послед. №2 p75-Fc	1	Подкожно	0, 5, 10	4

Забор крови производили из хвостовой вены крыс примерно в одно время суток (10:00-11:30 утра) в дни 2, 4, 6, 8, 12 и 15 и отделяли плазму крови.

Забор крови из хвостовой вены.

Крыс помещали в термостатируемый инкубатор с температурой внутри 38°C и выдерживали не менее 5 мин, но не дольше 10 мин, чтобы добиться вазодилатации хвостовой вены и облегчить кровопускание. Затем крыс помещали в специальную клетку для иммобилизации животных, накалывали хвостовую вену стерильной иглой калибра 23 G и давали крови стечь в микропробирку microvette CB300 (Sarstedt 16.444). У каждой крысы всякий раз забирали порцию крови от 100 до 300 мкл. Для повторного забора крови использовали другой участок вены; во время процедуры крысы вели себя спокойно. Крысы показали хорошую переносимость многократного забора крови: синяков и кровоподтеков не наблюдалось. Образцы крови использовались для получения плазмы.

Предсмертный забор крови из полости сердца.

Предсмертный забор крови осуществляли путем пункции сердца под анестезией изофлураном, пользуясь шприцем Terumo (1 мл) с иглой калибра 23 G. После этого животных усыпляли смещением шейных позвонков. Образцы крови использовались для получения плазмы.

Получение плазмы крови.

Микропробирку microvette с образцом крови из хвостовой вены осторожно переворачивали несколько раз для полного смешивания с антикоагулянтом (калиевая соль ЭДТА). Затем микропробирки помещали на лед и выдерживали некоторое время, после чего центрифугировали при $2700 \times G$ в течение 10 мин, при этом плазма отделялась и стекала в полипропиленовые пробирки (за один раз готовили две порции плазмы для каждой особи из крови, отобранной в одно время, кроме дня 2, когда готовили лишь одну порцию плазмы). Все образцы плазмы немедленно замораживали и хранили при температуре -80°C до тех пор, пока она не понадобится для дальнейшей работы.

Получение сыворотки крови.

Образцы крови, взятые из полости сердца в день 15, оставляли свертываться в полипропиленовых пробирках при комнатной температуре в течение 2-3 ч (не более!). После коагуляции образцы крови центрифугировали при $4000 \times G$ в течение 5 мин, при этом сыворотка отделялась и стекала в полипропиленовые пробирки (готовили две порции сыворотки для каждой особи). Образцы сыворотки немедленно замораживали и хранили при температуре -80°C .

Определение содержания белка p75NTR-Fc в плазме крови.

Концентрацию белка p75NTR-Fc в плазме крови определяли по видоизмененной методике иммуноферментного анализа (ELISA), адаптированной для определения белка p75NTR (системы R и D), а также вариант IgG1 Fc ELISA (системы R и D), поскольку способ дает возможность определять полную концентрацию p75NTR-Fc в плазме, не искаженную дополнительными факторами.

Определяли фармакокинетический профиль последовательности № 1 (SEQ ID NO: 1) и последовательности № 3 (SEQ ID NO: 3) рекомбинантного белка p75NTR-Fc.

	p75NTR-Fc, последовательность №1 (SEQ ID № 1)	p75NTR-Fc, последовательность №3 (SEQ ID № 3)
Лиганд	NGF BDNF NT3/4	NGF BDNF NT3/4
Молекулярная масса, кДа	90-120	90-100
Kd Biacore, пМ	390	360
T _{1/2} (модель на крысах), сут.	1,5	3,3
T _{max} (модель на крысах), сут.	0,5	3
Эффективная обезболивающая доза, мг/кг	10	1-3
Эффективная концентрация (C _{eff}), нмоль/л	10	2

Заключение.

В сравнении с последовательностью № 3 (SEQ ID NO: 3) удаление участков рестрикции действием альфа- и гамма-секретаз из последовательности № 1 (SEQ ID NO: 1) способствовало тому, что фармакокинетические показатели белка p75NTR-Fc существенно улучшились; то же самое относится и к эффективности обезболивания по результатам длительного лечения. Присутствие участков рестрикции действием альфа-и гамма-секретаз в структуре последовательности № 1 (SEQ ID NO: 1) белка p75NTR-Fc делает это соединение непригодным для использования в качестве лекарства *in vivo* при обезболивании и лечении других заболеваний, имеющих отношение к биологическим свойствам нейротрофинов, к примеру респираторных заболеваний.

В сравнении с последовательностью № 1 (SEQ ID NO: 1) последовательность № 3 (SEQ ID NO: 3) отличается стабильными характеристиками, показывает лучший фармакокинетический и фармакодинамический профиль (PK/PD) и более высокую аффинность к нейротрофинам.

Соединение P75NTR-Fc (SEQ ID NO: 3) относится к анальгетикам.

Цель настоящего исследования заключалась в изучении обезболивающих эффектов соединения p75NTR-Fc (SEQ ID NO: 3) при длительном воздействии на крыс, у которых индуцировали остеоартрит (ОА) действием мононатрий-йодацетата (MIA).

Ранее авторами изобретения показано, что хорошей оценкой статической боли может служить измерение способности нести статическую нагрузку (с использованием прибора, измеряющего усилие, временно выводящее из строя). Показано, что результаты этого испытания коррелируют с данными гистопатологического исследования коленного сустава. Доклинические испытания новых видов лечения подверглись критике ввиду подверженности метода систематическим ошибкам. Для исправления этого недостатка проводилась рандомизация со случайным выбором левого или правого коленного сустава для индукции ОА, а все лица, занятые повседневной работой в рамках исследования *in vivo*, были лишены возможности следить за состоянием каждого колена. Судя по литературным данным, индукцию ОА, как правило, проводят лишь на правом колене, однако в своих предыдущих исследованиях заявители не обнаружили статистически значимых различий между результатами индукции ОА на правом и левом коленном суставе вне зависимости от применяемой дозы или времени введения MIA.

Приготовление раствора монойодацетата (MIA).

Монойодацетат готовили в виде раствора с содержанием 0,3 мг/50 мкл буферного раствора ETF-PBS (указан объем, используемый для одной внутрисуставной инъекции), что эквивалентно неразбавленному раствору концентрации 6 мг/мл. Отвешивали 302 мг MIA и растворяли в 50,3 мл буферного раствора ETF-PBS. Раствор MIA готовили за сутки до применения и хранили в темноте при 4°C до того, как использовать в работе.

Подопытные животные.

В данном исследовании участвовали 44 самца крысы линии Вистар (поставщик - Charles River UK (Великобритания)) с массой тела при поступлении 110-130 г. При поступлении каждую особь осматри-

вали, следя за тем, чтобы она выглядела внешне здоровой. После этого животных случайным образом рассаживали по клеткам (две особи на клетку) и каждой особи присваивали индивидуальный идентификационный номер, который наносили в виде татуировки на хвост животного. Далее животным давали время на акклиматизацию (не менее 10 суток), прежде чем начинать исследование в день, обозначенный как "день 0". Как только крысы адаптировались к условиям содержания, их перемещали в накопитель (манипуляционный кабинет), где над ними проводили все манипуляции *in vivo*. Животных содержали при свете люминесцентных ламп, дающих 12-часовой цикл день/ночь (начало светового дня 07:00, конец 19:00), согласно рекомендациям по содержанию домашних и лабораторных животных (см. Постановление Home Office Animals Act 1986 (для научных исследований)). Микроклимат в помещениях поддерживали при помощи кондиционеров, контролируя обычными способами температуру ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) и относительную влажность воздуха.

Крысам на протяжении всего исследования давали корм, подвергнутый ионизирующему облучению (поставщик - Scientific Animal Food and Engineering, Ожи (Франция)) и давали пить вволю (*ad libitum*) воду, прогретую в автоклаве. Для каждой партии корма проводили стандартный входной контроль состава и проверку на наличие посторонних примесей. Индивидуальные гнезда и клетки прогревали в автоклаве и каждую клетку проветривали отдельно, применяя систему IVC - клетки с индивидуальной вентиляцией.

План эксперимента.

Планом исследования было предусмотрено пять групп животных: контрольная группа ($n=6$), получавшая человеческое антитело, группы, получавшие p75NTR-Fc (SEQ ID № 3) в дозах 0,3, 1, 3 мг/кг, а также группа, получавшая PG-007 (антитело к NGF, биоаналог препарата танезумаб (Pfizer)).

Антитела и белок p75NTR-Fc (SEQ ID NO: 3) вводили путем подкожной инъекции раз в 5 дней на протяжении 25 дней.

Утром в день (-2), т.е. за два дня до начала исследования, подопытных животных взвешивали и забирали у них фоновую пробу крови из хвостовой вены. Примерно в это же время в день (-1), т.е. за день до начала исследования, измеряли фоновую способность нести статическую нагрузку. В день 0, вновь примерно в это же время суток, всем крысам вводили соответствующее антитело или дозу рекомбинантного белка p75NTR-Fc. Тремя часами позже всем животным вводили внутрь суставной сумки одного из коленных суставов инъекцию MIA в дозе 0,3 мг (в коленный сустав, расположенный на противоположной стороне тела, вводили инъекцию буферного раствора ETF-PBS).

Рандомизация терапевтического воздействия.

До начала исследования крыс взвешивали, а каждую клетку с двумя особями в ней случайным образом относили к определенной терапевтической группе, поэтому средняя масса тела животных в каждой группе была примерно одинаковой. Помимо случайного отнесения каждого животного к определенной терапевтической группе, проводилась дальнейшая рандомизация с тем, чтобы инъекция MIA каждой крысе могла вводиться и в левый, и в правый коленный сустав (а в коленный сустав, расположенный на противоположной стороне тела, каждой крысе вводили инъекцию ETF-PBS). Назначением животных в ту или иную терапевтическую группу и выбором того, в какой коленный сустав той или иной крысе будет вводиться препарат, управлял генератор случайных чисел, встроенный в программу Microsoft Excel для Mac (версия 14.1.1). Рандомизацию и распределение по группам проводили сотрудники, не контактирующие с животными.

Для каждой особи были выделены два полипропиленовых сосуда вместимостью по 7 мл; их маркировали обозначением левого или правого колена (в общей сложности 88 сосудов). Подготовкой всех 88 сосудов занимались два человека - один из них выставлял оценки и выполнял сверку протоколов рандомизации, а второй разбавлял растворы и готовил их к внутрисуставной инъекции. Разбавление и пипетирование растворов проводили в определенной последовательности с таким расчетом, чтобы вначале заполнялись сосуды для MIA, а затем во второй из оставшихся сосудов заливали буферный раствор ETF-PBS (этот сосуд соответствовал второму, противоположному коленному суставу для каждой особи). На протяжении всего исследования *in vivo* задействованные в нем сотрудники не знали статуса подопытных животных.

Манипуляции с подопытными животными.

Внутрисуставная инъекция в коленный сустав.

Всем крысам давали анестезию путем ингаляции изофлурана через аппарат Бойля. Шерсть на обоих коленях подстригали и кожу на колене протирали тампоном, смоченным этанолом. Инъекцию производили пункцией поднадколенной связки, вводя 50 мкл раствора MIA в ETF-PBS или одного лишь ETF-PBS из стерильного шприца для инсулина Becton Dickinson Micro-Fine (0,5 мл) через иглу калибра 27 G.

Порядок оценивания самопроизвольной боли.

Порог самопроизвольной боли определяли для каждого животного путем измерения несущей способности левой и правой задней конечности при помощи прибора, измеряющего усилие, временно выводящее из строя (Linton Instruments (Великобритания)). Крыс помещали в специальную пластиковую коробку подходящего размера из оргстекла "перспекс", установленную на приборе, с таким расчетом, что-

бы задние лапы опирались на два отдельных датчика. Размер коробки позволял крысе принимать удобную сидячую позу без сдавливания тела, но в то же время не позволял животному поворачиваться вокруг вертикальной оси. Как только крыса принимала устойчивое положение и успокаивалась, раз в 5 с регистрировали вес, приходящийся на каждую конечность, и записывали усредненную силу давления на опору (в граммах веса), развиваемую двумя задними лапами. Для каждой особи в каждый момент времени проводили пять замеров для оценки распределения весовой нагрузки между задними лапами (в предыдущем исследовании нами показана достоверность такой оценки) и по пяти показаниям вычисляли среднее. Для перевода данных по несущей способности конечностей в распределение весовой нагрузки находили частное от веса, приходящегося на правую конечность, на общий вес, приходящийся на обе задние конечности.

Количественная оценка самопроизвольной боли после индукции остеоартрита (ОА) действием МІА.

Количественную оценку порога самопроизвольной боли выполняли при помощи прибора, измеряющего усилие, временно выводящее из строя. Мерой служило распределение весовой нагрузки между задними лапами. Оценку получали перед началом исследования, а также спустя 3 недели после инъекции МІА.

Данные, представленные на фиг. 6, соответствуют соотношению общей весовой нагрузки на обе задние конечности.

Для животных, не получавших никакого лечения, статистически значимого различия между относительным весом на одну из задних конечностей и теоретическим прогнозом (0,5) не наблюдалось.

Для животных контрольной группы, получавших человеческие антитела, наблюдалось статистически значимое различие: на "больную" конечность приходилась существенно меньшая весовая нагрузка, чем на конечность, не получавшую лечения (39 и 61% соответственно). Тем не менее у животных, получавших стандартное антитело к NGF (PG-007, биоаналог препарата танезумаб 3 мг/кг) и у получавших рекомбинантный белок p75NTR-Fc (SEQ ID NO: 3) в концентрации 0,3 и 1 мг/кг, не наблюдалось статистически значимых ($P < 0,01$) различий между относительной весовой нагрузкой на "больную" заднюю конечность после лечения и теоретическим прогнозом (0,5), т.е. равным распределением нагрузки на обе задние конечности, в каждый момент времени, когда проводилось измерение. При этом обезболивающий эффект от применения белка p75NTR-Fc (SEQ ID NO: 3) в концентрации 3 мг/кг оказался даже более статистически значимым ($P < 0,05$), чем для контрольного антитела.

Из этих результатов со всей очевидностью следует, что в рамках модельных представлений об ОА, индуцированном у крыс действием МІА, рекомбинантный белок p75NTR-Fc (SEQ ID NO: 3) является анальгетиком. Обезболивающий эффект от применения p75NTR-Fc (SEQ ID NO: 3) оказался выше, чем у известных антител к NGF (PG-007, т.е. биоаналога препарата танезумаб (производитель - Pfizer)) при использовании в аналогичной дозе (3 мг/кг внутривенно).

Неожиданный эффект повышения аффинности к отдельным нейротрофинам у молекулярной формы белка p75NTR-Fc, последовательности № 3 и 15.

На основании литературных данных и по мнению специалистов, считается общепризнанным, что нейротрофиновый рецептор p75 не отличается высокой аффинностью по отношению к нейротрофинам, при этом аффинность ко всем нейротрофинам у него близка и составляет порядка 1 нМ (Ichim et al., 2012, Exp. Cell Res. 318(11):1221-8). В подтверждение этого, в описании уровня техники в патентной публикации Apollo Life Sciences (Molecules and chimeric molecules thereof (Молекулярные формы веществ и их генетические гибриды), патент США US 20090232808 A1) даются дополнительные примеры аффинности нейротрофинового рецептора p75 по отношению к отдельным нейротрофинам, которая примерно одинакова. "Нейротрофический фактор роста NGFR - это мембранный белок I типа, который с химической точки зрения представляет собой гликопротеин, построенный из 427 аминокислот, в структуре которого имеется сигнальная последовательность из 28 аминокислот. При связывании со всеми нейротрофинами NGFR характеризуется одинаковой аффинностью".

В то же время, по результатам резонанса плазмы на установке Biacore авторами изобретения показано наличие значительных изменений аффинности у последовательностей № 3 и 15, присоединенных к фрагменту Fc интерферона человека IgG1 через линкер GGG.

Таблица 3

Аффинность последовательностей № 3 и 15 к отдельным нейротрофинам
(получено на установке Biacore)

Последовательность	Аффинность к лигандам, пМ			
	NT-3	NT-4	BDNF	NGF
3	14	181	48	525
15	15	164	38	498

Понижение изоэлектрической точки (pI).

Для изоэлектрической точки последовательности № 3, а также соединений, описанных в разделе "Уровень техники" патентной публикации Apollo Life Science, теоретическое значение pI составляет 4,11; однако указанные молекулы в значительной степени гликозилированы, что должно приводить к смещению фактической pI в область pH 3-4.

Для последовательности № 15 теоретическое значение pI составляет 4,23, а степень гликозилирования меньше, чем у других форм p75NTR. Как следствие, pI должно находиться в области pH 4-5. Это дает существенное преимущество (как с точки зрения рецептуры, так и ввиду меньшей изменчивости молекулярной структуры в зависимости от места и степени гликозилирования) по сравнению с последовательностью № 3, а также последовательностями, описанными ранее в разделе "Уровень техники" патентной публикации Apollo Life Science.

Предмет настоящего изобретения никаким образом не ограничен содержанием конкретных примеров, рассмотренных в настоящем документе. В самом деле, любому специалисту в данной области ясно из предыдущего описания и сопроводительного иллюстративного материала, что возможны самые разные варианты осуществления изобретения в дополнение к уже описанным. Прилагаемая формула изобретения намеренно составлена так, чтобы охватывать подобные варианты. Кроме того, все варианты реализации изобретения, рассмотренные в тексте настоящего документа, считаются универсально применимыми и допускающими совместную реализацию с другими вариантами, если это целесообразно.

В тексте настоящего документа даны ссылки на всевозможные публикации, содержание которых включено во всей его полноте путем отсылки к первоисточнику.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок для обезболивания и/или профилактики возникновения боли, содержащий:
фрагмент (а), включающий нейротрофин-связывающий белок, представляющий собой внеклеточный домен нейротрофинового рецептора p75NTR;
фрагмент (b), включающий Fc-область иммуноглобулина,
причем фрагмент (а) и фрагмент (b) соединены линкером, включающим пептид формулы G_x, где x равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6.
2. Слитый белок p75NTR-Fc по п.1, где фрагмент (а) представляет собой белок p75NTR человека.
3. Слитый белок p75NTR-Fc по любому из пп.1, 2, где фрагмент (b) представляет собой Fc-область иммуноглобулина человека.
4. Слитый белок p75NTR-Fc по любому из предыдущих пунктов, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID № 3.
5. Слитый белок p75NTR-Fc по любому из предыдущих пунктов, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID № 15.
6. Слитый белок p75NTR-Fc по любому из предыдущих пунктов, где фрагмент (а) связывается с любым нейротрофином из перечня NGF, BDNF, NT3 и NT4/5 и характеризуется аффинностью (K_d) в диапазоне приблизительно от 0,01 до 50 нМ по данным резонанса поверхностных плазмонов при 20°C.
7. Применение слитого белка p75NTR-Fc по любому из предыдущих пунктов для обезболивания и/или профилактики возникновения боли.
8. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок p75NTR-Fc по любому из пп.1-6.
9. Реплицируемый вектор экспрессии для трансфицирования клетки, включающий молекулу нуклеиновой кислоты по п.8.
10. Реплицируемый вектор экспрессии по п.9, представляющий собой вирусный вектор.
11. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.8.
12. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по п.8 для обезболивания и/или профилактики возникновения боли.
13. Применение вектора по любому из пп.9 или 10 для обезболивания и/или профилактики возникновения боли.
14. Применение слитого белка p75NTR-Fc по любому из пп.1-6 в комбинации со вторым фармакологически активным соединением последовательно или одновременно для обезболивания и/или профилактики возникновения боли.
15. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по п.8 в комбинации со вторым фармакологически активным соединением последовательно или одновременно для обезболивания и/или профилактики возникновения боли.
16. Применение вектора по любому из пп.9 или 10 в комбинации со вторым фармакологически активным соединением последовательно или одновременно для обезболивания и/или профилактики возникновения боли.
17. Фармацевтическая композиция для обезболивания и/или профилактики возникновения боли, включающая слитый белок p75NTR-Fc по любому из пп.1-6, либо молекулу нуклеиновой кислоты по п.8, либо вектор по любому из пп.9 или 10, а также фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомога-

тельное вещество.

18. Набор для обезболивания, либо для смягчения или снижения частоты приступов боли, либо замедления развития или нарастания боли, либо для профилактики возникновения боли у человека, включающий:

(а) слитый белок р75NTR-Fc по любому из пп.1-6, либо молекулу нуклеиновой кислоты по п.8, либо вектор по любому из пп.9 или 10, либо фармацевтическую композицию по п.17; и

(б) инструкцию по применению эффективного количества указанного слитого белка р75NTR-Fc, молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или фармацевтической композиции.

19. Способ обезболивания и/или профилактики возникновения боли у человека, предусматривающий введение человеку терапевтически эффективного количества слитого белка р75NTR-Fc по любому из пп.1-6, либо молекулы нуклеиновой кислоты по п.8, либо вектора по любому из пп.9 или 10, либо композиции по п.17.

SEQ ID NO: 1

KEACPTGLYTHSGECKKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECV
GLQMSAPCVEADDAVCRCAYGYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDKQNTVCEECP
DGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAEEIEIPGRWITRSTPPEGSDSTAPSTQ
EPEAPPEQDLIASTVAGVVTVMGSSQPVVTRGTTDNDIEGRMDPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

Фиг. 1

SEQ ID NO: 2

MEWSWVFLFSLSVTTGVHSKEACPTGLYTHSGECKKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDS
VTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQMSAPCVEADDAVCRCAYGYQDETTGRCEACRVCEAG
SGLVFSCQDKQNTVCEECPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAEEIEIPG
RWITRSTPPEGSDSTAPSTQEAPPEQDLIASTVAGVVTVMGGGGEPKSSDKTHTCPPCPAP
ELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Фиг. 2

SEQ ID NO: 3

KEACPTGLYTHSGECKKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECV
GLQMSAPCVEADDAVCRCAYGYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDKQNTVCEECP
DGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAEEIEIPGRWITRSTPPEGSDSTAPSTQ
EPEAPPEQDLIASTVAGVVTVMGGGGEPKSSDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Фиг. 3

SEQ ID NO: 4

AAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGTCTGGGTGTTCTTCTCTGTCGGTGACCAAC
GGCGTGCACCTCAAAAGAGGCTTGTCCACCGGCTGTACACCACTCTGGCGAGTGTJGC
AAGGCCTGTAACCTGGGAGAAGGCGTGGCCAGCCTGTGGCGCTAATCAGACAGTGTG
CGAGCCCTGCCCTGGACTCCGTGACCTTCTCCGATGTGGTGTCCGCCACCGAGCCTTGCAA
GCCCTGCACAGAGTGTGTGGGCTGCAGTCCATGTCCGCCCTTGCCTGGAAGCCGACGA
CGCCGTGTGTAGATGCGCCTACGGCTACTACCAGGACGAGACAACCGGCAGATGCGAGG
CCTGCAGAGTGTGCGAAGCTGGCTCTGGCTGGTGTTCAGTGTCAAGACAAGCAGAAC
ACCGTGTGCGAGGAATGCCCGACGGCACCTACTCTGACGAGGCCAATCAGTGGACCC
CTGCCCTGCCTTGACCCGTGTGAAGATACCGAGCGGCAGCTGCGCGAGTGCACAGAT
GGGCTGATGCCGAGTGCGAAGAGATCCCTGGCCGGTGGATCACCAGATCCACCCCTCA
GAGGCTCCGACTCTACCGCTCCCTTACCCAGGAACCTGAGGCCCTCTCTGAGCAGGAC
CTGATCGCTTCTACAGTGGCCGGCTGCTGACACAGTATGGGCGGAGGCGGCGAGCC
TAAGTCTCCGACAAGACCCACACCTGTCCCTCTGCTCTGCCCTGAACTGCTGGGCGG
ACCTTCCGTGTTTCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCTGATGATCTCCCGACCCC
CGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGACCTGAAAGTGAAGTTCAATT
GGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAAGAGAGGAACAGTA
CAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGTGCACAGGACTGGCTGAACGG
CAAAAGATACAAGTGCAAGGTGCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCA
TCTCAAGGCCAAGGGCCAGCCCGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCCTAGCAGG
GACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCC
GATATCGCGCTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAATAAGACACCC
CCCTGTGTGACAGCGACGGCTCATTTCTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTC
CCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCTGTCAGCGTGTATGCACGAGGCTCTGCACAAC
ACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCGGCTGATGAATTC

Фиг. 4

SEQ ID NO: 6-13

P75NTR IASTVAGVVTVMGSSQPVVTRGTTDNLIPVYCSILAAVVVGLVAYIAFKR (SEQ ID 6)

Commercial p75-Fc IASTVAGVVTVMGIPKVDKKV-EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF (SEQ ID 7)

p75-Fc IASTVAGVVTVMGIPKVDKKV-EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF (SEQ ID 8)

p75-Fc C222S IASTVAGVVTVMGIPKVDKKV-EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF (SEQ ID 9)

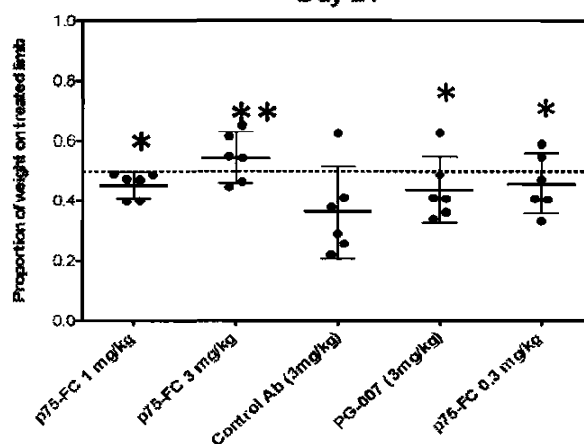
p75-Fc G4x1 IASTVAGVVTVMGGGG-----EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF (SEQ ID 10)

p75-Fc G4Sx1 IASTVAGVVTVMGGGGS-----EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF (SEQ ID 11)

p75-Fc G4Sx2 IASTVAGVVTVMGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF (SEQ ID 12)

Lonza IgG1za -----NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF (SEQ ID 13)

Фиг. 5

Proportion of weight on treated limb by group
Day 21

Фиг. 6

Proportion of weight on treated limb by group Day 21	Относительная весовая нагрузка на больную конечность в разных группах День 21
Proportion of weight on treated limb	Относительная весовая нагрузка на больную конечность
P75-Fc 1 mg/kg	P75-Fc, 1 мг/кг
P75-Fc 3 mg/kg	P75-Fc, 3 мг/кг
Control Ab (3 mg/kg)	Контрольное антитело, 3 мг/кг
PG-007 (3 mg/kg)	PG-007, 3 мг/кг
P75-Fc 0.3 mg/kg	P75-Fc, 0,3 мг/кг

SEQ ID NO: 15

KEACPTGLYTHSGECKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPCVEAD
 DAVCRCAYYGYQDETTGRCEACRVCEAGSLVFSCQDKQNTVCEECPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDETERQLR
 ECTRWADAEECEIPGRWITRSTPPEGGGGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Фиг. 7



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2