

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092491** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.02.09

(22) Дата подачи заявки
2019.04.10

(51) Int. Cl. *C07K 16/22* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

**(54) МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ,
КОДИРУЮЩИЙ ЕГО ГЕН И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 201810344670.3; 201811320006.1

(32) 2018.04.17; 2018.11.07

(33) CN

(86) PCT/CN2019/082107

(87) WO 2019/201133 2019.10.24

(71) Заявитель:

АКЕСО БАЙОФАРМА, ИНК. (CN)

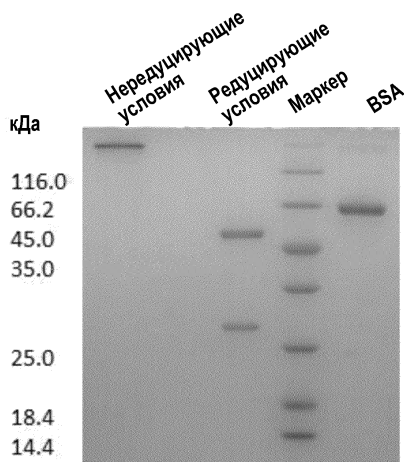
(72) Изобретатель:

**Ван Чжунминь Максвелл, Ли Байюн,
Ся Юй, Чжан Пэн (CN)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к моноклональному антителу против фактора роста нервов, а также к кодирующему его гену и его применению. Моноклональное антитело против фактора роста нервов по настоящему изобретению содержит тяжелые цепи, содержащие константную область тяжелой цепи и переменную область тяжелой цепи, и легкие цепи, содержащие константную область легкой цепи и переменную область легкой цепи. Переменная область тяжелой цепи содержит три определяющие комплементарность области HCDR1, HCDR2 и HCDR3 и переменная область легкой цепи содержит три определяющие комплементарность области LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Моноклональное антитело против фактора роста нервов по настоящему изобретению может специфически связываться с фактором роста нервов и может использоваться для обнаружения наличия и/или уровня фактора роста нервов, а также для производства лекарственного средства для ингибирования зависимой от фактора роста нервов пролиферации клеток TF-1 и для производства лекарственного средства для лечения или профилактики по меньшей мере одной из невропатической боли, хронической боли и связанной с воспалением боли, таким образом оно имеет хорошие перспективы применения и востребовано на рынке.



A1

202092491

202092491

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565116EA/019

МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ, КОДИРУЮЩИЙ ЕГО ГЕН И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к области иммунологии и молекулярной биологии. Более конкретно, настоящее изобретение относится к моноклональному антителу против фактора роста нервов, кодирующему его гену и его применению для изготовления наборов для детектирования и для производства различных лекарственных средств.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Фактор роста нервов (NGF) является одним из самых ранних определенных трофических факторов роста нервов и играет важную роль в формировании, дифференцировке и поддержании функции биологических нейронов. NGF может связываться с тропомиозин-рецепторной киназой A (TrKA) с высоким сродством и неспецифично связываться с рецептором P75NTR. Появляется все больше и больше доказательств, свидетельствующих о том, что помимо биологического воздействия на рост, развитие и выживание нейронов, NGF следует рассматривать в качестве медиатора постоянной и хронической боли. Например, внутривенная инфузия NGF может вызвать системные болевые реакции, а местная инъекция NGF может вызвать гипералгезию и аномальную боль в месте инъекции. Секреция NGF в месте воспаления увеличивается и длится дольше. Кроме того, при некоторых типах рака избыток NGF способствует росту и инфильтрации нервных волокон, вызывая, таким образом, боль при раке. Имеются сообщения о том, что мыши с нокаутным рецептором TrKA не испытывают боли, и NGF считается молекулой, тесно связанной с болью. Эти данные свидетельствуют о том, что использование ингибиторов NGF может облегчить болевые реакции на животных моделях невропатической и хронической воспалительной боли. Нейтрализующие анти-NGF антитела могут существенно облегчить боль на мышинной модели боли при раке.

Лекарственные препараты на основе антител, особенно моноклональных антител, на сегодняшний день являются высокоэффективными при лечении различных заболеваний. Получение безопасных и эффективных моноклональных анти-NGF антител может обеспечить новый класс анальгетиков для лечения хронической боли и боли при раке, отличный от опиатов, нестероидов и т.д., которые вызывают привыкание или побочные эффекты в пищеварительном тракте. В настоящее время танезумаб, разработанный компанией Pfizer Pharmaceuticals Co., Ltd., показал хорошие анальгетические эффекты в доклинических и клинических исследованиях. Однако до сих пор имеется недостаток в других более эффективных анти-NGF антителах.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Целью настоящего изобретения является преодоление недостатков, связанных с низкой активностью и видовыми различиями антител против фактора роста нервов,

предшествующего уровня техники, а также предоставление моноклональных антител против фактора роста нервов, которые являются высокоактивными с устраненными межвидовыми различиями, и предоставление кодирующего гена и их применение, а также их применение при изготовлении наборов для детектирования и при изготовлении различных лекарственных средств.

Для достижения вышеуказанной цели изобретения настоящее изобретение предоставляет моноклональное антитело, которое может специфически связываться с человеческим фактором роста нервов, содержащее тяжелые цепи и легкие цепи, где тяжелая цепь содержит константную область тяжелой цепи и переменную область тяжелой цепи, и легкая цепь содержит константную область легкой цепи и переменную область легкой цепи.

Переменные области легкой цепи и тяжелой цепи определяют связывание антигена; где переменная область каждой цепи содержит три гиперпеременные области, называемые определяющими комплементарность областями (CDR) (CDR тяжелой цепи (H) включают HCDR1, HCDR2, HCDR3, и CDR легкой цепи (L) включают LCDR1, LCDR2, LCDR3; названные по Kabat et al., см. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition (1991), Volumes 1-3, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md).

В настоящем изобретении переменная область тяжелой цепи содержит три определяющих комплементарность области HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и переменная область легкой цепи содержит три определяющих комплементарность области LCDR1, LCDR2 и LCDR3;

где аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области HCDR1 приведена в SEQ ID NO: 5;

аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области HCDR2 приведена в SEQ ID NO: 6;

аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области HCDR3 приведена в SEQ ID NO: 7;

аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области LCDR1 приведена в SEQ ID NO: 8;

аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области LCDR2 приведена в SEQ ID NO: 9; и

аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области LCDR3 приведена в SEQ ID NO: 10.

В настоящем изобретении сконструированы аминокислотные последовательности 6 областей CDR и введены специфические модификации для улучшения антигенсвязывающей активности переменных областей антитела. Для приведения в соответствие с изменениями в областях CDR, каркасные области также модифицируют. Однако необходимо убедиться, что модификации этих каркасных областей все еще совместимы с последовательностями человеческой зародышевой линии. Модификации

каркаса также анализируют, чтобы убедиться, что эти изменения не влияют на связывание областей CDR с антигенами.

Определяющие комплементарность области (CDR) варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи моноклонального антитела, которые представлены в приведенных выше SEQ ID NO: 5-7 и SEQ ID NO: 8-10, соответственно, анализируют с помощью технических средств, известных специалистам в данной области, например, через веб-сайт Национального центра биотехнологической информации (NCBI). В настоящем изобретении это моноклональное антитело названо H26L17.

В качестве предпочтительной технической схемы моноклонального антитела против фактора роста нервов по настоящему изобретению аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи приведена в SEQ ID NO: 2; аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи приведена в SEQ ID NO: 4.

В качестве дополнительной предпочтительной технической схемы моноклонального антитела против фактора роста нервов по настоящему изобретению нуклеотидная последовательность, кодирующая варибельную область тяжелой цепи, приведена в SEQ ID NO: 1; нуклеотидная последовательность, кодирующая варибельную область легкой цепи, приведена в SEQ ID NO: 3.

В одном из вариантов осуществления моноклонального антитела против фактора роста нервов по настоящему изобретению моноклональное антитело против фактора роста нервов выбирают из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, фрагмента определяющей комплементарность области, одноцепочечного антитела (например, scFv), гуманизированного антитела, химерного антитела и диатела.

В одном из вариантов осуществления моноклонального антитела против фактора роста нервов по настоящему изобретению моноклональное антитело против фактора роста нервов связывается с белком NGF с EC₅₀ менее 100 нМ (например, менее примерно 10 нМ, 1 нМ, 0,9 нМ, 0,8 нМ, 0,7 нМ, 0,6 нМ, 0,5 нМ, 0,4 нМ, 0,3 нМ, 0,2 нМ, 0,1 нМ или менее). При этом EC₅₀ можно измерить с помощью сэндвич-метода ELISA.

В одном из вариантов осуществления моноклонального антитела против фактора роста нервов по настоящему изобретению моноклональное антитело против фактора роста нервов содержит область, не являющуюся CDR, где эта область, не являющаяся CDR, принадлежит другим видам, не мышам, например, человеческому антителу.

Для достижения указанной выше цели настоящее изобретение также предоставляет ген, кодирующий указанное выше моноклональное антитело против фактора роста нервов.

Для достижения вышеупомянутой цели настоящее изобретение также предоставляет вектор, содержащий нуклеотидную последовательность варибельной области тяжелой цепи и/или нуклеотидную последовательность варибельной области легкой цепи.

Для достижения вышеупомянутой цели настоящее изобретение также

предоставляет клетку-хозяин, содержащую нуклеотидную последовательность варибельной области тяжелой цепи и/или нуклеотидную последовательность варибельной области легкой цепи; или

вектор, содержащий нуклеотидную последовательность варибельной области тяжелой цепи и/или нуклеотидную последовательность варибельной области легкой цепи.

Для достижения вышеуказанной цели настоящее изобретение также предоставляет способ получения моноклонального антитела против фактора роста нервов, который включает культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в подходящих условиях и выделение моноклонального антитела против фактора роста нервов из клеточной культуры.

Настоящее изобретение также предоставляет конъюгат моноклонального антитела, содержащий моноклональное антитело против фактора роста нервов и конъюгированную часть, конъюгированную с ним, где конъюгированная часть представляет собой детектируемую метку. Предпочтительно конъюгированная часть представляет собой радиоизотоп, люминесцентное вещество, окрашенное вещество или фермент.

Настоящее изобретение также предоставляет набор, содержащий моноклональное антитело против фактора роста нервов и/или конъюгат моноклонального антитела.

В качестве предпочтительной технической схемы набора по настоящему изобретению набор дополнительно содержит вторичное антитело, которое специфически распознает моноклональное антитело против фактора роста нервов; кроме того, вторичное антитело дополнительно содержит детектируемую метку, такую как радиоизотоп, люминесцентное вещество, окрашенное вещество или фермент.

Настоящее изобретение также предоставляет применению моноклонального антитела против фактора роста нервов и/или конъюгата моноклонального антитела в наборе, который позволяет определять присутствие и/или уровень фактора роста нервов. Набор используется для определения наличия или уровня NGF в образце.

Настоящее изобретение также предоставляет лекарственное средство, содержащее моноклональное антитело против фактора роста нервов и/или конъюгат моноклонального антитела; где лекарственное средство необязательно дополнительно содержит фармацевтически приемлемые носители и/или вспомогательные вещества.

Вышеупомянутое лекарственное средство специфически связывается с фактором роста нервов и может быть использован для подавления биологических эффектов, опосредованных фактором роста нервов, таких как пролиферация клеток TF-1; и/или

для лечения или профилактики невропатической боли, хронической боли и связанной с воспалением боли.

В настоящем изобретении в результате экспериментов *in vivo* было обнаружено, что моноклональные антитела против фактора роста нервов по настоящему изобретению могут уменьшать изменение походки в случае пораженной конечности и потерю веса животным в мышинной модели боли при артрите коленного сустава Lenti-IL-1 β -NIN/3T3.

В настоящем изобретении, если не указано иное, используемые научные и технические термины имеют значения, обычно понятные специалистам в данной области. Кроме того, выполняемые в лаборатории операции по культивированию клеток, молекулярной генетике, химии нуклеиновых кислот и иммунологии, используемые в настоящем изобретении, являются рутинными операциями, широко используемыми в соответствующих областях. Между тем, для лучшего понимания настоящего изобретения ниже приведены определения и пояснения соответствующих терминов.

Используемый в настоящем изобретении термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, которая обычно состоит из двух пар полипептидных цепей (каждая пара с одной «легкой» (L) цепью и одной «тяжелой» (H) цепью). Легкие цепи антитела классифицируются как легкие κ - и λ -цепи. Тяжелые цепи классифицируются как μ , δ , γ , α или ϵ . Изотипы антител определяются как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. В легких цепях и тяжелых цепях переменная область и константная область связаны областью «J», состоящей из примерно 12 или более аминокислот, и тяжелая цепь также содержит область «D», состоящую из примерно 3 или более аминокислот. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (V_H) и константной области тяжелой цепи (C_H). Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов (C_{H1} , C_{H2} и C_{H3}). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (V_L) и константной области легкой цепи (C_L). Константная область легкой цепи состоит из одного домена C_L . Константная область антитела может опосредовать связывание иммуноглобулинов с тканями или факторами хозяина, включая связывание различных клеток (например, эффекторных клеток) иммунной системы и первого компонента ($C1q$) классической системы комплемента. Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на высоковариабельные области (называемые определяющими комплементарность областями (CDR)), между которыми распределены консервативные области, называемые каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из 3 CDR и 4 FR, расположенных от аминоконца до карбоксильного конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области (V_H и V_L) каждой пары тяжелая цепь/легкая цепь образуют сайты связывания антител, соответственно. Отнесение аминокислот к каждой области или домену выполнено в соответствии с определением по Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 и 1991)) или Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al. (1989) Nature 342:878-883. Термин «антитело» не ограничено каким-либо конкретным способом получения антитела. Например, антитело включает, в частности, рекомбинантное антитело, моноклональное антитело и поликлональное антитело. Антитела могут быть разными изотипами антител, такими как антитела IgG (например, подтип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM.

Используемый в настоящем изобретении термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела относится к полипептиду, содержащему фрагмент полноразмерного антитела, который сохраняет способность специфически связываться с тем же антигеном, с которым

связывается полноразмерное антитело, и/или конкурировать с полноразмерным антителом за специфическое связывание с антигеном, который также известен как «антигенсвязывающая часть». См. *Fundamental Immunology*, гл. 7 (Paul, W., ed., 2nd edition, Raven Press, NY (1989)), которая включена в настоящее описание во всей своей полноте в виде ссылки для всех целей. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены с помощью технологии рекомбинантной ДНК или ферментативного или химического расщепления интактных антител. В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент включает Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, фрагмент определяющей комплементарности области (CDR), одноцепочечный фрагмент антитела (например, scFv), химерное антитело, диатело и полипептид, содержащий по меньшей мере часть антитела, достаточную для придания полипептиду специфической способности связывания антигена.

Используемый в настоящем изобретении термин «фрагмент Fd» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов V_H и C_H1; термин «фрагмент Fv» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов V_L и V_H одного плеча антитела; термин «фрагмент dAb» относится к фрагменту антитела, состоящему из домена V_H (Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989)); термин «Fab-фрагмент» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов V_L, V_H, C_L и C_H1; и термин «фрагмент F(ab')₂» относится к фрагменту антитела, содержащему два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области.

В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой одноцепочечное антитело (например, scFv), в котором домены V_L и V_H спарены с образованием одновалентной молекулы через линкер, который позволяет им продуцировать единую полипептидную цепь (см., например, Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988) и Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988)). Такие молекулы scFv имеют общую структуру: NH₂-V_L-линкер-V_H-COOH или NH₂-V_H-линкер-V_L-COOH. Подходящий линкер предшествующего уровня техники состоит из повторяющейся аминокислотной последовательности GGGGS или ее варианта. Например, можно использовать линкер, имеющий аминокислотную последовательность (GGGGS)₄, но также можно использовать его варианты (Holliger et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448). Другие линкеры, которые можно использовать в настоящем изобретении, описаны Alfthan et al. (1995), *Protein Eng.* 8:725-731, Choi et al. (2001), *Eur. J. Immunol.* 31:94-106, Hu et al. (1996), *Cancer Res.* 56:3055-3061, Kipriyanov et al. (1999), *J. Mol. Biol.* 293:41-56 и Roovers et al. (2001), *Cancer Immunol.*

В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой диатело, т.е. двухвалентное антитело, в котором домены V_H и V_L экспрессируются в одной полипептидной цепи. Однако используемый линкер слишком короткий, чтобы позволить спаривание двух доменов в одной цепи, поэтому домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи, создавая два сайта связывания антигена (см., например, Holliger P. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993) и Poljak RJ et al.,

Structure 2:1121-1123 (1994)).

Антигенсвязывающие фрагменты антител могут быть получены из данных антител с помощью обычных методов, известных специалистам в данной области (например, технологии рекомбинантной ДНК или ферментативного или химического расщепления), и антигенсвязывающие фрагменты антител подвергают скринингу на специфичность в тех же условиях, что и интактные антитела.

В настоящем изобретении, если из контекста в явном виде не следует иное, когда речь идет о термине «антитело», он включает не только интактные антитела, но также антигенсвязывающие фрагменты антител.

Используемые в настоящем изобретении термины «McAb» и «моноклональное антитело» относятся к антителу или фрагменту антитела, которое происходит из группы высокомонологичных антител, т.е. из группы идентичных молекул антител, за исключением естественных мутаций, которые могут возникать спонтанно. Моноклональное антитело обладает высокой специфичностью к одному эпитопу на антигене. Поликлональное антитело по сравнению с моноклональным антителом обычно содержит по меньшей мере два или более разных антител, которые обычно распознают разные эпитопы на антигене. Моноклональные антитела как правило могут быть получены с помощью гибридомной технологии, впервые описанной Kohler et al. (Nature, 256:495, 1975), но также могут быть получены с помощью технологии рекомбинантной ДНК (например, см. Патент США 4,816,567).

Используемый в настоящем изобретении термин «гуманизованное антитело» относится к антителу или фрагменту антитела, получаемому, когда все или часть областей CDR человеческого иммуноглобулина (рецепторного антитела) заменены областями CDR нечеловеческого антитела (донорского антитела), где донорское антитело может быть нечеловеческим (например, мышинным, крысиным или кроличьим) антителом с требуемой специфичностью, сродством или реактивностью. Кроме того, некоторые аминокислотные остатки в каркасных областях (FR) рецепторного антитела также могут быть заменены аминокислотными остатками соответствующих нечеловеческих антител или аминокислотными остатками других антител для дальнейшего улучшения или оптимизации функциональных характеристик антитела. Более подробно о гуманизованных антителах см., например, Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); Presta, Curr. Op Struct. Biol., 2:593-596 (1992); и Clark, Immunol. Today 21:397-402 (2000).

Используемый в настоящем изобретении термин «эпитоп» относится к участку антигена, с которым специфически связывается иммуноглобулин или антитело. «Эпитоп» также называется в данной области «антигенной детерминантой». Эпитоп или антигенная детерминанта обычно состоит из поверхностных химически активных групп молекулы, таких как аминокислоты, углеводы или боковые цепи сахара, и обычно имеет специфические трехмерные структурные характеристики и специфические характеристики заряда. Например, эпитоп обычно включает по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7,

8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 непрерывно или дискретно расположенных аминокислот в уникальной пространственной конформации, и может быть «линейным» или «конформационным». См., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol.66, G. E. Morris, Ed. (1996). В линейном эпитопе все точки взаимодействия между белком и взаимодействующей молекулой (например, антителом) расположены линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка. В конформационном эпитопе точки взаимодействия находятся между аминокислотными остатками белка, которые отделены друг от друга.

Используемый в настоящем изобретении термин «выделенный» означает «полученный искусственным путем из естественного состояния». Если в природе появляется некоторое «выделенное» вещество или компонент, это может быть связано с изменением в его естественной среде, или он является выделенным из естественной среды, или и то, и другое. Например, определенный невыделенный полинуклеотид или полипептид существует в природе в определенном живом животном, и тот же полинуклеотид или полипептид, выделенный с высокой чистотой из такого естественного состояния, называется выделенным полинуклеотидом или полипептидом. Термин «выделенный» не исключает существования искусственных или синтетических веществ или других примесей, которые не влияют на активность этого вещества.

Используемый в настоящем изобретении термин «система экспрессии *E. coli*» относится к системе экспрессии, состоящей из *E. coli* (штамма) и вектора, где *E. coli* (штамм) происходит из коммерчески доступного штамма, такого как *GI698*, *ER2566*, *BL21 (DE3)*, *B834 (DE3)* и *BLR (DE3)*.

Используемый в настоящем изобретении термин «вектор» относится к носителю нуклеиновой кислоты, в который может быть вставлен полинуклеотид. Когда вектор обеспечивает экспрессию белка, кодируемого вставленным полинуклеотидом, вектор называется вектором экспрессии. Вектор может быть введен в клетку-хозяин путем трансформации, трансдукции или трансфекции таким образом, что элементы генетического вещества, переносимые вектором, могут быть экспрессированы в клетке-хозяине. Векторы хорошо известны специалистам в данной области и включают, без ограничения: плазмиды; фагемиды; космиды; искусственные хромосомы, такие как искусственные хромосомы дрожжей (YAC), бактериальные искусственные хромосомы (BAC) или искусственные хромосомы на основе P1 (PAC); фаги, такие как лямбда-фаги или фаги M13, и вирусы животных и т.д. Вирусы животных, которые могут использоваться в качестве векторов, включают, без ограничения, ретровирусы (включая лентивирусы), аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса (такие как вирус простого герпеса), поксвирусы, бакуловирусы, папилломавирусы и паповавирусы (например, SV40). Вектор может содержать множество элементов, контролирующих экспрессию, включая, помимо прочего, промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности, элементы отбора и репортерные гены. Кроме того, вектор может дополнительно

содержать сайт инициации репликации.

Используемый в настоящем изобретении термин «клетка-хозяин» относится к клеткам, которые можно использовать для введения векторов, включая, без ограничения, прокариотические клетки, такие как *E. coli* или *Bacillus subtilis*, клетки грибов, такие как клетки дрожжей или *Aspergillus*, клетки насекомых, такие как клетки дрозиды S2 или Sf9, или клетки животных, такие как фибробласты, клетки CHO, клетки COS, клетки NSO, клетки HeLa, клетки ВНК, клетки НЕК 293 или клетки человека.

Используемый в настоящем изобретении термин «специфически связывать» относится к реакции неслучайного связывания между двумя молекулами, такой как реакция между антителом и антигеном, на который оно нацелено. В некоторых вариантах реализации антитело, которое специфически связывается с антигеном (или антитело, которое является специфическим для антигена), означает, что антитело связывается с антигеном со сродством (K_D) менее примерно 10^{-5} М, например, менее чем примерно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М или менее.

Используемый в настоящем изобретении термин « K_D » относится к константе равновесной диссоциации, характеризующей специфическое взаимодействие антитело-антиген, которая используется для описания сродства связывания между антителом и антигеном. Чем меньше константа равновесной диссоциации, тем прочнее связь антитело-антиген и тем выше сродство между антителом и антигеном. Обычно антитела связываются с антигенами (например, белком L1) с константой равновесной диссоциации (K_D) менее примерно 10^{-5} М, например менее примерно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М или менее, например, определенной с помощью прибора BIACORE методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Используемые в настоящем изобретении термины «моноклональное антитело» и «McAb» имеют одинаковое значение и могут использоваться взаимозаменяемо; термины «поликлональное антитело» и «PcAb» имеют одинаковое значение и могут использоваться взаимозаменяемо; термины «полипептид» и «белок» имеют одинаковое значение и могут использоваться взаимозаменяемо. И в настоящем изобретении аминокислоты как правило представлены однобуквенными или трехбуквенными обозначениями, известными в данной области. Например, аланин может быть представлен буквой А или Ala.

Используемый в настоящем изобретении термин «эффективное количество» относится к количеству, достаточному для получения или, по меньшей мере, частичного получения требуемого эффекта. Например, профилактически эффективное количество относится к количеству, достаточному для профилактики, купирования или отсрочки возникновения заболеваний; терапевтически эффективное количество относится к количеству, достаточному для излечения или, по меньшей мере, частичного купирования заболевания и его осложнений у пациентов, страдающих этим заболеванием. Специалисты в данной области вполне могут определить такое эффективное количество. Например, количество, эффективное для терапевтического применения, будет зависеть от тяжести заболевания, которое подлежит лечению, общего состояния иммунной системы

пациента, общего состояния пациента, такого как возраст, вес и пол, способа введения лекарственного средства и других одновременно предоставляемых видов лечения и т.д.

По сравнению с предшествующим уровнем техники настоящее изобретение имеет следующие преимущества:

Моноклональное антитело против фактора роста нервов по настоящему изобретению может специфически связываться с фактором роста нервов и имеет такие преимущества, как высокая активность и т.п., и может использоваться для обнаружения наличия и/или уровня фактора роста нервов, а также для производства лекарственного средства, противодействующего фактору роста нервов, и для производства лекарственного средства для лечения или профилактики невропатической боли, хронической боли и связанной с воспалением боли, таким образом оно имеет хорошие перспективы применения и востребовано на рынке.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг. 1 показаны результаты анализа SDS-PAGE моноклонального антитела H26L17 против фактора роста нервов по настоящему изобретению. Образцы из четырех полос слева направо и их соответствующие загрузочные количества представляют собой: антитело в загрузочном буфере для электрофореза белка в нередуцирующих условиях, 1 мкг; антитело в загрузочном буфере для электрофореза белка в редуцирующих условиях, 1 мкг; маркер молекулярной массы белка (Marker), 5 мкл; бычий сывороточный альбумин (BSA), 1 мкг.

На фиг. 2 показаны результаты анализа активности связывания H26L17 и танезумаба с антигеном человеческим β -NGF.

На фиг. 3 показаны результаты стандартной кривой для анализа ингибирования пролиферации клеток TF-1, обусловленного действием H26L17 и танезумаба, выполненного методом ССК-8.

На фиг. 4 показано количество клеток через 72 часа ингибирования NGF-индуцированной пролиферации клеток TF-1 моноклональным антителом H26L17 против фактора роста нервов по настоящему изобретению.

На фиг. 5 показано значение OD для каждой группы, полученное при измерении методом ССК-8 ингибирования пролиферации клеток TF-1, обусловленного действием H26L17 и танезумаба.

На фиг. 6 показана кривая аппроксимации для H26L17, ингибирующего NGF-индуцированную пролиферацию клеток TF-1. Взяв логарифм концентрации антител (нМ) в качестве оси абсцисс и значение OD при 450 нм в качестве оси ординат, строили кривую доза-эффект для сравнения EC_{50} разных антител.

На фиг. 7 показано влияние H26L17 на паттерн ходьбы при пораженной конечности, вызванную болью, на мышинной модели боли при артрите коленного сустава Lenti-IL-1 β -NIN/3T3.

На фиг. 8 показано влияние H26L17 на вес мышей на мышинной модели боли при артрите коленного сустава Lenti-IL-1 β -NIN/3T3.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Варианты осуществления настоящего изобретения описаны более подробно ниже со ссылкой на примеры. Специалисты в данной области поймут, что приведенные ниже примеры используются только для иллюстрации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения. Случаи без конкретных описаний методов или условий выполняли в соответствии с методами или условиями, описанными в литературе в данной области техники (например, см. Guide to Molecular Cloning Experiments, под редакцией J. Sambrook et al. и переведенным Huang Peitang et al., third edition, Science Press) или в соответствии с руководством по продукту. Используемые реагенты или инструменты являются обычными коммерчески доступными продуктами, если их производители не указаны.

В приведенных ниже примерах настоящего изобретения мышей C57BL/6 для экспериментов приобретены в Центре медицинских экспериментальных животных провинции Гуандун.

Используемое антитело положительного контроля, танезумаб, представляло собой антитело Танезумаб компании Pfizer (David L. Shelton. Methods for treating bone cancer by administering a Nerve Growth Factor antagonist antibody. USA, 20110243961A1. 2011-06-06).

Пример 1. Разработка, экспрессия и очистка последовательностей тяжелой и легкой цепи H26L17.

1. Разработка антитела

Для создания антитела H26L17 к NGF человека, была разработана серия последовательностей антител на основе последовательности белка NGF и его трехмерной кристаллической структуры и т.д. Посредством широкомасштабного скрининга и анализов было получено антитело H26L17, которое специфически связывается с NGF. Аминокислотные последовательности варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи антитела и их кодирующие последовательности ДНК представлены в SEQ ID NO: 1-4.

2. Экспрессия и очистка антител.

Кодирующая нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи (приведена в SEQ ID NO: 1; константная область представляет собой С-область цепи гамма-1 Ig, номер доступа: P01857) и кодирующая нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи (приведена в SEQ ID NO: 3; константная область представляет собой С-область цепи лямбда-2 Ig; номер доступа: P0CG05.1) H26L17 независимо клонировали в векторы pUC57simple (предоставленные Genscript), и получали плазмиды pUC57simple-H26L17H и pUC57simple-H26L17L, соответственно.

Плазмиды pUC57simple-H26L17H и pUC57simple-H26L17L расщепляли (HindIII и EcoRI), и нуклеотидные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи, выделенные с помощью электрофореза, независимо субклонировали в векторы pcDNA3.1, и для совместной трансфекции экстрагировали рекомбинантные плазмиды. Затем трансфицированные клетки 293F культивировали в течение 7 дней, культуральную среду

центрифугировали с высокой скоростью, полученный супернатант концентрировали и наносили на колонку HiTrap MabSelect SuRe. Белок элюировали за одну стадию элюентом для выделения целевого образца. Образец антител хранили в буфере PBS.

Очищенный образец добавляли как к буферному раствору для электрофореза белка в редуцирующих условиях, так и к буферному раствору для электрофореза белка в нередуцирующих условиях, а затем кипятили. Обработанные образцы анализировали электрофорезом в SDS-PAGE. Электрофореграмма H26L17 показана на фиг. 1. Образец целевого белка в редуцирующем буфере составляет 45 кДа и 30 кДа, а образец целевого белка в нередуцирующем буфере (одно антитело) составляет 150 кДа.

H26L17, полученный в этом примере, использовали в следующих примерах 2-4.

Пример 2. Анализ связывающей активности H26L17 к антигену человеческому β -NGF.

В этом эксперименте использовали метод ELISA для определения EC_{50} (концентрация медианного эффекта) связывания H26L17 с человеческим β -NGF для исследования специфичности связывания и сродства антитела к человеческому β -NGF.

Микропланшет покрывали 50 мкл 0,5 мкг/мл человеческого β -NGF в каждой лунке и инкубировали в течение ночи при 4°C. После того, как микропланшет промывали один раз и промокали насухо, каждую лунку блокировали 300 мкл 1% раствора BSA (растворенного в PBS). Микропланшет инкубировали при 37°C в течение 2 часов и промокали насухо после трехкратной промывки. Антитело разбавляли до 1 мкг/мл в качестве начальной концентрации, и в микропланшете выполняли градиентное разбавление 1:3 для получения всего 7 концентраций в дополнение к пустой контрольной лунке. Для указанных выше концентраций готовили дублирующие лунки с конечным объемом 100 мкл на лунку, и микропланшет инкубировали при 37°C в течение 30 минут. После трехкратной промывки микропланшета и промокания насухо в каждую лунку добавляли 50 мкл рабочего раствора вторичных козьих антител к человеческому IgG (H+L), меченных пероксидазой хрена, и микропланшет инкубировали при 37°C в течение 30 мин. После четырехкратной промывки микропланшета и промокания насухо в каждую лунку добавляли 50 мкл хромогенного раствора ТМВ для проявления цвета при комнатной температуре в течение 5 минут в отсутствие света, затем в каждую лунку добавляли 50 мкл стоп-раствора для остановки реакции проявления цвета. Сразу после прекращения реакции микропланшет помещали в считывающее устройство для микропланшетов и выбирали длину волны света, равную 450 нм, для считывания значения OD каждой лунки микропланшета. Программное обеспечение SoftMax Pro 6.2.1 использовали для анализа и обработки данных.

Из таблицы 2 и фиг. 2 видно, что результаты считывания при 450 нм показывают, что H26L17 может эффективно связываться с человеческим β -NGF, и эффективность связывания зависит от дозы. Взяв концентрацию антитела в качестве абсциссы и значение оптической плотности в качестве оси ординат, строили 4-параметрическую кривую для аппроксимации, и получали EC_{50} связывания, составляющее 0,071 нМ, что сравнимо с

танезумабом. В таблице 2 представлены результаты анализа активности связывания H26L17 и танезумаба с человеческим β -NGF. Результаты показывают, что связывание H26L17 с антигеном человеческим β -NGF является дозозависимым, при этом EC_{50} связывания составляет 0,071 нМ, что сравнимо с танезумабом.

Таблица 2. Результаты анализа активности связывания H26L17 и танезумаба с антигеном человеческим β -NGF.

Разведение антитела	Значение OD связывания антиген-антитело (450 нм)			
	H26L17		танезумаб	
1 мкг/мл	2,730	2,655	2,770	2,705
1:3	2,704	2,797	2,656	2,553
1:9	2,663	2,605	2,482	2,274
1:27	2,242	2,222	2,166	1,969
1:81	1,613	1,525	1,178	1,266
1:243	0,779	0,735	0,560	0,609
1:729	0,323	0,313	0,227	0,245
0	0,047	0,046	0,044	0,045
EC_{50} (нМ)	0,071		0,103	

Пример 3. Анализ клеточной биологической активности H26L17.

1. Анализ фармакологической активности H26L17 при ингибировании NGF-индуцированной пролиферации клеток TF-1.

Для анализа влияния H26L17 на ингибирование NGF-зависимой пролиферации клеток TF-1, антитела, клетки NGF и TF-1 в различных концентрациях совместно инкубировали, и измеряли пролиферацию клеток через 72 часа культивирования. Конкретные процедуры заключаются в следующем:

Клетки TF-1 собирали центрифугированием и подсчитывали, и в каждую лунку 96-луночного планшета высевали 40000 клеток. Для введения контрольной группе использовали три концентрации NGF: 0,2, 2 и 20 нг/мл, а для группы, получающей антитело, использовали концентрацию 20 нг/мл NGF; антитело использовали в пяти концентрациях: 0,016 нМ, 0,08 нМ, 0,4 нМ, 2 нМ и 10 нМ. Перед введением в клетки премикса NGF/антитело антитело и NGF предварительно инкубировали при 37°C в течение 30 мин. В эксперименте также использовали контрольную группу изотипа. После того, как клетки культивировали в течение 72 часов (пипетировали и гомогенизировали каждые 24 часа) после обработки, пролиферацию клеток измеряли в соответствии с инструкциями тестового набора ССК-8 (для анализа брали 100 мкл жидкости). Стандартная кривая пролиферации клеток показана на фиг.3. Результаты анализа клеточной пролиферации через 72 часа инкубации клеток показаны на фиг.4. Как видно на фиг.4, H26L17 ингибирует стимулирующий эффект NGF на пролиферацию клеток TF-1

дозозависимым образом. В частности, когда концентрация антитела ниже 0,08 нМ, антитело H26L17 значительно лучше ингибирует действие NGF на пролиферацию клеток TF-1, чем танезумаб, антитело положительного контроля.

2. Значение EC_{50} H26L17, нейтрализующее NGF, в эксперименте с H26L17, ингибирующим NGF-индуцированную пролиферацию клеток TF-1.

Для анализа фармакологической активности H26L17 в отношении ингибирования NGF-индуцированной пролиферации клеток TF-1 и вычисления значения EC_{50} H26L17, нейтрализующего NGF, антитела, клетки NGF и TF-1 в различных концентрациях инкубировали совместно, и через 72 часа культивирования измеряли пролиферацию клеток. Ниже приводится краткое описание конкретных процедур или методов:

Клетки TF-1 собирали центрифугированием и в 96-луночный планшет высевали по 40000 клеток на лунку. Для введения в контрольной группе использовали три концентрации NGF: 0,06 нМ, 0,3 нМ и 1,5 нМ. Конечная концентрация NGF в группе премикса NGF/антитела составляла 1,5 нМ, а концентрации антител составляли 0,0468 нМ, 0,07 нМ, 0,105 нМ, 0,158 нМ, 0,237 нМ, 0,356 нМ, 0,533 нМ и 0,8 нМ, соответственно. Перед введением в клетки премикса NGF/антитело антитело и NGF предварительно инкубировали при 37°C в течение 30 мин. В эксперименте использовали контрольную группу с изотипом антитела с концентрацией 1,5 нМ. Через 72 часа культивирования (пипетирования и гомогенизации один раз каждые 24 часа) после обработки, пролиферацию клеток измеряли в соответствии с инструкциями набора для тестирования ССК-8 (для анализа использовали 100 мкл жидкости).

Значения OD для каждой группы, измеренные в эксперименте ССК-8, показаны на фиг. 5. На оси x откладывали логарифм концентрации антител (нМ), а на оси y - значение OD 450 нм, и выполняли подбор кривой доза-эффект для сравнения EC_{50} различных антител; аппроксимирующая кривая показана на фиг. 6. H26L17 может ингибировать NGF-индуцированную пролиферацию клеток TF-1 дозозависимым образом, демонстрируя нейтрализующую NGF активность, которая немного лучше активности коммерчески доступного препарата Танезумаб, применяемого с той же целью. Значение EC_{50} , нейтрализующее NGF, этих двух антител составляют 0,16 нМ и 0,21 нМ, соответственно, где антитело H26L17 оказалось значительно более эффективным по NGF-ингибирующему действию на пролиферацию клеток TF-1, чем танезумаб, антитело положительного контроля.

Пример 4. H26L17 может улучшать ходьбу при пораженной конечности и уменьшить потерю веса в мышинной модели Lenti-IL-1 β -NIN/3T3 боли при артрите коленного сустава.

Пациенты с артритом хромают и имеют другие изменения в поведении из-за боли, а также потерю веса в результате уменьшения потребления пищи из-за плохих эмоций, вызванных болью. Для измерения облегчения, обусловленного анти-NGF антителом, болевого ответа при артрите коленного сустава создавали мышиную модель боли при артрите коленного сустава, вызванной Lenti-IL-1 β -NIN/3T3, и эффективность

лекарственного средства оценивали по улучшению поведения мышей. В этой модели клетки Lenti-IL-1 β -NIH/3T3 сверхэкспрессируют IL-1 β в суставной полости мышей, что, в свою очередь, вызывает воспаление суставов и боль в месте инъекции. В этом эксперименте 60 мышей C57BL/6 делили на 6 групп в соответствии с массой тела, а именно: нормальная группа (физиологический раствор, подкожно), модельная группа (анти-HEL, 20 мг/кг, подкожно), группа танезумаба (танезумаб, 20 мг/кг, подкожно) и группа низкой дозы антитела H26L17 (H26L17, 0,2 мг/кг, подкожно), группа средней дозы (H26L17, 2 мг/кг, подкожно) и группа высокой дозы (H26L17, 20 мг/кг, подкожно), по 10 животных в группе. День группировки обозначен как день 0 (D0). После группировки мышей взвешивали, и вводили подкожно соответствующие лекарственные средства в соответствии с массой тела мыши в объеме введения 10 мл/кг. Лекарственные средства вводили всего три раза подкожно в D0, D3 и D6, соответственно, после группировки. После введения в день группировки 10 мышам C57BL/6 в нормальной группе инокулировали суспензию клеток NIH/3T3 (50000 клеток/мышь) в полость коленного сустава, а другим 50 мышам C57BL/6 в остальных группах инокулировали суспензию клеток Lenti-IL-1 β -NIH/3T3 (50000 клеток/мышь) в полость коленного сустава. Затем после введения в день группировки оценивали поведение мышей в дни D3, D5 и D11.

Результаты влияния анти-NGF антитела на болевую реакцию в коленном суставе у мышей показаны на фиг. 7. По сравнению с танезумабом, антителом положительного контроля (20 мг/кг, подкожно), у группы высокой дозы H26L17 (20 мг/кг, подкожно) болевой ответ был существенно снижен; по сравнению с танезумабом, антителом положительного контроля (20 мг/кг, подкожно) в группе низкой дозы антитела H26L17 (0,2 мг/кг, подкожно) и группе средней дозы H26L17 (2 мг/кг, подкожно) эффект уменьшения боли у мышей был эквивалентным. Результаты анти-NGF антитела в отношении потери веса мышей в мышинной модели боли при артрите коленного сустава показаны на фиг. 8. Эффект уменьшения потери веса в мышинной модели боли при артрите коленного сустава в группах средней и высокой доз антитела H26L17 был эквивалентным эффекту танезумаба, антитела положительного контроля, и более значимым, чем в случае анти-HEL контрольного изотипа.

Выше были подробно описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, но настоящее изобретение не ограничивается этими вариантами осуществления. Специалисты в данной области могут сделать различные эквивалентные модификации или замены, не нарушая сущности настоящего изобретения. Эти эквивалентные модификации или замены включены в объем, определенный формулой изобретения настоящей заявки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело против фактора роста нервов, содержащее тяжелые цепи, содержащие константную область тяжелой цепи и переменную область тяжелой цепи, и легкие цепи, содержащие константную область легкой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи содержит три определяющие комплементарности области HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и переменная область легкой цепи содержит три определяющих комплементарности области LCDR1, LCDR2 и LCDR3;

аминокислотная последовательность определяющей комплементарности области HCDR1 приведена в SEQ ID NO: 5;

аминокислотная последовательность, определяющей комплементарности области HCDR2 приведена в SEQ ID NO: 6;

аминокислотная последовательность, определяющей комплементарности области HCDR3 приведена в SEQ ID NO: 7;

аминокислотная последовательность определяющей комплементарности области LCDR1 приведена в SEQ ID NO: 8;

аминокислотная последовательность определяющей комплементарности области LCDR2 приведена в SEQ ID NO: 9; и

аминокислотная последовательность определяющей комплементарности области LCDR3 приведена в SEQ ID NO: 10.

2. Моноклональное антитело против фактора роста нервов по п.1, в котором аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи приведена в SEQ ID NO: 2; аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи приведена в SEQ ID NO: 4.

3. Моноклональное антитело против фактора роста нервов по п.1, выбранное из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, фрагмента определяющей комплементарности области, одноцепочечного антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела и диатела.

4. Моноклональное антитело против фактора роста нервов по п.1, которое связывается с белком NGF с EC₅₀ менее 100 нМ.

5. Нуклеотидная последовательность, кодирующая моноклональное антитело против фактора роста нервов по п.1 или п.2.

6. Нуклеотидная последовательность по п.5, где нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи приведена в SEQ ID NO: 1; и нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область легкой цепи приведена в SEQ ID NO: 3.

7. Вектор, содержащий нуклеотидную последовательность по п.5 или п.6.

8. Клетка-хозяин, содержащая нуклеотидную последовательность по пп. 5, 6 или 7.

9. Конъюгат моноклонального антитела, содержащий моноклональное антитело против фактора роста нервов по п.1 или п.2 и конъюгированный участок, конъюгированный с ним, где конъюгированный участок представляет собой детектируемую метку.

10. Набор, содержащий моноклональное антитело против фактора роста нервов по п.1 или п.2 и/или конъюгат моноклонального антитела по п.9.

11. Набор по п.10, дополнительно содержащий вторичное антитело, специфически распознающее моноклональное антитело против фактора роста нервов по п.1 или п.2.

12. Применение моноклонального антитела против фактора роста нервов по п.1 или п.2 и/или конъюгата моноклонального антитела по п.9 для получения набора для определения наличия и/или уровня фактора роста нервов.

13. Применение моноклонального антитела против фактора роста нервов по п.1 или п.2 и/или конъюгата моноклонального антитела по п.9 в производстве:

лекарственного средства, которое специфически связывается с фактором роста нервов;

лекарственного средства, ингибирующего зависимость от фактора роста нервов пролиферацию клеток TF-1; и/или

лекарственного средства для лечения или профилактики по меньшей мере одной из невропатической боли, хронической боли и связанной с воспалением боли.

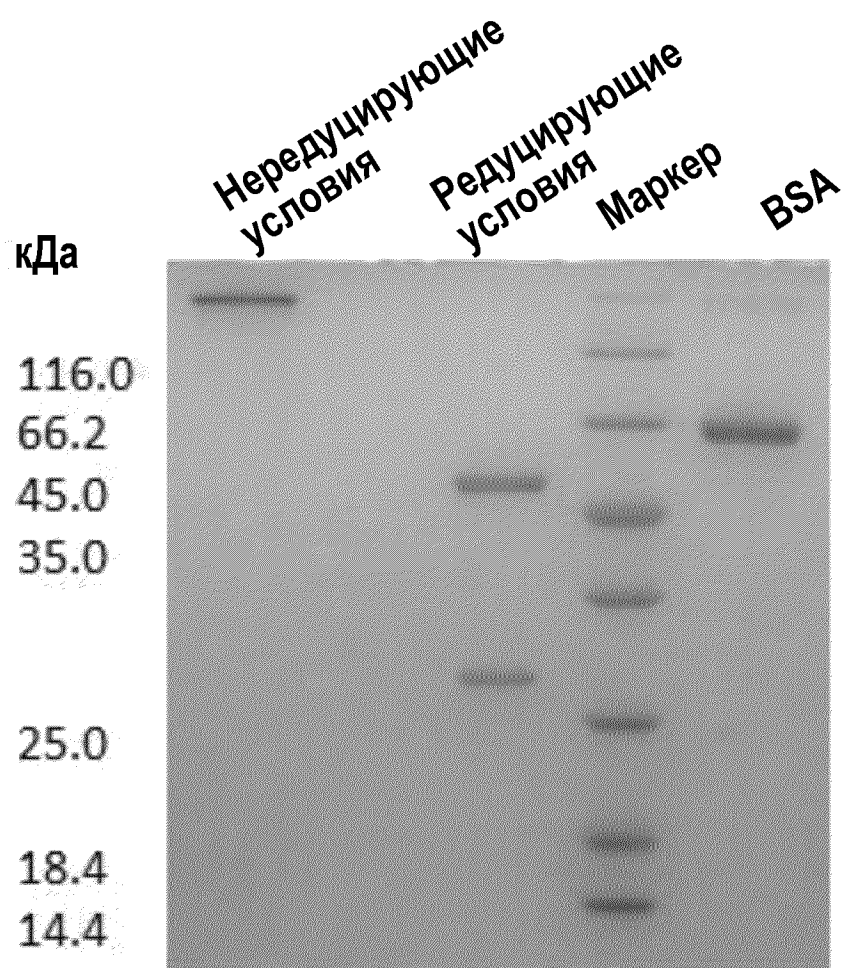
14. Лекарственное средство, содержащее моноклональное антитело против фактора роста нервов по п.1 или п.2 и/или конъюгат моноклонального антитела по п.9 в качестве активного ингредиента и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

15. Лекарственное средство по п.14, которое специфически связывается с фактором роста нервов, обеспечивая таким образом ингибирование зависимой от фактора роста нервов пролиферации клеток TF-1, и/или

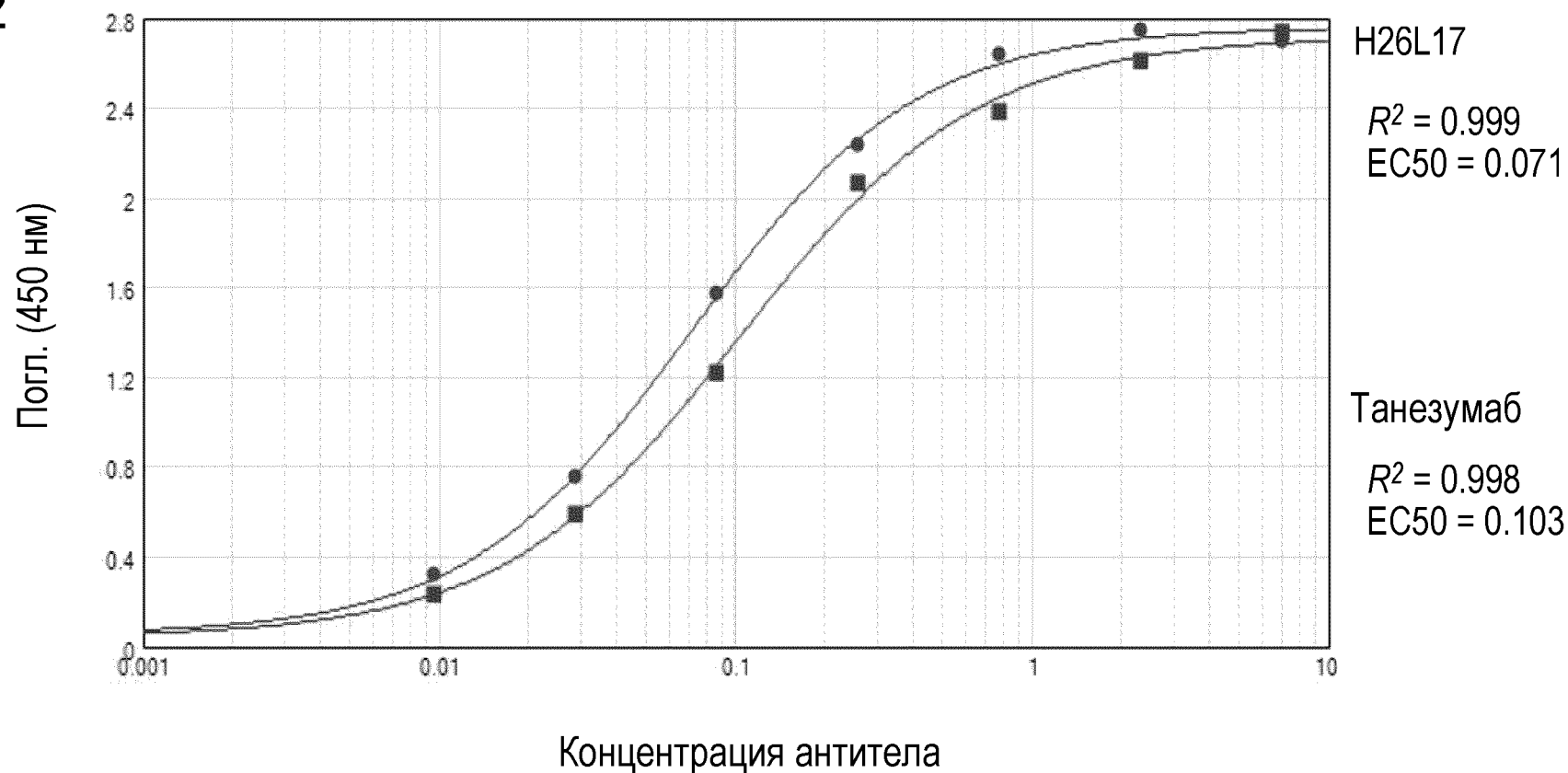
лечение или профилактики по меньшей мере одной из невропатической боли, хронической боли и связанной с воспалением боли.

По доверенности

ФИГ.1



ФИГ.2



2/5

• H26L17 ... в зависимости от концентрации ...)

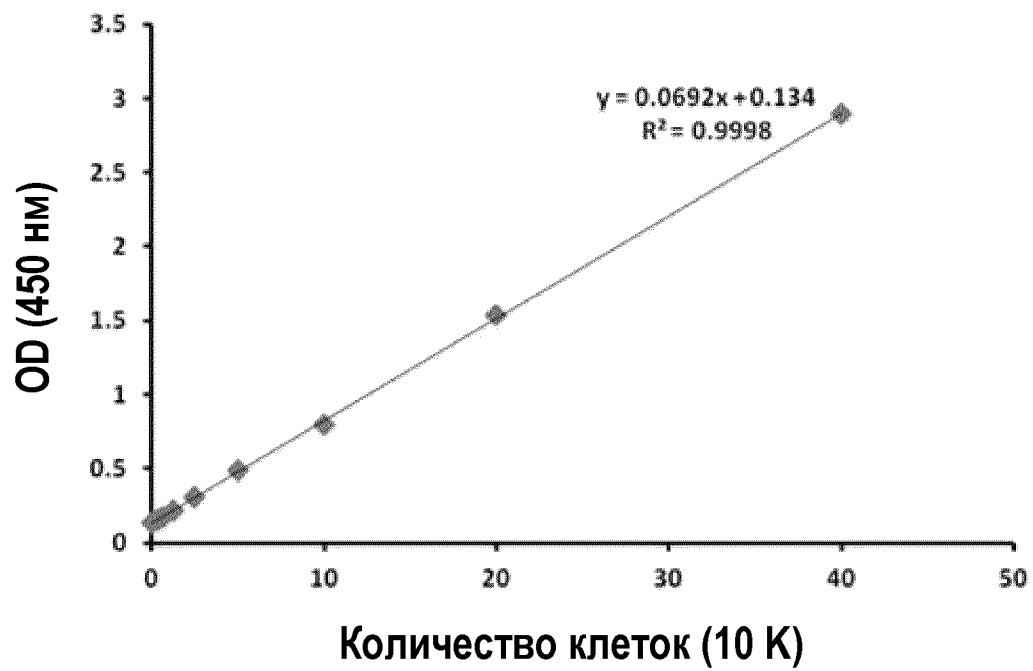
■ Танезумаб (Танезумаб: среднее геометр. ... в зависимости от концентрации ...)

Результат подбора кривой ▲

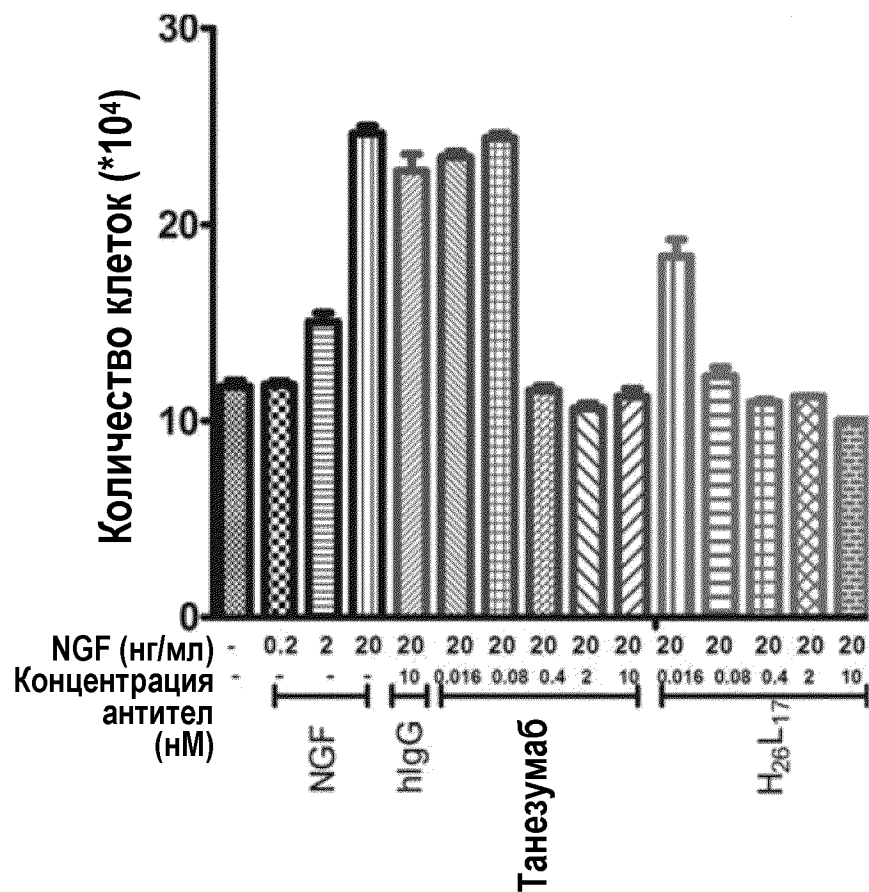
Подбор кривой: 4-параметрическая

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B}$$

ФИГ.3

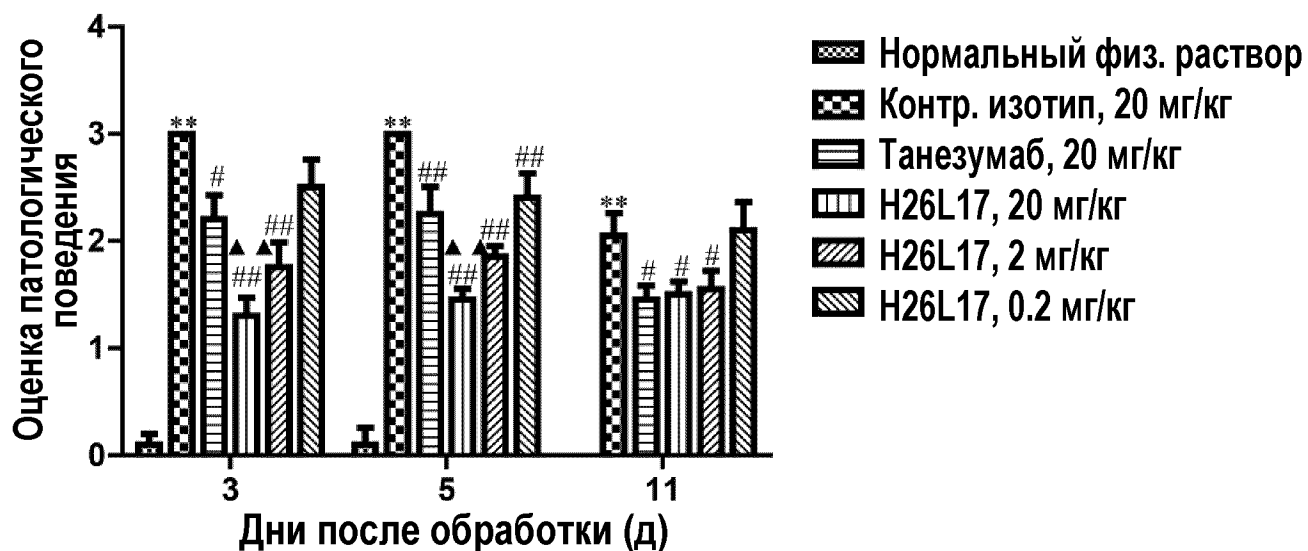


ФИГ.4





ФИГ.7



** $P < 0,01$, в сравнении с нормой

$P < 0,01$, в сравнении с контрольным изотипом

$P < 0,05$, в сравнении с контрольным изотипом

^^ $P < 0,01$, в сравнении с танезумабом

ФИГ.8

