

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390912** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.07.05

(22) Дата подачи заявки
2021.09.27

(51) Int. Cl. *C07K 16/22* (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(54) **СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛИ**

(31) **63/084,358**

(32) **2020.09.28**

(33) **US**

(86) **PCT/EP2021/076524**

(87) **WO 2022/064043 2022.03.31**

(71) Заявитель:
МЕДИММУН ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:

**Уэлш Фрейзер, Чесселл Тарани,
Тан Кит, Остенфелд Тор, Дженкинс
Ричард (GB)**

(74) Представитель:

**Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев
А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.
(RU)**

(57) Изобретение предусматривает новые способы и схемы дозирования для применения в лечении или предупреждении боли, где связывающая молекула содержит домен антагониста NGF и домен антагониста TNF α , где домен антагониста NGF представляет собой антитело к NGF или его антигенсвязывающий фрагмент, и где домен антагониста TNF α содержит растворимый TNF α -связывающий фрагмент TNFR.

A1

202390912

202390912

A1

СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛИ ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0001] Боль является одним из наиболее распространенных симптомов, по поводу которого обращаются за медицинской помощью, и представляет собой основную жалобу половины всех пациентов, посещающих врача. Несмотря на существование и широкое применение многочисленных обезболивающих лекарственных препаратов, устранение боли, в частности хронической боли, не имело успеха. Таким образом, нагрузка на общество остается высокой. По результатам оценки из различных исследований, боль приводит к потере 50 миллионов рабочих дней ежегодно и снижению производительности на 61,2 миллиарда долларов. Среди страдающих хронической болью только приблизительно половина способна справиться с болью с помощью доступных назначаемых вариантов лечения. Таким образом, общий объем рынка рецептурных обезболивающих лекарственных препаратов составляет примерно 25 миллиардов долларов в год.

[0002] Боль представляет собой доминирующий симптом остеоартрита, который является основной причиной инвалидности и источником социальных издержек для лиц пожилого возраста. В условиях стареющего населения с растущей заболеваемостью ожирением данный синдром становится еще более распространенным, чем в предыдущие десятилетия (Hunter & Bierma-Zeinstra *Lancet*, 393:1745-59 (2019)). Существующие средства лечения боли при остеоартрите предусматривают введение низких доз NSAID для перорального применения. Однако вследствие их ассоциации с повышенным уровнем смертности вследствие явлений со стороны сердечно-сосудистой системы, применение NSAID предпочтительно ограничивается кратковременным применением (Kolasinski et al., *Arthritis Care & Research*, 72(2) 149-162 (2020)). Согласно этим данным, сохраняется большая потребность в безопасных и эффективных новых анальгетиках.

[0003] Терапевтические средства, которые снижают уровни в тканях или ингибируют эффекты секретируемого фактора роста нервов (NGF или бета-NGF), потенциально могут представлять собой именно такие новые анальгетики. Хорошо известно, что NGF играет ключевую роль в развитии нервной системы; однако NGF также представляет собой хорошо валидированную мишень для воздействия на боль, поскольку он вызывает боль у животных и людей. В частности, у взрослых NGF способствует здоровью и выживанию подгруппы центральных и периферических нейронов (Huang & Reichardt, *Ann. Rev. Neurosci.* 24:677-736 (2001)). NGF также

способствует модуляции функциональных характеристик этих нейронов и осуществляет тонический контроль над чувствительностью, или возбудимостью, сенсорных болевых рецепторов, называемых ноцицепторами (Priestley *et al.*, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80:495-505 (2002); Bennett, *Neuroscientist* 7:13-17 (2001)). Ноцицепторы воспринимают и передают в центральную нервную систему различные вредные стимулы, которые вызывают восприятие боли (ноцицепцию). Рецепторы NGF расположены на ноцицепторах. Экспрессия NGF повышена в поврежденной и воспаленной ткани и активируется при болевых состояниях у человека. Таким образом, в связи с ролью NGF в ноцицепции NGF-связывающие средства, которые снижают уровни NGF, характеризуются применимостью в качестве анальгетических терапевтических средств.

[0004] Фактор некроза опухоли-альфа (TNF α), также называемый кахектином, представляет собой плеiotропный цитокин с широким спектром биологических активностей, включая цитотоксичность, пролиферацию иммунных клеток, воспаление, опухолеобразование и репликацию вирусов. Kim *et al.*, *J. Mol. Biol.* 374, 1374 (2007). TNF α сначала продуцируется в виде трансмембранного белка (tm TNF α), который затем расщепляется металлопротеиназой до растворимой формы (sTNF α). Wallis, *Lancet Infect. Dis.* 8(10): 601 (2008). TNF α (~17 кДа) существует в виде жесткой гомотримерной молекулы, которая связывается с рецептором 1 TNF или рецептором 2 TNF клеточной поверхности, индуцируя олигомеризацию рецептора и передачу сигнала. Известно, что воспалительные цитокины и, в частности, TNF α играют роль в возникновении гипералгезии. Leung, L., and Cahill, CM., *J. Neuroinflammation* 7:27 (2010). Некоторые предварительные данные продемонстрировали, что ингибиторы TNF α могут быть применимы для контроля нейропатической боли. См., например, Sommer C, *et al.*, *J. Peripher. Nerv. Syst.* 6:67–72 (2001), Cohen et al, *A&A* Feb 2013, 116, 2, 455-462, Genevay *et al.*, *Ann Rheum Dis* 2004, 63, 1120-1123. Результаты клинических исследований по тестированию ингибиторов TNF α в качестве монотерапии в лечении нейропатической боли остаются неубедительными. См. Leung and Cahill (2010).

[0005] Было продемонстрировано, что ранее раскрытая связывающая молекула, содержащая антигенсвязывающий фрагмент, связывающий NGF, и растворимую часть TNFR-2, является мощным ингибитором как NGF, так и TNF α . Более того, было продемонстрировано, что эта связывающая молекула является терапевтически эффективной для снижения признаков боли в животной модели боли. См., например, патент США № 9884911, который включен посредством ссылки во всей своей полноте. Ввиду очевидной терапевтической применимости этих связывающих молекул

существует потребность в улучшенных схемах дозирования связывающих молекул для лечения, например, снижения или предупреждения боли (например, боли при остеоартрите) у субъекта, нуждающегося в этом.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] Настоящее изобретение предусматривает новые способы и схемы дозирования для лечения боли, например, для снижения или предупреждения боли у субъекта, включающие введение субъекту фиксированной дозы связывающей молекулы для подкожного введения, где связывающая молекула содержит часть антагониста NGF и часть антагониста TNF α . В некоторых вариантах осуществления введение контролирует боль у субъекта более эффективно, чем эквивалентное количество антагониста NGF или антагониста TNF α , вводимых по отдельности.

[0007] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способ снижения или предупреждения боли у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту фиксированной дозы связывающей молекулы для подкожного введения, где связывающая молекула содержит домен антагониста NGF и домен антагониста TNF α , где домен антагониста NGF представляет собой антитело к NGF или его антигенсвязывающий фрагмент, где домен антагониста TNF α содержит растворимый TNF α -связывающий фрагмент TNFR, и где способ приводит к снижению или предупреждению боли у субъекта. В некоторых вариантах осуществления фиксированная доза связывающей молекулы для подкожного введения составляет 5-200 мг. В некоторых вариантах осуществления фиксированная доза связывающей молекулы для подкожного введения составляет 7,5-150 мг. В некоторых вариантах осуществления фиксированная доза связывающей молекулы для подкожного введения составляет 7,5, 25, 75 или 150 мг. В некоторых вариантах осуществления фиксированная доза для подкожного введения эквивалентна фиксированной дозе для внутривенного введения, составляющей 30 мг связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления фиксированную дозу вводят по меньшей мере один раз в две недели. В некоторых вариантах осуществления фиксированную дозу вводят в течение по меньшей мере 12 недель. В некоторых вариантах осуществления боль предусматривает хроническую боль. В некоторых вариантах осуществления боль предусматривает боль при остеоартрите. В некоторых вариантах осуществления боль предусматривает боль при остеоартрите в коленном суставе.

[0008] В некоторых вариантах осуществления субъект страдал от боли в течение 3 месяцев или дольше до введения связывающей молекулы. В некоторых вариантах

осуществления боль ассоциирована с воспалением сустава. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется остеоартрит. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется односторонний остеоартрит коленного сустава. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется остеоартрит коленного сустава 2 степени по шкале оценки Келлгрена-Лоуренса (KL) от 0 до 4 согласно оценке центрального эксперта.

[0009] В некоторых вариантах осуществления способ включает до введения связывающей молекулы субъекту: а. введение субъекту NSAID, сильного опиоида, слабого опиоида, ингибитора COX-2, ацетаминофена или их комбинации, и б. определение i) того, что NSAID, сильный опиоид, слабый опиоид, ингибитор COX-2, ацетаминофен или их комбинация не приводит к снижению или предупреждению боли у субъекта, и/или ii) определение того, что субъект характеризуется непереносимостью NSAID, сильного опиоида, слабого опиоида, ингибитора COX-2, ацетаминофена или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления NSAID, сильный опиоид, слабый опиоид, ингибитор COX-2, ацетаминофен или их комбинацию вводят в течение по меньшей мере 2 недель. В некоторых вариантах осуществления NSAID, сильный опиоид, слабый опиоид, ингибитор COX-2, ацетаминофен или их комбинацию вводили субъекту в течение по меньшей мере 2 недель до введения связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется непереносимостью NSAID, сильных опиоидов, слабых опиоидов, ингибиторов COX-2, ацетаминофена (парацетамола) или их комбинации.

[0010] В некоторых вариантах осуществления способ включает тестирование субъекта в отношении инфекции SARS-CoV2 до введения фиксированной дозы связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления тестирование субъекта в отношении инфекции SARS-CoV2 предусматривает тестирование субъекта в отношении генетического материала SARS-CoV2 до введения фиксированной дозы связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления субъект не инфицирован SARS-CoV2 на исходном уровне.

[0011] В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется средним показателем интенсивности боли, составляющим по меньшей мере 5, в суставе, как измерено по числовой шкале оценки (NRS) боли на исходном уровне. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к снижению недельного среднесуточного показателя боли по шкале NRS у субъекта по сравнению с исходным уровнем. В некоторых вариантах осуществления фиксированную дозу вводят один раз в 2 недели в

течение 12 недель, и где способ приводит к снижению недельного среднесуточного показателя боли по шкале NRS у субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере неделе 12. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к снижению недельного среднесуточного показателя боли по шкале NRS у субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере 30%. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к снижению недельного среднесуточного показателя боли по шкале NRS у субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере 50%.

[0012] В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется средним показателем боли при остеоартрите, разработанным Университетами Западного Онтарио и МакМастера (WOMAC), составляющим по меньшей мере 5, в суставе, как измерено с использованием подшкалы оценки боли индекса WOMAC на исходном уровне. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к снижению показателя по подшкале оценки боли WOMAC у субъекта по сравнению с исходным уровнем. В некоторых вариантах осуществления фиксированную дозу вводят один раз в 2 недели в течение 12 недель, и при этом способ приводит к снижению недельного среднесуточного показателя боли по шкале WOMAC у субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере неделе 12. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к снижению показателя по подшкале оценки боли WOMAC у субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере 30%. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к снижению показателя по подшкале оценки боли WOMAC у субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере 50%. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к снижению показателя по подшкале оценки физических симптомов WOMAC у субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере 30%. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к снижению показателя по подшкале оценки физических симптомов WOMAC у субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере 50%.

[0013] В некоторых вариантах осуществления способ приводит к улучшению общей оценки пациентом (PGA) остеоартрита по сравнению с исходным уровнем. В некоторых вариантах осуществления фиксированную дозу вводят один раз в 2 недели в течение 12 недель, и где способ приводит к снижению PGA остеоартрита по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере неделе 12. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к улучшению PGA остеоартрита на по меньшей мере 2 балла.

[0014] В некоторых вариантах осуществления снижение боли наблюдается после введения субъекту однократной дозы связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту NSAID. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту опиоида. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту парацетамола. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту ингибитора COX-2.

[0015] В некоторых вариантах осуществления антитело к NGF или его фрагмент способны ингибировать связывание NGF с TrkA, p75NRT или как с TrkA, так и с p75NRT. В некоторых вариантах осуществления антитело к NGF или его фрагмент предпочтительно блокируют связывание NGF с TrkA по сравнению со связыванием NGF с p75NRT. В некоторых вариантах осуществления антитело к NGF или его фрагмент связывают NGF человека с аффинностью, составляющей приблизительно 0,25-0,44 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VH антитела, содержащий набор CDR HCDR1, HCDR2, HCDR3, и домен VL антитела, содержащий набор CDR LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где HCDR1 характеризуется аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 4 с наличием до двух аминокислотных замен, HCDR2 характеризуется аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 5 с наличием до двух аминокислотных замен, HCDR3 характеризуется аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 6 с наличием до двух аминокислотных замен, SSRIYDFNSALISYYDMDV (SEQ ID NO: 11) или SSRIYDMISLQPYDMDV (SEQ ID NO:12), LCDR1 характеризуется аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 8 с наличием до двух аминокислотных замен, LCDR2 характеризуется аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 9 с наличием до двух аминокислотных замен, и LCDR3 характеризуется аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 10 с наличием до двух аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VH антитела, содержащий набор CDR HCDR1, HCDR2, HCDR3, и домен VL антитела, содержащий набор CDR LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, SSRIYDFNSALISYYDMDV (SEQ ID NO: 11) или SSRIYDMISLQPYDMDV (SEQ ID NO:12), LCDR1 содержит аминокислотную

последовательность под SEQ ID NO: 8, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело к NGF или его фрагмент содержат VH, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3 или 94. В некоторых вариантах осуществления антитело к NGF или его фрагмент содержат VL, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7 или 95. В некоторых вариантах осуществления антитело к NGF или его фрагмент представляют собой полноразмерное антитело H₂L₂, фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab)₂ или одноцепочечный фрагмент Fv (scFv). В некоторых вариантах осуществления антитело к NGF или его фрагмент являются гуманизированными, химерными, приматизированными или полностью человеческими. В некоторых вариантах осуществления фрагмент scFv, связывающий NGF, содержит от N-конца к C-концу VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3, линкерную последовательность из 15 аминокислот (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 15), и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления фрагмент scFv, связывающий NGF, содержит от N-конца к C-концу VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 94, линкерную последовательность из 20 аминокислот (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 19), и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 95.

[0016] В некоторых вариантах осуществления TNFR представляет собой TNFR-2. В некоторых вариантах осуществления фрагмент TNFR-2 слит с доменом Fc иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления домен Fc иммуноглобулина представляет собой домен Fc IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления домен антагониста TNF α содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична аминокислотной

последовательности, представленной под SEQ ID NO: 13, или ее функциональному фрагменту.

[0017] В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула предусматривает слитый белок, который содержит антагонист NGF, слитый с антагонистом TNF α посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула предусматривает гомодимер слитого белка. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула предусматривает гомодимер слитого полипептида, содержащего от N-конца к C-концу TNF α -связывающий фрагмент TNFR-2, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична последовательности, соответствующей аминокислотам 1-235 из SEQ ID NO: 13, домен Fc IgG1 человека, линкерную последовательность из 10 аминокислот (GGGGS)₂ (SEQ ID NO: 98), VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO 3 или 94, линкерную последовательность из 15 аминокислот (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 15), и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7 или 95. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула предусматривает гомодимер слитого полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула предусматривает гомодимер слитого полипептида, содержащего от N-конца к C-концу TNF α -связывающий фрагмент TNFR-2 массой 75 кДа, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13, линкерную последовательность из 10 аминокислот (GGGGS)₂ (SEQ ID NO: 98, VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 94, линкерную последовательность из 20 аминокислот (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 19, и VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 95. В некоторых вариантах осуществления остаток глицина в положении аминокислоты, соответствующем положению 102, 103 или 104 в SEQ ID NO: 7, модифицирован с получением остатка цистеина, и где остаток глицина в положении аминокислоты, соответствующем положению 44 в SEQ ID NO: 3, модифицирован с получением остатка цистеина. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула предусматривает гомодимер слитого полипептида, содержащего

аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула предусматривает гомодимер слитого полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 17.

[0018] Настоящее изобретение предусматривает связывающую молекулу для применения в способе снижения или предупреждения боли у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение субъекту фиксированной дозы связывающей молекулы для подкожного введения, где связывающая молекула содержит домен антагониста NGF и домен антагониста TNF α , где домен антагониста NGF представляет собой антитело к NGF или его антигенсвязывающий фрагмент, где домен антагониста TNF α содержит растворимый TNF α -связывающий фрагмент TNFR, и где способ приводит к снижению или предупреждению боли у субъекта.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0019] Фигура 1: схематическое изображение слитого белка TNFR2-Fc (панель A) и иллюстративной полиспецифической связывающей молекулы, TNFR2-Fc_VH№4, содержащей домен TNFR2-Fc, слитый с доменом scFv, связывающим NGF (панель B).

[0020] На фигуре 2A показаны результаты анализа посредством SEC-HPLC уровней фрагментации агрегатов, мономеров и белков в партии очищенного TNFR2-Fc_VH№4.

[0021] На фигуре 2B показан анализ посредством SDS-PAGE очищенного TNFR2-Fc_VH№4 и очищенного белка TNFR2-Fc в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Порядок загрузки геля: 1. TNFR2-Fc_VH№4, 2. TNFR2-Fc_VL-VH (TNFR2-Fc, слитый с scFv, связывающим NGF, с обратной ориентацией гена переменного домена), 3. TNFR2-Fc, нерелевантный scFv 1, 4. TNFR2-Fc, 5. TNFR2-Fc, нерелевантный scFv 2.

[0022] На фигуре 3A показана чистота TNFR2-Fc_VH№4 после очистки на колонке с белком A. На фигуре 3B показана чистота TNFR2-Fc_VH№4 после второй стадии очистки на колонке с SP-сефарозой.

[0023] На фигуре 4 показан анализ стабильности TNFR2-Fc_VH№4 с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии.

[0024] На фигуре 5 показано связывание TNFR2-Fc_VH№4 с TNF α и NGF как отдельно, так и вместе, как определено посредством ELISA. На фигуре 5A показано

связывание с NGF, на фигуре 5B показано связывание с TNF α , а на фигуре 5C показано одновременное связывание с TNF α и NGF.

[0025] На фигуре 6 показана сенсограмма анализа поверхностного плазмонного резонанса для связывания TNFR2-Fc_VH№4. Конкурентное связывание антигена с полиспецифическим антителом TNFR2-Fc_VH№4 выполняли с использованием BIAcore 2000. Одновременное связывание антигена оценивали посредством серийного связывания TNF α и NGF по сравнению с TNFR2-Fc_VH№4, связанным с поверхностью сенсора. Первая часть сенсограммы демонстрирует связывание насыщающих количеств TNF α с полиспецифическим антителом, вторая часть сенсограммы демонстрирует связывание при нанесении второго антигена, либо повторно TNF α , что демонстрировало насыщение поверхности, либо эквимольной смеси TNF α и NGF. Повышение резонансных единиц приравнивается к связыванию NGF с полиспецифической молекулой и, следовательно, к одновременному вовлечению антигенов. Анализ также проводили с добавлением антигенов в обратном порядке, что подтверждает эти данные.

[0026] На фигуре 7 показано ингибирование NGF-опосредованной пролиферации клеток TF-1. А. NGF-опосредованная пролиферация в отсутствие добавленного антагониста NGF. В. Ингибирование ответа NGF человека посредством TNFR2-Fc_VH№4. С. Ингибирование ответа NGF мыши посредством TNFR2-Fc_VH№4. Активность NGF обычно представляют в виде RLU – относительной единицы люминесценции, и % опосредованной NGF пролиферации рассчитывают как % ответа на лиганд NGF отдельно с использованием следующей формулы: $100 * (RLU \text{ лунки} - \text{фоновая RLU}) / (\text{общая RLU} - \text{фоновая RLU})$, где фоновая RLU = среднее значение для контролей, представляющих собой среду, и общая RLU = среднее значение для контролей только с лигандом. D. Ингибирование ответа NGF человека с помощью TNFR2-Fc_VarB и ндимаба VarB. E. Ингибирование ответа NGF мыши с помощью TNFR2-Fc_VarB и ндимаба VarB.

[0027] На фигуре 8 показано ингибирование индуцированной TNF α активности каспазы 3 в клетках U937. А. TNF α индуцировал активность каспазы 3 в клетках U937 в отсутствие добавленного антагониста TNF α . В. Ингибирование индуцированной TNF α активности каспазы 3 в клетках U937, показанное в виде процента ответа в отсутствие добавленного антагониста. Активность TNF обычно представляют в виде RFU – относительной единицы флуоресценции, и % опосредованного TNF высвобождения каспазы 3 рассчитывали как % ответа на лиганд TNF отдельно с использованием

формулы, описанной выше для фиг. 7С: С. Сходные результаты показаны для родственной молекулы TNFR2-Fc_varB и ндимаба VarB.

[0028] На фигуре 9 показано влияние комбинированного лечения этанерцептом и MEDI-578 на механическую гипералгезию, индуцированную частичным лигированием седалищного нерва. Результаты показаны в виде отношения ипсилатеральная лапа/контралатеральная лапа. N = 9-10 на группу. Данные анализировали с применением 2-факторного анализа ANOVA с временем и обработкой в качестве зависимых факторов. Последующую статистическую значимость получали с применением апостериорного критерия Бонферрони. $***p < 0,001$ по сравнению с контролем Op + CAT-251.

[0029] На фигуре 10А показано влияние TNFR2-Fc_VH№4 на механическую гипералгезию, индуцированную частичным лигированием седалищного нерва. Результаты показаны в виде отношения ипсилатеральная лапа/контралатеральная лапа. N = 10 на группу. Данные анализировали с применением 2-факторного анализа ANOVA с временем и обработкой в качестве зависимых факторов. Последующую статистическую значимость получали с применением апостериорного критерия Бонферрони. $***p < 0,001$ по сравнению с биспецифическим изотипическим контролем. На фигуре 10В показаны сходные результаты для родственной молекулы TNFR2-Fc_varB.

[0030] На фигуре 11 показано влияние совместного введения MEDI-578 и этанерцепта на снижение боли в модели боли в суставах при механической гиперчувствительности. N = 9-10 на группу. Данные анализировали с применением 2-факторного анализа ANOVA. Последующую статистическую значимость получали с применением апостериорного критерия Бонферрони. $*P > 0,05$; $***P < 0,001$ по сравнению с CAT-251.

[0031] На фигуре 12 показано влияние TNFR2-Fc_VH№4 на снижение боли в модели боли в суставах при механической гиперчувствительности. N = 9-10 на группу. Данные анализировали с применением 2-факторного анализа ANOVA. Последующую статистическую значимость получали с применением апостериорного критерия Бонферрони. $***P < 0,001$ по сравнению с биспецифическим изотипическим контролем.

[0032] На фигуре 13 показано влияние пяти различных доз TNFR2-Fc_varB на CFA-индуцированную гипералгезию в крысиной модели.

[0033] Фигура 14: тепловая карта, демонстрирующая соотношения HTRF для реакций фосфо-p38.

[0034] Фигура 15: кривые доза-ответ, демонстрирующие влияние $TNF\alpha$, NGF или комбинации $TNF\alpha$ и NGF на фосфорилирование p38.

[0035] Фигура 16: тепловая карта, демонстрирующая соотношения HTRF для реакций фосфо-ERK.

[0036] Фигура 17: кривые доза-ответ, демонстрирующие влияние $TNF\alpha$, NGF или комбинации $TNF\alpha$ и NGF на фосфорилирование ERK.

[0037] На фигуре 18A показана упрощенная диаграмма исследования чередующихся однократной возрастающей дозы (SAD) и многократных возрастающих доз (MAD). На фигуре 18B в табличной форме показан дизайн исследования для каждой когорты. "RoA" означает путь введения, "IV" означает внутривенный, "SC" означает подкожный. Также представлен прогнозируемый средний процент подавления NGF.

[0038] На фигуре 19A показан график, на котором представлено влияние однократной внутривенной дозы TNFR2-Fc_varB на среднесуточный показатель боли, нанесенный на график в зависимости от времени (дни после введения дозы). Верхняя горизонтальная линия красного цвета представляет собой среднесуточный показатель боли для всех субъектов до введения дозы. Нижняя горизонтальная линия красного цвета представляет собой среднесуточный показатель боли для всех субъектов, получающих плацебо. На фигуре 19B представлена таблица, в которой указаны прогнозируемый средний процент подавления NGF и пиковое изменение по шкале NRS по сравнению с плацебо (PBO) при перечисленных дозах.

[0039] На фигуре 20A представлен график скорректированного по исходному уровню среднего показателя боли по WOMAC после введения TNFR2-Fc_varB. Субъекты отвечают на пять вопросов, которые специально фокусируются на боли (при ходьбе, подъеме по лестнице, в ночное время, в покое и при весовой нагрузке). Каждый вопрос оценивается по 5-балльной шкале (0-4), где 0 означает "нет", и 4 означает "крайне". Чем выше показатель, тем сильнее ощущается боль при выполнении данного вида деятельности (или тем больше воспринимается функциональная недостаточность). Субъекты, отвечающие на все пять вопросов о боли, могут характеризоваться максимальным показателем, составляющим 20, уменьшенным по масштабу до 10 в данном документе для возможности сравнения с показателями боли по шкале NRS. Субъектов просили заполнить опросник в клинике на исходном уровне (за 1 день до введения дозы) и в дни 8, 15, 22, 29 (и для когорт с дозой 250 и 1000 мкг/кг только в дни 43 и 56). На фигуре 20B представлена таблица, в которой представлены р-значения для

сравнений показателей WOMAC для плацебо и различных доз TNFR2-Fc_varB в исследовании SAD.

[0040] На фигуре 21 представлена таблица, демонстрирующая три статистически значимые однократные дозы TNFR2-Fc_varB, измеренный % подавления NGF на пике и в среднем через 2 недели после введения дозы, а в скобках приведены прогнозируемые уровни подавления NGF. Пиковое изменение показателя по подшкале оценки боли WOMAC по сравнению с плацебо также представлено для каждой из этих трех доз. Обратите внимание, что максимальный эффект соответствует измеренному подавлению свободного NGF на 46-55% в дозах, составляющих 50 и 250 мкг/кг соответственно.

[0041] На фигуре 22 показано подавление свободного NGF в плазме крови в результате введения однократных доз TNFR2-Fc_varB. Вкратце, образцы крови брали у каждого субъекта в следующие временные точки: до введения дозы, через 1, 8 и 24 ч после введения дозы, в дни 8, 15, 22, 29 (в дни 43 и 56 только для двух наиболее высоких доз). Образцы плазмы крови получали и анализировали с применением технологии Singulex, Erenna. Рассчитывали подавление свободного NGF и рассчитывали среднее подавление в течение 14-дневного периода после введения дозы при каждой концентрации. Среднее подавление свободного NGF в течение 14 дней находится в диапазоне от 0 (0,3 мкг на кг) до ~65% (1000 мкг на кг).

[0042] На фигуре 23 представлена серия графиков, на которых изображено повышение уровней NGF для каждого субъекта в когортах SAD 1-4 (0,3-50 мкг/кг).

[0043] На фигуре 24 представлен график, на котором изображен процент среднего изменения уровней CXCL-13 по сравнению с исходным уровнем для каждой когорты в зависимости от времени.

[0044] На фигуре 25 показаны средние геометрические фармакокинетические профили TNFR2-Fc_varB (обозначенного как MEDI7352) в сыворотке крови при введении однократных внутривенных доз в диапазоне от 0,3 до 1000 мкг/кг и при введении однократной подкожной дозы, составляющей 50 мкг/кг. На фиг. 25 данные представлены в логарифмическом масштабе. Для доз до 50 мкг/кг образцы собирали до дня 29 после введения дозы. Для доз 250 и 1000 мкг/кг сбор образцов продлевали до дня 43 и дня 56 после введения дозы. Данные для 250 мкг/кг не показаны после дня 29, поскольку значения для всех субъектов в когорте были ниже нижнего предела количественного определения в дни 43 и 56. Для 1000 мкг/кг значения превышали нижний предел количественного определения только у 3 субъектов в день 43 и у 1 субъекта в день 56. LLOQ = нижний предел количественного определения.

[0045] На фигуре 26 показаны средние геометрические фармакокинетические профили TNFR2-Fc_varB (обозначенного как MEDI7352) в сыворотке крови при введении повторных внутривенных доз в диапазоне от 1 до 450 мкг/кг. На фиг. 26А представлены данные в линейном масштабе. На фиг. 26В данные представлены в логарифмическом масштабе. Данные для 1 мкг/кг не показаны после дня 57 после введения дозы, поскольку значения для всех субъектов в когорте были ниже нижнего предела количественного определения в дни 64, 71 и 84. Данные для 50 мкг/кг не показаны для дня 84, поскольку у всех субъектов концентрации были ниже нижнего предела количественного определения. Для 450 мкг/кг не было доступных данных по концентрации после дня 57.

[0046] На фигуре 27 показана максимальная наблюдаемая концентрация TNFR2-Fc_varB в сыворотке крови в день 43 после введения дозы (C_{max} ; верхний график) и ассоциированное с этим изменение показателя боли по шкале WOMAC по сравнению с исходным уровнем (нижний график) после введения повторных внутривенных доз TNFR2-Fc_varB в диапазоне от 1 до 450 мкг/кг.

[0047] На фигуре 28 показаны уровни боли после введения повторных доз TNFR2-Fc_varB. На фиг. 28А показано изменение по сравнению с исходным уровнем боли по шкале NRS с дня 0 до дня 84 у пациентов, которые получали плацебо, 150 мкг/кг или 450 мкг/кг TNFR2-Fc_varB. На фиг. 28В сравниваются эффекты введения повторных доз TNFR2-Fc_varB с 2,5 мг танезумаба, 5 мг танезумаба, 40 мг оксикодона или плацебо. На фиг. 28С показано снижение боли, определенное по изменению по подшкале оценки боли WOMAC по сравнению с исходным уровнем, индуцированное различными дозами фасинумаба, фулранумаба, TNFR2-Fc_varB (обозначенного как MEDI7352) и танезумаба.

[0048] На фигуре 29 показано влияние титра ADA на концентрацию TNFR2-Fc_varB (обозначенного как MEDI7352) и облегчение боли, определенное по изменению по подшкале оценки боли WOMAC (верхний график), или боли по подшкале NRS (нижний график).

[0049] На фигуре 30 показан средний геометрический фармакокинетический профиль TNFR2-Fc_varB в сыворотке крови при введении однократных внутривенных доз в диапазоне от 0,3 до 1000 мкг/кг и повторных внутривенных доз в диапазоне от 1 до 450 мкг/кг, категоризированных по уровням титра ADA.

[0050] На фигуре 31 представлена диаграмма рассеяния клиренса TNFR2-Fc_varB в зависимости от веса тела после введения 4 доз два раза в неделю. В условных

обозначениях указаны номера когорт MAD и дозы TNFR2-Fc_varB. Данные по клиренсу получали из некомпартментного анализа. На диаграмме показан анализ линейной регрессии (сплошная линия) с 95% доверительными интервалами (пунктирные линии). р-значение, составляющее 0,61, указывает на отсутствие значимой ассоциации между клиренсом и весом.

[0051] На фигуре 32 показана упрощенная диаграмма исследования подкожного введения фиксированной дозы.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Определения

[0052] Следует отметить, что форма единственного числа объекта относится к одному или нескольким таким объектам. В связи с этим формы единственного числа, выражения "один или несколько" и "по меньшей мере один" можно использовать в данном документе взаимозаменяемо.

[0053] Кроме того, выражение "и/или", в случае его использования в данном документе, следует рассматривать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом, подразумевается, что термин "и/или", используемый в данном документе в такой фразе, как "А и/или В", включает "А и В", "А или В", "А" (отдельно) и "В" (отдельно). Аналогично, подразумевается, что термин "и/или", используемый в такой фразе, как "А, В и/или С", охватывает каждый из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно).

[0054] Следует понимать, что во всех случаях, если аспекты описываются в данном документе формулировкой "содержащий", также предусмотрены в иных отношениях аналогичные аспекты, описанные терминами "состоящий из" и/или "состоящий по сути из".

[0055] Термин "приблизительно" или "примерно" означает в пределах приемлемого диапазона погрешности для конкретного значения, как определено специалистом в данной области, что будет частично зависеть от того, как значение измеряют или определяют, т. е. от ограничений системы измерения. Например, "приблизительно" может означать в пределах одного или более чем одного стандартного отклонения в соответствии с практикой в уровне техники. В качестве альтернативы, "приблизительно" может означать диапазон до 20%, до 15%, до 10%, до 5% или до 1% выше или ниже конкретного значения.

[0056] Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое общеизвестно специалисту средней квалификации в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Например, the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; the Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press обеспечивают специалиста общим словарем многих терминов, используемых в настоящем изобретении.

[0057] Единицы измерения, префиксы и символы обозначены в их форме, которая принята согласно Международной системе единиц (SI). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, то аминокислотные последовательности записаны слева направо в направлении от аминоконца к карбоксиконцу. Приведенные в данном документе заголовки не ограничивают различные аспекты настоящего изобретения, которые могут обеспечиваться ссылкой на описание в целом. Исходя из этого, термины, определение которых приводится непосредственно ниже, более полно определяются ссылкой на описание во всей его полноте.

[0058] Используемый в данном документе термин "связывающая молекула" относится в своем самом широком смысле к молекуле, которая специфически связывается с антигенной детерминантой например, антигеном. Неограничивающий пример связывающей молекулы включает антитела или их фрагменты, слитые белки, состоящие из растворимых рецепторов, или их фрагменты, каркасы, отличные от каркасов иммуноглобулинов, или их фрагменты, каждый из которых сохраняет антигенспецифическое связывание. Иллюстративные слитые белки, состоящие из растворимых рецепторов и антител, представлены ниже. В определенных вариантах осуществления связывающая молекула может быть сконструирована таким образом, чтобы она содержала комбинации таких антител или их фрагментов, слитых белков, состоящих из растворимых рецепторов, или их фрагментов, а также каркасов, отличных от каркасов иммуноглобулинов, или их фрагментов.

[0059] Связывающая молекула или любая часть связывающей молекулы, которая распознает антиген, обозначается в данном документе как "связывающий домен". Если конкретно не ссылаются на полноразмерные связывающие молекулы, такие как встречающиеся в природе антитела, термин "связывающая молекула" охватывает без ограничения полноразмерные антитела или другие отличные от антител связывающие

молекулы, а также антигенсвязывающие фрагменты, варианты, аналоги или производные таких связывающих молекул, например, встречающиеся в природе молекулы антител или иммуноглобулинов или сконструированные связывающие молекулы или фрагменты, которые связывают антиген способом, аналогичным полноразмерной связывающей молекуле.

[0060] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает определенные полиспецифические связывающие молекулы, например, биспецифические, триспецифические, тетраспецифические и т. п. связывающие молекулы или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные. Как используется в данном документе, полиспецифическая связывающая молекула может содержать один или несколько связывающих доменов антитела, один или несколько связывающих доменов, полученных не из антитела, или их комбинацию.

[0061] Термин "фактор роста нервов" ("NGF"), также обозначаемый в литературе как фактор роста нервов бета, как используется в данном документе, относится к секретлируемому белку, который участвует в росте и выживании различных нейронов. NGF человека представлен в Genbank под номером доступа NP_002497.2 и представлен в данном документе под SEQ ID NO: 1. Используемый в данном документе термин NGF не ограничивается NGF человека и включает все ортологи разновидностей NGF человека. Термин "NGF" охватывает проформу NGF, про-NGF, полноразмерный NGF, а также любую форму NGF, которая образуется в результате процессинга в клетке. Термин также охватывает встречающиеся в природе варианты NGF, например, сплайс-варианты, аллельные варианты и изоформы. NGF способен связываться с двумя рецепторами: рецептором нейротрофина р75 (p75(NTR)) и TrkA, трансмембранной тирозинкиназой. Известно, что NGF является хорошо валидированной мишенью для боли, опосредующей сенсibilизацию ноцицепторов.

[0062] NGF-опосредованная боль является особенно хорошо подходящей для безопасного и эффективного лечения связывающими молекулами, представленными в данном документе, поскольку уровни NGF повышаются на периферии в ответ на вредные стимулы, и антитела характеризуются низкой проницаемостью через гематоэнцефалический барьер. В литературе можно найти ряд антител к NGF и их антигенсвязывающих фрагментов, которые можно применять в средствах терапии и композициях, описанных в данном документе, см., например, публикации согласно РСТ №№ WO02/096458 и WO04/032870.

[0063] Термин "MEDI-578" относится к антителу, которое специфически связывает NGF, которое является объектом международной заявки № PCT/GB2006/000238 и публикации заявки на патент США № 2008/0107658 A1, обе из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Последовательности тяжелой и легкой цепи MEDI-578 показаны под SEQ ID NO: 3 и 7 соответственно.

[0064] Термин NGF-NG относится к антителу, которое специфически связывает NGF. Последовательности тяжелой и легкой цепи NGF-NG показаны под SEQ ID NO: 24 и 26 соответственно.

[0065] Термин "фактор некроза опухоли альфа" ("TNF α "), также обозначаемый в литературе как кахектин, белок APC1; фактор некроза опухоли; TNF или представитель 2 суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли, как используется в данном документе, относится к конкретному белку TNF α , а не к суперсемейству лигандов TNF. TNF α человека представлен в Genbank под номером доступа NP_000585.2 и представлен под SEQ ID NO: 2. Используемый в данном документе термин TNF α не ограничивается TNF человека и включает все ортологи разновидностей TNF α человека. Термин "TNF α " охватывает проформу TNF α , про-TNF α , полноразмерный TNF α , а также любую форму TNF α , которая образуется в результате процессинга в клетке. Термин также охватывает встречающиеся в природе и не встречающиеся в природе варианты TNF α , например, сплайс-варианты, аллельные варианты и изоформы. TNF α способен связывать два рецептора, TNFR1 (рецептор TNF типа 1; CD120a; p55/60) и TNFR2 (рецептор TNF типа 2; CD120b; p75/80). TNF α функционирует в качестве провоспалительного цитокина, например, функционирующего при нейровоспалении. Например, считается, что TNF α функционально участвует в возникновении нейропатической боли (Leung, L., and Cahill, SM., *J. Neuroinflammation* 7:27 (2010)).

[0066] "Выделенная" связывающая молекула, полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетка-хозяин или композиция относятся к связывающей молекуле, полипептиду, антителу, полинуклеотиду, вектору, клетке-хозяину или композиции, которые находятся в форме, не встречающейся в природе. Выделенные связывающие молекулы, полипептиды, антитела, полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева или композиции включают таковые, которые были изменены, адаптированы, объединены, перегруппированы, сконструированы или иным образом обработаны до такой степени, что они больше не представлены в форме, в которой они встречаются в природе. В некоторых аспектах связывающая молекула, антитело, полинуклеотид,

вектор, клетка-хозяин или композиция, которые являются выделенными, являются "рекомбинантными".

[0067] Используемые в данном документе термины "полифункциональный полипептид" и "бифункциональный полипептид" относятся к не встречающейся в природе связывающей молекуле, разработанной для нацеливания на два или более антигенов. Иллюстративный полифункциональный полипептид, описанный в данном документе, представляет собой полифункциональную связывающую молекулу, содержащую антигенсвязывающий фрагмент, связывающий NGF, или часть антитела, и растворимую часть TNFR2.

[0068] Термин "антитело" означает молекулу иммуноглобулина, которая распознает мишень, такую как белок, полипептид, пептид, углевод, полинуклеотид, липид или комбинации вышеуказанных, и специфически связывается с ней посредством по меньшей мере одного антигенраспознающего сайта в пределах вариабельной области молекулы иммуноглобулина. Используемый в данном документе термин "антитело" охватывает интактные поликлональные антитела, интактные моноклональные антитела, фрагменты антител (такие как Fab-, Fab'-, F(ab')₂ и Fv-фрагменты), одноцепочечные мутантные варианты Fv (scFv), полиспецифические антитела, такие как биспецифические, триспецифические, тетраспецифические и т. п. антитела, полученные из по меньшей мере двух интактных антител, химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, слитые белки, содержащие антигенопределяющую часть антитела, а также любую другую модифицированную молекулу иммуноглобулина, содержащую антигенраспознающий сайт, при условии, что антитела проявляют требуемую биологическую активность. Антитело может относиться к любому из пяти основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM или их подклассов (изотипов) (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) на основании идентичности их константных доменов тяжелой цепи, обозначаемых соответственно как альфа, дельта, эpsilon, гамма и мю. Разные классы иммуноглобулинов имеют различные и хорошо известные структуры субъединиц и трехмерные конфигурации.

[0069] В некоторых вариантах осуществления "блокирующая" связывающая молекула, например, блокирующее антитело или "антагонистическая" связывающая молекула, такая как, например, антагонистическое антитело или слитый белок, представляет собой молекулу, которая ингибирует или снижает биологическую активность антигена, с которым она связывается, такого как NGF или TNF α . В определенных аспектах блокирующие антитела или антагонистические связывающие

молекулы в значительной степени или полностью ингибируют биологическую активность антигена. Например, биологическая активность может быть снижена на 0,01%, 0,1%, 0,5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% или даже 100%.

[0070] Используемые в данном документе термины "антагонисты" и "домены антагониста" включают полипептиды или другие молекулы, которые связываются со своей мишенью (например, TNF α или NGF), за счет чего осуществляется блокирование или ингибирование взаимодействия мишени с рецептором. Таким образом, антагонисты NGF и/или TNF α предусматривают молекулы, которые блокируют или ингибируют взаимодействие NGF с trkA или нейротрофином p75 или взаимодействие TNF α с TNFR-1 или TNFR-2. Антагонисты NGF и/или TNF α также предусматривают молекулы, которые снижают фосфорилирование p38 и/или фосфорилирование ERK. Иллюстративные антагонисты включают без ограничения антитела к NGF или их антигенсвязывающие фрагменты и специфические в отношении мишени, растворимые, не передающие сигнал пептиды рецептора TNF-альфа ("рецепторы-приманки" или их лиганд-связывающие фрагменты).

[0071] Термин "фрагмент антитела" относится к части интактного антитела и относится к определяющим антиген вариабельным областям интактного антитела. Примеры фрагментов антитела включают без ограничения Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагменты, линейные антитела, одноцепочечные антитела и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. В настоящем изобретении также предусмотрены антигенсвязывающие фрагменты связывающих молекул, отличных от антител, описанных в других разделах в данном документе.

[0072] "Моноклональное антитело" относится к гомогенной популяции антител, участвующих в высокоспецифическом распознавании и связывании одной антигенной детерминанты или эпитопа. Этим они отличаются от поликлональных антител, которые, как правило, включают различные антитела, направленные против различных антигенных детерминант. Термин "моноклональное антитело" охватывает как интактные и полноразмерные моноклональные антитела, так и фрагменты антител (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные (scFv) мутантные варианты, слитые белки, содержащие часть антитела, и любые другие модифицированные молекулы иммуноглобулина, содержащие антигенраспознающий сайт. Кроме того, "моноклональное антитело" относится к таким антителам, которые получены любым из ряда способов, в том числе без ограничения посредством гибридомы, отбора с помощью фагов, рекомбинантной экспрессии и с использованием трансгенных животных.

[0073] Термин "гуманизированное" антитело относится к формам антител, отличных от человеческих (например, мышинных), которые представляют собой специфические цепи иммуноглобулинов, химерные иммуноглобулины или их фрагменты, которые содержат минимальные последовательности, отличные от человеческих (например, мышинные). Гуманизированные антитела обычно представляют собой человеческие иммуноглобулины, в которых остатки из области, определяющей комплементарность (CDR), заменены остатками из CDR видов, отличных от человека (например, мыши, крысы, кролика или хомяка), которые характеризуются требуемой специфичностью, аффинностью и функциональной способностью (Jones *et al.*, 1986, *Nature*, 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature*, 332:323-327; Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science*, 239:1534-1536). В некоторых случаях остатки каркасной области (FR или FW) Fv человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими остатками антитела из вида, отличного от человека, которое характеризуется требуемой специфичностью, аффинностью и функциональной способностью. Гуманизированное антитело можно дополнительно модифицировать посредством замены дополнительных остатков в каркасной области Fv и/или в замененных остатках, отличных от человеческих, для усовершенствования и оптимизации специфичности, аффинности и/или функциональной способности антитела. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать практически все из по меньшей мере одного и обычно двух или трех переменных доменов, содержащих все или практически все из CDR-областей, которые соответствуют таковым у иммуноглобулина, отличного от человеческого, тогда как все или практически все из FR-областей являются таковыми из консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело также может содержать по меньшей мере часть константной области или домена (Fc) иммуноглобулина, как правило, человеческого иммуноглобулина. Примеры способов, применяемых для получения гуманизированных антител, описаны в патенте США 5225539 или 5639641.

[0074] "Переменная область" антитела относится к переменной области легкой цепи антитела или переменной области тяжелой цепи антитела либо по отдельности, либо в комбинации. Каждая из переменных областей тяжелой и легкой цепей состоит из четырех каркасных областей (FR или FW), соединенных тремя определяющими комплементарность областями (CDR), также известными как гиперпеременные области. В каждой цепи CDR удерживаются вместе в непосредственной близости друг к другу помощью FR и вместе с CDR из другой цепи

участвуют в образовании антигенсвязывающего сайта антител. Существует по меньшей мере две методики определения CDR: (1) подход, основанный на межвидовой вариабельности последовательностей (т. е. Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)), и (2) подход, основанный на кристаллографических исследованиях комплексов антиген-антитело (Al-lazikani *et al.* (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948)). Кроме того, для определения CDR в данной области техники иногда используют комбинации этих двух подходов.

[0075] Обычно при обозначении остатка в вариабельном домене (примерно остатки 1-107 легкой цепи и остатки 1-113 тяжелой цепи) применяют систему нумерации согласно Kabat (например, Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

[0076] Нумерация аминокислотных положений согласно Kabat относится к системе нумерации, применяемой к вариабельным доменам тяжелой цепи или вариабельным доменам легкой цепи антител в соответствии с собранными сведениями в Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). При применении данной системы нумерации фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество аминокислот или дополнительные аминокислоты, соответствующие укорочению FR или CDR вариабельного домена или вставке в них. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может содержать вставку из одной аминокислоты (остаток 52a согласно Kabat) после остатка 52 в H2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c и т. д. согласно Kabat) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерацию остатков согласно Kabat можно определить для данного антитела путем выравнивания последовательности антитела со "стандартной" последовательностью, пронумерованной согласно Kabat, в областях гомологии. В отличие от этого, Chothia ссылается на расположение структурных петель (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Конец петли CDR-H1 согласно Chothia при нумерации с использованием системы нумерации согласно Kabat варьируется от H32 до H34 в зависимости от длины петли (это обусловлено тем, что в соответствии со схемой нумерации согласно Kabat вставки расположены в H35A и H35B; при этом если не присутствуют ни 35A, ни 35B, то петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, то петля заканчивается на 33; если присутствуют как 35A, так и 35B, то петля заканчивается на 34). Определение гипервариабельных областей согласно AbM

представляет собой компромисс между определением CDR согласно Kabat и структурных петель согласно Chothia и используется в программном обеспечении для моделирования антител AbM от Oxford Molecular. Сравнение представлено в таблице 1 ниже.

Таблица 1. Сравнение систем нумерации антител

Петля	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
		Нумерация согласно Kabat	
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
		Нумерация согласно Chothia	
H2	H-50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0077] Термин "человеческое антитело" означает нативное человеческое антитело или антитело, характеризующееся аминокислотной последовательностью, соответствующей нативному человеческому антителу, полученное с применением любой методики, известной из уровня техники. Это определение человеческого антитела включает интактные или полноразмерные антитела, их фрагменты и/или антитела, содержащие по меньшей мере один полипептид человеческой тяжелой и/или легкой цепи, как, например, антитело, содержащее полипептиды мышинной легкой цепи и человеческой тяжелой цепи.

[0078] Термин "химерные антитела" относится к антителам, в которых аминокислотная последовательность молекулы иммуноглобулина происходит из двух или более видов. Варибельная область как легкой, так и тяжелой цепей, как правило, соответствует варибельной области антител, происходящих из одного вида млекопитающих (например, мыши, крысы, кролика и т. п.), с требуемой специфичностью, аффинностью и функциональной способностью, тогда как константные области гомологичны последовательностям в антителах, происходящих из другого вида (обычно человека), во избежание индукции иммунного ответа у этого вида. Полиспецифические связывающие молекулы, например, содержащие один или несколько связывающих доменов антитела, один или несколько связывающих доменов, полученных не из антитела, или их комбинацию, например, антагонисты TNF α и/или антагонисты NGF, предусмотренные в данном документе, могут содержать константные области антитела (например, области Fc), в которых по меньшей мере часть одного или

нескольких доменов константной области была подвергнута делеции или иным образом изменена с получением требуемых биохимических характеристик, таких как повышенная локализация в опухоли или сокращенный период полужизни в сыворотке крови, по сравнению с антителом с примерно такой же иммуногенностью, содержащим нативную или неизмененную константную область. Модифицированные константные области, предусмотренные в данном документе, могут предусматривать изменения или модификации одного или нескольких из трех константных доменов тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) и/или константного домена легкой цепи (CL). В некоторых аспектах один или несколько константных доменов могут быть частично или полностью делетированы. В некоторых аспектах может быть делетирован весь домен CH2 (конструкции Δ CH2). См., например, Oganessian V, *et al.*, 2008 *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 64:700-4; Oganessian V, *et al.*, *Mol Immunol.* 46:1750-5; Dall'Acqua, W.F., *et al.*, 2006. *J. Biol. Chem.* 281:23514–23524; и Dall'Acqua, *et al.*, 2002. *J. Immunol.* 169:5171–5180.

[0079] Термины "эпитоп" или "антигенная детерминанта" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к той части антигена, которая способна распознаваться и специфически связываться конкретным антителом. Если антиген представляет собой полипептид, эпитопы могут быть образованы как смежными аминокислотами, так и несмежными аминокислотами, расположенными рядом за счет сворачивания белка в третичную структуру. Эпитопы, образованные смежными аминокислотами, как правило, сохраняются при денатурации белка, тогда как эпитопы, образованные за счет сворачивания белка в третичную структуру, как правило, утрачиваются при денатурации белка. Эпитоп, как правило, содержит по меньшей мере 3 и чаще по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Эпитоп, как описано в данном документе, не обязательно должен быть определен до конкретных аминокислот, которые образуют эпитоп. В некоторых аспектах эпитоп можно идентифицировать посредством изучения связывания с пептидными субъединицами полипептидного антигена или посредством изучения конкуренции за связывание с антигеном группой антиген-специфических антител.

[0080] Под "субъектом", или "индивидуумом", или "животным", или "пациентом", или "млекопитающим" подразумевается любой субъект, в частности субъект-млекопитающее, для которого требуется постановка диагноза, прогнозирование или терапия. Субъекты-млекопитающие включают людей, домашних животных, сельскохозяйственных животных, животных, используемых в спорте, и зоопарковых животных, в том числе, например, людей, приматов, отличных от человека, собак, кошек,

морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупный рогатый скот, медведей и т. п.

[0081] Термины "композиция" и "фармацевтическая композиция" относятся к препарату, который находится в такой форме, чтобы обеспечивать эффективность биологической активности активного ингредиента, и который не содержит дополнительных неприемлемо токсичных компонентов для субъекта, которому будут вводить композицию. Такие композиции могут быть стерильными.

[0082] Используемые в данном документе термины "эффективное количество" и "терапевтически эффективное количество" относятся к количеству одной или нескольких терапевтических композиций, эффективных для лечения или контроля боли у субъекта. Термины "лечить боль", "контролировать боль" и грамматические эквиваленты используются в данном документе для описания любого благоприятного или требуемого эффекта у субъекта, нуждающегося в контроле боли. Например, эффективное количество одной или нескольких терапевтических композиций, описанных в данном документе, может, например, приводить к предупреждению боли, поддержанию переносимого уровня боли, облегчению боли, снижению боли, сведению боли к минимуму и/или устранению боли у субъекта. В частности, термины "лечить боль", "контролировать боль" и грамматические эквиваленты используются в данном документе для описания снижения боли и/или предупреждения боли.

[0083] Используемый в данном документе термин "введение" относится к введению субъекту одной или нескольких терапевтических композиций, описанных в данном документе, например, бифункционального полипептида, содержащего домен антагониста NGF и домен антагониста TNF α . Термин "совместное введение" относится к введению субъекту двух или более терапевтических композиций. Используемый в данном документе термин "совместное введение" предусматривает, но не требует, чтобы две или более терапевтических композиций вводились субъекту одновременно. Две или более терапевтических композиций можно вводить субъекту последовательно, например, с интервалом в тридцать минут, с интервалом в один час, с интервалом в два часа, с интервалом в три часа, с интервалом в четыре часа или с интервалом в пять часов или больше. Последовательность и время совместного введения, как описано в данном документе, могут быть фиксированными или могут варьироваться на основании суждения профессионала в области здравоохранения.

[0084] Термины "полинуклеотид" и "нуклеиновая кислота" относятся к полимерному соединению, состоящему из ковалентно связанных нуклеотидных

остатков. Полинуклеотиды могут представлять собой ДНК, кДНК, РНК, однонитевые или двухнитевые, векторы, плазмиды, фаг или вирусы.

[0085] Термин "вектор" означает конструкцию, которая способна доставлять в клетку-хозяина и экспрессировать в клетке-хозяине один или несколько генов или последовательностей, представляющих интерес. Примеры векторов включают без ограничения вирусные векторы, векторы экспрессии на основе "голой" ДНК или РНК, плазмиды, космиды или фаговые векторы, векторы экспрессии на основе ДНК или РНК, ассоциированные с катионными конденсирующими средствами, векторы экспрессии на основе ДНК или РНК, инкапсулированные в липосомы, а также определенные эукариотические клетки, такие как клетки-продуценты.

[0086] Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются в данном документе взаимозаменяемо по отношению к полимерам из аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, может содержать модифицированные аминокислоты и его могут разделять компоненты, отличные от аминокислот. Данные термины также охватывают полимер из аминокислот, который был модифицирован естественным путем или посредством вмешательства; например, посредством образования дисульфидной связи, гликозилирования, липидизации, ацетилирования, фосфорилирования или любой другой манипуляции или модификации, такой как конъюгирование с метящим компонентом. В объем данного определения также включены, например, полипептиды, содержащие один или несколько аналогов аминокислот (в том числе, например, неприродные аминокислоты и т.п.), а также другие модификации, известные из уровня техники.

[0087] "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой один аминокислотный остаток заменяется другим аминокислотным остатком со сходной боковой цепью. Семейства аминокислотных остатков со сходными боковыми цепями были определены в данной области техники и включают основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), незаряженные полярные боковые цепи (например, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Например, замена фенилаланина тирозином является консервативной заменой. В определенных аспектах консервативные замены в последовательностях полипептидов и

антител, предусмотренных в данном документе, не устраняют связывающую или другую функциональную активность полипептида, содержащего аминокислотную последовательность. Способы идентификации нуклеотидных и аминокислотных консервативных замен, которые не влияют на функцию, хорошо известны из уровня техники (см., например, Brummell *et al.*, *Biochem.* 32: 1180-1 187 (1993); Kobayashi *et al.* *Protein Eng.* 12:879-884 (1999); и Burks *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

Связывающая молекула, содержащая домен антагониста NGF и домен антагониста TNF α

[0088] В настоящем изобретении предусмотрен бифункциональный полипептид, содержащий домен антагониста NGF и домен антагониста TNF α , для применения в любом из способов, раскрытых в данном документе (например, в соответствии с любой из схем дозирования, раскрытых в данном документе). В определенных аспектах введение эффективного количества бифункционального полипептида, предусмотренного в данном документе, может контролировать боль у субъекта, нуждающегося в этом, более эффективно, чем эквивалентное количество антагониста NGF или антагониста TNF α , вводимых по отдельности. Бифункциональные полипептиды, предусмотренные в данном документе, могут содержать домен антагониста NGF и домен антагониста TNF α в любом порядке, структуре или конформации. Любые подходящие антагонисты NGF или антагонисты TNF α могут быть частью бифункционального полипептида, предусмотренного в данном документе. В настоящем изобретении описаны иллюстративные антагонисты NGF и антагонисты TNF α .

[0089] В определенных аспектах антагонист NGF представляет собой антитело к NGF или его антигенсвязывающий фрагмент. В определенных аспектах антагонист, связывающий NGF, например, антагонистическое антитело или его фрагмент для применения в бифункциональной молекуле, предусмотренной в данном документе, например, полиспецифической связывающей молекуле, может предпочтительно блокировать связывание NGF с TrkA по сравнению со связыванием NGF с p75NRT.

[0090] Иллюстративные антитела или их фрагменты для применения в бифункциональных полипептидах, например, полиспецифических связывающих молекулах, раскрытых в данном документе, доступны в публикации заявки на патент США № 2008/0107658, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В определенных аспектах антитело к NGF или его фрагмент связываются с одним и тем же эпитопом, способны конкурентно ингибировать или

способны связываться с NGF с более высокой аффинностью, чем антитело MEDI-578 к NGF. В определенных вариантах осуществления антитело к NGF или его фрагмент связывают NGF человека и/или NGF крысы с аффинностью, составляющей 1, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3 или 0,2 нМ или меньше. Например, антитело к NGF или его фрагмент могут связывать NGF человека с аффинностью, составляющей приблизительно 0,2-0,8, 0,2-0,7, 0,2-0,6, 0,2-0,5 и/или 0,25-0,44 нМ, и NGF крысы с аффинностью, составляющей приблизительно 0,2-0,9, 0,2-0,8 и/или 0,25-0,70 нМ.

[0091] В определенных аспектах антитело к NGF или его фрагмент представляют собой MEDI-578. MEDI-578 раскрыто в публикации заявки на патент США № 2008/0107658 как клон 1252A5. В других аспектах антитело к NGF или его фрагмент представляют собой танезумаб (RN-624), гуманизованное mAb к NGF (Pfizer; описано в Kivitz et al., (2013) PAIN, 154, 9, 1603-161), фулранумаб, полностью человеческое mAb к NGF (Amgen; описано в Sanga et al., PAIN, Volume 154, Issue 10, October 2013, Pages 1910–1919); REGN475/SAR164877, полностью человеческое mAb к NGF (Regeneron/Sanofi-Aventis); ABT-110 (PG110), гуманизованное mAb к NGF (Abbott Laboratories); фасинумаб, mAb к NGF человека (Regeneron, раскрыто в публикации заявки на патент США № 2009/0041717 как клон REGN475). Антитело к NGF или его фрагмент, включенные в бифункциональный полипептид, например, полиспецифическую связывающую молекулу, предусмотренную в данном документе, могут быть, например, гуманизованными, химерными, приматизированными или полностью человеческими.

[0092] В определенных аспектах антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VH антитела, содержащий домены HCDR1, HCDR2 и HCDR3 MEDI-578, варианты CDR тяжелой цепи MEDI-578, содержащие до одного, двух, трех, четырех, пяти или более аминокислотных замен, например, консервативных аминокислотных замен. Например, антитело к NGF или его фрагмент могут содержать HCDR1 с точной аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4 или с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4 с одной или более, например, одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью или более аминокислотными заменами. Сходным образом, антитело к NGF или его фрагмент могут содержать HCDR2 с точной аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 5 или с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 5 с одной или более, например, одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью или более аминокислотными заменами. Аналогично, антитело к NGF или его фрагмент могут содержать HCDR3 с точной аминокислотной последовательностью под SEQ ID

NO: 6 или с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6 с одной или более, например, одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью или более аминокислотными заменами. В определенных аспектах HCDR3 может содержать аминокислотную последовательность SSRIYDFNSALISYYDMDV (SEQ ID NO: 11) или SSRIYDMISLQPYDMDV (SEQ ID NO: 12).

[0093] В определенных аспектах антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VL антитела, содержащий домены LCDR1, LCDR2 и LCDR3 MEDI-578, варианты CDR легкой цепи MEDI-578, содержащие до одного, двух, трех, четырех, пяти или более аминокислотных замен, например, консервативных аминокислотных замен. В определенных аспектах антитело к NGF или его фрагмент могут содержать LCDR1 с точной аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8 или с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8 с одной или более, например, одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью или более аминокислотными заменами. Сходным образом, антитело к NGF или его фрагмент могут содержать LCDR2 с точной аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 9 или с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 9 с одной или более, например, одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью или более аминокислотными заменами. Аналогично, антитело к NGF или его фрагмент могут содержать LCDR3 с точной аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 10 или с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 10 с одной или более, например, одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью или более аминокислотными заменами.

[0094] В определенных аспектах антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VH антитела, содержащий аминокислотную последовательность VH, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VH антитела, содержащий аминокислотную последовательность VH под SEQ ID NO: 3.

[0095] В определенных аспектах антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VL антитела, содержащий аминокислотную последовательность VL, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7. В некоторых аспектах антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VL антитела, содержащий аминокислотную последовательность VL под SEQ ID NO: 7.

[0096] В определенных аспектах антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VH антитела, содержащий аминокислотную последовательность VH, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 94. В некоторых аспектах антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VH антитела, содержащий аминокислотную последовательность VH под SEQ ID NO: 94.

[0097] В определенных аспектах антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VL антитела, содержащий аминокислотную последовательность VL, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 95. В некоторых аспектах антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VL антитела, содержащий аминокислотную последовательность VL под SEQ ID NO: 95.

[0098] В определенных аспектах антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VH антитела, содержащий домены HCDR1, HCDR2 и HCDR3 из любой из SEQ ID NO: 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 и 96 или их варианты, содержащие до одной, двух, трех, четырех, пяти или более аминокислотных замен, например, консервативных аминокислотных замен.

[0099] В определенных аспектах антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VL антитела, содержащий домены LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из любой из SEQ ID NO: 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87 и 97 или их варианты, содержащие до одной, двух, трех, четырех, пяти или более аминокислотных замен, например, консервативных аминокислотных замен.

[00100] В определенных аспектах антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VH антитела, содержащий аминокислотную последовательность VH, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 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 и 96. В некоторых аспектах антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VH антитела, содержащий аминокислотную последовательность VH под любым из SEQ ID NO: 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 и 96.

[00101] В определенных аспектах антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VL антитела, содержащий аминокислотную последовательность VL, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную

аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87 и 97. В некоторых аспектах антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VL антитела, содержащий аминокислотную последовательность VL под любым из SEQ ID NO: 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87 и 97.

[00102] В определенных аспектах антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VH антитела, содержащий домены HCDR1, HCDR2 и HCDR3 NGF-NG, варианты CDR тяжелой цепи NGF-NG, содержащие до одного, двух, трех, четырех, пяти или более аминокислотных замен, например, консервативных аминокислотных замен. Например, антитело к NGF или его фрагмент могут содержать HCDR1 с точной аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 88 или с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 88 с одной или более, например, одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью или более аминокислотными заменами. Сходным образом, антитело к NGF или его фрагмент могут содержать HCDR2 с точной аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 89 или с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 89 с одной или более, например, одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью или более аминокислотными заменами. Аналогично, антитело к NGF или его фрагмент могут содержать HCDR3 с точной аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 90 или с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 90 с одной или более, например, одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью или более аминокислотными заменами.

[00103] В определенных аспектах антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VL антитела, содержащий домены LCDR1, LCDR2 и LCDR3 NGF-NG, варианты CDR легкой цепи NGF-NG, содержащие до одного, двух, трех, четырех, пяти или более аминокислотных замен, например, консервативных аминокислотных замен. В определенных аспектах антитело к NGF или его фрагмент могут содержать LCDR1 с точной аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 91 или с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 91 с одной или более, например, одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью или более аминокислотными заменами. Сходным образом, антитело к NGF или его фрагмент могут содержать LCDR2 с точной аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 92 или с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 92 с одной или более, например, одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью или более аминокислотными заменами. Аналогично, антитело к NGF или его фрагмент могут содержать LCDR3 с точной аминокислотной последовательностью под SEQ ID

NO: 93 или с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 93 с одной или более, например, одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью или более аминокислотными заменами.

[00104] В определенных аспектах антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VH антитела, содержащий аминокислотную последовательность VH, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 24. В некоторых аспектах антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VH антитела, содержащий аминокислотную последовательность VH под SEQ ID NO: 24.

[00105] В определенных аспектах антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VL антитела, содержащий аминокислотную последовательность VL, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 26. В некоторых аспектах антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VL антитела, содержащий аминокислотную последовательность VL под SEQ ID NO: 26.

[00106] Полифункциональный полипептид, например, полиспецифическая связывающая молекула, предусмотренная в настоящем изобретении, может содержать полное антитело к NGF, т. е. антитело, содержащее две полные тяжелые цепи и две полные легкие цепи в формате H₂L₂. Если антитело к NGF представляет собой полное антитело, один или несколько доменов антагониста TNF α могут быть слиты с N-концом или C-концом одной или нескольких тяжелых цепей антитела к NGF или с N-концом или C-концом одной или нескольких легких цепей антитела к NGF. В качестве альтернативы, полифункциональный полипептид, например, полиспецифическая связывающая молекула, предусмотренная в настоящем изобретении, может содержать антигенсвязывающий фрагмент антитела к NGF. В определенных аспектах фрагмент антитела к NGF может содержать любую часть константных доменов антитела или может содержать только переменные домены. Иллюстративные фрагменты антитела к NGF для включения в бифункциональный полипептид, например, полиспецифическую связывающую молекулу, включают без ограничения фрагменты Fab, фрагменты Fab', фрагменты F(ab)₂ или одноцепочечные фрагменты Fv (scFv).

[00107] В определенных иллюстративных композициях, предусмотренных в данном документе, антитело к NGF представляет собой фрагмент scFv, например, фрагмент scFv MEDI-578 или его NGF-связывающий вариант. В определенных иллюстративных композициях, предусмотренных в данном документе, антитело к NGF

представляет собой фрагмент scFv, например, фрагмент scFv NGF-NG или его NGF-связывающий вариант. Полипептид scFv, связывающий NGF, может содержать домены VH и VL в любом порядке, либо N-VH-VL-C, либо N-VL-VH-C. Молекулы ScFv, как правило, конструируют таким образом, что домены VH и VL соединены посредством гибкого линкера. Иллюстративные структуры scFv, включая различные линкеры, можно найти в Dimasi, N., *et al.*, *J Mol Biol.* 393:672-92 (2009) и в публикации согласно РСТ № WO 2013/070565, обе из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Как понятно специалистам в данной области техники, фрагменты scFv антител могут характеризоваться сниженной стабильностью по сравнению с переменными доменами, существующими в стандартной конформации Fab. В некоторых аспектах scFv может быть структурно стабилизирован посредством введения стабилизирующих мутаций или посредством введения межцепочечной(межцепочечных) дисульфидной(дисульфидных) связи(связей) (например, SS-стабилизирован). Однако стабилизирующие мутации и/или введенная межцепочечная дисульфидная связь не требуются и в определенных аспектах не присутствуют. Доступен ряд признанных в данной области техники способов стабилизации полипептидов scFv.

[00108] Линкеры можно применять для соединения доменов/областей бифункциональных полипептидов, предусмотренных в данном документе. Линкеры можно применять для соединения домена антагониста NGF и домена антагониста TNF α бифункциональной молекулы, и также можно применять для соединения переменных областей тяжелых и легких цепей scFv. Иллюстративным неограничивающим примером линкера является полипептидная цепь, содержащая по меньшей мере 4 остатка. Части таких линкеров могут быть гибкими, гидрофильными и характеризоваться своей собственной незначительной вторичной структурой или не иметь ее (части линкеров или части гибких линкеров). Линкеры из по меньшей мере 4 аминокислот можно применять для соединения доменов и/или областей, которые расположены рядом друг с другом после сборки бифункциональной молекулы полипептида. Можно также применять более длинные линкеры. Таким образом, длина линкеров может составлять приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 остатков. Линкеры также могут состоять, например, из приблизительно 100-175 остатков. Если для соединения частей бифункциональной молекулы полипептида применяют несколько линкеров, линкеры могут быть одинаковыми или разными (например, характеризоваться одинаковой или разной длиной и/или аминокислотной последовательностью).

[00109] Линкер(линкеры) в бифункциональной молекуле полипептида облегчает(облегчают) образование требуемой структуры. Линкеры могут содержать остатки $(\text{Gly-Ser})_n$ (где n представляет собой целое число от по меньшей мере одного, двух и до, например, 3, 4, 5, 6, 10, 20, 50, 100 или больше), при этом некоторые остатки Glu или Lys распределены по всей длине для повышения растворимости. В качестве альтернативы, определенные линкеры не содержат остатков серина, например, если линкер подвергается O-связанному гликозилированию. В некоторых аспектах линкеры могут содержать остатки цистеина, например, если димеризация линкеров используется для приведения доменов бифункционального полипептида в их правильно свернутую конфигурацию. В некоторых аспектах бифункциональный полипептид может содержать по меньшей мере один, два, три, четыре или больше полипептидных линкеров, которые соединяют домены полипептида.

[00110] В некоторых аспектах полипептидный линкер может содержать 1-50 остатков, 1-25 остатков, 25-50 остатков или 30-50 остатков. В некоторых аспектах полипептидный линкер может содержать часть фрагмента Fc. Например, в некоторых аспектах полипептидный линкер может содержать часть шарнирного домена иммуноглобулина из антитела IgG1, IgG2, IgG3 и/или IgG4 или его варианта.

[00111] В некоторых аспектах полипептидный линкер может предусматривать линкер gly-ser или состоять из него. Используемый в данном документе термин "линкер gly-ser" относится к пептиду, который состоит из остатков глицина и серина. Иллюстративный линкер gly-ser содержит аминокислотную последовательность формулы $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$, где n представляет собой целое число, по меньшей мере один, два и до, например, 3, 4, 5, 6, 10, 20, 50, 100 или больше. В некоторых аспектах полипептидный линкер может содержать по меньшей мере часть шарнирной области (например, полученную из молекулы IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4) и ряд аминокислотных остатков gly-ser (например, линкер gly-ser, такой как $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$).

[00112] Если полифункциональный полипептид, например, полиспецифическая связывающая молекула, содержит scFv, гибкий линкер может соединять тяжелую и легкую цепи scFv. Этот гибкий линкер, как правило, не содержит шарнирной части, а скорее представляет собой линкер gly-ser или другой гибкий линкер. Длина и аминокислотная последовательность гибкого линкера, соединяющего домены scFv, могут быть легко выбраны и оптимизированы.

[00113] В определенных аспектах полифункциональный полипептид, например, полиспецифическая связывающая молекула, может содержать фрагмент scFv,

связывающий NGF, который содержит от N-конца к С-концу VH, линкерную последовательность (GGGS)₃ из 15 аминокислот и VL. В определенных вариантах осуществления линкер, соединяющий VH и VL scFv, представляет собой линкерную последовательность (GGGS)₄ из 20 аминокислот. В определенных аспектах VH содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO 3. В определенных аспектах VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7. В определенных вариантах осуществления VH содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 24, 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, 94 и 96. В определенных вариантах осуществления VL содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 26, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 95 и 97. В определенных аспектах домен VH содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 3, 24, 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, 94 и 96. В определенных аспектах домен VL содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 7, 26, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 95 и 97.

[00114] В других аспектах стабильность полипептида может быть улучшена посредством добавления межцепочечной дисульфидной связи между доменом VH и доменом VL посредством модификации определенных остатков в пределах доменов VH и VL с получением остатков цистеина. См., например, Michaelson, J. S., et al. (2009) *MAbs* 1, 128-41; Brinkmann, U., et al., (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7538-42; Young, N. M., et al., (1995) *FEBS Lett* 377, 135-9. Например, остаток глицина в положениях 102, 103 или 104 VL (например, SEQ ID NO: 7) может быть модифицирован с получением остатка цистеина, и остаток глицина в положении 44 VH (например, SEQ ID NO: 3) может быть модифицирован с получением остатка цистеина. В некоторых вариантах осуществления остаток глицина в положении аминокислоты, соответствующем положению 102, 103 или 104 в SEQ ID NO: 7, модифицирован с получением остатка цистеина. В некоторых вариантах осуществления остаток глицина в положении аминокислоты, соответствующем положению 44 в SEQ ID NO: 3, модифицирован с получением остатка цистеина.

[00115] Полифункциональный полипептид, например, полиспецифическая связывающая молекула, предусмотренная в данном документе, содержит домен антагониста TNF α . В определенных аспектах домен антагониста TNF α способен к ингибированию связывания TNF α с рецептором TNF (TNFR) на поверхности клеток, за счет чего блокируется активность TNF.

[00116] В определенных аспектах антагонист TNF α представляет собой TNF α -связывающий растворимый фрагмент рецептора TNF, например, TNFR-1, или TNFR-2, или их вариант, или их растворимый фрагмент. В определенных аспектах растворимый фрагмент TNFR-1 представляет собой фрагмент массой 55 кДа. В определенных вариантах осуществления растворимый фрагмент TNFR-2 представляет собой фрагмент массой 75 кДа. В определенных аспектах фрагмент рецептора TNF слит с гетерологичным полипептидом, например, фрагментом Fc иммуноглобулина, например, доменом Fc IgG1. В определенных аспектах антагонист TNF α содержит аминокислоту, представленную под SEQ ID NO: 13, или его TNF α -связывающий фрагмент. Часть TNFR-2 содержит аминокислоты 1-235 из SEQ ID NO: 13. В определенных аспектах вариант TNF α -связывающего растворимого фрагмента TNFR-2 содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную аминокислотам 1-235 из SEQ ID NO: 13. В определенных аспектах вариант TNF α -связывающего растворимого фрагмента TNFR-2 содержит аминокислоты 1-235 из SEQ ID NO: 13, за исключением, например, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 20, 40 или 50 аминокислотных вставок, замен или делеций. Часть Fc IgG1 содержит аминокислоты 236-467 из SEQ ID NO: 13. В определенных аспектах TNF α -связывающий растворимый фрагмент TNFR-2 может быть слит с частью Fc любого человеческого антитела или антитела, отличного от человеческого, или с любым другим веществом белковой или небелковой природы, которые могут обеспечить стабильность, например, альбумином или полиэтиленгликолем. В определенных аспектах вариант TNF α -связывающего растворимого фрагмента TNFR-2 содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную аминокислотам 236-467 из SEQ ID NO: 13. В определенных аспектах вариант TNF α -связывающего растворимого фрагмента TNFR-2 содержит аминокислоты 236-467 из SEQ ID NO: 13, за исключением, например, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 20, 40 или 50 аминокислотных вставок, замен или делеций. В определенных аспектах вариант TNF α -связывающего растворимого фрагмента TNFR-2 содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или

100% идентичную SEQ ID NO: 13. В определенных аспектах вариант TNF α -связывающего растворимого фрагмента TNFR-2 содержит SEQ ID NO: 13, за исключением, например, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 40 или 50 аминокислотных вставок, замен или делеций.

[00117] В определенных аспектах TNF α -связывающий растворимый фрагмент TNFR-2 представляет собой одноцепочечный слитый белок. В определенных аспектах TNF α -связывающий растворимый фрагмент TNFR-2 представляет собой димер из двух слитых белков, ассоциированных, например, посредством дисульфидных связей между двумя доменами Fc.

[00118] Полифункциональный полипептид, например, полиспецифическая связывающая молекула, предусмотренная в данном документе, может характеризоваться множеством различных структур и конформаций. В одном аспекте полифункциональный полипептид, предусмотренный в данном документе, предусматривает слитый белок, в котором домен антагониста NGF, описанный выше, слит с доменом антагониста TNF α , описанным выше, посредством гибкого линкера. Примеры линкеров описаны в других разделах данного документа. В определенных аспектах полифункциональный полипептид предусматривает гомодимер слитого белка.

[00119] В иллюстративном аспекте предусмотрен полифункциональный полипептид, в котором антагонист NGF представляет собой домен scFv, связывающий NGF, полученный, например, из MEDI-578, и антагонист TNF α представляет собой растворимый TNF α -связывающий фрагмент TNFR-2, слитый на своем карбоксиконце с доменом Fc иммуноглобулина. В некоторых аспектах scFv, связывающий NGF, может быть слит с карбоксиконцом домена Fc иммуноглобулина посредством линкера. В определенных аспектах мономеры данного полифункционального полипептида образуют гомодимер, при этом каждая субъединица содержит от N-конца к C-концу TNF α -связывающий фрагмент TNFR-2 массой 75 кДа, домен Fc IgG1 человека, линкер из 10 аминокислот (GGGS)₂ (SEQ ID NO: 98), VH, связывающую NGF, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO 3, линкерную последовательность из 15 аминокислот (GGGS)₃ (SEQ ID NO: 15), и VL, связывающую NGF, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7. В одном аспекте полифункциональный полипептид представляет собой TNFR2-Fc_VH№4, который предусматривает гомодимер слитого полипептида, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14. В некоторых аспектах полифункциональный полипептид предусматривает гомодимер слитого полипептида, содержащего

аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 14.

[00120] В другом иллюстративном аспекте полифункциональный полипептид содержит от N-конца к C-концу TNF α -связывающий фрагмент TNFR-2 массой 75 кДа, домен Fc IgG1 человека, линкер из 10 аминокислот (GGGGS)₂ (SEQ ID NO: 98), VH, связывающую NGF, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO 94, линкерную последовательность из 20 аминокислот (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 19), и VL, связывающую NGF, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 95. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит от N-конца к C-концу TNF α -связывающий фрагмент TNFR-2 массой 75 кДа, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 13, домен Fc IgG1 человека, линкер из 10 аминокислот (GGGGS)₂ (SEQ ID NO: 98), VH, связывающую NGF, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 94, линкерную последовательность из 20 аминокислот (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 19), и VL, связывающую NGF, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 95. В некотором аспекте полифункциональный полипептид представляет собой TNFR2-Fc_varB, который предусматривает гомодимер слитого полипептида, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17. В некоторых аспектах полифункциональный полипептид предусматривает гомодимер слитого полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентична SEQ ID NO: 17.

Полинуклеотиды, векторы и клетки-хозяева

[00121] Настоящее изобретение предусматривает молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие полинуклеотиды, которые кодируют любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, для применения в любом из способов, раскрытых в данном документе (например, любой из схем дозирования, раскрытых в данном документе). Настоящее изобретение дополнительно предусматривает молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие полинуклеотиды, которые кодируют отдельные полипептиды, предусматривающие соответственно антагонист NGF и антагонист TNF α . В определенных аспектах такие полинуклеотиды кодируют пептидный домен, который

специфически связывает NGF или его фрагмент, а также связывает TNF α или его фрагмент. Например, настоящее изобретение предусматривает полинуклеотид, который кодирует полипептидный домен, содержащий антитело к NGF или его антигенсвязывающий фрагмент, и полипептидный домен, содержащий антагонист TNF α , такой как антитело к TNF α или его антигенсвязывающий фрагмент, или растворимую TNF α -связывающую часть рецептора TNF, например, TNFR2. Полинуклеотиды могут быть представлены в форме РНК или в форме ДНК. ДНК включает кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК и может быть двухнитевой или одонитевой, и если она одонитевая, то может представлять собой кодирующую нить или некодирующую (антисмысловую) нить.

[00122] В некоторых вариантах осуществления выделенный полинуклеотид, который кодирует полифункциональный полипептид, описанный в данном документе, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 16, 18 или 99 или ее фрагменты, или последовательность, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 16, 18 или 99 или ее фрагментам.

[00123] Выделенные полипептиды, описанные в данном документе, могут быть получены посредством любого подходящего способа, известного из уровня техники. Такие способы варьируются от способов прямого синтеза белка до конструирования последовательности ДНК, кодирующей выделенные полипептидные последовательности, и экспрессии этих последовательностей в подходящем трансформированном хозяине. В некоторых аспектах последовательность ДНК конструируют с применением рекомбинантной технологии посредством выделения или синтеза последовательности ДНК, кодирующей полифункциональный полипептид, содержащий домен антагониста NGF и домен антагониста TNF α , или отдельные полипептиды, содержащие домен антагониста NGF и домен антагониста TNF α соответственно. Соответственно, настоящее изобретение предусматривает выделенный полинуклеотид, который кодирует бифункциональный полипептид, содержащий домен антагониста NGF и домен антагониста TNF α , как подробно описано выше. Кроме того, предусмотрены выделенные полинуклеотиды, которые кодируют отдельные полипептиды, которые содержат соответственно домен антагониста NGF и домен антагониста TNF α .

[00124] В некоторых аспектах последовательность ДНК, кодирующую полифункциональный полипептид, например, полиспецифическую связывающую молекулу, представляющую интерес, или отдельные полипептиды, содержащие домен

антагониста NGF и домен антагониста TNF α соответственно, можно конструировать посредством химического синтеза с применением синтезатора олигонуклеотидов. Такие олигонуклеотиды можно конструировать на основе аминокислотной последовательности требуемого полифункционального полипептида и отбирая те кодоны, которые являются предпочтительными для клетки-хозяина, в которой будут получать рекомбинантный полипептид, представляющий интерес. Для синтеза выделенной полинуклеотидной последовательности, кодирующей полифункциональный полипептид, представляющий интерес, можно применять стандартные способы. Например, полную аминокислотную последовательность можно применять для конструирования гена с возможной последовательностью, восстановленной по полипептиду. Затем можно синтезировать ДНК-олигомер, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую конкретный полифункциональный полипептид или отдельные полипептиды. Например, можно синтезировать несколько небольших олигонуклеотидов, кодирующих части требуемого полипептида, а затем лигировать их. Отдельные олигонуклеотиды, как правило, содержат 5'- или 3'-выступающие концы для комплементарной сборки.

[00125] В определенных аспектах полинуклеотиды, предусмотренные в данном документе, могут содержать кодирующую последовательность зрелого полипептида, слитую в одной рамке считывания с маркерной последовательностью, что позволяет, например, осуществлять очистку кодируемого полипептида. Например, маркерная последовательность может представлять собой гексагистицидиновую метку, доставляемую вектором рQE-9, для обеспечения очистки слитого с маркером зрелого полипептида в случае бактериального хозяина, или маркерная последовательность может представлять собой гемагглютининовую (НА) метку, полученную из белка гемагглютинина вируса гриппа, если используется хозяин, представляющий собой млекопитающее (например, клетки COS-7).

[00126] Полинуклеотиды, предусмотренные в данном документе, могут дополнительно содержать изменения в кодирующих областях, некодирующих областях или как в тех, так и в других. В некоторых аспектах варианты полинуклеотида содержат изменения, которые приводят к "молчащим" заменам, добавлениям или делециям, но не изменяют свойства или активность кодируемого полипептида. В некоторых аспектах варианты нуклеотидов получены посредством "молчащих" замен за счет вырожденности генетического кода. Варианты полинуклеотидов можно получать по ряду причин, например, для оптимизации экспрессии кодонов для конкретного хозяина (замена

кодонов в мРНК человека на кодоны, предпочтительные для бактериального хозяина, такого как *E. coli*).

[00127] Также предусмотрены векторы и клетки, содержащие полинуклеотиды, описанные в данном документе. Сразу после сборки (посредством синтеза, сайт-направленного мутагенеза или другого способа) полинуклеотидные последовательности, кодирующие конкретный выделенный полипептид, представляющий интерес, могут быть вставлены в вектор экспрессии и функционально связаны с последовательностью контроля экспрессии, подходящей для экспрессии белка в требуемом хозяине. Настоящее изобретение предусматривает такие векторы. Правильность сборки можно подтвердить посредством секвенирования нуклеотидов, рестрикционного картирования и экспрессии биологически активного полипептида в подходящем хозяине. Как хорошо известно из уровня техники, для того, чтобы получить высокие уровни экспрессии трансфицированного гена в хозяине, ген должен быть функционально связан с последовательностями контроля транскрипции и трансляции в ходе экспрессии, которые являются функциональными в хозяине, выбранном для экспрессии.

[00128] В определенных аспектах рекомбинантные векторы экспрессии можно применять для амплификации и экспрессии ДНК, кодирующей полифункциональные полипептиды, например, полиспецифические связывающие молекулы, содержащие домен антагониста NGF и домен антагониста TNF α , или отдельные полипептиды, содержащие домен антагониста NGF и домен антагониста TNF α соответственно. Рекомбинантные векторы экспрессии представляют собой реплицируемые ДНК-конструкции, которые содержат синтетические или полученные из кДНК фрагменты ДНК, кодирующие полифункциональный полипептид или отдельные полипептиды, содержащие домен антагониста NGF и домен антагониста TNF α соответственно, функционально связанные с подходящими элементами, регулирующими транскрипцию или трансляцию, полученными из генов млекопитающих, микроорганизмов, вирусов или насекомых. Как правило, транскрипционная единица содержит сборку из (1) генетического элемента или элементов, характеризующихся регуляторной ролью в экспрессии генов, например, промоторов или энхансеров транскрипции, (2) структурной или кодирующей последовательности, которая транскрибируется в мРНК и транслируется в белок, и (3) подходящих последовательностей инициации транскрипции и трансляции, а также последовательностей терминации, подробно описанных ниже. Такие регуляторные элементы могут включать последовательность оператора для

контроля транскрипции. Способность к репликации в хозяине обычно обеспечивается точкой начала репликации, при этом можно дополнительно встроить ген для отбора для облегчения распознавания трансформантов. Области ДНК являются функционально связанными, если они функционально зависят друг от друга. Например, ДНК сигнального пептида (секреторная лидерная последовательность) функционально связана с ДНК полипептида, если она экспрессируется в виде предшественника, который участвует в секреции полипептида; промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если он контролирует транскрипцию последовательности, или сайт связывания рибосомы функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен так, чтобы обеспечивать трансляцию. Структурные элементы, предназначенные для применения в дрожжевых системах экспрессии, включают лидерную последовательность, обеспечивающую секрецию из клетки транслируемого белка клеткой-хозяином. В качестве альтернативы, если рекомбинантный белок экспрессируется без лидерной или транспортной последовательности, он может содержать N-концевой остаток метионина. Этот остаток может впоследствии быть необязательно отщеплен от экспрессируемого рекомбинантного белка с получением конечного продукта.

[00129] Выбор последовательности контроля экспрессии и вектора экспрессии будет зависеть от выбора хозяина. Можно использовать большое разнообразие комбинаций хозяин/вектор для экспрессии. Применимые векторы экспрессии для эукариотических хозяев включают, например, векторы, содержащие последовательности контроля экспрессии из SV40, вируса папилломы крупного рогатого скота, аденовируса и цитомегаловируса. Применимые векторы экспрессии для бактериальных хозяев включают известные бактериальные плазмиды, такие как плазмиды из *E. coli*, в том числе pCR1, pBR322, pMB9 и их производные, плазмиды для более широкого круга хозяев, такие как M13 и нитевидные фаги, содержащие однонитевую ДНК.

[00130] Настоящее изобретение дополнительно предусматривает клетки-хозяева, содержащие полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, предусмотренные в данном документе. Клетки-хозяева, подходящие для экспрессии полипептидов, предусмотренных в данном документе, включают клетки прокариот, дрожжей, насекомых или высших эукариот под контролем соответствующих промоторов. Прокариоты включают грамотрицательные или грамположительные организмы, например *E. coli* или бациллы. Клетки высших эукариот включают устойчивые линии

клеток, происходящие от млекопитающих, описанные ниже. Можно также использовать бесклеточные системы трансляции. Соответствующие векторы для клонирования и векторы экспрессии для применения в клетках-хозяевах бактерий, грибов, дрожжей и млекопитающих описаны в Pouwels *et al.* (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985), соответствующее раскрытие которой настоящим включено посредством ссылки. Дополнительную информацию, относящуюся к способам получения белка, в том числе получения антител, можно найти, например, в публикации патента США № 2008/0187954, патентах США №№ 6413746 и 6660501 и международной публикации патента № WO 04009823, каждая из которых настоящим включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00131] Различные системы культур клеток млекопитающих или насекомых можно также преимущественно использовать для экспрессии рекомбинантного белка. Экспрессию рекомбинантных белков можно осуществлять в клетках млекопитающих, поскольку такие белки обычно правильно свернуты, соответствующим образом модифицированы и полностью функциональны. Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают НЕК-293 и НЕК-293Т, линии COS-7 клеток почки обезьяны, описанные Gluzman (Cell 23:175, 1981), и другие линии клеток, в том числе, например, L-клетки, линии клеток C127, 3Т3, яичников китайского хомячка (СНО), HeLa и ВНК. Векторы экспрессии для млекопитающих могут содержать нетранскрибируемые элементы, такие как точка начала репликации, подходящий промотор и энхансер, связанные с экспрессируемым геном, и другие 5'- и 3'-концевые фланкирующие нетранскрибируемые последовательности, а также 5'- или 3'-концевые нетранслируемые последовательности, такие как необходимые сайты связывания рибосомы, сайт полиаденилирования, донорные и акцепторные сайты сплайсинга и последовательности терминации транскрипции. Бакуловирусные системы для получения гетерологичных белков в клетках насекомых рассматриваются в Luckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988).

[00132] Настоящее изобретение дополнительно предусматривает способ получения полифункционального полипептида, описанного в данном документе, или получения отдельных полипептидов, содержащих соответственно антагонист NGF и антагонист TNF α . Способ включает культивирование клетки-хозяина, описанной выше, в условиях, стимулирующих экспрессию полифункционального полипептида или отдельных полипептидов, и выделение полифункционального полипептида или отдельных полипептидов.

[00133] Для долгосрочного получения рекомбинантных белков с высоким выходом подходящей является стабильная экспрессия. Например, можно сконструировать линии клеток, которые стабильно экспрессируют полифункциональный полипептид. Вместо применения векторов экспрессии, которые содержат вирусные точки начала репликации, клетки-хозяева можно трансформировать с помощью ДНК, контролируемой подходящими элементами контроля экспрессии (например, промотором, энхансером, последовательностями, терминаторами транскрипции, сайтами полиаденилирования и т. п.), и селективируемого маркера. После введения чужеродной ДНК сконструированным клеткам можно обеспечить рост в течение 1-2 дней на обогащенной среде, а затем их переносят на селективную среду. Селективируемый маркер в рекомбинантной плазмиде придает устойчивость для отбора и позволяет клеткам стабильно интегрировать плазмиду в свои хромосомы и расти с образованием очагов, которые, в свою очередь, можно клонировать, и количество которых можно увеличить с получением линий клеток. Этот способ можно применять для конструирования линий клеток, которые экспрессируют полифункциональный полипептид.

[00134] В определенных вариантах осуществления полифункциональные полипептиды, предусмотренные в данном документе, экспрессируются в линии клеток с временной экспрессией полифункционального полипептида. Временная трансфекция представляет собой процесс, при котором нуклеиновая кислота, вводимая в клетку, не интегрируется в геномную или хромосомную ДНК такой клетки, но сохраняется в клетке в виде внехромосомного элемента, например, в виде эписомы. Процессы транскрипции нуклеиновой кислоты эписомы не затрагиваются, и продуцируется белок, кодируемый нуклеиновой кислотой эписомы.

[00135] Линию клеток, подвергнутую стабильной или временной трансфекции, поддерживают в среде для культивирования клеток и в условиях, известных из уровня техники, что приводит к экспрессии и продуцированию полипептидов. В определенных вариантах осуществления в основе среды для культивирования клеток млекопитающих лежат коммерчески доступные составы сред, в том числе например, DMEM или среды Хэма F12. В некоторых вариантах осуществления среду для культивирования клеток модифицируют для поддержки как роста клеток, так и биологической экспрессии белка. Используемые в данном документе термины "среда для культивирования клеток", "среда для культивирования" и "состав среды" относятся к питательному раствору для поддержания, роста, размножения или экспансии клеток в искусственном окружении *in*

in vitro вне многоклеточного организма или ткани. Среду для культивирования клеток можно оптимизировать для использования в конкретной культуре клеток, включая, например, ростовую среду для культивирования клеток, которая составлена для стимуляции клеточного роста, или среду для культивирования клеток, предназначенную для продуцирования, которая составлена для стимуляции продуцирования рекомбинантного белка. Термины "питательное вещество", "ингредиент" и "компонент" могут использоваться взаимозаменяемо для обозначения составляющих компонентов, которые образуют среду для культивирования клеток.

[00136] В различных вариантах осуществления линии клеток поддерживают с использованием способа периодического культивирования с подпиткой. Используемый в данном документе термин "способ периодического культивирования с подпиткой" относится к способу, при котором культуру клеток для периодического культивирования с подпиткой дополняют дополнительными питательными веществами после первоначального инкубирования с базальной средой. Например, способ периодического культивирования с подпиткой может включать добавление среды с добавками в соответствии с определенным режимом подпитки в течение определенного периода времени. Следовательно, "культура клеток для периодического культивирования с подпиткой" относится к культуре клеток, где клетками, как правило млекопитающего, и средой для культивирования изначально заполняют сосуд для культивирования, и дополнительные питательные вещества для культуры подаются непрерывно или отдельными шагами в культуру во время культивирования с периодическим сбором клеток и/или продукта до завершения культивирования или без него.

[00137] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит базальную среду и по меньшей мере один гидролизат, например, гидролизат на основе сои, гидролизат на основе дрожжей или комбинацию двух типов гидролизатов, что приводит к получению модифицированной базальной среды. Дополнительные питательные вещества могут иногда включать только базальную среду, такую как концентрированная базальная среда, или могут включать только гидролизаты или концентрированные гидролизаты. Подходящие базальные среды включают без ограничения среду Игла, модифицированную по Дульбекко (DMEM), DME/F12, минимальную питательную среду (MEM), базальную среду Игла (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, минимальную питательную среду альфа (альфа-MEM), минимальную питательную среду Глазго (G-MEM), PF CHO (см., например, не содержащую белков среду для CHO (Sigma) или EX-CELL.TM, бессывороточную среду 325 PF CHO для

культивирования клеток CHO без добавления белка (SAFC Bioscience) и среду Дульбекко, модифицированную по Искову. Другие примеры базальных сред, которые можно применять в технологии, описанной в данном документе, включают базальную среду BME (Gibco-Invitrogen; среду Игла, модифицированную по Дульбекко (DMEM, в виде порошка) (Gibco-Invitrogen (№ 31600)).

[00138] В определенных вариантах осуществления базальная среда может быть бессывороточной, что означает, что среда не содержит сыворотки (например, фетальной бычьей сыворотки (FBS), лошадиной сыворотки, козьей сыворотки или сыворотки, полученной от любого другого животного, известной специалисту в данной области техники), или средой, не содержащей животных белков, или средой с определенным химическим составом.

[00139] Базальную среду можно модифицировать с целью удаления определенных компонентов, не являющихся питательными веществами, находящихся в стандартной базальной среде, таких как разнообразные неорганические и органические буферы, поверхностно-активное(поверхностно-активные) вещество(вещества) и хлорид натрия. Удаление таких компонентов из базальной среды для клеток позволяет повысить концентрацию остальных питательных компонентов и может улучшить общий рост клеток и экспрессию белка. Кроме того, изъятые компоненты можно добавлять обратно в среду для культивирования клеток, содержащую модифицированную базальную среду для клеток в соответствии с требованиями условий культивирования клеток. В определенных вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит модифицированную базальную среду для клеток и по меньшей мере одно из следующих питательных веществ: источника железа, рекомбинантного фактора роста; буфера; поверхностно-активного вещества; регулятора осмолярности; источника энергии и гидролизатов неживотного происхождения. Кроме того, модифицированная базальная среда для клеток может необязательно содержать аминокислоты, витамины или комбинацию как аминокислот, так и витаминов. В некоторых вариантах осуществления модифицированная базальная среда дополнительно содержит глутамин, например, L-глутамин, и/или метотрексат.

[00140] В некоторых вариантах осуществления продуцирование белка может проводиться в большом количестве посредством процесса в биореакторе с использованием способов периодического культивирования с подпиткой, периодического культивирования в биореакторе, культивирования в перфузионном биореакторе или биореакторе с непрерывной подачей, известных из уровня техники.

Крупномасштабные биореакторы имеют емкость, составляющую по меньшей мере 50 л, емкость, составляющую иногда приблизительно более 500 литров или 1000-100000 литров. В этих биореакторах могут применяться лопастные мешалки для распределения кислорода и питательных веществ. Биореакторы небольшого масштаба относятся, как правило, к культивированию клеток в рабочем объеме не более чем примерно 100 литров и могут варьироваться от приблизительно 1 литра до приблизительно 100 литров. В качестве альтернативы, биореакторы одноразового применения (SUB) можно использовать либо для крупномасштабного, либо для мелкомасштабного культивирования.

[00141] Температура, рН, перемешивание, аэрация и плотность посева могут изменяться в зависимости от применяемых клеток-хозяев и рекомбинантного белка, который нужно экспрессировать. Например, культуру клеток с рекомбинантным белком можно поддерживать при температуре от 30 до 45 градусов Цельсия. рН среды для культивирования можно отслеживать в ходе процесса культивирования так, чтобы рН оставался на оптимальном уровне, который для определенных клеток-хозяев может находиться в пределах диапазона рН от 6,0 до 8,0. Осуществляемое лопастной мешалкой смешивание можно применять для таких способов культивирования для перемешивания. Скорость вращения лопастной мешалки может быть окружной скоростью концов лопастей, составляющей примерно 50-200 см/с, но можно применять другие аэролифтные или другие системы перемешивания/аэрации, известные из уровня техники, в зависимости от типа культивируемых клеток-хозяев. Достаточная аэрация обеспечивается для поддержания концентрации растворенного кислорода при насыщении культуры воздухом примерно от 20% до 80%, опять-таки в зависимости от выбранного типа культивируемых клеток-хозяев. В качестве альтернативы, биореактор может барботировать воздух или кислород непосредственно в культуральную среду. Существуют другие способы подачи кислорода, включающие системы беспузырьковой аэрации, в которых используются аэраторы с мембраной из полых волокон.

Очистка белка

[00142] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способы очистки любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, для применения в любом из способов, раскрытых в данном документе (например, любой из схем дозирования, раскрытых в данном документе). Белки, продуцируемые трансформированным хозяином, как описано выше, можно очищать в соответствии с любым подходящим способом. Такие стандартные способы включают

хроматографию (например, ионообменную, аффинную и эксклюзионную колоночную хроматографию), центрифугирование, очистку на основании различной растворимости или любую другую стандартную методику очистки белков. Аффинные метки, такие как гексагистидин, мальтозосвязывающий домен, последовательность белка оболочки вируса гриппа и глутатион-S-трансфераза, можно присоединять к белку для обеспечения возможности легкой очистки посредством пропускания через соответствующую аффинную колонку. Выделенные белки также можно характеризовать физически с применением таких методик, как протеолиз, ядерный магнитный резонанс и рентгеновская кристаллография.

[00143] Например, образцы надосадочной жидкости из систем, которые секретируют рекомбинантный белок в среду для культивирования, можно сначала сконцентрировать с применением коммерчески доступного фильтра для концентрирования белков, например, установки для ультрафильтрации Amicon или Pellicon от Millipore. После стадии концентрирования концентрат можно нанести на подходящую матрицу для очистки. В качестве альтернативы можно использовать анионообменную смолу, например, матрицу или субстрат, содержащие боковые диэтиламиноэтильные (DEAE) группы. Матрицы могут быть акриламидными, агарозными, декстрановыми, целлюлозными или относиться к другим типам, обычно используемым для очистки белков. В качестве альтернативы можно использовать стадию катионного обмена. Подходящие катионообменники включают различные нерастворимые матрицы, содержащие сульфопропильные или карбоксиметильные группы. В конечном счете можно применять одну или несколько стадий обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC), в которых используются гидрофобные среды для RP-HPLC, например, силикагель с боковыми метильными или другими алифатическими группами, для дополнительной очистки NGF-связывающего средства. Некоторые или все из вышеизложенных стадий очистки в различных комбинациях можно также использовать для получения гомогенного рекомбинантного белка.

[00144] Рекомбинантный белок, продуцируемый в бактериальной культуре, можно выделить, например, посредством изначального экстрагирования из клеточных осадков с последующей одной или несколькими стадиями концентрирования, высаливания, ионообменной или эксклюзионной хроматографии в водной среде. На конечных стадиях очистки можно использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC). Клетки микроорганизмов, используемые для экспрессии

рекомбинантного белка, можно разрушать посредством любого удобного способа, в том числе чередования циклов замораживания-размораживания, обработки ультразвуком, механического разрушения или применения средств для лизиса клеток.

[00145] Способы, известные из уровня техники для очистки рекомбинантных полипептидов, также включают, например, способы, описанные в публикациях патентов США №№ 2008/0312425, 2008/0177048 и 2009/0187005, каждая из которых настоящим включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Способы применения и фармацевтические композиции

[00146] Настоящее изобретение предусматривает способы осуществления контроля или лечения боли у субъекта, например, снижения и/или предупреждения боли у субъекта, включающие введение терапевтически эффективного количества полифункционального полипептида антагониста TNF α и NGF, например, полиспецифической связывающей молекулы, предусмотренной в данном документе, или включающие совместное введение антагониста TNF α и антагониста NGF. В определенных аспектах субъектом является человек.

[00147] Настоящее изобретение дополнительно предусматривает фармацевтические композиции, содержащие любую из связывающих молекул, описанных в данном документе. В определенных аспектах фармацевтические композиции дополнительно содержат фармацевтически приемлемую среду-носитель. Эти фармацевтические композиции применимы для лечения, например, снижения или предупреждения боли, например, нейропатической и воспалительной боли (например, при остеохондрозе или ревматоидном артрите).

[00148] Полифункциональные полипептиды и композиции, содержащие антагонист NGF и антагонист TNF α , предусмотренные в данном документе, могут быть применимы в различных областях применения, включая без ограничения контроль или лечение (например, снижение и/или предупреждение) боли, например, нейропатической боли. Способы применения могут представлять собой способы *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*.

[00149] В определенных аспектах заболевание, нарушение или состояние, которое лечат NGF-связывающим средством (например, антителом или полипептидом), ассоциировано с болью. В определенных аспектах боль ассоциирована с хронической ноцицептивной болью, хронической болью в пояснице, нейропатической болью, болью при раке, болью при постгерпетической невралгии (PHN) или состояниями с висцеральной болью. В определенных аспектах боль ассоциирована с воспалением сустава, таким как воспаление коленного сустава или тазобедренного сустава.

[00150] Настоящее изобретение предусматривает способ осуществления контроля, например, снижения или предупреждения боли у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в контроле боли, эффективного количества антагониста фактора роста нервов (NGF) и антагониста фактора некроза опухоли (TNF α), где введение может контролировать (например, снижать или предупреждать) боль у субъекта более эффективно, чем эквивалентное количество антагониста NGF или антагониста TNF α , вводимых по отдельности.

[00151] Под контролем боли "более эффективно", чем при введении компонентов по отдельности, подразумевается, что комбинированное лечение является более эффективным при контроле боли, чем эквивалентные количества либо антагониста NGF, либо антагониста TNF α , вводимых по отдельности. В определенных аспектах и как более подробно описано ниже, способ осуществления контроля (например, снижения или предупреждения) боли, предусмотренный в данном документе, может обеспечить синергетическую эффективность, например, эффект от введения как антагониста NGF, так и антагониста TNF α может обеспечить более высокую эффективность, чем аддитивный эффект, или может быть эффективным, когда ни антагонист NGF, ни антагонист TNF α не эффективны по отдельности. В определенных аспектах комбинация может обеспечивать введение меньших доз, например, эффективные дозы отдельных компонентов при совместном введении могут быть меньше, чем эффективные дозы каждого компонента по отдельности.

[00152] В определенных аспектах способ осуществления контроля (например, снижения или предупреждения) боли, предусмотренный в данном документе, является на по меньшей мере 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% более эффективным при контроле (например, снижении или предупреждении) боли у субъекта, чем эквивалентное количество антагониста NGF или антагониста TNF α , вводимых по отдельности. В определенных аспектах дозы антагониста NGF при введении отдельно или антагониста TNF α при совместном введении или доза относительной дозы антагониста NGF или антагониста TNF α , вводимых при введении бифункционального полипептида, предусмотренного в данном документе, могут быть ниже, например, на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% ниже чем дозы, необходимые для компонентов, вводимых по отдельности.

[00153] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает введение субъекту любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, при определенной схеме дозирования. В некоторых вариантах

осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей 0,04-0,25 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей 0,04-0,15 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей 0,04-0,1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей 0,04-0,075 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей 0,04-0,06 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей приблизительно 0,05 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей приблизительно 0,1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей приблизительно 0,15 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей приблизительно 0,2 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят подкожно.

[00154] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способ лечения (например, снижения или предупреждения) боли у субъекта, нуждающегося в этом, включающий внутривенное введение субъекту 0,04-0,275 мг/кг любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает внутривенное введение субъекту 0,04-0,25 мг/кг связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления способ включает внутривенное введение субъекту 0,04-0,2 мг/кг связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления способ включает внутривенное введение субъекту

0,04-0,15 мг/кг связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления способ включает внутривенное введение субъекту 0,04-0,1 мг/кг связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления способ включает внутривенное введение субъекту 0,04-0,08 мг/кг связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления способ включает внутривенное введение субъекту 0,1-0,275 мг/кг связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления способ включает внутривенное введение субъекту 0,1-0,25 мг/кг связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления способ включает внутривенное введение субъекту 0,1-0,2 мг/кг связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления способ включает внутривенное введение субъекту 0,15-0,25 мг/кг связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления способ включает внутривенное введение субъекту приблизительно 0,05 мг/кг связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления способ включает внутривенное введение субъекту приблизительно 0,1 мг/кг связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления способ включает внутривенное введение субъекту приблизительно 0,15 мг/кг связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления способ включает внутривенное введение субъекту приблизительно 0,2 мг/кг связывающей молекулы.

[00155] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способ лечения (например, снижения или предупреждения) боли у субъекта, нуждающегося в этом, включающий подкожное введение субъекту 0,1-1,2 мг/кг любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способ лечения (например, снижения или предупреждения) боли у субъекта, нуждающегося в этом, включающий подкожное введение субъекту 0,1-1,0 мг/кг любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способ лечения (например, снижения или предупреждения) боли у субъекта, нуждающегося в этом, включающий подкожное введение субъекту 0,1-0,8 мг/кг любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способ лечения (например, снижения или предупреждения) боли у субъекта, нуждающегося в этом, включающий подкожное введение субъекту 0,1-0,6 мг/кг любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способ лечения (например, снижения или предупреждения) боли у субъекта, нуждающегося в этом,

введение субъекту приблизительно 0,8 мг/кг любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способ лечения (например, снижения или предупреждения) боли у субъекта, нуждающегося в этом, включающий подкожное введение субъекту приблизительно 1 мг/кг любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе.

[00156] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способ лечения, например, снижения или предупреждения боли у субъекта, нуждающегося в этом, посредством введения субъекту любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, при фиксированной схеме дозирования. Используемый в данном документе термин "фиксированная схема дозирования" означает, что доза, вводимая каждому субъекту, является фиксированной и не зависит от веса или других характеристик субъекта. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при фиксированной дозе, составляющей 5-200 мг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей 7,5-150 мг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей 25-150 мг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей 75-150 мг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей 5, 7,5, 25, 75, 150 или 200 мг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей 7,5, 25, 75 или 150. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей 5 мг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей 7,5 мг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей 7,5 мг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей 7,5 мг.

дозе, составляющей 25 мг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей 75 мг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей 150 мг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей 200 мг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при фиксированной дозе, эквивалентной внутривенной дозе связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления фиксированная доза, эквивалентная внутривенной дозе, представляет собой фиксированную дозу, которая обеспечивает по сути такой же или такой же фармакокинетический профиль в сыворотке крови, что и внутривенная доза. В некоторых вариантах осуществления фиксированная доза, эквивалентная внутривенной дозе, представляет собой фиксированную дозу, которая обеспечивает по сути такую же или такую же среднюю геометрическую площадь под кривой на графике фармакокинетического профиля, что и внутривенная доза. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при фиксированной дозе, эквивалентной внутривенной фиксированной дозе связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при фиксированной дозе, эквивалентной фиксированной внутривенной дозе, составляющей 30 мг связывающей молекулы.

[00157] В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят внутривенно любому из субъектов, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят при фиксированной дозе внутривенно.

[00158] В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят подкожно. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят подкожно любому из субъектов, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах

осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят при фиксированной дозе подкожно. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят подкожно при любой из фиксированных доз, раскрытых в данном документе.

[00159] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способ лечения, например, предупреждения или снижения боли у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту подкожной фиксированной дозы любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает подкожное введение фиксированной дозы, составляющей 5-200 мг любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает подкожное введение фиксированной дозы, составляющей 7,5-150 мг любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает подкожное введение фиксированной дозы, составляющей 25-150 мг любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает подкожное введение фиксированной дозы, составляющей 75-150 мг любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает подкожное введение фиксированной дозы, составляющей 5, 7,5, 25, 75, 150 или 200 мг любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает подкожное введение фиксированной дозы, составляющей 7,5, 25, 75 или 150 мг любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят подкожно любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей 5 мг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят подкожно любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей 7,5 мг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят подкожно любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей 25 мг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят подкожно любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей 75 мг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят подкожно любому из субъектов,

раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей 150 мг. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят подкожно любому из субъектов, раскрытых в данном документе, при дозе, составляющей 200 мг. В некоторых вариантах осуществления способ включает подкожное введение фиксированной дозы, эквивалентной внутривенной фиксированной дозе связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления способ включает подкожное введение фиксированной дозы, эквивалентной фиксированной внутривенной дозе, составляющей 30 мг связывающей молекулы.

[00160] В некоторых вариантах осуществления способ лечения (например, предупреждения или снижения) боли включает введение любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, в соответствии со схемой дозирования. В некоторых вариантах осуществления связывающую молекулу вводят субъекту один раз. В некоторых вариантах осуществления связывающую молекулу вводят субъекту несколько раз. В некоторых вариантах осуществления фиксированную дозу связывающей молекулы вводят субъекту несколько раз. В некоторых вариантах осуществления одну и ту же фиксированную дозу связывающей молекулы вводят субъекту несколько раз. В некоторых вариантах осуществления связывающую молекулу (например, фиксированную дозу связывающей молекулы) вводят субъекту по меньшей мере один раз в неделю, не более одного раза в неделю, по меньшей мере один раз в две недели, не более одного раза в две недели, по меньшей мере один раз в три недели, не более одного раза в три недели, по меньшей мере один раз в месяц, не более одного раза в месяц, по меньшей мере два раза в месяц, не более двух раз в месяц, по меньшей мере три раза в месяц, не более трех раз в месяц, по меньшей мере один раз в шесть недель или не более одного раза в шесть недель. В некоторых вариантах осуществления связывающую молекулу (например, фиксированную дозу связывающей молекулы) вводят субъекту по меньшей мере один раз в две недели. В некоторых вариантах осуществления связывающую молекулу (например, фиксированную дозу связывающей молекулы) вводят субъекту не более одного раза в две недели. В некоторых вариантах осуществления связывающую молекулу (например, фиксированную дозу связывающей молекулы) вводят субъекту один раз в две недели. В некоторых вариантах осуществления связывающую молекулу (например, фиксированную дозу связывающей молекулы) вводят субъекту по меньшей мере один раз в три недели. В некоторых вариантах осуществления связывающую молекулу вводят субъекту не более одного раза в три недели. В некоторых вариантах осуществления связывающую молекулу (например,

фиксированную дозу связывающей молекулы) вводят субъекту один раз в три недели. В некоторых вариантах осуществления связывающую молекулу (например, фиксированную дозу связывающей молекулы) вводят субъекту по меньшей мере один раз в месяц. В некоторых вариантах осуществления связывающую молекулу (например, фиксированную дозу связывающей молекулы) вводят субъекту не более одного раза в месяц. В некоторых вариантах осуществления связывающую молекулу (например, фиксированную дозу связывающей молекулы) вводят субъекту один раз в месяц.

[00161] Настоящее изобретение предусматривает способ лечения, например, предупреждения или снижения боли, где схема дозирования для введения любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, продолжается в течение установленного периода времени. Например, фиксированную дозу связывающей молекулы можно вводить по меньшей мере один раз в 2 недели в течение по меньшей мере 12 недель. В некоторых вариантах осуществления связывающую молекулу вводят в течение по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 8 недель, по меньшей мере 12 недель или по меньшей мере 16 недель. В некоторых вариантах осуществления связывающую молекулу вводят в течение по меньшей мере 4 недель. В некоторых вариантах осуществления связывающую молекулу вводят в течение по меньшей мере 8 недель. В некоторых вариантах осуществления связывающую молекулу вводят в течение по меньшей мере 12 недель. В некоторых вариантах осуществления связывающую молекулу вводят в течение по меньшей мере 16 недель. В некоторых вариантах осуществления связывающую молекулу вводят в течение 12 недель. В некоторых вариантах осуществления связывающую молекулу вводят по меньшей мере один раз в 2 недели в течение по меньшей мере 12 недель. В некоторых вариантах осуществления связывающую молекулу вводят один раз в 2 недели в течение по меньшей мере 12 недель. В некоторых вариантах осуществления связывающую молекулу вводят один раз в 2 недели в течение 12 недель.

[00162] Любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, можно применять для снижения или предупреждения боли в комбинации с дополнительным средством лечения боли. Дополнительное средство лечения боли можно вводить одновременно с любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, или независимо от любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе. Таким образом, настоящее изобретение предусматривает способ снижения или предупреждения боли у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, и дополнительно

включающий введение дополнительного средства лечения боли. В некоторых вариантах осуществления способ предупреждения или снижения боли дополнительно включает введение субъекту NSAID. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту опиоида. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту ацетаминофена. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту парацетамола. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту ингибитора COX-2.

[00163] Субъект, нуждающийся в лечении боли, может страдать от боли в течение некоторого времени до того, как ему будет введена любая из связывающих молекул, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способа предупреждения или снижения боли субъект страдал от боли в течение 1 месяца или дольше до введения связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления субъект страдал от боли в течение 3 месяцев или дольше до введения связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления субъект страдал от боли в течение 6 месяцев или дольше до введения связывающей молекулы.

[00164] До начала лечения с применением любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, субъекту уже могло быть введено альтернативное средство лечения боли. В некоторых вариантах осуществления способ предупреждения или снижения боли включает введение субъекту альтернативного средства лечения боли до введения любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, и определение того, что альтернативное средство лечения боли не приводит к снижению или предупреждению боли у субъекта, и/или что субъект характеризуется непереносимостью альтернативного средства лечения боли. В некоторых вариантах осуществления альтернативное средство лечения боли представляет собой NSAID, сильный опиоид, слабый опиоид, ингибитор COX-2, ацетаминофен или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления способ включает следующие стадии до введения связывающей молекулы субъекту: а. введение субъекту NSAID, сильного опиоида, слабого опиоида, ингибитора COX-2, ацетаминофена или их комбинации, и b. определение i) того, что NSAID, сильный опиоид, слабый опиоид, ингибитор COX-2, ацетаминофен или их комбинация не приводит к снижению или предупреждению боли у субъекта, и/или ii) определение того, что субъект характеризуется непереносимостью NSAID, сильного опиоида, слабого опиоида, ингибитора COX-2, ацетаминофена или их комбинации. . В некоторых вариантах осуществления NSAID, сильный опиоид, слабый

опиоид, ингибитор COX-2, ацетаминофен или их комбинацию вводят в течение по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель или по меньшей мере 4 недель. В некоторых вариантах осуществления NSAID, сильный опиоид, слабый опиоид, ингибитор COX, ацетаминофен или их комбинацию вводят в течение по меньшей мере 2 недель. В некоторых вариантах осуществления NSAID, сильный опиоид, слабый опиоид, ингибитор COX-2, ацетаминофен или их комбинацию вводили субъекту в течение по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель или по меньшей мере 4 недель до введения любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления NSAID, сильный опиоид, слабый опиоид, ингибитор COX-2, ацетаминофен или их комбинацию вводили субъекту в течение по меньшей мере 2 недель до введения любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется непереносимостью NSAID, сильного опиоида, слабых опиоидов, ингибиторов COX-2, ацетаминофена или их комбинации.

[00165] До начала лечения с применением любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, субъекта можно тестировать в отношении наличия инфекции. В некоторых вариантах осуществления способ предупреждения или снижения боли включает тестирование субъекта в отношении инфекции SARS-CoV2 до введения любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает тестирование субъекта в отношении инфекции SARS-CoV2 до введения субъекту фиксированной дозы связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления тестирование субъекта в отношении инфекции SARS-CoV2 предусматривает тестирование субъекта в отношении генетического материала SARS-CoV2 до введения субъекту фиксированной дозы связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления субъект не инфицирован SARS-CoV2 на исходном уровне. Субъект может характеризоваться отрицательным результатом тестирования в отношении рибонуклеиновой кислоты (РНК) SARS-CoV2 на исходном уровне по результатам тестирования посредством ПЦР. Субъект может не демонстрировать клинические признаки или симптомы, соответствующие инфекции COVID-19 или острому вирусному респираторному заболеванию, например, лихорадку, кашель, одышку, боль в горле и/или потерю вкуса/обоняния. Субъект может характеризоваться отрицательным результатом тестирования в отношении SARS-CoV2, может характеризоваться отрицательным результатом тестирования в отношении антител к COVID-19.

[00166] Настоящее изобретение предусматривает способы осуществления контроля или лечения (например, снижения или предупреждения) боли. В определенных аспектах боль выбрана из хронической ноцицептивной боли, хронической боли в пояснице, нейропатической боли, боли при раке, боли при постгерпетической невралгии (PHN) или состояний с висцеральной болью. В определенных аспектах боль ассоциирована с воспалением сустава, таким как воспаление коленного сустава или тазобедренного сустава.

[00167] Связывающие молекулы, раскрытые в данном документе, могут быть особенно применимы для снижения или предупреждения боли, ассоциированной с артритом. В некоторых вариантах осуществления способа предупреждения или снижения боли у субъекта имеется остеоартрит. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется односторонний остеоартрит коленного сустава. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется остеоартрит коленного сустава по меньшей мере 2 степени по шкале оценки Келлгрена-Лоуренса (KL) от 0 до 4 согласно оценке центрального эксперта. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется остеоартрит коленного сустава 2 степени по шкале KL от 0 до 4 согласно оценке центрального эксперта (Kohn et al (2016) Clin Orthop Relat Res 474: 1886-1893 и Altman et al. (1986) Arthritis Rheum.;29(8):1039-49). Система классификации KL основана на радиографической оценке коленного сустава, при этом степень 0 характеризуется отсутствием радиографических признаков остеоартрита, что означает отсутствие ОА; степень 1 характеризуется сомнительным сужением суставной щели; степень 2 характеризуется возможным сужением суставной щели и наличием остеофитов; степень 3 характеризуется явным сужением суставной щели и множеством остеофитов, и степень 4 характеризуется выраженным сужением суставной щели, тяжелым склерозом и большими остеофитами, что указывает на тяжелый ОА.

[00168] Эффективность контроля боли можно измерить, попросив пациента оценить качество и интенсивность испытываемой боли в соответствии с рядом различных шкал. В вербальной шкале оценки боли используются слова для описания диапазона от отсутствия боли до слабой боли, умеренной боли и сильной боли, при этом каждой из них присвоен показатель от 0 до 3. В качестве альтернативы пациенту можно попросить оценить свою боль в соответствии с числовой шкалой оценки боли от 0 (отсутствие боли) до 10 (наиболее сильная возможная боль). На визуальной аналоговой шкале (VAS) на вертикальной или горизонтальной линии имеются слова для описания боли от отсутствия боли до наиболее сильной возможной боли, и пациента просят

отметить линию в точке, которая отражает его текущий уровень боли. Индекс боли МакГилла позволяет пациентам описать как качество, так и интенсивность боли посредством подбора слов, которые лучше всего описывают их боль, из серии коротких перечней, например, пульсирующая, жгучая, сдавливающая. Другие шкалы оценки боли можно использовать для взрослых, которые испытывают трудности с использованием VAS или числовых шкал, например, FACES, или для пациентов, не умеющих говорить, например, поведенческую шкалу оценки. Показатель функциональной активности относится к тому, насколько пациенту мешает боль, когда его просят выполнить задание, связанное с болезненной областью. Улучшения по шкале оценки боли с использованием данных типов шкал потенциально могут указывать на улучшение эффективности анальгетика.

[00169] Исходный уровень боли, от которой страдает субъект, может быть определен до того, как субъекту будут введены любые из связывающих молекул, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется средним показателем боли при остеоартрите, представляющим собой индекс Университетов Западного Онтарио и МакМастера (WOMAC), составляющим по меньшей мере 5, в суставе, как измерено с использованием подшкалы оценки боли индекса WOMAC на исходном уровне.

[00170] Многошкальный индекс WOMAC используется для оценки боли, скованности и функциональности суставов у субъектов с ОА коленного сустава или тазобедренного сустава. Подшкала оценки боли WOMAC является широко используемым инструментом измерения исходов, сообщаемых пациентами, для оценки участников с ОА коленного сустава (Lundgren-Nilsson et al. Patient-reported outcome measures in osteoarthritis: a systematic search and review of their use and psychometric properties. RMD Open. 2018 Dec 16;4(2):e000715). Состоит из 5 вопросов, позволяющих оценить боль субъекта вследствие ОА в целевом коленном суставе. Каждый вопрос оценивается по шкале NRS от 0 до 10, и показатель по подшкале оценки боли WOMAC рассчитывается как средний показатель по всем 5 вопросам, где более высокие показатели означают более сильную боль. Подшкала оценки физического функционирования WOMAC состоит из 17 вопросов, позволяющих оценить затруднения субъекта при выполнении повседневной деятельности вследствие ОА в целевом коленном суставе. Каждый вопрос оценивается по шкале NRS от 0 до 10, и показатель по подшкале оценки боли WOMAC рассчитывается как средний показатель по всем 17 вопросам, где более высокие показатели означают наихудшее функционирование.

Подшкала оценки скованности WOMAC состоит из 2 вопросов, позволяющих оценить скованность вследствие ОА в целевом коленном суставе. Скованность определяется как ощущение снижения легкости движения в целевом коленном суставе. Каждый вопрос оценивается по шкале NRS от 0 до 10, и показатель по подшкале оценки боли WOMAC рассчитывается как средний показатель по 2 вопросам, где более высокие показатели означают более сильную скованность. Используемый в данном документе показатель WOMAC на исходном уровне определяется как показатель WOMAC в день введения связывающего средства.

[00171] В некоторых вариантах осуществления субъект характеризуется средним показателем интенсивности боли, составляющим по меньшей мере 5, в суставе, как измерено по числовой шкале (NRS) оценки боли на исходном уровне. NRS представляет собой 11-балльную шкалу Лайкерта, используемую для оценки боли, где субъектов просят описать их среднюю боль в указанном коленном суставе посредством определения числа от 0, что соответствует "отсутствию боли", до 10, что соответствует "наиболее сильной боли, которую можно себе представить, за предыдущие 24 часа" (см. Alghadir et al. Test-retest reliability, validity, and minimum detectable change of visual analog, numerical rating, and verbal rating scales for measurement of osteoarthritic knee pain. *J Pain Res.* 2018 Apr 26; 11:851-6). Используемый в данном документе показатель по шкале NRS определяется как среднее значение ежедневных показателей боли по шкале NRS, о которых сообщили с дня -7 до дня -1 (включительно) до начала лечения с применением любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе.

[00172] Эффективность снижения или предупреждения боли можно установить посредством сравнения изменений уровня боли у субъекта, которому вводили любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, с изменениями уровня боли у контрольного субъекта, которому не вводили ни одну из связывающих молекул, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления любой из способов или схем дозирования, раскрытых в данном документе, приводит к снижению боли на по меньшей мере 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5 или 6 баллов по шкале индекса остеоартрита университетов Западного Онтарио и МакМастера (WOMAC) (при оценке по шкале от 1 до 10) по сравнению с показателем WOMAC у контрольного субъекта, которому не вводили связывающую молекулу (например, контрольного субъекта, которому вводили плацебо). В некоторых вариантах осуществления любой из способов или схем дозирования, раскрытых в данном документе, приводит к снижению боли на по меньшей мере 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 или 4 балла по шкале WOMAC (при оценке по шкале

от 0 до 4) по сравнению с показателем WOMAC у контрольного субъекта, которому не вводили связывающую молекулу (например, контрольного субъекта, которому вводили плацебо).

[00173] В некоторых вариантах осуществления любого из способов или схем дозирования, раскрытых в данном документе, способ приводит к снижению боли на по меньшей мере 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5 или 6 баллов по числовой шкале оценки боли (NRS) (при оценке по шкале от 1 до 10) по сравнению с показателем по шкале NRS у контрольного субъекта, которому не вводили связывающую молекулу. В некоторых вариантах осуществления снижение боли наблюдается после введения субъекту однократной дозы связывающей молекулы.

[00174] Эффективность снижения или предупреждения боли можно установить посредством сравнения изменений уровня боли у субъекта, которому вводили любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, с уровнем боли у субъекта на исходном уровне. В некоторых вариантах осуществления любой из способов или схем дозирования, раскрытых в данном документе, приводит к снижению по подшкале оценки боли WOMAC у субъекта по сравнению с исходным уровнем. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят в фиксированной дозе один раз в 2 недели в течение 12 недель, и способ приводит к снижению показателя по подшкале оценки боли WOMAC у субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере 12 недель после первого введения любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления любой из способов или схем дозирования, раскрытых в данном документе, приводит к снижению показателя по подшкале оценки боли WOMAC субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50%. В некоторых вариантах осуществления любой из способов или схем дозирования, раскрытых в данном документе, приводит к снижению показателя по подшкале оценки боли WOMAC субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере 30%. В некоторых вариантах осуществления любой из способов или схем дозирования, раскрытых в данном документе, приводит к снижению показателя по подшкале оценки боли WOMAC субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере 50%.

[00175] В некоторых вариантах осуществления любой из способов или схем дозирования, раскрытых в данном документе, приводит к снижению показателя по подшкале оценки физических симптомов WOMAC у субъекта по сравнению с исходным

уровнем. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят в фиксированной дозе один раз в 2 недели в течение 12 недель, и способ приводит к снижению показателя по подшкале оценки физических симптомов WOMAC у субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере 12 недель после первого введения любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления любой из способов или схем дозирования, раскрытых в данном документе, приводит к снижению показателя по подшкале оценки физических симптомов WOMAC у субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50%. В некоторых вариантах осуществления любой из способов или схем дозирования, раскрытых в данном документе, приводит к снижению показателя по подшкале оценки физических симптомов WOMAC у субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере 30%. В некоторых вариантах осуществления любой из способов или схем дозирования, раскрытых в данном документе, приводит к снижению показателя по подшкале оценки физических симптомов WOMAC у субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере 50%.

[00176] В некоторых вариантах осуществления любой из способов или схем дозирования, раскрытых в данном документе, приводит к снижению недельного среднесуточного показателя боли по шкале NRS у субъекта по сравнению с исходным уровнем. В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят в фиксированной дозе один раз в 2 недели в течение 12 недель, и способ приводит к снижению недельного среднесуточного показателя боли по шкале NRS у субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере 12 недель. В некоторых вариантах осуществления любой из способов или схем дозирования, раскрытых в данном документе, приводит к снижению недельного среднесуточного показателя боли по шкале NRS у субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50%. В некоторых вариантах осуществления любой из способов или схем дозирования, раскрытых в данном документе, приводит к снижению недельного среднесуточного показателя боли по шкале NRS у субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере 30%. В некоторых вариантах осуществления любой из способов или схем дозирования, раскрытых в данном документе, приводит к снижению

недельного среднесуточного показателя боли по шкале NRS у субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере 50%.

[00177] В некоторых вариантах осуществления любой из способов или схем дозирования, раскрытых в данном документе, приводит к улучшению общей оценки пациентом (PGA) остеоартрита по сравнению с исходным уровнем. Как используется в данном документе, PGA на исходном уровне определяется как показатель PGA в день введения связывающего средства. PGA представляет собой 5-балльную шкалу Лайкерта, используемую для оценки симптомов и нарушения активности вследствие ОА коленного сустава (см., например, Nikiphorou et al (2016) *Arthritis Res Ther* 18:251). Субъектов просят определить число от 1, что соответствует "очень хорошо" (без симптомов и ограничения обычной повседневной деятельности), до 5, что соответствует "очень плохо" (очень тяжелые симптомы, которые являются непереносимыми, и неспособность выполнять все виды обычной повседневной деятельности), на основании вопроса "Учитывая все аспекты того, каким образом ОА коленного сустава влияет на вас, как вы себя чувствуете сегодня?" В некоторых вариантах осуществления любую из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, вводят в фиксированной дозе один раз в 2 недели в течение 12 недель, и способ приводит к улучшению PGA остеоартрита по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере 12 недель. В некоторых вариантах осуществления любой из способов или схем дозирования, раскрытых в данном документе, приводит к улучшению PGA остеоартрита на по меньшей мере 2 балла.

[00178] Эффективность снижения или предупреждения боли можно установить посредством измерения изменений уровней биомаркеров у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способ предупреждения или снижения боли приводит к подавлению активности NGF у субъекта на по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% по сравнению с активностью NGF у контрольного субъекта, которому не вводили связывающую молекулу (например, контрольного субъекта, которому вводили плацебо). В некоторых вариантах осуществления способ приводит к подавлению активности NGF у субъекта на по меньшей мере 40% по сравнению с активностью NGF у контрольного субъекта, которому не вводили связывающую молекулу. В некоторых вариантах осуществления подавление NGF наблюдается после введения субъекту однократной дозы связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления подавление NGF наблюдается после введения субъекту многократных доз связывающей молекулы.

[00179] В некоторых вариантах осуществления способ предупреждения или снижения боли приводит к подавлению уровней CXCL-13 у субъекта на по меньшей мере 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% по сравнению с уровнями CXCL-13 у контрольного субъекта, которому не вводили связывающую молекулу (например, контрольного субъекта, которому вводили плацебо). В некоторых вариантах осуществления подавление CXCL-13 наблюдается после введения субъекту однократной дозы связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления подавление CXCL-13 наблюдается после введения субъекту многократных доз связывающей молекулы.

[00180] В некоторых аспектах составы получают для хранения и применения посредством объединения полифункционального полипептида антагониста TNF α и NGF, например, полиспецифической связывающей молекулы, предусмотренной в данном документе, с фармацевтически приемлемой средой-носителем (например, носителем, вспомогательным веществом) (Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* 20th Edition Mack Publishing, 2000). Подходящие фармацевтически приемлемые среды-носители включают без ограничения нетоксичные буферы, такие как фосфатный, цитратный и буферы на основе других органических кислот; соли, такие как хлорид натрия; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (например, хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные полипептиды (например, менее чем приблизительно 10 аминокислотных остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; углеводы, такие как моносахариды, дисахариды, глюкоза, манноза или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок) и неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN или полиэтиленгликоль (PEG).

[00181] Полифункциональные полипептиды по настоящему изобретению могут быть составлены в жидкой, полужидкой или твердой формах, в зависимости от физико-химических свойств молекулы и пути доставки. Составы могут содержать вспомогательные вещества или комбинации вспомогательных веществ, например,

сахара, аминокислоты и поверхностно-активные вещества. Жидкие составы могут содержать полипептиды с широким диапазоном концентраций и значений pH. Твердые составы могут быть получены, например, посредством лиофилизации, высушивания распылением или высушивания с применением технологии сверхкритической жидкости. В некоторых вариантах осуществления любой из составов, описанных в данном документе, представляет собой лиофилизированный состав.

[00182] Фармацевтическую композицию, предусмотренную в данном документе, можно вводить посредством любого количества способов для местного или системного лечения. Введение может представлять собой местное (например, через слизистые оболочки, включая вагинальную и ректальную доставку), например, с помощью трансдермальных пластырей, мазей, лосьонов, кремов, гелей, капель, суппозиториев, спреев, жидкостей и порошков; легочное (например, посредством ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, в том числе с помощью небулайзера; интратрахеальное, интраназальное, эпидермальное и трансдермальное); пероральное; или парентеральное, включая внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или инфузию; или внутривентрикулярное (например, интратекальное или интравентрикулярное) введение.

[00183] Полифункциональный полипептид антагониста TNF α и NGF, предусмотренный в данном документе, может быть дополнительно объединен в фармацевтическом комбинированном составе или в схеме дозирования в качестве средства комбинированной терапии со вторым (или третьим) соединением, характеризующимся антиинфламаторными свойствами.

[00184] Для лечения боли подходящая дозировка многофункционального полипептида антагониста TNF α и NGF, например, полиспецифической связывающей молекулы, предусмотренной в данном документе, зависит от типа боли, подлежащей лечению, тяжести и течения боли, ответа боли на лечение, того, вводится ли полифункциональный полипептид в терапевтических или профилактических целях, предыдущей терапии, клинического анамнеза пациента и т. п., – все на усмотрение лечащего врача. Полифункциональный полипептид можно вводить один раз или на протяжении ряда периодов лечения продолжительностью от нескольких дней до нескольких месяцев для поддержания эффективного контроля боли. Оптимальные схемы дозирования можно рассчитать на основании измерений накопления лекарственного средства в организме пациента, и они будут варьироваться в зависимости от относительной эффективности отдельного антитела или полипептида. Лечащий врач

может легко определить оптимальные дозы, методики дозирования и частоту повторений.

[00185] Введение полифункционального полипептида, например, полиспецифической связывающей молекулы, предусмотренной в данном документе, может обеспечивать "синергизм" и оказывает "синергетический" эффект, т. е. когда достигаемый при совместном применении активных ингредиентов эффект больше, чем сумма эффектов, получаемых при раздельном применении соединений. Синергетический эффект может быть достигнут, когда активные ингредиенты вводят в виде одного полифункционального слитого полипептида.

Боль

[00186] В своем самом широком смысле "боль" относится к эмпирическому феномену, который является очень субъективным в отношении индивидуума, испытывающего его, и находится под влиянием психического состояния индивидуума, включая окружающую среду и культурный фон. "Физическая" боль обычно может быть связана со стимулом, воспринимаемым третьим лицом, который является причиной фактического или потенциального повреждения тканей. В этом смысле боль можно рассматривать как "сенсорное и эмоциональное переживание, ассоциированное с фактическим или потенциальным повреждением тканей или описываемое в терминах такого повреждения", в соответствии с Международной ассоциацией изучения боли (IASP). Однако в некоторых случаях боль не имеет видимой причины. Например, психогенная боль, включая обострение ранее существовавшей физической боли психогенными факторами или синдромами иногда устойчивой воспринимаемой боли у лиц с психическими расстройствами без каких-либо признаков видимой причины боли. "Боль" в контексте настоящего изобретения может представлять собой или может предусматривать любой из типов боли, раскрытых в данном документе.

Типы боли

[00187] В контексте настоящего изобретения боль предусматривает ноцицептивную боль, нейропатическую/нейрогенную боль, прорывную боль, аллодинию, гипералгезию, гиперестезию, дизестезию, парестезию, гиперпатию, фантомную боль в конечностях, психогенную боль, болезненную анестезию, невралгию, неврит. Другие категории предусматривают боль при злокачественном новообразовании, ангинозную боль и/или идиопатическую боль, комплексный регионарный болевой синдром I, комплексный регионарный болевой синдром II. Типы

и симптомы боли не обязательно должны быть взаимоисключающими. Данные термины предназначены для использования в соответствии с определением IASP.

[00188] Ноцицептивная боль инициируется специализированными чувствительными ноцицепторами в периферических нервах в ответ на вредные стимулы, преобразуя вредные стимулы в потенциалы действия. Ноцицепторы, как правило, на волокнах A δ и (полимодалных) волокнах C, представляют собой свободные нервные окончания, которые заканчиваются непосредственно под кожей, в сухожилиях, суставах и органах тела. Нейроны ганглия задних корешков (DRG) обеспечивают связь между периферией и спинным мозгом. Сигнал проходит через спинной мозг к стволу головного мозга и участкам таламуса, и, наконец, к коре головного мозга, где он обычно (но не всегда) вызывает ощущение боли. Ноцицептивная боль может возникать в результате широкого спектра химических, термических, биологических (например, воспалительных) или механических явлений, которые потенциально способны раздражать или повреждать ткани тела, которые обычно превышают определенное минимальное пороговое значение интенсивности, необходимое для того, чтобы вызвать ноцицептивную активность в ноцицепторах.

[00189] Нейропатическая боль, как правило, является результатом аномального функционирования периферической или центральной нервной системы, что приводит к периферической или центральной нейропатической боли соответственно. Нейропатическая боль определяется согласно IASP как боль, инициируемая или вызываемая первичным поражением или дисфункцией нервной системы. Нейропатическая боль часто предусматривает фактическое повреждение нервной системы, особенно в хронических случаях. Воспалительная ноцицептивная боль обычно является результатом повреждения тканей и возникающего в результате этого воспалительного процесса. Нейропатическая боль может долго сохраняться (например, месяцы или годы) после видимого заживления любого наблюдаемого повреждения тканей.

[00190] В случаях нейропатической боли сенсорная обработка в пораженной области может стать аномальной, и безвредные стимулы (например, температурные, прикосновение/давление), которые обычно не вызывают боли, могут вызвать ее (т. е. аллодинию), или вредные стимулы могут вызывать обостренное восприятие боли (т. е. гипералгезию) в ответ на обычно болезненный стимул. Кроме того, нормальные стимулы могут вызывать ощущения, подобные электрическому покалыванию, или ударам, или "пощипыванию" (т. е. парестезии), и/или ощущения, характеризующиеся неприятными

свойствами (т. е. дизестезии). Прорывная боль представляет собой обострение существовавшей ранее хронической боли. Гиперпатия представляет собой болевой синдром, возникающий в результате аномально болезненной реакции на стимул. Стимул в большинстве случаев является повторяющимся с повышенным болевым порогом, что можно расценивать как наименьшее ощущение боли, которое пациент может распознать как боль.

[00191] Примеры нейропатической боли включают тактильную аллодинию (например, индуцированную после повреждения нерва), невралгию (например, постгерпетическую (или после опоясывающего герпеса) невралгию, невралгию тройничного нерва), рефлекторную симпатическую дистрофию/каузалгию (травму нерва), компоненты боли при раке (например, боли вследствие рака как такового или ассоциированных состояний, таких как воспаление, или вследствие лечения, такого как химиотерапия, хирургическое вмешательство или лучевая терапия), фантомную боль в конечностях, туннельную нейропатию (например, синдром запястного канала) и нейропатии, такие как периферическая нейропатия (например, вследствие диабета, ВИЧ, хронического употребления алкоголя, воздействия других токсинов (включая многие виды химиотерапии), дефицитов витаминов и множества других медицинских состояний). Нейропатическая боль включает боль, индуцируемую проявлением патологического функционирования нервной системы после повреждения нерва вследствие различных причин, например, хирургического вмешательства, раны, опоясывающего герпеса, диабетической нейропатии, ампутации ног или рук, рака и т. п. Медицинские состояния, ассоциированные с нейропатической болью, включают травматическое повреждение нерва, инсульт, рассеянный склероз, сирингомиелию, повреждение спинного мозга и рак.

[00192] Стимул, вызывающий боль, часто вызывает воспалительный ответ, который сам по себе может способствовать ощущению боли. При некоторых состояниях, по-видимому, боль может быть вызвана сложным сочетанием ноцицептивных и нейропатических факторов. Например, хроническая боль часто включает воспалительную ноцицептивную боль или нейропатическую боль или сочетание их обоих. Первоначальная дисфункция или повреждение нервной системы могут провоцировать высвобождение нейронами медиаторов воспаления и последующее нейропатическое воспаление. Например, мигренозные головные боли могут представлять собой сочетание нейропатической и ноцицептивной боли. Также миофасциальная боль, вероятно, является вторичной по отношению к ноцицептивному

воздействию на мышцы, однако аномальная мышечная активность может быть результатом нейропатических состояний.

[00193] В соответствии со способом контроля боли (например, снижение или предупреждение боли), предусмотренным в данном документе, введение любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе, является достаточным для контроля боли (например, снижения или предупреждения боли) у субъекта, нуждающегося в контроле боли. В некоторых вариантах осуществления снижение боли наблюдается после введения субъекту однократной дозы любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления снижение боли наблюдается после введения субъекту многократных доз любой из связывающих молекул, раскрытых в данном документе. В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способы или схемы дозирования для снижения или предупреждения боли, ассоциированной с остеоартритом. В некоторых вариантах осуществления боль, ассоциированная с остеоартритом, представляет собой боль в колене, ассоциированную с остеоартритом.

[00194] В некоторых вариантах осуществления способа предупреждения или снижения боли боль представляет собой острую боль, кратковременную боль, постоянную или хроническую ноцицептивную боль или постоянную или хроническую нейропатическую боль. В некоторых вариантах осуществления боль предусматривает хроническую боль. В некоторых вариантах осуществления боль ассоциирована с воспалением сустава, таким как воспаление коленного сустава или тазобедренного сустава. В некоторых вариантах осуществления боль предусматривает боль при остеоартрите. В некоторых вариантах осуществления боль предусматривает боль при остеоартрите в коленном суставе.

Наборы, содержащие антагонисты TNF α и NGF

[00195] Настоящее изобретение предусматривает наборы, которые содержат полифункциональный полипептид антагониста TNF α и NGF, например, полиспецифическую связывающую молекулу, предусмотренную в данном документе, которую можно применять для осуществления способов, описанных в данном документе. В определенных аспектах набор содержит по меньшей мере полифункциональный слитый полипептид, содержащий антагонист TNF α и антагонист NGF, например, полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14 или 17, в одном или нескольких контейнерах. Специалист в данной области техники легко поймет, что раскрытые антагонисты TNF α и NGF,

предусмотренные в данном документе, могут быть легко включены в один из установленных форматов наборов, которые хорошо известны из уровня техники.

ПРИМЕРЫ

[00196] Далее приведено общее описание настоящего изобретения, которое можно будет легче понять, исходя из следующих примеров, которые включены только для целей иллюстрации определенных аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначены для ограничения настоящего изобретения.

Пример 1. Конструирование и определение характеристик полиспецифической связывающей молекулы, представляющей собой scFv, связывающий NGF/TNFR2-Fc

[00197] Полифункциональную молекулу, в частности полиспецифическую связывающую молекулу, содержащую домен антитела к NGF и домен TNFR2-Fc, получали следующим образом. Фрагмент scFv антитела к NGF сливали с С-концом слитого белка TNFR2-Fc (SEQ ID NO: 13) посредством домена CH3 тяжелой цепи в соответствии с форматом Bs3Ab, описанным в Dimasi, N., *et al.*, *J Mol Biol.* 393:672-92 (2009) и в публикации согласно РСТ № WO 2013/070565. Схема структуры показана на фиг. 1. ДНК-конструкции, кодирующие полипептид TNFR2-Fc и полиспецифическую связывающую молекулу, синтезировали в GeneArt (Invitrogen). Для полиспецифической связывающей молекулы конструировали scFv, связывающий NGF, содержащий домены VH (SEQ ID NO: 3) и VL (SEQ ID NO: 7) MEDI-578, соединенные вместе посредством линкерной последовательности из 15 аминокислот (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 15). N-конец scFv сливали посредством линкерной последовательности из 10 аминокислот (GGGGS)₂ с С-концом SEQ ID NO: 13. Данная полиспецифическая связывающая молекула обозначена в данном документе как TNFR2-Fc_VH№4. ДНК-конструкцию, кодирующую полиспецифическую связывающую молекулу, конструировали таким образом, чтобы она содержала стоп-кодон и сайт рестрикции EcoRI на 3'-конце для клонирования в вектор экспрессии Bs3Ab. Последовательность ДНК, кодирующая TNFR2-Fc_VH№4, представлена под SEQ ID NO: 16, а его аминокислотная последовательность представлена под SEQ ID NO: 14.

[00198] Термостабильность полиспецифической связывающей молекулы TNF-NGF улучшали посредством добавления межцепочечной дисульфидной связи между доменами VH и VL части scFv MEDI-578 полиспецифической связывающей молекулы. Это осуществляли посредством введения мутации G->C при аминокислоте 44 домена VH (SEQ ID NO: 94) и при аминокислоте 103 домена VL (SEQ ID NO: 95). Данный клон был обозначен как TNFR2-Fc_varB. Аминокислотная последовательность TNFR2-Fc_varB

представлена под SEQ ID NO: 17. Последовательность ДНК, кодирующая TNFR2-Fc_varB, представлена под SEQ ID NO: 18. Кодон-оптимизированная последовательность ДНК, кодирующая TNFR2-Fc_varB, представлена под SEQ ID NO: 99. TNFR2-Fc_varB дополнительно отличается от TNFR2-Fc_VH№4 тем, что линкерная последовательность из 15 аминокислот (GGGGS)₃, соединяющая VH и VL части scFv, заменена линкером из 20 аминокислот (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 19). Дифференциальную сканирующую флуориметрию (DSF) использовали для измерения T_m TNFR2-Fc_VH№4 и TNFR2-Fc_varB. Данный метод позволяет измерить включение флуоресцентного красителя Sypro Orange (Invitrogen), который связывается с гидрофобными поверхностями, которые становятся доступными во время разворачивания домена белка при воздействии повышенных температур. В анализе посредством DSF T_m TNFR2-Fc_VH№4 составляла 62°C, в то время как T_m TNFR2-Fc_varB составляла 66°C. Таким образом, добавление межцепочечной дисульфидной связи в часть scFv MEDI-578 полиспецифической молекулы приводило к улучшению термостабильности молекулы на 4°C.

[00199] Белок TNFR2-Fc и TNFR2-Fc_VH№4 временно экспрессировали в суспензии клеток CHO с использованием полиэтиленимина (PEI) (Polysciences) в качестве реагента для трансфекции. Клетки поддерживали в среде CD-CHO (Life Technologies). Собранные культуры клеток, полученных в результате мелкомасштабных трансфекций, очищали с применением аффинной хроматографии с колонкой HiTrap MabSelect SuRe™ объемом 1 мл в соответствии с протоколом производителя (GE Healthcare) и затем заменяли буфер на 1% сахарозу, 100 мМ NaCl, 25 мМ гидрохлорида L-аргинина и 25 мМ фосфата натрия (pH 6,3). Чистоту рекомбинантных белков анализировали с применением SDS-PAGE в восстанавливающих условиях и с применением аналитической эксклюзионной хроматографии (см. метод ниже) и концентрации определяли посредством измерения поглощения при 280 нм с применением теоретически определенных коэффициентов экстинкции.

[00200] Посредством мелкомасштабной временной экспрессии и очистки слитого белка TNFR2-Fc и полиспецифической конструкции TNF-NGF, TNFR2-Fc_VH№4, на колонке с использованием белка А получали значения выхода, составляющие 36,6 и 79,9 мг л⁻¹ соответственно.

[00201] Более крупную партию TNFR2-Fc_VH№4 получали следующим образом. Неочищенную собранную культуру клеток, полученную в результате крупномасштабной трансфекции (до 6 л), фильтровали с использованием глубинной

филтрации и загружали в колонку размером 1,6 x 20 см с агарозой и белком А (GE Healthcare), предварительно уравновешенную буфером А (фосфатно-солевым буфером, рН 7,2). Затем колонку промывали буфером А и продукт элюировали в ступенчатом градиенте буфера В (50 мМ ацетата натрия, рН < 4,0). Далее продукт очищали посредством загрузки на колонку Poros HS 50 размером 1,6 x 20 см (Applied Biosystems), предварительно уравновешенную буфером С (50 мМ буфером на основе ацетата натрия, рН < 5,5), промывали буфером С и затем продукт элюировали в линейном градиенте от 0 до 1 М NaCl в 50 мМ буфере на основе ацетата натрия, рН < 5,5. Полученные элюаты анализировали посредством эксклюзионной HPLC. Концентрацию белка определяли посредством спектроскопии A280 на спектрофотометре Beckman DU520 с использованием рассчитанного коэффициента экстинкции, составляющего 1,36.

Способы определения характеристик TNFR2-Fc_VH№4

[00202] Анализ посредством вестерн-блоттинга проводили с использованием стандартных протоколов. Белки переносили на мембрану из поливинилиденфторида (Life Technologies) с использованием системы Xcell SureLock™ (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Мембрану блокировали с помощью 3% (вес/объем) сухого обезжиренного молока в фосфатно-солевом буфере (PBS) в течение 1 ч при комнатной температуре. Вестерн-блоттинг осуществляли с использованием стандартных протоколов со специфическим антителом к Fc IgG человека, конъюгированным с HRP (Sigma).

[00203] Эксклюзионную HPLC проводили с использованием системы для HPLC от Gilson (изократический насос-307, детектор UV/Vis-151, жидкостный манипулятор-215 и модуль-819 для введения) с колонкой Phenomenex BioSep-SEC-S3000 (300 x 7,8 мм) с подвижной фазой D-PBS (Life Technologies) при расходе 1 мл/мин. Двадцать пять мкл образцов вводили в колонку и отслеживали разделение белковых разновидностей при A280 нм.

[00204] Ферментативное дегликозилирование полученного в малом масштабе очищенного TNFR2-Fc_VH№4 проводили с применением набора EDGLY (Sigma Aldrich) в соответствии с протоколами производителя. Белки дегликозилировали как в денатурирующих, так и в нативных условиях. В случае денатурированных белков 30 мкг белка дегликозилировали PNGазой F, O-гликозидазой и α -(2→3, 6, 8, 9)-нейраминидазой, β -N-ацетилглюкозаминидазой и β -(1→4)-галактозидазой в течение 3 ч при 37°C. В нативных условиях 35 мкг белка дегликозилировали тем же набором ферментов, который указан выше, в течение 3 дней при 37°C. Дегликозилированные

белки анализировали посредством SDS-PAGE с окрашиванием красителем кумасси и посредством вестерн-блоттинга с использованием стандартных протоколов анализа.

[00205] Секвенирование N-концевых аминокислот TNFR2-Fc_VH№4 проводили следующим образом. Примерно 2 мкг TNFR2-Fc_VH№4 анализировали на геле для SDS-PAGE с использованием стандартных протоколов. Белки переносили на мембрану из PVDF с использованием системы Xcell SureLock™ (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Мембрану окрашивали с помощью 0,1% (вес/объем) amidoblack в течение примерно 15 минут на платформе для орбитального встряхивания, затем промывали с помощью dH₂O для снижения фонового окрашивания мембраны из PVDF. Мембрану высушивали на воздухе перед N-концевым секвенированием. Полосы, представляющие интерес, вырезали и определяли последовательность N-конца полиспецифической связывающей молекулы на секвенаторе Applied Biosystems 494 HT (Applied Biosystems, Сан-Франциско, Калифорния, США) с онлайн-анализом с фенилтиогидантоином с применением колонки для HPLC 140A micro от Applied Biosystems.

Результаты определения характеристик

[00206] Очищенные белки TNFR2-Fc_VH№4 и TNFR2-Fc профилировали посредством SEC-HPLC в отношении уровней агрегатов, мономеров и фрагментации белков (фиг. 2A и 2B). Основной пик, содержащий мономер, составлял примерно 90% от общего присутствующего белка, при этом оставшиеся примерно 10% массы белка с меньшим временем удерживания на колонке указывают на присутствие разновидностей или агрегатов более высокого порядка. Однако пик мономера, полученный в результате SEC-HPLC, характеризовался двумя выраженными плечами, что указывало на то, что белок в пределах данного пика не представлял собой одну разновидность. Анализ посредством SDS-PAGE с окрашиванием красителем кумасси демонстрировал две отдельные полосы для TNFR2-Fc_VH№4 (при примерно 100 и 75 кДа) и аналогично две отдельные полосы для слитого белка TNFR2-Fc (при примерно 70 и 45 кДа) также в восстанавливающих условиях (фиг. 2B). В невосстанавливающих условиях присутствовали три основные полосы для TNFR2-Fc_VH№4 (между 150 и 250 кДа), а также одна основная и одна минорная полоса для слитого белка TNFR2-Fc при примерно 150 и 120 кДа соответственно. Поскольку разница в молекулярной массе между двумя полосами в восстанавливающих условиях была примерно эквивалентна размеру фрагмента scFv (~26,5 кДа), проводили дополнительный анализ для понимания того, в каких формах образовывалась полиспецифическая связывающая молекула. Масс-

спектроскопический анализ в нативных условиях подтверждал данные SDS-PAGE, согласно которым для двух отдельных очищенных белковых препаратов в очищенном препарате TNFR2-Fc_VH№4 присутствовали три молекулярные массы при примерно 125, 152 и 176 кДа (фиг. 2С).

[00207] Если паттерн образования полос, наблюдаемый в геле для SDS-PAGE, был обусловлен дифференциальным гликозилированием TNFR2-Fc_VH№4, то при дегликозилировании он разделится бы в виде одной полосы. Однако паттерн образования полос сохранялся как в восстанавливающих, так и в невосстанавливающих условиях, когда TNFR2-Fc_VH№4 был дегликозилирован либо как нативный белок, либо как денатурированный белок (данные не показаны). Окрашивание посредством вестерн-блоттинга как гликозилированного, так и дегликозилированного TNFR2-Fc_VH№4 с применением специфического поликлонального антитела к Fc IgG человека демонстрировало, что как полноразмерная ожидаемая полоса, так и полоса с более низкой молекулярной массой взаимодействовали со специфическими антителами к Fc (данные не показаны).

[00208] Окончательную идентификацию усеченного продукта проводили посредством секвенирования N-концевых аминокислот белка. В результате было обнаружено, что первые 8 аминокислот N-конца усеченного белка представляют собой SMAPGAVH, что соответствует аминокислотам 176-183 последовательности TNFR2-Fc_VH№4 (SEQ ID NO: 14). Они представляли собой усеченный фрагмент из 175 аминокислот на N-конце TNFR2-Fc_VH№4, в результате чего оставались только 42 аминокислоты домена TNFR2. Это позволяет авторам настоящего изобретения точно интерпретировать данные по массе, полученные с применением SDS-PAGE, масс-спектропии и анализа посредством SEC-HPLC. Имели место три возможные комбинации димеров TNFR2-Fc_VH№4, и все они присутствовали в препаратах очищенного белка: (1) полноразмерный гомодимер, (2) полноразмерный гетеродимер и усеченные разновидности и (3) гомодимер усеченных разновидностей. Для точного измерения биологической активности как *in vitro*, так и *in vivo*, препарат полноразмерного гомодимера получали посредством способа двухстадийной колоночной хроматографии. На первой стадии, после очистки с применением белка А, продукт содержал 80,5% мономера (фиг. 3А), а после второй стадии очистки на колонке (SP-сефароза) процент мономера составлял 97,8% (фиг. 3В). Выход в течение всего процесса составлял 7,3%.

Пример 2. Анализ термической стабильности посредством дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC).

[00209] Для калориметрических измерений использовали автоматизированную систему для DSC MicroCal VP-Capillary (GE Healthcare, США). Образцы белка тестировали при 1 мг/мл в буфере на основе 25 мМ гистидина/гистидина-НСl, рН 6,0. Образцы белка и буфер подвергали линейному нагреванию с 25°C до 100°C со скоростью 95°C в час. Показатель для буфера вычитали в качестве эталона из показателя для образца белка с использованием программного обеспечения Origin 7 и определяли тепловые переходы.

[00210] На термограмме TNFR2-Fc_VH№4 (фиг. 4) показаны три отчетливых перехода при разворачивании, при этом температуры денатурации (T_m) составляют 64, 67 и 84°C. Авторы настоящего изобретения сделали вывод, что T_m, составляющая 64°C, соответствовала денатурации как домена TNFR2, так и домена scFv, связывающего NGF, при этом значения T_m, составляющие 67°C и 84°C, являются типичными для значений T_m денатурации для доменов CH2 и CH3 IgG1 соответственно (например, Dimasi, N., *et al.*, *J Mol Biol.* 393:672-92 (2009) и публикация согласно РСТ № 2013/070565). Без ограничения какой-либо теорией, scFv обычно характеризуются более низкими температурами денатурации, чем другие домены антитела, и их разворачивание характеризуется одним явлением перехода (Roberge *et al.*, 2006, Jung *et al.*, 1999, Tischenko *et al.*, 1998).

Пример 3. Подтверждение связывания антигена с TNFR2-Fc_VH№4

А. Связывание одного и двух антигенов посредством ELISA

[00211] Лунки Nunc Maxisorp покрывали при 4°C в течение ночи с помощью 50 мкл TNF α (R&D Systems), разбавленного до 5 мкг мл⁻¹ в PBS (рН 7,4). На следующий день покрывающий раствор удаляли и лунки блокировали с помощью 150 мкл блокирующего буфера [3% обезжиренное молоко-PBS] в течение 1 ч при комнатной температуре. Лунки трижды промывали с помощью PBS перед добавлением 50 мкл серии разбавлений TNFR2-Fc_VH№4, полученной в блокирующем буфере. Через 1 ч при комнатной температуре лунки трижды промывали в PBS-Tween 20 (0,1% объем/объем; PBS-T). Затем в лунки добавляли пятьдесят мкл биотинилированного NGF и инкубировали в течение еще одного часа при комнатной температуре перед промывкой, как указано выше, и добавляли 50 мкл конъюгата стрептавидин-HRP (1:100). Через 1 час при комнатной температуре лунки промывали с помощью PBS-T, добавляли 50 мкл 3,3',5,5'-тетраметилбензидинового субстрата и выдерживали до появления окрашивания.

Реакцию останавливали посредством добавления 1 М H₂SO₄ и измеряли оптическую плотность при 450 нм с применением ридера планшетов для микротитрования. Полученные данные анализировали с применением программного обеспечения Prism 5 (GraphPad, Сан-Диего, Калифорния). Для ELISA, при котором связывается один антиген, лунки покрывали либо TNF α , либо конъюгатом NGF-биотин, как указано выше, и связывание антител выявляли с помощью конъюгированного с HRP специфического антитела к Fc IgG человека (1:5000), и окрашивание проявлялось, как указано выше.

[00212] Результаты ELISA показаны на фиг. 5. TNFR2-Fc_VH№4 разрабатывали для связывания как с антигенами TNF α , так и с антигенами NGF. Связывание одного антигена выполняли посредством иммобилизации сначала одного антигена на 96-луночном планшете для микротитрования с последующим добавлением серийных разбавлений TNFR2-Fc_VH№4. Специфическое связывание выявляли с использованием специфического антитела к Fc IgG, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP). Для ELISA, при котором связываются два антигена, первый антиген, TNF α , подвергали иммобилизации на планшете для ELISA, а затем добавляли серийное разбавление TNFR2-Fc_VH№4 с последующим добавлением второго биотинилированного антигена, NGF, при фиксированной концентрации. Затем выявляли специфическое связывание с использованием стрептавидина, конъюгированного с HRP. TNFR2-Fc_VH№4 связывался с TNF α и NGF в ELISA, при котором связывается один антиген (фиг. 5А и В). В ELISA, в котором связывается два антигена, TNFR2-Fc_VH№4 одновременно связывался как с TNF α , так и с NGF (фиг. 5С).

В. Одновременное связывание антигенов посредством поверхностного плазмонного резонанса

[00213] Эксперименты по одновременному связыванию антигенов проводили по сути как описано в Dimasi, N., *et al.*, *J Mol Biol.* 393:672-92 (2009) с использованием прибора BIAcore 2000 (GE Healthcare). Вкратце, сенсорный чип CM5 использовали для иммобилизации примерно 1500 резонансных единиц TNFR2-Fc_VH№4 при 100 нМ. Затем поверхности сенсорных чипов использовали для конкурентного связывания TNF α и NGF. Антигены получали в буфере HBS-EP [10 мМ HEPES (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 3 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), 0,005% P20]. Для всех измерений связывания использовали расход, составляющий 30 мкл/мин. Для определения одновременного связывания полиспецифического антитела с TNF α и NGF на поверхность сенсорного чипа вводили 1 мкМ TNF α (молекулярная масса 17,5 кДа) и после завершения введения затем вводили смесь TNF α и NGF (молекулярная масса 13,5

кДа), в обоих случаях при 1 мкМ. TNF α включали в смесь с NGF для предупреждения потери сигнала вследствие диссоциации TNF α во время фазы связывания NGF. В качестве контроля выполняли аналогичную процедуру связывания и при последнем введении добавляли только TNF α , отсутствие дальнейшего повышения резонансных единиц в случае данного введения указывало на то, что TNF α связывался при уровнях насыщения. Проводили аналогичные эксперименты по связыванию и контрольные эксперименты, в которых порядок введения TNF α и NGF был обратным.

[00214] Одновременное связывание антигенов TNFR2-Fc_VH№4 характеризовали посредством поверхностного плазмонного резонанса. Явления связывания качественно анализировали последовательным образом. TNFR2-Fc_VH№4 подвергали ковалентной иммобилизации на поверхности сенсорного чипа с использованием химии конъюгации по аминокислотной группе. Затем вводили первый антиген с получением насыщающих уровней связывания с TNFR2-Fc_VH№4, после чего вводили второй антиген в виде эквимольной смеси с антигеном 1. Сенсограмма связывания явно демонстрировала, что TNFR2-Fc_VH№4 одновременно связывался с TNF α и NGF (фиг. 6). Одновременное связывание двух антигенов происходило независимо от порядка введения антигенов.

Пример 4. Ингибирование пролиферации клеток TF-1, индуцированной NGF

[00215] Клетки TF-1 (№ по каталогу 93022307 в ECACC) высевали при $1,5 \times 10^4$ клеток/лунка в 50 мкл бессывороточной культуральной среды в 96-луночный планшет для тканевых культур (Corning Costar) и инкубировали в течение 18 ч при 37°C с 5% CO₂. Рекомбинантный человеческий (Sigma) или мышинный NGF (R&D Systems) предварительно инкубировали с разбавлениями TNFR2-Fc_VH№4, MEDI-578 IgG1 TM YTE, несвязывающим изотипическим контрольным IgG1 TM YTE для MEDI-578 или несвязывающим биспецифическим изотипическим контрольным Bs3Ab R347 в течение 30 мин при 37°C в 96-луночном круглодонном планшете (Greiner). Затем в планшет с клетками добавляли пятьдесят микролитров каждого образца и инкубировали в течение 48 ч при 37°C. После периода инкубации добавляли 100 мкл буфера для анализа клеток TITRE GLO® (Promega) и планшет инкубировали в течение 10 мин при 37°C с 5% CO₂. Затем измеряли люминесценцию с использованием стандартного протокола для измерения люминесценции. Стандартная NGF-индуцированная пролиферация TF-1 в отсутствие антитела показана на фиг. 7А.

[00216] Функциональную активность TNFR2-Fc_VH№4 определяли с использованием NGF-индуцированной пролиферации TF-1. TNFR2-Fc_VH№4 был способен полностью ингибировать пролиферацию, индуцированную как NGF человека,

так и NGF мыши (фиг. 7B и 7C соответственно). Фиг. 7B: клетки TF-1 стимулировали рекомбинантным человеческим NGF, соответствующим концентрации EC₈₀. Клетки инкубировали с лигандом с серией разбавлений антитела в течение 48 ч, после чего пролиферацию клеток количественно оценивали посредством культивирования в течение 10 мин с буфером для анализа клеток TITRE GLO® (Promega). Фиг. 7C: клетки TF-1 стимулировали рекомбинантным мышинным NGF, соответствующим концентрации EC₈₀. Клетки инкубировали с лигандом с серией разбавлений антитела в течение 48 ч, после чего пролиферацию клеток количественно оценивали посредством культивирования в течение 10 мин с буфером для анализа клеток TITRE GLO® (Promega). Эти данные демонстрируют, что ингибирующая часть NGF TNFR2-Fc_VH№4 является биологически активной и ингибирует NGF-индуцированную пролиферацию с эффективностью, аналогичной MEDI-578, в качестве IgG1TM. Сходные данные также наблюдали в случае TNFR2-Fc_varB и другой полиспецифической связывающей молекулы, связывающей TNF-NGF, ндимаба var B (фиг. 7D и 7E). Ндимаб varB содержит полное антитело к TNF α , т. е. антитело, содержащее две полные тяжелые цепи и две полные легкие цепи в формате H₂L₂, при этом scFv MEDI-578 слит с C-концом тяжелой цепи антитела к TNF α . Легкая цепь ндимаба varB представлена под SEQ ID NO: 20, а тяжелая цепь ндимаба varB представлена под SEQ ID NO: 22.

Пример 5. Ингибирование апоптоза клеток U937, индуцированного TNF α

[00217] Клетки U937 (№ по каталогу 85011440 в ECACC) высевали в 96-луночный планшет для тканевых культур со стенками черного цвета (Corning Costar) при концентрации 8×10^5 клеток/луночка в 50 мкл культуральной среды. клетки U937 стимулировали рекомбинантным человеческим TNF α , соответствующим концентрации EC₈₀. Клетки инкубировали с лигандом с серией разбавлений антитела в течение 2 ч, после чего активность каспазы 3 количественно определяли посредством культивирования в течение 2 часов с реакционным буфером для анализа с применением каспазы 3. TNFR2-Fc_VH№4, несвязывающее биспецифическое изотипическое контрольное антитело Bs3Ab R347 и этанерцепт предварительно инкубировали с клетками в течение 30 мин при 37°C. После этого добавляли 50 мкл рекомбинантного человеческого TNF α (R&D Systems) с получением конечной концентрации для анализа, составляющей 20 нг/мл, и затем инкубировали в течение 2 ч при 37°C. После периода инкубации добавляли 50 мкл реакционного буфера для анализа с применением каспазы 3 (0,2% вес/объем CHAPS, 0,5% объем/объем Igepal CA-630, 200 mM NaCl, 50 mM HEPES, 20 мкМ субстрата DEVD-R110 (Invitrogen)) и клетки инкубировали в течение 2,5

ч при 37°C. Флуоресценцию измеряли при длине волны возбуждения, составляющей 475 нм, и длине волны испускания, составляющей 512 нм. Активность каспазы в отсутствие антагониста TNF α показана на фигуре 8А.

[00218] Функциональную активность TNFR2-Fc_VH№4 определяли с использованием анализа TNF α -индуцированной активности каспазы 3 в клетках U937. TNFR2-Fc_VH№4 полностью ингибировал TNF α -индуцированную активность каспазы 3, как и этанерцепт (фиг. 8В). Это ясно демонстрирует, что часть TNFR2-Fc_VH№4, ингибирующая TNF α , является биологически активной и характеризуется эффективностью, сходной с эффективностью этанерцепта. Сходные данные также наблюдали в случае TNFR2-Fc_varB и ндимаба varB (см. фигуру 8С).

Пример 6. Анализы *in vivo*

[00219] Все процедуры *in vivo* проводили в соответствии с законом Министерства внутренних дел Соединенного Королевства о животных (научные процедуры) (1986 г.) и они были одобрены местным комитетом по этике. На протяжении всего исследования использовали самок мышей C57Bl/6 (Charles River, Соединенное Королевство). Мышей содержали группами по 5/6 на клетку в отдельно вентилируемых клетках (IVC) со свободным доступом к пище и воде при 12-часовом цикле свет/темнота (свет включен с 07:00 до 19:00). В помещениях для содержания и осуществления процедур поддерживали при 24°C и постоянный фоновый шум поддерживали с помощью обычной радиостанции. Всем мышам вводили транспонеры под анестезией (3% изофлуран в кислороде) для целей идентификации за по меньшей мере 5 дней до начала каждого исследования.

A. Модель нейропатической боли согласно Seltzer

[00220] Механическую гипералгезию определяли с применением анальгезиметра (Randall LO, Selitto JJ, *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 111:409-19 (1957)) (Ugo Basile). Возрастающую силу применяли к дорсальной поверхности каждой задней лапы по очереди до тех пор, пока не наблюдали ответа отдергивания. В этот момент применение силы останавливали и записывали вес в граммах. Данные выражали в виде порога отдергивания в граммах для ипсилатеральной и контралатеральной лап. После определения исходных значений мышей разделяли на 2 группы с примерно равными соотношениями ипсилатеральная/контралатеральная лапа и подвергали их хирургическому вмешательству. Мышей анестезировали 3% изофлураном. После этого приблизительно 1 см левого седалищного нерва подвергали тупой диссекции через разрез на уровне середины бедра. Шовный материал (10/0 Virgin Silk: Ethicon) затем пропускали через дорсальную треть нерва и туго завязывали. Разрез закрывали с

помощью клея и мышам обеспечивали возможность восстановления в течение по меньшей мере семи дней перед началом тестирования. Ложнооперированные мыши проходили обработку по тому же протоколу, но после обнажения нерва рану заклеивали и обеспечивали возможность восстановления. Мышей тестировали в отношении гипералгезии в день 7 и 10 после хирургического вмешательства. После тестирования в день 10 оперированных мышей дополнительно разделяли на группы, которые получали изотипический контроль IgG1 CAT251 (0,03 мг/кг s. c.), этанерцепт (0,01 мг/кг s. c.), MEDI-578 (0,03 мг/кг s. c.) или комбинацию этанерцепта (0,01 мг/кг s. c.) и MEDI-578 (0,03 мг/кг s. c.). Все ложнооперированные мыши получали CAT251 (0,03 мг/кг s. c.). Механическую гипералгезию измеряли через 4 ч, 1, 2, 3, 4 и 7 дней после введения дозы.

[00221] Совместное введение этанерцепта и MEDI-578 в модели механической гипералгезии проявлялось в виде значительного снижения соотношения ипсилатеральная/контралатеральная лапа в день 10 после хирургического вмешательства по сравнению с ложнооперированными контролями (фиг. 9). Введение однократной дозы этанерцепта (0,01 мг/кг s. c.) или MEDI-578 (0,03 мг/кг s. c.) не приводило к значительному устранению данной гипералгезии. Совместное введение этанерцепта (0,01 мг/кг s. c.) вместе с MEDI-578 (0,03 мг/кг s. c.) приводило к значительному устранению механической гипералгезии через 4 ч после введения дозы, и эффект сохранялся до 7 дней после введения дозы.

[00222] Во втором исследовании оценивали влияние TNFR2-Fc_VHN₄. После определения механической гипералгезии мышам в день 13 после хирургического вмешательства вводили дозу изотипического контроля Bs3Ab R347 (0,03 мг/кг s. c.), этанерцепта (0,01 мг/кг s. c.), MEDI-578 (0,03 мг/кг s. c.) или TNFR2- Fc_VHN₄ (0,01 мг/кг или 0,03 мг/кг s. c.). Животные, подготовленные для ложной операции, получали изотипический контроль Bs3Ab R347 (0,03 мг/кг s. c.). Мышей тестировали в отношении механической гипералгезии через 4 ч после введения дозы и в дни 1, 2, 4 и 7 после введения дозы, как описано выше.

[00223] Введение TNFR2-Fc_VHN₄ приводило к значительному снижению соотношения ипсилатеральная/контралатеральная лапа в день 10 после хирургического вмешательства по сравнению с ложнооперированными контролями (фиг. 10A). Введение этанерцепта (0,01 мг/кг s. c.) или MEDI-578 (0,03 мг/кг s. c.) не приводило к значительному устранению механической гипералгезии. Однако введение TNFR2-Fc_VHN₄ (0,01 и 0,03 мг/кг s. c.) приводило к значительному устранению механической гипералгезии через 4 ч после введения дозы, и этот эффект сохранялся в течение до 6

дней после введения дозы. После введения контрольного Bs3Ab R347 эффекта не наблюдали. Сходные данные наблюдали при введении TNFR2-Fc_varB (см. фигуру 10B). Эти данные свидетельствуют о том, что TNFR2-Fc_VHN[№]4 способен значительно устранять боль при очень низких дозах, когда эквивалентные дозы, как было показано, неэффективны или минимально эффективны при введении MEDI-578 или этанерцепта по отдельности.

В. Модель хронической боли в суставах

[00224] Механическую гиперчувствительность определяли с применением устройства для определения недееспособности мышей (Linton Instrumentation). Мышей помещали в устройство задними лапами на отдельные датчики и рассчитывали распределение веса тела в течение периода времени, составляющего 4 с. Данные выражали в виде соотношения весовой нагрузки для ипсилатеральной и контралатеральной лап в граммах.

[00225] После определения исходных значений мышей разделяли на 2 группы с примерно равными соотношениями ипсилатеральная/контралатеральная лапа. Внутрисуставные инъекции осуществляли с применением следующей методики: животных анестезировали с применением 3% изофлурана в кислороде и левое колено брили и очищали. В коленный сустав каждой мыши путем инъекции вводили либо 10 мкл полного адьюванта Фрейнда (FCA) (10 мг/мл), либо среду-носитель (легкое минеральное масло) с использованием иглы 25 калибра, установленной на шприц Hamilton объемом 100 мкл. Инъекции осуществляли непосредственно в синовиальное пространство коленного сустава. Мышам обеспечивали восстановление и повторно тестировали в отношении изменения механической гиперчувствительности в дни 7 и 10 после инъекции, как описано выше. После тестирования в день 10 мышей, обработанных с помощью FCA, дополнительно рандомизировали на группы, и в день 13 мышам вводили этанерцепт (0,01 мг/кг i. p.) или среду-носитель, после чего они получали дозу MEDI-578 (0,03 мг/кг i. v.) или изотипического контроля CAT251 (0,03 мг/кг i. v.). Мышей тестировали в отношении механической гиперчувствительности через 4 ч после введения дозы и в дни 1, 2, 4 и 7 после введения дозы, как описано выше.

[00226] Эффект совместного введения этанерцепта и MEDI-578 оценивали с использованием внутрисуставной модели воспалительной боли, вызванной FCA. Внутрисуставное введение FCA вызывало механическую гиперчувствительность, которая проявлялась в виде значительного снижения соотношения ипсилатеральная/контралатеральная лапа в дни 7 и 10 по сравнению с контролем со

средой-носителем (фиг. 11). В группах с ложной обработкой не наблюдали снижения соотношения ипсилатеральная/контралатеральная лапа по сравнению с исходными уровнями до обработки. Введение этанерцепта (0,01 мг/кг i. p.) + CAT251 (0,03 мг/кг i. v.) или PBS (10 мл/кг i. p.) + MEDI-578 (0,03 мг/кг i. v.) вызывало незначительное устранение FCA-индуцированной механической гиперчувствительности через 4 ч и 1, 2, 4 и 7 дней после введения дозы, однако оно не достигало статистической значимости. Однако введение этанерцепта (0,01 мг/кг i. p.) + MEDI-578 (0,03 мг/кг i. v.) вызывало значительное устранение FCA-индуцированной механической гиперчувствительности во всех временных точках исследования после введения дозы.

[00227] Во втором исследовании оценивали влияние TNFR2-Fc_VH№4. После установления FCA-индуцированной механической гиперчувствительности мышам в день 13 после FCA вводили дозу: изотипического контроля Bs3Ab R347 (0,01 мг/кг s. c.), этанерцепта (0,01 мг/кг s. c.), MEDI-578 (0,01 мг/кг s. c.) или TNFR2-Fc_VH№4 (0,003 мг/кг или 0,01 мг/кг s. c.). Мышей снова тестировали в отношении механической гиперчувствительности через 4 ч после введения дозы и в дни 1, 2, 4 и 7 после введения дозы, как описано выше.

[00228] Эффект TNFR2-Fc_VH№4 ("биспецифического") по сравнению с эффектами этанерцепта и MEDI-578 при введении по отдельности показан на фиг. 12. Ни этанерцепт (0,01 мг/кг s. c.), ни MEDI-578 (0,01 мг/кг s. c.) не вызывали значительного устранения FCA-индуцированной механической гиперчувствительности в любой временной точке после введения дозы. Однако введение TNFR2-Fc_VH№4 вызывало значительное устранение FCA-индуцированной механической гиперчувствительности. Более высокая доза TNFR2-Fc_VH№4 (0,01 мг/кг s. c.) характеризовалась значительной активностью в течение всего исследования, тогда как более низкая доза (0,003 мг/кг s. c.) достигала значимости в день 1 после введения дозы и оставалась на уровне, сходном с уровнем для более высокой дозы во время исследования.

С. Установление модели FCA-индуцированной механической гиперчувствительности у крысы

[00229] Интраплантарная инъекция полного адьюванта Фрейнда (FCA) вызывает воспалительную реакцию, которая индуцирует гиперчувствительность и отек и имитирует некоторые аспекты клинической воспалительной боли. Эти эффекты можно изучать с использованием оборудования для измерения весовой нагрузки. Оценку потенциальных антигипералгезических свойств TNFR2-Fc_VH№4 при FCA-индуцированной гиперчувствительности осуществляли с использованием метода с

весовой нагрузкой. Необработанные крысы равномерно распределяют вес тела между двумя задними лапами. Однако, когда (левая) задняя лапа, в которую осуществляли инъекцию, воспалена и/или болит, вес перераспределяется так, чтобы на пораженную лапу ложился меньший вес (уменьшение весовой нагрузки на поврежденную лапу). Весовую нагрузку на каждую заднюю конечность определяют с применением устройства для определения недееспособности крыс (Linton Instruments, Соединенное Королевство). Крыс помещают в устройство для определения недееспособности задними лапами на отдельные датчики и регистрируют среднее усилие, прикладываемое обеими задними конечностями, в течение 4 секунд.

[00230] Для данного исследования необработанных крыс (самцов, крыс Sprague Dawley (Harlan, Соединенное Королевство), 198-258 г) акклиматизировали в помещении для осуществления процедур в их домашних клетках с пищей и водой, доступных *ad libitum*. Обеспечивали привыкание к устройству для определения недееспособности в течение нескольких дней. Перед индукцией инсульта осуществляли регистрацию исходной весовой нагрузки. Воспалительную гиперчувствительность индуцировали посредством интраплатарной инъекции FCA (доступного от Sigma, 100 мкл раствора с концентрацией 1 мг/мл) в левую заднюю лапу. Для оценки гиперчувствительности через 23 часа после введения FCA проводили измерение весовой нагрузки до обработки.

[00231] Затем животных ранжировали и рандомизировали на группы обработки в соответствии с окном FCA с весовой нагрузкой в схеме латинского квадрата. Через 24 часа после инъекции FCA животных обрабатывали либо TNFR2-Fc_VH№4 ("биспецифическим"), вводимым *i. v.* при 0,003, 0,01, 0,03, 0,3 и 3 мг/кг, антителом отрицательного контроля, NIP228 (антителом, полученным для связывания с гаптеном нитрофенолом) при *i. v.* введении при 3 мг/кг, средой-носителем (1% метилцеллюлозой), вводимой *p. o.* при 2 мл/кг, либо индометацином, вводимым *p. o.* при 10 мг/кг.

[00232] Весовую нагрузку оценивали через 4 и 24 часа после обработки антителами/лекарственными средствами. Данные анализировали путем сравнения групп обработки с контрольной группой, получавшей среду-носитель, в каждой временной точке. Статистический анализ включал ANOVA для повторяющихся измерений с последующим применением критерия плановых сравнений с применением InVivoStat (invivostat.co.uk) ($p < 0,05$ считали значимым). Результаты показаны на фиг. 13. Значительное устранение гиперчувствительности наблюдали при применении индометацина (10 мг/кг) через 4 и 24 часа. TNFR2-Fc_VH№4 при введении в дозах 0,3 и 3 мг/кг демонстрировал значительное устранение гиперчувствительности как через 4

часа, так и через 24 часа, TNFR2-Fc_VHN₄ при введении в дозах 0,003 и 0,03 мг/кг также демонстрировал значительное устранение гиперчувствительности, однако только через 24 часа. Изотипический контроль, NIP228, не оказывал значительного влияния на ответ на FCA ни в одной из временных точек.

Пример 7. Фосфорилирование p38, индуцируемое TNF α и NGF.

[00233] Данные из литературы свидетельствуют о том, что фосфорилирование p38 играет важную роль в развитии нейропатической боли. Например, было показано, что лечение ингибиторами p38 предупреждает развитие симптомов нейропатической боли в модели "щадящего" повреждения нерва (Wen YR et al., *Anesthesiology* 2007, 107:312-321) и в модели седалищной воспалительной нейропатии (Milligan ED et al., *J Neurosci* 2003, 23:1026-1040). В настоящем эксперименте роль TNF α , NGF и комбинации TNF α и NGF в фосфорилировании p38 исследовали в анализе культуры клеток. Вкратце, клетки Neuroscreen-1 (субклон нейроэндокринных клеток крысы PC-12) инкубировали с возрастающими количествами TNF α , NGF или комбинации TNF α и NGF. После 20-минутного периода инкубации фосфо-p38 количественно оценивали с использованием анализа гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF) (Cisbio).

[00234] *Анализ HTRF.* После стимуляции с помощью TNF α , NGF или комбинации TNF α и NGF образцы надосадочной жидкости клеток быстро удаляли и клетки лизировали в лизирующем буфере. MAPK фосфо-p38 (Thr180/Tyr182) выявляли в лизатах в формате сэндвич-анализа с использованием двух разных специфических антител: антитела к фосфо-p38, конъюгированного с криплатом европия (донорный флуорофор), и антитела к p38 (общему), конъюгированного с d2 (акцепторный флуорофор). Антитела инкубировали с лизатами клеток и соотношения HTRF рассчитывали по измерениям флуоресценции при 665 нм и 620 нм, выполненным с использованием многоканального планшет-ридера EnVision (Perkin Elmer).

[00235] Данные представлены в виде соотношений HTRF, которые рассчитывают как отношение испускания при 665 нм и испускания при 620 нм. Тепловая карта, демонстрирующая соотношения HTRF для реакций фосфо-p38, показана на фиг. 14. Кривые доза-ответ, демонстрирующие влияние TNF α , NGF или комбинации TNF α и NGF, показаны на фиг. 15. Как видно из фиг. 15, комбинированный эффект более высоких концентраций TNF α и NGF на фосфо-p38 больше, чем прогнозируемая сумма сигналов фосфо-p38, индуцированных любым фактором по отдельности. Эти данные свидетельствуют о том, что TNF α и NGF могут действовать вместе для индукции

фосфорилирования p38, и что эти два пути могут участвовать в молекулярной передаче сигнала, приводящей к боли.

Пример 8. Фосфорилирование ERK, индуцируемое TNF α и NGF.

[00236] Подобно p38, ERK также активируется в ходе развития нейропатической боли (Zhuang ZY et al., Pain 2005, 114:149-159). В настоящем эксперименте роль TNF α , NGF и комбинации TNF α и NGF в фосфорилировании ERK исследовали в анализе культуры клеток. Вкратце, клетки Neuroscreen-1 (субклон нейроэндокринных клеток крысы PC-12) инкубировали с возрастающими количествами TNF α , NGF или комбинации TNF α и NGF. После 20-минутного периода инкубации фосфо-ERK количественно оценивали с использованием анализа HTRF (Cisbio).

[00237] *Анализ HTRF.* После стимуляции образцы надосадочной жидкости клеток быстро удаляли и клетки лизировали в лизирующем буфере. MAPK фосфо-ERK (Thr202/Tyr204) выявляли в лизатах в формате сэндвич-анализа с использованием двух разных специфических антител: антитела к фосфо-ERK, конъюгированного с криптоатом европия (донорный флуорофор), и антитела к ERK (общему), конъюгированного с d2 (акцепторный флуорофор). Антитела инкубировали с лизатами клеток и соотношения HTRF рассчитывали по измерениям флуоресценции при 665 нм и 620 нм, выполненным с использованием многоканального планшет-ридера EnVision (Perkin Elmer).

[00238] Данные представлены в виде соотношений HTRF, которые рассчитывают как отношение испускания при 665 нм и испускания при 620 нм. Тепловая карта, демонстрирующая соотношения HTRF для реакций фосфо-ERK, показана на фиг. 16. Кривые доза-ответ, демонстрирующие влияние TNF α , NGF или комбинации TNF α и NGF, показаны на фиг. 17. Как видно из фиг. 17, низкие количества TNF α отдельно не индуцировали фосфо-ERK, однако более высокие количества приводили к повышению уровня NGF-индуцированного фосфо-ERK. Эти данные свидетельствуют о том, что TNF α и NGF могут действовать вместе для индукции фосфорилирования p38, и что эти два пути могут участвовать в молекулярной передаче сигнала, приводящей к боли.

Пример 9. Эффекты различных доз TNFR2-Fc_varB у людей с болезненным остеоартритом коленного сустава

[00239] Многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование с чередованием однократной возрастающей дозы (SAD) и многократных возрастающих доз (MAD) разрабатывали для субъектов в возрасте от 18 до 80 лет с болезненным остеоартритом коленного сустава. Когорта 1 SAD включала трех пациентов, получающих TNFR2-Fc_varB, и 2 пациентов, получающих плацебо.

Каждая из когорт 2-7 CAP включала 8 пациентов, при этом шесть пациентов в каждой когорте получали TNFR2-Fc_varB, и 2 пациента в каждой когорте получали плацебо. Каждая из когорт 8 и 9 MAD включала 18 пациентов, при этом 12 пациентов в каждой когорте получали TNFR2-Fc_varB, и 6 пациентов в каждой когорте получали плацебо. Каждая из когорт 10 и 11 MAD включала 12 пациентов, при этом 9 пациентов в каждой когорте получали TNFR2-Fc_varB, и 3 пациентов в каждой когорте получали плацебо. Упрощенная схема дизайна исследования представлена на фигурах 18А и 18В.

[00240] Субъекты в когортах SAD получали либо однократную инфузию TNFR2-Fc_varB, либо плацебо в двойном слепом режиме. После выписки субъектов инструктировали ежедневно регистрировать боль по 11-балльной шкале NRS (0-10) в примерно одно и то же время каждое утро для отображения отзыва в течение 24 часов, до конца периода последующего наблюдения.

[00241] Неожиданно было обнаружено, что однократная внутривенная доза TNFR2-Fc_varB, находящаяся в диапазоне доз от 2 до 1000 мкг/кг, приводит к снижению среднесуточного показателя боли (при максимальном эффекте) на 0,69-3,45 балла по сравнению с плацебо (фигуры 19А-19В). Данный эффект является статистически значимым ($p \leq 0,01$) при дозах, составляющих 50, 250 и 1000 мкг/кг. Продолжительность данного эффекта, что неожиданно, составляла более 10 дней по сравнению с периодом полужизни TNFR2-Fc_varB (3-4 дня). Снижение показателя боли у тех субъектов, которые получают плацебо, по-видимому, составляет примерно 0,5 балла. Данный эффект плацебо является относительно низким и, по-видимому, стабильным.

[00242] Индекс остеоартрита Университетов Западного Онтарио и МакМастера (WOMAC) представляет собой инструмент, основанный на опроснике, предназначенном для измерения функционального нарушения в результате хронической боли у субъектов с ОА. Неожиданно, однократные введения TNFR2-Fc_varB при дозах, находящихся в диапазоне от 0,3 до 1000 мкг/кг, значительно снижали средний показатель боли по подшкале WOMAC в течение периода времени, составляющего 10+ дней, на до ~3 баллов (фигуры 20А-20В). При дозах, составляющих 50, 250 и 1000 мкг/кг, максимальное снижение показателя боли по подшкале варьируется от 2,0 до 2,9 и является статистически значимым при р-значениях, составляющих 0,06 или меньше. Как и в случае конечной точки оценки боли по шкале NRS, продолжительность эффекта после введения однократной дозы (~10+ дней) была более длительной, чем ожидалось для молекулы с периодом полужизни 3-4 дня. Максимальный эффект соответствовал

измеренному подавлению свободного NGF на 46-55% при дозах, составляющих 50 и 250 мкг/кг соответственно (фигура 21).

[00243] Влияние TNFR2-Fc_varB на уровни свободного NGF на периферии определяли с применением анализа Singulex Egenna. Вкратце, образцы крови брали у каждого субъекта во временные точки до введения дозы, через 1, 8 и 24 часа после введения дозы, в дни 8, 15, 22, 29 (в дни 43 и 56 только для двух наиболее высоких доз). Образцы плазмы крови получали и анализировали в соответствии со следующими стадиями: (1) смешивание образцов с магнитными гранулами, покрытыми mAb к NGF, (2) комплекс магнитных гранул с захваченным NGF смешивают с флуоресцентно меченым антителом к NGF человека, (3) элюирование комплекса с гранулами с высвобождением флуоресцентных меток, (4) флуоресцентный сигнал определяют помощью флуоресцентного ридера Egenna. Рассчитывали подавление свободного NGF и наносили на график среднее подавление в течение 14-дневного периода после введения дозы при каждой концентрации TNFR2-Fc_varB (фигура 22). Среднее подавление свободного NGF в течение 14 дней находилось в диапазоне от 0 (0,3 мкг/кг) до ~65% (1000 мкг/кг).

[00244] Влияние TNFR2-Fc_varB на уровни общего NGF на периферии определяли с применением анализа посредством LC-MS/MS, разработанного Q2 Solutions. Вкратце, образцы крови брали у каждого субъекта во временные точки до введения дозы, через 1, 8 и 24 часа после введения дозы, в дни 8, 15, 22, 29 (в дни 43 и 56 только для двух наиболее высоких доз). Образцы сыворотки крови получали и анализировали способом, сходным с описанным в Neubert et al., 2013, Anal. Chem., 85:1719-1726. Повышение уровней общего NGF рассчитывали и наносили на график для каждого субъекта в когортах 1-4 SAD (0,3-50 мкг/кг) и средние уровни общего NGF рассчитывали для каждой из когорт 1-7. Явное повышение уровней общего NGF наблюдали после однократного введения повышенных доз TNFR2-Fc_varB (фигура 23; таблица 2). Без ограничения теорией, повышение может происходить вследствие повышения периода полужизни NGF в соответствии с периодом полужизни TNFR2-Fc_varB, с которым он связан в данном случае.

Таблица 2. Средние уровни общего NGF на периферии после лечения с применением TNFR2-Fc_varB

Когорта	N	RoA	Доза (мкг/кг)	Наблюдаемый средний % подавления NGF	Средний уровень общего NGF (пг/мл)
1	3	IV	0,3	3	65,2
2	6	IV	2	27	98,1
3	6	IV	10	29	228,0
4	6	IV	50	35	334,0
5	6	IV	250	59	539,0
6	6	IV	1000	68	199,0*
7	6	SC	50	37	206,0

* Доступны данные только от 1 субъекта. RoA – путь введения, IV означает внутривенный, SC означает подкожный

[00245] Следует отметить, что у двух субъектов в каждой когорте отсутствовало явное повышение уровня общего NGF. Поскольку исследование остается слепым на момент подачи настоящей заявки, прогноз заключается в том, что эти образцы представляют собой плацебо. Для когорт 3 и 4 наблюдали очевидное влияние антител к лекарственному средству на уровни общего NGF. Данный эффект, вероятно, имел место вследствие снижения воздействия TNFR2-Fc_varB и соответствующего сокращения продолжительности эффекта.

[00246] В качестве альтернативного способа измерения уровней TNF α уровни CXCL-13 можно измерять с использованием платформенной технологии Simoa. Экспрессия гена CXCL-13 регулируется путем лимфотоксина альфа. TNFR2-Fc_varB связывает TNF α и лимфотоксин альфа и, таким образом, предполагается, что он оказывает влияние на уровни экспрессии CXCL-13. Образцы крови брали у каждого субъекта во временные точки до введения дозы, через 1, 8 и 24 часа после введения дозы, в дни 8, 15, 22, 29 (в дни 43 и 56 только для двух наиболее высоких доз). Образцы сыворотки крови получали и затем анализировали в анализе CXCL-13 Simoa. Наблюдали явный ответ с повышенным подавлением уровней CXCL-13, наблюдаемым после введения возрастающих однократных доз TNFR2-Fc_varB (фигура 24).

[00247] Уровни TNFR2-Fc_varB в сыворотке крови, вводимого внутривенно, определяли через различные временные интервалы после введения однократных возрастающих доз. Наблюдаемая фармакокинетика TNFR2-Fc_varB в сыворотке крови

указывала на то, что воздействие наблюдалось во всех когортах, и воздействия повышались в среднем дозозависимым образом (фигура 25). На фигуре 25 показано, что подкожное введение обеспечивало относительно стабильный уровень TNFR2-Fc_varB в сыворотке крови в течение более 10 дней.

[00248] Абсолютную биодоступность при подкожном введении рассчитывали путем сравнения средних геометрических значений ($n = 6$) площади под кривой (AUC) при подкожном введении однократных доз 50 мкг/кг по сравнению с внутривенным введением 50 мкг/кг TNFR2-Fc_varB, как показано в таблице 3. Было обнаружено, что биодоступность при подкожном введении TNFR2-Fc_varB была неожиданно низкой и согласно оценкам составляла 21%. Как показано в таблице 3а, 90% доверительный интервал для рассчитанного значения абсолютной биодоступности составлял от 0,1627 до 0,2781.

Таблица 3. Предварительный анализ фармакокинетики внутривенного и подкожного введения TNFR2-Fc_varB

Параметр (единицы)	Статистический показатель	Доза TNFR2-Fc_varB (путь)	
		50 мкг/кг (iv)	50 мкг/кг (sc)
C_{max} (нг/мл)	N	6	6
	Геометрическое среднее значение	1082	78,53
	CV (%)	14,04	32,1
t_{max} (дни)	N	6	6
	Медианное значение	0,04	7,07
	Минимальное значение, максимальное значение	0,04, 0,04	7,01, 8,09
t_{last} (дни)	N	6	6
	Медианное значение	10,473	17,622
	Минимальное значение, максимальное значение	6,95, 27,90	14,01, 29,10
AUC_{last} (дни. нг/мл)	N	6	6
	Геометрическое среднее значение	3766	801
	CV (%)	26,87	25,16
$AUC_{0-\infty}$ (дни. нг/мл)	N	6	1
	Геометрическое среднее значение	4267	NC

	CV (%)	17,89	NC
$t_{1/2}$ (дни)	N	6	1
	Среднее арифметическое значение	3,304	NC
	SD	0,5104	NC
V_{ss} (л) ^a	N	6	1
	Среднее арифметическое значение	4,473	NC
	SD	0,3705	NC
CL (л/день) ^a	N	6	1
	Среднее арифметическое значение	0,9649	NC
	SD	0,1582	NC

При $N < 3$ суммарную статистику не рассчитывали.

$AUC_{0-\infty}$: площадь под кривой зависимости концентрации от времени от нуля до бесконечности; AUC_{last} : площадь под кривой зависимости концентрации от времени от нуля до последней измеряемой временной точки; CL: клиренс; C_{max} : максимальная наблюдаемая концентрация; CV: коэффициент вариации (геометрический); iv: внутривенный; Max: максимальный; min: минимальный; N: количество субъектов; sc: подкожный; NC: рассчитать невозможно; SD: стандартное отклонение; $t_{1/2}$: период полужизни; t_{last} : время последней наблюдаемой измеряемой концентрации; t_{max} : время до достижения C_{max} ; V_{ss} : объем распределения в устойчивом состоянии.

Таблица 3а. Анализ абсолютной биодоступности TNFR2-Fc_varB при подкожном введении

Параметр (единицы)	Доза и путь введения	n	Среднее геометрическое значение, рассчитанное по методу LS	Сравнение SC и IV введения (соотношение геометрических средних значений, рассчитанных по методу LS)	
				Соотношение (SC:IV)	90% CI
C_{max} (нг/мл)	50 мкг/кг SC	6	78,53	0,0725	0,0563, 0,0935
	50 мкг/кг IV	6	1082,47		
AUC_{last} (дни.нг/мл)	50 мкг/кг SC	6	801,17	0,2127	0,1627, 0,2781
	50 мкг/кг IV	6	3766,28		

AUC_{last} : площадь под кривой зависимости концентрации от времени от нуля до последней измеряемой временной точки; C_{max} : максимальная наблюдаемая концентрация; IV: внутривенный; LS: метод наименьших квадратов; n: количество субъектов, включенных в анализ; PK: фармакокинетический; SC: подкожный.

[00249] Субъекты в когортах MAD получали повторные внутривенные инфузии TNFR2-Fc_varB в диапазоне от 1 до 450 мкг/кг один раз в 2 недели (всего 4 дозы) или плацебо в двойном слепом режиме. Наблюдаемая фармакокинетика TNFR2-Fc_varB в сыворотке крови указывала на то, что воздействие наблюдалось во всех когортах, и воздействия повышались в среднем дозозависимым образом (фигура 26). Анализ воздействие-ответ свидетельствует о том, что максимальная эффективность снижения боли достигалась в диапазоне внутривенных доз, составляющем 150-450 мкг/кг (фигура 27; таблица 4).

Таблица 4. Ответ NGF и болевой ответ у субъектов, которых лечили с помощью TNFR2-Fc_varB

Когорта	N	RoA	Доза (мкг/кг)	Наблюдаемый средний % подавления NGF	WOMAC (CFB) на неделе 8	WOMAC (CFP) на неделе 8
8	12	IV	1	16	0,2	1,3
9	11	IV	5	18	-0,8	0,4
10	9	IV	50	33	-1,4	-0,3
11	11	IV	150	37	-2,4	-1,2
12	7	IV	450	47	-2,3	-1,1

RoA: путь введения; изменение по сравнению с исходным уровнем (CFB); изменение по сравнению с плацебо (CFP).

[00250] После выписки субъектов инструктировали ежедневно регистрировать боль по 11-балльной шкале NRS (0-10) в примерно одно и то же время каждое утро для отображения отзыва в течение 24 часов, до конца периода последующего наблюдения. Повторные инъекции либо 150 мкг/кг TNFR2-Fc_varB и 450 мкг/кг TNFR2-Fc_varB приводили к явному снижению боли по сравнению с контролями, которых лечили с помощью плацебо (фигура 28A). Обе эти дозы также приводили к большему снижению боли по сравнению с дозой опиоида оксикодона, составляющей 40 мг, дозой танезумаба, представляющего собой антитело к NGF, составляющей 2,5 мг или 5 мг (фигура 28B)

танезумаба, и были более эффективны для снижения боли по сравнению с максимальным снижением боли, достигаемым при применении фасинумаба, фулранумаба или танезумаба (фигура 28С).

[00251] Уровни антител к лекарственному средству (ADA) измеряли посредством оценки иммуногенности (Food and Drug Administration. Guidance for industry. Immunogenicity assessment for therapeutic protein products. August 2014. Доступно по адресу:

<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm338856.pdf>. Доступ получали 27 июля 2018 г.). В целом, распространенность ADA у субъектов, которые получали повторные дозы TNFR2-Fc_varB, составляла 70% (35 из 50 субъектов). Распространенность ADA определяли как долю субъектов, которые были ADA-положительными в любое время (на исходном уровне и/или после исходного уровня). Не было очевидной связи между уровнями доз TNFR2-Fc_varB и распространенностью ADA, хотя небольшая часть пациентов характеризовалась высоким титром ADA, как показано в таблице 5 ниже. Для определения того, влияет ли высокий титр ADA на воздействие и эффективность TNFR2-Fc_varB, воздействие TNFR2-Fc_varB, титр ADA и снижение боли измеряли у отдельного субъекта, которого лечили с помощью 150 мкг/кг TNFR2-Fc_varB. Неожиданно, несмотря на высокий титр ADA, наблюдалось значительное воздействие TNFR2-Fc_varB, и эффективность снижения боли сохранялась в течение более 50 дней (фигура 29). Кроме того, период полужизни TNFR2-Fc_varB был выше у субъектов с более низкими титрами ADA, и ни один из пациентов, которых лечили с помощью 450 мкг/кг TNFR2-Fc_varB, не характеризовался высоким титром ADA (фигура 30). Важно отметить, что не было ассоциации между ADA и нежелательными явлениями.

Таблица 5. Распространенность ADA между дозовыми группами после предварительного анализа

Доза	%ADA+ (субъекты, которых лечили)	Максимальные титры (минимальное значение- медианное значение- максимальное значение)	меньше 1000	1000- 10000	больше 10000
1 мкг/кг iv	41,7% (5/12)	120-960-3840	3 (60%)	2 (40%)	0 (0%)
5 мкг/кг iv	72,7% (8/11)	120-1920-15360	3 (37,5%)	4 (50%)	1 (12,5%)
50 мкг/кг iv	88,9% (8/9)	480-3840-61440	2 (25%)	5 (62,5%)	1 (12,5%)
150 мкг/кг iv	81,8% (9/11)	60-1920-30720	2 (22,2%)	5 (55,6%)	2 (22,2%)
450 мкг/кг iv	71,4% (5/7)	30-480-1920	4 (80%)	1 (20%)	0 (0%)
Все пациенты	70,0% (35/50)	30-1920-61440	14 (40%)	17 (48,6%)	4 (11,4%)

[00252] Неожиданно, используя данные стадии MAD испытания, авторы настоящего изобретения также обнаружили, что вес тела не является клинически значимой ковариатой для воздействия ($p = 0,61$; фигура 31).

Пример 10. Эффекты фиксированных доз TNFR2-Fc_varB при подкожном введении у людей с болезненным остеоартритом коленного сустава

[00253] На основании обнаружения того, что вес тела не является клинически значимой ковариатой для воздействия TNFR2-Fc_varB, авторы настоящего изобретения предположили, что стратегия фиксированного дозирования TNFR2-Fc_varB будет эффективной для лечения боли у людей. Таким образом, многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое клиническое испытание было разработано для субъектов в возрасте от 18 до 80 лет с болезненным остеоартритом коленного сустава. Примерно 300 подходящих субъектов будут случайным образом распределены для лечения с помощью TNFR2-Fc_varB или плацебо для того, чтобы гарантировать, что примерно 255 субъектов завершат период лечения. Субъекты будут

получать одну из 4 фиксированных доз TNFR2-Fc_varB при подкожном введении (7,5 мг, 25 мг, 75 мг и 150 мг) или плацебо один раз в 2 недели (Q2W) в течение 12-недельного периода. Предполагается, что эти фиксированные подкожные дозы TNFR2-Fc_varB оказывают эффекты, сходные с эффектами доз TNFR2-Fc_varB, составляющих 15, 50, 150 и 300 мкг/кг соответственно, при внутривенном введении, и их рассчитывали на основании биодоступности, наблюдаемой в случае подкожно вводимого TNFR2-Fc_varB, и распределения веса пациентов с ОА. В целом, каждый субъект получит 6 доз TNFR2-Fc_varB или плацебо в течение периода лечения. Упрощенная схема дизайна исследования представлена на фигуре 32.

[00254] Начиная с 14 дней до начала лечения субъектов проинструктируют о ежедневной регистрации боли по 11-балльной шкале NRS (0-10) в примерно одно и то же время каждое утро для отображения отзыва в течение 24 часов, до по меньшей мере 6 недель после окончательного введения TNFR2-Fc_varB или плацебо.

[00255] Субъектов проинструктируют о заполнении опросника WOMAC в определенные временные точки, начиная до начала лечения и заканчивая через по меньшей мере 6 недель после последнего введения TNFR2-Fc_varB или плацебо.

[00256] Субъектов проинструктируют об осуществлении общей оценки пациентом (PGA) в определенные временные точки, начиная до начала лечения и заканчивая через по меньшей мере 6 недель после последнего введения TNFR2-Fc_varB или плацебо. PGA представляет собой 5-балльную шкалу Лайкерта, используемую для оценки симптомов и нарушения активности вследствие ОА коленного сустава. Субъектов просят определить число от 1, что соответствует "очень хорошо" (без симптомов и ограничения обычной повседневной деятельности), до 5, что соответствует "очень плохо" (очень тяжелые симптомы, которые являются непереносимыми, и неспособность выполнять все виды обычной повседневной деятельности), на основании вопроса "Учитывая все аспекты того, каким образом ОА коленного сустава влияет на вас, как вы себя чувствуете сегодня?"

[00257] Влияние TNFR2-Fc_varB на уровни свободного NGF на периферии можно измерить. Например, уровень свободного NGF на периферии можно измерять один раз в неделю, начиная с дня 1 после введения до недели 12, а затем снова измерять на неделе 18 и неделе 28.

[00258] Влияние TNFR2-Fc_varB на уровни общего NGF на периферии можно измерить. Например, уровень общего NGF на периферии можно измерять один раз в

неделю, начиная с дня 1 после введения до недели 12, а затем снова измерять на неделе 18 и неделе 28.

[00259] В качестве альтернативного способа измерения уровней TNF α можно измерять уровни CXCL-13. Например, уровни CXCL-13 можно измерять один раз в неделю, начиная с дня 1 после введения до недели 12, а затем снова измерять на неделе 18 и неделе 28.

Перечень последовательностей

SEQ ID NO: 1 NP_002497.2| предшественник фактора роста нервов бета [*Homo sapiens*]

1 MSMLFYTLIT AFLIGIQAEP HSESNVPAGH TIPQAHWTKL QHSLDTALRR ARSAPAAAIA
61 ARVAGQTRNI TVDPRLFKKR RLRSPRVLFS TQPPREAADT QDLDFEVGGA APFNRTHRSK
121 RSSSHPIFHR GEFSVCDSVS VWVGDKTTAT DIKGKEVMVL GEVNINNSVF KQYFFETKCR
181 DPNPVDSGCR GIDSKHWNSY CTTTHTFVKA LTMDGKQAAW RFIRIDTACV CVLSRKAVRR
241 A

SEQ ID NO: 2 NP_000585.2| фактор некроза опухоли [*Homo sapiens*]

1 MSTESMIRDV ELAEEALPKK TGGPQGSRRR LFLSLFSFLI VAGATTLFCL LHFVIGPQR
61 EEFPRLSLI SPLAQAVRSS SRTPSDKVA HVVANPQAEQ QLQWLNRRAN ALLANGVELR
121 DNQLVVPSEG LYLIYSQVLF KGQGCPTHV LLTHTISRIA VSYQTKVNL SAIKSPCQRE
181 TPEGAEAKPW YEPIYLGGVF QLEKGDRLSA EINRPDYLDF AESGQVYFGI IAL

SEQ ID NO: 3 VH MEDI-578 (VH 1256A5)

1 QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGGTFS TYGISWVRQA PGQGLEWMGG IIPFDGTGNS
61 AQSFGQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSS RIYDLNPSLT AYYDMDVWGQ
121 GTMVTVSS

SEQ ID NO: 4 VHCDR1 MEDI-578

1 TYGIS

SEQ ID NO: 5 VHCDR2 MEDI-578

1 GIIPFDGTGN SAQSFQG

SEQ ID NO: 6 VHCDR3 MEDI-578

1 SSRIYDLNPS LTAYYDMDV

SEQ ID NO: 7 VL MEDI-578 (VL 1256A5)

1 QSVLTQPPSV SAAPGQKVTI SCSGSSSNIG NNYVSWYQQL PGTAPKLLIY DNNKRPSGIP
61 DRFSGSKSGT SATLGITGLQ TGDEADYYCG TWDSSLSAWV FGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 8 VLCDR1 MEDI-578

1 SGSSSNIGNN YVS

SEQ ID NO: 9 VLCDR2 MEDI-578

1 DNNKRPS

SEQ ID NO: 10 VLCDR3 MEDI-578

1 GTWDSSLSAW V

SEQ ID NO: 11

1 SSRIYDFNSA LISYYDMDV

SEQ ID NO: 12

1 SSRIYDMISS LQPYDMDV

SEQ ID NO: 13 аминокислотная последовательность растворимого TNFR2

1 LPAQVAFTPY APEPGSTCRL REYYDQTAQM CCSKCSPGQH AKVFCTKTS D TVCDSCEDST
 61 YTQLWNWVPE CLSCGSRCSS DQVETQACTR EQNRICRCRP GWYCALSQEQE GCRLCAPLRK
 121 CRPGFGVARP GTETSDVVCK PCAPGTFSNT TSSTDICRPH QICNVVAIPG NASMDAVCTS
 181 TSPTRSMAPG AVHLPQPVST RSQHTQPTPE PSTAPSTSFL LPMGPSPPAE GSTGDEPKSC
 241 DKHTTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 301 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
 361 GQPREPQVY T LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
 421 DGSFFLYSKL TVDKSRWQOG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS LSLSPGK

SEQ ID NO: 14 TNFR2-Fc_VH№4 - аминокислотная последовательность

1 LPAQVAFTPY APEPGSTCRL REYYDQTAQM CCSKCSPGQH AKVFCTKTS D TVCDSCEDST
 61 YTQLWNWVPE CLSCGSRCSS DQVETQACTR EQNRICRCRP GWYCALSQEQE GCRLCAPLRK
 121 CRPGFGVARP GTETSDVVCK PCAPGTFSNT TSSTDICRPH QICNVVAIPG NASMDAVCTS
 181 TSPTRSMAPG AVHLPQPVST RSQHTQPTPE PSTAPSTSFL LPMGPSPPAE GSTGDEPKSC
 241 DKHTTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 301 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
 361 GQPREPQVY T LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
 421 DGSFFLYSKL TVDKSRWQOG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG GSGGGGSQVQ
 481 LVQSGAEVKK PGSSVKV SCK ASGGTFSTYG ISWVRQAPGQ GLEWMGGIIP IFDTGNSAQ S
 541 FQGRVTITAD ESTSTAYMEL SSLRSED TAV YYCARSSRIY DLNPSLTAYY DMDVWGQGT M
 601 VTVSSGGGGS GGGGSGGGGS AQS VLTQPPS VSAAPGQKVT ISCSGSSSNI GNNYVSWYQQ
 661 LPGTAPKLLI YDNNKRPSGI PDRFSGSKSG TSATLGITGL QTGDEADYYC GTWDSSLSAW
 721 VFGGGTKLTV L

SEQ ID NO: 15 последовательность линкера из 15 аминокислот (Gly₄Ser)₃

1 GGGGSGGGGS GGGGS

SEQ ID NO: 16 TNFR2-Fc_VH№4 - нуклеотидная последовательность

1 CTGCCCCGCC AGGTGGCCTT TACCCCTTAT GCCCCGAGC CCGGCAGCAC CTGTGGCTG
 61 AGAGAGTACT ACGACCAGAC CGCCAGATG TGCTGCAGCA AGTGCTCTCC TGGCCAGCAT
 121 GCCAAGGTGT TCTGCACCAA GACCAGCGAC ACCGTGTGCG ACAGCTGCGA GGACAGCACC
 181 TACACCCAGC TGTGGA AACTG GGTGCCCGAG TGCCTGAGCT GCGGCAGCAG ATGCAGCAGC
 241 GACCAGGTGG AAACCCAGGC CTGCACCAGA GAGCAGAACC GGATCTGCAC CTGTAGACCC
 301 GGCTGGTACT GCGCCCTGAG CAAGCAGGAA GGCTGCAGAC TCTGCGCCCC TCTGCGGAAG
 361 TGCAGACCCG GCTTTGGCGT GGCCAGACCC GGCACCGAGA CAAGCGACGT GGTCTGTAAG
 421 CCCTGCGCTC CTGGCACCTT CAGCAACACC ACCAGCAGCA CCGACATCTG CAGACCCAC
 481 CAGATCTGCA ACGTGGTGGC CATCCCCGGC AACGCCAGCA TGGATGCCGT CTGCACCAGC
 541 ACTAGCCCCA CCAGAAGTAT GGCCCTGGC GCCGTGCATC TGCCCCAGCC TGTGTCCACC
 601 AGAAGCCAGC ACACCCAGCC CACCCCTGAG CCTAGCACCG CCCCCTCCAC CAGCTTTCTG
 661 CTGCCTATGG GCCCTAGCCC TCCAGCCGAG GGAAGCACAG GCGACGAGCC CAAGAGCTGC
 721 GACAAGACCC ACACCTGTCC CCCCTGCCCT GCCCCTGAAC TGCTGGGCGG ACCCAGCGTG

781 TTCCTGTTCC CCCCAAAGCC CAAGGACACC CTGATGATCA GCCGGACCCC CGAAGTGACC
 841 TGGCTGGTGG TGGACGTGTC CCACGAGGAC CCTGAAGTGA AGTTCAATTG GTACGTGGAC
 901 GGGCTGGAAG TGCACAACGC CAAGACCAAG CCCAGAGAGG AACAGTACAA CTCCACCTAC
 961 CGGGTGGTGT CCGTGCTGAC CGTGCTGCAC CAGGACTGGC TGAACGGCAA AGAGTACAAG
 1021 TGCAAGGTCT CCAACAAGGC CCTGCCTGCC CCCATCGAGA AAACCATCAG CAAGGCCAAG
 1081 GGCCAGCCCC GCGAGCCTCA GGTGTACACA CTGCCCCCCA GCCGGGAAGA GATGACCAAG
 1141 AACCAGGTGT CCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTACC CCAGCGATAT CGCCGTGGAA
 1201 TGGGAGAGCA ATGGCCAGCC CGAGAACAAC TACAAGACCA CCCCCCTGT GCTGGACAGC
 1261 GACGGCTCAT TCTTCTGTA CAGCAAGCTG ACCGTGGACA AGAGCCGGTG GCAGCAGGGC
 1321 AACGTGTTCA GCTGCAGCGT GATGCACGAG GCCCTGCACA ACCACTACAC CCAGAAGTCC
 1381 CTGAGCCTGA GCCCCGAAA GGGCGGTGGC GGATCCGGAG GTGGGGGATC TCAGGTGCAG
 1441 CTGGTGCAGT CTGGCGCCGA AGTGAAGAAA CCCGGCTCTA GCGTGAAGGT GTCTGCAAG
 1501 GCCAGCGGCG GCACCTTCTC CACCTACGGC ATCAGCTGGG TCCGCCAGGC CCCTGGACAG
 1561 GGCCTGGAAT GGATGGGCGG CATCATCCCC ATCTTCGACA CCGGCAACAG CGCCAGAGC
 1621 TTCCAGGGCA GAGTGACCAT CACCGCCGAC GAGAGCACCT CCACCGCCTA CATGGAACTG
 1681 AGCAGCCTGC GGAGCGAGGA CACCGCCGTG TACTACTGCG CCAGAAGCAG CCGGATCTAC
 1741 GACCTGAACC CCAGCCTGAC CGCCTACTAC GACATGGACG TGTGGGGCCA GGGCACCATG
 1801 GTCACAGTGT CTAGCGGAGG CGGCGGATCT GGCGGCGGAG GAAGTGGCGG GGGAGGATCT
 1861 GCCCAGAGCG TGCTGACCCA GCCCCCTTCT GTGTCTGCCG CCCCTGGCCA GAAAGTGACC
 1921 ATCTCCTGCA GCGGCAGCAG CAGCAACATC GGCAACAACCT ACGTGTCTCTG GTATCAGCAG
 1981 CTGCCCCGCA CCGCCCCTAA GCTGCTGATC TACGACAACA ACAAGCGGCC CAGCGGCATC
 2041 CCCGACCGGT TTAGCGGCAG CAAGAGCGGG ACTTCTGCTA CACTGGGCAT CACAGGCCTG
 2101 CAGACCGGCG ACGAGGCCGA CTACTACTGC GGCACCTGGG ACAGCAGCCT GAGCGCTTGG
 2161 GTGTTGCGCG GAGGCACCAA GCTGACAGTG CTG

SEQ ID NO: 17 - TNFR2-Fc_varB - аминокислотная последовательность

1 LPAQVAFTPY APEPGSTCRL REYYDQTAQM CCSKCSPGQH AKVFCTKTS D TVCDSCEDST
 61 YTQLWNWVPE CLSCGSRCS DQVETQACTR EQNRICTRP GWYCALSQ E GCRLCAPLRK
 121 CRPGFGVARP GTETSDVVCK PCAPGTF SNT TSSTDICRPH QICNVVAIPG NASMDAVCTS
 181 TSPTRSMAPG AVHLPQPVST RSQHTQPTPE PSTAPSTSFL LPMGPSPPAE GSTGDEPKSC
 241 DKHTCPCPP APELLGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 301 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
 361 GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
 421 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG **GSGGGGSQVQ**
 481 LVQSGAEVKK PGSSVKV SCK ASGGTFSTYG ISWVRQAPGQ CLEWMGGIIP IFDTGNSAQS
 541 FQGRVTITAD ESTSTAYMEL SSLRSED TAV YYCARSSRIY DLNPSLTAYY DMDVWGQGM
 601 VTVSSGGGGG **GGGGSGGGGS** GGGGSQSVLT QPPSVSAAPG QKVTISCSGS SSNIGNNYVS
 661 WYQQLPGTAP KLLIYDNNKR PSGIPDRFSG SKSGTSATLG ITGLQTGDEA DY YCGTWDSS
 721 LSAWVFGCGT KLTVL

SEQ ID NO: 18 - TNFR2-Fc_varB - нуклеотидная последовательность

1 CTGCCCCGCC AGGTGGCCTT TACCCCTTAT GCCCCCGAGC CCGGCAGCAC CTGTGGGCTG
 61 AGAGAGTACT ACGACCAGAC CGCCAGATG TGCTGCAGCA AGTGCTCTCC TGCCAGCAT

121 GCCAAGGTGT TCTGCACCAA GACCAGCGAC ACCGTGTGCG ACAGCTGCGA GGACAGCACC
 181 TACACCCAGC TGTGGAAGTGG GGTGCCCGAG TGCCTGAGCT GCGGCAGCAG ATGCAGCAGC
 241 GACCAGGTGG AAACCCAGGC CTGCACCAGA GAGCAGAACC GGATCTGCAC CTGTAGACCC
 301 GGCTGGTACT GCGCCCTGAG CAAGCAGGAA GGCTGCAGAC TCTGCGCCCC TCTGCGGAAG
 361 TGCAGACCCG GCTTTGGCGT GGCCAGACCC GGCACCGAGA CAAGCGACGT GGTCTGCAAG
 421 CCCTGCGCTC CTGGCACCTT CAGCAACACC ACCAGCAGCA CCGACATCTG CAGACCCCAC
 481 CAGATCTGCA ACGTGGTGGC CATCCCCGGC AACGCCAGCA TGGATGCCGT GTGCACCAGC
 541 ACCAGCCCCA CCAGAAGTAT GGCCCCCTGGC GCCGTGCATC TGCCCCAGCC TGTGTCCACC
 601 AGAAGCCAGC ACACCCAGCC CACCCCTGAG CCTAGCACCG CCCCCTCCAC CAGCTTTCTG
 661 CTGCCTATGG GCCCTAGCCC TCCAGCCGAG GGAAGCACAG GCGACGAGCC CAAGAGCTGC
 721 GACAAGACCC ACACCTGTCC CCCCTGCCCT GCCCCTGAAC TGCTGGGCGG ACCCAGCGTG
 781 TTCCTGTTCC CCCCAAAGCC CAAGGACACC CTGATGATCA GCCGGACCCC CGAAGTGACC
 841 TGCCTGGTGG TGGACGTGTC CCACGAGGAC CCTGAAGTGA AGTTCAATTG GTACGTGGAC
 901 GCGCTGGAAG TGCACAACGC CAAGACCAAG CCCAGAGAGG AACAGTACAA CTCCACCTAC
 961 CGGGTGGTGT CCGTGCTGAC CGTGCTGCAC CAGGACTGGC TGAACGGCAA AGAGTACAAG
 1021 TGCAAAGTCT CCAACAAGGC CCTGCCTGCC CCCATCGAGA AAACCATCAG CAAGGCCAAG
 1081 GGCCAGCCCC GCGAGCCTCA gGTGTACACA CTGCCCCCA GCCGGGAAGA GATGACCAAG
 1141 AACCAGGTGT CCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTACC CCAGCGATAT CGCCGTGGAA
 1201 TGGGAGAGCA ACGGCCAGCC CGAGAACAAC TACAAGACCA CCCCCCTGT GCTGGACAGC
 1261 GACGGCTCAT TCTTCTGTA CAGCAAGCTG ACCGTGGACA AGAGCCGGTG GCAGCAGGGC
 1321 AATGTCTTCA GCTGTAGCGT GATGCACGAG GCCCTGCACA ACCACTACAC CCAGAAGTCC
 1381 CTGAGCCTGA GCCCCGAAA GGGCGGAGGC GGATCCGGAG GTGGGGGATC TCAGGTGCAG
 1441 CTGGTGCAGT CTGGCGCCGA AGTGAAGAAA CCCGGCTCTA GCGTGAAGGT GTCTTGCAAG
 1501 GCCAGCGGCG GCACCTTCTC CACCTACGGC ATCAGCTGGG TCCGCCAGGC CCCTGGACAG
 1561 TGTCTGGAAT GGATGGGCGG CATCATCCCC ATCTTCGACA CCGGCAACAG CGCCAGAGC
 1621 TTCCAGGGCA GAGTGACCAT CACCGCCGAC GAGAGCACCT CCACCGCCTA CATGGAAGTGG
 1681 AGCAGCCTGC GGAGCGAGGA CACCGCCGTG TACTACTGCG CCAGAAGCAG CCGGATCTAC
 1741 GACCTGAACC CCAGCCTGAC CGCCTACTAC GACATGGACG TGTGGGGCCA GGGCACCATG
 1801 GTCACAGTGT CTAGCGGAGG CGGAGGCAGC GGAGGTGGTG GATCTGGTGG CGGAGGAAGT
 1861 GGCGGCGGAG GCTCTCAGAG CGTGCTGACC CAGCCCCCTT CTGTGTCTGC CGCCCCCTGGC
 1921 CAGAAAGTGA CCATCTCCTG CAGCGGCAGC AGCAGCAACA TCGGCAACAA CTACGTGTCC
 1981 TGGTATCAGC AGCTGCCCCG CACCGCCCCCT AAGCTGCTGA TCTACGACAA CAACAAGCGG
 2041 CCCAGCGGCA TCCCCGACCG GTTTAGCGGC AGCAAGAGCG GGACTTCTGC TACTACTGGG
 2101 ATCACAGGCC TGCAGACCGG CGACGAGGCC GACTACTACT GCGGCACCTG GGACAGCAGC
 2161 CTGAGCGCTT GGGTGTTCGG CTGCGGCACC AAGCTGACAG TGCTG

SEQ ID NO: 19 - последовательность линкера из 20 аминокислот (Gly₄Ser)₄

1 GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 20 - ндимаб varB - аминокислотная последовательность L-цепи

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVY SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRAIGIPA
 61 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPFTFG PGTKVDIKRT VAAPSVFIFP
 121 PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTL

181 TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC

SEQ ID NO: 21 - ндимаб varB - нуклеотидная последовательность L-цепи

1 GAAATCGTGC TGACCCAGAG CCCC GCCACC CTGTCTCTGA GCCCTGGCGA GAGAGCCACC
 61 CTGAGCTGCA GAGCCAGCCA GAGCGTGTAC TCCTACCTGG CTTGGTATCA GCAGAAGCCC
 121 GGCCAGGCCC CCAGACTGCT GATCTACGAC GCCAGCAACC GGGCCATCGG CATCCCTGCC
 181 AGATTTTCTG GCAGCGGCAG CGGCACCGAC TTCACCCTGA CCATCAGCAG CCTGGAACCC
 241 GAGGACTTCG CCGTGTACTA CTGCCAGCAG CGGAGCAACT GGCCCCCCTT CACCTTCGGC
 301 CCTGGCACCA AGGTGGACAT CAAGCGTACG GTGGCTGCAC CATCTGTCTT CATCTTCCCC
 361 CCATCTGATG AGCAGTTGAA ATCTGGAAC GCCTCTGTTG TGTGCCTGCT GAATAACTTC
 421 TATCCCAGAG AGGCCAAAGT ACAGTGGAAG GTGGATAACG CCCTCCAATC GGGTAACTCC
 481 CAGGAGAGTG TCACAGAGCA GGACAGCAAG GACAGCACCT ACAGCCTCAG CAGCACCTG
 541 ACGCTGAGCA AAGCAGACTA CGAGAAACAC AAAGTCTACG CCTGCGAAGT CACCCATCAG
 601 GGCCTGAGCT CGCCCCTCAC AAAGAGCTTC AACAGGGGAG AGTGT

SEQ ID NO: 22 - ндимаб varB - аминокислотная последовательность H-цепи

1 QVQLVESGGG VVQPGRLRL SCAASGFIFS SYAMHWVQA PNGLEWVAF MSYDGSNKKY
 61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDR GISAGGNYYY YGMDVWGQGT
 121 TVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP
 181 AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKRVEPKSCD KHTHCPPCPA
 241 PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
 301 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL
 361 PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPVDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSG GSFFLYSKLT
 421 VDKSRWQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGKGGGG **SGGGGS**QVQL VQSGAEVKKP
 481 GSSVKVSCKA SGGTFSTYGI SWVRQAPGQC LEWMGGIPI FDTGNSAQSF QGRVTITADE
 541 STSTAYMELS SLRSEDVAVY YCARSSRIYD LNPSLTAYYD MDVWGQGMV TVSS**GGGGSG**
 601 **GGGS**GGGGSG **GGGS**QSVLTQ PPSVSAAPGQ KVTISCSGSS SNIGNNYVSW YQQLPGTAPK
 661 LLIYDNNKRP SGIPDRFSGS KSGTSATLGI TGLQTGDEAD YYCGTWDSSL SAWVFGCGTK
 721 LTVL

SEQ ID NO: 23 - ндимаб varB - нуклеотидная последовательность H-цепи

1 CAGGTGCAGC TGGTGGAAAG CGGCGGAGGC GTGGTGCAGC CCGGCAGAAG CCTGAGACTG
 61 AGCTGCGCTG CCAGCGGCTT CATCTTCAGC AGCTACGCCA TGCACTGGGT CCGCCAGGCC
 121 CCTGGCAACG GACTGGAATG GGTGGCCTTC ATGAGCTACG ACGGCAGCAA CAAGAAGTAC
 181 GCCGACAGCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC AGCCGGGACA ACAGCAAGAA CACCCTGTAC
 241 CTGCAGATGA ACAGCCTGCG GGCTGAGGAC ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CAGAGACCGA
 301 GGCATCAGTG CTGGCGGCAA CТАCTACTAC TACGGCATGG ACGTGTGGGG CCAGGGCACC
 361 ACCGTGACCG TGTCTAGCGC GTCGACCAAG GGCCCATCCG TCTTCCCCCT GGCACCCTCC
 421 TCCAAGAGCA CCTCTGGGGG CACAGCGGCC CTGGGCTGCC TGGTCAAGGA CТАCTTCCCC
 481 GAACCGGTGA CGGTGTCCTG GAACTCAGGC GCTCTGACCA GCGGCCTGCA CACCTTCCCC
 541 GCTGTCCTAC AGTCCTCAGG ACTCTACTCC CTCAGCAGCG TGGTGACCGT GCCCTCCAGC
 601 AGCTTGGGCA CCCAGACCTA CATCTGCAAC GTGAATCACA AGCCAGCAA CACCAAGGTG
 661 GACAAGAGAG TTGAGCCCAA ATCTTGTGAC AAAACTCACA CATGCCACC GTGCCAGCA
 721 CCTGAACTCC TGGGGGGACC GTCAGTCTTC CTCTTCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC

781 ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT
841 GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG
901 CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAG
961 GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC
1021 ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT CTACACCCTG
1081 CCCCCATCCC GGGAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC
1141 TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC
1201 AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTATAG CAAGCTCACC
1261 GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT
1321 CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC CGGGTAAAGG CGGAGGGGGA
1381 TCCGGCGGAG GGGGCTCTCA GGTGCAGCTG GTGCAGTCTG GCGCCGAAGT GAAGAAACCC
1441 GGCTCTAGCG TGAAGGTGTC CTGCAAGGCC AGCGGCGGCA CCTTCTCCAC CTACGGCATC
1501 AGCTGGGTCC GCCAGGCCCC TGGACAGTGT CTGGAATGGA TGGGCGGCAT CATCCCCATC
1561 TTCGACACCG GCAACAGCGC CCAGAGCTTC CAGGGCAGAG TGACCATCAC CGCCGACGAG
1621 AGCACCTCCA CCGCCTACAT GGAAGTGAAGC AGCCTGCGGA GCGAGGACAC CGCCGTGTAC
1681 TACTGCGCCA GAAGCAGCCG GATCTACGAC CTGAACCCCA GCCTGACCGC CTACTACGAC
1741 ATGGACGTGT GGGGCCAGGG CACCATGGTC ACAGTGTCTA GCGGAGGCGG AGGCAGCGGA
1801 GGTGGTGGAT CTGGTGGCGG AGGAAGTGGC GCGGAGGCT CTCAGAGCGT GCTGACCCAG
1861 CCCCCTTCTG TGTCTGCCGC CCCTGGCCAG AAAGTGACCA TCTCCTGCAG CGGCAGCAGC
1921 AGCAACATCG GCAACAACATA CGTGTCTGG TATCAGCAGC TGCCCCGGCAC CGCCCCTAAG
1981 CTGCTGATCT ACGACAACAA CAAGCGGCC AGCGGCATCC CCGACCGGTT TAGCGGCAGC
2041 AAGAGCGGGA CTTCTGCTAC ACTGGGCATC ACAGGCCTGC AGACCGGCGA CGAGGCCGAC
2101 TACTACTGCG GCACCTGGGA CAGCAGCCTG AGCGCTTGGG TGTTCCGGCTG CGGCACCAAG
2161 CTGACAGTGC TG

SEQ ID NO: 24 - аминокислотная последовательность VH NGF-NG

QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGGTFWFGAFTWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGLTNLAQNFQGRVTITADES
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 25 - нуклеотидная последовательность VH NGF-NG

caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctctggagg caccttctgg ttcggcgcgt tcacctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag gacttgagtg gatgggaggg attattccta tcttcgggtt gacgaacttg 180
gcacagaact tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagtctac 240
atggagctga gcagcttgag atctgaagac acggccgtat attattgtgc acgttcaagt 300
cgtatctacg atctgaacct gtcctgacc gctactacg atatggatgt ctggggccag 360
gggacaatgg tcaccgtctc gagt 384

SEQ ID NO: 26 - аминокислотная последовательность VL NGF-NG

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSDIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 27 - нуклеотидная последовательность VL NGF-NG

cagtctgtgc tgactcagcc gccatcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tcctgctctg gaagcagctc cgacattggg aataattatg tctcgtggta ccagcagctc 120

ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gcagcctgag tgcttgggtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

SEQ ID NO: 28 - аминокислотная последовательность VH ндимаба

1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFIFS SYAMHWVQA PNGLEWVAF MSYDGSNKKY
61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDR GISAGGNYYY YGMDVWGQGT
121 TVTVSS

SEQ ID NO: 29 - аминокислотная последовательность VL ндимаба

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVY SYLAWYQQKQ GQAPRLLIYD ASNRAIGIPA
61 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPFTFG PGTKVDIK

SEQ ID NO: 30 - аминокислотная последовательность VH 1126F1

EVQLVQTGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDANRQAVPYDMDVWGQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 31 - аминокислотная последовательность VL 1126F1

QAVLTQPSVSTPPGQMTVITSCSGSSSDIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 32 - аминокислотная последовательность VH 1126G5

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDFTSGLAPYYDMDVWGQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 33 - аминокислотная последовательность VL 1126G5

QAVLTQPSVSTPPGQKVTITSCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPPGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 34 - аминокислотная последовательность VH 1126H5

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDAGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAHMEVSSLRSED TAVYYCASSSRIYDHNIQKGGYYDMDVWGQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 35 - аминокислотная последовательность VL 1126H5

QAVLTQPSVSTPPGQKVTITSCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 36 - аминокислотная последовательность VH 1127D9

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDYHTIAYYD

SEQ ID NO: 37 - аминокислотная последовательность VL 1127D9

QAVLTQPSVSTPPGQKVTITSCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 38 - аминокислотная последовательность VH 1127F9

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMKVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDYIPGMRPYDMDVWGQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 39 - аминокислотная последовательность VL 1127F9

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTIISCSGNSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSRSGTLATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 40 - аминокислотная последовательность VH 1131D7

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIDFTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDFNSSLIAYYDMDVWGQGMVTVSS

SEQ ID NO: 41 - аминокислотная последовательность VL 1131D7

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTIISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDETDYYCGTWDSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 42 - аминокислотная последовательность VH 1131H2

EVQLVQSGAEVKKPGSTVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIDFTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGMVTVSS

SEQ ID NO: 43 - аминокислотная последовательность VL 1131H2

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTIISCSGTSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 44 - аминокислотная последовательность VH 132A9

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFGTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDFEPSLIYYYYDMDVWGQGMVTVSS

SEQ ID NO: 45 - аминокислотная последовательность VL 132A9

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTIISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 46 - аминокислотная последовательность VH 1132H9

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIDFTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGMVTVSS

SEQ ID NO: 47 - аминокислотная последовательность VL 1132H9

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTIISCSGSSSDIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPTGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 48 - аминокислотная последовательность VH 1133C11

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIDFTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGMVTVSS

SEQ ID NO: 49 - аминокислотная последовательность VL 1133C11

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTIISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 50 - аминокислотная последовательность VH 1134D9

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIDFTGNSAQSFQGRVAITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGMVTVSS

SEQ ID NO: 51 - аминокислотная последовательность VL 1134D9

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTIISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSGLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 52 - аминокислотная последовательность VH 1145D1

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIDFTSNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDFRTLYSTYYDMDVWGQGMVTVSS

SEQ ID NO: 53 - аминокислотная последовательность VL 1145D1

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGISDRFSGSKSGTSATLG
IAGLQTGDEADYYCGTWDSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 54 - аминокислотная последовательность VH 1146D7

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIDFTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGMVTVSS

SEQ ID NO: 55 - аминокислотная последовательность VL 1146D7

QAVLTQPSSVSTPPGQEVTVISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 56 - аминокислотная последовательность VH 1147D2

EVQLVQSGAEVKKPGSSVRIKASGGTFSTYGVSWVRQAPGQGLEWIGGIIPIDFTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGMVTVSS

SEQ ID NO: 57 - аминокислотная последовательность VL 1147D2

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 58 - аминокислотная последовательность VH 1147G9

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSAYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIDFTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGMVTV

SEQ ID NO: 59 - аминокислотная последовательность VL 1147G9

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTVSCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 60 - аминокислотная последовательность VH 1150F1

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIDFTGNSAQSFQDRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGHGTMVTVSS

SEQ ID NO: 61 - аминокислотная последовательность VL 1150F1

QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 62 - аминокислотная последовательность VH 1152H5

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLVWIGGIIPIDFTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDMISLQPYDMDVWGQGMVTVSS

SEQ ID NO: 63 - аминокислотная последовательность VL 1152H5

QAVLTQPSSVSTPPGQKATISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 64 - аминокислотная последовательность VH 1155H1

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIDFTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDFHLANKGYDMDVWGQGMVTVSS

SEQ ID NO: 65 - аминокислотная последовательность VL 1155H1

QAVLTQPSSVSTPPGQKATISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLD
ITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 66 - аминокислотная последовательность VH 1158A1

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFGTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDHHNHVGGYYDMDVWGQGMVTVSS

SEQ ID NO: 67 - аминокислотная последовательность VL 1158A1

QAVLTQPSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYASWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQGTGDEADYYCGTWDGSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 68 - аминокислотная последовательность VH 1160E3

EVQLVQSGAEVKKPGSSAKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGMVTVSS

SEQ ID NO: 69 - аминокислотная последовательность VL 1160E3

QAVLTQPSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQGTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 70 - аминокислотная последовательность VH 1165D4

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGMVTVSS

SEQ ID NO: 71 - аминокислотная последовательность VL 1165D4

QAVLTQPSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIENNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQGTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 72 - аминокислотная последовательность VH 1175H8

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQRLWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDATTLTPYYDMDVWGQGMVTVSS

SEQ ID NO: 73 - аминокислотная последовательность VL 1175H8

QAVLTQPSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLRTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 74 - аминокислотная последовательность VH 1211G10

EVQLVQSGAEVRKPGSSVKVSKAYGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWVGGIIPIFDTRNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDMVSTLIPYYDMDVWGQGMVTVSS

SEQ ID NO: 75 - аминокислотная последовательность VL 1211G10

QAVLTQPSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQGTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 76 - аминокислотная последовательность VH 1214A1

EVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDAHLQAYYDMDVWGQGMVTVSS

SEQ ID NO: 77 - аминокислотная последовательность VL 1214A1

QAVLTQPSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPPGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQGTGDEADYYCGTRDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 78 - аминокислотная последовательность VH 1214D10

EVQLVQSGAEAKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGRGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVAITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDAHLNHHGYDMDVVWGQGMVTVSS

SEQ ID NO: 79 - аминокислотная последовательность VL 1214D10

QAVLTQPSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQAGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 80 - аминокислотная последовательность VH 1218H5
EVQLVQSGAVVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDFTGSSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGMVTVSS

SEQ ID NO: 81 - аминокислотная последовательность VL 1218H5
QAVLTQPSVSTPPGQKVTISCSGSSSNTGNNYVSWYQQLSGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 82 - аминокислотная последовательность VH 1230H7
EMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPFDFTGNSAQSFQGRVTITADES
TSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDFNSALISYYDMDVWGQGMVTVSS

SEQ ID NO: 83 - аминокислотная последовательность VL 1230H7
QAVLTQPSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLG
ITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 84 - аминокислотная последовательность VH 1083H4
QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFAYHYLHWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTTNYAQRFDQDRVTITADES
TSTAYMELSSLRSED TAVYYCASADYVWGSYRPDWFYDLWGRGTMVTVSS

SEQ ID NO: 85 - аминокислотная последовательность VL 1083H4
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQRLPGAAPQLLIYNNDQRPSGIPDRFSGSKSGTSGSLV
ISGLQSEDEADYYCASWDDSLNGRVFVGGGKTLTVL

SEQ ID NO: 86 - аминокислотная последовательность VH 1227H8
QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGHTFAYHYLHWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTTNYAQRFDQDRVTITADES
TSTAYMELSSLRSED TAVYYCASADYAWESYQPPQINGVWGRGTMVTVSS

SEQ ID NO: 87 - аминокислотная последовательность VL 1227H8
QSVLTQPPSVSAAPGQKVTITCSGSTSNIIGNNYVSWYQHPGKAPKLMYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNSASLD
ISGLQSEDEADYYCAAWDDSLSEFFFGTGKTLTVL

SEQ ID NO: 88 - HCDR1 NGF-NG
FGAFT

SEQ ID NO: 89 - HCDR2 NGF-NG
GIIPFGLTNLAQNFQG

SEQ ID NO: 90 - HCDR3 NGF-NG
SSRIYDLNPSLTAYYDMDV

SEQ ID NO: 91 - LCDR1 NGF-NG
SGSSSDIGNNYVS

SEQ ID NO: 92 - LCDR2 NGF-NG
DNNKRPS

SEQ ID NO: 93 - LCDR3 NGF-NG
GTWDSLSAWV

SEQ ID NO: 94 - аминокислотная последовательность VH MEDI-578 с G->C
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYGISWVRQA PGQCLEWMGGIIPFDFTGNS
AQSFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQ
GTMVTVSS

SEQ ID NO: 95 - аминокислотная последовательность VL MEDI-578 с G->C

QSVLTQPPSV SAAPGQKVTI SCSGSSSNIG NNYVSWYQQL PGTAPKLLIY DNNKRPSGIP
DRFSGSKSGT SATLGITGLQ TGDEADYYCG TWDSSLSAWV FCGGTKLTVL

SEQ ID NO: 96 - аминокислотная последовательность VH 1230D8

QMLVQSGAEVKKTGSSSVKVSCKASGYTFPHYHLHWVRQAPGGLEWMGGIIPIFGTTNYAQRFDRTITADES
TSTAYMEFSSLRSEDTAVYYCASADYVWESYHPATSLSLWGRGTMVTVSS

SEQ ID NO: 97 - аминокислотная последовательность VL 1230D8

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCPGSTSNIGNNYVSWYQRPKGAPKLMYDVKRPSGVPDRFSGSKSGNSASLD
ISELQSEDEADYYCAAWDDSLSEFLFGTGTKLTVL

SEQ ID NO: 98

GGGSGGGGS

SEQ ID NO: 99 - TNFR2-Fc_varB - кодон-оптимизированная нуклеотидная последовательность

1	CTGCCCCCCC	AGGTGGCCTT	TACCCCTTAT	GCTCCTGAGC	CCGGCTCTAC	CTGCCGGCTG
61	AGAGAGTACT	ACGACCAGAC	CGCCAGATG	TGCTGCTCCA	AGTGCTCTCC	TGGCCAGCAC
121	GCCAAGGTGT	TCTGCACCAA	GACCTCCGAT	ACCGTGTGCG	ACTCCTGCGA	GGA CTCCACC
181	TACACCCAGC	TGTGGA ACTG	GGTGCCCGAG	TGCCTGTCTT	GCGGCTCCAG	ATGTTCTCTC
241	GACCAGGTGG	AAACCCAGGC	CTGCACCAGA	GAGCAGAACC	GGATCTGCAC	CTGTCCGGCTT
301	GGCTGGTACT	GCGCCCTGTC	TAAGCAGGAA	GGCTGCAGAC	TGTGCGCCCC	TCTGCGGAAG
361	TGTAGACCTG	GCTTTGGCGT	GGCCAGACCC	GGCACCGAGA	CATCTGATGT	CGTGTGCAAG
421	CCTTGCGCCC	CTGGCACCTT	CTCCAACACC	ACCTCCTCCA	CCGACATCTG	CCGGCCTCAC
481	CAGATCTGCA	ACGTGGTGGC	CATCCCTGGC	AACGCCTCTA	TGGACGCCGT	GTGCACCTCT
541	ACCTCCCCCA	CCAGAAGTAT	GGCCCTGGC	GCTGTGCATC	TGCCCCAGCC	TGTGTCTACC
601	AGATCCCAGC	ACACCCAGCC	CACCCCTGAG	CCTTCTACCG	CCCCTTCTAC	CAGCTTCCTG
661	CTGCCTATGG	GCCCTAGCCC	TCCTGCTGAG	GGATCTACAG	GCGACGAGCC	CAAGTCCTGC
721	GACAAGACCC	ACACCTGTCC	CCCTTGTCCT	GCCCCGTAAC	TGCTGGGCGG	ACCTTCCGTG
781	TTCCTGTTCC	CCCCAAAGCC	CAAGGACACC	CTGATGATCA	GCCGGACCCC	TGAAGTGACC
841	TGCGTGGTGG	TGGATGTGTC	CCACGAGGAT	CCCGAAGTGA	AGTTCAATTG	GTACGTGGAC
901	GGCGTGGAAG	TGCACAACGC	CAAGACCAAG	CCCAGAGAGG	AACAGTACAA	CTCCACCTAC
961	CGGGTGGTGT	CCGTGCTGAC	CGTGCTGCAC	CAGGATTGGC	TGAACGGCAA	AGAGTACAAG
1021	TGCAAGGTGT	CCAACAAGGC	CCTGCCTGCC	CCCATCGAAA	AGACCATCTC	CAAGGCCAAG
1081	GGCCAGCCCC	GGGAACCCCA	GGTGTACACA	CTGCCCCCTA	GCCGGGAAGA	GATGACCAAG
1141	AACCAGGTGT	CCCTGACCTG	TCTCGTGAAG	GGCTTCTACC	CCTCCGATAT	CGCCGTGGAA
1201	TGGGAGTCCA	ACGGCCAGCC	TGAGAACAAC	TACAAGACCA	CCCCCCTGT	GCTGGACTCC
1261	GACGGCTCAT	TCTTCCTGTA	CTCCAAGCTG	ACAGTGGACA	AGTCCCGGTG	GCAGCAGGGC
1321	AACGTGTTCT	CCTGCTCCGT	GATGCACGAG	GCCCTGCACA	ACCACTACAC	CCAGAAGTCC
1381	CTGTCCCTGA	GCCCTGGAAA	AGGCGGCGGA	GGATCTGGCG	GAGGCGGATC	TCAGGTGCAG
1441	CTGGTGCAGT	CTGGCGCTGA	AGTGAAGAAA	CCCGGCTCCT	CCGTGAAGGT	GTCTTGC AAG
1501	GCTTCTGGCG	GCACCTTCTC	TACCTACGGC	ATCTCCTGGG	TGCGACAGGC	CCCTGGCCAG
1561	TGCCTGGAAT	GGATGGGCGG	CATCATCCCC	ATCTTCGACA	CCGGCAACTC	CGCCCAGAGC
1621	TTCCAGGGCA	GAGTGACCAT	CACCGCCGAC	GAGTCTACCT	CCACCGCCTA	CATGGA ACTG
1681	TCCTCCCTGC	GGAGCGAGGA	CACCGCCGTG	TACTACTGCG	CCCGTCCCTC	TCGGATCTAC

1741 GACCTGAACC CTTCCCTGAC CGCCTACTAC GACATGGACG TGTGGGGCCA GGGCACAATG
1801 GTCACCGTGT CATCTGGTGG TGGCGGCTCT GGTGGCGGAG GAAGTGGGGG AGGGGGTTCT
1861 GGGGGGGGAG GATCTCAGTC TGTGCTGACC CAGCCTCCTT CCGTGTCTGC TGCCCCAGGC
1921 CAGAAAGTGA CAATCTCCTG CAGCGGCTCC AGCTCCAACA TCGGCAACAA CTACGTGTCC
1981 TGGTATCAGC AGCTGCCCCG CACCGCTCCC AAAGTGTGTA TCTACGATAA CAACAAGCGG
2041 CCCTCCGGCA TCCCCGACAG ATTCTCCGGC TCTAAGTCCG GCACCTCTGC CACCCTGGGC
2101 ATCACCGGAC TGCAGACAGG CGACGAGGCC GACTACTACT GTGGCACCTG GGAATCCTCC
2161 CTGTCCGCTT GGGTGTTCGG CTGCGGCACC AAAGTGTGTA TGCTG

[00260] Настоящее изобретение не ограничивается по объему конкретными описанными аспектами, которые, как предполагается, являются единичными иллюстрациями отдельных аспектов настоящего изобретения, и любые композиции или способы, которые являются функционально эквивалентными, находятся в пределах объема настоящего изобретения. В действительности, различные модификации настоящего изобретения, в дополнение к показанным и описанным в данном документе, станут очевидными специалистам в данной области техники из предшествующего описания и сопроводительных графических материалов. Предполагается, что такие модификации находятся в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

[00261] Все публикации и заявки на патенты, упоминаемые в настоящем описании, включены в данный документ посредством ссылки в такой же степени, как если бы каждая отдельная публикация или заявка на патент была конкретно и отдельно указана как включенная посредством ссылки.

Формула изобретения

1. Способ снижения или предупреждения боли у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение субъекту фиксированной дозы связывающей молекулы для подкожного введения, где связывающая молекула содержит домен антагониста NGF и домен антагониста TNF α , где домен антагониста NGF представляет собой антитело к NGF или его антигенсвязывающий фрагмент, где домен антагониста TNF α содержит растворимый TNF α -связывающий фрагмент TNFR, и где способ приводит к снижению или предупреждению боли у субъекта.
2. Способ по п. 1, где фиксированная доза связывающей молекулы для подкожного введения составляет от приблизительно 5 до 200 мг.
3. Способ по любому из предыдущих пунктов, где фиксированная доза связывающей молекулы для подкожного введения составляет от приблизительно 7,5 до 150 мг.
4. Способ по любому из предыдущих пунктов, где фиксированная доза связывающей молекулы для подкожного введения составляет приблизительно 7,5 мг, приблизительно 25 мг, приблизительно 75 мг или приблизительно 150 мг.
5. Способ по любому из предыдущих пунктов, где фиксированная доза для подкожного введения является эквивалентной фиксированной дозе для внутривенного введения, составляющей 30 мг связывающей молекулы.
6. Способ по любому из предыдущих пунктов, где фиксированную дозу вводят по меньшей мере один раз в две недели.
7. Способ по любому из предыдущих пунктов, где фиксированную дозу вводят в течение по меньшей мере 12 недель.
8. Способ по любому из предыдущих пунктов, где боль предусматривает хроническую боль.
9. Способ по любому из предыдущих пунктов, где боль предусматривает боль при остеоартрите.
10. Способ по любому из предыдущих пунктов, где боль предусматривает боль при остеоартрите в коленном суставе.
11. Способ по любому из предыдущих пунктов, где субъект страдал от боли в течение 3 месяцев или дольше до введения связывающей молекулы.
12. Способ по любому из предыдущих пунктов, где боль ассоциирована с воспалением суставов.
13. Способ по любому из предыдущих пунктов, где у субъекта имеется остеоартрит.

14. Способ по п. 13, где у субъекта имеется односторонний остеоартрит коленного сустава.

15. Способ по п. 13 или п. 14, где у субъекта имеется остеоартрит коленного сустава по меньшей мере 2 степени по шкале оценки Келлгрена-Лоуренса (KL) от 0 до 4 согласно оценке центрального эксперта.

16. Способ по любому из предыдущих пунктов, включающий следующие стадии до введения субъекту связывающей молекулы:

- a. введение субъекту NSAID, сильного опиоида, слабого опиоида, ингибитора COX-2, ацетаминофена или их комбинации, и
- b. определение i) того, что NSAID, сильный опиоид, слабый опиоид, ингибитор COX-2, ацетаминофен или их комбинация не приводит к снижению или предупреждению боли у субъекта, и/или ii) определение того, что субъект характеризуется непереносимостью NSAID, сильного опиоида, слабого опиоида, ингибитора COX-2, ацетаминофена или их комбинации.

17. Способ по п. 16, где NSAID, сильный опиоид, слабый опиоид, ингибитор COX-2, ацетаминофен или их комбинацию вводят в течение по меньшей мере 2 недель.

18. Способ по п. 16, где NSAID, сильный опиоид, слабый опиоид, ингибитор COX-2, ацетаминофен или их комбинацию вводили субъекту в течение по меньшей мере 2 недель до введения связывающей молекулы.

19. Способ по любому из предыдущих пунктов, где субъект характеризуется непереносимостью NSAID, сильных опиоидов, слабых опиоидов, ингибиторов COX-2, ацетаминофена или их комбинации.

20. Способ по любому из предыдущих пунктов, где способ включает тестирование субъекта в отношении инфекции SARS-CoV2 до введения фиксированной дозы связывающей молекулы.

21. Способ по п. 20, где тестирование субъекта в отношении инфекции SARS-CoV2 предусматривает тестирование субъекта в отношении генетического материала SARS-CoV2 до введения фиксированной дозы связывающей молекулы.

22. Способ по любому из предыдущих пунктов, где субъект не инфицирован SARS-CoV2 на исходном уровне.

23. Способ по любому из предыдущих пунктов, где субъект характеризуется средним показателем боли при остеоартрите, разработанным Университетами Западного Онтарио и МакМастера (WOMAC), составляющим по меньшей мере 5, в суставе, как измерено с использованием подшкалы оценки боли индекса WOMAC на исходном уровне.

24. Способ по любому из предыдущих пунктов, где субъект характеризуется средним показателем интенсивности боли, составляющим по меньшей мере 5, в суставе, как измерено по числовой шкале оценки (NRS) боли на исходном уровне.

25. Способ по любому из предыдущих пунктов, где способ приводит к снижению недельного среднесуточного показателя боли по шкале NRS у субъекта по сравнению с исходным уровнем.

26. Способ по любому из предыдущих пунктов, где фиксированную дозу вводят один раз в 2 недели в течение 12 недель, и где способ приводит к снижению недельного среднесуточного показателя боли по шкале NRS у субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере неделе 12.

27. Способ по любому из предыдущих пунктов, где способ приводит к снижению недельного среднесуточного показателя боли по шкале NRS у субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере 30%.

28. Способ по любому из предыдущих пунктов, где способ приводит к снижению недельного среднесуточного показателя боли по шкале NRS у субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере 50%.

29. Способ по любому из предыдущих пунктов, где способ приводит к снижению показателя по подшкале оценки боли WOMAC у субъекта по сравнению с исходным уровнем.

30. Способ по любому из предыдущих пунктов, где фиксированную дозу вводят один раз в 2 недели в течение 12 недель, и где способ приводит к снижению показателя боли по подшкале оценки боли WOMAC у субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере неделе 12.

31. Способ по любому из предыдущих пунктов, где способ приводит к снижению показателя по подшкале оценки боли WOMAC у субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере 30%.

32. Способ по любому из предыдущих пунктов, где способ приводит к снижению показателя по подшкале оценки боли WOMAC у субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере 50%.

33. Способ по любому из предыдущих пунктов, где способ приводит к снижению показателя по подшкале оценки физических симптомов WOMAC у субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере 30%.

34. Способ по любому из предыдущих пунктов, где способ приводит к снижению показателя по подшкале оценки физических симптомов WOMAC у субъекта по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере 50%.

35. Способ по любому из предыдущих пунктов, где способ приводит к улучшению общей оценки пациентом (PGA) остеоартрита по сравнению с исходным уровнем.

36. Способ по любому из предыдущих пунктов, где фиксированную дозу вводят один раз в 2 недели в течение 12 недель, и где способ приводит к улучшению PGA остеоартрита по сравнению с исходным уровнем на по меньшей мере неделе 12.

37. Способ по любому из предыдущих пунктов, где способ приводит к улучшению PGA остеоартрита на по меньшей мере 2 балла.

38. Способ по любому из предыдущих пунктов, где снижение боли наблюдается после введения субъекту однократной дозы связывающей молекулы.

39. Способ по любому из предыдущих пунктов, где способ включает введение субъекту NSAID.

40. Способ по любому из предыдущих пунктов, где способ включает введение субъекту опиоида.

41. Способ по любому из предыдущих пунктов, где способ включает введение субъекту ацетаминофена.

42. Способ по любому из предыдущих пунктов, где способ включает введение субъекту ингибитора COX-2.

43. Способ по любому из предыдущих пунктов, где антитело к NGF или его фрагмент способны ингибировать связывание NGF с TrkA, p75NRT или как с TrkA, так и с p75NRT.

44. Способ по любому из предыдущих пунктов, где антитело к NGF или его фрагмент предпочтительно блокируют связывание NGF с TrkA по сравнению со связыванием NGF с p75NRT.

45. Способ по любому из предыдущих пунктов, где антитело к NGF или его фрагмент связывают NGF человека с аффинностью, составляющей приблизительно 0,25-0,44 нМ.

46. Способ по любому из предыдущих пунктов, где антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VH антитела, содержащий набор CDR HCDR1, HCDR2, HCDR3, и домен VL антитела, содержащий набор CDR LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где HCDR1 характеризуется аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 4 с наличием до двух аминокислотных замен, HCDR2 характеризуется аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 5 с наличием

до двух аминокислотных замен, HCDR3 характеризуется аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 6 с наличием до двух аминокислотных замен, SSRIYDFNSALISYYDMDV (SEQ ID NO: 11) или SSRIYDMISLQPYDMDV (SEQ ID NO:12), LCDR1 характеризуется аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 8 с наличием до двух аминокислотных замен, LCDR2 характеризуется аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 9 с наличием до двух аминокислотных замен, и LCDR3 характеризуется аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 10 с наличием до двух аминокислотных замен.

47. Способ по любому из предыдущих пунктов, где антитело к NGF или его фрагмент содержат домен VH антитела, содержащий набор CDR HCDR1, HCDR2, HCDR3, и домен VL антитела, содержащий набор CDR LCDR1, LCDR2 и LCDR3,

где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, SSRIYDFNSALISYYDMDV (SEQ ID NO: 11) или SSRIYDMISLQPYDMDV (SEQ ID NO:12),

LCDR1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10.

48. Способ по любому из предыдущих пунктов, где антитело к NGF или его фрагмент содержат VH, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3 или 94.

49. Способ по любому из предыдущих пунктов, где антитело к NGF или его фрагмент содержат VL, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7 или 95.

50. Способ по любому из предыдущих пунктов, где антитело к NGF или его фрагмент представляют собой полноразмерное антитело H₂L₂, фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab)₂ или одноцепочечный фрагмент Fv (scFv).

51. Способ по любому из предыдущих пунктов, где антитело к NGF или его фрагмент являются гуманизированными, химерными, приматизированными или полностью человеческими.

52. Способ по любому из предыдущих пунктов, где фрагмент scFv, связывающий NGF, содержит от N-конца к С-концу VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 3, линкерную последовательность из 15 аминокислот (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 15), и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7.

53. Способ по любому из предыдущих пунктов, где фрагмент scFv, связывающий NGF, содержит от N-конца к С-концу VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 94, линкерную последовательность из 20 аминокислот (GGGGS)₄ (SEQ ID NO:19), и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 95.

54. Способ по любому из предыдущих пунктов, где TNFR представляет собой TNFR-2.

55. Способ по любому из предыдущих пунктов, где фрагмент TNFR-2 слит с доменом Fc иммуноглобулина.

56. Способ по любому из предыдущих пунктов, где домен Fc иммуноглобулина представляет собой домен Fc IgG1 человека.

57. Способ по любому из предыдущих пунктов, где антагонист TNF α содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 13, или ее функциональному фрагменту.

58. Способ по любому из предыдущих пунктов, где связывающая молекула предусматривает слитый белок, который содержит антагонист NGF, слитый с антагонистом TNF α посредством линкера.

59. Способ по любому из предыдущих пунктов, где связывающая молекула предусматривает гомодимер слитого белка.

60. Способ по любому из предыдущих пунктов, где связывающая молекула предусматривает гомодимер слитого полипептида, содержащего от N-конца к С-концу TNF α -связывающий фрагмент TNFR-2, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична последовательности, соответствующей аминокислотам 1-235 из SEQ ID

NO: 13, домен Fc IgG1 человека, линкерную последовательность из 10 аминокислот (GGGGS)₂ (SEQ ID NO: 98), VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO 3 или 94, линкерную последовательность из 15 аминокислот (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 15), и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7 или 95.

61. Способ по любому из предыдущих пунктов, где связывающая молекула предусматривает гомодимер слитого полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 14.

62. Способ по любому из предыдущих пунктов, где связывающая молекула предусматривает гомодимер слитого полипептида, содержащего от N-конца к C-концу TNF α -связывающий фрагмент TNFR-2 массой 75 кДа, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13, линкерную последовательность из 10 аминокислот (GGGGS)₂ (SEQ ID NO: 98), VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 94, линкерную последовательность из 20 аминокислот (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 19), и VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 95.

63. Способ по любому из предыдущих пунктов, где остаток глицина в положении аминокислоты, соответствующем положению 102, 103 или 104 в SEQ ID NO: 7, модифицирован с получением остатка цистеина, и где остаток глицина в положении аминокислоты, соответствующем положению 44 в SEQ ID NO: 3, модифицирован с получением остатка цистеина.

64. Способ по любому из предыдущих пунктов, где связывающая молекула предусматривает гомодимер слитого полипептида, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17.

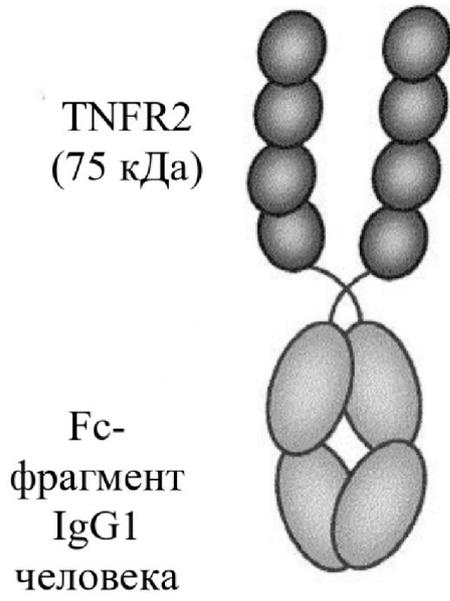
65. Способ по любому из предыдущих пунктов, где связывающая молекула предусматривает гомодимер слитого полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 17.

66. Связывающая молекула для применения в способе снижения или предупреждения боли у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает

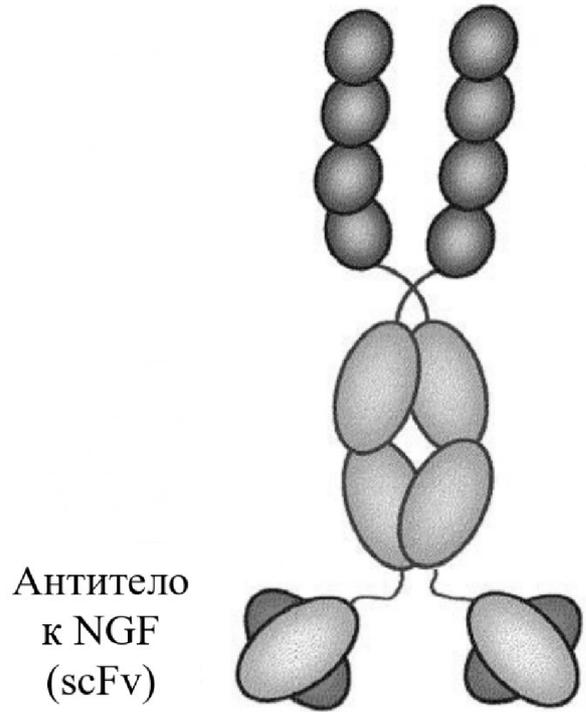
введение субъекту фиксированной дозы связывающей молекулы для подкожного введения, где связывающая молекула содержит домен антагониста NGF и домен антагониста TNF α , где домен антагониста NGF представляет собой антитело к NGF или его антигенсвязывающий фрагмент, где домен антагониста TNF α содержит растворимый TNF α -связывающий фрагмент TNFR, и где способ приводит к снижению или предупреждению боли у субъекта.

67. Связывающая молекула для применения в способе по любому из пп. 1-65.

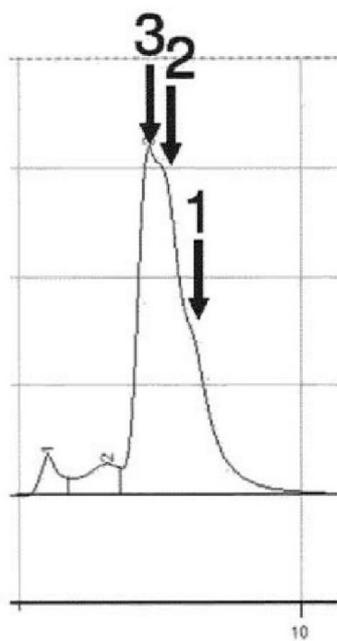
ФИГ. 1А



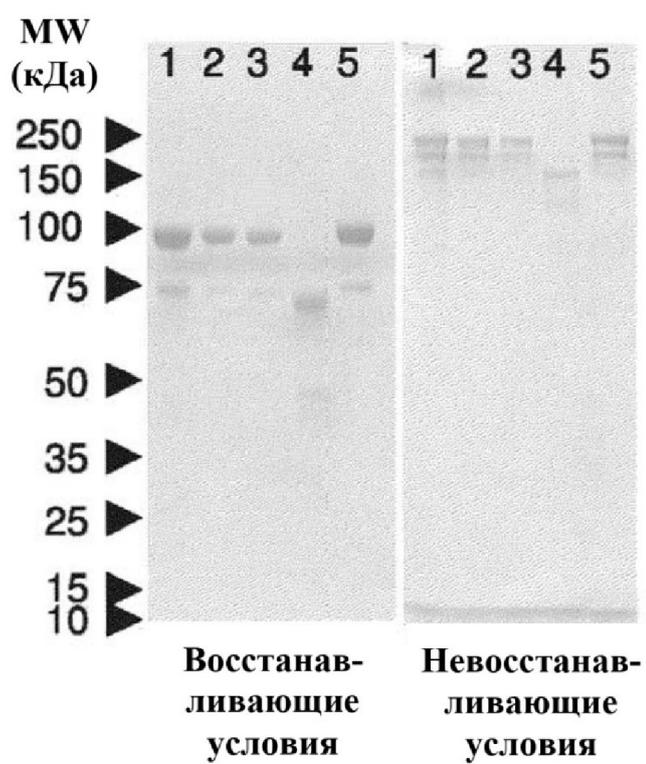
ФИГ. 1В



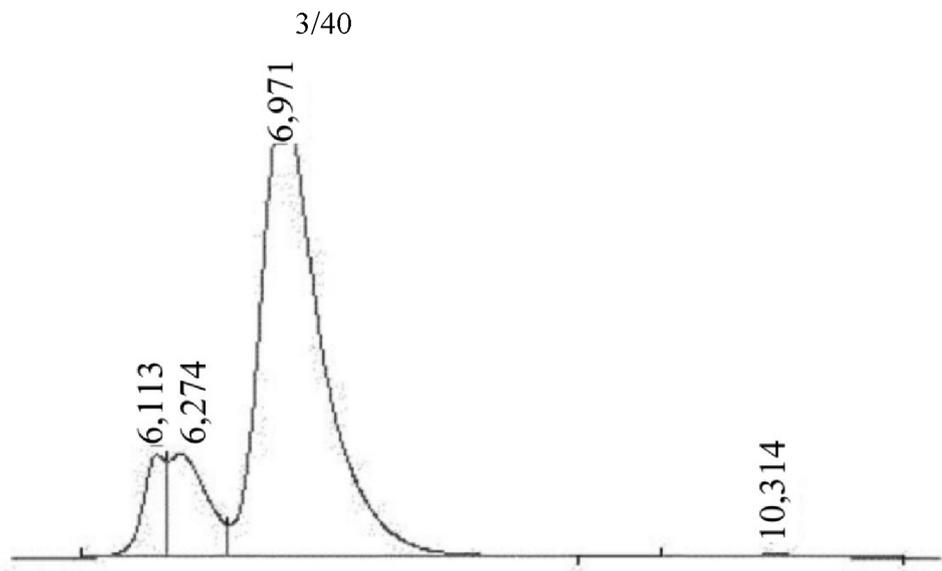
ФИГ. 2А



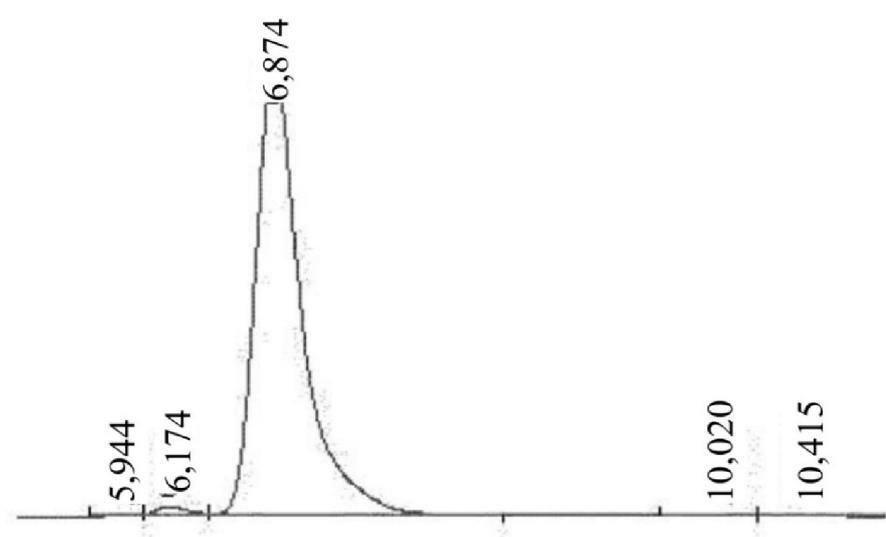
ФИГ. 2В



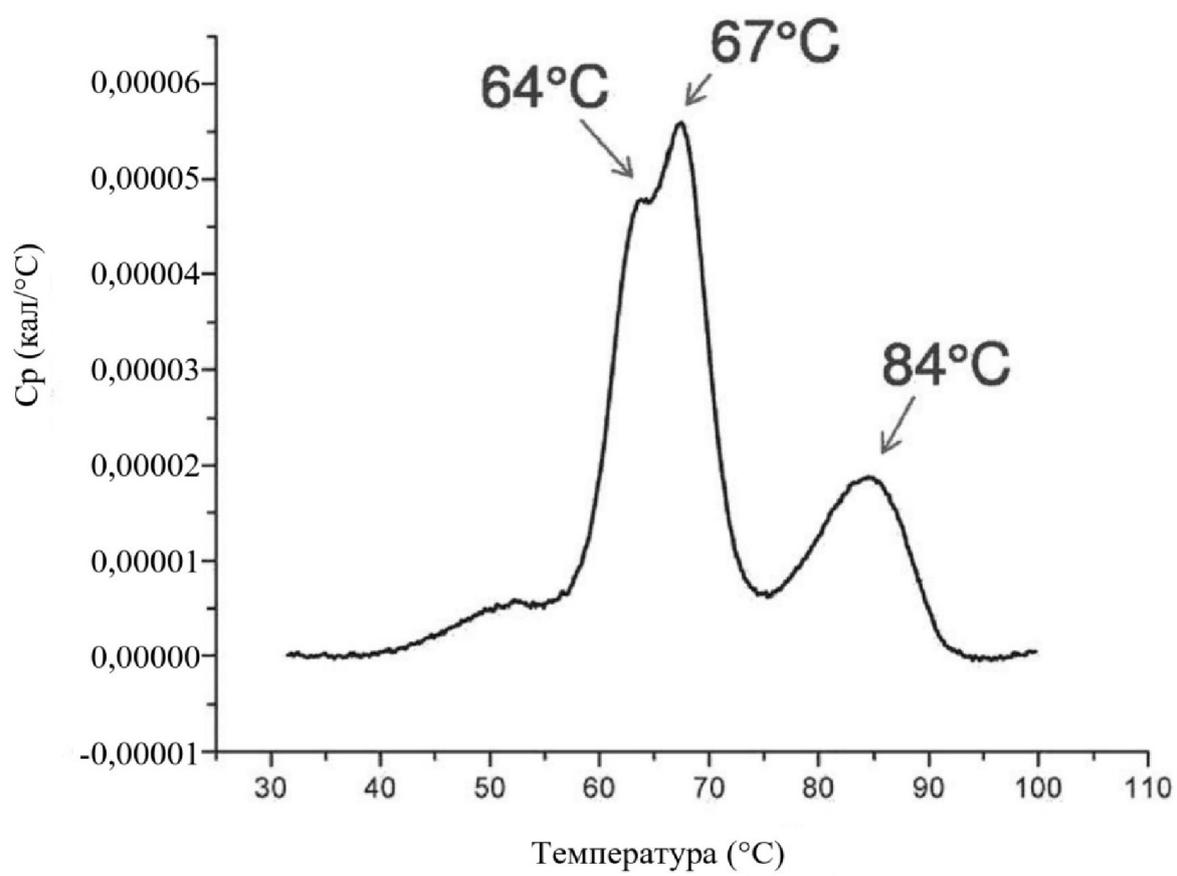
ФИГ. 3А



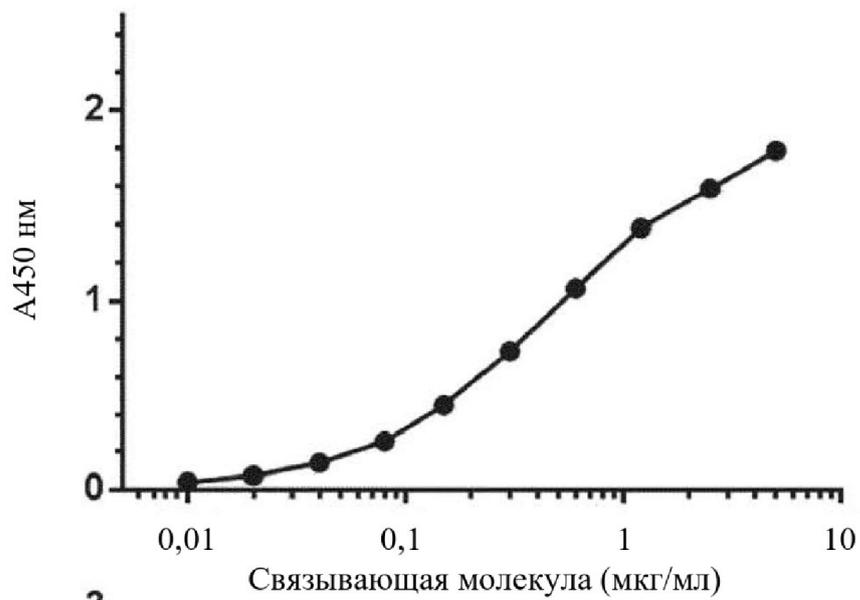
ФИГ. 3В



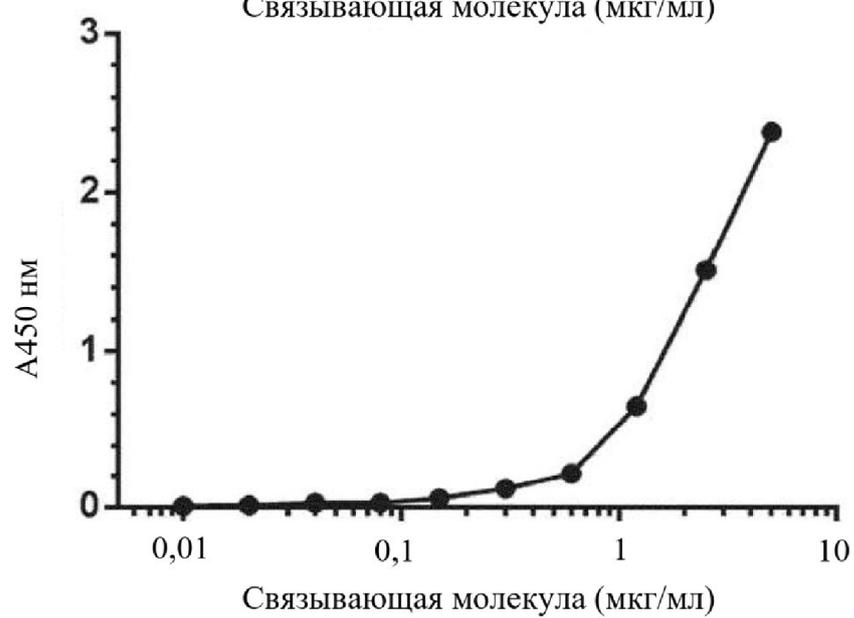
ФИГ. 4



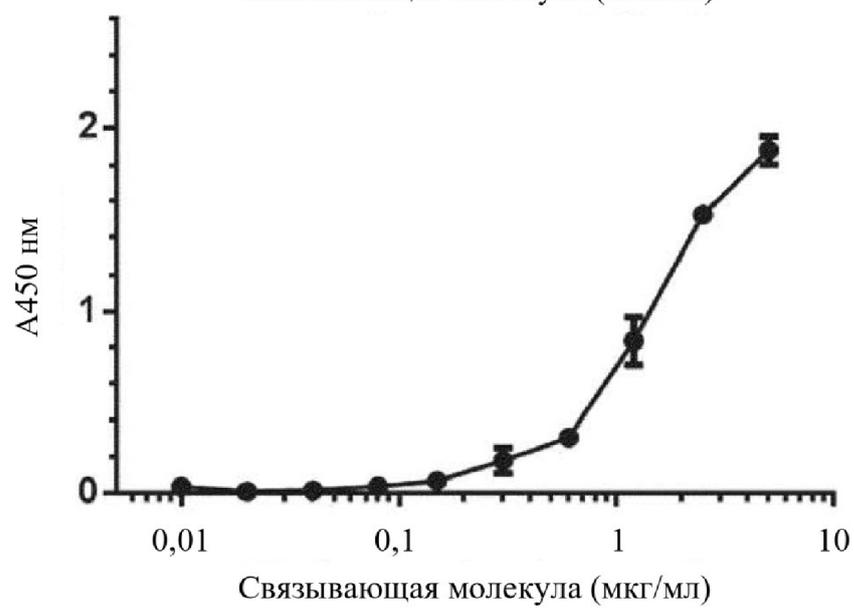
Фиг. 5А



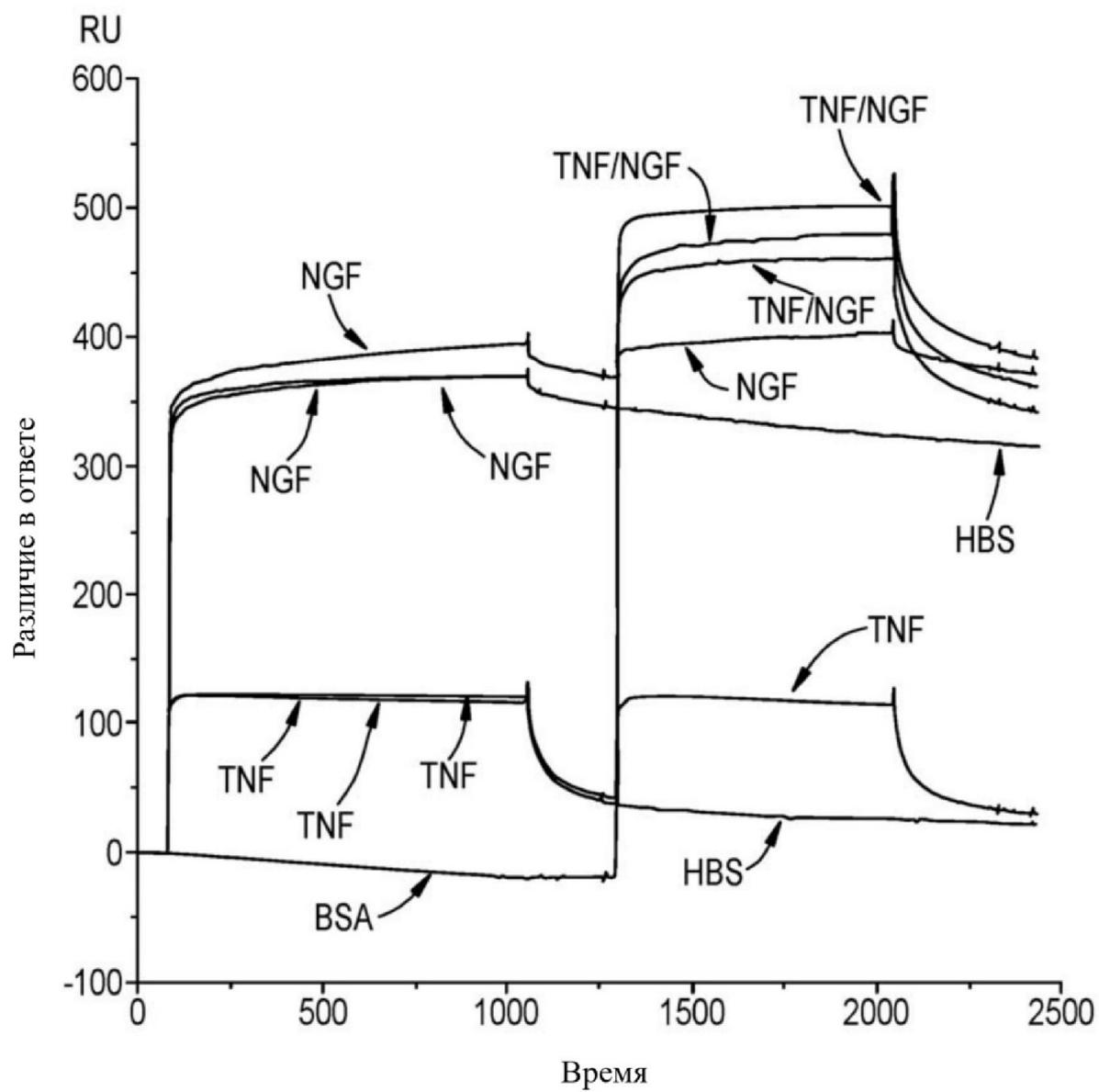
Фиг. 5В



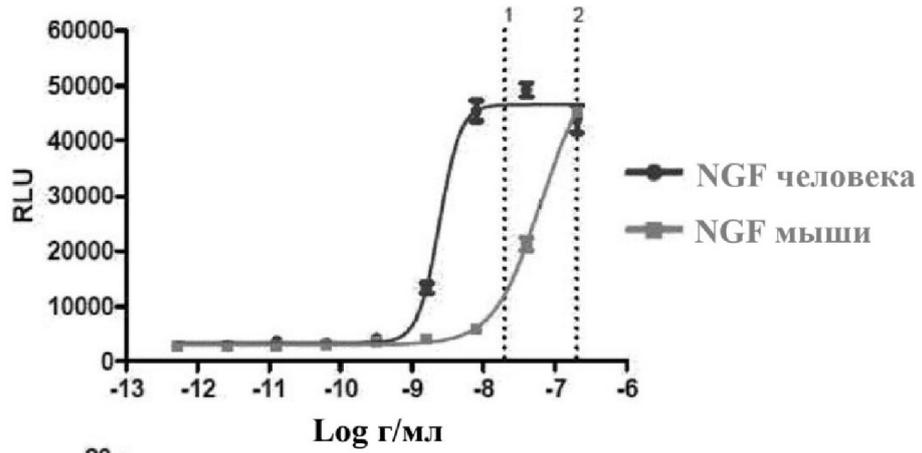
Фиг. 5С



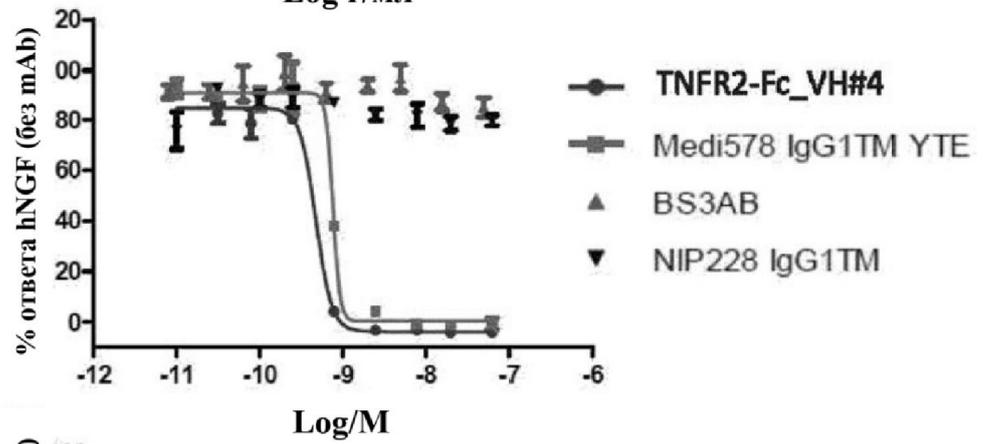
ФИГ. 6



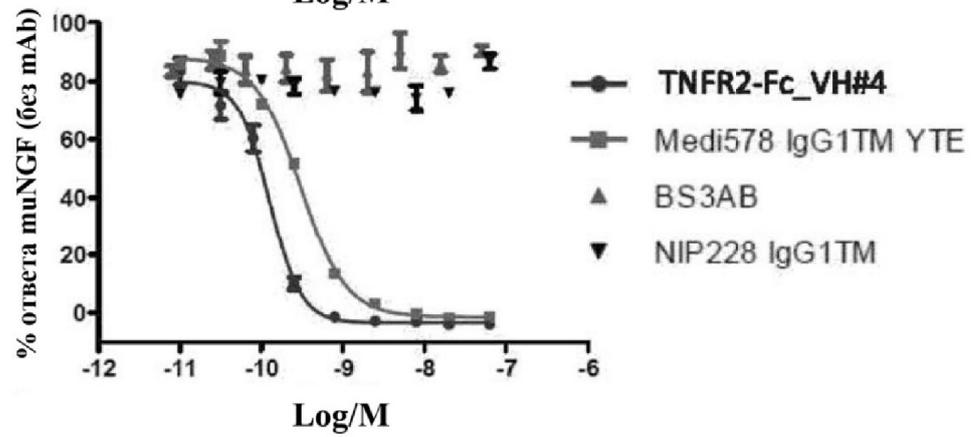
ФИГ. 7А



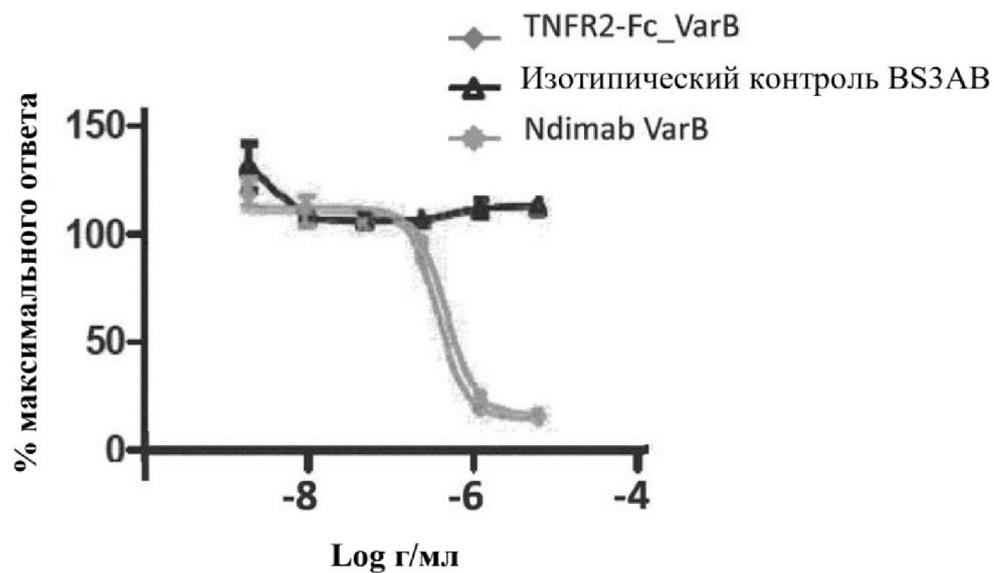
ФИГ. 7В



ФИГ. 7С

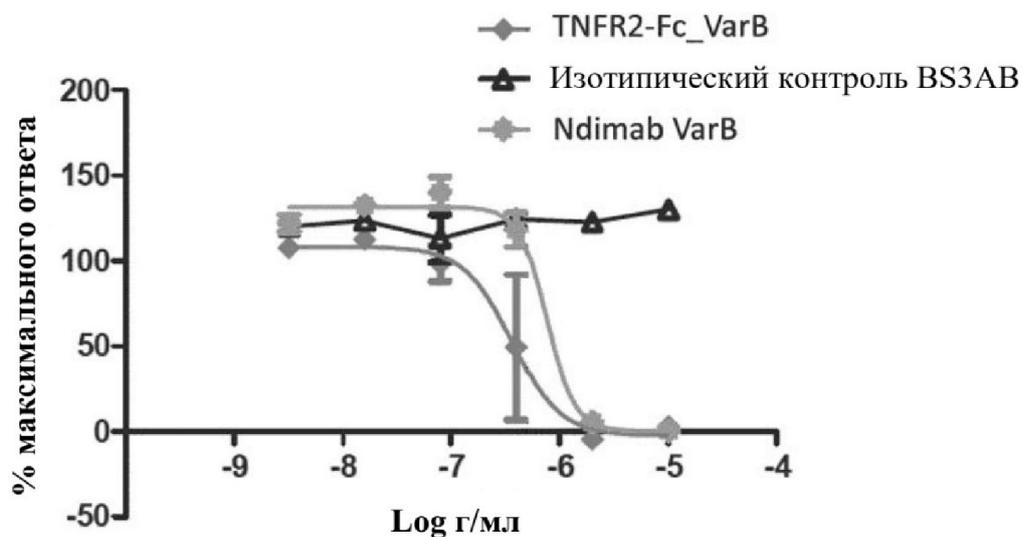


ФИГ. 7D



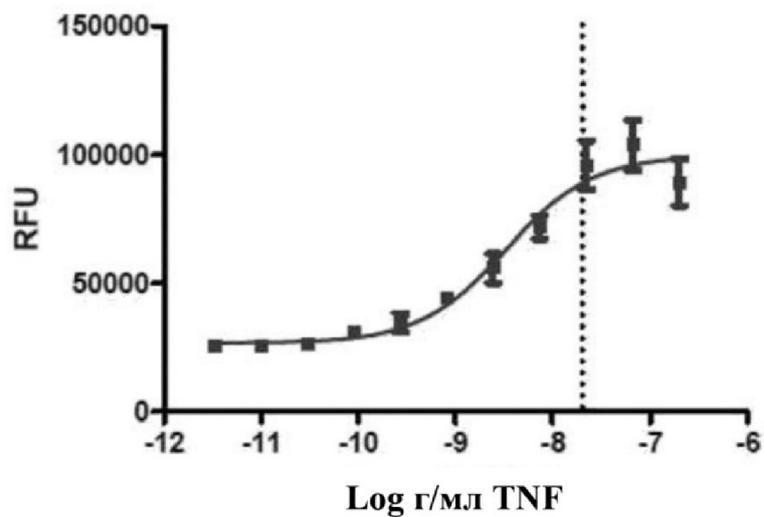
	TNFR2-Fc_VarB	ndimab VarB
IC50	3,134e-007	3,934e-007

ФИГ. 7E

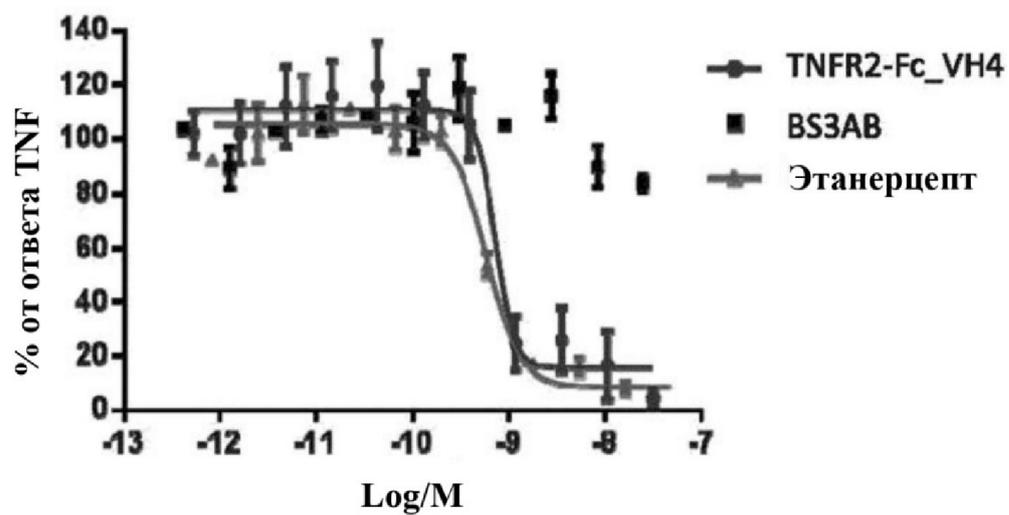


	TNFR2-Fc_VarB	ndimab VarB
IC50	3,634e-007	7,602e-007

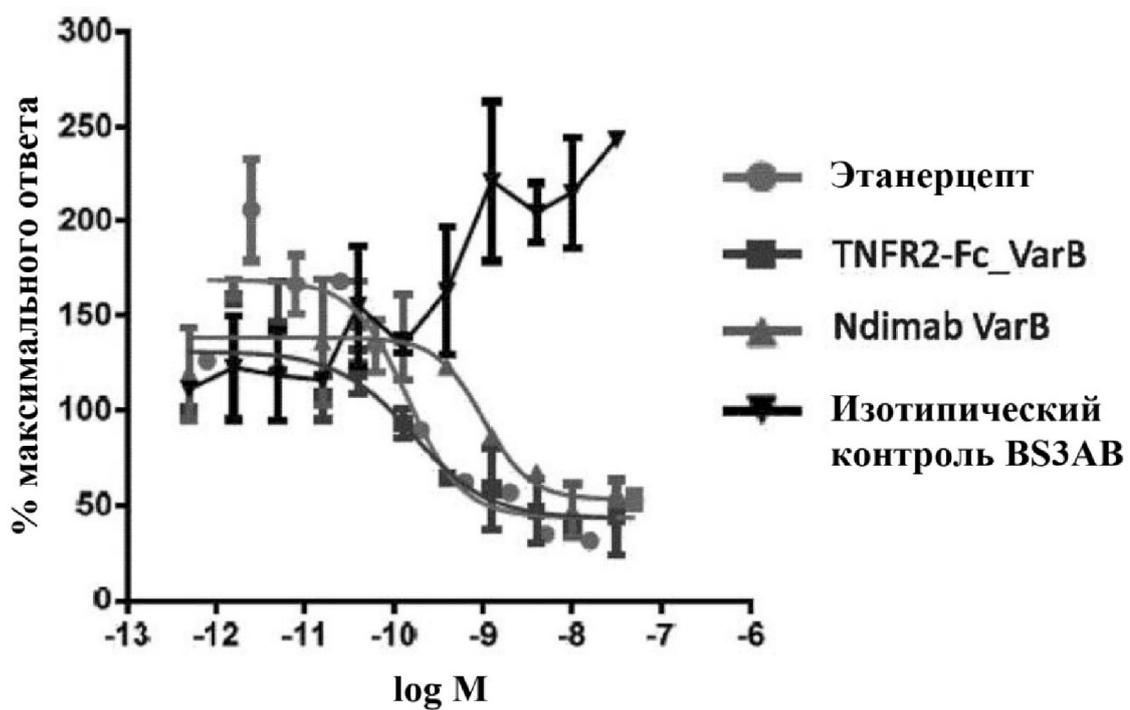
ФИГ. 8А



ФИГ. 8В

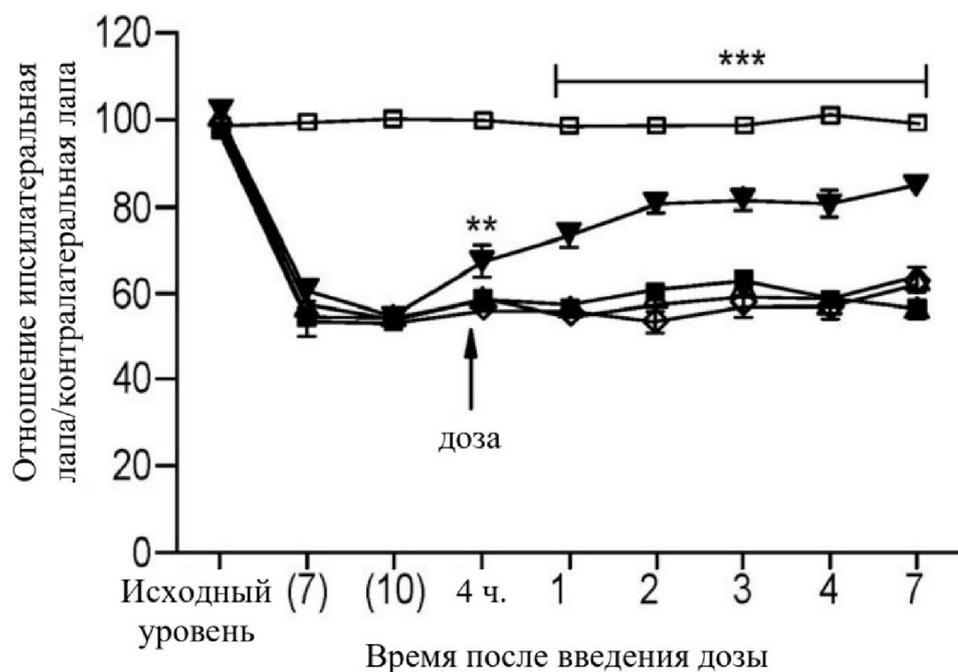


ФИГ. 8С



	Этанерцепт	TNFR2-Fc_VarB	ndimab VarB
IC50	1,444e-010	1,652e-010	1,004e-009

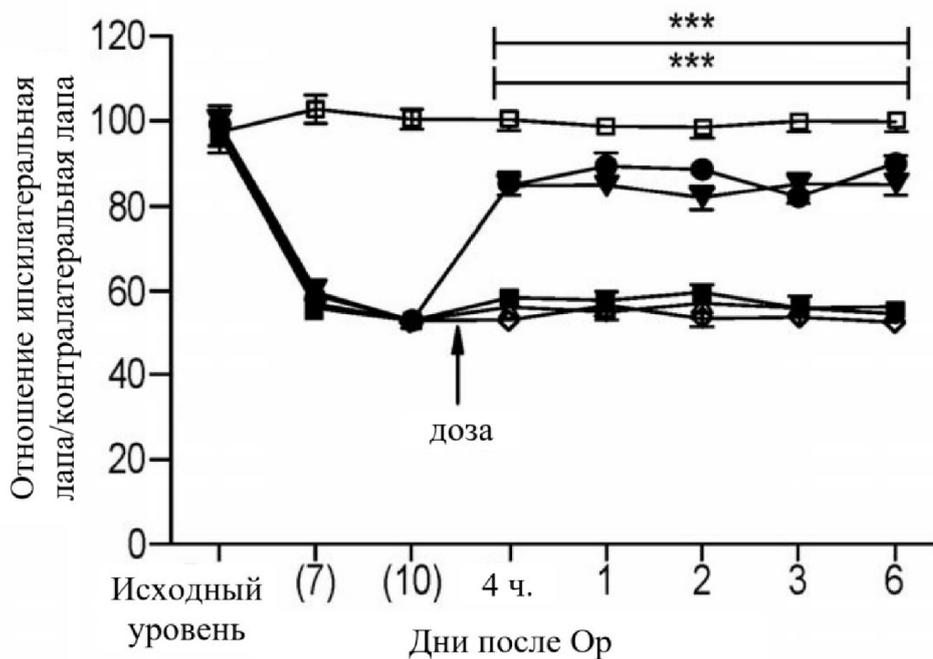
ФИГ. 9



- Имитация + CAT251, 0,03 мг/кг s.c. —◇— Op + CAT251, 0,03 мг/кг s.g.
 —■— Op + этанерцепт, 0,01 мг/кг s.g. —△— Op + MEDI578, 0,03 мг/кг s.g.
 —▼— Op + этанерцепт + MEDI578

N = 9-10 на группу. Данные анализировали с использованием 2-факторного ANOVA с временем и лечением в качестве зависимых факторов. Последующую статистическую значимость получали с применением апостериорного критерия Бонферрони
 *** $p < 0,001$ по сравнению с контролем Op + CAT251

ФИГ. 10А

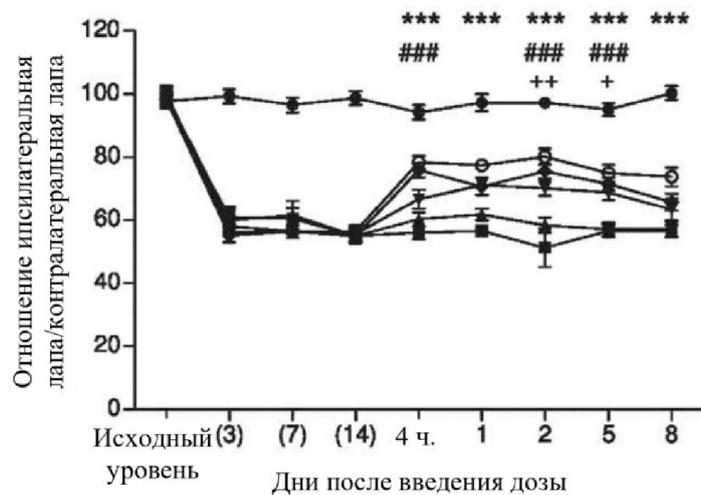


- | | |
|--|--|
| —■— Имитация + изотипический контроль, 0,03 мг/кг s.c. | —◇— Op + изотипический контроль, 0,03 мг/кг s.c. |
| —■— Op + этанерцепт, 0,01 мг/кг s.c. | —△— Op + MEDI578, 0,03 мг/кг s.c. |
| —▼— Op + биспецифическое антитело, 0,01 мг/кг s.c. | —●— Op + биспецифическое антитело, 0,03 мг/кг s.c. |

N = 10 на группу. Данные анализировали с использованием 2-факторного ANOVA с временем и лечением в качестве зависимых факторов. Последующую статистическую значимость получали с применением апостериорного критерия Бонферрони.

*** $p < 0,001$ по сравнению с биспецифическим изотипическим контролем (0,03 мг/кг s.c.)

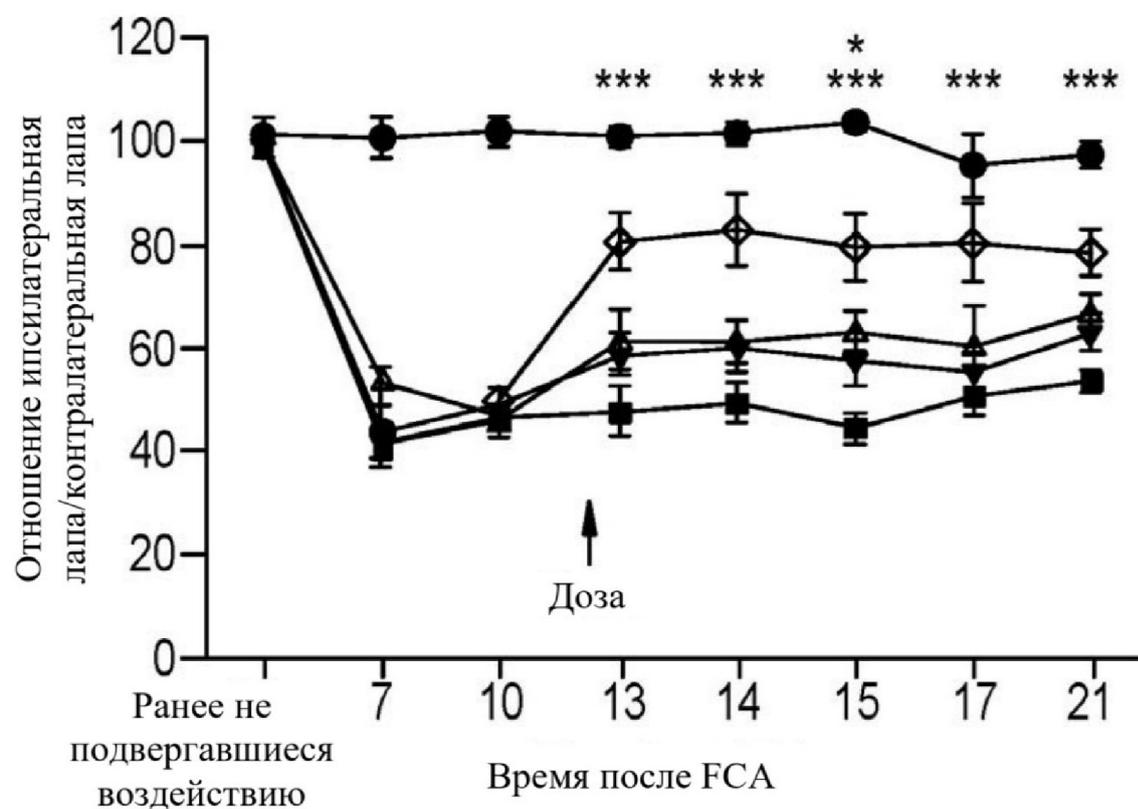
ФИГ. 10В



- Имитация + PBS, 10 мл/кг s.c.
- Or + PBS, 10 мл/кг s.c.
- ▲ Or + Bs3Ab, 0,3 мг/кг s.c.
- ▼ Or + биспецифическое антитело, 0,03 мг/кг s.c.
- ◆ Or + биспецифическое антитело, 0,1 мг/кг s.c.
- ⊖ Or + биспецифическое антитело, 0,3 мг/кг s.c.

Данные анализировали с использованием 2-факторного дисперсионного анализа, а затем апостериорного критерия Бонферрони в случае необходимости.
 + P < 0,05; ++ P < 0,01 PNL + биспецифическое антитело (0,03 мг/кг sc); ###P < 0,01 PNL + биспецифическое антитело (0,1 мг/кг sc); *** P < 0,001 PNL + биспецифическое антитело (0,3 мг/кг sc), во всех случаях по сравнению с PNL + R347

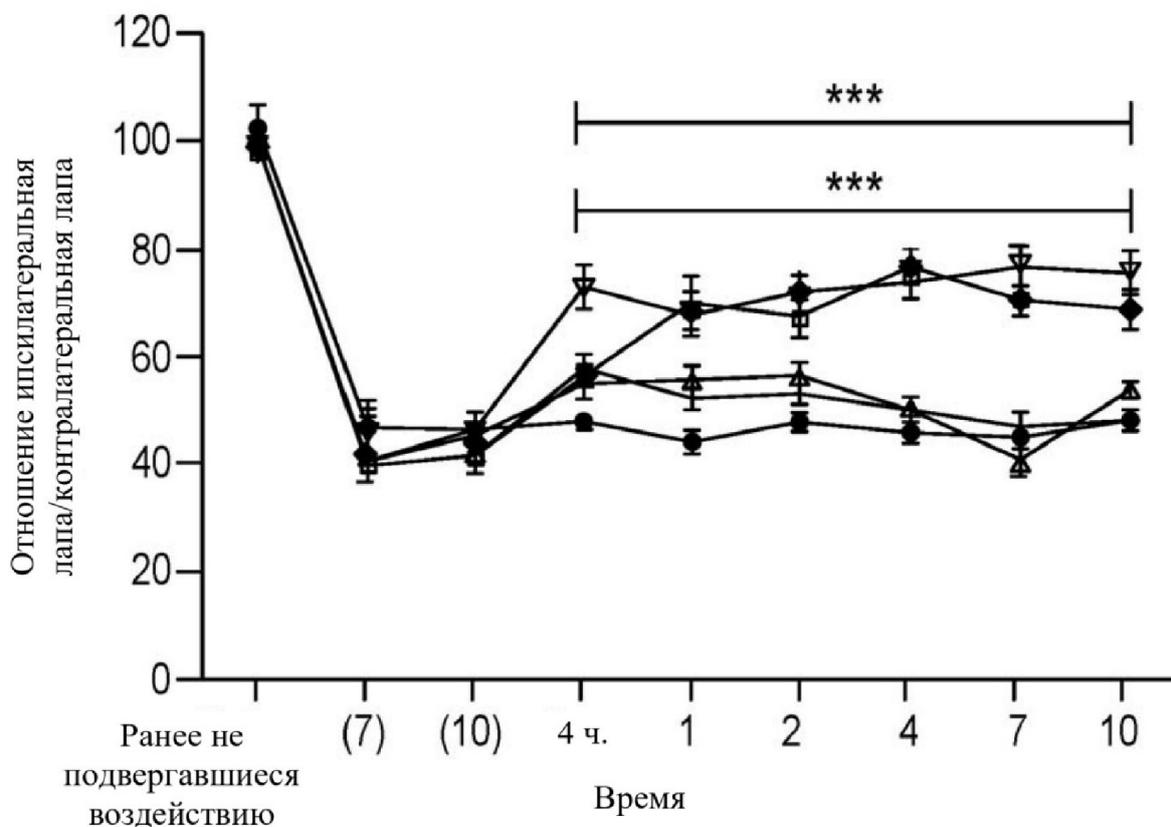
ФИГ. 11



- Среда-носитель – CAT251 (0,03 мг/кг i.v.) + PBS (10 мл/кг i.p.)
- ▲ FCA – MEDI 578 (0,03 мг/кг i.v.) + PBS (10 мл/кг i.p.)
- FCA – CAT251 (0,03 мг/кг i.v.) + PBS (10 мл/кг i.p.)
- ▼ FCA – CAT251 (0,03 мг/кг i.v.) + этанерцепт (0,01 мг/кг i.p.)
- ◇ FCA – MEDI 578 (0,03 мг/кг i.v.) + этанерцепт (0,01 мг/кг i.p.)

N = 9/10 на группу. Данные анализировали с использованием 2-факторного ANOVA, а затем апостериорного критерия Бонферрони.
 *** P > 0,05, *** P < 0,001 по сравнению со средой-носителем с CAT-251 (0,03 мг/кг i.v.) + PBS (10 мл/кг i.p.)

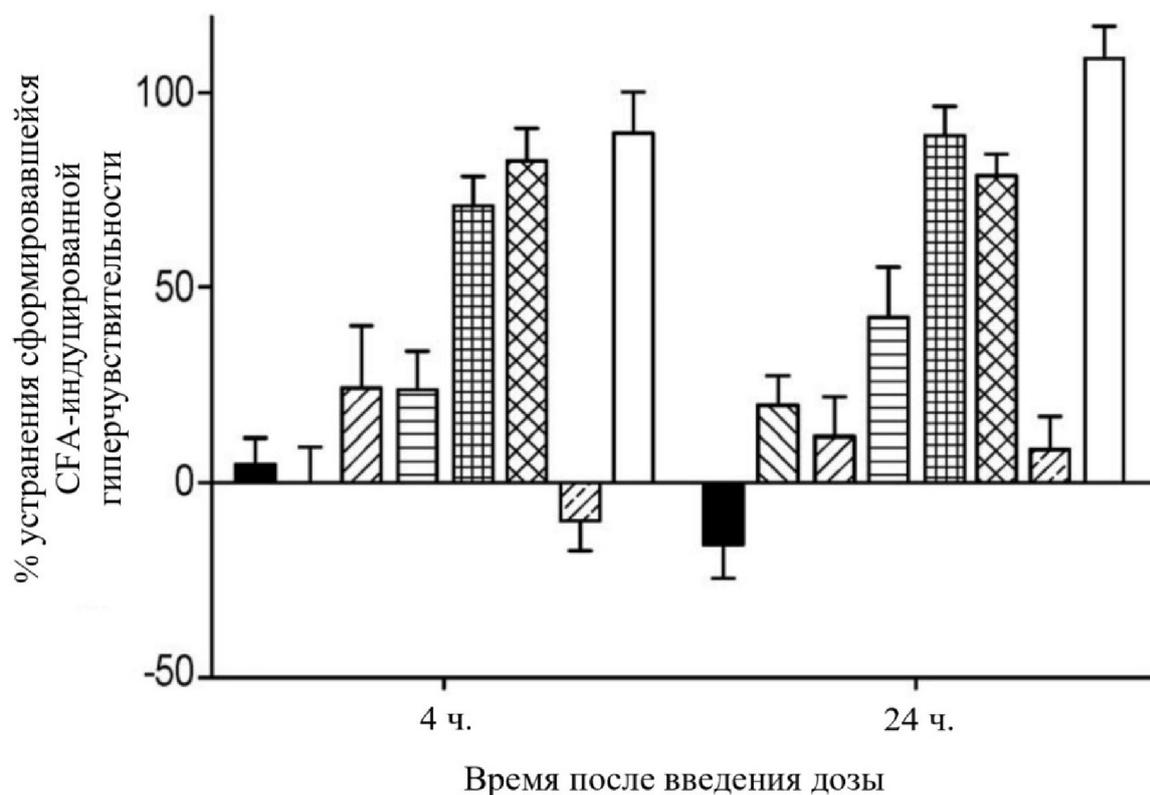
ФИГ. 12



- Биспецифический изотипический контроль, 0,01 мг/кг s.c.
- MEDI578, 0,01 мг/кг s.c.
- ▲ Этанерцепт, 0,01 мг/кг s.c.
- ◆ Биспецифическое антитело, 0,003 мг/кг s.c.
- ▼ Биспецифическое антитело, 0,01 мг/кг s.c.

Данные анализировали с использованием 2-факторного ANOVA с временем и лечением в качестве зависимых факторов. Последующую статистическую значимость получали с применением апостериорного критерия Бонферрони. *** $P < 0,001$ по сравнению с биспецифическим изотипическим контролем (0,01 мг/кг s.c.) $n = 9-10$

ФИГ. 13



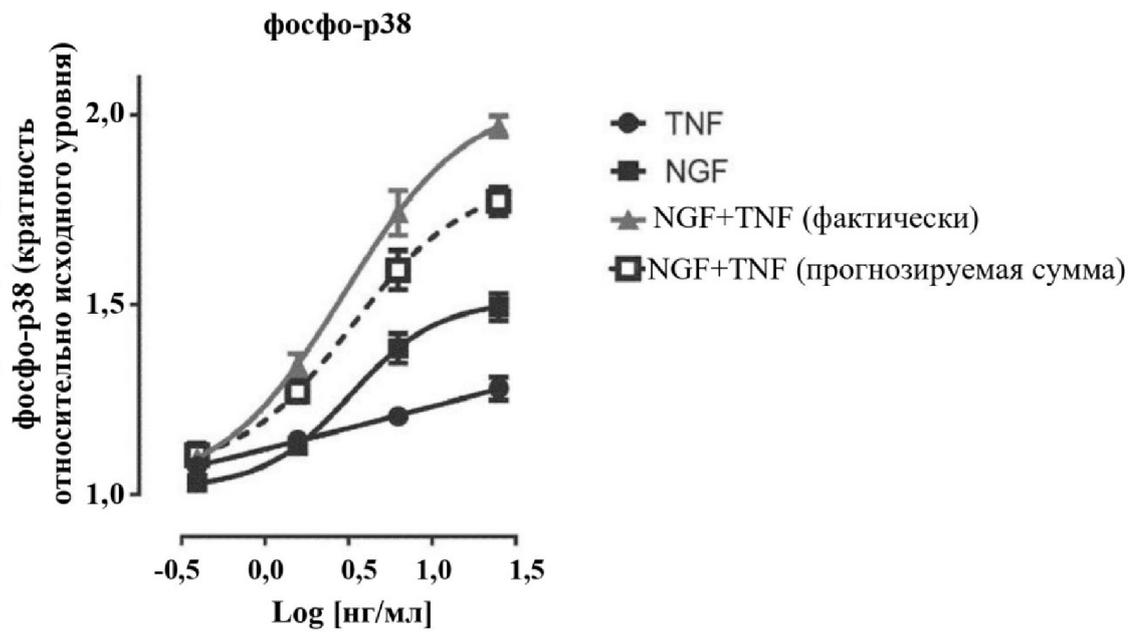
Статистический анализ – ANOVA с повторными измерениями, а затем критерий плановых сравнений с применением InVivoStat. *
 $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ — значимое устранение гипералгезии по сравнению со средой-носителем в каждый момент времени.

- Среда-носитель
- ▨ 0,003 мг/кг биспецифического антитела
- ▧ 0,01 мг/кг биспецифического антитела
- ▩ 0,03 мг/кг биспецифического антитела
- 0,3 мг/кг биспецифического антитела
- ▣ 3 мг/кг биспецифического антитела
- ▤ 3 мг/кг NIP228
- Индометацин, 10 мг/кг

ФИГ. 14

	100,0	25,0	6,3	1,6	0,4	0,0
25,0	1,1	1,1	1,1	0,9	0,7	0,7
6,3	1,1	1,1	1,1	0,8	0,7	0,7
1,6	1,0	1,0	1,0	0,8	0,6	0,7
0,4	0,9	0,9	0,9	0,7	0,6	0,6
0,1	0,9	0,9	0,9	0,7	0,6	0,6
0,0	0,9	0,8	0,8	0,6	0,6	0,6
0,0	0,9	0,9	0,8	0,6	0,6	0,6

ФИГ. 15



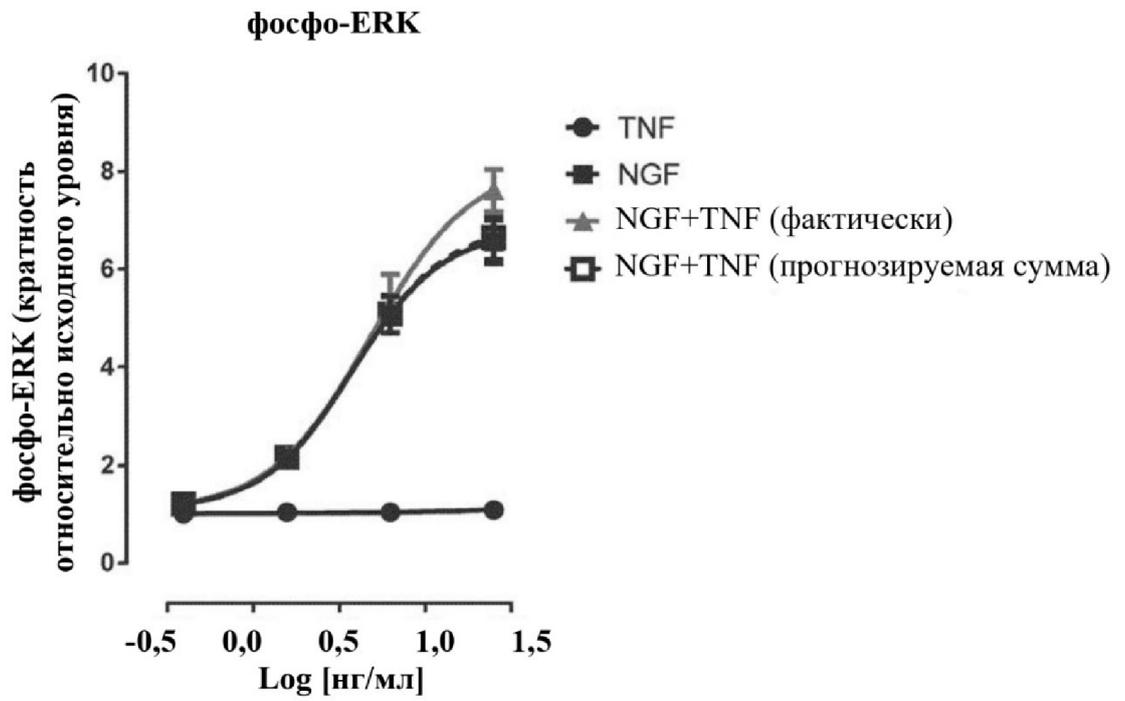
ФИГ. 16

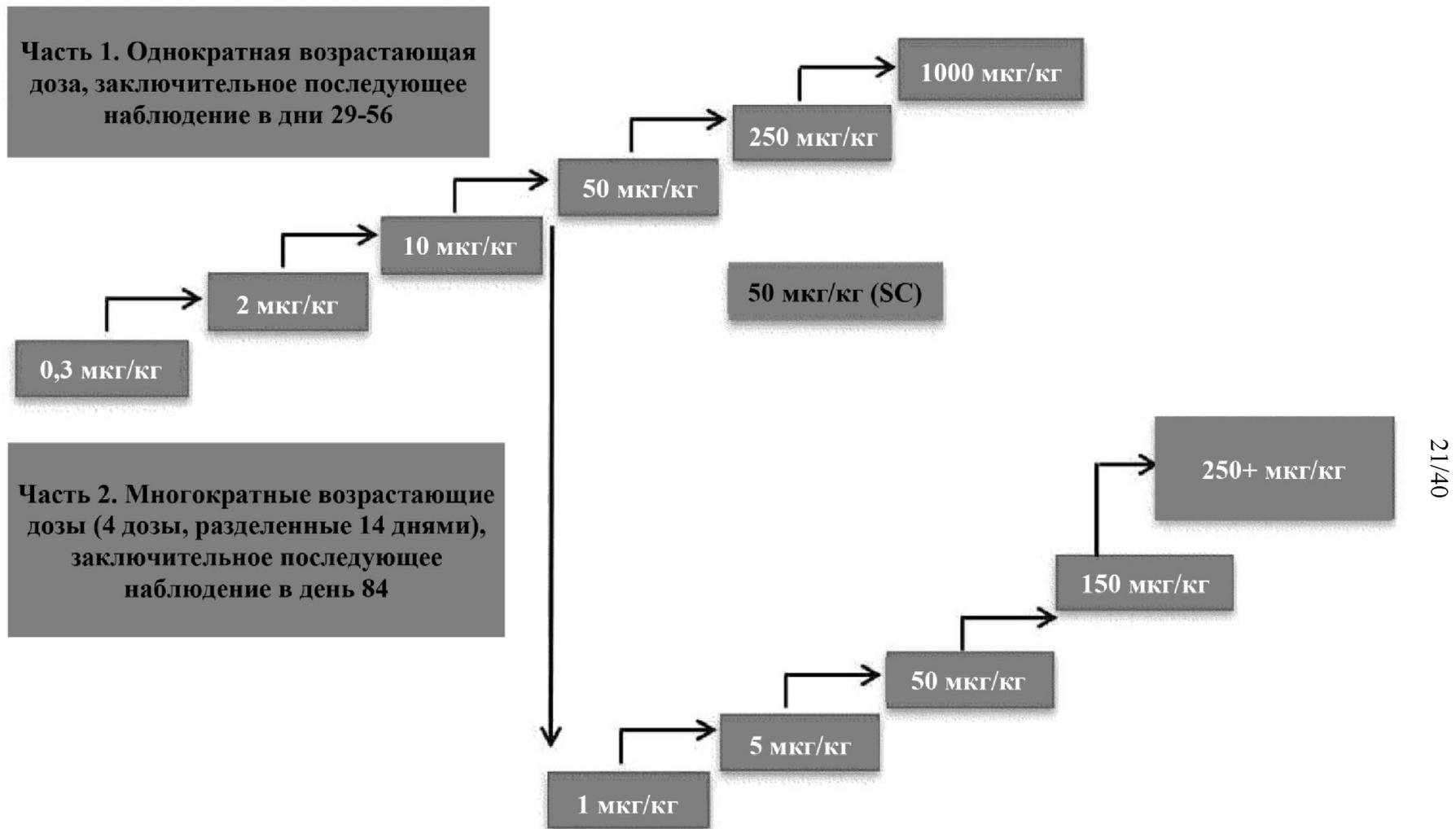
NGF [нг/мл]

TNFα [нг/мл]

	100,0	25,0	6,3	1,6	0,4	0,0
25,0	0,7	0,7	0,5	0,2	0,1	0,1
6,3	0,6	0,5	0,4	0,2	0,1	0,1
1,6	0,6	0,5	0,4	0,2	0,1	0,1
0,4	0,6	0,5	0,4	0,2	0,1	0,1
0,1	0,6	0,5	0,4	0,2	0,1	0,1
0,0	0,6	0,5	0,4	0,2	0,1	0,1
0,0	0,6	0,6	0,4	0,2	0,1	0,1

ФИГ. 17

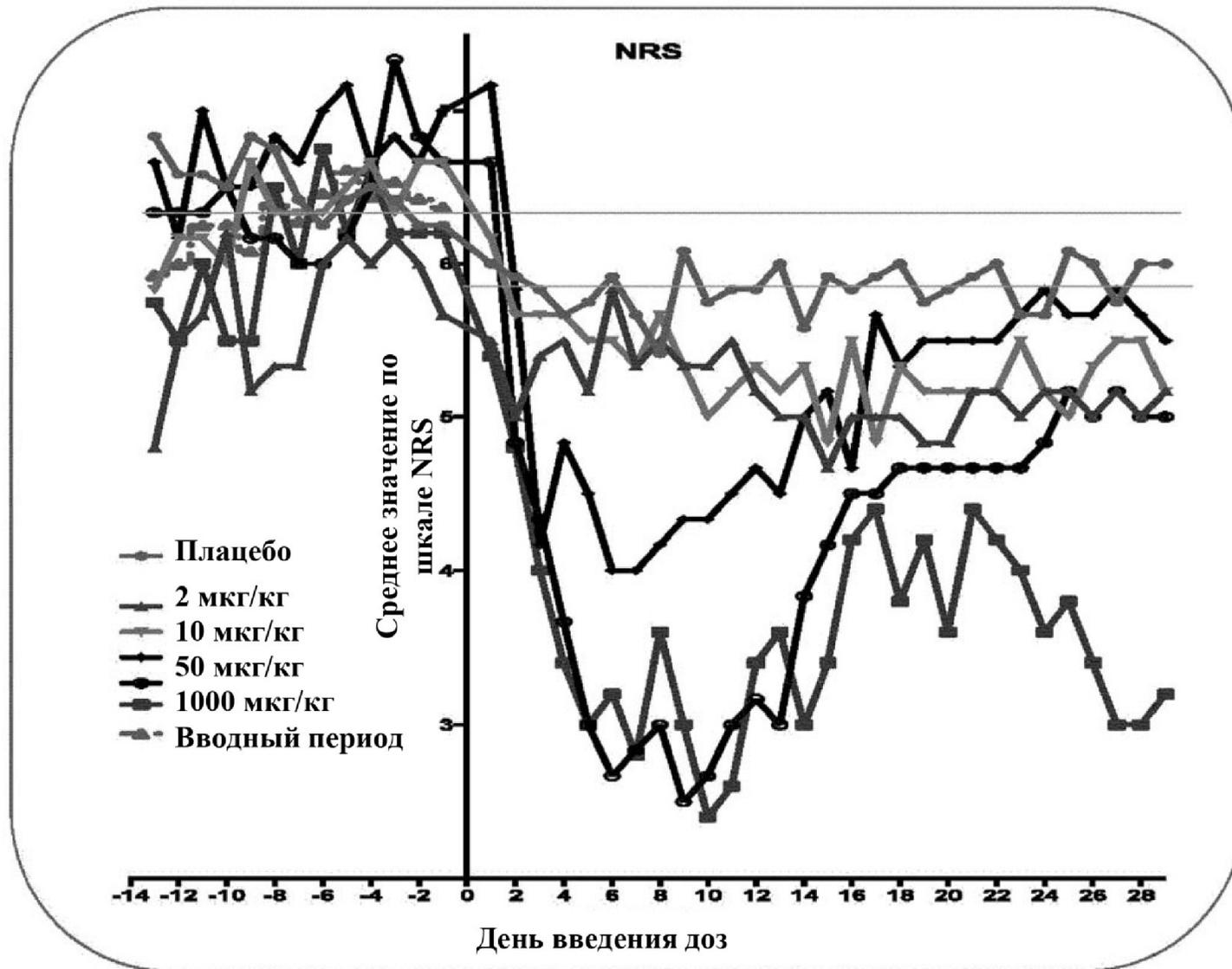




ФИГ. 18А

Когорта	RoA	Доза, мкг/кг	Прогнозируемый средний % подавления NGF
Часть I - SAD			
1	IV	0,3	10
2	IV	2	27
3	IV	10	38
4	IV	50	53
5	IV	250	71
6	IV	1000	82
7	SC	50	20
Часть II - MAD			
8	IV	1	21
9	IV	5	34
10	IV	50	51
11	IV	150	69

ФИГ. 18В



ФИГ. 19А

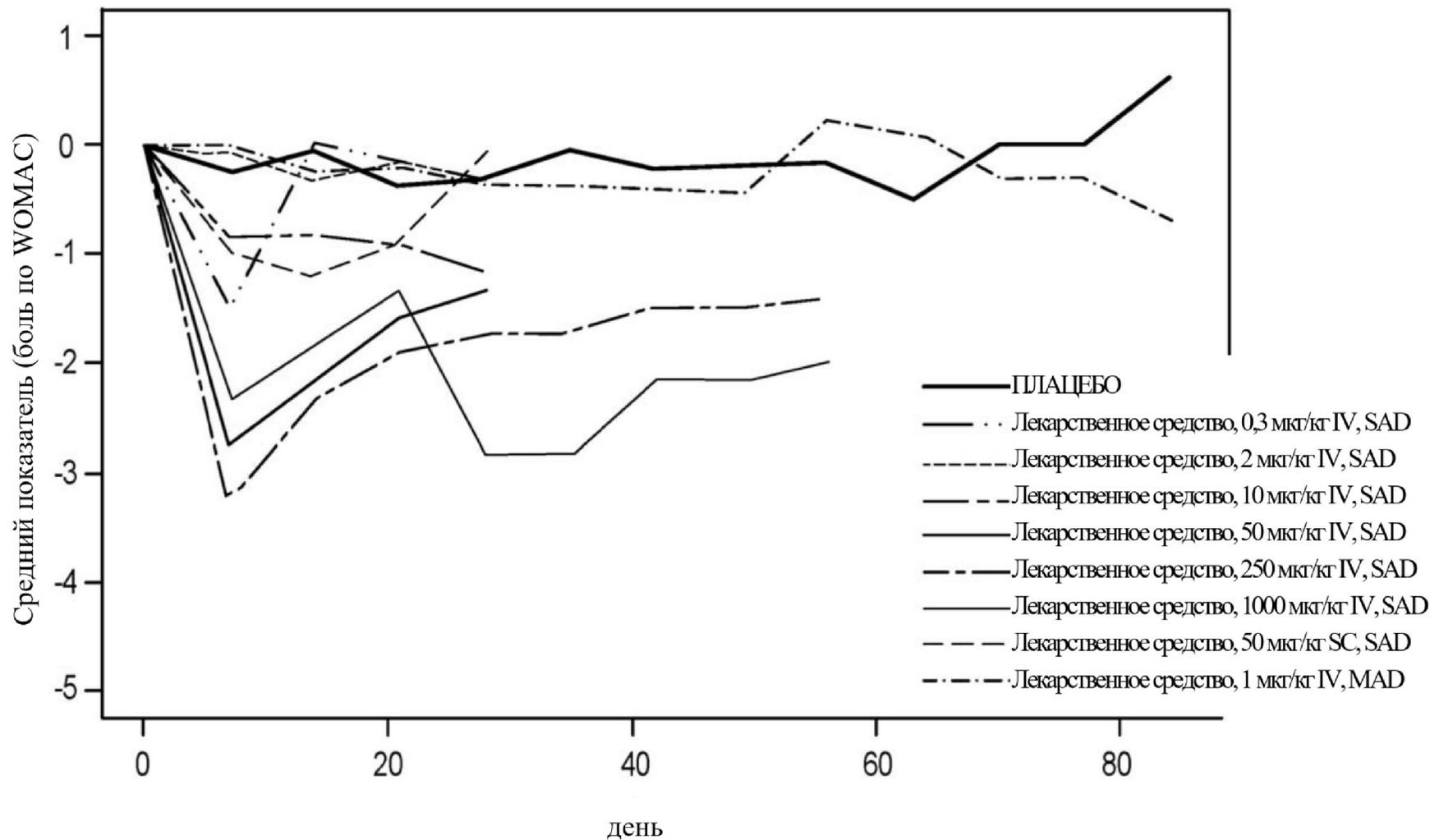
Доза в когорте SAD (мкг на кг)	Прогнозируемое среднее подавление NGF (%)	Пиковое изменение по шкале NRS по сравнению с PBO
2	27	-0,69
10	38	-0,85
50	53	-1,85
250	71	-3,35
1000	83	-3,45

24/40

ФИГ. 19В

ФИГ. 20А

Скорректированный по исходному уровню средний показатель боли по WOMАС при оценке по шкале 0-10 (1-недельные периоды)



	Тестирование в одну неделю	p-значение
Плацебо по сравнению с	TNFR2-Fc varB, 0,3 мкг/кг IV, SAD	0,95
Плацебо по сравнению с	TNFR2-Fc varB, 2 мкг/кг IV, SAD	0,97
Плацебо по сравнению с	TNFR2-Fc varB, 10 мкг/кг IV, SAD	0,43
Плацебо по сравнению с	TNFR2-Fc varB, 50 мкг/кг IV, SAD	0,06
Плацебо по сравнению с	TNFR2-Fc varB, 250 мкг/кг IV, SAD	0,03
Плацебо по сравнению с	TNFR2-Fc varB, 1000 мкг/кг IV, SAD	0,06
Плацебо по сравнению с	TNFR2-Fc varB, 50 мкг/кг SC, SAD	0,59

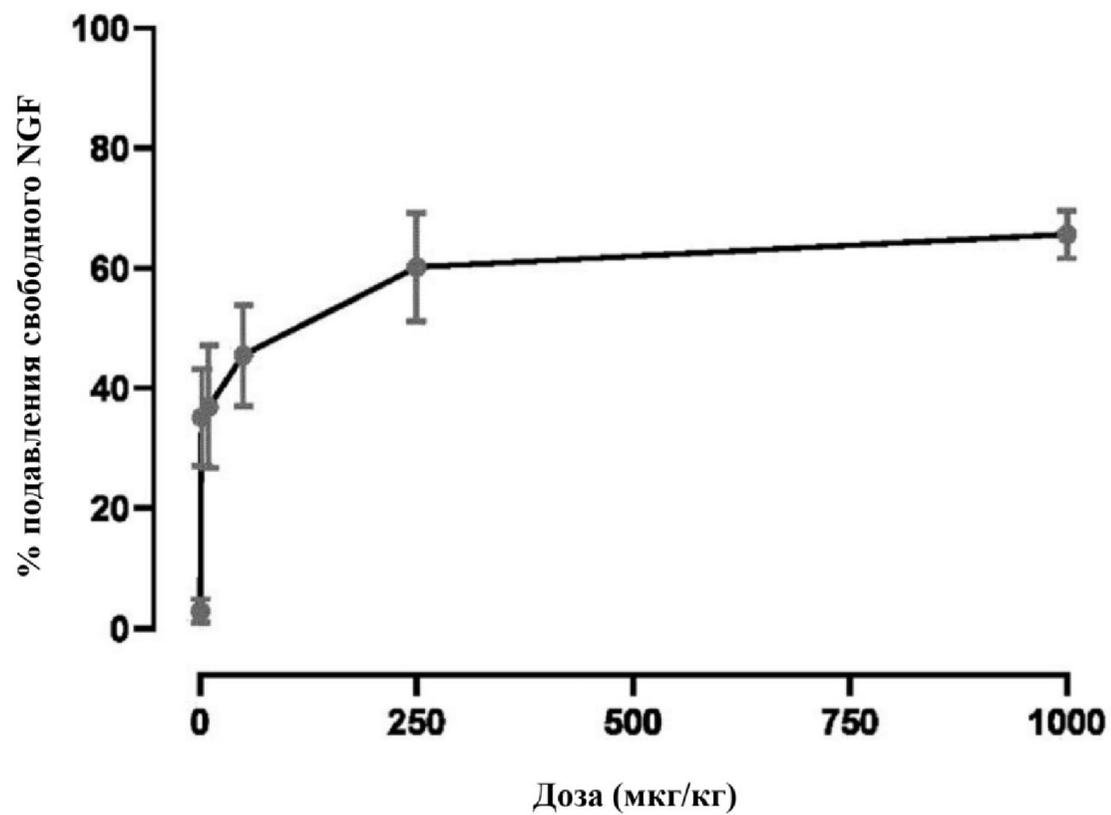
26/40

ФИГ. 20В

Доза MEDI7352 (мкг/кг)	Измеренный % подавления NGF (по сравнению с прогнозируемым)		Пиковое изменение показателя по подшкале оценки боли WOMAC по сравнению с плацебо
	Пик	Среднее значение	MEDI7352
50 (SAD)	92 (99)	46 (53)	-2,4
250 (SAD)	90 (100)	55 (71)	-2,9
1000 (SAD)	tbd (100)	tbd (82)	-2,0

ФИГ. 21

Средний % подавления свободного NGF (среднее значение \pm SE) в течение 14 дней для всех IV доз

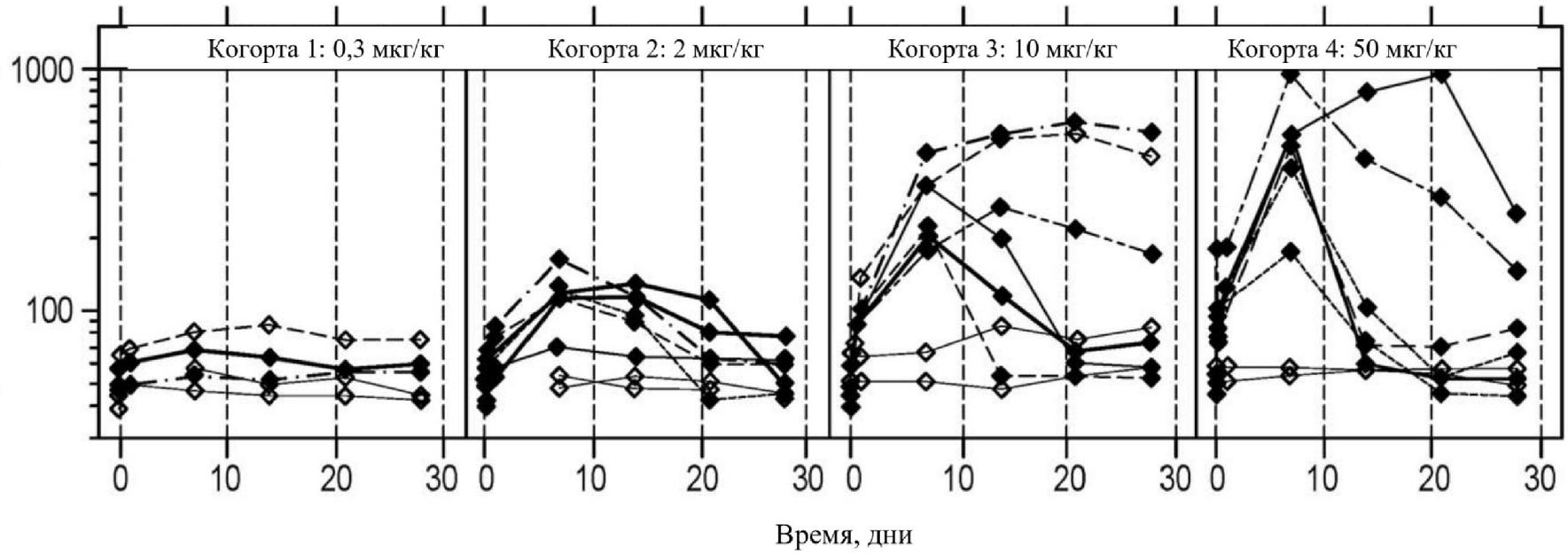


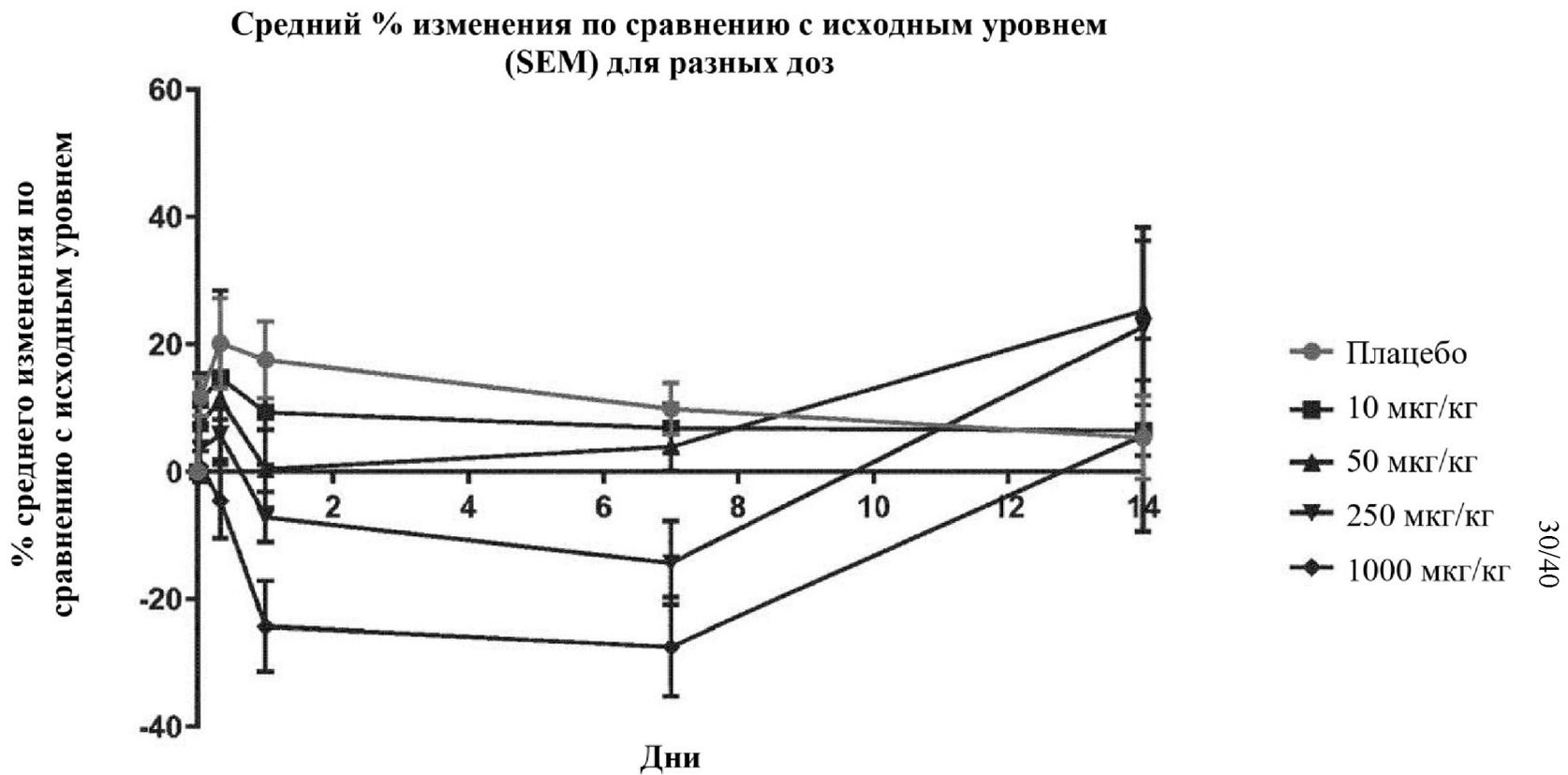
28/40

ФИГ. 22

ФИГ. 23

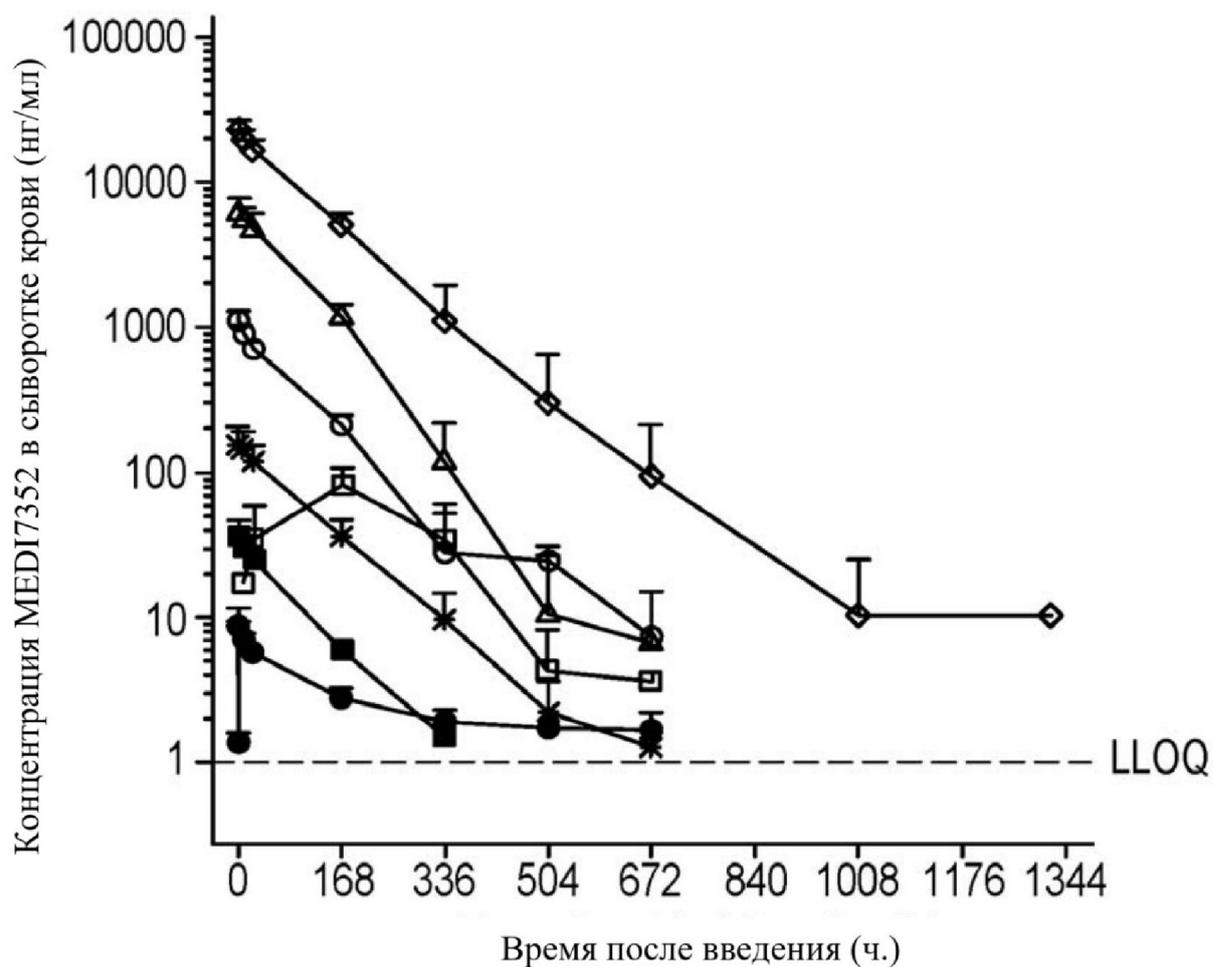
Общая концентрация NGF в сыворотке крови, пг/мл





ФИГ. 24

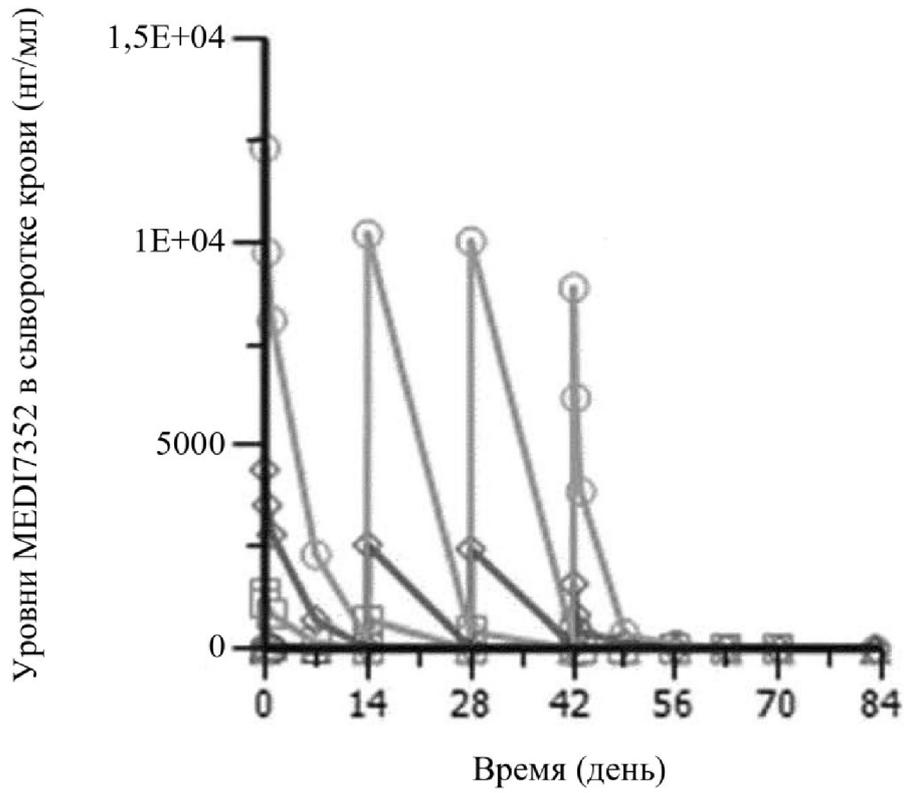
ФИГ. 25



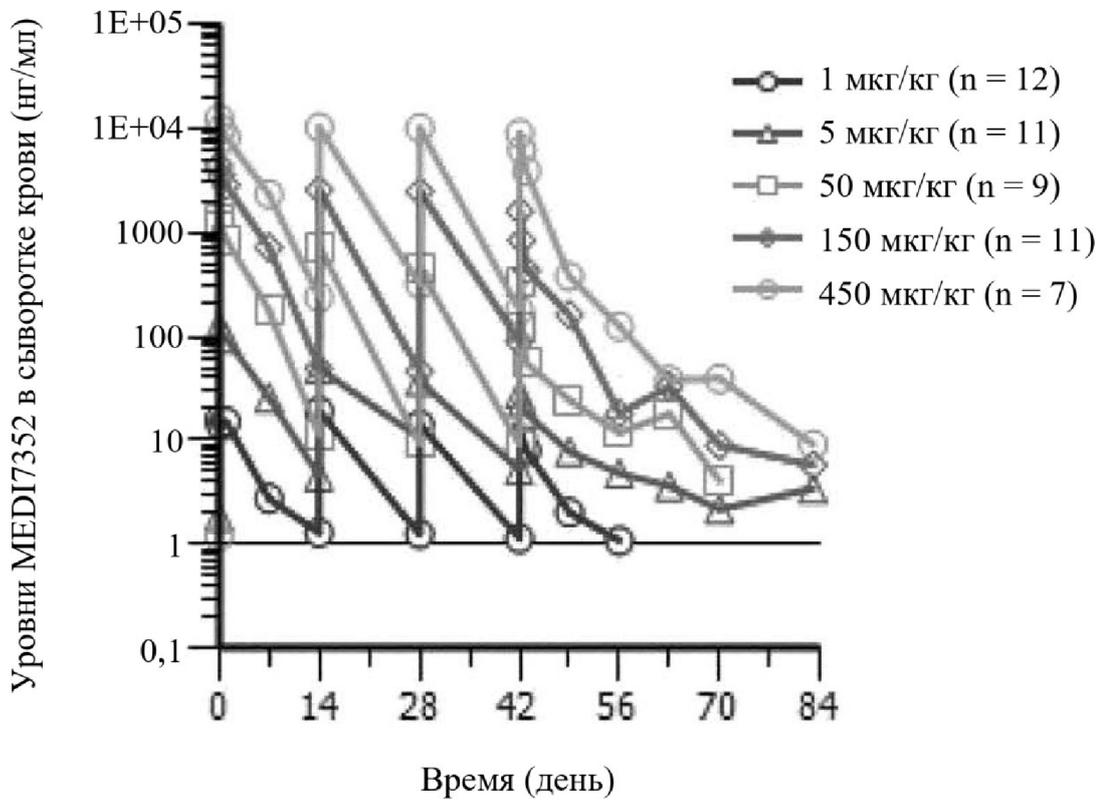
Обработка

- MEDI7352, 0,3 мкг/кг IV (SAD)
- MEDI7352, 2 мкг/кг IV (SAD)
- ✱ MEDI7352, 10 мкг/кг IV (SAD)
- MEDI7352, 50 мкг/кг IV (SAD)
- △ MEDI7352, 250 мкг/кг IV (SAD)
- ◇ MEDI7352, 1000 мкг/кг IV (SAD)
- MEDI7352, 50 мкг/кг SC (SAD)

ФИГ. 26А

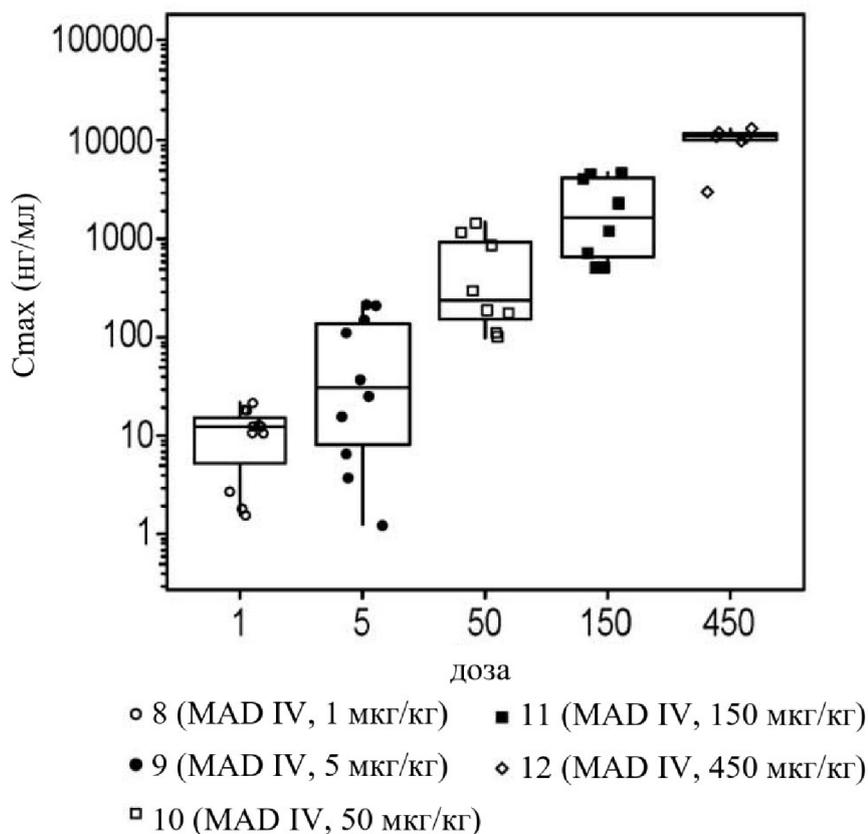


ФИГ. 26В

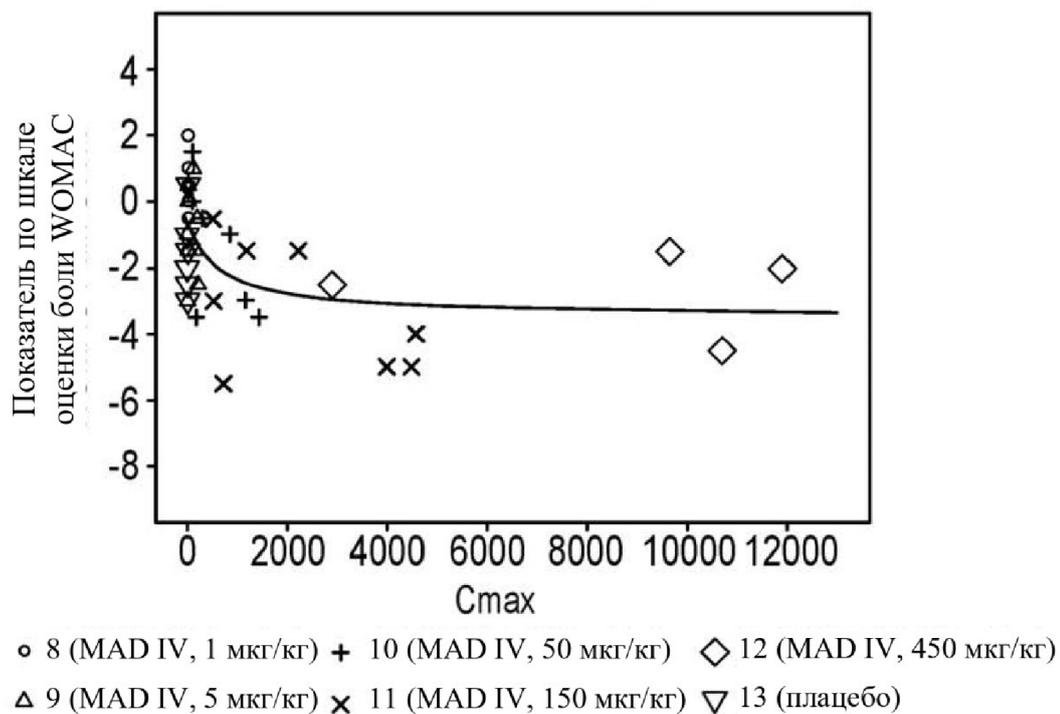


ФИГ. 27

Сmax в зависимости от дозы в когортах MAD (день 43)

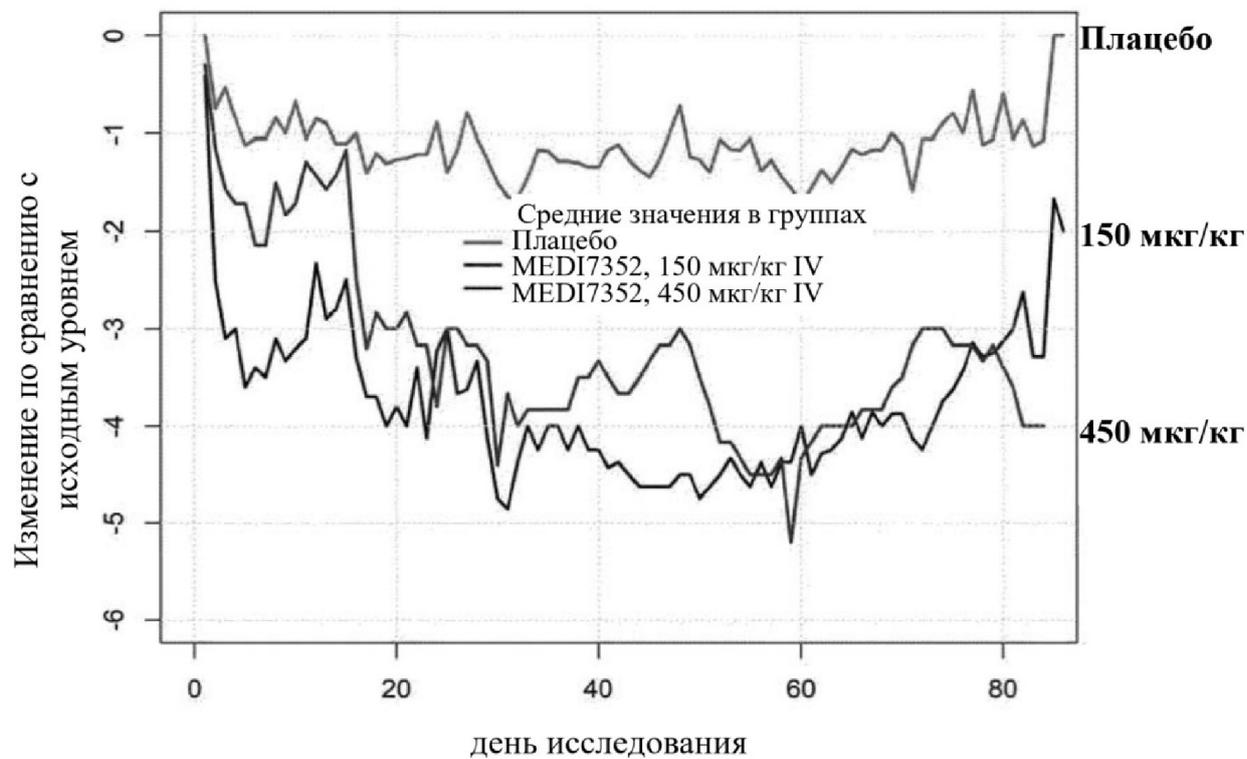


Изменение по сравнению с исходным уровнем в неделю 8 (когорты MAD)

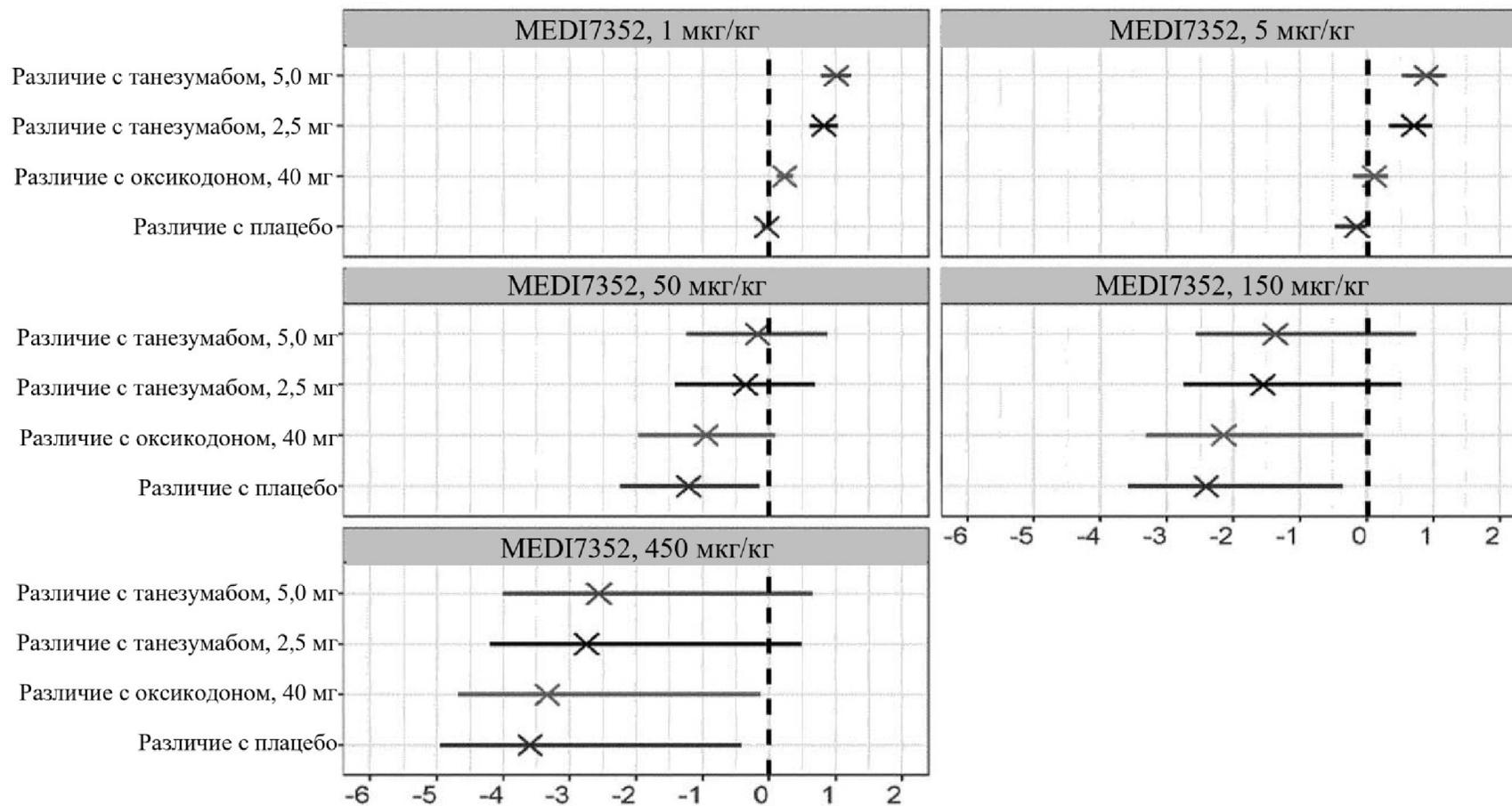


ФИГ. 28А

Изменение показателя боли по шкале NRS по сравнению с исходным уровнем (все когорты MAD)



**Эффект лечения с точки зрения среднего показателя боли по шкале NRS –
различие по сравнению с препаратом сравнения**

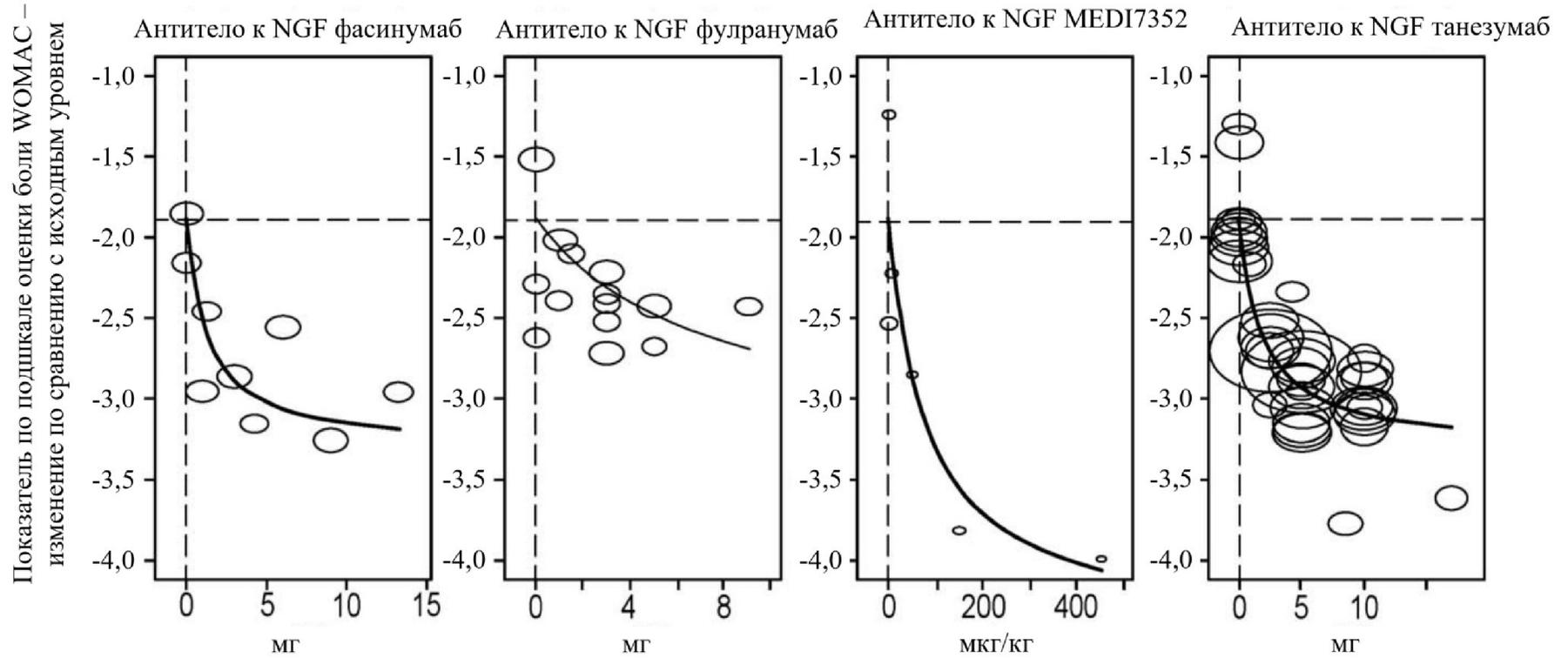


Изменение по сравнению с исходным уровнем, различие по сравнению с препаратом сравнения

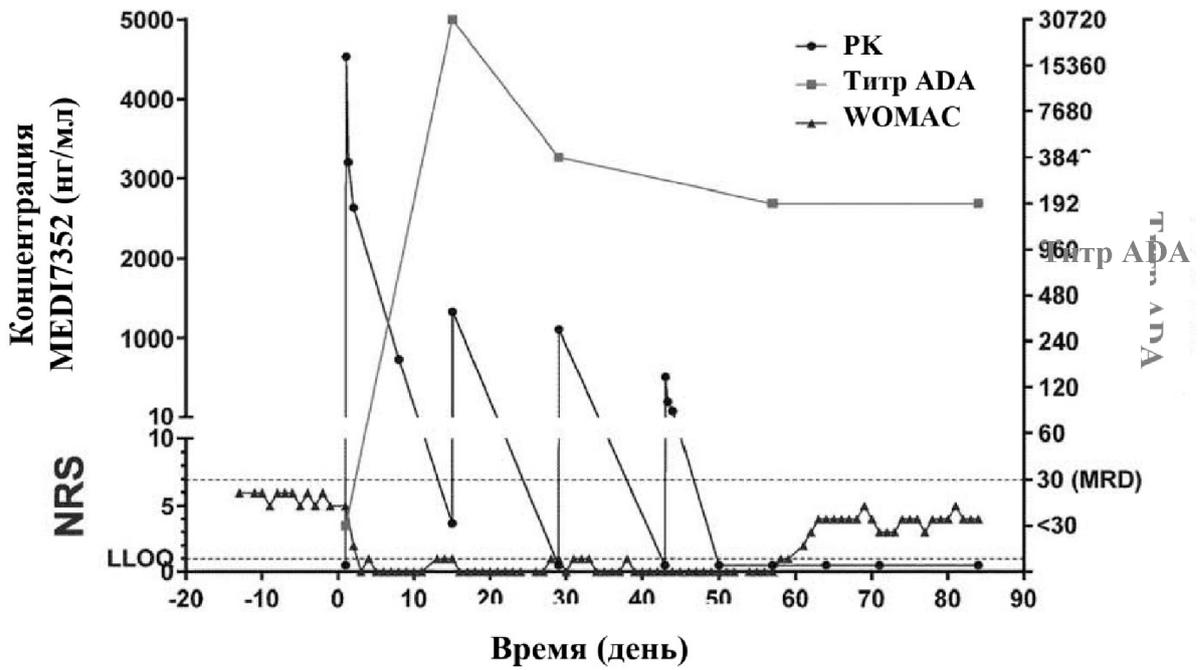
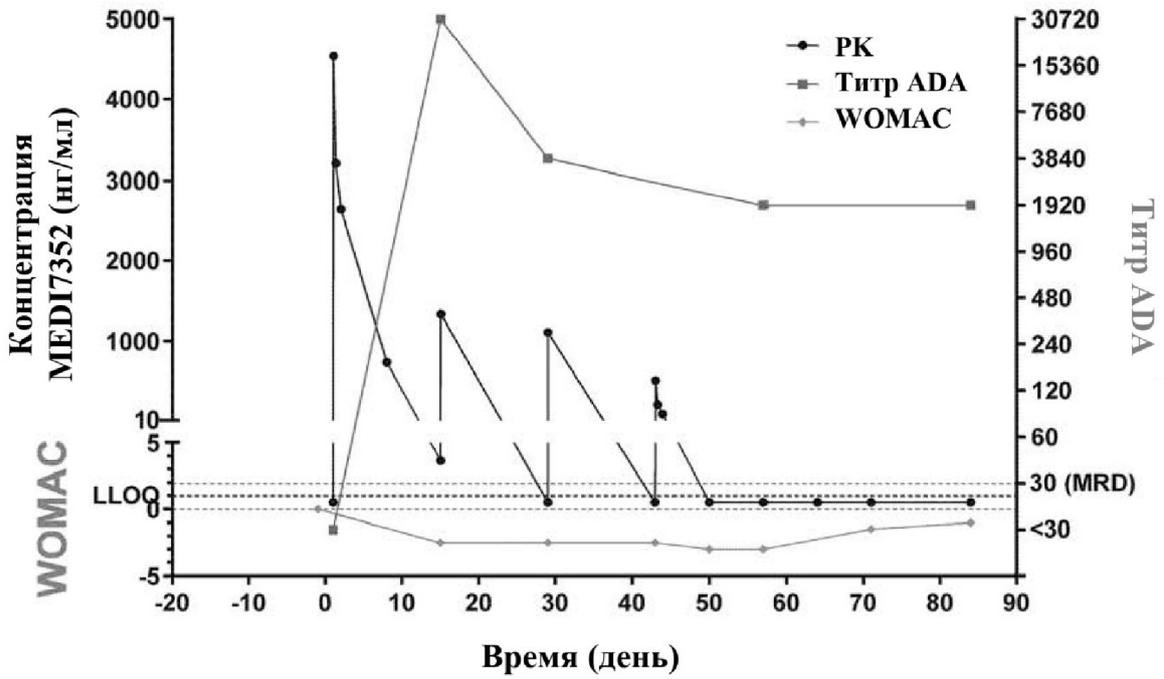
- ✱ Различие с оксикодоном, 40 мг
- ✱ Различие с танезумабом, 2,5 мг
- ✱ Различие с танезумабом, 5,0 мг
- ✱ Различие с плацебо

ФИГ. 28В

ФИГ. 28С

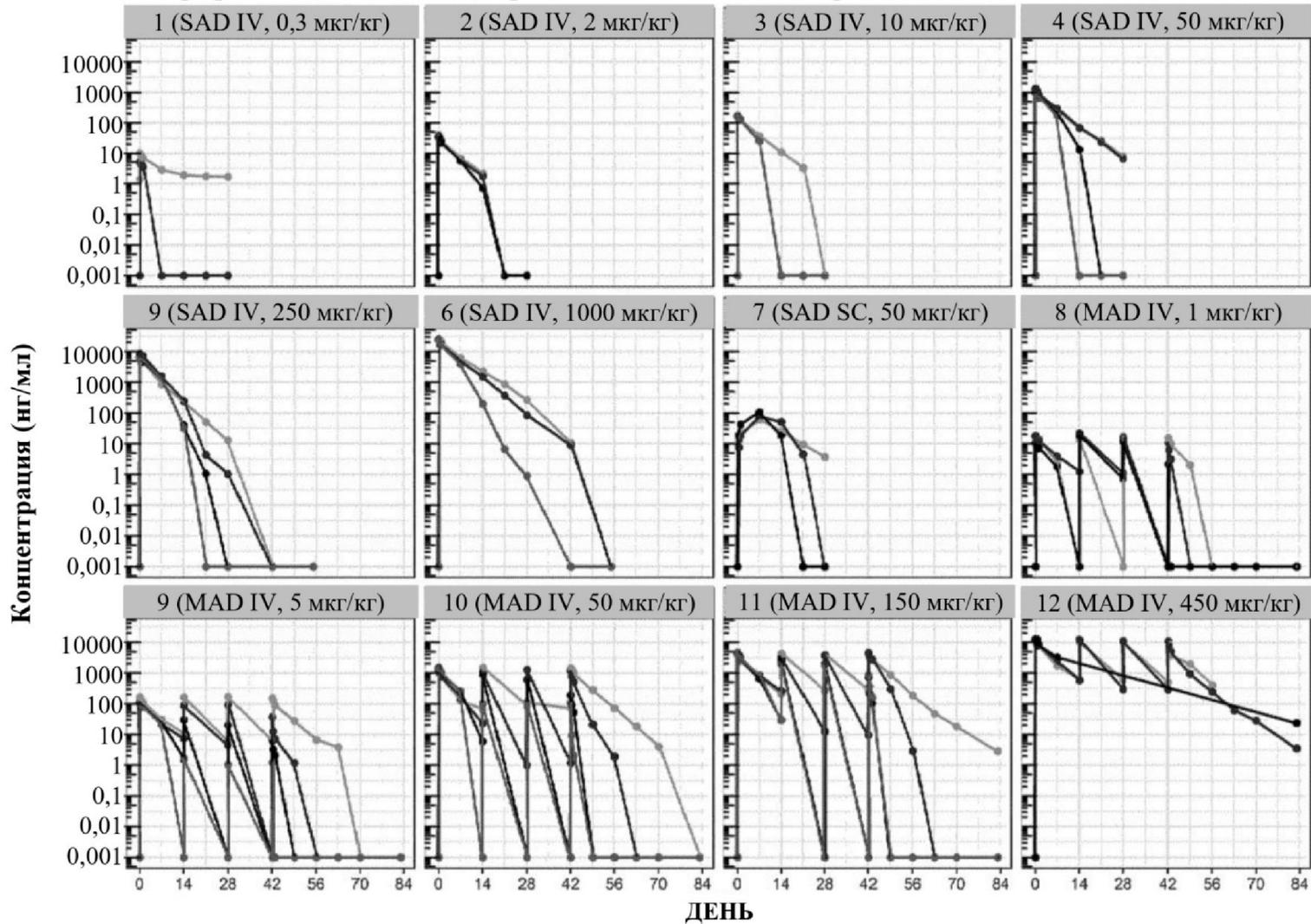


ФИГ. 29



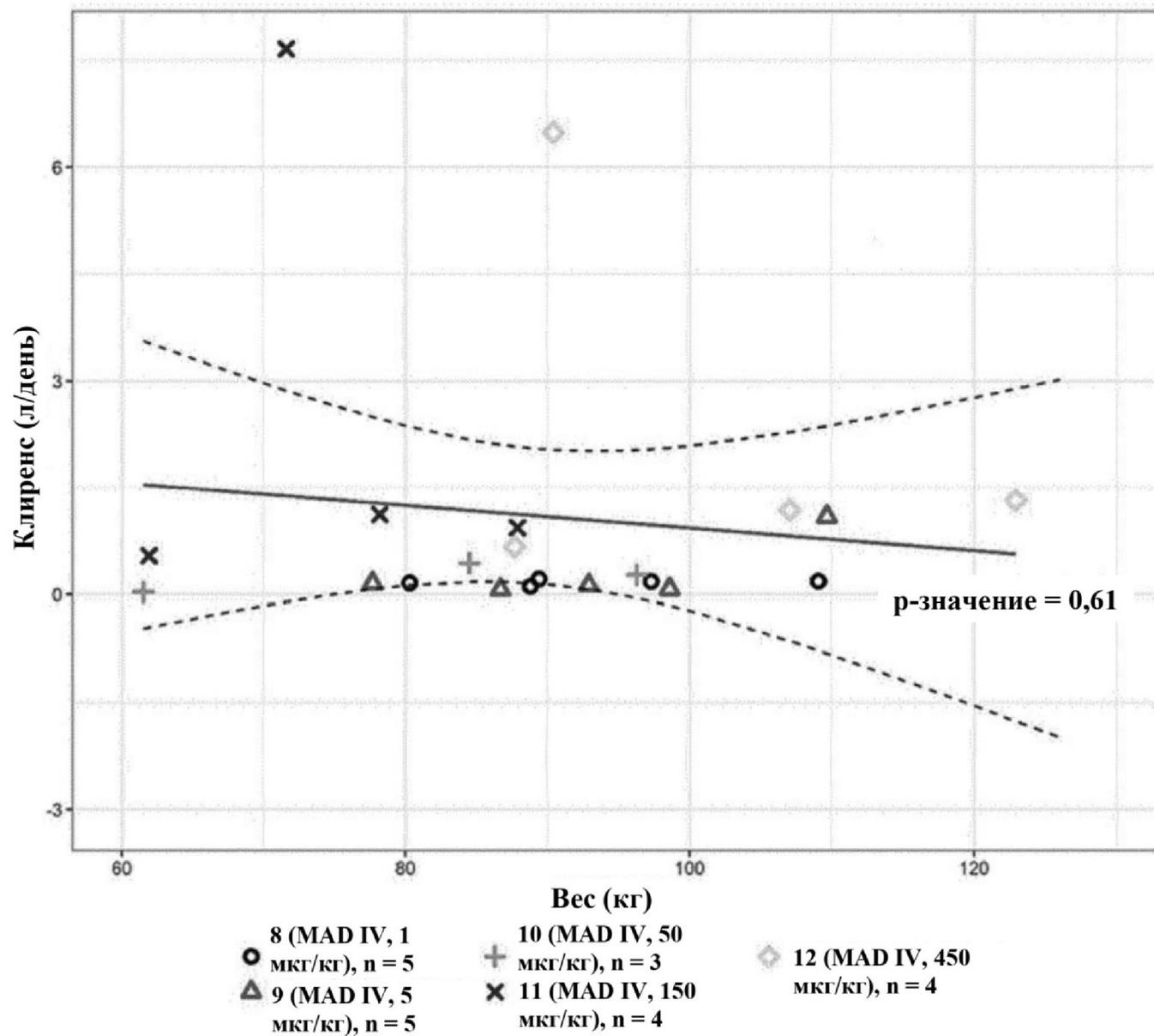
Титр ADA: отрицательный < 30; медианный = 1920;
Q3 = 7680

ПК-профиль медианных концентраций в зависимости от титра ADA

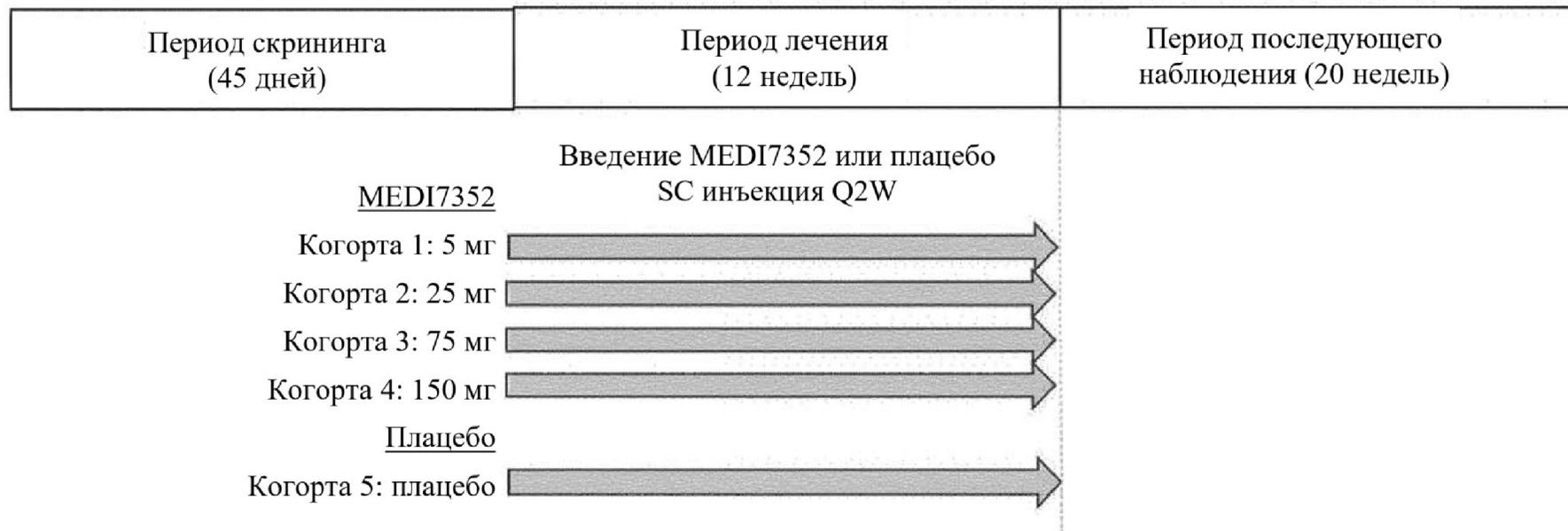


ФИГ. 30

ADA отсутствуют (титр < 30)
 Низкий (30 ≤ титр < 1000)
 Средний (1000 ≤ титр < 10000)
 Высокий (титр ≥ 10000)



ФИГ. 31



ФИГ. 32