

NUEVO FRAGMENTO FAB ANTI-NGF HUMANO

CAMPO TÉCNICO [0001]

La presente invención se relaciona con un nuevo fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano. La presente invención también se relaciona con un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica el fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano, con un vector de expresión que incluye el polinucleótido, con una célula huésped que ha sido transformada con el vector de expresión y con un método para preparar el fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano. La presente invención también está relacionada con una composición farmacéutica que comprende el fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano y con un método para tratar el dolor postoperatorio en el que se usa el fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION [0002]

El factor de crecimiento nervioso (NGF) es uno de los factores humorales que generalmente son conocidos como “factores neurotróficos”, y tiene una participación en la generación y la diferenciación de las neuronas y en el mantenimiento de las funciones de las neuronas en el cuerpo. Como receptores de NGF, se conoce el receptor trkA (la quinasa receptora de la tropomiosina A), que presenta una afinidad alta, y el receptor p75NTR (el receptor de la neurotrofina p75), que presenta una afinidad baja. En este contexto, se ha informado que p75NTR puede unirse a todos los factores neurotróficos y que participa en la apoptosis que tiene lugar en el proceso de generación de las neuronas. Sin embargo, la participación de p75NTR todavía no ha podido ser explicada en una medida suficiente. Por otra parte, se sabe

que los ratones que han sido sometidos a un knockout en los genes que codifican el NGF y el receptor trkA presentan un fenotipo idéntico (Documento no patente 1), y se considera que la acción fisiológica del NGF está mediada principalmente por el receptor trkA. [0003]

Se ha informado de que la administración del NGF induce dolor en las ratas (Documento no patente 2), y que una administración intravenosa del NGF en un ser humano podría inducir un dolor muscular sistémico, mientras que una aplicación local del NGF podría inducir una hiperalgesia y una alodinia locales (Documento no patente 3). Se sabe que la cantidad del NGF que se expresa en los animales se incrementa cuando los tejidos son lesionados como resultado de una incisión en los músculos (Documento no patente 4) o en la piel (Documento no patente 5), lo cual puede verificarse en un modelo del dolor postoperatorio basado en ratas. Con relación a la condición patológica del dolor en los seres humanos, se ha comprobado que la expresión del NGF y del trkA se acelera en los cartílagos de las articulaciones afectadas por la osteoartritis (OA) (Documento no patente 6), que el nivel del NGF se incrementa en los exudados que se producen en los sitios en los que se han efectuado incisiones en el contexto de una operación de cesárea (Documento no patente 7) y que el nivel del NGF es mayor en los pacientes que padecen una artritis reumática (Documento no patente 8) o una cistitis intersticial (Documento no patente 9). [0004]

Hasta la fecha, sobre la base de los estudios que se han realizado con diversos modelos del dolor basados en animales, se ha establecido que el dolor se suprime cuando se inhibe la señal del NGF (Documento no patente 10, Documentos de patente 1 a 3). [0005]

Como anticuerpos anti-NGF humanos, hasta la fecha se han descrito los siguientes: REGN475 (Documento de patente 2), 1-15(N52D-A)-Fab'-PEG (Documento de patente 3), Fulranumab (Documento de patente 4) y MEDI-578 (Patente Documento 5), que toman la forma de anticuerpos anti-NGF humano completamente humanos, así como el Tanezumab (Documento de patente 6) y PG110 (Documento de patente 7), que es un anticuerpo anti-NGF humano humanizado. En este contexto, se ha informado que tanto la administración subcutánea del Tanezumab como su administración intravenosa provocan un efecto analgésico amplio sobre el dolor asociado a la artralgia, sobre el dolor asociado a la osteoartritis, sobre el dolor de espalda crónico y sobre la cistalgia asociada a la cistitis intersticial (Documentos de no patente 11 a 13) en un entorno clínico. [0006]

Se sabe que diversos medicamentos presentan efectos secundarios, y los anticuerpos anti-NGF no son una excepción. Se han informado diversas incidencias perjudiciales ocasionadas por la administración de anticuerpos anti-NGF humano, por ejemplo, dolores de cabeza, infecciones en la porción superior del tracto respiratorio y parestesia en el contexto de un examen clínico con tanezumab (Documento no patente 11), alteraciones en la percepción, dolores de cabeza y rinofaringitis en el contexto de un examen clínico con fulranumab (Documento no patente 14) y artralgia, hiperestesia, dolor muscular, edema periférico y artrocele en el contexto de un examen clínico con REGN475 (Documento no patente 15). [0007]

En términos generales, cuando un medicamento es expuesto a tejidos diferentes de los que se desea someter al tratamiento, pueden producirse efectos secundarios indeseables para el cuerpo humano. [0008]

Para solucionar este problema, se han desarrollado diversos agentes farmacéuticos que pueden administrarse de manera local y que pueden resultar útiles para prevenir o disminuir los efectos secundarios, tanto como resultado de un incremento en la concentración en el tejido en el que se efectúa la administración como a partir de una disminución en la exposición que pudiera producirse en otros tejidos desde la circulación sanguínea sistémica, como consecuencia de una administración directa en el tejido blanco. [0009]

Hay numerosos anticuerpos terapéuticos que pueden ser administrados por vía subcutánea o intramuscular, además de los que pueden ser administrados por vía endovascular, es decir, en las venas, entre otras posibilidades. Después de llevar a cabo una administración subcutánea o intramuscular, los anticuerpos son transportados inmediatamente hasta la sangre a través del sistema linfático, desde donde pueden circular por todo el cuerpo. Una vez que son transportados hasta la sangre, numerosos anticuerpos terapéuticos se distribuyen en el flujo de sangre, de manera tal que pueden ser transportados al tejido blanco, donde pueden ejercer su efecto farmacológico. Por otro lado, numerosos anticuerpos terapéuticos se distribuyen de manera sustancial en la sangre y presentan una actividad de transferencia baja desde la sangre hasta el tejido blanco (una proporción baja entre la concentración en el tejido y la concentración en la sangre). Por lo tanto, en el caso de estos anticuerpos terapéuticos, es necesario mantener una concentración elevada en la sangre para poder mantener la concentración deseada en el tejido blanco (Documento no patente 16). Más aun, numerosos anticuerpos terapéuticos presentan una vida media en la sangre que se encuentra en el rango de entre unos pocos días y aproximadamente un mes,

aunque también cabe la posibilidad de que permanezcan en la circulación sanguínea durante un período de tiempo más prolongado para que se conserve su efecto farmacológico. Por lo tanto, incluso si un anticuerpo terapéutico convencional es administrado en un sitio específico, por ejemplo, como resultado de una aplicación subcutánea o intramuscular, es posible que presente un efecto farmacológico o un efecto secundario sistémico al permanecer en la sangre, desde donde puede distribuirse en todo el cuerpo. [0010]

La multimerización, que abarca la dimerización, se convierte en un problema grave cuando se intenta garantizar una calidad estable y uniforme en el área de los productos biológicos, tales como los anticuerpos terapéuticos. [0011]

Se sabe que los fragmentos $F(ab')_2$, que son dímeros de fragmentos Fab' , presentan una farmacocinética diferente de la de los fragmentos Fab' (Documentos no patente 17 y 18). [0012]

Se ha informado de que el anticuerpo natural contra los fragmentos $F(ab')_2$, que según se ha indicado, son dímeros de fragmentos Fab' , da como resultado su eliminación (Documento no patente 19). Este tipo de reacción entre el antígeno y el anticuerpo afecta la farmacocinética del agente farmacéutico, de manera tal que el anticuerpo es eliminado más rápidamente, y también está asociada al riesgo de que se produzca una reacción anafilaxia, entre otros inconvenientes. Según puede observarse, el uso de los fragmentos $F(ab')_2$ está asociado a determinados riesgos.

DOCUMENTOS DE LOS ANTECEDENTES TÉCNICOS

Documentos de patente [0013]

Documento de patente 1: WO 2013/183032.

Documento de patente 2: WO 2009/023540.

Documento de patente 3: WO 2013/022083.

Documento de patente 4: WO 2005/019266.

Documento de patente 5: WO 2006/077441.

Documento de patente 6: WO 2004/058184.

Documento de patente 7: Patente de los EEUU N° 8435523.

Documentos no patente [0014]

Documento no patente 1: "Reviews in the Neurosciences", 1997, vol. 8, p. 13-27.

Documento no patente 2: "The Journal of Neuroscience", 1993, vol. 13, p. 2136-2148.

Documento no patente 3: "Annals of Neurology", 1994, vol. 36, p. 244-246.

Documento no patente 4: "Anesthesiology", 2009, vol. 110, p. 140-149.

Documento no patente 5: "Pain", 2005, vol. 117, p. 68-76.

Documento no patente 6: "Rheumatology", 2002, vol. 41, p. 1413-1418.

Documento no patente 7: "The Journal of Pain", 2008, vol. 9, p. 650-657.

Documento no patente 8: "Clinical and Experimental Rheumatology", 1997, vol. 15, p. 433-438.

Documento no patente 9: "British Journal of Urology", 1997, vol. 79, p. 572-577.

Documento no patente 10: "Trends in Pharmacological Sciences", 2006, vol. 27, p. 85-91.

Documento no patente 11: "The New England Journal of Medicine", 2010, vol. 363, p. 1521-1531.

Documento no patente 12: "The Journal of Urology", 2011, vol. 185, p. 1716-1721.

Documento no patente 13: "Pain", 2011, vol. 152, p. 2248-2258.

Documento no patente 14: "Pain", 2013, vol. 154, p. 1910-1919.

Documento no patente 15: "Pain", 2014, vol. 155, p. 1245-1252.

Documento no patente 16: "Bioanalysis", 2013, vol. 5, p. 2003-2014.

Documento no patente 17: "The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics", 1997, vol. 281, p. 1-8.

Documento no patente 18: "Cancer Research", 1986, vol. 46, p. 3969-3978.

Documento no patente 19: "European Journal of Immunology", 1995, vol. 25, p. 3128-3133.

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

Objetivo de la invención [0015]

El objetivo de la presente invención fue proveer un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano superior, que conservara una actividad de neutralización elevada, que presentara menos efectos secundarios como resultado de una exposición sistémica y que pudiera ejercer un efecto farmacológico local.

Medios para cumplir con el objetivo [0016]

En la presente invención se proveen los productos y los métodos que se detallan a continuación, que resultan útiles en las áreas de la medicina y de la industria. [0017]

En otras palabras, una forma de realización de la presente invención puede ser como la que se describe a continuación.

(1) Un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano que se selecciona de un grupo que consiste en los componentes (a) y (b) que se detallan a continuación:

(a) un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano que comprende un fragmento de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se representa en SEQ ID N° 5 y una cadena liviana que consiste en la secuencia de aminoácidos que se representa en SEQ ID N° 8; y

(b) un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano que se obtiene al someter un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de acuerdo con el componente (a) a una modificación posterior a la traducción.

(2) El fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de acuerdo con el artículo (1), que comprende un fragmento de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se representa en SEQ ID N° 5 y una cadena liviana que consiste en la secuencia de aminoácidos que se representa en SEQ ID N° 8.

(3) El fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de acuerdo con el artículo (1), donde la modificación posterior a la traducción es una piroglutamilación en el extremo N de una región variable de cadena pesada.

(4) El fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de acuerdo con el artículo (1), que comprende un fragmento de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se representa en SEQ ID N° 5, donde el residuo de glutamina que se encuentra en la posición que corresponde al aminoácido 1 de SEQ ID N° 5 ha sido modificado para obtener un ácido

piroglutámico, y una cadena liviana que consiste en la secuencia de aminoácidos que se representa en SEQ ID N° 8.

(5) Un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica un fragmento de la cadena pesada de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de acuerdo con el artículo (1).

(6) Un vector de expresión que se selecciona de un grupo que consiste en los componentes (a) y (b) que se detallan a continuación:

(a) un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica un fragmento de la cadena pesada de un anticuerpo anti-NGF humano Fab fragmento de acuerdo con el artículo (1) y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una cadena liviana de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano como el que se ha descrito; y

(b) un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica un fragmento de la cadena pesada de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de acuerdo con el artículo (1).

(7) Una célula huésped que ha sido transformada con un vector de expresión de acuerdo con el artículo (6).

(8) La célula huésped de acuerdo con el artículo (7), que se selecciona de un grupo que consiste en los componentes (a) y (b) que se detallan a continuación:

(a) una célula huésped que ha sido transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica un fragmento de la cadena pesada de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de acuerdo con el artículo (1) y un

polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una cadena liviana de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano como el que se ha descrito; y

(b) una célula huésped que ha sido transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica un fragmento de la cadena pesada de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de acuerdo con el artículo (1) y con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una cadena liviana de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano como el que se ha descrito.

(9) Un método para producir un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano, que comprende cultivar una célula huésped de acuerdo con el artículo (8) bajo condiciones apropiadas para que se exprese el fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano.

(10) Un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano que puede ser producido con un método de acuerdo con el artículo (9).

(11) Una composición farmacéutica que comprende un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de acuerdo con cualquiera de los artículos (1) a (4) y (10) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

(12) La composición farmacéutica de acuerdo con el artículo (11), que es una composición farmacéutica que puede ser administrada de manera local para tratar el dolor postoperatorio.

(13) Una composición farmacéutica que comprende un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de acuerdo con el artículo (2), un fragmento

de anticuerpo Fab anti-NGF humano de acuerdo con el artículo (4) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

(14) La composición farmacéutica de acuerdo con el artículo (13), que es una composición farmacéutica que puede ser administrada de manera local para tratar el dolor postoperatorio.

(15) El uso de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de acuerdo con cualquiera de los artículos (1) a (4) y (10) en la fabricación de una composición farmacéutica que puede ser administrada de manera local para tratar el dolor postoperatorio.

(16) El uso de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de acuerdo con cualquiera de los artículos (1) a (4) y (10) en el tratamiento del dolor postoperatorio, para lo cual puede administrárselo de manera local.

(17) El fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de acuerdo con cualquiera de los artículos (1) a (4) y (10), que puede ser usado para tratar el dolor postoperatorio, para lo cual puede administrárselo de manera local.

(18) Un método para tratar el dolor postoperatorio, que comprende administrar de manera local una cantidad eficaz de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de acuerdo con cualquiera de los artículos (1) a (4) y (10) en un sujeto.

Efecto ventajoso de la invención [0018]

El fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención resulta eficaz en el contexto del tratamiento del dolor postoperatorio, una condición patológica que se desarrolla bajo la influencia del NGF humano. El fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano que se describe en la presente invención se caracteriza por presentar una farmacocinética superior,

lo cual puede manifestarse, por ejemplo, como una actividad de neutralización elevada, una retención importante en los sitios en los que se lo administra o una eliminación rápida desde la sangre, lo que posibilita su administración en dosis más bajas y tiene como consecuencia un efecto más prolongado y una disminución en la magnitud de los efectos secundarios que pueden producirse como resultado de una exposición sistémica, con lo cual puede esperarse que se mejore no solamente el efecto de la droga, sino también su seguridad en el contexto de una aplicación clínica. El fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención resulta particularmente útil para tratar el dolor postoperatorio mediado por el NGF humano.

Modo para poner en práctica la invención [0019]

La presente invención se describe con mayor detalle más adelante, pero la descripción que se provee no ha de ser interpretada como una limitación para el alcance de la invención. A menos que se indique lo contrario en la presente, los términos científicos y los términos técnicos que se emplean en el contexto de la invención tienen el significado que suelen darles aquellos versados en la técnica. [0020]

Los presentes inventores llevaron a cabo estudios extensos para determinar modalidades apropiadas para preparar anticuerpos anti-NGF humano o fragmentos de éstos que pudieran unirse al mismo antígeno, y de esta manera pudieron desarrollar un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano superior, que conserva una actividad de neutralización elevada, que puede ejercer un efecto farmacológico local y que presenta menos efectos secundarios como resultado de una exposición sistémica. [0021]

La estructura básica de una molécula que constituye un anticuerpo es común entre todas las clases de anticuerpos, y está compuesta por cadenas pesadas que tienen un peso molecular de entre 50000 y 70000 y cadenas livianas que tienen un peso molecular de entre 20000 y 30000. La cadena pesada generalmente está compuesta por un polipéptido que constituye una cadena que comprende aproximadamente 440 aminoácidos, y cada clase presenta una estructura característica en este aspecto. Las cadenas pesadas se denominan γ , μ , α , δ y ϵ , y pueden corresponder a la IgG, a la IgM, a la IgA, a la IgD o a la IgE. En este contexto, la IgG abarca diversas subclases, tales como la IgG1, la IgG2, la IgG3 o la IgG4, y las cadenas correspondientes se denominan γ_1 , γ_2 , γ_3 y γ_4 , respectivamente. La cadena liviana generalmente está compuesta por un polipéptido que constituye una cadena que comprende aproximadamente 220 aminoácidos, y puede pertenecer a uno de dos tipos posibles conocidos, es decir, el tipo L y el tipo K, donde las cadenas correspondientes son conocidas como la cadena λ y la cadena κ , respectivamente. Con relación a la estructura básica que presenta una molécula peptídica que toma la forma de un anticuerpo, hay dos cadenas pesadas homólogas y dos cadenas livianas homólogas que están unidas a través de enlaces disulfuro (enlaces S-S) y a través de enlaces no covalentes, y el peso molecular final es de entre 150000 y 190000. Las cadenas livianas de los dos tipos que se han descrito pueden ser combinadas con cadenas pesadas de cualquier tipo. Una molécula que constituye un anticuerpo siempre comprende dos cadenas livianas idénticas y dos cadenas pesadas idénticas.

[0022]

Hay cuatro enlaces S-S en la estructura de cada una de las cadenas pesadas (con la excepción de las cadenas μ y ϵ , que comprenden cinco enlaces) y dos en la estructura de cada una de las cadenas livianas. Hay rizados que están formados por entre 100 y 110 residuos de aminoácidos, que presentan una estructura estérica similar y que en conjunto constituyen una unidad estructural o un dominio. La secuencia que presenta el dominio que se halla hacia el extremo N de las cadenas pesadas y livianas no suele ser constante, incluso dentro de una misma clase (o dentro de una misma subclase) en animales de la misma especie, por lo cual a este dominio se lo conoce como la región variable. Más precisamente, a estos dominios se los conoce como la región variable de la cadena pesada (VH) y la región variable de la cadena liviana (VL). Debido a que la secuencia de aminoácidos que se encuentra hacia el extremo C de cualquier región variable tiende a ser constante dentro de las clases o dentro de las subclases, esta región es conocida como la región constante, y a los dominios correspondientes se les da la designación de CH1, CH2, CH3 y CL. [0023]

El sitio en el que está determinada la especificidad por el antígeno de un anticuerpo está compuesto por la VH y la VL, y el grado de especificidad de la unión depende de la secuencia de aminoácidos. Por otra parte, la actividad biológica, por ejemplo, la unión a una variedad de complementos o de células, refleja las diferencias que hay en la estructura de la región constante entre las inmunoglobulinas de las diversas clases. Se sabe que la variabilidad en las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena liviana se encuentra limitada principalmente a tres regiones hipervariables pequeñas que están presentes en ambas cadenas, y estas regiones se conocen como las regiones

de determinación de la complementariedad (CDR, que desde el extremo N, se conocen como la CDR1, la CDR2 y la CDR3). La porción restante de la región variable se conoce como la región del marco (FR) y tiende a ser relativamente constante. [0024]

La porción que se halla entre el dominio CH1 y el dominio CH2 de la región constante de la cadena pesada de un anticuerpo conoce como la región de la bisagra. Esta región abarca numerosos residuos de prolina y comprende una pluralidad de enlaces S-S que conectan las dos cadenas pesadas. A modo de ejemplo, las regiones que hacen las veces de bisagra en la IgG1, la IgG2, la IgG3 y la IgG4 humanas comprenden 2, 4, 11 y 2 residuos de cisteína, respectivamente, con los cuales pueden constituirse los enlaces S-S entre las cadenas pesadas. La región de la bisagra es una región altamente sensible a enzimas proteolíticas como la papaína o la pepsina. Cuando un anticuerpo es sometido a una digestión con papaína, su cadena pesada se escinde en una posición más cercana al extremo N del sitio en el que se encuentra el enlace SS entre las cadenas pesadas, con lo cual se obtienen dos fragmentos Fab y un fragmento Fc. El fragmento Fab está constituido por una cadena liviana y un fragmento de la cadena pesada, que comprende una región variable de la cadena pesada (VH), un dominio CH1 y una parte de la región de la bisagra. Cuando un anticuerpo es digerido con pepsina, su cadena pesada se escinde en una posición más cercana al extremo C del sitio en el que se encuentra el enlace SS entre las cadenas pesadas, con lo cual se obtiene un fragmento $F(ab')_2$. Un fragmento $F(ab')_2$ es un fragmento que presenta una estructura dimérica, en la cual hay dos fragmentos Fab' unidos en sus cadenas pesadas, como resultado de la presencia de enlaces S-S en la región de la bisagra. A su

vez, los fragmentos Fab' están compuestos por una cadena liviana y un fragmento de la cadena pesada, que comprende una región de variable de la cadena pesada (VH), un dominio CH1 y una parte de la región de la bisagra. Los residuos de cisteína con los cuales se constituyen los enlaces S-S entre las cadenas pesadas están presentes en la porción que corresponde a la región de la bisagra. Todos los fragmentos Fab, $F(ab')_2$ y Fab' comprenden una región variable y pueden unirse a los antígenos. [0025]

El fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención, que pudo ser obtenido con éxito por los presentes inventores, toma la forma de un fragmento Fab que presenta las características que se detallarán a continuación. Se trata de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano que comprende un fragmento de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se representa en SEQ ID N° 5 y una cadena liviana que consiste en la secuencia de aminoácidos que se representa en SEQ ID N° 8. [0026]

Específicamente, los presentes inventores modificaron el anticuerpo anti-NGF humano completamente humano 1-15 (N52D-A)-Fab' (Documento de patente 3, donde también se lo conoce como "1-15 (N52D-A)-Fab"), y sobre la base del resultado que obtuvieron en diversos estudios de la actividad biológica y de las propiedades físicas, pudieron determinar que el fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención es un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano estable, que presenta una actividad de neutralización elevada y que puede ejercer su efecto de manera local. [0027]

El fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención puede ser preparado fácilmente por aquellos versados en la técnica

sobre la base de la información de secuencia que se provee en la presente y de acuerdo con métodos conocidos de uso habitual. A modo de ejemplo, el fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención puede producirse mediante la síntesis de un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica un fragmento de una cadena pesada y de un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una cadena liviana, los cuales pueden ser introducidos posteriormente en vectores de expresión convenientes. Posteriormente, estos vectores de expresión han de ser introducidos en las células en un cultivo. Finalmente, cuando las células en el cultivo se hayan desarrollado, aquellos versados en la técnica podrán obtener fragmentos Fab monoclonales a partir del sobrenadante del cultivo. [0028]

El polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica el fragmento de la cadena pesada del fragmento Fab de la presente invención y el polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica la cadena liviana del fragmento Fab de la presente invención puede ser sintetizado, por ejemplo, sobre la base de una secuencia de bases que ha sido diseñada de acuerdo con las secuencias de aminoácidos del fragmento de la cadena pesada y de la cadena liviana, mediante el uso de métodos para sintetizar genes que han de resultar conocidos para aquellos versados en la técnica. A modo de ejemplo, se describe un método apropiado para sintetizar genes que codifican anticuerpos en WO 90/07861, aunque aquellos versados en la técnica también han de poder recurrir a otros métodos de uso habitual en este contexto. [0029]

En una forma de realización, como un ejemplo de un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica un fragmento de la cadena pesada de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano que consiste en la secuencia de aminoácidos que se representa en SEQ ID N° 5, puede usarse un polinucleótido que comprende una secuencia de bases como la que se detalla en SEQ ID N° 1. Como un ejemplo de un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena liviana de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano que consiste en la secuencia de aminoácidos que se representa en SEQ ID N° 8, puede usarse un polinucleótido que comprende una secuencia de bases como la que se detalla en SEQ ID N° 4. [0030]

Los procesos posteriores a la preparación del polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica el fragmento de la cadena pesada del fragmento Fab de la presente invención y el polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica la cadena liviana del fragmento Fab de la presente invención, tales como la introducción del polinucleótido en un vector de expresión, la introducción del vector de expresión en una célula en un cultivo, la incubación de la célula en el cultivo y la purificación del fragmento Fab, pueden ponerse en práctica de acuerdo con una variedad de protocolos que han de resultar conocidos para aquellos versados en la técnica. [0031]

Los vectores de expresión que pueden usarse abarcan, por ejemplo, los vectores GS pEE6.4 y pEE12.4 (de Lonza), pero ha de comprenderse que no hay limitaciones particulares en este aspecto, con la condición de que el vector sea útil para expresar el polinucleótido que comprenda la secuencia de bases que codifique el fragmento de la cadena pesada del fragmento Fab de la

presente invención y/o el polinucleótido que comprenda la secuencia de bases que codifique la cadena liviana del fragmento Fab de la presente invención, y que como consecuencia, posibilite la producción de los polipéptidos codificados. [0032]

Los vectores de expresión que se han descrito pueden ser introducidos en las células en los cultivos con métodos como la transfección con fosfato de calcio o la electroporación. [0033]

Las células en cultivos en las que pueden introducirse los vectores de expresión pueden ser, por ejemplo, células CHO-K1SV, células CHO-DG44 o las células 293, y la incubación puede llevarse a cabo de acuerdo con un abordaje habitual. [0034]

Una vez finalizado el cultivo, los fragmentos Fab que se hayan acumulado en el sobrenadante podrán ser purificados de acuerdo con diversos métodos basados en cromatografías en columnas, por ejemplo, con el conjunto de elementos KappaSelect. [0035]

Un ejemplo de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención es el anticuerpo h1f.6 que se describe en la sección de ejemplos más adelante. [0036]

Cuando un anticuerpo se expresa en las células, se sabe que ha de ser sometido a diversas modificaciones posteriores a la traducción. Los ejemplos de las modificaciones que pueden tener lugar después a la traducción abarcan la escisión de la lisina que se encuentra en el extremo C de la cadena pesada por parte de una carboxipeptidasa y el cambio de un residuo de glutamina o de ácido glutámico en el extremo N de la cadena pesada o de la cadena liviana por un residuo de ácido piroglutámico por medio de una reacción de

piroglutamilación, de glucosilación, de oxidación, de desamidación o de glucación, entre otras posibilidades. En la técnica se sabe que, como resultado de estas modificaciones posteriores a la traducción, pueden producirse diversos anticuerpos (J. Pharm. Sci., 2008, vol. 97, p. 2426-2447). [0037]

Un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención puede tomar la forma de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano que ha sido obtenido como resultado de diversas modificaciones posteriores a la traducción. Un ejemplo de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano que puede obtenerse como resultado de diversas modificaciones posteriores a la traducción puede ser un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano que ha sido sometido a una reacción de piroglutamilación en el extremo N de la región variable de la cadena pesada. En la técnica se sabe que las modificaciones posteriores a la traducción que están basadas en la puesta en práctica de una reacción de piroglutamilación en el extremo N no afectan la actividad de los anticuerpos (Anal. Biochem., 2006, vol. 348, p. 24-39). [0038]

A modo de ejemplo, el fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención puede tomar la forma de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano como el que se describe a continuación.

En particular, puede tratarse de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano que comprende un fragmento de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se representa en SEQ ID N° 5, donde el residuo de glutamina que se encuentra en la posición que corresponde al aminoácido 1 de SEQ ID N° 5 ha sido modificado para obtener un ácido

piroglutámico, y una cadena liviana que consiste en la secuencia de aminoácidos que se representa en SEQ ID N° 8. [0039]

El fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención puede unirse al NGF humano. La actividad de unión del fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano obtenido al NGF humano puede determinarse por medio de un abordaje basado en un ELISA o una FACS, entre otras posibilidades. A modo de ejemplo, si se desea recurrir a un ELISA, el NGF humano puede inmovilizarse en la placa en la que ha de llevarse a cabo el estudio, para luego agregar el fragmento Fab, seguido por un anticuerpo secundario apropiado, que puede tomar la forma de un anticuerpo anti-kappa marcado con biotina, entre otras posibilidades, y una estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina. En este contexto, la actividad se determina mediante el uso de un reactivo apropiado para tal fin, es decir, para comprobar la unión al anticuerpo secundario (que por ejemplo, puede tomar la forma de un sustrato quimioluminiscente útil para detectar la fosfatasa marcada usada en las marcas). Por otra parte, cabe la posibilidad de que el fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención se una a otro NGF de origen animal (por ejemplo, el NGF del ratón), además del NGF humano, y la actividad de unión a estas otras proteínas también puede ser determinada como se describió con anterioridad. [0040]

El fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención presenta actividad de neutralización sobre el NGF humano. Tal como se lo emplea en la presente, el término “actividad de neutralización”, aplicado a un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano, hace referencia a una actividad que tiene como consecuencia la inhibición de cualquier actividad

biológica inducida por el NGF humano, lo cual se produce como resultado de la unión al NGF humano, y esta actividad puede ser evaluada usando como indicadores una o más de las actividades biológicas que suele presentar el NGF humano. La actividad de neutralización puede manifestarse, por ejemplo, como la capacidad de inhibir la unión entre el NGF humano y su receptor TrkA humano, en cuyo caso puede ser evaluada con métodos como los que se describen en la sección de ejemplos más adelante. [0041]

Con el fin de evaluar el efecto del fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención con mayor detalle, también es posible llevar a cabo un estudio in vivo. A modo de ejemplo, de acuerdo con un protocolo como el que se describe en la sección de ejemplos más adelante, puede ponerse en práctica un estudio del efecto analgésico con un modelo del dolor postoperatorio basado en ratas, donde el dolor puede provocarse como resultado de una incisión en la planta de las patas y donde este modelo puede resultar útil para determinar el efecto de la droga, es decir, el fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano, in vivo. Para confirmar la actividad farmacológica de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano en un tejido, también puede ponerse en práctica un estudio basado en el análisis de la actividad de unión al NGF o un estudio basado en el análisis de la actividad de inhibición de la unión entre el NGF y su receptor trkA, para lo cual puede emplearse una muestra de tejido homogenizado obtenida después de administrar de manera local un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano en el músculo femoral de diversas ratas. Por otra parte, también es posible realizar un estudio para evaluar la concentración del fragmento Fab en el plasma o en otros tejidos, con el objeto de determinar el nivel de retención del

fragmento Fab, es decir, su exposición local, así como la disminución en la exposición sistémica desde la sangre. [0042]

Otros ejemplos de los métodos que pueden usarse en este contexto abarcan los métodos que son útiles para evaluar la estabilidad del fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención (por ejemplo, la estabilidad térmica, la estabilidad durante un período de almacenamiento prolongado o la estabilidad en una concentración elevada), como podría ser el caso de los métodos que son útiles para determinar la agregación durante el almacenamiento, sobre la base de una cromatografía de exclusión en función del tamaño. [0043]

Una vez purificado, el fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención puede ser formulado con un método de uso habitual para usarlo en el tratamiento del dolor postoperatorio. [0044]

El término “dolor postoperatorio” hace referencia al dolor que es provocado por las lesiones traumáticas o que se origina como consecuencia de ellas, donde una lesión traumática puede tomar la forma de una lesión provocada por un corte, por un pinchazo, por una incisión o por una laceración en un tejido de un individuo, entre otras posibilidades (lo cual abarca todas las lesiones que pueden ser provocadas por un tratamiento quirúrgico invasivo o no invasivo). El término “dolor postoperatorio”, tal como se lo emplea en la presente, no abarca el dolor que se produce en ausencia de lesiones físicas asociadas a causas externas (es decir, el dolor que no es causado por una lesión o que no se produce como resultado de una lesión). El dolor postoperatorio puede tomar la forma de un dolor interno o externo (lo que puede abarcar un dolor periférico), y cabe la posibilidad de que la lesión, que

según se ha indicado, puede tomar la forma de una lesión provocada por un corte, por un pinchazo, por una incisión o por una laceración, entre otros factores, haya sido provocada por accidente (en caso de una lesión externa) o de manera deliberada (en caso de lesión provocada en el transcurso de una operación). El dolor puede ser evaluado de manera objetiva o subjetiva, mediante el uso de una escala apropiada o de acuerdo con otros abordajes que han de resultar conocidos para aquellos versados en la técnica. Más aun, el término “dolor postoperatorio”, tal como se lo emplea en la presente, puede abarcar la alodinia (que en general hace referencia a un incremento en la magnitud de la respuesta ante un estímulo no nocivo) y la hiperpatía (que en general hace referencia a un incremento en la magnitud de la respuesta ante un estímulo nocivo o desagradable), donde los estímulos causantes pueden ser de naturaleza térmica o mecánica. En este contexto, los dolores pueden tomar la forma de dolores que se potencian con el calor, de dolores que se potencian con determinados estímulos o de dolores mecánicos que se manifiestan en un estado de reposo. De esta manera, el dolor postoperatorio también puede abarcar el dolor que es inducido por diversos estímulos mecánicos y el dolor que se experimenta en reposo. [0045]

Según se ha indicado, el fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención puede ser usado como un agente terapéutico para tratar el dolor postoperatorio. Los ejemplos de las formulaciones que pueden usarse para administrar los agentes terapéuticos de este tipo abarcan los agentes que se administran por vía parenteral, tales como las formas inyectables, las gotas o las formas a partir de las cuales pueden producirse depósitos, y en este contexto, para llevar a cabo una administración de manera

local en un tejido determinado, puede recurrirse a una inyección intramuscular o hipodérmica. Con relación a la elaboración de las formulaciones farmacéuticas, puede resultar deseable usar vehículos o aditivos apropiados para conferir propiedades determinadas, los cuales siempre han de ser farmacéuticamente aceptables. [0046]

La cantidad del fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención que se coloca en una formulación farmacéutica como las que se han descrito depende de la magnitud de los síntomas, de la edad del paciente, de la forma de la formulación farmacéutica que se desea emplear y de la valencia del anticuerpo, aunque en general se aplica una cantidad aproximada de entre 0,001 mg/kg y 100 mg/kg. [0047]

La presente invención también está relacionada con una composición farmacéutica que comprende un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención. La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender vehículos o aditivos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos y los aditivos farmacéuticamente aceptables no se encuentran particularmente limitados, y en la práctica de la presente invención han de poder usarse diversos vehículos y aditivos que han de resultar conocidos para aquellos versados en la técnica. La presente invención también está relacionada con un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano que es como los que se describen en la presente, que puede ser usado en el tratamiento del dolor postoperatorio, y con el uso de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano como los que se describen en la presente en la fabricación de una composición farmacéutica que puede resultar útil para tratar el dolor postoperatorio. La presente invención también está relacionada

con un método útil para tratar el dolor postoperatorio, que comprende administrar de manera local una cantidad eficaz de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención en un sujeto. En este contexto, vale aclarar que el término “sujeto” puede ser interpretado como una referencia a un ser humano o a un mamífero de otro tipo que debe ser sometido al tratamiento en cuestión, y en una forma de realización, el sujeto que debe ser sometido al tratamiento es un ser humano. La cantidad eficaz del fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano que se usa en el método de tratamiento de la presente invención puede ser una cantidad similar a la cantidad del fragmento Fab que se aplica cuando se produce una formulación farmacéutica como las que se describieron con anterioridad. Por otro lado, el término “local”, usado en el contexto de la administración de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, hace referencia a una administración que se efectúa en el sitio en el que se desea aplicar el tratamiento o en sitios adyacentes a él, donde el tejido en cuestión puede ser conocido como el tejido blanco, y puede ser un tejido en el que se lleva a cabo un procedimiento quirúrgico o la zona adyacente a él. A modo de ejemplo, en el contexto de la presente invención, cabe la posibilidad de administrar una composición farmacéutica por medio de una inyección intramuscular o hipodérmica, de manera tal de alcanzar el tejido blanco, que se define según se indicó con anterioridad. Una forma de realización puede abarcar la administración de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención de manera tal que sea retenido en el tejido blanco durante un período de tiempo determinado, preferiblemente durante 72 horas y más preferiblemente durante 24 horas. [0048]

Una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender múltiples tipos de fragmentos de anticuerpos Fab anti-NGF humano de acuerdo con la presente invención. A modo de ejemplo, dentro del alcance de la presente invención ha de quedar incluida una composición farmacéutica que comprende un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano que no ha sido sometido a una modificación posterior a la traducción y un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano que ha sido obtenido como resultado de una modificación posterior a la traducción. [0049]

En una forma de realización, una composición farmacéutica de la presente invención toma la forma de una composición farmacéutica que comprende fragmentos de anticuerpos Fab anti-NGF humano como los que se detallan en los artículos (a) y (b) a continuación.

- (a) un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano que comprende un fragmento de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se representa en SEQ ID N° 5 y una cadena liviana que consiste en la secuencia de aminoácidos que se representa en SEQ ID N° 8; y
- (b) un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano que se obtiene al someter un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de acuerdo con el artículo (a) a una modificación posterior a la traducción. [0050]

En una forma de realización, una composición farmacéutica de la presente invención toma la forma de una composición farmacéutica que comprende fragmentos de anticuerpos Fab anti-NGF humano como los que se detallan en los artículos (a) y (b) a continuación.

- (a) un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano que comprende un fragmento de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos

que se representa en SEQ ID N° 5 y una cadena liviana que consiste en la secuencia de aminoácidos que se representa en SEQ ID N° 8; y

(b) un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano que comprende un fragmento de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se representa en SEQ ID N° 5, donde el residuo de glutamina que se encuentra en la posición que corresponde al aminoácido 1 de SEQ ID N° 5 ha sido modificado para obtener un ácido piroglutámico, y una cadena liviana que consiste en la secuencia de aminoácidos que se representa en SEQ ID N° 8.

[0051]

La presente invención también está relacionada con un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica un fragmento de la cadena pesada del fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena liviana del fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención (los cuales pueden ser conocidos en conjunto de aquí en adelante como “el polinucleótido de la presente invención”), así como un vector de expresión que comprende uno de estos dos polinucleótidos o ambos (que de aquí en adelante puede ser conocido como “el vector de expresión de la presente invención”). [0052]

El vector de expresión de la presente invención no está limitado a un tipo particular, con la condición de que a partir de él pueda expresarse un polinucleótido que comprenda una secuencia de bases que codifique un fragmento de la cadena pesada de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención y/o un polinucleótido que comprenda una secuencia de bases que codifique la cadena liviana de un fragmento de

anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención en diversas células huésped, las cuales podrán ser células procariotas o células eucarióticas, de manera tal de producir los uno o más polipéptidos que estén codificados por los nucleótidos en cuestión. Los ejemplos de los vectores de expresión que pueden usarse en la práctica de la invención abarcan los vectores basados en plásmidos y los vectores basados en virus (por ejemplo, en adenovirus o en retrovirus), tales como los vectores GS pEE6.4 o pEE12.4 (de Lonza). En una forma de realización, el vector de expresión de la presente invención es un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica un fragmento de la cadena pesada de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención. En otra forma de realización, el vector de expresión de la presente invención es un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica un fragmento de la cadena pesada de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención y un polinucleótido que comprende secuencia de bases que codifica la cadena liviana de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano como el que se ha descrito. [0053]

El vector de expresión de la presente invención puede comprender un promotor unido operativamente a un polinucleótido de la presente invención. Los promotores que posibilitan la expresión de un gen que codifica un fragmento Fab de la presente invención, la región variable de su cadena pesada o la región variable de su cadena liviana en una bacteria abarcan el promotor Trp, el promotor lac, el promotor recA, el promotor λ pL, el promotor lpp y el promotor tac cuando el huésped es una bacteria del género

Escherichia. Los promotores que posibilitan la expresión en las levaduras abarcan, por ejemplo, el promotor PH05, el promotor PGK, el promotor GAP o el promotor ADH, y los promotores que posibilitan la expresión en una bacteria del género *Bacillus* abarcan el promotor SL01, el promotor SP02 y el promotor penP. Los promotores que pueden usarse en células huésped eucariotas, tales como las células de los mamíferos, abarcan los promotores derivados del SV40, los promotores derivados de retrovirus y los promotores de las proteínas que participan en el choque térmico. [0054]

Cuando como célula huésped se usa una bacteria, especialmente *E. coli*, el vector de expresión de la presente invención también puede comprender un codón de inicio, un codón de finalización, una región de terminación y una unidad replicable. Cuando como célula huésped se usa una levadura, una célula de un insecto o una célula proveniente de otro animal, el vector de expresión de la presente invención puede comprender un codón de inicio y un codón de finalización. En este caso, el vector también puede comprender una secuencia potenciadora, diversas regiones no traducidas los extremos 5' y 3' del gen que codifica el fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención, una secuencia útil como señal para la secreción, una región apropiada para la escisión, una región de poliadenilación y una unidad replicable, entre otras posibilidades. Más aun, el vector puede comprender un indicador de uso habitual en los procesos de selección (por ejemplo, un gen apropiado para conferir resistencia a la tetraciclina, un gen apropiado para conferir resistencia a la ampicilina, un gen apropiado para conferir resistencia a la kanamicina, un gen apropiado para conferir resistencia

a la neomicina o un gen apropiado para conferir resistencia a la reductasa del ácido dihidrofólico), en función del uso previsto. [0055]

La presente invención también está relacionada con una célula huésped que ha sido transformada con un vector de expresión de la presente invención. Las células huésped que pueden ser sometidas al proceso de transformación no se encuentran limitadas a un tipo particular, con la condición de que puedan alojar un vector de expresión como los que han descrito y que sean idóneas para el proceso de transformación: los ejemplos de las células que pueden usarse como células huésped en la práctica de la presente invención abarcan diversas células de origen natural y diversas células de líneas que han sido generadas de manera artificial, que han de resultar conocidas para aquellos versados en la técnica (a modo de ejemplo, pueden usarse bacterias (tales como las bacterias del género *Escherichia* o las bacterias del género *Bacillus*), levaduras (tales como las levaduras del género *Saccharomyces* o las levaduras del género *Pichia*), células de insectos (tales como las células Sf9) o células provenientes de otros animales (tales como las células CHO-K1SV, las células CHO-DG44 o las células 293), entre otras posibilidades). La transformación propiamente dicha puede ser llevada a cabo de acuerdo con cualquier método conocido. [0056]

Una célula huésped de la presente invención puede seleccionarse de un grupo que consiste en los componentes (a) y (b) que se detallan a continuación:

(a) una célula huésped que ha sido transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica el fragmento de la cadena pesada del fragmento de

anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una cadena liviana de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano como el que se ha descrito; y (b) una célula huésped que ha sido transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica un fragmento de la cadena pesada de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención y con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica una cadena liviana de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano como el que se ha descrito. [0057]

La presente invención también está relacionada con un método para producir un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano, que comprende cultivar una célula huésped de la presente invención bajo condiciones apropiadas para que se exprese el fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano. Preferiblemente, la célula huésped que se emplea en este método se selecciona de un grupo que consiste en los componentes (a) y (b) que se han descrito. [0058]

En el contexto de la producción de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención, la célula huésped transformada puede ser cultivada en un medio nutritivo. El medio nutritivo preferiblemente contiene una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno inorgánico o una fuente de nitrógeno orgánico, las cuales son imprescindibles para el crecimiento de la célula huésped. Los ejemplos de las fuentes de carbono abarcan la glucosa, el dextrano, el almidón soluble y la sacarosa, entre otros; los ejemplos de la fuente de nitrógeno inorgánico o de la fuente de nitrógeno orgánico abarcan las

sales de amonio, los nitratos, los aminoácidos, el licor de maíz fermentado, la peptona, la caseína, el extracto de carne, la torta de soja y el extracto de papa, entre otros. Si se lo desea, pueden incluirse otros nutrientes (como podría ser el caso de diversas sales inorgánicas (tales como el cloruro de calcio, el dihidrógeno fosfato de sodio o el cloruro de magnesio) o diversas vitaminas, entre otros) o diversos antibióticos (tales como la tetraciclina, la neomicina, la ampicilina o la kanamicina). [0059]

La célula huésped ha de ser cultivada de acuerdo con un método comúnmente conocido. Las condiciones bajo las cuales se realiza cultivo, por ejemplo, la temperatura, el pH del medio o la duración del cultivo, han de ser seleccionadas de manera apropiada. A modo de ejemplo, cuando la célula huésped es una célula de origen animal, puede usarse un medio MEM, que contiene aproximadamente entre 5% y 20% de suero bovino fetal (Science, vol. 122, p. 501, 1952), un medio DMEM (Virology, vol. 8, p. 396, 1959), un medio RPMI1640 (J. Am. Med. Assoc., vol. 199, p. 519, 1967) o un medio 199 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., vol. 73, p. 1, 1950), entre otros. El pH del medio preferiblemente se encuentra en un rango aproximado de entre 6 y 8, y el cultivo normalmente se lleva a cabo a una temperatura aproximada de entre 30°C y 40°C durante un período aproximado de entre 15 y 72 horas, con aireación o agitación en la medida necesaria. En particular, cuando la célula huésped es una célula de un insecto, entre otras posibilidades, puede usarse, por ejemplo, el medio de Grace, que comprende suero fetal bovino (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 82, p. 8404, 1985), y el pH de la medio preferiblemente se encuentra en un rango aproximado de entre 5 y 8. En este caso, el cultivo normalmente se realiza a una temperatura aproximada de entre 20°C y 40°C

durante un período de entre 15 y 100 horas, una vez más, con aireación o agitación en la medida necesaria. Cuando el huésped es una bacteria, un actinomiceto, una levadura o un hongo filamentoso, puede usarse, por ejemplo, un medio líquido que comprende fuentes de nutrientes como las que se describieron con anterioridad. En este contexto, resulta preferible un medio con un pH de entre 5 y 8. Específicamente, cuando el huésped es *E. coli*, resulta preferible usar un medio LB o un medio M9 (Miller et al., Exp. Mol. Genet., Cold Spring Harbor Laboratory, p. 431, 1972), entre otras posibilidades. En este caso, el cultivo normalmente se lleva a cabo a una temperatura de entre 14°C y 43°C durante un período aproximado de entre 3 y 24 horas, también en este caso con aireación o agitación en la medida necesaria. Por otro lado, cuando el huésped es una bacteria del género *Bacillus*, el cultivo normalmente se lleva a cabo a una temperatura de entre 30°C y 40°C durante un período aproximado de entre 16 y 96 horas, también con aireación o agitación en la medida necesaria. Más aun, cuando el huésped es una levadura, como medio puede usarse el medio mínimo de Burkholder (Bostian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 77, p. 4505, 1980), y el pH del medio deseablemente es de entre 5 y 8. En este caso, el cultivo normalmente se lleva a cabo a una temperatura de entre 20°C y 35°C durante un período aproximado de entre 14 y 144 horas, con aireación o agitación en la medida necesaria. [0060]

Además del cultivo de una célula huésped de la presente invención bajo condiciones apropiadas para que se exprese el fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano, el método para producir un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención también comprende un paso en el que se recupera el fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano en cuestión,

y donde también preferiblemente se lo aísla y se lo purifica a partir de la célula huésped. Los ejemplos de los métodos que pueden usarse para poner en práctica el aislamiento y la purificación abarcan los métodos que están basados en las diferencias en la solubilidad, tales como la precipitación con sal o la precipitación con solventes, los métodos que están basados en las diferencias en el peso molecular, tales como la diálisis, la ultrafiltración, la filtración a través de geles o la electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS), los métodos que están basados en las diferencias en la carga eléctrica, tales como la cromatografía basada en el intercambio iónico o la cromatografía con hidroxilapatita, los métodos que están basados en la afinidad, tales como la cromatografía basada en la afinidad, los métodos que están basados en las diferencias en hidrofobicidad, tales como la cromatografía líquida con una resolución elevada en una fase inversa, y los métodos que están basados en las diferencias en el punto isoeléctrico, tales como el enfoque isoeléctrico, entre otros. [0061]

Un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención también puede tomar la forma de un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano que puede ser obtenido con un método para producir un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención. [0062]

Aunque la presente invención ha sido descrita de manera general, a continuación se proveen diversos ejemplos específicos para posibilitar una mejor comprensión. Vale aclarar que estos ejemplos solamente se proveen con fines ilustrativos y que no tienen por objeto limitar el alcance de la presente invención.

EJEMPLOS [0063]

En los pasos en los que se emplearon conjuntos de elementos o reactivos disponibles en el mercado, los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos adjuntos, a menos que se indique específicamente lo contrario. [0064]

Ejemplo 1. Preparación de fragmentos de anticuerpos Fab anti-NGF humano

Los presentes inventores prepararon tres tipos de fragmentos de anticuerpos Fab anti-NGF humano mediante la modificación del anticuerpo anti-NGF humano completamente humano 1-15 (N52D-A)-Fab' (Documento de patente 3, donde también se lo conoce como "1-15 (N52D-A)-Fab"). [0065]

Se amplificaron tres tipos de fragmentos del gen, que provinieron de la VH o de la región bisagra, mediante el uso de una ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (de Finnzymes, F-530L), con un vector de expresión que comprendió la cadena pesada del fragmento 1-15 (N52D-A)-Fab' (Documento de patente 3) como molde. Las regiones que se amplificaron contenían un sitio donde podría actuar la enzima HindIII en el extremo 5' y un sitio donde podría actuar la enzima EcoRI en el extremo 3'. Los fragmentos de los genes que codificarían las cadenas pesadas fueron sometidos a una digestión con HindIII y EcoRI (ambas de NEB) y fueron insertados en un vector de expresión pEE6.4. [0066]

Estos plásmidos de expresión se introdujeron en *E. coli* de acuerdo con un método habitual para obtener clones transformados, y posteriormente se usó un sistema para purificar ADN Wizard Plus SV Minipreps (de Promega, A1460) para depurar el ADN plasmídico. Por otro lado, el gen que codificaría la

cadena liviana comprendió una secuencia de bases (SEQ ID N° 4) que fue idéntica a la del gen que codificaba la cadena liviana del fragmento 1-15 (N52D-A)-Fab', y la secuencia de aminoácidos codificada por él correspondió a SEQ ID N° 8. Se usó un vector pEE12.4 para alojar el fragmento del gen que codificaría la cadena liviana. [0067]

El vector GS que comprendía el fragmento del gen que codificaría la cadena pesada del fragmento de anticuerpo Fab NGF anti-humano (pEE6.4), y el vector GS que comprendía el fragmento del gen que codificaría la cadena liviana del fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano (pEE12.4) se escindieron con las enzimas de restricción NotI y PvuI (ambas de NEB). Posteriormente, se los unió con una mezcla apropiada para unir ADN (de Takara Bio Inc., 6023), de manera tal de obtener vectores de GS que comprendieran el fragmento del gen que codificaría la cadena pesada y el fragmento del gen que codificaría la cadena liviana de los fragmentos de anticuerpos Fab anti-NGF humano. El ADN plasmídico obtenido fue usado como molde en una reacción de secuenciación, con lo cual fue posible confirmar que en él estaban presentes tanto las secuencias de bases que codificarían la cadena pesada, que habían sido clonadas a partir de fragmentos del gen que provenían de la VH o de la región bisagra, como las secuencias de bases que codificarían la cadena liviana, que habían sido clonadas a partir de fragmentos del gen que provenían de la VL o de la CL. Las secuencias de bases que codificarían las cadenas pesadas, que según se ha indicado, pertenecían a tres tipos diferentes y provenían de la VH o de la región bisagra, se representan como SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2 y SEQ ID N° 3. Las secuencias de aminoácidos codificadas por estas secuencias de bases se

representan como SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6 y SEQ ID N° 7, respectivamente. Los tres tipos de fragmentos de anticuerpos Fab anti-NGF humano se prepararon combinando una cadena pesada como la que se detalla en SEQ ID N° 1 con una cadena liviana como la que se detalla en SEQ ID N° 4, una cadena pesada como la que se detalla en SEQ ID N° 2 con una cadena liviana como la que se detalla en SEQ ID N° 4 y una cadena pesada como la que se detalla en SEQ ID N° 3 con una cadena liviana como la que se detalla en SEQ ID N° 4, y a los anticuerpos que se obtuvieron se les dieron las designaciones h1f.6, h1f.7 y h1f.8, respectivamente. [0068]

Los fragmentos de anticuerpos Fab anti-NGF humano se expresaron de acuerdo con métodos que posibilitaron una expresión transitoria o una expresión constitutiva, mediante el uso de los vectores GS que se han descrito. En el contexto de la expresión transitoria, los vectores GS se introdujeron en células CHO-K1SV (de Lonza) que habían sido cultivadas en un medio CD-CHO (de Invitrogen), de acuerdo con un método de electroporación en el que se usó un dispositivo MaxCyte (de MaxCyte), y posteriormente se incubaron durante 7 días. Los fragmentos de anticuerpos Fab anti-NGF humano se purificaron a partir del sobrenadante de los cultivos mediante el uso del conjunto de elementos KappaSelect (de GE Healthcare, 17-5458-02). En el contexto de la expresión constitutiva, los vectores GS fueron sometidos a una escisión con la enzima de restricción PvuI y fueron introducidos en células CHO-K1SV de acuerdo con un método de electroporación, de modo tal de expresar los fragmentos de anticuerpos Fab anti-NGF humano. En este caso, los fragmentos de anticuerpos Fab anti-NGF humano se purificaron a partir del sobrenadante de los cultivos mediante el uso del conjunto de elementos

KappaSelect, y los productos que se obtuvieron fueron sometidos a una cromatografía de exclusión en función del tamaño y a una electroforesis en un gel de poliacrilamida con SDS para verificarlos. Para confirmar que el anticuerpo h1f.6 purificado presentara la modificación posterior a la traducción deseada, se puso en práctica una espectrometría de masa. Como resultado, se observó un pico para la mayor parte del anticuerpo que fue asociado a una piroglutamilación en el extremo N. [0069]

Ejemplo 2. Evaluación de la actividad de inhibición de la unión de los fragmentos de anticuerpos Fab anti-NGF humano sobre el NGF humano

Para evaluar la actividad de inhibición de la unión de los fragmentos de anticuerpos Fab anti-NGF humano que se habían obtenido sobre el NGF humano, se puso en práctica un ELISA competitivo con el receptor del NGF humano trkA, de manera tal de determinar la inhibición de la unión entre el NGF humano y su receptor trkA como indicador. Se sometió el receptor trkA humano (de R & D Systems, 175-TK-050) a una dilución con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) hasta alcanzar una concentración de 2000 ng/ml, se colocó la solución diluida en la placa blanca con 96 cavidades Nunc MaxiSorp® (de Nunc, 436110) a razón de 50 µl/cavidad y se la inmovilizó por medio de una incubación a 4°C durante la noche. La solución que contenía el receptor trkA humano fue separada por medio de una centrifugación inversa, después de lo cual se agregó una solución de bloqueo a base de caseína en TBS (de Thermo, 37532), a razón de 200 µl/cavidad. Posteriormente, se incubó la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos y se eliminó la solución de bloqueo a base de caseína en TBS por medio de una centrifugación inversa. Se tomaron muestras de los anticuerpos purificados, se las sometió a entre 7 y

11 diluciones en serie con PBS que contenía 0,1% de albúmina de suero bovino (BSA), de manera tal de que su concentración disminuyera desde aproximadamente 200000 ng/ml hasta aproximadamente 2 ng/ml, y se las mezcló con 700 ng/ml de NGF humano biotinilado en cantidades iguales. Después de llevar a cabo una incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se colocaron las muestras a razón de 100 µl/cavidad. El NGF humano biotinilado que se usó en este caso fue preparado sometiendo NGF humano (de R & D Systems, 256-GF-100/CF) a una biotinilación con el reactivo EZ-Link NHS-PEG4-biotina (de Thermo Scientific, 21329). La biotinilación del NGF humano se basó en la combinación de 1,25 µl de una solución del reactivo NHS-PEG4-biotina 5 mM con 250 µl del NGF humano en una concentración de 0,4 mg/ml. Después de realizar una incubación en hielo a la sombra durante 2 horas, la mezcla de reacción fue sometida a dos lavados con PBS, mediante el uso del dispositivo Amicon Ultra-0.5mL 3K (de Millipore, UFC500324), y posteriormente el producto fue recuperado a partir de la PBS de acuerdo con el manual. Como control, se usaron muestras con PBS que contenían 0,1% de albúmina de suero bovino (BSA) en lugar de los fragmentos de anticuerpos Fab anti-NGF humano. Después de incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se sometieron las placas a tres lavados con una solución de lavado (una mezcla de Tris y una solución salina amortiguada (TBS) que contenía 0,05% de Tween-20) y se introdujeron 100 µl/cavidad de una estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina (de Thermo, 21324), que había sido sometida a una dilución al 1000° con el reactivo Blocking One (de Nacalai Tesque Inc., 03953-95), el cual a su vez había sido sometido a una dilución al 20° con PBS. Después de llevar a cabo una incubación a temperatura ambiente durante 30

minutos, se sometió la placa a tres lavados con la solución de lavado y se agregaron 100 μ l/cavidad de un sustrato apropiado para detectar la fosfatasa alcalina (que fue el sustrato quimioluminiscente para membranas AP Microwell Super Sensitive, de SurModics, APU4-0100-01, que puede reaccionar en presencia de una longitud de onda de 450 nm), el cual había sido sometido a una dilución al 5° con un amortiguador a base de Tris 2 mM (pH 9,8) que contenía cloruro de magnesio 0,1 mM. Después de efectuar una incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se determinó el valor de la señal con un contador EnVision (Perkin Elmer). [0070]

Las evaluaciones con el fragmento 1-15 (N52D-A)-Fab', con el anticuerpo h1f.6, con el anticuerpo h1f.7 y con el anticuerpo h1f.8 se realizaron por duplicado. Para calcular la tasa de inhibición de la unión entre el NGF humano y el receptor trkA que se obtuvo con cada anticuerpo en cada concentración, se estableció que el valor que se obtuvo con PBS en combinación con 0,1% de BSA en lugar de los anticuerpos fue de 100% y que el valor que se obtuvo con cada anticuerpo en la concentración máxima fue de 0%. Una vez que se obtuvo la tasa de inhibición de la unión entre el NGF humano y el receptor trkA, se determinó el valor de la IC_{50} para cada uno de los anticuerpos en función de un ajuste con un algoritmo basado en una curva logística con tres o cuatro parámetros. Debido a que los experimentos se llevaron a cabo por duplicado, fue posible determinar la media geométrica del valor de la IC_{50} en cada caso: el valor para el fragmento 1-15 (N52D-A)-Fab' fue de 0,30 μ g/ml, el valor para el anticuerpo h1f.6 fue de 0,32 μ g/ml, el valor para el anticuerpo h1f.7 fue de 0,30 μ g/ml y el valor para el anticuerpo h1f.8 fue

de 0,28 µg/ml, con lo cual fue posible demostrar que su actividad de inhibición de la unión entre el NGF humano y el receptor trkA fue muy similar. [0071]

Ejemplo 3. Evaluación de la formación de dímeros entre los fragmentos de anticuerpos Fab anti-NGF humano después de incubarlos a 50°C durante 14 días

Para evaluar la estabilidad del fragmento 1-15 (N52D-A)-Fab', del anticuerpo h1f.6, del anticuerpo h1f.7 y del anticuerpo h1f.8 después de una incubación a 50°C durante 14 días, se reemplazó el solvente en las soluciones en las que se los había obtenido por un solvente que tenía un pH de 5, 6 ó 7 (que comprendió una mezcla de ácido cítrico 20 mM y NaCl 120 mM con un pH de 5 ó 6 o PBS con un pH de 7) y se ajustó la concentración en 10 mg/ml. [0072]

Se determinó la cantidad de dímeros que se formaron en las muestras antes y después de llevar a cabo una incubación a 50°C durante 14 días por medio de una cromatografía de exclusión en función del tamaño, mediante el uso de un dispositivo LC1100 (de Agilent Technologies) y una columna con un gel TSK Super Sw3000 (de TOSOH, con un diámetro interno de 2 mm y una longitud de 300 mm). La determinación se realizó con una fase móvil que comprendió una solución de hidrógeno fosfato de disodio 0,1 M y L(+) arginina en forma de una sal ácida 0,2 M, cuyo pH había sido ajustado en 6,8 mediante la adición de cloruro de hidrógeno, con una velocidad de flujo de 0,075 ml/minuto, a una temperatura de 25°C, donde la detección se realizó con una longitud de onda de 280 nm y donde como referencia se usó una longitud de onda de 360 nm. Para obtener la media aritmética, la determinación se realizó dos veces, y la tasa de incremento en la cantidad de dímeros que se formaron

se obtuvo restándole la cantidad de dímeros que se habían formado antes de efectuar la incubación a la cantidad de dímeros que se formaron después. De esta manera, se determinó que la tasa de incremento en la cantidad de dímeros que se formaron a partir del fragmento 1-15 (N52D-A)-Fab' a un pH de 5, 6 ó 7 fue de 5,4%, 17,0% o 18,2%, respectivamente, lo que implica que se formaron cantidades significativas de dímeros bajo estas condiciones. Por otra parte, la tasa de incremento en la cantidad de dímeros que se formaron a partir del anticuerpo h1f.6 a un pH de 5, 6 ó 7 fue de 0,1%, 0,3% o 0,5%, respectivamente, la correspondiente al anticuerpo h1f.7 a un pH de 5, 6 ó 7 fue de 0,1%, 0,3% o 0,4%, respectivamente, y la correspondiente al anticuerpo h1f.8 a un pH de 5, 6 ó 7 fue de 0,1%, 0,5% o 0,7%, respectivamente. Por lo tanto, se demostró que se formaron significativamente menos dímeros a partir del anticuerpo h1f.6, el anticuerpo h1f.7 o el anticuerpo h1f.8 que a partir del fragmento 1-15 (N52D-A)-Fab'. [0073]

Ejemplo 4. Evaluación de la actividad de inhibición de la unión de los fragmentos de anticuerpos Fab anti-NGF humano sobre el NGF humano después incubarlos a 50°C durante 14 días

Para evaluar el cambio en la actividad de inhibición de la unión del fragmento 1-15 (N52D-A)-Fab', del anticuerpo h1f.6, del anticuerpo h1f.7 y del anticuerpo h1f.8 sobre el NGF humano después de realizar una incubación a una temperatura de 50°C y a un pH de 6 durante 14 días, se recurrió a un ELISA basado en la competición con el NGF humano por el receptor trkA, según se describió en el ejemplo 2. Debido a que los experimentos se llevaron a cabo por duplicado, fue posible determinar la media geométrica del valor de la IC₅₀ en cada caso: el valor para el fragmento 1-15 (N52D-A)-Fab' fue de 0,47

g/ml, el valor para el anticuerpo h1f.6 fue de 0,38 mg/ml, el valor para el anticuerpo h1f.7 fue de 0,56 mg/ml y el valor para el anticuerpo h1f.8 fue de 0,47 g/ml. La proporción en la que se incrementó el valor de la IC₅₀ de los anticuerpos después de incubarlos a una temperatura de 50°C y a un pH de 6 durante 14 días, con relación al valor que se había determinado antes de la incubación, fue de 59%, 21%, 87% y 68%, respectivamente. [0074]

Sobre la base de los resultados, que se obtuvieron, fue posible concluir que el anticuerpo h1f.6, el anticuerpo h1f.7 y el anticuerpo h1f.8 son fragmentos Fab anti-NGF que tienden a formar dímeros en una proporción significativamente menor que el fragmento 1-15 (N52D-A)-Fab' después de incubarlos a una temperatura de 50°C y a un pH de 6 durante 14 días, y que en particular, el anticuerpo h1f.6 es el más estable y el menos susceptible a experimentar mermas en su actividad de inhibición de la unión durante la incubación. [0075]

Ejemplo 5. Evaluación de la actividad de unión de los anticuerpos anti-NGF humano por medio de un ELISA

Se llevó a cabo un ELISA para determinar la actividad de unión al antígeno del anticuerpo h1f.6. En el estudio que se realizó para evaluar la capacidad de unión de este anticuerpo al NGF humano, se usó una placa en la cual se había inmovilizado el NGF humano. Como anticuerpo comparativo, se usó el Tanezumab, un anticuerpo conocido a partir de los antecedentes técnicos. [0076]

En este experimento, se combinó NGF humano (de R & D Systems, 256-GF-100/CF) con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y se aplicó la mezcla en una concentración de 1000 ng/ml en la placa blanca con 96

cavidades Nunc MaxiSorp® (de Nunc, 436110) a razón de 100 µl/cavidad y se la inmovilizó por medio de una incubación a 4°C durante la noche. La solución que contenía el NGF humano fue separada por medio de una centrifugación inversa, después de lo cual se agregó una solución de bloqueo a base de caseína en TBS (de Thermo, 37532), a razón de 200 µl/cavidad. Posteriormente, se incubó la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos y se eliminó la solución de bloqueo a base de caseína en TBS por medio de una centrifugación inversa. Se tomaron muestras de los anticuerpos purificados, se las sometió a 11 diluciones en serie con PBS que contenía 0,1% de albúmina de suero bovino (BSA), de manera tal de que su concentración disminuyera desde 1000 ng/ml hasta 0,01 ng/ml, y se las colocó en las placas a razón de 100 µl/cavidad. Como control, se usaron muestras con PBS que contenían 0,1% de albúmina de suero bovino (BSA) en lugar de los anticuerpos. Después de incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se sometieron las placas a tres lavados con una solución de lavado (una mezcla de Tris y una solución salina amortiguada (TBS) que contenía 0,05% de Tween-20) y se introdujeron 100 µl/cavidad de un anticuerpo biotinilado dirigido contra la cadena liviana kappa humana (de IBL, 17249), que había sido sometido a una dilución al 1000° con el reactivo Blocking One (de NacalaiTesque Inc., 03953-95), el cual a su vez había sido sometido a una dilución al 20° con PBS. Después de llevar a cabo una incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se sometió la placa a tres lavados con la solución de lavado y se agregaron 100 µl/cavidad de una estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina (de Thermo, 21324), que había sido sometida a una dilución al 1000° con el reactivo Blocking One (de NacalaiTesque Inc.,

03953-95), el cual a su vez había sido sometido a una dilución al 20° con PBS. Después de llevar a cabo una incubación a temperatura ambiente durante 0,5 horas, se sometió la placa a tres lavados con la solución de lavado y se agregaron 100 µl/cavidad de un sustrato apropiado para detectar la fosfatasa alcalina (que fue el sustrato quimioluminiscente para membranas AP Microwell Super Sensitive, de SurModics, APU4-0100-01, que puede reaccionar en presencia de una longitud de onda de 450 nm), el cual había sido sometido a una dilución al 5° con un amortiguador a base de Tris 2 mM (pH 9,8) que contenía cloruro de magnesio 0,1 mM. Después de efectuar una incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se determinó el valor de la señal con un contador EnVision (Perkin Elmer). [0077]

Las evaluaciones con cada uno de los anticuerpos se realizaron por duplicado, de manera tal de poder calcular la media aritmética. Para calcular la tasa de unión entre cada anticuerpo y el NGF humano, se estableció que el valor que se obtuvo con PBS en combinación con 0,1% de BSA en lugar de los anticuerpos fue de 100% y que el valor que se obtuvo con cada anticuerpo en la concentración máxima fue de 0%. Una vez que se obtuvo la tasa de unión al NGF humano, se determinó el valor de la EC_{50} para cada uno de los anticuerpos en función de un ajuste con un algoritmo basado en una curva logística con tres o cuatro parámetros. Debido a que los experimentos se llevaron a cabo por duplicado, fue posible determinar la media geométrica del valor de la EC_{50} en cada caso: el valor de la EC_{50} para la unión entre el anticuerpo h1f.6 y el NGF humano fue de 73,0 ng/ml, mientras que el valor de la EC_{50} para la unión entre el Tanezumab y el NGF humano fue de 146 ng/ml. [0078]

Ejemplo 6. Evaluación de la actividad de inhibición de la unión de los anticuerpos sobre el NGF humano

Se recurrió a un ELISA basado en la competición con el NGF humano por el receptor trkA para determinar la actividad de inhibición de la unión del anticuerpo h1f.6 sobre el NGF humano. Como control, se usó un anticuerpo comparable, el Tanezumab. [0079]

La evaluación se llevó a cabo en cuatro ocasiones para el anticuerpo h1f.6 y en tres ocasiones para el Tanezumab, y se calcularon las medias geométricas a partir de los valores de la IC_{50} que se determinaron. De esta manera, fue posible establecer que el valor de la IC_{50} asociado a la capacidad del anticuerpo h1f.6 de inhibir la unión entre el NGF humano y el receptor trkA fue de 0,31 g/ml, el valor de la IC_{50} asociado a la capacidad del Tanezumab de inhibir la unión entre el NGF humano y el receptor trkA fue de 0,86 g/ml. [0080]

Ejemplo 7. Evaluación de la acumulación local de un anticuerpo en un tejido, de su capacidad de unirse al NGF y de su capacidad de inhibir la unión al NGF humano

Después de administrar de manera local el anticuerpo h1f.6, se determinó su concentración en el tejido para evaluar la medida en la cual se acumuló. En este caso, el anticuerpo h1f.6 fue administrado de manera local en el músculo femoral de ratas normales, en dosis de 0,3 ó 3 mg/kg, en cada caso con $n = 4$, y 6 horas después se determinó la concentración del anticuerpo en el músculo femoral por medio de un análisis basado en la electroquimioluminiscencia (ECL). La administración local se basó en la inyección del anticuerpo en el músculo femoral, en un volumen de 0,2 ml/kg, en una solución salina amortiguada con fosfato (PBS) como diluyente. [0081]

En este experimento, se preparó un homogenato con tejido extraído a partir del músculo femoral combinando la muestra con 2,5 veces su volumen con una solución apropiada para efectuar la homogenización (que fue la solución cOmplete Mini (de Roche), que comprendió Tris 10 mM y NaCl 137 mM y que tuvo un pH de 8,0). En el análisis basado en la ECL, se usaron anticuerpos anti-1-15 de dos tipos, ANA-IBL-13A y ANA-IBL-52A biotinilado, que habían sido obtenidos inmunizando un ratón con un anticuerpo 1-15 (Documento de patente 3), el cual a su vez había sido obtenido inmunizando un ratón con VelocImmune con el NGF humano. En este contexto, vale destacar que el anticuerpo ANA-IBL-52A biotinilado fue sometido a una biotinilación de acuerdo con las instrucciones del conjunto de elementos para aplicar marcas con biotina NH₂ (de Dojindo Laboratories, LK03). [0082]

A continuación se proveen diversos detalles acerca del análisis basado en la ECL. El anticuerpo anti-1-15 ANA-IBL-13A fue sometido a una dilución con una solución salina amortiguada con Tris (TBS) en una concentración de 1000 ng/ml y se colocó en una placa con 96 cavidades Multi-array (de Meso Scale Discovery, L15XA-6), a razón de 25 µl/cavidad. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora para inmovilizar el anticuerpo ANA-IBL-13A. La solución que contenía ANA-IBL-13A fue separada por medio de una centrifugación inversa, después de lo cual se sometió la placa a tres lavados con una solución de lavado (TBS que contenía 0,05% de Tween-20) y se agregaron 150 µl/cavidad de una solución de bloqueo a base de caseína en TBS (de Thermo, 37532). Posteriormente, se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora, se eliminó la solución de bloqueo a base de caseína en TBS por medio de una centrifugación inversa, se sometió la placa a tres

lavados, se agregaron 25 µl/cavidad de las muestras homogenizadas del músculo femoral, que habían sido sometidas a una dilución al 100° con un diluyente apropiado (una solución de bloqueo a base de caseína en TBS que contenía 0,05% de Tween-20), y de ser necesario, a una dilución adicional con 1% de una muestra homogenizada del músculo femoral libre de anticuerpos, de manera tal de obtener valores fuera del rango de la curva de calibración. Con el propósito de generar una curva de calibración para las muestras homogenizadas del músculo femoral, se combinaron muestras del anticuerpo h1f.6 que habían sido sometidas a 10 diluciones en serie con un diluyente apropiado, de manera tal de que su concentración disminuyera desde 10000 ng/ml hasta 0,51 ng/ml, con 1% de las muestras homogenizadas del músculo femoral libres de anticuerpos. Como control, se usó 1% de las muestras homogenizadas del músculo femoral libres de anticuerpos. Después de efectuar una incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, se removi6 la solución por medio de una centrifugación inversa. Se sometió la placa a tres lavados con la solución de lavado y se agregaron 25 µl/cavidad del anticuerpo ANA-IBL-52A biotinilado, el cual había sido sometido a una dilución con 300 ng/ml de un diluyente apropiado. Después de incubar a temperatura ambiente durante 1 hora, se separó la solución por medio de una centrifugación inversa. Se sometió la placa a otros tres lavados con la solución de lavado y se agregaron 25 µl/cavidad de estreptavidina MSD SULFO-TAG (de Meso Scale Discovery, R32AD-1), que había sido sometida a una dilución hasta alcanzar una concentración de 1000 ng/ml con un diluyente apropiado. Se llevó a cabo una incubación a temperatura ambiente durante 1 hora y se separó la solución por medio de una centrifugación inversa. Una vez más, se sometió la placa a

tres lavados con la solución de lavado, se agregaron 150 μ l/cavidad del amortiguador de lectura MSD T (4x) combinado con un agente tensioactivo apropiado (de Meso Scale Discovery, R92TC-2), el cual había sido sometido a una dilución al medio con agua ultrapura (MilliQ (marca registrada), de Merck), y se determinó la electroquimioluminiscencia de las muestras con un dispositivo generador de imágenes SECTOR 6000 (de Meso Scale Discovery). [0083]

De esta manera, fue posible generar una curva de calibración con la cual pudiera calcularse la concentración del anticuerpo. La ecuación con la cual se determinó la regresión fue sometida a un ajuste con un algoritmo basado en una curva logística con cuatro parámetros. Mediante el uso de esta curva de calibración, fue posible calcular la concentración del anticuerpo en el músculo femoral en cada punto de tiempo. Los análisis fueron realizados por duplicado, con lo cual fue posible calcular la media aritmética de la concentración en cada caso. [0084]

6 horas después de que el anticuerpo h1f.6 fue administrado de manera local en una dosis de 0,3 ó 3 mg/kg en el músculo femoral, su concentración en el sitio fue de 2,66 g/ml ó 67,9 mg/ml, respectivamente. [0085]

Para evaluar la capacidad del anticuerpo h1f.6 de unirse al NGF humano en el músculo femoral, se llevó a cabo un ELISA en el que se analizó la unión al NGF humano.

En este experimento, se combinó NGF humano (de R & D Systems, 256-GF-100/CF) con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y se aplicó la mezcla en una concentración de 1000 ng/ml en la placa blanca con 96 cavidades Nunc MaxiSorp® (de Nunc, 436110) a razón de 20 μ l/cavidad y se la inmovilizó por medio de una incubación a 4°C durante la noche. La solución

que contenía el NGF humano fue separada por medio de una centrifugación inversa, después de lo cual se agregó una solución de bloqueo a base de caseína en TBS (de Thermo, 37532), a razón de 80 µl/cavidad. Posteriormente, se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora, se la sometió a tres lavados con una solución de lavado (que fue una solución salina amortiguada con Tris (TBS) que contenía 0,05% de Tween-20) y se agregaron 20 µl/cavidad de las muestras homogenizadas de los músculos femorales sobre los cuales se había aplicado el anticuerpo en una dosis de 0,3 ó 3 mg, las cuales habían sido sometidas a una dilución al 10° o al 100°, respectivamente, con el reactivo Blocking One, el cual a su vez había sido sometido a una dilución al 10° con una solución salina amortiguada con Tris (TBS) que contenía 0,05% de Tween-20.

Por otra parte, con el propósito de generar una curva de calibración con las muestras homogenizadas de los músculos femorales sobre los cuales se había aplicado el anticuerpo h1f.6 en una dosis de 0,3 ó 3 mg, se las sometió a 11 diluciones en serie con el reactivo Blocking One, de manera tal de que su concentración disminuyera desde 3000 ng/ml hasta 0,03 ng/ml con un diluyente, donde el reactivo a su vez había sido sometido a una dilución al 10° con una TBS que contenía 0,05% de Tween-20 en combinación con 10% o 1% de las muestras homogenizadas del músculo femoral libres de anticuerpos, respectivamente, y posteriormente se aplicaron las mezclas resultantes a razón de 20 µl/cavidad. [0086]

Después de incubar a temperatura ambiente durante 1 hora, se sometió la placa a tres lavados con la solución de lavado. En cada cavidad de la placa, se introdujeron 20 µl de un anticuerpo biotinilado dirigido contra la cadena

liviana kappa humana (de IBL, 17249), que había sido sometido a una dilución al 2500° con el reactivo Blocking One (de NacalaiTesque Inc., 03953-95), el cual a su vez había sido sometido a una dilución al 20° con una solución salina amortiguada con Tris (TBS) que contenía 0,05% de Tween-20. Después de llevar a cabo una incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, se sometió la placa a tres lavados con la solución de lavado y se agregaron 20 µl/cavidad de una estreptavidina conjugada con HRP con una sensibilidad elevada (de Thermo, 21130), que había sido sometida a una dilución al 8000° con el reactivo Blocking One, el cual a su vez había sido sometido a una dilución al 10° con una solución salina amortiguada con Tris (TBS) que contenía 0,05% de Tween-20. Después de llevar a cabo una incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, se sometió la placa a tres lavados con la solución de lavado, se agregaron 20 µl/cavidad de una sustancia quimioluminiscente (que fue el sustrato quimioluminiscente para ELISA BM (POD), de Roche, 11582950001) y se determinó el valor de la señal con el contador EnVision (de Perkin Elmer). Cada evaluación se realizó por duplicado, de modo tal que fue posible generar una curva de calibración que fue apropiada para analizar la capacidad del anticuerpo h1f.6 de unirse al NGF humano. La ecuación con la cual se determinó la regresión fue sometida a un ajuste con un algoritmo basado en una curva logística con cuatro parámetros, y la actividad de unión al NGF humano en cada punto de tiempo fue calculada sobre la base de la curva de calibración. La capacidad del anticuerpo h1f.6 de unirse al NGF humano en el músculo femoral se calculó multiplicando los valores que se obtuvieron como resultado de la administración de las dosis de

0,3 ó 3 mg/kg por 35 ó 350, respectivamente, y a partir de este resultado se calculó la media aritmética. [0087]

Por medio de este experimento, se determinó que la capacidad del anticuerpo h1f.6 de unirse al NGF humano cuando se lo administró en una dosis de 0,3 mg/kg fue de 2,12 µg/ml, mientras que su capacidad de unirse al NGF humano cuando se lo administró en una dosis de 3 mg/kg fue de 77,9 µg/ml. Con relación al valor de la IC₅₀ para la inhibición de la unión entre el NGF humano y el receptor trkA que se había determinado en el ejemplo 2, estos valores fueron 6,6 veces y 243 veces más elevados, respectivamente. [0088]

Sobre la base de los resultados que se obtuvieron, se concluyó que prácticamente la totalidad del anticuerpo presente en el músculo femoral pudo unirse al NGF humano y pudo inhibir la unión entre el NGF humano y el receptor trkA. [0089]

Posteriormente, para evaluar la actividad de inhibición de la unión del NGF humano en el músculo femoral, se puso en práctica un ELISA competitivo con el receptor del NGF humano trkA, de manera tal de determinar la inhibición de la unión entre el NGF humano y su receptor trkA como indicador.

En este experimento, se sometió el receptor trkA humano (de R & D Systems, 175-TK-050) a una dilución con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) hasta alcanzar una concentración de 2000 ng/ml, se colocó la solución diluida en la placa blanca con 96 cavidades Nunc MaxiSorp® (de Nunc, 436110) a razón de 50 µl/cavidad y se la inmovilizó por medio de una incubación a 4°C durante la noche. La solución que contenía el receptor trkA humano fue separada por medio de una centrifugación inversa, después de lo

cual se agregó una solución de bloqueo a base de caseína en TBS (de Thermo, 37532), a razón de 80 µl/cavidad. Después de realizar una incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se sometió la placa a tres lavados con una solución de lavado (que fue una solución salina amortiguada con Tris (TBS) que contenía 0,05% de Tween-20), con lo cual se eliminó la solución de bloqueo a base de caseína en TBS. Se obtuvieron muestras homogenizadas del músculo femoral de diversas ratas, se las sometió a una dilución al 5° con PBS que contenía 0,1% de albúmina de suero bovino (BSA) cuando provinieron del grupo que había tratado con la dosis de 0,3 mg/kg o a una dilución al 50° cuando provinieron del grupo que había tratado con la dosis de 3 mg/kg y se la mezcló 0,4 µg/ml un NGF humano biotinilado en cantidades iguales. Después de llevar a cabo una incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se colocaron las muestras a razón de 20 µl/cavidad. Debido a que el tejido muscular que se había obtenido había sido sometido a una dilución con una solución que contenía un tejido homogenizado en una concentración 2,5 veces mayor, la concentración del anticuerpo en el músculo femoral del grupo que había tratado con la dosis de 0,3 mg/kg fue evaluada con un factor de dilución de 35, mientras que la concentración del anticuerpo en el músculo femoral del grupo que había tratado con la dosis de 3 mg/kg fue evaluada con un factor de dilución de 350.

El NGF humano biotinilado que se usó en este caso fue preparado sometiendo NGF humano (de R & D Systems, 256-GF-100/CF) a una biotinilación con el reactivo EZ-Link NHS-PEG4-biotina (de Thermo Scientific, 21329). La biotinilación del NGF humano se basó en la combinación de 5 µl de una solución del reactivo NHS-PEG4-biotina 5 mM con 1 ml del NGF humano

en una concentración de 0,4 mg/ml. Después de realizar una incubación en hielo a la sombra durante 2 horas, la mezcla de reacción fue sometida a dos lavados con PBS, mediante el uso del dispositivo Amicon Ultra-0.5mL 3K (de Millipore, UFC500324), y posteriormente el producto fue recuperado a partir de la PBS de acuerdo con el manual.

Como controles, se usaron muestras con PBS que contenían 10 µg/ml del anticuerpo h1f.6 y 0,1% de albúmina de suero bovino (BSA) y muestras con PBS que contenían 0,1% de albúmina de suero bovino (BSA) en lugar del anticuerpo. Las muestras que se usaron como control para el grupo que había tratado con la dosis 0,3 mg/kg y para el grupo que había tratado con la dosis 3 mg/kg fueron sometidas a una dilución con un diluyente apropiado (PBS que contenía 0,1% de BSA, más 10% y el 1% de muestras tejido homogenizado proveniente de un músculo femoral libre de anticuerpos, respectivamente). Después de incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se sometieron las placas a tres lavados con una solución de lavado y se agregaron 20 µl/cavidad de una estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina (de Thermo, 21324), que había sido sometida a una dilución al 1000° con el reactivo Blocking One (de NacalaiTesque Inc., 03953-95), el cual a su vez había sido sometido a una dilución al 20° con una solución salina amortiguada con Tris (TBS) que contenía 0,05% de Tween-20. Después de llevar a cabo una incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se sometió la placa a tres lavados con la solución de lavado y se agregaron 20 µl/cavidad de un sustrato apropiado para detectar la fosfatasa alcalina (que fue el sustrato quimioluminiscente para membranas AP Microwell Super Sensitive, de SurModics, APU4-0100-01, que puede reaccionar en presencia de una longitud

de onda de 450 nm), el cual había sido mezclado en una proporción de 1:1 con una solución salina amortiguada con Tris 200 mM (con un pH de 9,8) que contenía cloruro de magnesio 10 mM y que había sido sometida a una dilución al 10° con agua ultrapura (MilliQ (marca registrada), de Merck). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se determinó el valor de la señal con un contador EnVision (de Perkin Elmer).

Para calcular la actividad de inhibición que ejerció el anticuerpo sobre el NGF humano en cada concentración, se estableció que el valor que se obtuvo con PBS en combinación con 0,1% de BSA en lugar del anticuerpo fue de 0% y que el valor que se obtuvo con el anticuerpo en una concentración de 10 µg/ml fue de 100%. El estudio se realizó por duplicado (con 4 u 8 cavidades como control), de manera tal de poder calcular la media aritmética. [0090]

Con este experimentó, se determinó que en el grupo que fue tratado con una dosis de 0,3 mg/kg, la actividad de inhibición de la unión fue de 21,2%, incluso cuando los anticuerpos estuvieron presentes en el músculo femoral diluidos en un factor de 35. Por otro lado, en el grupo que fue tratado con una dosis de 3 mg/kg, la actividad de inhibición de la unión fue de 59,9%, y en este caso, los anticuerpos estuvieron presentes en el músculo femoral diluidos en un factor de 350. Es decir, como resultado de la administración del anticuerpo h1f.6 en una concentración de 0,3 ó 3 mg/kg en el tejido muscular, fue posible confirmar que hubo actividad de inhibición de la unión al NGF humano como resultado del análisis de la unión entre el NGF humano y su receptor trkA. [0091]

En función de lo anterior, puede concluirse que el fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención, en este caso el

anticuerpo h1f.6, pudo actuar en el tejido blanco, es decir, pudo unirse al NGF humano cuando se lo administró de manera local, con lo cual pudo inhibir la unión entre el NGF humano y su receptor. El fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención, en este caso el anticuerpo h1f.6, podría resultar útil como medicamento, ya que presentó una acción local apropiada en una dosis considerablemente más baja que la que habría sido necesario aplicar de los medicamentos precedentes. [0092]

Ejemplo 8. Evaluación del efecto analgésico en un modelo del dolor postoperatorio posterior a una incisión en la planta de las patas basado en ratas

Los efectos analgésicos que produjo el anticuerpo h1f.6 sobre el dolor postoperatorio como resultado de una administración local en el sitio en el que se había realizado una operación se evaluaron en un modelo del dolor postoperatorio posterior a una incisión en la planta de las patas basado en ratas (Banik, R. K., et al., Pain, 2005, 117, 68-76), del que se considera que resulta útil para reflejar el dolor postoperatorio en un modelo clínico. En el Documento de patente 3 se indica que la administración intravenosa sistémica del anticuerpo anti-humano NGF completamente humano 1-15 (N52D-A)-Fab'-PEG 10K había dado como resultado un efecto analgésico en este mismo modelo. En este estudio, para evaluar el efecto analgésico que produjo el anticuerpo h1f.6 sobre el dolor postoperatorio como resultado de una administración local en el sitio en el que se había realizado una operación, se administró el anticuerpo 1-15 (N52D-A)-Fab'-PEG 10K de manera local y sistémica con fines comparativos. [0093]

Específicamente, se sometieron cinco grupos de 10 ratas a sendas operaciones y se separaron otras 5 ratas que no fueron sometidas a ninguna operación como control: uno de los grupos fue tratado con un solvente (que comprendió citrato 20 mM y NaCl 120 mM y que tuvo un pH de 6), otro grupo fue sometido a la administración local de 900 µg del anticuerpo h1f.6 en la planta de las patas, otro grupo fue sometido a la administración local de 900 µg del anticuerpo 1-15 (N52D-A)-Fab'-PEG 10K en la planta de las patas y otro grupo fue sometido a la administración de 1 mg/kg del anticuerpo 1-15 (N52D-A)-Fab'-PEG 10K por vía intravenosa. La administración local en la planta de las patas se llevó a cabo mediante el implante de una lámina de Spongel (una marca registrada de Astellas Pharma) de aproximadamente 2 mg en la porción incisa del músculo plantar, donde esta lámina había sido sumergida y dilatada con 30 µl de una solución que contenía el anticuerpo en una concentración de 30 mg/ml. Sin embargo, en el caso del grupo que fue tratado tan solo con el solvente y el grupo que fue sometido a la administración de 1 mg/kg del anticuerpo 1-15 (N52D-A)-Fab'-PEG 10K por vía intravenosa, las láminas Spongel fueron sumergidas y dilatadas con el solvente. En esta evaluación, se realizó una incisión lineal con una longitud aproximada de 10 mm en la planta de la pata trasera izquierda, a una distancia de aproximadamente 5 mm desde el extremo del talón, en la dirección del dedo del pie, bajo anestesia con isoflurano, se expuso la porción incisa del músculo plantar de manera vertical, se colocó nuevamente el músculo en su posición original, se implantó la lámina Spongel y se suturó el músculo en dos puntos con un hilo de nylon. El umbral para el dolor fue analizado 24, 48 y 72 horas después de la operación. El registro del umbral de dolor se realizó con un anestesiómetro dinámico plantar

(de Ugo Basile), con el cual fue posible determinar la presión que fue necesario aplicar sobre la planta de la pata para generar una conducta de evitación en las ratas. [0094]

La media aritmética del valor de la presión que provocó un comportamiento de aversión en las ratas en cada uno de los grupos fue calculada sobre la base del umbral para el dolor, y la tasa de mejora del umbral para el dolor en cada uno de los grupos que fueron sometidos a los tratamientos con los agentes farmacéuticos fue calculada con relación al umbral para el dolor que se determinó en el grupo que no fue operado, que fue fijado como 100%, y con relación al umbral para el dolor en el grupo que fue tratado con el solvente solo, que fue fijado como 0%. Como resultado, 24 horas después de la operación, la tasa de mejora del umbral para el dolor en el grupo que fue sometido a la administración local en la planta de las patas de 900 µg del anticuerpo h1f.6 fue de 34%, la tasa de mejora del umbral para el dolor en el grupo que fue sometido a la administración local en la planta de las patas de 900 µg de 1-15 (N52D-A)-Fab'-PEG 10K fue de 49% y la tasa de mejora del umbral para el dolor en el grupo que fue sometido a la administración intravenosa de 1 mg/kg de 1-15 (N52D-A)-Fab'-PEG 10K fue de 46%, a partir de lo cual, y mediante el uso de una prueba t de Student, pudo comprobarse que el umbral para el dolor en todos los grupos que fueron sometidos a los tratamientos con los agentes farmacéuticos mejoró de manera significativa, con un valor de p inferior a 0,05, en comparación con el grupo que solamente fue tratado con el solvente. Por otra parte, 48 horas después de la operación, la tasa de mejora del umbral para el dolor en el grupo que fue sometido a la administración local en la planta de las patas de 900 µg del anticuerpo h1f.6 fue

de 38%, la tasa de mejora del umbral para el dolor en el grupo que fue sometido a la administración local en la planta de las patas de 900 μ g de 1-15 (N52D-A)-Fab'-PEG 10K fue de 31% y la tasa de mejora del umbral para el dolor en el grupo que fue sometido a la administración intravenosa de 1 mg/kg de 1-15 (N52D-A)-Fab'-PEG 10K fue de 34%, a partir de lo cual, y mediante el uso de una prueba t de Student, pudo comprobarse que el umbral para el dolor en todos los grupos que fueron sometidos a los tratamientos con los agentes farmacéuticos mejoró de manera significativa, con un valor de p inferior a 0,05, en comparación con el grupo que solamente fue tratado con el solvente. Más aun, 72 horas después de la operación, la tasa de mejora del umbral para el dolor en el grupo que fue sometido a la administración local en la planta de las patas de 900 μ g del anticuerpo h1f.6 fue de 26%, la tasa de mejora del umbral para el dolor en el grupo que fue sometido a la administración local en la planta de las patas de 900 μ g de 1-15 (N52D-A)-Fab'-PEG 10K fue de 33% y la tasa de mejora del umbral para el dolor en el grupo que fue sometido a la administración intravenosa de 1 mg/kg de 1-15 (N52D-A)-Fab'-PEG 10K fue de 28%, a partir de lo cual, y mediante el uso de una prueba t de Student, pudo comprobarse que el umbral para el dolor en todos los grupos que fueron sometidos a los tratamientos con los agentes farmacéuticos mejoró de manera significativa, con un valor de p inferior a 0,05, en comparación con el grupo que solamente fue tratado con el solvente. Cuando se realizó un análisis basado en comparaciones múltiples de Tukey, no se observaron diferencias significativas, es decir, diferencias asociadas a valores de p inferiores a 0,05, en el umbral para el dolor de los tres grupos, a saber, el grupo que fue sometido a la administración local en la planta de las patas de 900 μ g del anticuerpo h1f.6, el

grupo que fue sometido a la administración local en la planta de las patas de 900 µg de 1-15 (N52D-A)-Fab'-PEG 10K y el grupo que fue sometido a la administración intravenosa de 1 mg/kg de 1-15 (N52D-A)-Fab'-PEG 10K, ya sea 24, 48 ó 72 horas después de la operación. Sobre la base de estos resultados, fue posible comprobar que el efecto analgésico que se observó en los tres grupos fue idéntico desde el punto de vista farmacológico una vez transcurridas 24, 48 y 72 horas después de la operación. [0095]

Ejemplo 9. Evaluación de la concentración de una droga en el plasma o en un tejido después de una administración local

Para evaluar la concentración de diversos anticuerpos en el músculo plantar o en el plasma en el contexto del estudio que se describió en el ejemplo 8, se administraron 900 µg del anticuerpo h1f.6 de manera local en la planta de las patas de tres ratas, se administraron 900 µg de 1-15 (N52D-A)-Fab'-PEG 10K de manera local en la planta de las patas de otras tres ratas y se administró 1 mg/kg de 1-15 (N52D-A)-Fab'-PEG 10K por vía intravenosa en otras tres ratas, de acuerdo con un método similar que se describió en el ejemplo 8, y 24 horas después de la operación, se determinó la concentración de los anticuerpos en el músculo plantar y en el plasma por medio de un análisis basado en la electroquimioluminiscencia (ECL). La administración local en la planta de las patas se llevó a cabo de acuerdo con un método similar que se describió en el ejemplo 8, mediante el implante de una lámina de Spongel (una marca registrada de Astellas Pharma) de aproximadamente 2 mg en la porción incisa del músculo plantar, donde esta lámina había sido sumergida y dilatada con 30 µl de una solución que contenía cada anticuerpo en una concentración de 30 mg/ml. [0096]

La concentración de los anticuerpos en el músculo plantar se determinó a partir de muestras de tejido plantar que habían sido homogenizadas con 9 veces su volumen de una solución apropiada para efectuar la homogenización (que fue la solución cOmplete Mini (de Roche), que comprendió Tris 10 mM, NaCl 137 mM, 1% de Triton X-100 y 10% de glicerol y que tuvo un pH de 8,0), y el resultado fue multiplicado por 10. En el análisis basado en la ECL, se usaron anticuerpos anti-1-15 de dos tipos, ANA-IBL-13A y ANA-IBL-52A biotinilado. En este contexto, vale destacar que el anticuerpo ANA-IBL-52A biotinilado fue sometido a una biotinilación de acuerdo con las instrucciones del conjunto de elementos para aplicar marcas con biotina NH₂ (de Dojindo Laboratories, LK03). [0097]

A continuación se proveen diversos detalles acerca del análisis basado en la ECL. El anticuerpo anti-1-15 ANA-IBL-13A fue sometido a una dilución con una solución salina amortiguada con Tris (TBS) en una concentración de 1000 ng/ml y se colocó en una placa con 96 cavidades Multi-array (de Meso Scale Discovery, L15XA-6), a razón de 25 µl/cavidad. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora para inmovilizar el anticuerpo ANA-IBL-13A. La solución que contenía ANA-IBL-13A fue separada por medio de una centrifugación inversa, después de lo cual se sometió la placa a tres lavados con una solución de lavado (TBS que contenía 0,05% de Tween-20) y se agregaron 150 µl/cavidad de una solución de bloqueo a base de caseína en TBS (de Thermo, 37532). Posteriormente, se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora, se eliminó la solución de bloqueo a base de caseína en TBS por medio de una centrifugación inversa y se sometió la placa a tres lavados con la solución de lavado. Las muestras del plasma y las muestras del

músculo plantar homogenizado fueron sometidas a una dilución al 10^0 con un diluyente apropiado (una solución de bloqueo a base de caseína en TBS que contenía 0,05% de Tween-20) y fueron aplicadas a razón de 25 μ l/cavidad. Con el propósito de generar una curva de calibración para las muestras del plasma, se combinaron muestras del anticuerpo h1f.6 que habían sido sometidas a 10 diluciones en serie con un diluyente libre de anticuerpos que contenía 10% de plasma, de manera tal de que su concentración disminuyera desde 333 ng/ml hasta 0,017 ng/ml, y como control se usaron muestras que contenían un diluyente libre de anticuerpos más 10% de plasma. Con el propósito de generar una curva de calibración para las muestras homogenizadas del músculo femoral, se combinaron muestras del anticuerpo h1f.6 que habían sido sometidas a 10 diluciones en serie con un diluyente libre de anticuerpos que contenía 10% de tejido de músculo plantar homogenizado, de manera tal de que su concentración disminuyera desde 333 ng/ml hasta 0,017 ng/ml, y como control se usaron muestras que contenían un diluyente libre de anticuerpos más 10% de tejido de músculo plantar homogenizado. Después de efectuar una incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, se removió la solución por medio de una centrifugación inversa. Se sometió la placa a tres lavados con la solución de lavado y se agregaron 25 μ l/cavidad del anticuerpo ANA-IBL-52A biotinilado, el cual había sido sometido a una dilución con 1000 ng/ml de un diluyente apropiado. Después de incubar a temperatura ambiente durante 1 hora, se separó la solución por medio de una centrifugación inversa. Se sometió la placa a otros tres lavados con la solución de lavado y se agregaron 25 μ l/cavidad de estreptavidina MSD SULFO-TAG (de Meso Scale Discovery, R32AD-1), que había sido sometida a una dilución al 500^0 con un diluyente

apropiado. Se llevó a cabo una incubación a temperatura ambiente durante 1 hora y se separó la solución por medio de una centrifugación inversa. Una vez más, se sometió la placa a tres lavados con la solución de lavado, se agregaron 150 µl/cavidad del amortiguador de lectura MSD T (4x) combinado con un agente tensioactivo apropiado (de Meso Scale Discovery, R92TC-2), el cual había sido sometido a una dilución al medio con agua ultrapura (MilliQ (marca registrada), de Merck), y se determinó la electroquimioluminiscencia de las muestras con un dispositivo generador de imágenes SECTOR 6000 (de Meso Scale Discovery). [0098]

De esta manera, fue posible generar una curva de calibración con la cual pudiera calcularse la concentración de cada uno de los anticuerpos. La ecuación con la cual se determinó la regresión fue sometida a un ajuste con un algoritmo basado en una curva logística con cuatro o cinco parámetros. Mediante el uso de esta curva de calibración, fue posible calcular la concentración de los anticuerpos en el plasma y en el músculo plantar en cada punto de tiempo. Los análisis fueron realizados por triplicado, con lo cual fue posible calcular la media aritmética de la concentración en cada caso. El límite de determinación para el anticuerpo h1f.6 en este estudio de 0,2 ng/ml para la concentración en el plasma y de 2 ng/ml para la concentración en el músculo plantar, y el límite de la determinación para el anticuerpo anti-NGF humano completamente humano 1-15 (N52D-A)-Fab'-PEG 10K fue de 0,5 ng/ml para la concentración en el plasma y de 2 ng/ml para la concentración en el músculo plantar. [0099]

La concentración en el músculo plantar en el grupo que fue sometido a la administración local en la planta de las patas de 900 µg del anticuerpo h1f.6

fue de 132 ng/ml, la concentración en el músculo plantar en el grupo que fue sometido a la administración local en la planta de las patas de 900 µg de 1-15 (N52D-A)-Fab'-PEG 10K fue de 46,2 ng/ml, y la concentración en el músculo plantar en el grupo que fue sometido a la administración intravenosa de 1 mg/kg de 1-15 (N52D-A)-Fab'-PEG 10K fue de 24,1 ng/ml. La concentración en el músculo plantar más alta se obtuvo como resultado de la administración local del anticuerpo h1f.6. Por otra parte, la concentración en el plasma a 24 horas después de la administración fue inferior a 0,230 ng/ml (de los tres casos, en uno se obtuvo un valor de 0,230 ng/ml y en los otros dos se obtuvieron valores inferiores a 0,2 ng/ml), 65,1 ng/ml ó 396 ng/ml, respectivamente, y la concentración en el plasma más baja se obtuvo como resultado de la administración local del anticuerpo h1f.6. [0100]

Sobre la base de la concentración en el músculo plantar y la concentración en el plasma de cada uno de los anticuerpos, se calculó la proporción entre la concentración en el músculo plantar y la concentración en el plasma 24 horas después de la administración para el grupo que fue sometido a la administración local en la planta de las patas de 900 µg del anticuerpo h1f.6, para el grupo que fue sometido a la administración local en la planta de las patas de 900 µg de 1-15 (N52D-A)-Fab'-PEG 10K y para el grupo que fue sometido a la administración intravenosa de 1 mg/kg de 1-15 (N52D-A)-Fab'-PEG 10K. A la concentración en el plasma que se determinó 24 horas después de la administración en el grupo que fue sometido a la administración local en la planta de las patas de 900 µg del anticuerpo h1f.6 se le asignó el valor correspondiente al límite de determinación, 0,2 ng/ml, ya que de hecho fue inferior a éste bajo las condiciones con las que se realizó el estudio. [0101]

La proporción entre la concentración en el músculo plantar y la concentración en el plasma en el grupo que fue sometido a la administración local en la planta de las patas de 900 µg del anticuerpo h1f.6 fue de 628, la proporción entre la concentración en el músculo plantar y la concentración en el plasma en el grupo que fue sometido a la administración local en la planta de las patas de 900 µg de 1-15 (N52D-A)-Fab'-PEG 10K fue de 0,71 y la proporción entre la concentración en el músculo plantar y la concentración en el grupo que fue sometido a la administración intravenosa de 1 mg/kg de 1-15 (N52D-A)-Fab'-PEG 10K fue de 0,061. La proporción entre la concentración en el músculo plantar y la concentración en el plasma que se obtuvo como resultado de la administración local de 1-15 (N52D-A)-Fab'-PEG 10K en la planta de las patas fue más de 10 veces mayor que la que se obtuvo como resultado de la administración intravenosa. Como resultado de una administración local en la planta de las patas, el anticuerpo h1f.6 presentó una proporción entre la concentración en el músculo plantar y la concentración en el plasma que fue 800 veces mayor que la que se obtuvo con 1-15 (N52D-A)-Fab'-PEG 10K. [0102]

Sobre la base de los resultados que se han descrito, puede concluirse que la administración local del anticuerpo h1f.6, que es un fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención, puede tener como consecuencia una menor concentración del anticuerpo en el flujo sanguíneo sistémico, sin que se vea afectada su concentración en el sitio en el que se desee efectuar el tratamiento, y que este anticuerpo, que una vez más, puede mantenerse en una concentración más baja en el flujo sanguíneo sistémico y en una concentración similar en el sitio en el que se desea efectuar el

tratamiento, resultaría más eficaz que el anticuerpo anti-NGF humano completamente humano 1-15 (N52D-A)-Fab'-PEG 10K. Por lo tanto, el fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención podría resultar útil como medicamento, ya que debería presentar menos efectos secundarios sistémicos y podría ejercer un efecto similar en los sitios que se deseara tratar.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL [0103]

Se espera que el fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención sea útil en el contexto del tratamiento del dolor postoperatorio. Se espera que el fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención sea particularmente útil como un agente farmacéutico superior, ya que debería presentar menos efectos secundarios sistémicos como resultado de su exposición en la sangre y podría ejercer el efecto deseado en los sitios que se deseara tratar.

TEXTO LIBRE DEL LISTADO DE SECUENCIAS [0104]

Se provee información acerca de cada una de las “secuencias artificiales” numeradas, que presentan el encabezado <223> en el listado de secuencias adjunto. Específicamente, la secuencia de bases que se representa como SEQ ID N° 1 en el listado de secuencias corresponde a la secuencia de bases de un fragmento de la cadena pesada del anticuerpo h1f.6, y la secuencia de aminoácidos que se representa como SEQ ID N° 5 en el listado de secuencias corresponde a la secuencia de aminoácidos del fragmento de la cadena pesada que está codificado por SEQ ID N° 1. La secuencia de bases que se representa como SEQ ID N° 2 en el listado de secuencias corresponde a la secuencia de bases de un fragmento de la cadena pesada del anticuerpo

h1f.7, y la secuencia de aminoácidos que se representa como SEQ ID N° 6 en el listado de secuencias corresponde a la secuencia de aminoácidos del fragmento de la cadena pesada que está codificado por SEQ ID N° 2. La secuencia de bases que se representa como SEQ ID N° 3 en el listado de secuencias corresponde a la secuencia de bases de un fragmento de la cadena pesada del anticuerpo h1f.8, y la secuencia de aminoácidos que se representa como SEQ ID N° 7 en el listado de secuencias corresponde a la secuencia de aminoácidos del fragmento de la cadena pesada que está codificado por SEQ ID N° 3. La secuencia de bases que se representa como SEQ ID N° 4 en el listado de secuencias corresponde a la secuencia de bases de la cadena liviana del fragmento 1-15 (N52D-A)-Fab', y la secuencia de aminoácidos que se representa como SEQ ID N° 8 en el listado de secuencias corresponde a la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que está codificada por SEQ ID N° 4. La secuencia de bases que se representa como SEQ ID N° 9 en el listado de secuencias corresponde a la secuencia de bases de la región variable de cadena pesada del fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención, y la secuencia de aminoácidos que se representa como SEQ ID N° 10 en el listado de secuencias corresponde a la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada que está codificada por SEQ ID N° 9. La secuencia de bases que se representa como SEQ ID N° 11 en el listado de secuencias corresponde a la secuencia de bases de la región variable de la cadena liviana del fragmento de anticuerpo Fab anti-NGF humano de la presente invención, y la secuencia de aminoácidos que se representa como SEQ ID N° 12 en el listado de secuencias corresponde a la

secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana que está codificada por SEQ ID N° 11.