

ANTICUERPOS ANTI-NGF Y MÉTODOS DE ESTOS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención hace referencia al campo de la inmunología. Más específicamente, la presente invención hace referencia a proteínas de unión a antígeno anti-NGF que se unen específicamente a NGF que fueron modificadas para tornarse no inmunogénicas en especies de interés. La invención también hace referencia al uso de dichas proteínas de unión a antígeno en el tratamiento y/o la prevención de trastornos relacionados con NGF, particularmente, dolor.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El factor de crecimiento nervioso (NGF) fue la primera neurotrofina identificada y se ha caracterizado su función en el desarrollo y la supervivencia tanto de neuronas periféricas como centrales. Se ha demostrado que el NGF es un factor de supervivencia y mantenimiento crítico en el desarrollo de neuronas sensoriales embrionarias y simpáticas periféricas y de neuronas colinérgicas del prosencéfalo (Smeyne et ál., *Nature* 368:246-249 (1994) y Crowley et ál., *Cell* 76: 1001-1011 (1994)). El NGF regula por aumento la expresión de neuropéptidos en neuronas sensoriales (Lindsay et ál., *Nature* 337:362-364 (1989)) y dos receptores unidos a membranas diferentes median su actividad, el receptor de tirosina cinasa TrkA y el receptor de neurotrofina común p75 (a los que a menudo se hace referencia como receptores de NGF de «afinidad elevada» y «baja afinidad», respectivamente), lo que se relaciona estructuralmente a otros miembros de la familia de receptor de necrosis tumoral (Chao et ál., *Science* 232:518-521 (1986)).

Además de sus efectos en el sistema nervioso, NGF se ha involucrado cada vez más en procesos fuera del sistema nervioso. Por ejemplo, se ha observado que NGF aumenta la permeabilidad vascular (Otten et ál., *Eur J Pharmacol.* 106: 199-201 (1984)), mejora las respuestas inmunitarias de células T y B (Otten et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10059-10063 (1989)), induce la diferenciación de linfocitos y la proliferación de mastocitos, y provoca la liberación de señales biológicas solubles desde los mastocitos (Matsuda et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6508-6512 (1988); Pearce, et ál., *J. Physiol.* 372:379-393 (1986); Bischoff, et ál., *Blood* 79:2662-2669 (1992); Horigome, et ál., *J. Biol. Chem.* 268:14881-14887 (1993)).

Varios tipos de células producen NGF y estas incluyen mastocitos (Leon et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3739-3743 (1994)), linfocitos B (Torcia et ál., *Cell* 85:345-356 (1996)), queratinocitos (Di Marco et ál., *J. Biol. Chem.* 268: 22838-22846)), células de músculos lisos (Ueyama et ál., *J. Hypertens.* 11: 1061-1065 (1993)), fibroblastos (Lindholm et ál., *Eur. J. Neurosci.* 2:795-801 (1990)), células epiteliales bronquiales (Kassel et ál., *Clin. Exp. Allergy* 31:1432-40 (2001)), células mesangiales renales (Steiner et ál., *Am. J. Physiol.* 261: F792-798

(1991)) y miotubos de músculos esqueléticos (Schwartz et ál., *J Photochem. Photobiol. B*66: 195-200 (2002)). Se han encontrado receptores de NGF en una variedad de tipos de células fuera del sistema nervioso. Por ejemplo, se ha encontrado TrkA en monocitos, linfocitos T y B y mastocitos humanos.

Se ha observado una asociación entre niveles elevados de NGF y una variedad de afecciones inflamatorias en pacientes humanos, así como en varios modelos animales. Esto incluye lupus eritematoso sistémico (Bracci-Laudiero et ál., *Neuroreport* 4:563-565 (1993)), esclerosis múltiple (Bracci-Laudiero et ál., *Neurosci. Lett.* 147:9-12 (1992)), psoriasis (Raychaudhuri, et ál., *Acta Derm. l'enereol.* 78:84-86 (1998)), artritis (Falcim et ál., *Ann. Rheum. Dis.* 55:745-748 (1996)), cistitis intersticial (Okragly et ál., *J. Urology* 161: 438-441 (1999)) y asma (Braun et ál., *Eur. J Immunol.* 28:3240-3251 (1998)). Un nivel de NGF constantemente elevado en tejidos periféricos se asocia con hiperalgesia e inflamación, y se ha observado en varias formas de artritis. La membrana sinovial de pacientes afectados con artritis reumatoide expresa niveles elevados de NGF, al tiempo que se ha informado que el NGF no es detectable en membranas sinoviales no inflamadas (Aloe et ál., *Arch. Rheum.* 35:351-355 (1992)). Se observaron resultados similares en ratas con artritis reumatoide experimentalmente inducida (Aloe et ál., *Clin. Exp. Rheumatol.* 10:203-204 (1992)). Se han informado niveles elevados de NGF en ratones artríticos transgénicos junto con un aumento de la cantidad de mastocitos (Aloe et ál., *Int. J. Tissue Reactions-Exp. Clin. Aspects* 15:139-143 (1993)).

La osteoartritis (OA) es una de las enfermedades musculoesqueléticas crónicas más comunes en perros y afecta a 20 % de la población canina mayor de un año. El desarrollo de OA es principalmente secundario a traumatismos, inestabilidad de articulaciones y enfermedades tales como displasia de cadera. La osteoartritis es una afección que afecta a la articulación entera y tanto cambios inflamatorios como degenerativos de todas las estructuras articulares producen discapacidad y signos clínicos de cojera y dolor. El dolor es la manifestación clínica más importante de la OA canina y se debe a una interacción compleja entre cambios estructurales de las articulaciones, alteraciones bioquímicas y moleculares, así como mecanismos de procesamiento de dolor centrales y periféricos. En dicha red, la activación y la sensibilización de nociceptores periféricos mediante mediadores inflamatorios e hiperalgésicos (por ejemplo, citocinas, prostaglandinas y neuromedadores) es uno de los mecanismos periféricos principales responsables del dolor articular. El tratamiento del dolor canino con un medicamento no farmacéutico que daría alivio durante períodos más largos de tiempo que el tratamiento de dolor clásico en canes es una necesidad claramente no atendida.

Solo en los Estados Unidos de América, aproximadamente 14.5 millones de perros padecen de OA (encuesta de 2010). Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) son la

categoría de fármaco más comúnmente prescrita por veterinarios, pero su eficacia y tolerabilidad son limitadas. La investigación de mercado indica que se trata a aproximadamente 9 millones de perros con AINE en los EUA. Rara vez se usan corticosteroides y, usualmente, durante un período de tiempo breve y como último recurso. Claramente, sigue siendo necesario un producto seguro y conveniente para el tratamiento eficaz de perros con OA.

En felinos, OA es un cambio patológico de una articulación sinovial diartrodial que se caracteriza por el deterioro del cartílago articular, formación de osteofitos, remodelación ósea, cambios en tejidos blandos y una inflamación no purulenta de bajo grado. Aunque se han descrito los rasgos radiográficos de OA felinos, existe poca información sobre los signos clínicos de la enfermedad y puede no diagnosticarse. La dificultad para evaluar la cojera en gatos se debe a su tamaño pequeño y su agilidad natural, lo cual les permite compensarla. Sin embargo, se cree que los signos clínicos de OA felina incluyen reducción de peso, anorexia, depresión, eliminación anormal de hábitos, poco aseo, comportamiento agresivo y una reducción gradual de la capacidad para saltar debido a una cojera notoria. Debido al diagnóstico equivocado, la OA felina no es generalmente tratada y representa una necesidad médica veterinaria no atendida.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La invención provee una proteína de unión a antígeno anti-NGF novedosa (anticuerpo, fragmento de anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, parte de unión a antígeno, anticuerpo antagonista, etc., tal como se definen y se usan de forma indistinta en la presente) y polinucleótidos que la codifican. La invención también provee métodos para producir y usar dichas proteínas de unión a antígeno en el tratamiento y/o nucleótidos en el tratamiento y/o la prevención de trastornos relacionados con NGF, particularmente, dolor, en un sujeto. Además, la invención provee composiciones farmacéuticas y usos para el tratamiento de trastornos relacionados con NGF, particularmente, dolor, en un sujeto.

En un aspecto, la presente invención provee una proteína de unión a antígeno recombinante que se une específicamente al factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende una cadena ligera variable (VL) que comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende secuencias de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO.1 o SEQ ID NO.21; una región determinante de complementariedad 1 (CDR2) que comprende secuencias de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID. NO.2 o SEQ ID NO.22; una región determinante de complementariedad 1 (CDR3) que comprende secuencias de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID. NO.3 o SEQ ID NO.23; y una cadena pesada variable (VH) que comprende: una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende secuencias de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID. NO.4 o SEQ ID NO.24; una región

determinante de complementariedad 1 (CDR2) que comprende secuencias de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID. NO.5 o SEQ ID NO.25; y una región determinante de complementariedad 1 (CDR3) que comprende secuencias de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID. NO.6 o SEQ ID NO.26; y cualesquiera
5 variantes de estas con una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en al menos una de CDR1, CDR2 o CDR3 en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno.

En una modalidad, la presente invención prevé que la proteína de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una región determinante de
10 complementariedad 1 (CDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO. 1; una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos alrededor de 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO. 2; una región determinante de complementariedad 3
15 (CDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos alrededor de 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO. 3; y una región variable de cadena pesada (VH) que comprende: una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos alrededor de 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que comprende la
20 SEQ ID NO. 4; una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos alrededor de 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO. 5; una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos alrededor de 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que comprende la
25 SEQ ID NO. 6; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en al menos una de CDR1, CDR2 o CDR3 en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno.

En una modalidad, la presente invención prevé que la proteína de unión a antígeno de la invención comprende una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que comprende la
30 SEQ ID NO. 21; una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos alrededor de 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO. 22; una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos

alrededor de 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO. 23; y una región variable de cadena pesada (VH) que comprende: una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos alrededor de 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO. 24; una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos alrededor de 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO. 25; una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos alrededor de 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO. 26; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en al menos una de CDR1, CDR2 o CDR3 en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno.

En un aspecto, la presente invención provee una proteína de unión a antígeno recombinante que se une específicamente al factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO. 7; SEQ ID NO.9; SEQ ID NO. 27; SEQ ID NO.29; SEQ ID NO.55; SEQ ID NO.71; SEQ ID NO.73; SEQ ID NO.83; SEQ ID NO.85; SEQ ID NO.87; SEQ ID NO.89 y SEQ ID NO.91; una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO. 8; SEQ ID NO.10; SEQ ID NO. 28; SEQ ID NO.30; SEQ ID NO.56; SEQ ID NO.67; SEQ ID NO.69; SEQ ID NO.75; SEQ ID NO.77; SEQ ID NO.79 y SEQ ID NO. 81; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno.

En una modalidad, la invención prevé que la proteína de unión a antígeno recombinante de la invención comprende la cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 7 y la cadena pesada variable comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 8; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno. En una modalidad, la invención prevé una proteína de unión a antígeno recombinante, en donde la cadena ligera variable comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 27 y la cadena pesada variable comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de

secuencia con la SEQ ID NO. 28; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno.

En una modalidad, la invención prevé que la proteína de unión a antígeno recombinante de la invención comprende la cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 9 y la cadena pesada variable comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 10; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno. En una modalidad, la invención prevé que la proteína de unión a antígeno recombinante de la invención comprende la cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 29 y la cadena pesada variable comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 30; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno.

En una modalidad, la invención prevé que la proteína de unión a antígeno recombinante de la invención comprende la cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 55 y la cadena pesada variable comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 56; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno.

En una modalidad, la invención prevé que la proteína de unión a antígeno recombinante de la invención comprende la cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 91 y la cadena pesada variable comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 79; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno. En una modalidad, la invención prevé que la proteína de unión a antígeno recombinante de la invención comprende la cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 87 y la cadena pesada variable comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 79; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en cualquiera de las regiones de cadena ligera

variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno. En una modalidad, la invención prevé que la proteína de unión a antígeno recombinante de la invención comprende la cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 91 y la cadena pesada variable comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 75; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno. En una modalidad, la invención prevé que la proteína de unión a antígeno recombinante de la invención comprende la cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 87 y la cadena pesada variable comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 89; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno. En una modalidad, la invención prevé que la proteína de unión a antígeno recombinante de la invención comprende la cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 91 y la cadena pesada variable comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 75; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno. En una modalidad, la presente invención provee una proteína de unión a antígeno recombinante que se une específicamente al factor de crecimiento nervioso (NGF) que también comprende una región constante que comprende los aminoácidos seleccionados de SEQ ID NO. 41 o 43. En una modalidad, la presente invención provee una secuencia de nucleótidos que codifica una región constante seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO. 42 o la SEQ ID NO. 44. En una modalidad, la región constante de la proteína de unión a antígeno de la presente invención carece de función efectora. En una modalidad, las alteraciones de la región constante de la proteína de unión a antígeno de la invención previenen la degradación de la proteína de unión a antígeno.

En una modalidad, la presente invención provee una proteína de unión a antígeno recombinante que se une específicamente a NGF que comprende además una región constante que comprende la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO.62. En una modalidad, la presente invención provee una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante que comprende la SEQ ID NO. 63. En una modalidad, la región constante de la proteína de unión a antígeno de la presente invención carece de función efectora. En una modalidad, las alteraciones de la región constante de la proteína de unión a antígeno de la invención previenen la

degradación de la proteína de unión a antígeno.

En un aspecto, la presente invención provee secuencias de nucleótidos que codifican la proteína de unión a antígeno recombinante de la invención que se une específicamente al factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende una cadena ligera variable (VL) que comprende
5 secuencias de ácido nucleico de una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO.11 o SEQ ID NO.31; y una región determinante de complementariedad 1 (CDR2) que comprende secuencias de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID. NO.12 o SEQ ID NO.32; y una región determinante de complementariedad 1 (CDR3) que comprende secuencias de nucleótidos con al
10 menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID. NO.13 o SEQ ID NO.33; y una cadena pesada variable (VH) que comprende: una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende secuencias de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID. NO.14 o SEQ ID NO.34; y una región determinante de complementariedad 1 (CDR2) que comprende secuencias de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ
15 ID. NO.15 o SEQ ID NO.35; y una región determinante de complementariedad 1 (CDR3) que comprende secuencias de aminoácidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID. NO.15 o SEQ ID NO.36; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de ácidos nucleicos con base en la degeneración del código genético en al menos una de CDR1, CDR2 o CDR3 en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha
20 proteína de unión a antígeno.

En una modalidad, la presente invención provee una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno de la invención que comprende una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la
25 secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO. 11; una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos alrededor de 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO. 12; una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos alrededor de 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO. 13; y una región variable de cadena pesada (VH) que comprende: una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos alrededor de 90 % de identidad de
30 secuencia con la secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO. 14; una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos alrededor de 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos que

comprende la SEQ ID NO. 15; una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos alrededor de 90 % de identidad de secuencia con la secuencia nucleica que comprende la SEQ ID NO. 16; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de ácidos nucleicos con base en la degeneración del código genético en al menos una de CDR1, CDR2 o CDR3 en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno.

En una modalidad, la presente invención provee una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno de la invención y que comprende nucleótidos que codifican una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO. 31; una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos alrededor de 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO. 32; una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos alrededor de 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO. 33; y secuencias de nucleótidos que codifican una región variable de cadena pesada (VH) que comprende: una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos alrededor de 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO. 34; una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos alrededor de 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO. 35; una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos alrededor de 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO. 36; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de ácidos nucleicos con base en la degeneración del código genético en al menos una de CDR1, CDR2 o CDR3 en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno.

En un aspecto, la presente invención provee una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de unión a antígeno recombinante de la invención que se une específicamente al factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende nucleótidos que codifican una cadena ligera variable que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con las secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO. 17; SEQ ID NO.19; SEQ ID NO. 37; SEQ ID NO.39; SEQ ID NO.57; SEQ ID NO. 88, SEQ ID NO. 90 y SEQ ID NO. 92 y nucleótidos que codifican una cadena pesada variable que comprende

una secuencia de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con las secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO. 18; SEQ ID NO.20; SEQ ID NO. 38; SEQ ID NO.40; SEQ ID NO. 58; SEQ ID.76 y la SEQ ID NO. 80; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de ácidos nucleicos con base en la degeneración del código genético en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno.

En una modalidad, la invención prevé que las secuencias de nucleótidos que codifican la proteína de unión a antígeno recombinante de la invención comprendan secuencias de nucleótidos que codifican la cadena ligera variable que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 17 y secuencias de nucleótidos que codifican la cadena pesada variable que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 18; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de ácidos nucleicos con base en la degeneración del código genético en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno.

En una modalidad, la invención provee una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de unión a antígeno de la invención, en donde las secuencias de nucleótidos codifican la cadena ligera variable que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 37 y secuencias de nucleótidos que codifican la cadena pesada variable que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 38; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de ácidos nucleicos con base en la degeneración del código genético en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno.

En una modalidad, la invención prevé que las secuencias de nucleótidos que codifican la proteína de unión a antígeno recombinante de la invención comprendan secuencias de nucleótidos que codifican la cadena ligera variable que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 19 y secuencias de nucleótidos que codifican la cadena pesada variable que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 20; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de ácidos nucleicos con base en la degeneración del código genético en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno.

En una modalidad, la invención provee una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de unión a antígeno de la invención, en donde las secuencias de nucleótidos codifican la cadena ligera variable que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 39 y secuencias de nucleótidos que codifican la cadena pesada variable que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de

secuencia con la SEQ ID NO. 40; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de ácidos nucleicos con base en la degeneración del código genético en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno.

En una modalidad, la invención prevé que las secuencias de nucleótidos que codifican la proteína de unión a antígeno recombinante de la invención comprendan secuencias de nucleótidos que codifican la cadena ligera variable que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 57 y secuencias de nucleótidos que codifican la cadena pesada variable que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 58; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de ácidos nucleicos con base en la degeneración del código genético en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno.

En una modalidad, la invención prevé que las secuencias de nucleótidos que codifican la proteína de unión a antígeno recombinante de la invención comprendan secuencias de nucleótidos que codifican la cadena ligera variable que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 92 y secuencias de nucleótidos que codifican la cadena pesada variable que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 80; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de ácidos nucleicos con base en la degeneración del código genético en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno.

En una modalidad, la invención provee una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de unión a antígeno de la invención, en donde las secuencias de nucleótidos codifican la cadena ligera variable que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 88 y secuencias de nucleótidos que codifican la cadena pesada variable que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 80; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de ácidos nucleicos con base en la degeneración del código genético en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno. En una modalidad, la invención prevé que las secuencias de nucleótidos que codifican la proteína de unión a antígeno recombinante de la invención comprendan secuencias de nucleótidos que codifican la cadena ligera variable que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 92 y secuencias de nucleótidos que codifican la cadena pesada variable que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 76; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de ácidos nucleicos con base en la degeneración del código genético en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno.

En una modalidad, la invención provee una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de unión a antígeno de la invención, en donde las secuencias de nucleótidos codifican la cadena ligera variable que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 88 y secuencias de nucleótidos que codifican la cadena pesada variable que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 76; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de ácidos nucleicos con base en la degeneración del código genético en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno. En una modalidad, la invención prevé que las secuencias de nucleótidos que codifican la proteína de unión a antígeno recombinante de la invención comprendan secuencias de nucleótidos que codifican la cadena ligera variable que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 90 y secuencias de nucleótidos que codifican la cadena pesada variable que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 76; y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de ácidos nucleicos con base en la degeneración del código genético en cualquiera de las regiones de cadena ligera variable o pesada variable de dicha proteína de unión a antígeno.

En una o más modalidades, la proteína de unión a antígeno de la invención inhibe la unión de NGF al receptor TrkA. En una o más modalidades, la proteína de unión a antígeno de la invención inhibe la función biológica asociada con la unión de NGF al receptor TrkA. En una o más modalidades, la proteína de unión a antígeno de la invención inhibe la unión de NGF a ambos receptores TrkA. En una o más modalidades, la proteína de unión a antígeno inhibe la función biológica asociada a la unión de NGF a TrkA con o sin los receptores p75, lo que incluye el bloqueo de la transducción de señal y las vías asociadas con la unión de NGF al receptor TrkA.

En una o más modalidades, la proteína de unión a antígeno de la invención reduce o elimina un trastorno relacionado con NGF mediante la interrupción de la señal asociada con la unión de NGF a los receptores TrkA y p75. En una o más modalidades, el trastorno relacionado con NGF se selecciona del grupo que consiste en: enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, obesidad, diabetes tipo 2, síndrome metabólico, dolor e inflamación. En una modalidad, el trastorno relacionado con NGF es dolor. En una modalidad, dicho trastorno relacionado con NGF es un trastorno de dolor y se selecciona del grupo que consiste en: dolor por osteoartritis, dolor por artritis reumatoide, dolor quirúrgico y posquirúrgico, dolor por una incisión, dolor inflamatorio general, dolor por cáncer, dolor debido a traumatismo, dolor neuropático, neuralgia, dolor por neuropatía diabética, dolor asociado con enfermedades reumáticas, dolor asociado con enfermedades musculoesqueléticas, dolor visceral y dolor gastrointestinal. En una modalidad, el trastorno relacionado con NGF comprende dolor por osteoartritis. En una modalidad, el trastorno

relacionado con NGF comprende dolor quirúrgico y posquirúrgico. En una modalidad, el trastorno relacionado con NGF comprende dolor por cáncer.

En uno o más aspectos, la proteína de unión a antígeno de la invención se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de cadena simple, un anticuerpo tetramérico, un anticuerpo tetravalente, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo específico para un dominio, un anticuerpo con dominio eliminado, una proteína de fusión, una proteína de fusión ScFc, un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fv, un fragmento ScFv, un fragmento Fd, un anticuerpo de dominio simple, un fragmento dAb, un nanocuerpo inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP) y una molécula de IgNAR. En una modalidad, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo monoclonal. En una modalidad, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo quimérico.

En una modalidad, la proteínas de unión a antígeno de la invención se selecciona de anticuerpo monoclonal canino o caninizado, un anticuerpo monoclonal felinizado, un anticuerpo monoclonal equinizado o un anticuerpo monoclonal humanizado. En una modalidad, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo canino o caninizado. En una modalidad, la proteína de unión a antígeno de la presente invención es un anticuerpo felinizado. En una modalidad, la proteína de unión a antígeno de la presente invención es un anticuerpo equinizado. En una modalidad, la proteína de unión a antígeno de la presente invención es un anticuerpo humanizado.

En uno o más aspectos, la invención provee una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de unión a antígeno y un portador farmacéuticamente aceptable. En una modalidad, la invención provee una composición veterinaria que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de unión a antígeno y un portador farmacéuticamente aceptable. En una modalidad, la invención provee una composición veterinaria o farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de unión a antígeno y un portador farmacéuticamente aceptable. En una modalidad, la composición farmacéutica de la invención se usa en el tratamiento de un trastorno relacionado con NGF. En una modalidad, el trastorno relacionado con NGF se selecciona del grupo que consiste en: enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, obesidad, diabetes tipo 2, síndrome metabólico, dolor e inflamación. En una modalidad, el trastorno relacionado con NGF comprende dolor. En una modalidad, la composición farmacéutica se usa en el tratamiento del dolor. En una modalidad, la composición farmacéutica se usa para el tratamiento de un dolor y el tipo de dolor se selecciona de dolor por osteoartritis, dolor por artritis reumatoide, dolor quirúrgico y posquirúrgico, dolor por una incisión, dolor inflamatorio general, dolor por cáncer, dolor debido a traumatismo, dolor neuropático, neuralgia, dolor por neuropatía diabética, dolor asociado con enfermedades reumáticas, dolor asociado con enfermedades musculoesqueléticas, dolor visceral y dolor

gastrointestinal. En una modalidad, el dolor comprende dolor por osteoartritis. En una modalidad, el dolor comprende dolor quirúrgico y posquirúrgico. En una modalidad, el dolor comprende dolor por cáncer. En una o más modalidades, la composición farmacéutica de la invención es para uso en un can. En una o más modalidades, la composición farmacéutica de la invención es para uso en felinos. En una o más modalidades, la composición farmacéutica de la invención es para uso en equinos. En una o más modalidades, la composición farmacéutica de la invención es para uso en seres humanos.

En una o más modalidades, la composición farmacéutica de la invención no tiene efectos adversos significativos en el sistema inmunitario de un can. En una modalidad, la composición de la invención no tiene efectos adversos significativos en el sistema inmunitario de un felino. En una o más modalidades, la composición de la invención no tiene efectos adversos significativos en el sistema inmunitario de un equino. En una modalidad, la composición de la invención no tiene efectos adversos significativos en el sistema inmunitario de un ser humano. En una modalidad, la composición farmacéutica es una composición veterinaria.

En una o más modalidades, la presente invención provee una célula hospedadora que produce una o más de las proteínas de unión a antígeno de la presente invención.

En una o más modalidades, la invención provee un vector que comprende uno o más de los ácidos nucleicos de la presente invención.

En una o más modalidades, la invención provee una célula hospedadora que comprende uno o más de los ácidos nucleicos de la presente invención.

En una o más modalidades, la invención provee una célula hospedadora que comprende el vector que comprende uno o más de los ácidos nucleicos de la presente invención.

En una o más modalidades, la invención provee una célula hospedadora que comprende uno o más de los ácidos nucleicos de la presente invención.

En uno o más aspectos, la presente invención provee un método para producir la proteína de unión a antígeno de la invención al cultivar la célula hospedadora de la invención en condiciones que resultan en la producción de la proteína de unión a antígeno y, posteriormente, aislar la proteína de unión a antígeno de la célula hospedadora o medio de cultivo de la célula hospedadora.

En uno más aspectos, la presente invención provee un método para el tratamiento de un trastorno relacionado con NGF en un sujeto, el que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica o veterinaria de la presente invención. En una modalidad, la invención prevé que el trastorno relacionado con NGF se seleccione del grupo que consiste en: enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, obesidad, diabetes tipo 2, síndrome metabólico, dolor e inflamación. En una modalidad, el trastorno

relacionado con NGF comprende dolor. En una modalidad, el trastorno relacionado con NGF es un trastorno de dolor y se selecciona del grupo que consiste en: dolor por osteoartritis, dolor por artritis reumatoide, dolor quirúrgico y posquirúrgico, dolor por una incisión, dolor inflamatorio general, dolor por cáncer, dolor debido a traumatismo, dolor neuropático, neuralgia, dolor por neuropatía diabética, dolor asociado con enfermedades reumáticas, dolor asociado con enfermedades musculoesqueléticas, dolor visceral y dolor gastrointestinal. En una modalidad, el trastorno relacionado con NGF comprende dolor por osteoartritis. En una modalidad, el trastorno relacionado con NGF comprende dolor quirúrgico y posquirúrgico. En una modalidad, el trastorno relacionado con NGF es dolor por cáncer. En una modalidad, el sujeto se selecciona del grupo que consiste en canes, felinos, humanos y equinos. En una modalidad, el sujeto comprende caninos. En una modalidad, el sujeto comprende felinos. En una modalidad, el sujeto comprende equinos. En una modalidad, el sujeto comprende seres humanos.

En una o más modalidades, la presente invención provee un método para detectar o cuantificar los niveles de NGF en una muestra biológica y el método comprende:

- (a) incubar una muestra clínica o biológica que contiene NGF en presencia de cualquiera de las proteínas de unión a antígeno de la presente invención y
- (b) detectar las proteínas de unión a antígeno que están unidas a NGF en la muestra.

En algunas modalidades, la proteína de unión a antígeno de la invención está etiquetada de forma detectable. En algunas modalidades, la proteína de unión a antígeno no etiquetada se usa en combinación con una segunda proteína de unión a antígeno o fragmentos que están etiquetados de forma detectable. En una modalidad, la invención comprende un kit que comprende la proteína de unión a antígeno de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: es una representación esquemática de la estructura general de una molécula de inmunoglobulina G (IgG) de ratón en la que se resalta el sitio de unión a antígeno.

Figura 2: es una representación esquemática de la estructura general de una IgG quimérica de ratón/canina.

Figura 3: es una ilustración que muestra la especiación o «caninización» de una IgG de ratón y se injertan CDR de ratón en marcos caninos. Esta figura también representa la felinización, equinización, humanización y otras especiaciones, tal como se define en la presente.

Figura 4 es una ilustración de un anticuerpo monoclonal «heterodimérico» que aparea la cadena ligera quimérica con una cadena pesada completamente caninizada.

Figura 5 es una ilustración de cadenas variables de anticuerpos en las que se observan

cebadores para regiones constantes y cebadores degenerados dirigidos a regiones variables de ratón.

Figura 6 es una representación del efecto de mAb anti-NGF ZTS-841 y ZTS-842 en señalización de pERK-1/2 inducida por NGF canino en células caTrkA-CHO.

Figura 7 es una representación de la versión caninizada del mAb aD11, un control negativo, y el mAb 13L11 en señalización de pERK-1/2 inducida por NGF canino en células caTrkA-CHO.

Figura 8 es una representación de mAb anti-NGF en la proliferación de células TF-1 inducida por NGF de mAb ZTS-841 y ZTS-842.

Figura 9 es una representación de mAb anti-NGF en la proliferación de TF-1 inducida por NGF con los mAb fel48L2VH1.1, fel48L2VH1.2 y quimera 48L2.

Figura 10 es una representación de mAb anti-NGF ZTS 841 administrado en dosis SC/SC/IV de 2.0 mg/kg en ensayos farmacocinéticos.

Figura 11 es una representación de mAb anti-NGF ZTS 842 administrado en dosis SC/SC/IV de 2.0 mg/kg en ensayos farmacocinéticos.

Figura 12 es una representación esquemática del ensayo de MIA de rata.

Figura 13 es una representación gráfica del mAb 841 en dosis que varían de 0.1-2 mg/kg en el ensayo de MIA de rata.

Figura 14 es una representación gráfica del mAb 841 en dosis que varían de 0.01-2.0 mg/kg en el ensayo de MIA de rata.

Figura 15 es una representación gráfica del mAb 842 en dosis de 0.5 y 2 mg/kg en el ensayo de MIA de rata.

Figure 16 es una representación gráfica de VAS de cojera con mAb 841 para grupos de tratamiento luego de tres y cinco horas la inducción de sinovitis en el modelo de sinovitis LPS.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

<u>SEQ ID NO.</u>	<u>DESCRIPCIÓN</u>	<u>SECUENCIA</u>
1	Secuencia de aminoácidos para CDR1 de cadena ligera variable de ZTS-841	TNNIGILG
2	Secuencia de aminoácidos para CDR2 de cadena ligera variable de ZTS-841	GNG
3	Secuencia de aminoácidos para CDR3 de cadena ligera variable de	QSFDTTLGAHV

		ZTS-841	
5	4	Secuencia de aminoácidos para CDR1 de cadena pesada variable de ZTS-841	GFTFSSHG
	5	Secuencia de aminoácidos para CDR2 de cadena pesada variable de ZTS-841	INSGGSST
	6	Secuencia de aminoácidos para CDR3 de cadena pesada variable de ZTS-841	AKESVGGWEQLVGPHFDY
10	7	Secuencia de aminoácidos para cadena ligera variable de ZTS-841	QSVLTQPTSVSGSLGQRVTISCSGSTNNIGILGASWYQLF PGKAPKLLVYGNGNRPSGVPDRFSGADSGDSVTLTITGL QAEDEADYYCQSFDTTLGAHVFGGGTHLTVL
15	8	Secuencia de aminoácidos para cadena pesada variable de ZTS-841	EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSSHGMHWVR QSPGKGLQWVAVINSGGSSTYYTDAVKGRFTISRDNANKN TVYLQMNSLRAEDTAMYYCAKESVGGWEQLVGPHFDY WGQGTLVIVSS
20	9	Secuencia de aminoácidos para cadena ligera variable de canfel_chimera 841	QSVLTQPTSVSGSLGQRVTISCSGSTNNIGILGASWYQLF PGKAPKLLVYGNGNRPSGVPDRFSGADSGDSVTLTITGL QAEDEADYYCQSFDTTLGAHVFGGGTHLTVL
25	10	Secuencia de aminoácidos para cadena pesada variable de canfel_chimera 841	EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSSHGMHWVR QSPGKGLQWVAVINSGGSSTYYTDAVKGRFTISRDNANKN TVYLQMNSLRAEDTAMYYCAKESVGGWEQLVGPHFDY WGQGTLVIVSS
30	11	Secuencia de nucleótidos para CDR1 de cadena ligera variable de ZTS-841	ACGAACAACATCGGTATTCTTGGT
	12	Secuencia de nucleótidos para CDR2 de cadena ligera variable de ZTS-841	GGTAATGGG
	13	Secuencia de nucleótidos para CDR3 de cadena ligera variable de ZTS-841	CAGTCCTTTGATACCACGCTTGGTGCTCATGTGTTC
	14	Secuencia de nucleótidos para	GGATTCACCTTCAGTAGCCACGGC

5

10

15

20

25

30

	CDR1 de cadena pesada variable de ZTS-841	
15	Secuencia de nucleótidos para CDR2 de cadena pesada variable de ZTS-841	ATTAACAGCGGTGGAAGTAGCACA
16	Secuencia de nucleótidos para CDR3 de cadena pesada variable de ZTS-841	GCAAAGGAGTCCGTCTGGGGGGTGGGAGCAACTGGTC GGACCTCATTTTGACTAC
17	Secuencia de nucleótidos para cadena ligera variable de ZTS 841	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCGACCTCAGTGTCAGGGT CCCTTGGCCAGAGGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAG CACGAACAACATCGGTATTCTTGGTGCGAGCTGGTACC AACTGTTCCAGGAAAGGCCCTAACTCCTCGTGTAC GGTAATGGGAATCGACCGTCAGGGGTCCCTGACCGGT TTCCGGCGCCGACTCTGGCGACTCAGTCACCCTGAC CATCACTGGGCTTCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTAT TACTGCCAGTCCTTTGATACCACGCTTGGTGCTCATGT GTTCCGGCGGAGGCACCCACCTGACCGTCCTT
18	Secuencia de nucleótidos para cadena pesada variable de ZTS-841	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGATTTGGTGA AGCCTGGGGGGTCTTGAGACTGTCCTGTGTGGCCTC TGGATTACCTTCAGTAGCCACGGCATGCACTGGGTC CGTCAGTCTCCAGGGAAGGGACTGCAGTGGGTCTGCAG TTATTAACAGCGGTGGAAGTAGCACATACTACACAGAC GCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACG CCAAGAACACAGTGTATCTACAGATGAACAGCCTGAGA GCCGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAAGGAGT CCGTCTGGGGGGTGGGAGCAACTGGTCGGACCTCATTT TGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCATCGTCTCG AGC
19	Secuencia de nucleótidos para cadena ligera variable de canfel_chimera 841	CAGGCGGTGCTGAACCAGCCGGCGAGCGTGAGCGGC GCGCTGGGCCAGAAAGTGACCATTAGCTGCAGCGGCA GCACCATGGATATTGATATTTTTGGCGTGAGCTGGTAT CAGCAGCTGCCGGGCAAAGCGCCGAACTGCTGGTG GATAGCGATGGCGATCGCCCGAGCGGCATTCCGGATC GCTTTAGCGGCAGCCGAGCGGCAACAGCGGCACCC TGACCATTACCGGCCTGCAGGCGGAAGATGAAGCGGA TTATCATTGCCAGAGCGGCGATAGCACCTGGGCGCG CTGGCGATTTTTGGCGGCGGCACCCATGTGACCGTGC

5

10

15

20

25

30

		TG
20	Secuencia de nucleótidos para cadena pesada variable de canfel_chimera 841	GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGATCTGGTG AAACCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGTGGCG AGCGGCTTTACCTTTAGCAGCCATGGCATGCATTGGGT GCGCCAGAGCCCGGGCAAAGGCCTGCAGTGGGTGGC GGTGATTAACAGCGGCGGCAGCAGCACCTATTATACC GATGCGGTGAAAGGCCGCTTTACCATTAGCCGCGATA ACGCGAAAAACACCGTGTATCTGCAGATGAACAGCCT GCGCGCGGAAGATACCGCGATGTATTATTGCGCGAAA GAAAGCGTGGGCGGCTGGGAACAGCTGGTGGGCCCCG CATTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGATTGT CTCGAGC
21	Secuencia de aminoácidos para CDR1 de cadena ligera variable de ZTS-842	TMDIDIFG
22	Secuencia de aminoácidos para CDR2 de cadena ligera variable de ZTS-842	SDG
23	Secuencia de aminoácidos para CDR3 de cadena ligera variable de ZTS-842	QSGDSTLGALAI
24	Secuencia de aminoácidos para CDR1 de cadena pesada variable de ZTS-842	GFTFSTYG
25	Secuencia de aminoácidos para CDR2 de cadena pesada variable de ZTS-842	ISSGGSST
26	Secuencia de aminoácidos para CDR3 de cadena pesada variable de ZTS-842	AGSRYTYAYGGGYEFHF
27	Secuencia de aminoácidos para cadena ligera variable de ZTS-842	QAVLNQPASVSGALGQKVTISCSGSTMDIDIFGVSWYQQ LPGKAPKLLVDSGDRPSGIPDRFSGSRSGNSGTLTITGL QAEDEADYHCQSGDSTLGALAIFGGGTHVTVL
28	Secuencia de aminoácidos para cadena pesada variable de ZTS-842	EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSTYGINWVRQ APGKGLQWVAYISSGGSSTYYADPVKGRFTISRDDAKNM LYLQMNSLRAEDTAIYYCAGSRYTYAYGGGYEFHFWGQ

		GTLTVTSS
5	29	Secuencia de aminoácidos para cadena ligera variable de canfel_chimera 842
		QSVLTQPTSVSGSLGQRVTISCSGSTNNIGILGASWYQLF PGKAPKLLVYGNGNRPSGVPDRFSGADSGDSVTLTITGL QAEDEADYYCQSFDTTLGAHVFGGGTHLTVL
10	30	Secuencia de aminoácidos para cadena pesada variable de canfel_chimera 842
		EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSTYGINWVRQ APGKGLQWVAYISSGGSSTYYADPVKGRFTISRDDAKNM LYLQMNSLRAEDTAIYYCAGSRYTYAYGGGYEFHFWGQ GTLTVTSS
	31	Secuencia de nucleótidos para CDR1 de cadena ligera variable de ZTS-842
		ACAATGGACATTGATATATTTGGT
15	32	Secuencia de nucleótidos para CDR2 de cadena ligera variable de ZTS-842
		AGTGATGGG
	33	Secuencia de nucleótidos para CDR3 de cadena ligera variable de ZTS-842
		CAGTCTGGTGATTCCACGCTTGGTGCCCTTGCTATT
20	34	Secuencia de nucleótidos para CDR1 de cadena pesada variable de ZTS-842
		GGATTACCTTCAGTACCTATGGC
	35	Secuencia de nucleótidos para CDR2 de cadena pesada variable de ZTS-842
		ATTAGTAGTGGTGGAAGTAGCACA
25	36	Secuencia de nucleótidos para CDR3 de cadena pesada variable de ZTS-842
		GCGGGTAGTAGATATACATATGCATACGGAGGAGGAT ATGAGTTTCACTTC
30	37	Secuencia de nucleótidos para cadena ligera variable de ZTS 842
		CAGGCTGTGCTGAATCAGCCGGCCTCAGTGTCTGGGG CCCTGGGCCAGAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAG CACAATGGACATTGATATATTTGGTGTGAGCTGGTACC AACAGCTCCCAGGAAAGGCCCTAACTCCTCGTGGA CAGTGATGGGGATCGACCCTCAGGGATCCCTGACAGA TTTTCTGGCTCCAGGTCTGGCAACTCAGGCACCCTGAC CATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTAT CACTGTCAGTCTGGTGATTCCACGCTTGGTGCCCTTGC TATTTTCGGCGGAGGCACCCATGTGACCGTCCTT

5	38	Secuencia de nucleótidos para cadena pesada variable de ZTS-842
10		GAGGTACAACCTGGTGGGAATCTGGGGGAGACCTGGTGA AGCCTGGGGGATCCCTGAGACTCTCCTGTGTGGCCTC TGGATTACCTTCAGTACCTATGGCATCAACTGGGTCC GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGGTGCGAT ACATTAGTAGTGGTGGGAAGTAGCACATACTATGCAGAT CCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACGACG CCAAGAACATGCTGTATCTTCAGATGAACAGCCTGAGA GCCGAGGACACGGCCATATATTACTGTGCGGGTAGTA GATATACATATGCATACGGAGGAGGATATGAGTTTCAC TTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
15	39	Secuencia de nucleótidos para cadena ligera variable de canfel_chimera 842
20		CAGGCGGTGCTGAACCAGCCGGCGAGCGTGAGCGGC GCGCTGGGCCAGAAAGTGACCATTAGCTGCAGCGGCA GCACCATGGATATTGATATTTTTGGCGTGAGCTGGTAT CAGCAGCTGCCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGGTG GATAGCGATGGCGATCGCCCGAGCGGCATTCCGATC GCTTTAGCGGCAGCCGCAGCGGCAACAGCGGCACCC TGACCATTACCGGCCTGCAGGCGGAAGATGAAGCGGA TTATCATTGCCAGAGCGGCGATAGCACCTGGGCGCG CTGGCGATTTTTGGCGGCGGCACCCATGTGACCGTGC TG
25	40	Secuencia de nucleótidos para cadena pesada variable de canfel_chimera 842
30	41	Secuencias de aminoácidos para HC-65
		ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVS WNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPS ETFTCNVAHPASKTKVDKVPKRENGRVPRPPDCPKCPA PEMLGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDP

5		EVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFNNGTYRVVSVLPIGH QDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVY VLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNQQEP ESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICA VMHEALHNHYTQESLSHSPGK
10	42	Secuencia de ácido nucleico para HC-65
15		GCCTCAACAACCTGCTCCTAGCGTGTTTCCCCTGGCCC CTAGCTGCGGAAGTACCTCAGGCAGCACAGTGGCCCT GGCTTGTCTGGTGTCTGGATATTTCCCTGAGCCAGTGA CCGTGAGTTGGAACAGCGGCTCTCTGACCTCCGGGGT GCACACATTTCCATCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGT ACTCCCTGTCAAGCATGGTGACTGTGCCTTCCTCTAGG TGGCCATCAGAACTTTACCTGCAACGTGGCCCATCC CGCCAGCAAGACCAAAGTGGACAAGCCCGTGCCTAAA AGGGAGAATGGAAGGGTGCCAAGACCACCTGATTGCC CTAAGTGTCCAGCTCCAGAAATGCTGGGAGGACCAAG CGTGTTTCATCTTTCCACCCAAGCCCAAAGACACACTGC TGATTGCTAGAACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGT GGACCTGGATCCAGAGGACCCCGAAGTGCAGATCTCC TGGTTCGTGGATGGGAAGCAGATGCAGACAGCCAAAA CTCAGCCTCGGGAGGAACAGTTTAACGGAACCTATAG AGTGGTGTCTGTGCTGCCAATTGGACACCAGGACTGG CTGAAGGGCAAACAGTTTACATGCAAGGTGAACAACAA GGCCCTGCCTAGTCCAATCGAGAGGACTATTTCAAAG CTAGGGGACAGGCTCATCAGCCTTCCGTGTATGTGCT GCCTCCATCCCGGAGGAACTGTCTAAGAACACAGTG AGTCTGACTTGTCTGATCAAAGATTTCTTTCCCCTGAC ATTGATGTGGAGTGGCAGAGCAATGGGCAGCAGGAGC CAGAATCCAAGTACAGAACCACACCACCCAGCTGGA CGAAGATGGCTCCTATTTCTGTACAGTAAGCTGTCAG TGGACAAATCTAGGTGGCAGCGCGGGGATACCTTTAT CTGCGCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAATCATTAC ACACAAGAAAGTCTGTACATAGCCCCGGCAAG
30	43	Secuencia de aminoácidos para HC-65e
		ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVS WNSGLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPS ETFTCNVAHPASKTKVDKVPKRENGRVPRPPDCPKCPA PEAAGAPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPE VQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFNNGTYRVVSVLPIGH

5		QDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVY VLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNQQEP ESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICA VMHEALHNHYTQESLSHSPGK
	44	Secuencia de ácido nucleico para HC-65e
10		GCCTCAACAACCTGCTCCTAGCGTGTTTCCCCTGGCCC CTAGCTGCGGAAGTACCTCAGGCAGCACAGTGGCCCT GGCTTGTCTGGTGTCTGGATATTTCCCTGAGCCAGTGA CCGTGAGTTGGAACAGCGGCTCTCTGACCTCCGGGGT GCACACATTTCCATCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGT ACTCCCTGTCAAGCATGGTGAAGTGTGCCTTCCCTTAGG TGGCCATCAGAACTTTACCTGCAACGTGGCCCATCC CGCCAGCAAGACCAAAGTGGACAAGCCCGTGCCTAAA AGGGAGAATGGAAGGGTGCCAAGACCACCTGATTGCC CTAAGTGTCCAGCTCCAGAAGCGGCGGGAGCACCAAG CGTGTTTCATCTTTCCACCCAAGCCCAAAGACACACTGC TGATTGCTAGAACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGT GGACCTGGATCCAGAGGACCCCGAAGTGCAGATCTCC TGTTTCGTGGATGGGAAGCAGATGCAGACAGCCAAA CTCAGCCTCGGGAGGAACAGTTTAACGGAACCTATAG AGTGGTGTCTGTGCTGCCAATTGGACACCAGGACTGG CTGAAGGGCAAACAGTTTACATGCAAGGTGAACAACAA GGCCCTGCCTAGTCCAATCGAGAGGACTATTTCAAAG CTAGGGGACAGGCTCATCAGCCTTCCGTGTATGTGCT GCCTCCATCCCGGGAGGAACTGTCTAAGAACACAGTG AGTCTGACTTGTCTGATCAAAGATTTCTTTCCCCTGAC ATTGATGTGGAGTGGCAGAGCAATGGGCAGCAGGAGC CAGAATCCAAGTACAGAACCACACCACCCAGCTGGA CGAAGATGGCTCCTATTTCTGTACAGTAAGCTGTCAG TGGACAAATCTAGGTGGCAGCGCGGGGATACCTTTAT CTGCGCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAATCATTAC ACACAAGAAAGTCTGTACATAGCCCCGGCAAG
30	45	Secuencia de aminoácidos para CDR1 de 13L11VL
	46	Secuencia de aminoácidos para CDR2 de 13L11VL
	47	Secuencia de aminoácidos para
		NIGSKD
		SDS
		QVWDISADAIV

5

10

15

20

25

30

	CDR3 de 13L11VL	
48	Secuencia de aminoácidos para CDR1 de 13L11VH	GYTFTDYY
49	Secuencia de aminoácidos para CDR1 de 13L11VH	IDPGNGAT
50	Secuencia de aminoácidos para CDR1 de 13L11VH	APLGYVPASTSEY
51	Secuencias de aminoácidos para 13L11VL	SYVLTQPPSVTVTLRQTAHITCGGDNIGSKDVYWYQQKP GQAPVLIYSDSKRPTGIPERFSGSNSGNMATLTISGALAE DEADYYCQVWDISADAIVFGGGTHLTVL
52	Secuencia de aminoácidos para 13L11VH	EVQLVQSAAEVKKPGASVKVSKTSGYTFTDYYMHWVQ QAPGAGLNWMGRIDPGNGATRYAQKFQGRLTLTADTST STAYMELSLRAEDTAVYYCAPLGYVPASTSEYWGGGTL VSVSS
53	Secuencia de nucleótidos para 13L11VL	TCCTATGTGCTGACCCAGCCACCATCAGTGACTGTGAC CCTGAGGCAGACGGCCACATCACCTGTGGGGGAGA CAACATTGGAAGTAAAGATGTTTATTGGTACCAGCAGA AGCCGGGCCAGGCCCCCGTGTTGATTATCTATAGTGA TAGCAAGAGGCCGACAGGGATCCCTGAGCGATTCTCC GGCTCCAACCTCGGGGAACATGGCCACCCTGACCATCA GTGGGGCCTTGGCGGAGGATGAGGCTGACTATTACTG CCAGGTATGGGACATCAGTGCTGATGCTATTGTGTTG GCGGAGGCACCCATCTGACCGTCCTT
54	Secuencia de nucleótidos 13L11VH	GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGCAGCTGAGGTTAAGA AGCCAGGGGCATCTGTAAAGGTCTCCTGCAAGACCTC TGGATACACCTTCACTGACTACTATATGCACTGGGTAC AACAGGCTCCAGGAGCAGGGCTCAATTGGATGGGACG GATTGATCCTGGAATGGTGCCACAAGGTATGCACAGA AGTTCCAGGGCAGACTCACCTGACGGCAGACACATC CACAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCGGTCTGAGA GCTGAGGACACAGCTGTGTACTACTGTGCGCCCCTAG GGTACGTGCCTGCATCAACATCTGAGTACTGGGGCCA GGGCACCCTGGTCAGCGTCTCGAGC
55	Secuencia de aminoácidos para VL 205 felina	QAVLNQPPSSVSGALGQRVTISCSGSTMDIDIFGVSWYQQI PGMAPKTIIDSDGDRPSGVPDRFSGSKSGSTGTLTITGLQ

		AEDEADYYCQSGDSTLGALAIFGGGTHVTVL
5	56	Secuencia de aminoácidos para VH 205 felina
10	57	Secuencia de nucleótidos para VL 205 felina
15		
20	58	Secuencia de nucleótidos para VH 205 felina
25		
30	59	Secuencia de aminoácidos para NGF canino [Canis lupus familiaris] AAY16195.1
	60	Secuencia de aminoácidos para cadena lambda canina

5	61	Secuencia de nucleótidos para cadena lambda canina	GGACAACCGAAGGCCTCCCCCTCGGTACACTCTTCC CGCCCTCCTCTGAGGAGCTCGGCGCCAACAAGGCCAC CCTGGTGTGCCTCATCAGCGACTTCTACCCCAGCGGC GTGACGGTGGCCTGGAAGGCAGACGGCAGCCCCGTC ACCCAGGGCGTGGAGACCACCAAGCCCTCCAAGCAGA GCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCT GACGCCTGACAAGTGGAAATCTCACAGCAGCTTCAGC TGCCTGGTCACGCACGAGGGGAGACCGTGGAGAAG AAGGTGGCCCCCGCAGAGTGCTCT
10	62	Secuencia de aminoácidos para HC felina	ASTTAPSVFPLAPSCGTTSGATVALACLVLGYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQASGLYSLSSMVTVPSSRWLS DTFTCNVAHPPSNTKVDKTVRKTDHPPGPKPCDCPKCPP PEMLGGPSIFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLGPDDSD VQITWFVDNTQVYTAKTSPREEQFNSTYRVVSVLPILHQD WLKGKEFKCKVNSKSLPSPIERTISKAKGQPHEPQVYVLP PAQEELSRNKVSVTCLIKSFHPPDIAVEWEITGQPEPEN YRTTPQLDSDGTYFVYSKLSVDRSHWQRGNTYTCSVS HEALSHHTQKSLTQSPGK
20	63	Secuencia de nucleótidos para HC felina	GCCTCCACCACGGCCCCATCGGTGTTCCCACTGGCCC CCAGCTGCGGGACCACATCTGGCGCCACCGTGGCCCT GGCCTGCCTGGTGTAGGCTACTTCCCTGAGCCGGTG ACCGTGTCTGGAAGTCCGGCGCCCTGACCAGCGGTG TGCACACCTTCCCGGCCGTCCTGCAGGCCTCGGGGCT GTACTCTCTCAGCAGCATGGTGACAGTGCCCTCCAGC AGGTGGCTCAGTGACACCTTCACCTGCAACGTGGCCC ACCCGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGCG CAAAACAGACCACCCACCGGGACCCAAACCCTGCGAC TGTCCCAAATGCCACCCCCTGAGATGCTTGGAGGAC CGTCCATCTTCATCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACC CTCTCGATTTCCTGGACGCCCCGAGGTCACATGCTTGG TGGTGGACTTGGGCCAGATGACTCCGATGTCCAGAT CACATGGTTTGTGGATAACACCCAGGTGTACACAGCCA AGACGAGTCCGCGTGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTA CCGTGTGGTCAGTGTCTCCCCATCCTACACCAGGAC TGGCTCAAGGGGAAGGAGTTCAAGTGCAAGGTCAACA GCAAATCCCTCCCCTCCCCATCGAGAGGACCATCTC
25			
30			

5

10

15

20

25

30

		CAAGGCCAAAGGACAGCCCCACGAGCCCCAGGTGTAC GTCCTGCCTCCAGCCCAGGAGGAGCTCAGCAGGAACA AAGTCAGTGTGACCTGCCTGATCAAATCCTTCCACCCG CCTGACATTGCCGTGAGTGGGAGATCACCGGACAGC CGGAGCCAGAGAACAACCTACCGGACGACCCCGCCCCA GCTGGACAGCGACGGGACCTACTTCGTGTACAGCAAG CTCTCGGTGGACAGGTCCCACTGGCAGAGGGGAAACA CCTACACCTGCTCGGTGTCACACGAAGCTCTGCACAG CCACCACACACAGAAATCCCTCACCCAGTCTCCGGGT AAA
64	Secuencia de aminoácidos para cadena lambda felina	GQPKSAPSVTLFPPSNEELSANKATLVCLISDFYPSGLTV AWKADGTPITQGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLSPNEW KRSRFTCQVTHEGSTVEKNVPAECS
65	Secuencia de nucleótidos para cadena lambda felina	GGCCAGCCCAAGAGCGCTCCCTCCGTGACCCTGTTCC CCCCAAGCAACGAGGAACTGAGCGCCAACAAGGCCAC CCTGGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTACCCCAGCGGC CTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGATGGCACCCCTATCA CCCAGGGCGTGGAACCACCAAGCCCAGCAAGCAGA GCAACAACAAATACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCT GAGCCCCAACGAGTGGAAGTCCCGGTCCCGGTTTACA TGCCAGGTGACACACGAGGGCAGCACCGTGGAAGA ACGTGGTGCCCGCCGAGTGCAGC
66	Secuencia de aminoácidos para el factor de crecimiento nervioso humano (n.º de acceso Genbank AAL05874)	MSMLFYTLITAFILIGIAEPHSESNVPAGHTIPQAHWTKLQ HSLDTALRRARSAPAAAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRR LRSPRVLFSTQPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNRTHRSK RSSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMV LGEVSINNSVFKQYFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWN SCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFIRIDTACMCVLSRKAV RRA
67	Secuencia de aminoácidos para can9L12VH_X92218	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHGMSWVR QAPGKGLEWVSVINSGGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKESVGGWEQLVGP HFDYW GQGTLVIVSS

5	68	Secuencia de nucleótidos para can9L12VH_X92218	GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTG CAGCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGCG AGCGGCTTTACCTTTAGCAGCCATGGCATGAGCTGGG TGCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGA GCGTGATTAACAGCGGCGGCAGCAGCACCTATTATGC GGATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATTAGCCGCGAT AACAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCT GCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGAAA GAAAGCGTGGGCGGCTGGGAACAGCTGGTGGGCCCCG CATTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGATTGT CTCGAGC
10	69	Secuencia de aminoácidos para can9L12VH_HM855939	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHGMHWV RQAPGKGLEWVSVINSGGSSTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKESVGGWEQLVGPFDY WGQGTLVIVSS
20	70	Secuencia de nucleótidos para can9L12VH_HM855939	CAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCGTGGTG CAGCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGCG AGCGGCTTTACCTTTAGCAGCCATGGCATGCATTGGGT GCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGAG CGTGATTAACAGCGGCGGCAGCAGCACCTATTATGCG GATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATTAGCCGCGATAA CAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGC GCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGAAAGA AAGCGTGGGCGGCTGGGAACAGCTGGTGGGCCCCGA TTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGATTGTCT CGAGC
25	71	Aminoácido para la secuencia can9L12VL_M94116	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSTNNIGILGVHWYQQ LPGTAPKLLIYGNNGNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGL QAEDEADYYCQSFDTTLGAHVFGGGTHLTVL
30	72	Secuencia de nucleótidos para can9L12VL_M94116	CAGAGCGTGCTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGGC GCGCCGGGCCAGCGCGTGACCATTAGCTGCACCGGC AGCACCAACAACATTGGCATTCTGGGCGTGATTGGTA TCAGCAGCTGCCGGGCACCGCGCCGAACTGCTGATT

5			TATGGCAACGGCAACCGCCCCGAGCGGCGTGCCGGAT CGCTTTAGCGGCAGCAAAAGCGGCACCAGCGCGAGC CTGGCGATTACCGGCCTGCAGGCGGAAGATGAAGCG GATTATTATTGCCAGAGCTTTGATACCACCCTGGGCGC GCATGTGTTTGGCGGCGGCACCCATCTGACCGTGCTG
	73	Secuencia de aminoácidos para can9L12VL_M94116_65698	QSVLTQPTSVSGAPGQRVTISCTGSTNNIGLVHWYQQ LPGTAPKLLIYGNGNRPSGVPDRFSGADSGDSVSLAITGL QAEDEADYYCQSFD TTLGAHVFGGGTHLTVL
10			CAGAGCGTGCTGACCCAGCCGACCAGCGTGAGCGGC GCGCCGGGCCAGCGCGTGACCATTAGCTGCACCGGC AGCACCAACAACATTGGCATTCTGGGCGTGATTGGTA TCAGCAGCTGCCGGGCACCGCGCCGAAACTGCTGATT TATGGCAACGGCAACCGCCCCGAGCGGCGTGCCGGAT CGCTTTAGCGGCGCGGATAGCGGCGATAGCGTGAGC CTGGCGATTACCGGCCTGCAGGCGGAAGATGAAGCG GATTATTATTGCCAGAGCTTTGATACCACCCTGGGCGC GCATGTGTTTGGCGGCGGCACCCATCTGACCGTGCTG
15	74	Secuencia de nucleótidos para can9L12VL_M94116_65698	
			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMNWVR QAPGKGLEWVSYISSGGSSIYYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLR AEDTAVYYCAGSRYTYAYGGGYEFHFWG QGTLVTVSS
20	75	Aminoácido para la secuencia can48L2VH_HM855336.1	
			GAAGTGCAGCTGGTGGAAGCGGCGGCGGCCTGGTG CAGCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGCG AGCGGCTTTACCTTTAGCACCTATGGCATGAACTGGGT GCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGAG CTATATTAGCAGCGGCGGCAGCAGCATTTATTATGCGG ATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATTAGCCGCGATAAC GCGAAAAACAGCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGC GCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGGGCAG CCGCTATACCTATGCGTATGGCGGCGGCTATGAATTC ATTTTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGATTGTCTCGAG C
25	76	Secuencia de nucleótidos para can48L2VH_HM855336.1	
30	77	Secuencia de aminoácidos para can48L2VH_HM855336.1_E46Q	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMNWVR QAPGKGLQWVSYISSGGSSIYYADSVKGRFTISRDNANK

		SLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSRYTYAYGGGYEFHFWG QGTLVTVSS
5	78	Secuencia de nucleótidos para can48L2VH_HM855336.1_E46Q
10		GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTG CAGCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGCG AGCGGCTTTACCTTTAGCACCTATGGCATGAACTGGGT GCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGCAGTGGGTGAG CTATATTAGCAGCGGCGGCAGCAGCATTTATTATGCGG ATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATTAGCCGCGATAAC GCGAAAAACAGCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGC GCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGGGCAG CCGCTATACCTATGCGTATGGCGGCGGCTATGAATTC ATTTTGGGGCCAGGGCACCTGGTGATTGTCTCGAG C
15	79	Secuencia de aminoácidos para can48L2VH_HM855323.1
20		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYGINWVRQ APGKGLEWVSYSISSGGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSRYTYAYGGGYEFHFWGQ GTLVTVSS
25	80	Secuencia de nucleótidos para can48L2VH_HM855323.1
30	81	Secuencia de aminoácidos para can48L2VH_HM855323.1_E46Q
	82	Secuencia de nucleótidos para
		GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTG

5

10

15

20

25

30

	can48L2VH_HM855323.1_E46Q	AAACCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGCG AGCGGCTTTACCTTTAGCACCTATGGCATTAACTGGGT GCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGCAGTGGGTGAG CTATATTAGCAGCGGCGGCAGCAGCACCTATTATGCG GATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATTAGCCGCGATAA CGCGAAAAACAGCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTG CGCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGGGCA GCCGCTATACCTATGCGTATGGCGGCGGCTATGAATTT CATTTTTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGATTGTCTCGA GC
83	Secuencia de aminoácidos para can48L2VL_Z73654.1_P8A	QSVLTQPASASGTPGQRTVISCSTMDIDIFGVNWHYQQ LPGTAPKLLIYSDGRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL QSEDEADYHCQSGDSTLGALAIFGGGTHVTV
84	Secuencia de nucleótidos para can48L2VL_Z73654.1_P8A	CAGAGCGTGCTGACCCAGCCGCGAGCGCGAGCGGC ACCCCGGGCCAGCGCGTGACCATTAGCTGCAGCGGC AGCACCATGGATATTGATATTTTTGGCGTGAAGTGGTA TCAGCAGCTGCCGGGCACCGCGCCGAAACTGCTGATT TATAGCGATGGCGATCGCCCGAGCGGCGTGCCGGATC GCTTTAGCGGCAGCAAAAGCGGCACCAGCGCGAGCCT GGCGATTAGCGGCCTGCAGAGCGAAGATGAAGCGGAT TATCATTGCCAGAGCGGCGATAGCACCCCTGGGCGCGC TGGCGATTTTTGGCGGCGGCACCCATGTGACCGTGCT G
85	Secuencia de aminoácidos para can48L2VL_Z73654.1_P14L	QSVLTQPPSASGTLGQRTVISCSTMDIDIFGVNWHYQQ LPGTAPKLLIYSDGRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL QSEDEADYHCQSGDSTLGALAIFGGGTHVTVL
86	Secuencia de nucleótidos para can48L2VL_Z73654.1_P14L	CAGAGCGTGCTGACCCAGCCGCCGAGCGCGAGCGGC ACCCTGGGCCAGCGCGTGACCATTAGCTGCAGCGGCA GCACCATGGATATTGATATTTTTGGCGTGAAGTGGTAT CAGCAGCTGCCGGGCACCGCGCCGAAACTGCTGATTT ATAGCGATGGCGATCGCCCGAGCGGCGTGCCGGATC GCTTTAGCGGCAGCAAAAGCGGCACCAGCGCGAGCCT GGCGATTAGCGGCCTGCAGAGCGAAGATGAAGCGGAT TATCATTGCCAGAGCGGCGATAGCACCCCTGGGCGCGC TGGCGATTTTTGGCGGCGGCACCCATGTGACCGTGCT G

5

87

Secuencia de aminoácidos para
can48L2VL_Z22192.1_P8A

QSVVTQPASVSGAPGQRTISCTGSTMDIDIFGVSWYQQ
LPGTAPKLLIYGDGDRPSGVPDRFSGSKSGASASLAITGL
QAEDEADYHCQSGDSTLGALAIFGGGTHVTVL

10

88

Secuencia de nucleótidos para
can48L2VL_Z22192.1_P8A

CAGAGCGTGGTGACCCAGCCGCGAGCGTGAGCGGC
GCGCCGGGCCAGCGCGTGACCATTAGCTGCACCGGC
AGCACCATGGATATTGATATTTTTGGCGTGAGCTGGTA
TCAGCAGCTGCCGGGCACCGCGCCGAACTGCTGATT
TATGGCGATGGCGATCGCCCCGAGCGGCGTGCCGGAT
CGCTTTAGCGGCAGCAAAAGCGGCGGAGCGCGAGC
CTGGCGATTACCGGCCTGCAGGCGGAAGATGAAGCG
GATTATCATTGCCAGAGCGGCGATAGCACCTGGGCG
CGCTGGCGATTTTTGGCGGCGGCACCCATGTGACCGT
GCTG

15

89

Secuencia de aminoácidos para
can48L2VL_Z22192.1_P14L

QSVVTQPPSVSGALGQRTISCTGSTMDIDIFGVSWYQQ
LPGTAPKLLIYGDGDRPSGVPDRFSGSKSGASASLAITGL
QAEDEADYHCQSGDSTLGALAIFGGGTHVTVL

20

90

Secuencia de nucleótidos para
can48L2VL_Z22192.1_P14L

CAGAGCGTGGTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGGC
GCGCTGGGCCAGCGCGTGACCATTAGCTGCACCGGC
AGCACCATGGATATTGATATTTTTGGCGTGAGCTGGTA
TCAGCAGCTGCCGGGCACCGCGCCGAACTGCTGATT
TATGGCGATGGCGATCGCCCCGAGCGGCGTGCCGGAT
CGCTTTAGCGGCAGCAAAAGCGGCGGAGCGCGAGC
CTGGCGATTACCGGCCTGCAGGCGGAAGATGAAGCG
GATTATCATTGCCAGAGCGGCGATAGCACCTGGGCG
CGCTGGCGATTTTTGGCGGCGGCACCCATGTGACCGT
GCTG

25

91

Secuencia de aminoácidos para
can48L2VL_Z22192.1

QSVVTQPPSVSGAPGQRTISCTGSTMDIDIFGVSWYQQ
LPGTAPKLLIYGDGDRPSGVPDRFSGSKSGASASLAITGL
QAEDEADYHCQSGDSTLGALAIFGGGTHVTVL

30

92

Secuencia de nucleótidos para
can48L2VL_Z22192.1

CAGAGCGTGGTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGGC
GCGCCGGGCCAGCGCGTGACCATTAGCTGCACCGGC
AGCACCATGGATATTGATATTTTTGGCGTGAGCTGGTA
TCAGCAGCTGCCGGGCACCGCGCCGAACTGCTGATT

5

		TATGGCGATGGCGATCGCCCCGAGCGGCGTGCCGGAT CGCTTTAGCGGCAGCAAAAGCGGCGGAGCGCGAGC CTGGCGATTACCGGCCTGCAGGCGGAAGATGAAGCG GATTATCATTGCCAGAGCGGCGATAGCACCGTGGGCG CGCTGGCGATTTTTGGCGGCGGCACCCATGTGACCGT GCTG
--	--	--

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10

La invención descrita en la presente provee proteínas de unión a antígeno anti-NGF que se unen a NGF con afinidad elevada. La invención también provee proteínas de unión a antígeno y polipéptidos que también se unen a NGF que son variantes de dichas proteínas de unión a antígeno, así como métodos para producir y usar dichas proteínas de unión a antígeno. En algunas modalidades, la invención también provee polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos y/o proteínas de unión a antígeno. La invención descrita en la presente también

15

Técnicas generales

20

Se ha de entender que la presente invención no se limita a la metodología, protocolos y reactivos, etc., particulares descritos en la presente y, como estos, puede variar. La terminología que se utiliza en la presente tiene la única finalidad de describir modalidades particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que se limita solamente mediante las reivindicaciones.

25

A menos que se definan de otra forma, los términos científicos y técnicos usados en conexión con las proteínas de unión a antígeno descritas en la presente tendrán los significados comúnmente entendidos por los expertos en la técnica. Asimismo, salvo que el contexto requiera algo distinto, los términos en singular incluyen los plurales y los términos en plural incluyen el singular. En general, la nomenclatura utilizada con relación al cultivo de células y tejidos, biología molecular e hibridación y química de polinucleótidos u oligonucleótidos y proteínas que se describen en la presente, y técnicas para esto, es aquella conocida y utilizada normalmente en la técnica. Es de conocimiento en la técnica que es posible sustituir lo descrito con técnicas diferentes.

30

Todas las patentes y otras publicaciones identificadas se incorporan en la presente de forma expresa mediante esta referencia con el fin de describir y divulgar, por ejemplo, las metodologías descritas en dichas publicaciones, que se podrían utilizar en relación con la presente invención. Estas publicaciones se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha

de presentación de la presente solicitud.

Se utilizan técnicas estándares para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transfección de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las técnicas de purificación y reacciones enzimáticas se ponen en práctica conforme a las especificaciones del fabricante, como se llevan a cabo comúnmente en la técnica o como se describe en la presente. En general, las técnicas y procedimientos que anteceden se llevan a cabo mediante métodos convencionales conocidos en la técnica y tal como se describe, de modo no taxativo, en las diversas referencias generales y más específicas que se citan y se discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Veá, por ejemplo, Sambrook et ál. *MOLECULAR CLONING: LAB. MANUAL* (3.^a ed., Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001) y Ausubel et ál. *Current Protocols in Molecular Biology* (Nueva York: Greene Publishing Association J Wiley Interscience), «Oligonucleotide Synthesis» (M. J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. 1. Freshney, ed. 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (1. P. Mather y P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths y D. G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller y M. P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel et ál., eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et ál., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (E. Coligan et ál., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway y P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practical approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies: a practical approach* (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (Y. T. DeVita et ál., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

Además de los ejemplos operativos o cuando se indique lo contrario, debe comprenderse que todas las cifras que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción que se utilizan en la presente pueden modificarse en todos los casos con el término «alrededor de».

Definiciones

Antes de describir la presente invención de manera detallada, se definirán diversos términos que se utilizan en el contexto de la presente invención. Además de dichos términos, se definen otros en otras partes de la memoria descriptiva cuando es necesario. A menos que se definan de otra forma expresamente en la presente, los términos técnicos usados en esta memoria

descriptiva tendrán sus significados reconocidos en la técnica.

Tal como se usan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, las formas singulares «un», «una», «el» y «la» incluyen referencias plurales, salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, una referencia a «un anticuerpo» incluye múltiples de dichos anticuerpos.

5 Tal como se usa en la presente, el término «comprende» significa que las composiciones y los métodos incluyen los elementos enumerados, pero no se excluyen otros.

Tal como se usan en la presente, «factor de crecimiento nervioso» y «NGF» hacen referencia a un factor de crecimiento nervioso y variantes de este que retienen al menos parte de la actividad biológica de NGF.

10 «Receptor de NGF» hace referencia a un polipéptido al que se une NGF o al que este activa. Los receptores de NGF incluyen el receptor TrkA y, en menor medida, el receptor p75 de canes.

En general, la «actividad biológica» de NGF hace referencia a la capacidad de unión de receptores de NGF y/o de activación de vías de señalización de receptor de NGF. De modo no
15 taxativo, una actividad biológica incluye cualesquiera uno o más de los siguientes: la capacidad para unirse a un receptor de NGF (tal como TrkA y/o p75), la capacidad de promover la dimerización y/o autofosforilación del receptor TrkA, la capacidad de activar una vía de señalización del receptor de NGF, la capacidad de promover la diferenciación, proliferación, supervivencia, crecimiento celulares y otros cambios en la fisiología celular que incluyen (en el
20 caso de neuronas, lo que incluye neuronas periféricas y centrales) cambios en la morfología neuronal, sinaptogénesis, función sináptica, liberación de neurotransmisor y/o neuropéptido y regeneración posterior al daño, la capacidad de promover la supervivencia de neuronas trigeminales E13.5 de ratón y la capacidad para mediar dolor, lo que incluye dolor posquirúrgico.

Tal como se usa en la presente, una «proteína de unión a antígeno anti-NGF» (a la que se
25 hace referencia de forma indistinta como «anticuerpo anti-NGF» y «anticuerpo antagonista anti-NGF», «fragmento de unión a antígeno» y «parte de unión a antígeno» y similares) hace referencia a una proteína de unión a antígeno capaz de unirse a NGF y de inhibir la actividad biológica de NGF y/o vías posteriores mediadas por señalización de NGF. Una proteína de unión a antígeno anti-NGF comprende proteínas de unión a antígeno y anticuerpos que bloquean, antagonizan, suprimen o reducen (lo que incluye esto significativamente) la actividad biológica de NGF, lo que
30 incluye las vías posteriores mediadas por señalización de NGF, y/o inhiben la unión de NGF a su receptor trkA, tal como la unión y/o evocación de una respuesta celular a NGF. A efectos de la presente invención, se entenderá explícitamente que las expresiones «proteína de unión a antígeno anti-NGF» o «anticuerpo antagonista anti-NGF» comprenden todas las expresiones, títulos y estados funcionales y características anteriormente descritos por los que se anulan,

reducen o neutralizan sustancialmente en cualquier grado significativo el NGF en sí mismo, una actividad biológica de NGF (que incluye, de modo no taxativo, su capacidad para mediar cualquier aspecto del dolor por osteoartritis, dolor inflamatorio, dolor posquirúrgico, dolor por cáncer y similares) o las consecuencias de la actividad biológica. En algunas modalidades, un anticuerpo antagonista anti-NGF se une a NGF y previene la dimerización de NGF y/o la unión a un receptor de NGF (tal como TrkA y/o p75). En otras modalidades, una proteína de unión a antígeno anti-NGF se une a NGF y previene la dimerización del receptor TrkA y/o la autofosforilación de TrkA. Se proveen en la presente ejemplos de anticuerpos antagonistas anti-NGF.

Tal como se usan en la presente, las expresiones «proteína de unión a antígeno», «anticuerpo», «proteína de unión a antígeno» y similares, las cuales se pueden usar de forma indistinta, hacen referencia a un polipéptido o fragmento de este que comprende un sitio de unión a antígeno. En una modalidad de la presente invención, la proteína de unión a antígeno de la invención también provee una inmunoglobulina capaz de unión específica a una diana, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno en una o más regiones variables de la molécula de inmunoglobulina. En algunas modalidades, un anticuerpo tiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Por lo tanto, un anticuerpo intacto aislado se puede aislar de un grupo de anticuerpos policlonales, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo sintético, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo heteroquimérico o un anticuerpo que se considera sometido a especiación, tal como se define en la presente. En algunas modalidades, «proteína de unión a antígeno», «anticuerpo», «anticuerpo antagonista» y similares hacen referencia, preferentemente, a anticuerpos monoclonales y fragmentos de estos, y equivalentes de unión inmunológicos de estos, que se pueden unir a la proteína de NGF y fragmentos de este. Tal como se usan en la presente, las expresiones abarcan tanto anticuerpos monoclonales o policlonales de longitud completa (lo que, conforme a la definición estándar, significa dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras), pero también fragmentos de estos. A los efectos de la presente invención, «anticuerpo» y «proteína de unión a antígeno» también incluyen fragmentos de anticuerpos, a menos que se indique lo contrario. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, dAb, diacuerpos, sus fragmentos de reconocimiento de antígeno, nanocuerpos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP), moléculas de IgNAR y los equivalentes reconocidos por un experto en la técnica como un fragmento de anticuerpo o proteína de unión a antígeno y cualquiera de los fragmentos anteriormente mencionados y sus contrapartidas química o genéticamente modificadas, así como otros fragmentos de anticuerpo y mutantes de estos, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de

antígeno. Los anticuerpos y proteínas de unión a antígeno se pueden producir, por ejemplo, mediante técnicas de hibridoma tradicionales (Kohler et ál., *Nature* 256:495-499 (1975)), métodos de ADN recombinante (patente estadounidense n.º 4,816,567) o técnicas de expresión en fagos con bibliotecas de anticuerpos (Clackson et ál., *Nature* 352:624-628 (1991); Marks et ál., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)). Por otras varias técnicas de producción de anticuerpos, vea *Antibodies: A Laboratory Manual*, eds. Harlow et ál., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, así como otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

Tal como se define en la presente, un «anticuerpo monoclonal» es un anticuerpo producido por una única clonación de células (específicamente, un único clon de células de hibridoma) y, por consiguiente, un único tipo homogéneo puro de anticuerpo. Todos los anticuerpos monoclonales producidos a partir del mismo clon son idénticos y tienen especificidad por el mismo antígeno. Los anticuerpos monoclonales son una población de anticuerpos homogéneos en la que el anticuerpo comprende aminoácidos (de origen natural y no natural) involucrados en la unión selectiva de un antígeno. Una población de anticuerpos monoclonales es muy específica y se dirige a un único sitio antigénico. La expresión «anticuerpo monoclonal» comprende no solo anticuerpos monoclonales intactos y anticuerpos monoclonales de longitud completa, sino también fragmentos de estos (Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, dAb, diacuerpos, sus fragmentos de reconocimiento de antígenos, nanocuerpos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP), moléculas de IgNAR y similares), mutantes de estos, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida y la capacidad para unirse a un antígeno. No se pretende que esto se limite a la fuente del anticuerpo o la forma en la que se produce (por ejemplo, hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, animales transgénicos, etc.).

Los anticuerpos monoclonales de la presente incluyen específicamente anticuerpos «quiméricos» (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada. Usualmente, los anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyos genes de cadena ligera y pesada se construyen, normalmente mediante modificación genética, a partir de genes de región variable y constante del anticuerpo que pertenecen a especies diferentes. Por ejemplo, los segmentos variables de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón se pueden unir a segmentos constantes caninos. La **Figura 2** es una representación esquemática de la estructura general de una modalidad de una IgG de

ratón:canina. En esta modalidad, el sitio de unión a antígeno deriva de un ratón y la parte de Fc es canina.

Tal como se define en la presente, el término «heteroquimérico» hace referencia a un anticuerpo en el que una de las cadenas de anticuerpo (pesada o ligera) se caniniza, al tiempo que la otra es quimérica. La **Figura 4** ilustra una modalidad de una molécula heteroquimérica. En esta modalidad, una cadena pesada variable caninizada (en la que todas las CDR son de ratón y todas las FR son caninas) se aparea con una cadena ligera variable quimérica (donde todas las CDR son de ratón y todas las FR son de ratón). En esta modalidad, tanto las cadenas pesadas variables como las cadenas ligeras variables se fusionan a una región constante canina.

A efectos de simplificación, a continuación se describen anticuerpos «caninizados». Sin embargo, esto también se puede aplicar a proteínas de unión a antígeno felinizadas, equinizadas, humanizadas o cualquier otra proteína de unión a antígeno sometida a especiación. Por ejemplo, se define la caninización como un método para transferir información de unión a antígeno no canina de un anticuerpo donante a un aceptor de anticuerpo canino menos inmunogénico para generar tratamientos útiles como terapia en perros. Los anticuerpos caninizados son secuencias de anticuerpos caninos en las que los residuos de región hipervariable del receptor se reemplazan con residuos de región hipervariable de una especie no canina (anticuerpo donante), tal como de ratón, rata, conejo, gato, perro, cabra, gallina, bovinos, caballo, llama, camello, dromedario, tiburón, primates no humanos, seres humanos, humanizado, secuencias recombinantes o una secuencia modificada con las propiedades, especificidad, afinidad y capacidad deseadas. Asimismo, los anticuerpos caninizados pueden incluir residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan a los efectos de refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. Se determinan las modificaciones de las regiones hipervariables y/o las regiones marco, tal como se describe en la presente, para cada anticuerpo sometido a especiación (caninizado) modificado independientemente con base en experimentación conocida por los expertos en la técnica, pero no es posible predecirlas antes de dicha experimentación. Opcionalmente, el anticuerpo caninizado puede comprender una región constante de inmunoglobulina (Fc), usualmente la de una inmunoglobulina canina, o al menos una parte de esta. La **Figura 3** es una ilustración de una modalidad que muestra la especiación o caninización de una IgG de ratón. Todas las descripciones de caninización de una proteína de unión a antígeno y de una proteína de unión a antígeno caninizada se pueden aplicar, conceptualmente, a cualquier anticuerpo sometido a especiación, ya sea caninización, felinización, equinización, humanización, etc.

Las expresiones «anticuerpo canino recombinante», «anticuerpo felino recombinante», «anticuerpo equino recombinante», «anticuerpo humano recombinante» y similares incluyen

anticuerpos sometidos a especiación que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan mediante medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados con un vector de expresión recombinante en transfección en una célula hospedadora, anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos caninos (o felinos, humanos, etc.) combinatorios y recombinantes, anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) transgénico para genes de inmunoglobulina canina (vea, por ejemplo Taylor, L. D., et ál. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique el empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina canina (o felina, humana, etc.) en otras secuencias de ADN.

Tal como se usan en la presente, las expresiones «anticuerpo canino», «anticuerpo felino», «anticuerpo equino», «anticuerpo humano» y similares hacen referencia a un anticuerpo (proteína de unión a antígeno) que se genera contra una diana y anticuerpos aislados de linfocitos de la especie diana. Estos anticuerpo, tal como se describe en la presente, se han modificado de forma recombinante *in vitro* para incluir regiones constantes específicas de la especie diana. Además, los anticuerpos tal como se describen en la presente se identificaron, aislaron, modificaron para alterar la región constante del anticuerpo seguido de una expresión y aislamiento de sistemas de cultivo celular *in vitro* conocidos y usados de forma rutinaria por los expertos en la técnica.

Normalmente, los «anticuerpos naturales» e «inmunoglobulinas naturales» son glicoproteínas heterotetraméricas de alrededor de 150 000 dalton compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está enlazada a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que la cantidad de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados en intervalos regulares. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido por una cantidad de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (VL) en un extremo y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena pesada y ligera. La **Figura 1** es un ejemplo de la estructura general de una molécula de inmunoglobulina G (IgG) de ratón natural donde se resalta el sitio de unión a antígeno.

En la presente, el anticuerpo «original» es uno codificado por una secuencia de aminoácidos usada para la preparación de la variante. Preferentemente, el anticuerpo original tiene una región marco canina y, si se encontraran presentes, tiene regiones constantes de anticuerpo canino. Por ejemplo, el anticuerpo original puede ser un anticuerpo canino o caninizado.

En función de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de las cadenas pesadas de los anticuerpos, las inmunoglobulinas se pueden asignar a clases diferentes. En la actualidad, existen cinco clases principales de inmunoglobulina: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA e IgA₂ (según las definió la designación de ratón y humana). Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las clases diferentes se denominan *alfa*, *delta*, *épsilon*, *gamma* y *mu*, respectivamente. En la técnica se conocen las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas en múltiples especies. La prevalencia de isotipos individuales y actividades funcionales asociados con estos dominios constantes son específicas de la especie y deben definirse mediante experimentos.

Las «cadenas ligeras» de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrados se puede asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), en función de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Una «región variable» de un anticuerpo hace referencia a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, ya sea sola o en combinación. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera consisten cada una en cuatro regiones marco (FR, por sus siglas en inglés) conectadas mediante tres regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), también conocidas como regiones hipervariables. Las FR mantienen las CDR en cada cadena muy cerca y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del punto de unión a antígeno de los anticuerpos. Existen al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) un enfoque que se basa en la variabilidad de secuencia entre especies (es decir, Kabat et ál. *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (5.^a ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)) y (2) un enfoque con base en estudios cristalográficos de complejos de anticuerpo y antígeno (Chothia et ál. (1989) *Nature* 342:877; Al-lazikani et ál (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948)). Tal como se usa en la presente, una CDR puede hacer referencia a CDR definidas mediante cualquier enfoque o mediante una combinación de ambos enfoques.

Cuando se usa en la presente, la expresión «región hipervariable» hace referencia a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una «región determinante de complementariedad» o «CDR» (Kabat, et ál. (1991), anterior) y/o los residuos de un «bucle hipervariable» (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Los residuos de «región marco» o «FR» son aquellos residuos de dominio variable distintos a los residuos de región hipervariable tal como se definen en la presente.

Tal como se usa en la presente, la expresión «región de unión a antígeno» hace referencia

a la parte de una molécula de antígeno que contiene los residuos aminoácidos que interactúan con un antígeno y le confieren al anticuerpo su especificidad y afinidad por el antígeno. La región de unión a antígeno incluye los residuos aminoácidos «marco» necesarios para mantener la conformación adecuada de los residuos de unión a antígeno.

Una «región Fc funcional» posee al menos una función efectora de una región Fc de secuencia natural. Ejemplos de «funciones efectoras» incluyen la unión a C1q, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), unión al receptor de Fc, unión al receptor neonatal, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), fagocitosis, regulación por disminución de los receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de células B (BCR)), etc. En general, tales funciones efectoras requieren que se combine la región Fc con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y se pueden evaluar mediante varios ensayos conocidos en la técnica para evaluar tales funciones efectoras de anticuerpo.

Una «región Fc de secuencia natural» comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc que se encuentra en la naturaleza. Una «región Fc variante» o una región Fc «mutante» o «con mutaciones» comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia natural en virtud de al menos una modificación de aminoácido y puede retener o no al menos una función efectora de la región Fc de secuencia natural. Preferentemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia natural o con la región Fc de un polipéptido original, por ejemplo, de alrededor de una a alrededor de diez sustituciones de aminoácidos y preferentemente de alrededor de una a alrededor de cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia natural o en la región Fc del polipéptido original. La región Fc variante de la presente poseerá, preferentemente, al menos alrededor de 80 % de identidad de secuencia con una región Fc de secuencia natural y/o con una región Fc de un polipéptido original, y más preferentemente, al menos alrededor de 90 % de identidad de secuencia con estas y más preferentemente, al menos alrededor de 95 % de identidad de secuencia con estas. Una región Fc variante o con mutación también puede eliminar esencialmente la función de la región Fc del anticuerpo. Por ejemplo, las mutaciones de la región Fc pueden eliminar la función efectora del anticuerpo. En una modalidad de la invención, el anticuerpo de la invención comprende una región Fc con mutación.

Tal como se usan en la presente «receptor de Fc» y «FcR» describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR de secuencia natural. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gama) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, que incluyen variantes alélicas y alternativamente formas empalmadas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un receptor de

activación) y FcγRIIB (un receptor de inhibición), los que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. Se reseñan los FcR en Ravetch y Kinet, 1991, *Ann. Rev. Immunol* 9:457-92; Capel et ál., 1994, *Immunomethods*, 4:25-34; y de Haas et ál., 1995, *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41. «FcR» también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer et ál., 1976, *J. Immunol.*, 117:587; y Kim et ál., 1994, *J. Immunol.*, 24:249).

Tal como se usan en la presente, «citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo» y «ADCC» hacen referencia a una reacción mediada por células en la cual células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (FcR, por ejemplo, células citolíticas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen anticuerpos de unión en una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana. Se puede evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés mediante un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como se describe en las patentes estadounidenses n.º 5,500,362 o 5,821,337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células NK. De manera alternativa o adicional, es posible evaluar la actividad de ADCC de la molécula de interés *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes et ál., 1998, *PNAS (USA)*, 95:652-656.

«Citotoxicidad dependiente del complemento» y «CDC» hacen referencia a la lisis de una diana en presencia de un complemento. La unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) con una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) que forma complejo con un antígeno cognado inicia la vía de activación del complemento. Para evaluar la activación del complemento, es posible realizar un ensayo de CDC, por ejemplo, tal como se describe en Gazzano-Santoro et ál., *J. Immunol. Methods*, 202: 163 (1996).

La digestión de papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, llamados fragmentos «Fab», cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento «Fc» residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizarse fácilmente. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación de antígenos y aun así es capaz de reticular el antígeno.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación que se utiliza en la presente para el Fab' en que el o los residuos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' con cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

“Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión al antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha y no covalente. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. En conjunto, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. No obstante, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprenda solo tres regiones hipervariables específicas de un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad inferior a todo el lugar de unión.

Tal como se usa en la presente, un «antígeno» hace referencia al determinante antigénico reconocido por las CDR del anticuerpo o proteína de unión a antígeno como se describe en la presente. En otras palabras, «epítipo» hace referencia a la parte de cualquier molécula que un anticuerpo puede reconocer y a la que se puede unir. A menos que se indique lo contrario, tal como se usa en la presente, el término «epítipo» hace referencia a la región de NGF a la que se une el agente/anticuerpo/proteína de unión a antígeno anti-NGF.

Las expresiones «dominio de unión a antígeno», «fragmentos activos de un anticuerpo» o similares hacen referencia a la parte de un anticuerpo o proteína de unión a antígeno que comprende el área que se une específicamente o que es complementaria a una parte o a la totalidad de un antígeno. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo puede unirse solamente a una parte particular del antígeno. El «epítipo», «fragmento activo de un epítipo» o «determinante antigénico», o similares, es una parte de una molécula de antígeno que es responsable de interacciones específicas con el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo. Uno o más dominios variables del anticuerpo (por ejemplo, un fragmento de anticuerpo denominado Fd que consiste en un dominio V_H) pueden proveer un dominio de unión al antígeno. Un dominio de unión a antígeno puede comprender un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (V_L) y un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (V_H) (patente estadounidense n.º 5,565,332).

Las expresiones «parte de unión» de un anticuerpo (o «parte de anticuerpo»), «polipéptido de unión a antígeno» o similares incluyen uno o más dominios completos, por ejemplo, un par de dominios completos, así como fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno, por ejemplo, NGF. Se ha demostrado que fragmentos de un anticuerpo de longitud completa pueden ejercer la función de unión de un anticuerpo. Los fragmentos de unión se producen mediante técnicas de ADN recombinantes o mediante escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, F(abc), Fd, dAb, Fv, cadenas simples, anticuerpos de cadena simple, por ejemplo, scFv, y anticuerpos de dominio simple (Muyldermans et ál., 2001, 26:230-5), y una región determinante de

complementariedad (CDR) aislada. Un fragmento Fab es un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1. Un fragmento F(ab')₂ es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra. Un fragmento Fd consiste en los dominios VH y CH1 y un fragmento Fv consiste en los dominios VL y VH de un solo grupo de un anticuerpo. Un fragmento dAb consiste en un dominio VH (Ward et ál., (1989) *Nature* 341:544-546). Aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, son codificados por genes independientes, pueden unirse mediante métodos recombinantes a través de un enlazador sintético que les permite formarse como una única cadena proteica en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes conocidas como Fv de cadena simple (scFv) (Bird et ál., 1988, *Science* 242:423-426). También se pretende que la expresión «parte de unión al antígeno» de un anticuerpo comprenda dichos anticuerpos de cadena simple. Otras formas de anticuerpos de cadena simple, tales como los diacuerpos, también están comprendidas. Los diacuerpos son anticuerpos biespecíficos bivalentes en los cuales se expresan los dominios VH y VL en una cadena de polipéptidos simple, pero mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, lo que obliga a los dominios a aparearse con dominios complementarios de otra cadena y crea dos sitios de unión a antígeno (vea, por ejemplo, Holliger et ál., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448). Un anticuerpo o parte de unión de este también puede ser parte de moléculas de inmunoadhesión más grandes formadas por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o parte de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos. Ejemplos de dichas moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región núcleo de estreptavidina para elaborar una molécula scFv tetramérica (Kipriyanov, S.M. et ál. (1995) *Human Antibodies and Hybridomas*, 6:93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistina de extremo C para elaborar moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S.M. et ál. (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Se pueden preparar fragmentos de unión, tales como fragmentos Fab y F(ab')₂, a partir de anticuerpos completos utilizando técnicas convencionales, tales como digestión de papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Además, se pueden obtener anticuerpos, partes de anticuerpos y moléculas de inmunoadhesión mediante técnicas de ADN recombinante estándares, tal como se describe en la presente y es de conocimiento en la técnica. Además de anticuerpos «bienespecíficos» y «bifuncionales», se entiende que un anticuerpo tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. Un anticuerpo «bienespecífico» o «bifuncional» es un anticuerpo híbrido artificial con dos pares de cadenas pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Un anticuerpo biespecífico también puede incluir dos regiones de unión a antígeno con una región constante interpuesta. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante una variedad de métodos que incluyen la fusión de hibridomas o el enlace de fragmentos Fab'. Ver, por

ejemplo, Songsivilai et ál., *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321, 1990.; Kostelny et ál., 1992, *J. Immunol.* 148, 1547-1553.

La expresión «mutación inversa» hace referencia a un proceso en el que se reemplazan algunos o todos los aminoácidos con mutación somática de un anticuerpo canino con los residuos de línea germinal correspondiente de una secuencia de anticuerpo de línea germinal homóloga. Las secuencias de cadena pesada y ligera del anticuerpo canino de la invención se alinean independientemente con las secuencias de línea germinal para identificar las secuencias con la mayor homología. Las diferencias en el anticuerpo canino de la invención vuelven a la secuencia de línea germinal mediante la mutación de posiciones de nucleótidos definidas que codifican dicho aminoácido diferente. Se debería investigar la función de cada aminoácido identificado de dicha forma como candidato para mutación inversa para determinar su función directa o indirecta en la unión a antígeno y no se debería incluir en el anticuerpo canino final ningún aminoácido que se determinara que afecta cualquier característica deseable luego de la mutación. Por ejemplo, no se someterían a mutación inversa los aminoácidos que mejoran la actividad identificados mediante el enfoque de mutagénesis selectiva. Con el fin de minimizar la cantidad de aminoácidos sometidos a mutación inversa, se pueden mantener las posiciones de aminoácidos que se determina que son diferentes de la secuencia de línea germinal más próxima, pero que son idénticas a los aminoácidos correspondientes en una segunda línea germinal, siempre que la segunda línea germinal sea idéntica y colineal con la secuencia del anticuerpo canino de la invención. Puede ser necesaria la mutación inversa de residuos marco diana seleccionados en los residuos de donante correspondientes para restaurar y/o mejorar la afinidad.

Tal como se usa en la presente, la unión «inmunoespecífica» de anticuerpos hace referencia a la interacción de unión específica a antígeno que ocurre entre el sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo y el antígeno específico reconocido por dicho anticuerpo (es decir, el anticuerpo reacciona con la proteína en un ensayo ELISA u otro inmunoensayo, y no reacciona de forma detectable con proteínas no relacionadas). También se entienden en la técnica las expresiones con relación a epítipo que «se une específicamente» o «se une preferencialmente» (los cuales se usan de forma indistinta en la presente) a un anticuerpo o un polipéptido, y métodos para determinar dicha unión preferencial o específica. Se plantea que una molécula exhibe «unión específica» o «unión preferencial» si reacciona o se asocia con mayor frecuencia, más fácilmente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una sustancia o célula particular que con sustancias o células alternativas. Un anticuerpo «se une específicamente» o «se une preferencialmente» a una diana si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración respecto a su unión a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específica o preferencialmente con un epítipo de NGF es un anticuerpo que se une a dicho

epítopo con mayor afinidad, avidez, más rápidamente y/o con mayor duración respecto a su unión a otros epítomos de NGF o epítomos no de NGF. También se entiende al leer esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o resto o epítopo) que se une específica o preferencialmente a una primera diana se puede unir específica o preferencialmente a una segunda diana o no. Por lo tanto, la «unión específica» o «unión preferencial» no requiere necesariamente una unión exclusiva (aunque la puede incluir). En general, aunque no necesariamente, la referencia a unión significa unión preferencial.

En el contexto de la unión a anticuerpo, el término «específicamente» hace referencia a unión con avidez elevada y/o afinidad elevada a un antígeno específico, es decir, un polipéptido o epítopo. La unión específica de anticuerpo a antígeno es más fuerte que la unión del mismo anticuerpo a otros antígenos. Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido pueden ser capaces de unirse a otros polipéptidos en un nivel débil, pero detectable (por ejemplo, 10 % o menos de la unión ilustrada con el polipéptido de interés). Esta unión débil o unión de fondo se puede distinguir fácilmente de la unión específica de un anticuerpo a un polipéptido sujeto, por ejemplo, mediante el uso de controles adecuados. En general, anticuerpos específicos se unen a un antígeno con una afinidad de unión con una K_d de 10^{-7} M o menos, 10^{-8} M o menos, 10^{-9} M o menos, 10^{-10} M o menos, 10^{-11} M o menos, 10^{-12} M o menos, o 10^{-13} M o menos, etc.

Tal como se usa en la presente, el término «afinidad» hace referencia a la resistencia de la unión de un sitio de combinación de antígeno simple con un determinante antigénico. La afinidad depende de la cercanía del ajuste estereoquímico entre sitios de combinación de anticuerpo o proteína de unión a antígeno y determinantes de antígenos, del área de contacto entre ellas, de la distribución de grupos cargados e hidrofóbicos, etc. Es posible medir la afinidad de un anticuerpo mediante análisis de equilibrio o mediante el método de resonancia de plasmones superficiales SPR (por ejemplo, BIACORE™). El método de SPR se basa en el fenómeno de resonancia superficial de plasmones (SPR), lo que ocurre cuando las ondas de plasmón superficial se excitan en una interfaz metal/líquido. La luz se dirige al lateral de la superficie que no se encuentra en contacto con la muestra, y se refleja de esta, y la SPR provoca la reducción de la intensidad de luz reflejada en una combinación específica de ángulo y longitud de onda. Los eventos de unión biomolecular provocan cambios en el índice de refracción en la capa superficial, los que se detectan como cambios en la señal de SPR.

Se pretende que el término « K_D », tal como se usa en la presente, haga referencia a la constante de disociación de una interacción de anticuerpo-antígeno. La constante de disociación, K_D , y la constante de asociación, K_a , son medidas cuantitativas de afinidad. En equilibrio, el antígeno libre (Ag) y el anticuerpo libre (Ab) se encuentran en equilibrio con el complejo de antígeno y anticuerpo (Ag-Ab), y las constantes de velocidad, k_a y k_d , cuantifican las velocidades

de las reacciones individuales. En equilibrio, $k_a [Ab][Ag] = k_d [Ag-Ab]$. La constante de disociación, K_d , se calcula como: $K_d = k_d/k_a = [Ag][Ab]/[Ag-Ab]$. K_d tiene unidades de concentración, más usualmente M, mM, μ M, nM, pM, etc. Cuando se comparan las afinidades de anticuerpos expresadas como K_d , un valor menor indica una mayor afinidad por NGF. La constante de asociación, K_a , se calcula como: $K_a = k_a/k_d = [Ag-Ab]/[Ag][Ab]$. K_a tiene unidades de concentración inversa, más usualmente M^{-1} , mM^{-1} , μM^{-1} , nM^{-1} , pM^{-1} , etc. Tal como se usa en la presente, el término «avidez» hace referencia a la fortaleza del enlace entre antígeno y anticuerpo luego de la formación de complejos reversibles. Los anticuerpos anti-NGF se pueden caracterizar en términos de K_d para su unión a una proteína NGF, como la unión «con una constante de disociación (K_d) en el rango de alrededor de (valor de K_d menor) a alrededor de (valor de K_d superior)».

Los términos «polipéptido», «oligopéptido», «péptido» y «proteína» se usan de manera intercambiable en la presente y se refieren a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede ser interrumpido por algo diferente a aminoácidos. Los términos abarcan también un polímero de aminoácidos que se modificó en forma natural o mediante intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcado. También se incluyen en la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (que incluyen, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Debido a que los polipéptidos de esta invención se basan en un anticuerpo, se entiende que los polipéptidos pueden ocurrir como cadenas simples o cadenas asociadas.

La expresión «sustitución de aminoácidos conservativa» indica cualquier sustitución de aminoácido para un residuo aminoácido dado, donde el residuo sustituto es tan químicamente similar al residuo dado que no se produce una reducción sustancial de la función polipeptídica (por ejemplo, actividad enzimática). Se conocen en la técnica sustituciones de aminoácidos conservativas y se describen ejemplos de estas, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.^{os} 6,790,639, 6,774,107, 6,194,167 o 5,350,576. En una modalidad preferida, una sustitución de aminoácidos conservativa será cualquiera que se produzca en uno de los seis grupos siguientes:

- residuos alifáticos pequeños sustancialmente no polares: Ala, Gly, Pro, Ser y Thr;
- residuos alifáticos grandes no polares: Ile, Leu y Val; Met;
- residuos polares con carga negativa y sus amidas: Asp y Glu;
- amidas de residuos polares con carga negativa: Asn y Gln; His;
- residuos polares con carga positiva: Arg y Lys; His; y

- residuos aromáticos grandes: Trp y Tyr; Phe.

En una modalidad preferida, una sustitución de aminoácidos conservativa será cualquiera de las siguientes, las que se mencionan como pares de residuos naturales (sustituciones conservativas): Ala (Ser); Arg (Lys); Asn (Gln; His); Asp (Glu); Gln (Asn); Glu (Asp); Gly (Pro); His (Asn; Gln); Ile (Leu; Val); Leu (Ile; Val); Lys (Arg; Gln; Glu); Met (Leu; Ile); Phe (Met; Leu; Tyr); Ser (Thr); Thr (Ser); Trp (Tyr); Tyr (Trp; Phe); y Val (Ile; Leu).

Las expresiones «ácido nucleico», «polinucleótido», «molécula de ácido nucleico» y similares se pueden usar de forma indistinta en la presente y hacen referencia a una serie de bases nucleotídicas (también conocidas como «nucleótidos») en ADN y ARN. El ácido nucleico puede contener desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o sus análogos. Por ejemplo, «ácido nucleico» incluye moléculas de cadena simple y de doble cadena. Por ejemplo, un ácido nucleico puede ser un gen o fragmento de gen, exones, intrones, una molécula de ADN (por ejemplo, ADNc), una molécula de ARN (por ejemplo, ARNm), ácidos nucleicos recombinantes, plásmidos y otros vectores, cebadores y sondas. Se incluyen tanto los polinucleótidos 5' a 3' (sentido) como 3' a 5' (antisentido). Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, bases o nucleótidos modificados y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse a un polímero mediante ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. De encontrarse presente una modificación de la estructura del nucleótido, esta se puede impartir antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede verse interrumpida por componentes no nucleótidos. Se puede modificar adicionalmente un polinucleótido luego de la polimerización, tal como mediante la conjugación con un componente de etiquetado. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, «casquetes», sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones de internucleótidos tales como, por ejemplo, con enlaces no cargados (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), que contienen restos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), que tienen intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), los que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.), que contienen alquilantes, con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas de los polinucleótidos. Además, se puede reemplazar cualquiera de los grupos hidroxilo presentes comúnmente en los azúcares, por ejemplo, con grupos fosfonato, grupos fosfato, los pueden proteger grupos protectores estándares o se pueden activar para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales o se pueden

conjugar con soportes sólidos. Es posible fosforilar los OH de extremos 5' y 3' o sustituirlos con aminas o restos de grupos de terminación orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. También se pueden derivar otros hidroxilos en grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogos de azúcares de ribosa o desoxirribosa generalmente conocidos en la técnica, lo que incluye, por ejemplo, 2'-O-metil-ribosa, 2'-O-alil-ribosa, 2'-fluoro-ribosa o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carboxílicos, azúcares anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como ribósidometilo. Uno o más enlaces de fosfodiéster pueden remplazarse con grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, de modo no taxativo, modalidades en las que se reemplaza el fosfato con P(O)S (tioato), P(S)S (ditioato), (O)NR₂ (amidato), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ (formacetal), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenoilo, cicloalquilo, cicloalquenoilo o araldilo. No es necesario que todos los enlaces en un polinucleótido sean idénticos. La descripción que antecede se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en la presente, incluidos ARN y ADN.

Tal como se usa en la presente, «vector» significa una construcción capaz de administrar y, preferentemente, expresar uno o más genes o secuencias de interés en una célula hospedadora. Los ejemplos de vectores incluyen, de modo no taxativo, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN no conjugado, vectores plásmidos, cósmidos o fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados a agentes de condensación catiónica, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas y determinadas células eucariotas, tal como células productoras. Los vectores, tal como se describe en la presente, tienen secuencias de control de expresión, lo que significa una secuencia de ácidos nucleicos que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Una secuencia de control de expresión puede ser un promotor, tal como un promotor constitutivo o un promotor inducible, o un potenciador. La secuencia de control «se enlaza de forma operativa» a la secuencia de ácidos nucleicos a transcribir. Un ácido nucleico se enlaza de forma operativa cuando se ubica en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está enlazado de forma operativa al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está enlazado de forma operativa a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia o un sitio de unión al ribosoma está enlazado de forma operativa a una secuencia codificante si se ubica de modo de facilitar la traducción. Generalmente, «unido de manera operativa» significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas, y, en el caso de una líder secretora, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, no es necesario que los

potenciadores sean contiguos. El enlace se logra mediante unión en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

Al igual que un polipéptido puede contener sustituciones de aminoácidos conservativas, un polinucleótido de este puede contener sustituciones de codones conservativas. Una sustitución de codón se considera conservativa si, cuando se expresa, produce una sustitución de aminoácido conservativa, tal como se describió anteriormente. La sustitución de codón degenerada, la que no genera sustitución de aminoácidos, también es útil en polinucleótidos de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, por ejemplo, un polinucleótido que codifica un polipéptido seleccionado útil en una modalidad de la presente invención puede mutar mediante sustitución de codón degenerada con el fin de aproximar la frecuencia de uso de codón que exhibe una célula hospedadora de expresión que se transforma con este o para mejorar de otra forma la expresión de este.

Una proteína de unión a antígeno anti-NGF «variante» hace referencia en la presente a una molécula que difiere de una secuencia de aminoácidos de anticuerpo anti-NGF «original» debido a la adición, eliminación y/o sustitución de uno o más residuos aminoácidos en la secuencia del anticuerpo original y mantiene al menos una actividad deseada del anticuerpo anti-NGF original. El anti-NGF variante puede comprender sustituciones de aminoácidos conservativas en la región hipervariable del anticuerpo, tal como se describe en la presente. Las actividades deseadas pueden incluir la capacidad de unión específica al antígeno, la capacidad de reducir, inhibir o neutralizar la actividad de NGF en un animal. En una modalidad, la variante comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más regiones hipervariables y/o regiones marco del anticuerpo original. Por ejemplo, la variante puede comprender al menos una, por ejemplo, de alrededor de una a alrededor de diez, y, preferentemente, de alrededor de dos a alrededor de cinco, sustituciones en una o más regiones hipervariables y/o regiones marco del anticuerpo original. Usualmente, la variante tendrá una secuencia de aminoácidos con al menos 50 % de identidad de secuencia de aminoácidos con las secuencias de dominio variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo original, más preferentemente, al menos alrededor de 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % y 95 % de identidad de secuencia. La identidad u homología con respecto a esta secuencia se define en la presente como el porcentaje de residuos aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos del anticuerpo original luego de la alineación de las secuencias y la introducción de huecos, si fuera necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia. No se debe interpretar que ninguna de las extensiones, eliminaciones o inserciones en la secuencia de anticuerpo en el extremo N, el extremo C o internas afecta la homología o identidad de secuencia. La variante retiene la capacidad de unión a NGF y,

preferentemente, tiene actividades deseadas que son iguales o superiores a las del anticuerpo original. Por ejemplo, la variante puede tener una afinidad de unión más fuerte, mayor capacidad para reducir, inhibir o neutralizar la actividad de NGF en un animal, y/o mayor capacidad para inhibir la unión de NGF a TrkA y p75.

5 TrkA, considerado el receptor de NGF de alta afinidad, es un miembro de la familia del receptor de tirosina cinasa neurotrófico (NTKR). Esta cinasa es un receptor unido a la membrana que, tras la unión a la neurotrofina, se fosforila a sí mismo (autofosforilación) y a miembros de vías de MAPK. La presencia de esta cinasa lleva a la diferenciación celular y puede cumplir una función en la especificación de subtipos de neuronas sensoriales. El receptor p75 se considera el receptor
10 de NGF de baja afinidad.

En la presente, un ácido nucleico «variante» hace referencia a una molécula que difieren en secuencia de un ácido nucleico «original». La divergencia de secuencias de polinucleótidos puede ser el resultado de cambios mutacionales, como eliminaciones, sustituciones o adiciones de uno o más nucleótidos. Cada uno de dichos cambios puede ocurrir solo o en combinación, una o
15 más veces en una secuencia dada.

El término «aislado» significa que el material (por ejemplo, ácido nucleico o proteína de unión a antígeno como se describe en la presente) se separa y/o se recupera de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del material y pueden incluir enzimas,
20 hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. Con respecto al ácido nucleico, un ácido nucleico aislado puede incluir uno que se separa de las secuencias 5' a 3' con las que normalmente se asocia en el cromosoma. En modalidades preferidas, el material se purificará hasta más de 95 % en peso del material y, más preferentemente, más de 99 % en peso. El material aislado incluye el material *in situ* dentro de células recombinantes, dado que al menos un componente del entorno natural del material no se encontrará presente. No obstante,
25 generalmente el material aislado se prepara mediante al menos una etapa de purificación.

Tal como se usan en la presente, las expresiones «célula», «línea celular» y «cultivo celular» se pueden usar de forma indistinta. Estas expresiones también incluyen su progenie, la que es toda generación posterior. Se entiende que es posible que toda la progenie no sea idéntica debido a mutaciones deliberadas o accidentales. En el contexto de expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga, la «célula hospedadora» hace referencia a una célula procariota o eucariota (por ejemplo, células bacterianas, células de levadura, células de mamíferos y células de
30 insectos) ya sea *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, las células hospedadoras pueden ubicarse en un animal transgénico. La célula hospedadora se puede usar como un receptor de vectores y puede incluir cualquier organismo que se pueda transformar que tenga la capacidad de replicar un vector

y/o expresar un ácido nucleico heterólogo codificado por un vector.

Cuando se usa en la presente, el término «etiqueta» hace referencia a un compuesto o composición que se puede detectar que se conjuga directa o indirectamente con el anticuerpo o ácido nucleico. La etiqueta puede ser detectable por sí misma (por ejemplo, etiquetas radioisotópicas o etiquetas fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar una alteración química de un compuesto o composición de sustrato que se puede detectar.

Un «sujeto» o «paciente» hace referencia a un animal que necesita tratamiento al que pueden afectar las moléculas de la invención. Los animales que se pueden tratar de acuerdo con la invención incluyen vertebrados y mamíferos tales como canes son ejemplos particularmente preferidos.

Se pretende que una «composición» signifique una combinación de agente activo, ya sea una composición química, una composición biológica o bioterapéutica (particularmente, proteínas de unión a antígeno, tal como se describen en la presente), y otro compuesto o composición que puede ser inerte (por ejemplo, una etiqueta) o activa, tal como un adyuvante.

Tal como se define en la presente, los expertos en la técnica conocen «portadores farmacéuticamente aceptables» adecuados para usar en la invención. Dichos portadores incluyen, de modo no taxativo, agua, solución salina, solución salina amortiguada, amortiguador fosfato, soluciones acuosas/en alcohol, emulsiones o suspensiones. Es posible agregar otros diluyentes, adyuvantes y excipientes convencionalmente usados de acuerdo con técnicas convencionales. Dichos portadores pueden incluir etanol, polioles y mezclas adecuadas de estos, aceites vegetales y ésteres orgánicos inyectables. También pueden utilizarse amortiguadores y agentes de ajuste del pH. Los amortiguadores incluyen, de modo no taxativo, sales preparadas a partir de una base o un ácido orgánicos. Ejemplos de amortiguadores incluyen, de modo no taxativo, sales de ácido orgánico, tales como sales de ácido cítrico, citratos, ácido ascórbico, ácido glucónico, histidina-Hel, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético o ácido ftálico, Tris, clorhidrato de trimetanamina o amortiguadores de fosfato. Los portadores parenterales pueden incluir solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa, trehalosa, sacarosa y cloruro de sodio, solución de Ringer lactada. Los portadores intravenosos pueden incluir regeneradores de fluidos y nutrientes, regeneradores de electrolitos, como los basados en dextrosa de Ringer y similares. Los conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), gases inertes y similares también se pueden proveer en los portadores farmacéuticos. La selección del portador no limita la presente invención. El experto en la técnica está familiarizado con la preparación de estas composiciones farmacéuticamente aceptables a partir de los componentes antedichos, con la isotonicidad, estabilidad, pH y otras características convencionales adecuadas. Vea, por ejemplo, textos como *Remington: The*

Science and Practice of Pharmacy, 20.^a ed., Lippincott Williams & Wilkins, publ., 2000; y *The Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 4.^a ed., eds. R. C. Rowe et ál, APhA Publications, 2003.

Una «cantidad terapéuticamente eficaz» (o «cantidad eficaz») hace referencia a una cantidad de un ingrediente activo, por ejemplo, un agente de acuerdo con la invención, que es suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados cuando se administra a un sujeto o paciente. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones, aplicaciones o dosis. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de acuerdo con la invención. En el contexto de esta invención, una «cantidad terapéuticamente eficaz» es una que produce un cambio objetivamente medido en uno o más parámetros asociados a una afección relacionada con NGF y que es suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados que incluyen resultados clínicos como el alivio o la reducción de la sensación de dolor. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones. A efectos de esta invención, una cantidad eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para tratar, mejorar, prevenir y/o reducir la intensidad del dolor, lo que incluye dolor posquirúrgico, dolor por artritis reumatoide y/o dolor por osteoartritis. En algunas modalidades, la «cantidad eficaz» puede reducir el dolor al estar en reposo (dolor en reposo) o dolor mecánicamente inducido (lo que incluye dolor luego del movimiento), o ambos, y se puede administrar antes, durante o después de un estímulo doloroso. Tal como se comprende en el contexto clínico, una cantidad eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica se puede lograr o no en conjunto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por lo tanto, se puede considerar una «cantidad eficaz» en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos y un único agente se puede considerar suministrado en una cantidad eficaz si, junto con uno o más agentes adicionales, se puede lograr o se logra un resultado deseable. Por supuesto, la cantidad terapéuticamente eficaz variará de acuerdo con el sujeto particular y la afección en tratamiento, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la afección, el compuesto particular seleccionado, el régimen de dosificación a seguir, el momento de administración, la forma de administración y similares, todo lo cual puede determinar fácilmente un experto en la técnica.

Tal como se usa en la presente, el término «terapéutico» comprende el espectro completo de tratamientos para una enfermedad, afección o trastorno. Un agente «terapéutico» de la invención puede actuar en una forma profiláctica o preventiva, lo que incluye aquellas que incorporan procedimientos diseñados para dirigirse a animales que se pueden identificar como en riesgo (farmacogenética), o en una forma que mejora o de naturaleza curativa, o puede actuar para enlentecer la velocidad o la extensión de la evolución de al menos un síntoma de una enfermedad o trastorno en tratamiento.

En un aspecto adicional, la invención incluye composiciones veterinarias en las cuales los anticuerpos de la presente invención se proveen para usos terapéuticos o profilácticos. La invención implica un método para el tratamiento de un sujeto canino con un antígeno particular, por ejemplo, uno asociado con una enfermedad o afección. El método incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo recombinante específico para el antígeno particular con el anticuerpo recombinante descrito en la presente.

La cantidad de anticuerpo útil para producir un efecto terapéutico se puede determinar mediante técnicas estándares conocidas por los expertos en la técnica. En general, los anticuerpos se proveerán mediante una técnica estándar en un amortiguador farmacéuticamente aceptable y se pueden administrar mediante cualquier vía deseada. La vía de administración del anticuerpo o resto de unión a antígeno de la invención puede ser oral, parenteral, tópica o mediante inhalación. En una modalidad preferida, la vía de administración es parenteral. Tal como se usa en la presente, el término «parenteral» incluye la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal o intraperitoneal.

Tal como se usa en la presente, «dolor» hace referencia a dolor de cualquier etiología, lo que incluye dolor agudo y crónico, y cualquier dolor con un componente inflamatorio. Ejemplos de dolor incluyen dolor inflamatorio, dolor por incisión posoperatorio, dolor neuropático, dolor por fractura, dolor por fractura osteoporótica, neuralgia posherpética, dolor por cáncer, dolor provocado por quemaduras, dolor asociado a quemaduras o heridas, dolor asociado con traumatismo (lo que incluye lesiones en la cabeza por traumatismo), dolor neuropático, dolor asociado con trastornos musculoesqueléticos como artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante, artropatías seronegativas (no reumatoides), trastornos periarticulares y reumatismo no articular, y dolor asociado con cáncer (lo que incluye «dolor episódico» y dolor asociado con cáncer terminal), neuropatía periférica y neuralgia posherpética.

Tal como se usa en la presente, «tratamiento» es un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. A efectos de esta invención, los resultados clínicos deseados o beneficiosos incluyen, de modo no taxativo, uno o más de los siguientes: mejora o alivio de cualquier aspecto de dolor, lo que incluye dolor agudo, crónico, inflamatorio, neuropático, posquirúrgico, dolor por artritis reumatoide o dolor por osteoartritis. A efectos de la presente invención, los resultados clínicos deseados o beneficiosos incluyen, de modo no taxativo, uno o más de los siguientes: reducir la gravedad, aliviar uno o más síntomas asociados con dolor, los que incluyen cualquier aspecto del dolor (tal como acortar la duración del dolor, reducir la sensación o la sensibilidad al dolor).

El trastorno relacionado con NGF, tal como se describe en la presente, hace referencia a un trastorno que incluye enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, obesidad, diabetes tipo

2, síndrome metabólico, dolor e inflamación. En algunas modalidades de la presente invención, un trastorno relacionado con NGF hace referencia a dolor, en particular, dolor crónico, dolor inflamatorio, dolor por incisión posoperatorio, dolor neuropático, dolor por fractura, dolor por fractura osteoporósica, neuralgia posherpética, dolor por cáncer, dolor provocado por quemaduras, dolor asociado a quemaduras o heridas, dolor asociado con traumatismo (lo que incluye lesiones en la cabeza por traumatismo), dolor neuropático, dolor asociado con trastornos musculoesqueléticos como artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante, artropatías seronegativas (no reumatoides), trastornos periarticulares y reumatismo no articular, y dolor asociado con cáncer (lo que incluye «dolor episódico» y dolor asociado con cáncer terminal), neuropatía periférica y neuralgia posherpética.

«Reducir la incidencia» del dolor significa cualquier reducción de gravedad (lo que puede incluir reducir la necesidad y/o la cantidad (por ejemplo, la exposición) de otros fármacos y/o tratamientos generalmente usados para estas afecciones, lo que incluye, por ejemplo, opiáceos), duración y/o frecuencia (lo que incluye, por ejemplo, retrasar o aumentar el tiempo hasta el dolor posquirúrgico en un individuo). Tal como lo entienden los expertos en la técnica, los individuos pueden variar en cuanto a su respuesta al tratamiento y, como tal, por ejemplo, un «método para reducir la incidencia de dolor por artritis reumatoide o dolor por osteoartritis en un individuo» refleja la administración del anticuerpo antagonista anti-NGF con base en una expectativa razonable de que es posible que dicha administración provoque tal reducción en la incidencia en dicho individuo en particular.

La «mejora» del dolor o uno o más síntomas de un dolor (tal como dolor por artritis reumatoide o dolor por osteoartritis) significa una reducción o mejora de uno o más síntomas de un dolor en comparación con la ausencia de administración de un anticuerpo antagonista anti-NGF. «Mejorar» también incluye acortar o reducir en duración un síntoma.

«Mitigar» el dolor o uno o más síntomas de un dolor (tal como dolor por artritis reumatoide o dolor por osteoartritis) significa una reducción de la extensión de una o más manifestaciones clínicas no deseadas de dolor posquirúrgico en un individuo o una población de individuos tratados con un anticuerpo antagonista anti-NGF de acuerdo con la invención.

Tal como se usa en la presente, «retrasar» el desarrollo de dolor significa demorar, obstaculizar, enlentecer, retardar, estabilizar y/o posponer la evolución del dolor, tal como dolor posquirúrgico, dolor por artritis reumatoide o dolor por osteoartritis. La extensión de tiempo de este retraso puede variar de acuerdo con el historial de la enfermedad y/o los individuos en tratamiento. Como es evidente para el experto en la técnica, un retraso suficiente o considerable puede implicar efectivamente la prevención, en el sentido de que el individuo no desarrolla dolor. Un método que «retrasa» el desarrollo del síntoma es un método que reduce la probabilidad del desarrollo del

síntoma en un marco de tiempo dado y/o reduce la extensión de los síntomas en un marco de tiempo dado, en comparación con la ausencia de uso del método. Usualmente, tales comparaciones se basan en ensayos clínicos y usan una cantidad estadísticamente significativa de sujetos.

El «dolor posquirúrgico» (al que se hace referencia indistinta como dolor «posincisional» o «postraumático») hace referencia a dolor provocado por o como consecuencia de un traumatismo externo como un corte, punción, incisión, desgarró o herida del tejido de un individuo (lo que incluye el provocado por procedimientos quirúrgicos, ya sean invasivos o no invasivos). Tal como se usa en la presente, el dolor posquirúrgico no incluye dolor que se produce (surge o se origina) sin un traumatismo físico externo. En algunas modalidades, el dolor posquirúrgico es dolor interno o externo (lo que incluye dolor periférico) y la herida, corte, traumatismo, desgarró o incisión se puede producir accidentalmente (tal como en una herida por traumatismo) o de forma deliberada (tal como una incisión quirúrgica). Tal como se usa en la presente, «dolor» incluye nocicepción y la sensación de dolor, y se puede evaluar de forma objetiva y subjetiva con calificaciones de dolor y otros métodos conocidos en la técnica. Tal como se usa en la presente, el dolor posquirúrgico incluye alodinia (es decir, mayor respuesta a un estímulo normalmente no dañino) e hiperalgesia (es decir, mayor respuesta a un estímulo normalmente desagradable o dañino) que, a su vez, puede tener naturaleza térmica o mecánica (táctil). En algunas modalidades, el dolor se caracteriza por sensibilidad térmica, sensibilidad mecánica y/o dolor en reposo. En algunas modalidades, el dolor posquirúrgico comprende dolor mecánicamente inducido o dolor en reposo. En otras modalidades, el dolor posquirúrgico comprende dolor en reposo. El dolor puede ser dolor primario o secundario, tal como se entiende en la técnica.

Antes de describir los métodos de la presente, se debe entender que esta invención no se limita a métodos particulares y las condiciones experimentales descritas, como dichos métodos y condiciones, pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente tiene el fin de describir solamente modalidades particulares y no se pretende que sea taxativa ya que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se indique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Si bien en la práctica o evaluación de la presente invención se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente, a continuación, se describen los métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en la presente se incorporan a esta en su totalidad mediante esta referencia.

La invención descrita en la presente hace referencia a proteínas de unión a antígeno (lo

que se usa de forma indistinta con las expresiones «anticuerpos», «anticuerpos antagonistas», «fragmentos de anticuerpo» y similares, como se describe en la presente) que se unen específicamente al factor de crecimiento nervioso (NGF) y, en particular, a anticuerpos, ya sean caninos, felinos, equinos, murinos, bovinos, humanos o de cualquier otra especie, caninizados, felinizados, bovinizados, equinizados, humanizados o cualesquiera otros anticuerpos sometidos a especiación producidos mediante métodos recombinantes, tecnologías de hibridoma o tecnología de expresión en fagos, o anticuerpos monoclonales caninizados (sometidos a especiación) que se unen específicamente a NGF y, de esa forma, previenen la unión de NGF a receptores TrkA caninos y, en menor medida, receptores p75 caninos, de manera que son útiles como antagonistas dado que se previene la activación mediante NGF de la vía de señalización.

NGF fue la primera neurotrofina identificada y se ha caracterizado su función en el desarrollo y la supervivencia tanto de neuronas periféricas como centrales. Se ha demostrado que el NGF es un factor de supervivencia y mantenimiento crítico en el desarrollo de neuronas sensoriales embrionarias y simpáticas periféricas y de neuronas colinérgicas del prosencéfalo (Smeyne et ál., (1994) *Nature* 368:246-249; Crowley et ál. (1994) *Cell* 76:1001-1011). NGF regula por aumento la expresión de neuropéptidos en neuronas sensoriales (Lindsay et ál. (1989) *Nature* 337:362-364) y dos receptores unidos a membranas diferentes, el receptor TrkA y el que se considera el receptor de neurotrofina común p75 de baja afinidad, median su actividad.

Se ha observado la elevación de NGF en trastornos relacionados con NGF en los que una cantidad elevada de NGF se encuentra presente en tejidos enfermos o lesionados. Un trastorno relacionado con NGF se puede definir como un aumento de dolor debido a la elevación de NGF en un tejido lesionado, enfermo o dañado. Tal como se usa en la presente, el dolor se define como se describe en la presente y hace referencia a un trastorno que incluye dolor crónico, dolor inflamatorio, dolor por incisión posoperatorio, dolor neuropático, dolor por fractura, dolor por fractura osteoporósica, neuralgia posherpética, dolor por cáncer, dolor provocado por quemaduras, dolor asociado a quemaduras o heridas, dolor asociado con traumatismo (lo que incluye lesiones en la cabeza por traumatismo), dolor neuropático, dolor asociado con trastornos musculoesqueléticos como dolor crónico, artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante, artropatías seronegativas (no reumatoides), trastornos periarticulares y reumatismo no articular, y dolor asociado con cáncer (lo que incluye «dolor episódico» y dolor asociado con cáncer terminal), neuropatía periférica y neuralgia posherpética.

En una modalidad de la presente invención, un trastorno NGF se define como osteoartritis en un sujeto (canino, felino, equino, humano, etc.). La osteoartritis (OA) es una enfermedad articular degenerativa progresiva lenta que se caracteriza por una reducción del cartílago articular y la posterior exposición del hueso subcondral en canes. Eventualmente, esto tiene como

consecuencia un trastorno gradual insidioso perpetuo caracterizado por dolor articular. En respuesta a la inflamación crónica y el daño de tejido local, se produce formación ósea nueva para intentar limitar tanto el movimiento como el dolor. Macroscópicamente, existe pérdida de cartílago articular, estrechamiento del espacio articular, esclerosis del hueso subcondral y se producen osteofitos articulares (*Veterinary Focus*, tomo 17, n.º 3; 2007)

En especies diferentes, tales como canes, felinos, equinos y similares, la aparición de OA primaria depende de la raza. En el caso de canes, por ejemplo, la edad promedio de aparición es 3.5 años en rottweilers y 9.5 años en caniches, con un amplio rango de edad de aparición para otras razas y razas mixtas. Las enfermedades ortopédicas de desarrollo y la osteoartritis asociada son las enfermedades articulares más comunes en perros y representan alrededor de 70 % de las consultas médicas por enfermedad articular y problemas relacionados en el esqueleto apendicular. Veintidós por ciento de los casos fueron perros de un año o menores. La incidencia de la OA aumenta debido a traumatismo, así como a obesidad, envejecimiento y anomalías genéticas. En particular, la edad puede ser un factor en la incidencia de OA, en donde >50 % de los casos de artritis se observan en perros de 8-13 años. Las enfermedades musculoesqueléticas son muy comunes en pacientes geriátricos y cerca de 20 % de los perros mayores presentan trastornos ortopédicos. En el caso de labradores retriever >8 años, es usual la OA en varias articulaciones (codo, hombro, cadera, rodilla). De manera adicional, el tamaño del can también afecta la aparición de la OA. Del total de perros con artritis, 45 % son perros de razas grandes. Entre estos, >50 % son perros de razas gigantes, solo 28 % son perros de razas medianas y 27 % son perros de razas pequeñas. La necesidad de intervención farmacéutica para el alivio del dolor por OA en canes es elevada.

Tal como se indica en la presente, niveles elevados de NGF son indicativos de un trastorno relacionado con NGF, particularmente, en OA. Se han informado niveles elevados de NGF en ratones artríticos transgénicos junto con un aumento de la cantidad de mastocitos (Aloe et ál., *Int. J. Tissue Reactions-Exp. Clin. Aspects* 15:139-143 (1993)). La publicación PCT n.º WO 02/096458 describe el uso de anticuerpos anti-NGF con determinadas propiedades en el tratamiento de varios trastornos relacionados con NGF, tales como una afección inflamatoria (por ejemplo, artritis reumatoide). Se ha informado que la inyección de un anticuerpo anti-NGF purificado en ratones transgénicos artríticos con el gen de factor de necrosis tumoral humano produjo la reducción de la cantidad de mastocitos, así como una reducción de los niveles de histamina y sustancia P en las membranas sinoviales de ratones con artritis (Aloe et ál., *Rheumatol. Int.* 14: 249-252 (1995)). Se ha demostrado que la administración exógena de un anticuerpo de NGF redujo el nivel elevado de TNF α en ratones artríticos (Marmi et ál., *Rheumatol. Int.* 18: 97-102 (1998)). Se ha informado sobre anticuerpos antagonistas anti-NGF de roedores. Ver, por ejemplo, Hongo et ál., *Hybridoma*

(2000) 19(3): 215-227; Ruberti et ál. (1993) *Cell. MOLEC. Neurobiol.* 13(5): 559-568. Sin embargo, cuando se usan anticuerpos de roedores de forma terapéutica en mamíferos no murinos, se desarrolla una respuesta al anticuerpo antimurina en cantidades significativas de individuos tratados. Por lo tanto, son necesarias proteínas de unión a antígeno antagonista anti-NGF que
5 incluyen anticuerpos antagonistas anti-NGF de la presente invención para uso en canes, particularmente, para uso en el tratamiento de OA.

Aunque las propiedades de los anticuerpos hacen que sean agentes terapéuticos muy atractivos, existen varias limitaciones. La gran mayoría de los anticuerpos monoclonales (mAb) son de origen roedor, tal como se mencionó anteriormente. Cuando dichos anticuerpos se administran
10 a una especie diferente, los pacientes pueden acumular su propia respuesta a dichos anticuerpos xenógenos. Dicha respuesta puede provocar la eventual neutralización y eliminación del anticuerpo. Tal como se describió anteriormente, se usan ratones de forma extensiva en la producción de anticuerpos monoclonales. Un problema del uso de anticuerpos producidos por una especie particular, en general, inicialmente en ratones, es que los sujetos no murinos tratados con
15 dichos anticuerpos reaccionan a los anticuerpos de ratón como si fueran una sustancia externa, de forma que crean un nuevo conjunto de anticuerpos para los anticuerpos de ratón. El sistema inmunitario no murino, por ejemplo, canino, «detecta» los anticuerpos de ratón como externos y genera una respuesta inmunitaria contra la molécula. Los expertos en la técnica reconocerán que es necesario poder tratar a un sujeto con un anticuerpo específico para el antígeno, pero que la
20 especie de anticuerpo sea específica. Parte de la reacción generada por la administración de anticuerpos de otra especie, por ejemplo, la administración de un anticuerpo monoclonal de ratón a un can, puede variar de una forma leve, como una erupción, a una respuesta más extrema y con riesgo de muerte, tal como insuficiencia renal. Esta respuesta inmunitaria también puede reducir la eficacia del tratamiento o crear una reacción futura si se administra al sujeto un tratamiento
25 posterior que contiene anticuerpos de ratón. Por consiguiente, se pretende sobreponerse a esta desventaja mediante la caninización de un anticuerpo. En particular, este proceso se centra en las regiones marco del dominio variable de inmunoglobulina, pero también podrían incluir las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del dominio variable. Se describen en la presente las etapas que posibilitan y la reducción para llevar a cabo este proceso.

Se ha buscado mucho un proceso de modificación de un anticuerpo monoclonal (proteína de unión a antígeno, anticuerpo antagonista, etc., tal como se describen en la presente y términos
30 usados de forma indistinta) de un animal para hacer que sea menos inmunogénico para administración terapéutica a otra especie y se ha descrito en diversas publicaciones (por ejemplo, *Antibody Engineering: A practical Guide*. Carl A. K. Borrebaeck ed. W.H. Freeman and Company, 1992). Sin embargo, no se ha aplicado este proceso para el desarrollo de terapias o diagnósticos

para especies no humanas, particularmente, canes, hasta recientemente. De hecho, se ha publicado muy poco respecto a dominios variables caninos. Wasserman y Capra, *Biochem.* 6, 3160 (1977), determinaron la secuencia de aminoácidos de las regiones variables tanto de una cadena pesada de IgM canina como de IgA canina. Wasserman y Capra, *Immunochem.* 15, 303 (1978), determinaron la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera K de una IgA canina. McCumber y Capra, *Mol. Immunol.* 16, 565 (1979), describen la secuencia de aminoácidos completa de una cadena mu canina. Tang et ál., *Vet. Immunology Immunopathology* 80, 259 (2001), describe secuencias de ADNc de una sola cadena de IgG-A y cuatro secuencias de proteínas de cadena de IgG-A y canina. Se describe la amplificación mediante PCR de una biblioteca de ADNc de bazo canino con un cebador oligonucleótido degenerado diseñado a partir de las regiones conservadas de IgG humanas, de ratón, de cerdo y bovinas. La escasez de información disponible sobre anticuerpos caninos ha impedido su desarrollo como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades caninas.

Estas limitaciones han llevado al desarrollo de tecnologías de modificación conocidas como «especiación» que son conocidas para los expertos en la técnica en términos de «humanización» de anticuerpos terapéuticos. Los anticuerpos caninizados, como un ejemplo de moléculas sometidas a especiación, se pueden generar como anticuerpos quiméricos o fragmentos de estos que contienen mínima secuencia derivada de inmunoglobulina no canina. En su mayoría, los anticuerpos caninizados son anticuerpos caninos (es decir, «anticuerpo receptor» o «anticuerpo de especie diana») en los que se reemplazan residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor con residuos de una CDR de una especie no canina (es decir, «anticuerpo donante» o «anticuerpo de especie original»), tal como ratón, con las propiedades deseadas tales como especificidad, afinidad y potencia. En algunos casos, se reemplazan los residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina canina con residuos no caninos correspondientes. Se hace referencia a esta estrategia de caninización como «realización de injertos de CDR». Puede ser necesaria la mutación inversa de residuos marco diana seleccionados en los residuos de donante correspondientes para restaurar y/o mejorar la afinidad. También es posible emplear los métodos con base en estructura para la caninización y la maduración de afinidad tal como se describe en US 7,261,890.

Los enfoques anteriormente descritos utilizan esencialmente regiones marco enteras de una o más cadenas ligeras variables o cadenas pesadas variables de anticuerpos de la especie diana que se modifican para recibir CDR de la especie donante. Este enfoque también se utiliza cuando se feliniza un anticuerpo para que sea menos antigénico cuando se administre a felinos, en la misma forma que la caninización. En algunos casos, la mutación inversa de residuos seleccionados en la región variable se usa para mejorar la presentación de las CDR. Diseñar

anticuerpos que minimicen la reacción inmunogénica en un sujeto a secuencias no nativas en el anticuerpo al tiempo que se preservan las regiones de unión a antígeno del anticuerpo en una medida suficiente para mantener la eficacia ha resultado difícil.

Otra dificultad para el desarrollo de anticuerpos terapéuticos dirigidos a proteínas es que los epítomos en la proteína homóloga en una especie diferente son frecuentemente diferentes y la posibilidad de reactividad cruzada con otras proteínas también es diferente. Como consecuencia, es necesario producir, evaluar y desarrollar anticuerpos para la diana específica en la especie particular a tratar.

Los anticuerpos seleccionan como diana un antígeno a través de la unión de un epítipo específico en un antígeno mediante la interacción con la región variable de la molécula de anticuerpo. Asimismo, los anticuerpos tienen la capacidad para mediar, inhibir (como en el caso de la proteína de unión a antígeno anti-NGF antagonista de la presente invención) y/o iniciar una variedad de actividades biológicas. Existe una amplia variedad de funciones para los anticuerpos terapéuticos, por ejemplo, los anticuerpos pueden modular las interacciones entre receptor y ligando como agonistas o antagonistas. La unión a anticuerpo puede iniciar señalización intracelular para estimular el crecimiento celular, producción de citocina o apoptosis. Los anticuerpos pueden administrar agentes unidos a la región Fc a sitios específicos. Los anticuerpos también provocan citotoxicidad mediada por anticuerpo (ADCC), citotoxicidad mediada por complemento (CDC) y fagocitosis. También existen anticuerpos que se alteraron en los que se eliminaron las funciones de ADCC, CDC, unión a C1q y fagocitosis. En una modalidad de la presente invención, el anticuerpo de la presente invención comprende alteraciones en la región Fc del anticuerpo que alteran la función efectora de dicho anticuerpo.

Caninización y felinización

Tal como se usa en la presente, «anticuerpo caninizado» significa un anticuerpo con una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de un anticuerpo producido por un can y/o producido con cualquiera de las técnicas conocidas o descritas en la presente. Se sigue el mismo proceso para la felinización y se debería aplicar a la descripción de la presente. A efectos de simplicidad, se usará principalmente caninización como ejemplo. Sin embargo, estos ejemplos no se limitan solo a canes. Los mismos conceptos y diseños se aplican a la especiación de otras proteínas de unión a antígeno, por ejemplo, felinas, equinas, humanas y similares. Esta definición de un anticuerpo caninizado incluye anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de cadena pesada canino o al menos un polipéptido de cadena ligera canino. La «especiación» de

anticuerpos, y, en particular, la humanización de anticuerpos, es un área de estudio conocida por los expertos en la técnica. Hasta hace poco tiempo, se desconocía si la especiación de anticuerpos más allá de la humanización produciría un anticuerpo terapéutico que podría ser eficaz en cualquier otra especie. La presente invención ejemplifica la caninización y la felinización de cualquier proteína de unión a antígeno anti-NGF para uso terapéutico en perros y gatos, respectivamente.

Los anticuerpos quiméricos comprenden secuencias de al menos dos especies diferentes. Por ejemplo, se pueden usar técnicas de clonación recombinantes para incluir regiones variables que contienen los sitios de unión a antígeno de un anticuerpo no receptor (es decir, un anticuerpo preparado en una especie donadora inmunizada con el antígeno) y regiones constantes derivadas de una inmunoglobulina de receptor.

Los anticuerpos sometidos a especiación (caninizados, felinizados y similares) son un tipo de anticuerpo quimérico, en donde los residuos de región variable responsables de la unión a antígeno (es decir, residuos de una región determinante de complementariedad, región determinante de complementariedad abreviada o cualesquiera otros residuos que participan en la unión a antígeno) derivan de una especie no canina (o no felina), mientras que los residuos de región variable restantes (es decir, residuos de las regiones marco) y regiones constantes derivan, al menos en parte, de secuencias de anticuerpos caninos (o felinos). Un subconjunto de residuos de región marco y residuos de región constante de un anticuerpo sometido a especiación puede derivar de fuentes no caninas (o felinas). Las regiones variables de un anticuerpo sometido a especiación también se describen como sometidas a especiación (es decir, una región variable de cadena ligera o pesada sometida a especiación). La especie no sometida a especiación es la usualmente empleada para inmunización con antígeno, tal como ratones, ratas, conejos, primates no humanos u otras especies de mamíferos no caninos o no felinos.

Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son residuos de regiones variables de anticuerpos que participan en la unión a antígeno. Varios sistemas de numeración se usan comúnmente para identificar las CDR. La definición de Kabat se basa en la variabilidad de secuencia y la definición de Chothia se basa en la ubicación de las regiones bucle estructurales. La definición de AbM es un compromiso entre los enfoques de Kabat y Chothia. Un anticuerpo sometido a especiación de la invención se puede construir de forma de comprender una o más CDR. Además, las CDR se pueden usar por separado o en combinación en moléculas sintéticas tales como SMIP y miméticos de anticuerpo pequeños.

Los residuos marco son aquellos residuos de regiones variables de anticuerpo diferentes de residuos de CDR o hipervariables. Los residuos marco pueden derivar de anticuerpos caninos de origen natural (por ejemplo, pero aplicables en concepto a otras especies tales como felinos,

equinos, humanos, etc. A efectos de simplicidad, se usarán canes como la especie representativa, pero los ejemplos no se limitan a canes), tal como un marco canino que es sustancialmente similar a una región marco del anticuerpo de la invención. También se pueden usar secuencias marco artificiales que representan un consenso entre secuencias individuales. Al seleccionar una región marco para caninización, se pueden preferir secuencias ampliamente representadas en canes con respecto a secuencias menos populosas. Es posible efectuar mutaciones adicionales a las secuencias aceptoras marco caninas para restaurar residuos murinos que se cree que están implicados en el contacto con antígenos y/o residuos implicados en la integridad estructural del sitio de unión a antígeno, o para mejorar la expresión de anticuerpos.

Se realizan injertos de CDR mediante el reemplazo de una o más CDR de un anticuerpo aceptor (por ejemplo, un anticuerpo caninizado u otro anticuerpo que comprende residuos marco deseados) con CDR de un anticuerpo donante (por ejemplo, un anticuerpo no canino). Los anticuerpos aceptores se pueden seleccionar con base en similitud de los residuos marco entre un anticuerpo aceptor candidato y un anticuerpo donante. Por ejemplo, se identifican regiones marco caninas con homología de secuencia sustancial con cada región marco del anticuerpo no canino relevante y se injertan CDR del anticuerpo no canino en el compuesto de las regiones marco caninas diferentes.

Se puede usar el análisis de estructuras tridimensionales de complejos de anticuerpo y antígeno, combinado con el análisis de los datos de secuencia de aminoácidos disponibles, para modelar la variabilidad de secuencia con base en la diferencia estructural de residuos aminoácidos en cada posición en la CDR. También es posible utilizar las CDR de la presente invención en miméticos de anticuerpos pequeños, los que comprenden dos regiones CDR y una región marco (Qui et ál., *Nature Biotechnology*, tomo 25; 921-929; agosto de 2007).

Los marcos aceptores para injertos de CDR o CDR abreviadas se pueden modificar adicionalmente para introducir residuos deseados. Por ejemplo, los marcos aceptores pueden comprender una región variable de cadena pesada de una secuencia de consenso canina, opcionalmente, con residuos de donante no canino en una o más posiciones. Luego de la realización de injertos, se pueden realizar cambios adicionales en las secuencias donantes y/o aceptoras para optimizar la funcionalidad y la unión a anticuerpo. Ver, por ejemplo, la publicación estadounidense n.º WO 91/09967.

La presente invención también provee células y líneas celulares que expresan anticuerpos de la invención. Células hospedadoras representativas incluyen células bacterianas, de levadura, de mamíferos y humanas, tales como células CHO, células HEK-293, células HeLa, células CV-1 y células COS. Se conocen en la técnica métodos para generar una línea celular estable luego de la transformación de una construcción heteróloga en una célula hospedadora. Ejemplos de células

hospedadoras no mamíferas incluyen células de insectos (Potter et ál. (1993) *Int. Rev. Immunol.* 10(2-3):103-112). También se pueden producir anticuerpos en animales transgénicos (Houdebine (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.* 13(6):625-629) y plantas transgénicas (Schillberg et ál. (2003) *Cell Mol. Life Sci.* 60(3):433-45).

5 Tal como se mencionó anteriormente, el alcance de la invención también abarca anticuerpos monoclonales, quiméricos, específicos para una especie y sometidos a especiación, los cuales se modificaron, por ejemplo, mediante la eliminación, adición o sustitución de otras partes del anticuerpo, por ejemplo, la región constante. Por ejemplo, se puede modificar un anticuerpo de la siguiente forma: (i) mediante la eliminación de la región constante; (ii) mediante el
10 reemplazo de la región constante con otra región constante, por ejemplo, una región constante con el fin de aumentar la semivida, estabilidad o afinidad del anticuerpo, o una región constante de otra especie o clase de anticuerpo, o (iii) mediante la modificación de uno o más aminoácidos en la región constante para alterar, por ejemplo, la cantidad de sitios de glicosilación, la función de células efectoras, la unión a receptor de Fc (FcR), la fijación de complementos, entre otras cosas.
15 En una modalidad de la presente invención, el anticuerpo de la invención comprende una región Fc alterada que altera la función efectora del anticuerpo. En algunas modalidades de la presente invención, se ha reemplazado, modificado o removido la región Fc de la proteína de unión a antígeno de la invención.

Se conocen en la técnica métodos para alterar una región constante de anticuerpo. Los
20 anticuerpos con función alterada, por ejemplo, afinidad alterada por un ligando efector, tal como FcR en una célula, o el componente C1 de un complemento se puede producir mediante el reemplazo de al menos un residuo aminoácido en la parte constante del anticuerpo con un residuo diferente (vea, por ejemplo, EP 388,151 A1, la patente estadounidense n.º 5,624,821 y la patente estadounidense n.º 5,648,260, cuyo contenido se incorpora en la presente en su totalidad mediante esta referencia).

25 Por ejemplo, es posible alterar la afinidad de una región Fc de un anticuerpo por un FcR (por ejemplo, Fc.gamma.R1) o por unión a C1q mediante el reemplazo del residuo o residuos especificados con un residuo o residuos con una funcionalidad adecuada en su cadena lateral, o mediante la introducción de un grupo funcional cargado, tal como glutamato o aspartato, o, quizás, un residuo no polar aromático tal como fenilalanina, tirosina, triptófano o alanina (vea, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5,624,821). El anticuerpo o fragmento de unión de este se puede conjugar con una citotoxina, un agente terapéutico o un ion de metal radioactivo. En una
30 modalidad, la proteína que se conjuga es un anticuerpo o fragmento de este. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células. Ejemplos no taxativos incluyen caliqueamicina, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina,

mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina, y análogos u homólogos de estos. Los agentes terapéuticos incluyen, de modo no taxativo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina y 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, clorambucil tiotepa, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina de platino (II) (DDP), cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina, bleomicina, mitramicina y antramicina) y agentes antimicóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Las técnicas para conjugar dichos restos con proteínas se conocen en la técnica.

Composiciones, composiciones derivadas y métodos para producir las composiciones

Esta invención comprende composiciones, las que incluyen composiciones farmacéuticas, que comprenden proteínas de unión a antígeno («anticuerpos», «fragmentos de anticuerpo», «anticuerpos antagonistas» y similares se usan de forma indistinta en la presente), polipéptidos y polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican polipéptidos o proteínas de unión a antígeno de la invención.

Tal como se usan en la presente, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos, polipéptidos o proteínas de unión a antígeno (las que se pueden encontrar en un anticuerpo o no) que se unen a NGF y/o uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican uno o más polipéptidos o anticuerpos que se unen a NGF. Dichas composiciones pueden comprender adicionalmente excipientes adecuados, tales como excipientes veterinaria o farmacéuticamente aceptables que incluyen amortiguadores, de conocimiento en la técnica. La invención también comprende modalidades de polinucleótido, polipéptido y anticuerpo aislado. La invención también comprende modalidades de polinucleótido, polipéptido y anticuerpo sustancialmente puro.

En una o más modalidades, la presente invención provee proteínas de unión a antígeno novedosas que se unen específicamente a NGF. En una o más modalidades, la proteína de unión a antígeno se define como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En una o más modalidades, la proteína de unión a antígeno es totalmente canina, totalmente felina, felina y bovina, totalmente equina, totalmente humana, caninizada, felinizada, equinizada o humanizada. En una o más modalidades, la proteína de unión a antígeno de la presente invención se une a NGF canino, felino, equino o humano. En una modalidad, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo monoclonal. En una modalidad, un anticuerpo monoclonal de la invención se une a NGF y previene su unión a sus receptores TrkA y, en menor medida, p75 y la activación de estos, lo que

previene la cascada de señalización como se describe en la presente. La proteína de unión a antígeno de la presente invención se identifica en la presente como ZTS-841.

En una o más modalidades, la presente invención provee una proteína de unión a antígeno recombinante y aislada, ZTS-841, en donde la cadena pesada variable comprende una secuencia de aminoácidos con al menos alrededor de 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO.4 (CDR1 de VH 0ZTS-841), una secuencia de aminoácidos con al menos alrededor de 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO.5 (CDR2 de VH ZTS-841), una secuencia de aminoácidos con al menos alrededor de 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO.6 (CDR3 de VH ZTS-841) y en donde la cadena ligera variable comprende una secuencia de aminoácidos con al menos alrededor de 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO. 1 (CDR1 de VL ZTS-841), una secuencia de aminoácidos con al menos alrededor de 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO.2 (CDR2 de VL ZTS-841) y una secuencia de aminoácidos con al menos alrededor de 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO.3 (CDR3 de VL ZTS-841), y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en al menos una de CDR1, CDR2 o CDR3 en cualquiera de las cadenas ligeras variables o pesadas variables de dicha proteína de unión a antígeno.

En una o más modalidades, la presente invención provee una proteína de unión a antígeno recombinante y aislada, ZTS-842, en donde la cadena pesada variable comprende una secuencia de aminoácidos con al menos alrededor de 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO.24 (CDR1 de VH 0ZTS-842), una secuencia de aminoácidos con al menos alrededor de 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO.25 (CDR2 de VH ZTS-842), una secuencia de aminoácidos con al menos alrededor de 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que comprende la

SEQ ID NO.26 (CDR3 de VH ZTS-842) y en donde la cadena ligera variable comprende una secuencia de aminoácidos con al menos alrededor de 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO.21 (CDR1 de VL ZTS-842), una secuencia de aminoácidos con al menos alrededor de 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO.22 (CDR2 de VL ZTS-842) y una secuencia de aminoácidos con al menos alrededor de 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO.23 (CDR3 de VL ZTS-842), y cualesquiera variantes de estas con una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en al menos una de CDR1, CDR2 o CDR3 en cualquiera de las cadenas ligeras variables o pesadas variables de dicha proteína de unión a antígeno.

La presente invención provee proteínas de unión a antígeno recombinantes, descritas en la presente en algunas modalidades, anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpo y sus usos en administraciones clínicas y procedimientos científicos, lo que incluye procedimientos de diagnóstico. Mediante el uso de métodos de biología molecular y tecnología recombinante, es posible producir un anticuerpo y moléculas tipo anticuerpo mediante medios recombinantes y, de esa forma, generar secuencias génicas que codifican secuencias de aminoácidos específicas que se observan en la estructura polipeptídica de los anticuerpos. Dichos anticuerpos se pueden producir ya sea mediante la clonación de secuencias génicas que codifican las cadenas polipeptídicas de dichos anticuerpos o mediante síntesis directa de dichas cadenas polipeptídicas, con arreglo de las cadenas sintetizadas para formar estructuras tetraméricas activas (H2L2) con afinidad por epítopos y determinantes antigénicos específicos. Esto ha hecho posible la producción de anticuerpos con secuencias características de anticuerpos neutralizantes de especies y fuentes diferentes.

Independientemente de la fuente de los anticuerpos, cómo se construyen de forma recombinante o cómo se sintetizan, *in vitro* o *in vivo*, con animales transgénicos, cultivos celulares grandes a escala de laboratorio o comercial, con plantas transgénicas o mediante síntesis química directa que no emplea organismos vivos en ninguna etapa del proceso, todos los anticuerpos tienen una estructura tridimensional generalmente similar. A menudo, se hace referencia a esta estructura como H2L2 y esto hace referencia al hecho de que los anticuerpos suelen comprender dos cadenas de aminoácidos ligeras (L) y dos cadenas de aminoácidos pesadas (H). Ambas cadenas tienen regiones capaces de interactuar con una diana antigénica estructuralmente complementaria. Se hace referencia a las regiones que interactúan con la diana como regiones

«variables» o «V» y se caracterizan por diferencias en la secuencia de aminoácidos de anticuerpos con especificidad antigénica diferente. Las regiones variables de las cadenas H o L contienen las secuencias de aminoácidos capaces de unirse de forma específica a dianas antigénicas.

Tal como se usa en la presente, la expresión «región de unión a antígeno» hace referencia a la parte de una molécula de antígeno que contiene los residuos aminoácidos que interactúan con un antígeno y le confieren al anticuerpo su especificidad y afinidad por el antígeno. La región de unión a antígeno incluye los residuos aminoácidos «marco» necesarios para mantener la conformación adecuada de los residuos de unión a antígeno. En las regiones variables de las cadenas H o L que proveen las regiones de unión a antígeno se encuentran secuencias menores a las que se hace referencia como «hipervariables» debido a su variabilidad extrema entre anticuerpos de especificidad diferente. También se hace referencia a dichas regiones hipervariables como «regiones determinantes de complementariedad» o regiones «CDR». Estas regiones CDR son las responsables de la especificidad básica del anticuerpo con respecto a una estructura de determinante antigénica particular.

Las CDR representan extensiones no contiguas de aminoácidos en las regiones variables, pero, independientemente de la especie, se observó que las ubicaciones posicionales de estas secuencias de aminoácidos fundamentales dentro de las regiones variables de cadena ligera y pesada tienen ubicaciones similares en las secuencias de aminoácidos de las cadenas variables. Cada una de las cadenas pesada y ligera variables de todos los anticuerpos tiene tres regiones CDR, cada una de ellas no contigua a las demás. En todas las especies de mamíferos, los péptidos de anticuerpos contienen regiones constantes (es decir, muy conservadas) y variables, y, en estas últimas, se encuentran las CDR y las llamadas «regiones marco» conformadas por secuencias de aminoácidos en la región variable de la cadena pesada o ligera, pero fuera de las CDR.

La presente invención también provee un vector que incluye al menos uno de los ácidos nucleicos descritos anteriormente. Debido a que el código genético se degenera, es posible usar más de un codón para codificar un aminoácido particular. Mediante el uso del código genético, se pueden identificar una o más secuencias de nucleótidos, cada una de las cuales sería capaz de codificar el aminoácido. La probabilidad de que un oligonucleótido particular constituya, de hecho, la secuencia codificante real se puede estimar mediante la consideración de las relaciones de apareamiento de bases anómalas y la frecuencia con la que realmente se usa un codón particular (para codificar un aminoácido particular) en células eucariotas o procariotas que expresan un anticuerpo anti-NGF o parte de este. Dichas «reglas de uso de codones» se describen en Lathe et ál., 183 *J. Molec. Biol.* 1-12 (1985) Con las «reglas de uso de codones» de Lathe, se puede identificar una única secuencia de nucleótidos o un conjunto de secuencias de nucleótidos que

contiene una secuencia de nucleótidos «más probable» teórica capaz de codificar secuencias anti-NGF. También se pretende que las regiones de codón de anticuerpo a usar en la presente invención puedan ser provistas mediante la alteración de genes de anticuerpos existentes con técnicas de biología molecular estándares que generan variantes (agonistas) de los anticuerpos y péptidos descritos en la presente. Dichas variantes incluyen, de modo no taxativo, eliminaciones, adiciones y sustituciones en la secuencia de aminoácidos de los péptidos o anticuerpos anti-NGF.

Por ejemplo, una clase de sustituciones son sustituciones de aminoácidos conservativas. Dichas sustituciones son aquellas que sustituyen un aminoácido dado en un péptido de anticuerpo anti-NGF con otro aminoácido de características similares. Usualmente, los reemplazos, uno por otro, entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu e Ile, el intercambio de los residuos hidroxilo Ser y Thr, el cambio de los residuos ácidos Asp y Glu, la sustitución entre residuos de amida Asn y Gln, el cambio de los residuos básicos Lys y Arg, los reemplazos entre los residuos aromáticos Phe, Tyr y similares se ven como sustituciones conservativas. Se encuentran lineamientos respecto a qué cambios de aminoácidos pueden ser fenotípicamente silenciosos en Bowie et ál., 247 *Science* 1306-10 (1990).

Los fragmentos de anticuerpo o proteínas de unión a antígeno anti-NGF variantes pueden ser totalmente funcionales o pueden carecer de función en una o más actividades. Las variantes completamente funcionales usualmente contienen solo variaciones conservativas o variaciones en residuos no críticos o en regiones no críticas. Las variantes funcionales también pueden contener sustituciones de aminoácidos similares que no producen cambios o producen un cambio insignificante en la función. De manera alternativa, dichas sustituciones pueden afectar de forma positiva o negativa la función en cierta medida. Las variantes no funcionales suelen contener una o más eliminaciones, inserciones, inversiones, truncamiento o sustituciones de aminoácidos no conservativas, o una sustitución, inserción, inversión o eliminación en un residuo esencial o región esencial.

Los aminoácidos esenciales para la función pueden identificarse con métodos conocidos en la técnica, como mutagénesis dirigida al lugar o mutagénesis con barrido de alanina. Cunningham et ál., 244 *Science* 1081-85 (1989). El último proceso introduce mutaciones de alanina simples en todos los residuos en la molécula. Entonces, se evalúan las moléculas mutantes resultantes para determinar actividad biológica, tal como unión a epítomos o actividad ADCC *in vitro*. También es posible determinar los sitios que son críticos para la unión entre receptor y ligando mediante análisis estructural, tal como cristalografía, resonancia magnética nuclear o etiquetado por fotoafinidad. Smith et ál., 224 *J. Mol. Biol.* 899-904 (1992); de Vos et ál., 255 *Science* 306-12 (1992).

Asimismo, los polipéptidos suelen contener aminoácidos diferentes de los veinte

aminoácidos naturales. Además, muchos aminoácidos, lo que incluye los aminoácidos terminales, se pueden modificar mediante procesos naturales, tales como procesamiento y otras modificaciones postraduccionales, o mediante técnicas de modificación química conocidas en la técnica. Modificaciones conocidas incluyen, de modo no taxativo, acetilación, acilación, ribosilación de ADP, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de reticulación covalente, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, carboxilación gamma, glicosilación formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenilación, sulfatación, adición de aminoácidos mediada por ARN de transferencia a proteínas tales como arginilación y ubiquitinación. Los expertos en la técnica conocen estas modificaciones y estas se encuentran descritas de forma detallada en la bibliografía científica. Varias modificaciones particularmente comunes, por ejemplo, glicosilación, unión de lípidos, sulfatación, carboxilación gamma de residuos de ácido glutámico, hidroxilación y ribosilación de ADP, se describen en la mayoría de los textos básicos, tales como *Proteins-Structure and Molecular Properties* (2.^a ed., T. E. Creighton, W.H. Freeman & Co., NY, 1993) se describen diversas modificaciones particularmente comunes, glicosilación, enlace lipídico, sulfatación, carboxilación gamma de residuos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación, por ejemplo. Existen diversos análisis detallados sobre este tema, como el de Wold, *Posttranslational Covalent Modification of proteins*, 1-12 (Johnson, ed., Academic Press, NY, 1983); Seifter et ál. 182 *Meth. Enzymol.* 626-46 (1990) y Rattan et ál. 663 *Ann. NY Acad. Sci.* 48-62 (1992)

Por consiguiente, los anticuerpos y péptidos de la presente invención también abarcan derivados o análogos en los que el código genético no codifica un residuo aminoácido sustituido. De manera similar, las adiciones y sustituciones en la secuencia de aminoácidos, así como las variaciones y las modificaciones descritas, se pueden aplicar igualmente a la secuencia de aminoácidos del epítipo y/o antígeno de NGF o péptidos de estos, y, por lo tanto, quedan comprendidos en la presente invención. Tal como se mencionó anteriormente, los genes que codifican un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención son específicamente eficaces para el reconocimiento de NGF.

Derivados de anticuerpos

El alcance de la presente invención incluye derivados de anticuerpos. Un «derivado» de un anticuerpo contiene restos químicos adicionales que normalmente no forman parte de la proteína. El alcance de la presente invención incluye modificaciones covalentes de la proteína. Dichas

modificaciones se pueden introducir en la molécula mediante la reacción de residuos aminoácidos del anticuerpo seleccionados como diana con un agente de derivación orgánico que es capaz de reaccionar con residuos terminales o cadenas laterales seleccionadas. Por ejemplo, la derivación con agentes bifuncionales, conocida en la técnica, es útil para la reticulación del anticuerpo o
5 fragmento con una matriz de soporte insoluble en agua u otros portadores macromoleculares.

Los derivados también incluyen anticuerpos monoclonales marcados de forma radioactiva que cuenten con marcadores. Por ejemplo, con yodo radioactivo (^{131}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), indio, tritio (H^3) o similares; conjugados de anticuerpos monoclonales con biotina o avidina, con enzimas, tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-D-galactosidasa,
10 glucosa oxidasa, glucoamilasa, anhidrasa de ácido carboxílico, acetilcolina esterasa, lisozima, malato dehidrogenasa o glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; y también conjugados de anticuerpos monoclonales con agentes bioluminescentes (tal como luciferasa), agentes quimioluminiscentes (tal como ésteres de acridina) o agentes fluorescentes (tal como ficobiliproteínas).

Otro anticuerpo bifuncional derivado de la presente invención es un anticuerpo biespecífico
15 generado mediante la combinación de partes de dos anticuerpos diferentes que reconocen dos grupos antigénicos diferentes. Esto se puede lograr mediante técnicas recombinantes o reticulación. De manera adicional, se pueden agregar restos al anticuerpo o una parte de este para aumentar la semivida *in vivo* (por ejemplo, al extender el tiempo hasta la depuración del torrente sanguíneo). Dichas técnicas incluyen, por ejemplo, la adición de restos de PEG (a lo que también
20 se denomina pegilación) y son conocidas en la técnica. Ver la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20030031671.

Expresión recombinante de anticuerpos

En algunas modalidades, los ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo monoclonal
25 sujeto se introducen directamente en una célula hospedadora y la célula se incuba en condiciones suficientes para inducir la expresión del anticuerpo codificado. Una vez que se han introducido los ácidos nucleicos sujeto en una célula, se suele incubar la célula, normalmente a 37 °C, en algunos casos, con selección, durante un período de alrededor de 1-24 horas con el fin de permitir la expresión del anticuerpo. En una modalidad, se secreta el anticuerpo en el sobrenadante del medio en el que crece la célula. Tradicionalmente, los anticuerpos monoclonales se producen como moléculas nativas en líneas de hibridoma murinas. Además de dicha tecnología, la presente invención prevé la expresión de ADN recombinante de anticuerpos monoclonales. Esto hace
30 posible la producción de anticuerpos caninizados, así como un espectro de derivados de anticuerpos y proteínas de fusión en una especie hospedadora seleccionada.

Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos un polipéptido, parte o anticuerpo

anti-NGF de la presente invención se puede recombinar con ADN de vector de acuerdo con técnicas convencionales, lo que incluye extremos romos o irregulares para ligadura, digestión de enzima de restricción para proveer extremos adecuados, relleno de extremos cohesivos cuando sea adecuado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones no deseadas y ligadura con ligasas adecuadas. Las técnicas para dichas manipulaciones se describen, por ejemplo, en Maniatis et ál., *MOLECULAR CLONING, LAB. MANUAL*, (Cold Spring Harbor Lab. Press, NY, 1982 y 1989) y Ausubel et ál. 1993 *supra*, y se podrían usar para construir secuencias de ácidos nucleicos que codifican una molécula de anticuerpo monoclonal o región de unión a antígeno de esta.

Se considera que una molécula de ácido nucleico, tal como ADN, es «capaz de expresar» un polipéptido si contiene secuencias de nucleótidos que contienen información de regulación de transcripción y traducción, y dichas secuencias «se unen de forma operativa» a las secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido. Un enlace operativo es un enlace en el que las secuencias reguladoras de ADN y la secuencia de ADN que se busca expresar se conectan de forma tal que se permite la expresión génica como partes de anticuerpo o péptidos anti-NGF en cantidades recuperables. La naturaleza precisa de las regiones reguladoras necesarias para la expresión génica puede variar entre organismos, tal como es sabido en la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook et ál., 2001 *supra*; Ausubel et ál., 1993 *supra*.

Por consiguiente, la presente invención abarca la expresión de un péptido o anticuerpo anti-NGF, ya sea en células procariotas o eucariotas. Hospedadores adecuados incluyen hospedadores bacterianos o eucariotas, lo que incluye células de bacterias, levaduras, insectos, hongos, pájaros y mamíferos ya sea *in vivo* o *in situ*, o células de origen mamífero, insecto, pájaro o levadura. La célula o tejido de mamífero puede provenir de un ser humano, primate, hámster, conejo, roedor, vaca, cerdo, oveja, caballo, cabra, perro o gato, pero se pueden usar células de cualquier otro mamífero.

En una modalidad, la secuencia de nucleótidos de la invención se incorporará en un vector viral o plásmido capaz de replicación autónoma en el hospedador receptor. Se puede emplear cualquiera de una amplia variedad de vectores con este fin. Ver, por ejemplo, Ausubel et ál., 1993 *supra*. Los factores de importancia para seleccionar un vector viral o plásmido particular incluyen: la facilidad con la que se pueden reconocer y seleccionar las células receptoras que contienen el vector de aquellas células receptoras que no contienen el vector; la cantidad de copias del vector que se desea en un hospedador particular y si es deseable poder «trasladar» el vector entre células hospedadoras de especies diferentes.

Ejemplos de vectores procariotas conocidos en la técnica incluyen plásmidos tales como aquellos capaces de replicación en *E. coli* (tales como, de modo no taxativo, por ejemplo, pBR322,

ColE1, pSC101, pACYC 184 y similares). Por ejemplo, se discuten dichos plásmidos en Maniatis et ál., 1989 *supra*; Ausubel et ál., 1993 *supra*. Los plásmidos de bacilos incluyen pC194, pC221, pT127, etc. Gryczan describe dichos plásmidos en *THE MOLEC. BIO. OF THE BACILLI* 307-329 (Academic Press, NY, 1982). Los plásmidos de *Streptomyces* adecuados incluyen pIJ101 (Kendall et ál., 1987 *J. Bacteriol.* 4177-83 (1987) y bacteriófagos de *Streptomyces* tales como phLC31 (Chater et ál., en *SIXTH INT'L SYMPOSIUM ON ACTINOMYCETALES BIO.* 45-54 (Akademiai Kiado, Budapest, Hungría 1986). Se reseñan plásmidos de *Pseudomonas* en John et ál., 1988 *Rev. Infect. Dis.* 693-704 (1988); Izaki, 1978 *Jpn. J. Bacteriol.* 729-42 (1978); y Ausubel et ál., 1993 *supra*.

De manera alternativa, los elementos de expresión génica útiles para la expresión de péptidos o anticuerpos anti-NGF que codifican ADNc incluyen, de modo no taxativo, (a) promotores de transcripción viral y sus elementos potenciadores, tales como el promotor temprano SV40 (Okayama et ál., 1983 *Mol. Cell. Biol.* 280 (1983)), LTR de virus de sarcoma de Rous (Gorman et ál., 1982 *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EUA 6777 (1982)) y LTR de virus de leucemia murino de Moloney (Grosschedl et ál., 1985 *Cell* 885 (1985)); (b) regiones de empalme y sitios de poliadenilación, tales como los derivados de la región tardía de SV40 (Okayama et ál., 1983) y (c) sitios de poliadenilación como en SV40 (Okayama et ál., 1983).

Los genes de ADNc de inmunoglobulina se pueden expresar tal como lo describe Weidle et ál., 1987 *Gene* 21 (1987), con el promotor temprano de SV40 y su potenciador como elementos de expresión, los potenciadores de promotor de cadena H de inmunoglobulina de ratón, empalme de ARNm de región tardía de SV40, secuencia interviniente de S-globina de conejo, sitios de poliadenilación de S-globina de conejo e inmunoglobulina, y elementos de poliadenilación de SV40. En el caso de genes de inmunoglobulina que comprenden parte ADNc, parte ADN genómico (Whittle et ál., 1987 *Protein Engin.* 499 (1987)), el promotor transcripcional puede ser citomegalovirus humano, los potenciadores de promotores pueden ser inmunoglobulina humana/de ratón y citomegalovirus, y las regiones de poliadenilación y empalme de ARNm pueden ser las secuencias de inmunoglobulina cromosomal nativa.

En una modalidad, para la expresión de genes de ADNc en células de roedores, el promotor transcripcional es una secuencia de LTR viral, los potenciadores de promotor transcripcional son uno del potenciador de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón y el potenciador de LTR viral o ambos, la región de empalme contiene un intrón de más de 31 pb y las regiones de terminación de poliadenilación y transcripción derivan de la secuencia cromosómica natural correspondiente a la cadena de inmunoglobulina que se sintetiza. En otras modalidades, las secuencias de ADNc que codifican otras proteínas se combinan con los elementos de expresión anteriormente mencionados para lograr la expresión de las proteínas en células de mamíferos.

Cada gen fusionado se puede ensamblar en un vector de expresión o insertar en este. Las células receptoras capaces de expresar el producto génico de cadena de inmunoglobulina quimérico se transfectan individualmente con un gen que codifica a cadena L quimérica o H quimérica o péptido anti-NGF, o se contransfectan con un gen de cadena L quimérica y H quimérica. Las células receptoras transfectadas se cultivan en condiciones que permiten la expresión de los genes incorporados y se recuperan las cadenas de inmunoglobulina expresadas o anticuerpos o fragmentos intactos del cultivo.

En una modalidad, los genes fusionados codifican las cadenas H y L quiméricas o un péptido anti-NGF, o partes de estos se ensamblan en vectores de expresión independientes que luego se usan para la cotransfección de una célula receptora. De manera alternativa, es posible ensamblar los genes fusionados que codifican las cadenas H y L quiméricas en el mismo vector de expresión. La línea celular receptora para la transfección de vectores de expresión y producción del anticuerpo quimérico puede ser una célula de mieloma. Las células de mieloma pueden sintetizar, ensamblar y secretar inmunoglobulinas codificadas por genes de inmunoglobulina transfectados y poseen el mecanismo para glicosilación de la inmunoglobulina. Las células de mieloma pueden crecer en cultivo o en la cavidad peritoneal de un ratón, donde la inmunoglobulina secretada se puede obtener de fluido de ascitis. Otras células receptoras adecuadas incluyen células linfoides tales como linfocitos B de origen humano y no humano, células de hibridoma de origen humano o no humano, o células de heterohibridoma interespecie.

El vector de expresión que porta una construcción de anticuerpo caninizado quimérico o polipéptido anti-NGF de la presente invención se puede introducir en una célula hospedadora adecuada mediante una variedad de métodos adecuados, lo que incluye medios bioquímicos como transformación, transfección, conjugación, fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio y aplicación con policationes tales como dietilaminoetil (DEAE) dextrano, y medios mecánicos tales como electroporación, microinyección directa y bombardeo con microproyectiles. Johnston et ál, 240 *Science* 1538 (1988).

La levadura puede proveer ventajas sustanciales respecto a bacterias para la producción de cadenas H y L de inmunoglobulina. Las levaduras realizan modificaciones de péptidos postraduccionales que incluyen glicosilación. En la actualidad, existe varias estrategias de ADN recombinante que utilizan secuencias promotoras fuertes y plásmidos con cantidades elevadas de copias para la producción de las proteínas deseadas en levadura. La levadura reconoce secuencias líder de productos génicos de mamíferos clonados y secreta péptidos con secuencias líder (es decir, prepéptidos). Hitzman et ál., 11.^o Conferencia internacional sobre levadura, genética y biología molecular (Montpellier, Francia, 1982).

Los sistemas de expresión génica de levadura se pueden evaluar de forma rutinaria para

determinar los niveles de producción, secreción y la estabilidad de péptidos anti-NGF, anticuerpo y anticuerpos ensamblados murinos y quiméricos, heteroquiméricos, caninizados, y fragmentos y regiones de estos. Se puede utilizar cualquiera de una serie de sistemas de expresión génica de levadura que incorporan elementos promotores y de terminación de los genes expresados activamente que codifican las enzimas glicolíticas producidas en grandes cantidades cuando las levaduras crecen en medios ricos en glucosa. Los genes glicolíticos conocidos también pueden proveer señales de control de transcripción muy eficientes. Por ejemplo, se pueden utilizar señales de terminación y promotor del gen de fosfocinasa (PGK). Es posible adoptar varios enfoques para evaluar plásmidos de expresión óptima para la expresión de ADNc de inmunoglobulina clonado en levadura. Remitirse al tomo II de *DNA Cloning*, 45-66, (Glover, ed.), IRL Press, Oxford, Reino Unido 1985).

Las cepas bacterianas también se pueden utilizar como hospedadoras para producir moléculas de anticuerpos o péptidos descritos por esta invención. Se usan vectores de plásmidos que contienen secuencias de control y replicón que derivan de especies compatibles con una célula hospedadora en conexión con estos hospedadores bacterianos. El vector porta un sitio de replicación, así como genes específicos capaces de proveer selección fenotípica en células transformadas. Es posible adoptar una variedad de enfoques para evaluar los plásmidos de expresión para la producción de anticuerpos murinos, quiméricos, heteroquiméricos, caninizados, fragmentos y regiones o cadenas de anticuerpos codificadas por los ADNc de inmunoglobulina clonados en bacterias (vea Glover, 1985 *supra*; Ausubel, 1993 *supra*; Sambrook, 2001 *supra*; Colligan et ál., eds. *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, NY, NY (1994-2001); Colligan et ál., eds. *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY (1997-2001).

Las células de mamíferos hospedadoras pueden crecer *in vitro* o *in vivo*. Las células de mamíferos proveen modificaciones postraduccionales a las moléculas proteicas de inmunoglobulina que incluyen la remoción de péptido líder, plegamiento y ensamblaje de cadenas L, glicosilación de las moléculas de anticuerpo y secreción de proteína de anticuerpo funcional. Las células de mamífero que pueden ser útiles como hospedadoras para la producción de proteínas de anticuerpo, además de las células de origen linfocítico anteriormente descritas, incluyen células de origen de fibroblasto, tales como células Vero (ATCC CRL 81) o CHO-K1 (ATCC CRL 61). Se encuentran disponibles varios sistemas de vectores para la expresión de genes de cadena H y L de péptidos anti-NGF clonados en células de mamíferos (vea Glover, 1985 *supra*). Se pueden seguir diferentes enfoques para obtener anticuerpos H2L2 completos. Es posible coexpresar cadenas H y L en las mismas células para lograr asociación intracelular y enlace de cadenas H y L en péptidos anti-NGF y/o anticuerpos H2L2 tetraméricos completos. La coexpresión puede suceder mediante el uso ya sea de los mismos plásmidos como de plásmidos diferentes en el

mismo hospedador. Los genes de péptidos anti-NGF y/o cadenas H y L se pueden ubicar en el mismo plásmido, el que luego se transfecta en células y de esa forma selecciona directamente células que expresan ambas cadenas. De manera alternativa, las células se pueden transfectar en primer lugar con un plásmido que codifica una cadena, por ejemplo, la cadena L, seguido de la transfección de la línea celular resultante con un plásmido de cadena H que contiene un segundo marcador seleccionable. Las líneas celulares que producen péptidos anti-NGF y/o moléculas de H2L2 por cualquier vía se podrían transfectar con plásmidos que codifican copias adicionales de péptidos, cadenas H, L o H más L en conjunto con marcadores seleccionables adicionales para generar líneas celulares con propiedades potenciadas, tales como mayor producción de moléculas de anticuerpo H2L2 o mayor estabilidad de las líneas celulares transfectadas.

En el caso de producción de alto rendimiento de anticuerpos recombinantes a largo plazo, se puede emplear expresión estable. Por ejemplo, se pueden modificar líneas celulares que expresen de forma estable la molécula de anticuerpo. En lugar de utilizar vectores de expresión que contengan orígenes de replicación virales, las células hospedadoras pueden transformarse con casetes de expresión de inmunoglobulina y un marcador seleccionable. Luego de la introducción del ADN extraño, se puede permitir que las células modificadas crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido y luego, cambiarlas a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren establemente el plásmido en un cromosoma y crezcan para formar focos que, a su vez, se pueden clonar y expandir en líneas celulares. Estas líneas celulares modificadas pueden ser particularmente útiles en la detección y evaluación de compuestos/componentes que interactúen directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Una vez que se produjo un anticuerpo de la invención, se puede purificar mediante cualquier método conocido en la técnica para purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, de afinidad, particularmente, de afinidad por el antígeno específico luego de proteína A, y de exclusión en columna), centrifugado, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. En muchas modalidades, la célula secreta los anticuerpos al medio de cultivo y se cosechan del medio de cultivo.

Aplicaciones veterinarias y farmacéuticas

La proteína de unión a antígeno anti-NGF o fragmentos de anticuerpos descritos en la presente invención se pueden usar, por ejemplo, en el tratamiento de trastornos relacionados con NGF en perros y gatos. Más específicamente, la invención también provee una composición farmacéutica que comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y, como

ingrediente activo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo conforme a la invención. El anticuerpo puede ser quimérico, heteroquimérico, caninizado, felinizado, equinizado, humanizado o sometido a especiación para adaptarse a una especie diferente. También se vislumbran inmunoglobulinas intactas o sus fragmentos de unión, tales como Fab. El anticuerpo y las composiciones farmacéuticas de este de esta invención son útiles para administración parenteral, por ejemplo, de forma subcutánea, intramuscular o intravenosa.

Los péptidos y/o anticuerpos anti-NGF de la presente invención se pueden administrar ya sea como agentes terapéuticos individuales o en combinación con otros agentes terapéuticos. Se pueden administrar solos, pero generalmente se administran con un portador farmacéutico seleccionado con base en la vía de administración seleccionada y la práctica farmacéutica estándar. La administración de los anticuerpos descritos en la presente puede llevarse a cabo utilizando cualquier medio adecuado, incluida inyección parenteral (como inyección intraperitoneal, subcutánea o intramuscular), por vía oral o mediante administración tópica de los anticuerpos (que se realiza generalmente en una formulación farmacéutica) en una superficie de las vías respiratorias. La administración tópica en una superficie de las vías aéreas se puede llevar a cabo mediante administración intranasal (por ejemplo, mediante el uso de un cuentagotas, hisopo o inhalador). La administración tópica de los anticuerpos en una superficie de las vías aéreas también se puede llevar a cabo mediante administración por inhalación, tal como al crear partículas respirables de una formulación farmacéutica (lo que incluye tanto partículas sólidas como líquidas) que contienen los anticuerpos como una suspensión en aerosol y luego hacer que el sujeto inhale las partículas respirables. Se conocen métodos y aparatos para administrar partículas respirables de formulaciones farmacéuticas y se puede emplear cualquier técnica convencional.

En algunas modalidades deseadas, los anticuerpos se administran mediante inyección parenteral. En el caso de administración parenteral, los péptidos o anticuerpos anti-NGF se pueden formular como una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, el vehículo puede ser una solución del anticuerpo o un cóctel de este disuelto en un portador aceptable, tal como un portador acuoso, y dichos vehículos son agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, solución de trehalosa o sacarosa, o albúmina en suero al 5 %, solución salina sal 0.4 %, glicina al 0.3 % y similares. También se pueden utilizar liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites no volátiles. Estas soluciones son estériles y están generalmente libres de materia en partículas. Estas composiciones se pueden esterilizarse con técnicas de esterilización convencionales y conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables necesarias para aproximar las condiciones fisiológicas, tales como agentes

amortiguadores y de ajuste de pH, agentes de ajuste de toxicidad, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio, etc. La concentración de anticuerpo en estas formulaciones puede variar en gran medida, por ejemplo, de menos de alrededor de 0.5 %, usualmente al menos alrededor de 1 % a tanto como 15 % o 20 % en peso, y se seleccionará principalmente con base en volúmenes de fluidos, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado. El vehículo o polvo liofilizado puede contener aditivos que conserven la isotonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio, manitol) y la estabilidad química (por ejemplo, soluciones amortiguadoras y conservantes). La formulación se esteriliza con técnicas comúnmente utilizadas. Los métodos existentes para preparar composiciones administrables por vía parenteral son conocidos o evidentes para los expertos en la técnica y se describen con mayor detalle, por ejemplo, en REMINGTON'S PHARMA. SCI. (15.^a ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa., 1980).

Los anticuerpos de la presente invención se pueden liofilizar para su almacenamiento y reconstruirse en un portador adecuado antes del uso. Se ha demostrado que esta técnica es eficaz con inmunoglobulinas convencionales. Se pueden emplear cualesquiera técnicas de liofilización y reconstitución adecuadas. Los expertos en la técnica entenderán que la liofilización y la reconstitución pueden llevar a grados diferentes de reducción de actividad de anticuerpos y que puede ser necesario ajustar los niveles de uso para compensar. Las composiciones que contienen los presentes anticuerpos o un cóctel de estos se pueden administrar para prevenir reapariciones y/o como tratamientos terapéuticos para una enfermedad existente. Se describen portadores farmacéuticos adecuados en la edición más reciente de *REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES*, un texto de referencia estándar en este campo de la técnica. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que ya padece una enfermedad en una cantidad suficiente para curar o al menos detener o aliviar parcialmente la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una «dosis terapéuticamente eficaz» o una «cantidad terapéuticamente eficaz». Las cantidades efectivas para el uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y el estado general del sistema inmunitario del sujeto, pero generalmente varían de alrededor de 0.1 mg de anticuerpo por kilogramo de peso corporal a alrededor de 10 mg de anticuerpo por kilogramo de peso corporal, preferentemente, alrededor de 0.3 mg de anticuerpo por kilogramo de peso corporal a alrededor de 5 mg de anticuerpo por kilogramo de peso corporal. En vista de la minimización de sustancias extrañas y la menor probabilidad de rechazo de la «sustancia extraña» logradas por los presentes anticuerpos tipo canino de esta invención, puede ser posible administrar estos anticuerpos en excesos importantes.

Por supuesto, la dosis administrada variará de acuerdo con factores conocidos, tales como

las características farmacodinámicas del agente particular y su modo y vía de administración, la edad, salud y peso del receptor, la naturaleza y extensión de los síntomas, el tipo de tratamiento simultáneo, la frecuencia de tratamiento y el efecto deseado.

Como ejemplo no taxativo, es posible proveer el tratamiento de patologías relacionadas con NGF en perros y gatos como una dosis bisemanal o mensual de anticuerpos anti-NGF de la presente invención en el rango de dosis necesario. Ejemplos de anticuerpos para uso terapéutico canino son anticuerpos de afinidad elevada (los que también pueden tener avidéz elevada) y fragmentos, regiones y derivados de estos con potente actividad anti-NGF *in vivo* de acuerdo con la presente invención. Una administración simple o múltiples administraciones de las composiciones se pueden llevar a cabo con niveles y patrones de dosis seleccionados por el veterinario tratante. En cualquier caso, las formulaciones farmacéuticas deberían proveer una cantidad de los anticuerpos de la invención que fuera suficiente para tratar al sujeto de forma eficaz.

Aplicaciones de diagnóstico

La presente invención también provee los péptidos y anticuerpos anti-NGF anteriores para usar en métodos de diagnóstico para detección de NGF en algunas especies, particularmente, en canes y felinos, conocidas por presentar un trastorno relacionado con NGF o que se sospecha que lo padecen. En una modalidad de la invención, el trastorno relacionado con NGF es dolor. En otra modalidad, el trastorno relacionado con NGF es osteoartritis. Los péptidos y/o anticuerpos anti-NGF de la presente invención son útiles para inmunoensayos que detectan o cuantifican NGF, o anticuerpos anti-NGF, en una muestra. Un inmunoensayo de NGF usualmente comprende la incubación de una muestra clínica o biológica en presencia de un polipéptido o anticuerpo anti-NGF de afinidad elevada (o avidéz elevada) etiquetado de forma detectable de la presente invención capaz de unirse de forma selectiva a NGF, y la detección del anticuerpo o péptido etiquetado que se une en una muestra. Se conocen en la técnica varios procedimientos de ensayo clínico. Ver, por ejemplo, *IMMUNOASSAYS FOR THE 80'S* (Voller et ál., eds., Univ. Park, 1981). Estas muestras incluyen biopsia de tejidos, sangre, suero y muestras fecales o líquidos extraídos de sujetos animales y sometidos a análisis ELISA como se describe en los posterior. Por lo tanto, es posible fijar un polipéptido o anticuerpo anti-NGF en nitrocelulosa u otro soporte sólido que es capaz de inmovilizar células, partículas celulares o proteínas solubles. Entonces, se puede lavar el soporte con amortiguadores adecuados, seguido de tratamiento con la proteína de unión a antígeno, anticuerpo o péptido específico para NGF etiquetado de forma detectable. Luego, se puede lavar el soporte de fase sólida con el amortiguador una segunda vez para remover el anticuerpo o péptido no unido. La cantidad de etiqueta unida en el soporte sólido se puede

detectar mediante etapas de métodos conocidos.

«Soporte de fase sólida» o «portador» hace referencia a cualquier soporte capaz de unirse al péptido, antígeno o anticuerpo. Los soportes o portadores conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, fluoruro de polivinilideno (PVDF), dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del portador puede ser soluble hasta determinado punto o insoluble a efectos de la presente invención. El material de soporte puede tener virtualmente cualquier configuración estructural posible siempre que la molécula acoplada sea capaz de unirse a NGF o un anticuerpo anti-NGF. Por lo tanto, la configuración de soporte puede ser esférica, tal como en una esfera, o cilíndrica, como en la superficie interna de un tubo de ensayo o la superficie externa de una varilla. De manera alternativa, la superficie puede ser plana, tal como una lámina, una placa de cultivo, una cinta de ensayo, etc. Por ejemplo, los soportes pueden incluir esferas de poliestireno. Los expertos en la técnica reconocerán muchos otros portadores adecuados para la unión de anticuerpo, péptido o antígeno, o los pueden determinar mediante experimentación de rutina. Etapas de métodos conocidos pueden determinar la actividad de unión de un lote dado de proteína de unión a antígeno o anticuerpo y/o péptido anti-NGF. Los expertos en la técnica pueden determinar condiciones operativas y de ensayo óptimas mediante experimentación de rutina.

El etiquetado detectable de un anticuerpo y/o péptido específico para NGF se puede lograr mediante el enlace a una enzima para uso en un inmunoensayo enzimático (EIA) o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). La enzima enlazada reacciona con el sustrato expuesto para generar un resto químico que se puede detectar, por ejemplo, mediante medios espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Las enzimas que se pueden usar para etiquetar de forma detectable los anticuerpos específicos para NGF de la presente invención incluyen, de modo no taxativo, malato deshidrogenasa, nucleasa de estafilococos, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. Al etiquetar los anticuerpos específicos para NGF de forma radioactiva, es posible detectar NGF mediante el uso de un radioinmunoensayo (RIA). Ver Work et ál., *LAB. TECHNIQUES & BIOCHEM. IN MOLEC. BIO* (No. Holland Pub. Co., NY, 1978). El isótopo radioactivo se puede detectar con medios tales como el uso de un contador gamma o un contador de centelleo o mediante autorradiografía. Los isótopos particularmente útiles a efectos de la presente invención incluyen: ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S y ^{14}C .

También es posible etiquetar los anticuerpos específicos para NGF con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo etiquetado con compuestos fluorescentes se expone a luz de

longitud de onda adecuada, es posible detectar su presencia debido a la fluorescencia. Entre otros compuestos de etiquetado fluorescente comúnmente usados son isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina. También es posible etiquetar de forma detectable los anticuerpos específicos para NGF o proteínas de unión a antígeno con metales que emiten fluorescencia, tales como ^{125}Eu , u otros de la serie de lantánidos. Estos metales se pueden unir al anticuerpo específico para NGF con grupos quelantes metálicos como ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Los anticuerpos específicos para NGF también se pueden etiquetar de forma detectable mediante acoplamiento a un compuesto quimioluminiscente. Entonces, se determina la presencia del anticuerpo etiquetado de forma quimioluminiscente mediante la detección de la presencia de luminiscencia que surge durante el transcurso de una reacción química. Los ejemplos de compuestos con etiquetado quimioluminiscente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato.

Asimismo, se puede usar un compuesto bioluminiscente para etiquetar el anticuerpo específico para NGF, parte, fragmento, polipéptido o derivado de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se encuentra en sistemas biológicos en los que una proteína catalizadora aumenta la eficacia de la reacción quimioluminiscente. Se determina la presencia de una proteína bioluminiscente mediante la detección de la presencia de luminiscencia. Los compuestos bioluminiscentes importantes a los efectos del marcado son luciferina, luciferasa y aecurina.

La detección del anticuerpo específico para NGF, parte, fragmento, polipéptido o derivado se puede llevar a cabo con un contador de centelleo, por ejemplo, si la etiqueta detectable es un emisor de radiación gamma, o con un fluorómetro, por ejemplo, si la etiqueta es un material fluorescente. En el caso de una etiqueta enzimática, la detección se puede lograr mediante métodos colorimétricos que emplean un sustrato para la enzima. La detección también se puede lograr mediante comparación visual del grado de reacción enzimática de un sustrato en comparación con estándares preparados de manera similar.

A efectos de la presente invención, el NGF que se detecta mediante los ensayos anteriores se puede encontrar presente en una muestra biológica. Se puede usar cualquier muestra que contenga NGF. Por ejemplo, la muestra es un fluido biológico tal como, por ejemplo, sangre, suero, linfa, orina, heces, exudado inflamatorio, fluido cefalorraquídeo, fluido amniótico, un homogenado o extracto de tejidos, y similares. La invención no se limita a ensayos que usan únicamente estas muestras. No obstante, es posible que un experto en la técnica, a la luz de la presente memoria descriptiva, determine condiciones adecuadas que permitan el uso de otras muestras.

Es posible lograr la detección *in situ* mediante la remoción de un espécimen histológico de

un sujeto animal y la provisión de la combinación de anticuerpos etiquetados de la presente invención a dicho espécimen. Es posible proveer el anticuerpo (o parte de este) mediante la aplicación o la superposición del anticuerpo etiquetado (o parte de este) a una muestra biológica. Mediante el uso de dicho procedimiento, es posible determinar tanto la presencia de NGF como la distribución de NGF en el tejido analizado. Utilizando la presente invención, los expertos en la técnica observarán fácilmente que se puede modificar cualquiera de diversos métodos histológicos (como procedimientos de tinción), para lograr esta detección *in situ*.

El anticuerpo, fragmento o derivado de la presente invención se puede adaptar para uso en un ensayo inmunométrico, también conocido como un ensayo «de dos sitios» o «sándwich». En un ensayo inmunométrico usual, una cantidad de anticuerpo no etiquetado (o fragmento de anticuerpo) se une a un soporte sólido que es insoluble en el fluido en ensayo y se agrega una cantidad de anticuerpo soluble etiquetado de forma detectable para hacer posible la detección y/o cuantificación del complejo ternario formado entre el anticuerpo de fase sólida, el antígeno y el anticuerpo etiquetado.

Los anticuerpos se pueden usar para detectar de forma cuantitativa o cualitativa el NGF en una muestra o para detectar la presencia de células que expresan el NGF. Esto se puede lograr mediante técnicas de inmunofluorescencia que emplean un anticuerpo etiquetado de forma fluorescente (ver más adelante) acoplado con microscopía con fluorescencia, detección fluorométrica o con citometría de flujo. Es posible etiquetar o no etiquetar los anticuerpos con fines de diagnóstico. Los anticuerpos no etiquetados se pueden usar en combinación con otros anticuerpos etiquetados (segundos anticuerpos) que reaccionan con el anticuerpo, tales como anticuerpos específicos para regiones constantes de inmunoglobulina canina. De manera alternativa, es posible etiquetar los anticuerpos directamente. Se puede emplear una amplia variedad de etiquetas, tales como radionúclido, flúor, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, ligandos (particularmente, haptenos), etc. Varios tipos de inmunoensayos, tales como los previamente discutidos, se encuentran disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica. Cabe destacar que los anticuerpos de la presente invención pueden ser útiles para el diagnóstico de un trastorno relacionado con NGF en canes. Más específicamente, el anticuerpo de la presente invención puede identificar la sobreexpresión de NGF en animales de compañía. Por lo tanto, el anticuerpo de la presente invención puede proveer una herramienta inmunohistoquímica importante. Los anticuerpos de la presente invención se pueden usar en arreglos de anticuerpos, los cuales son muy adecuados para medir perfiles de expresión génica.

Kits

El alcance de la presente invención también incluye kits para poner en práctica los métodos. Los kits incluyen al menos uno o más de los anticuerpos de la presente invención, un ácido nucleico que los codifica o una célula que los contiene. Se puede proveer un anticuerpo de la presente invención, usualmente en una forma liofilizada, en un recipiente. Normalmente, los anticuerpos, los cuales pueden estar conjugados con una etiqueta o toxina o no estar conjugados, están incluidos en los kits con amortiguadores, tales como Tris, fosfato, carbonato, etc., estabilizadores, biocidas, proteínas inertes, por ejemplo, albúmina en suero, o similares. En general, estos materiales se encontrarán presentes en menos de 5 % en peso con base en la cantidad de anticuerpo activo y usualmente, presentes en una cantidad total de al menos alrededor de 0.001 % en peso con base también en la concentración de anticuerpo. Con frecuencia, se deseará incluir un excipiente o extendedor inerte para diluir los ingredientes activos, donde el excipiente se puede encontrar presente de alrededor de 1 % a 99 % en peso de la composición total. Cuando se emplea un segundo anticuerpo capaz de unirse al anticuerpo primario en un ensayo, usualmente, este se encontrará presente en un vial independiente. El segundo anticuerpo se suele conjugar con una etiqueta y formularse en una forma análoga con las formulaciones de anticuerpo anteriormente descritas. En general, el kit incluirá también un conjunto de instrucciones para uso.

A continuación, se describirá la invención mediante ejemplos no taxativos.

EJEMPLOS

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes, los que la sustentan. Sin embargo, no se debería considerar que dichos ejemplos limiten adicionalmente el alcance de la invención. Por el contrario, un experto en la técnica entendería fácilmente que existen otras modalidades, modificaciones y equivalentes de la presente invención que no se apartan del espíritu de la presente invención y/o el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1

Síntesis y purificación de NGF canino (cNGF)

Se diseñaron cebadores de PCR con sitios de restricción adecuados para amplificar pre-pro- β -NGF canino (SEQ ID NO:59). Se clonó el gen de β -NGF en el plásmido pCTV927 (plásmido dirigido a Chromos) a través de los sitios EcoRV/KpnI. Se cotransfectó el plásmido pCTV927/ β -NGF junto con el plásmido que codifica la integrasa de sistema Chromos pSIO343 con reactivo de transfección Lipofectamine 2000 en células CHOK1SV. Se analizaron los clones estables individuales para determinar su expresión y se seleccionó un clon con expresión elevada para su

expansión y expresión para purificación posterior. El β -NGF canino (cNGF) producido a partir de estas transfecciones se purificó con cromatografía de intercambio iónico. Se llevó a cabo una limpieza inicial en modo de flujo en lotes en Q Sepharose FF (GE Healthcare 17-0510-01). El sobrenadante aclarado se diluyó 1:1 con agua y se ajustó el pH a 8.5 con Tris 1 mM. Se mezcló la muestra diluida con Q Sepharose FF en una relación 150:1 durante >1.5 horas. Se permitió que la resina se asentara y se recogió la parte no unida. Se purificó adicionalmente el cNGF mediante cromatografía de intercambio catiónico, se volvió a diluir 1:1 con agua y se cargó en SP-Sepharose FF (GE Healthcare 17-0729-01) previamente equilibrada con Tris 20 mM, pH 8.5. Luego de cargarla, se lavó la columna y se produjo la elución con un gradiente lineal de NaCl 0 a 210 mM (cada uno en Tris 20 mM, pH 8.5) en 20 volúmenes de columna. Se analizaron las fracciones mediante SDS-PAGE, se agruparon, se sometieron a diálisis (3.5K MWCO) contra PBS a 4 °C. Se recogió el dializado, se filtró para esterilización y se midió su concentración mediante absorbancia a 280 nm ($1 \text{ mg/mL} = 1.48 A_{280}$).

Ejemplo 2:

Inmunizaciones caninas

Es posible inmunizar canes mediante métodos conocidos en la técnica y no se limita a un único método. En un ejemplo, se administra NGF canino (tal como se describió en el Ejemplo 1) directamente a perros con un adyuvante para estimular la respuesta inmunitaria. Se administraron inyecciones de refuerzo a los canes para obtener respuestas antiantigénicas óptimas y se tomaron muestras de suero con regularidad. Se monitoreó la respuesta inmunitaria al anticuerpo de perros inmunizados y se determinó mediante métodos de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) estándares, también conocidos por un experto en la técnica y descritos más adelante.

Ejemplo 3:

Unión a antígeno primario y activación de células B

Se revistieron placas Immunolon 2Hb con 100 μL de NGF canino recombinante (10 $\mu\text{g/mL}$) a 4 °C para evaluar los títulos de anticuerpos anti-NGF canino. Se lavaron los pocillos con PBS-T (PBS+Tween 0.1 %) tres veces y se bloqueó la unión no específica con 200 μL de PBS + leche descremada al 5 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de tres lavados de placas con 300 μL de PBS-T, se incubaron diluciones seriales de suero canino durante una hora. Se detectó la unión de IgG anti-NGF canina con un cóctel de 100 μL IgG1 antiperro Bethyl (A40-120P) e IgG2 antiperro (A40-121P) a 0.2 $\mu\text{g/mL}$. Luego de la adición de un sustrato cromogénico (sustrato de peroxidasa para micropocillos de un componente SureBlue Reserve TMB, KPL 53-00-01) y diez minutos de incubación a temperatura ambiente, se detuvo la reacción con la adición de 100 μL de

HCl 0.1 N. Se determinó la absorbancia de cada pocillo a una densidad óptica (OD) de 450 nm.

Protocolo de activación para linfocitos B de memoria caninos

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con separación en gradiente Ficoll™ mediante centrifugación. Luego de aislar las PBMC de la muestra, se llevó a cabo una selección específica de células secretoras de anticuerpo con base en la expresión de marcadores de superficie celular de anticuerpo específicos conocidos para el experto en la técnica y tal como se describe en US 2014/0287402 y Callard y Kotowicz, *Cytokine Cell Biology: A practical approach*, Oxford University Press, 2000, páginas 17-31, que se incorporan a la presente mediante esta referencia. Antes de que las células B se depositen en chips de clasificación, se activaron *in vitro*. Luego de aislarlas y congelarlas, se removieron las células (PBMC, aproximadamente 10^7 células/frasco) de nitrógeno líquido y se descongelaron rápidamente en un baño de agua. Se transfirieron las células a tubos de centrífuga de 15 ml y se agregaron 12 ml de medio completo gota a gota. Luego de centrifugar las células a 1000 rpm durante 10 minutos, se resuspendió el sedimento en 10 ml de medio completo y se volvió a centrifugar a 1000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, se resuspendieron las células en 4 ml de medio.

Ejemplo 4

Secuencias de ADN que codifican los anticuerpos 9L12 (ZTS-841), 48L2 (ZTS-842) y 13L11

Se recuperaron las células individuales de interés de microarreglos mediante micromanipulación y se depositaron en microtubos que contenían amortiguador de lisis y esferas magnéticas para captura de ARNm. Se preparó ADNc a partir de ARN total con una mezcla de cebadores específicos para los genes que se hibridan en los dominios constantes tempranos de HC gamma, LC kappa y LC lambda. Se usó la enzima desoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT) para adición de cola en el extremo 3' de la primera cadena de producto de ADNc. Se usa una mezcla de cebadores inversos específicos para genes y un cebador directo universal para la posterior primera PCR. Luego, se llevaron a cabo PCR anidadas individualmente para cada cadena de VH y VL para amplificar las regiones variables de anticuerpo. Los cebadores inversos usados para esto se ubican en el dominio constante de HC o LC junto con un cebador directo universal. Se separaron los fragmentos amplificados de la PCR mediante electroforesis en gel en un gel de agarosa. Los amplicones de VH y VL de longitud completa aislados de una única célula se clonaron en vectores de expresión que contienen las partes constantes de HC o LC correspondientes. Las secuencias de dominio variable canino fueron las siguientes: cadena ligera variable 9L12 (841) (SEQ ID NO: 7), secuencia de nucleótidos correspondiente (SEQ ID NO: 17); cadena pesada variable 9L12 (841) (SEQ ID NO: 8), secuencia de nucleótidos correspondiente (SEQ ID NO: 18); cadena ligera variable 48L2 (842) (SEQ ID NO: 27), secuencia de nucleótidos

correspondiente (SEQ ID NO: 36); cadena pesada variable 48L2 (842) (SEQ ID NO: 28), secuencia de nucleótidos correspondiente (SEQ ID NO: 38); cadena ligera variable 13L11 (SEQ ID NO: 51), secuencia de nucleótidos correspondiente (SEQ ID NO: 53); cadena pesada variable 13L11 (SEQ ID NO: 52), secuencia de nucleótidos correspondiente (SEQ ID NO: 54).

Las regiones constantes de los anticuerpos aislados, aislados tal como se describió anteriormente, no se usaron en la construcción posterior de los anticuerpos de la invención. La región Fc de los anticuerpos recombinantes de la invención comprende una versión modificada de IgGB canina (Bergeron et ál., *Vet Immunol Immunopathol*, enero de 2014, 15:157 (1-2): 31-41) y se seleccionó por su semivida, sus propiedades biofísicas y su carencia de funciones efectoras. Tal como se informa en Bergeron et ál., la IgGB canina tiene buena afinidad con FcRn canino y propiedades biofísicas adecuadas para procesamiento posterior. La calorimetría de barrido diferencial (DSC) realizada en la región Fc canina sola indicó la estabilidad térmica de las regiones constantes a aproximadamente 70 °C y 83 °C. Estas temperaturas de fusión son similares o mayores que las informadas para mAb humanizados comercializados.

Se realizaron mutaciones de tres puntos del dominio CH2 de IgGB canina para eliminar la actividad de CDC y ADCC. En la presente, se hace referencia a Fc con mutaciones como IgGB(e-) (SEQ ID NO.43). Aunque NGF es una diana soluble, se eliminaron funciones efectoras del anticuerpo anti-NGF para proteger contra cualesquiera efectos secundarios asociados a funciones efectoras o dianas no específicas. Estas mutaciones no parecen afectar la inmunogenicidad de este mAb. Adicionalmente, las mutaciones de la Fc para eliminar las funciones efectoras no afectaron la unión a proteína A o FcRn. Se observó una reducción de la unión a FcγRI y FcγRIII canino, así como una reducción de la actividad de ADCC. La proteína C1q es la primera proteína en la cascada de complemento y es necesaria para la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) de las células. Se ha demostrado que IgGB(e-) carece de unión a la proteína C1q. La secuencia de aminoácidos de HC-65 constante canina, tal como se describe, se representa como la SEQ ID NO: 41 y su secuencia de nucleótidos correspondiente se representa como la SEQ ID NO: 42. La secuencia de aminoácidos de lambda constante canina se representa como la SEQ ID NO: 60 y su secuencia de nucleótidos correspondiente se representa como la SEQ ID NO: 61.

Ejemplo 5:

Determinación de afinidad de unión a antígeno

Se determinaron las afinidades de unión a anticuerpo de los anticuerpos contra NGF canino mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un sistema Biacore (Biacore Life Sciences (GE Healthcare), Uppsala, Suecia). La inmovilización de NGF canino y de rata se obtuvo mediante acoplamiento con amina de 5 µg/mL de NGF con química de N-hidroxisuccinimida

(NHS)/1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Los chips se inactivaron con etanolamina y se evaluó la afinidad con la que los mAb candidatos se unieron a NGF inmovilizado. Se inyectaron varias concentraciones de anticuerpos anti-NGF caninos y felinizados en las superficies de NGF mientras que se monitorearon en tiempo real la asociación del anticuerpo al antígeno y la disociación del complejo formado. Se llevó a cabo un análisis cinético para obtener la constante de disociación de equilibrio (KD). Los resultados se muestran en la Tabla 1 que se encuentra a continuación.

Tabla 1: Resumen de cinética de unión a NGF de rata y canino

Antígeno	Nombre	ZTS	ka (M-1 s-1)	kd (s-1)	KD (M)
NGF canino	48L2	ZTS-842	7.03E+05±2.72E+05	2.27E-05±5.30E-05	2.17E-11±5.13E-11
NGF canino	9L12	ZTS-841	5.27E+05±1.44E+05	2.36E-05±2.84E-05	5.06E-11±6.73E-11
NGF canino	fel48L2 1.1	ZTS-205	4.26E+05±2.21E+05	8.93E-05±2.14E-04	1.11E-10±2.56E-10
NGF canino	fel48L2 1.2	ZTS-206	4.22E+05±2.10E+05	8.64E-05±2.04E-04	1.13E-10±2.55E-10
NGF canino	fel48L2 chimera		4.71E+05±1.26E+05	2.64E-06±1.71E-06	6.25E-12±5.40E-12
NGF de rata	48L2	ZTS-842	5.73E+05±2.65E+05	1.42E-06±1.45E-06	3.25E-12±3.43E-12
NGF de rata	9L12	ZTS-841	5.87E+05±2.32E+05	4.61E-05±4.69E-05	1.08E-10±1.21E-10
NGF de rata	fel48L2 1.1	ZTS-205	6.72E+05±3.41E+05	2.9E-04±5.01E-04	2.77E-10±4.77E-10
NGF de rata	fel48L2 1.2	ZTS-206	6.42E+05±3.13E+05	2.91E-04±4.83E-04	3.09E-10±4.80E-10
NGF de rata	fel48L2 chimera		3.87E+05	1.10E-07	2.85E-13

Ejemplo 6:

Construcción de anticuerpos quiméricos 9L12 (841) y 48L2 (842)

Los dominios variables de los anticuerpos son responsables de la unión de antígenos. Los anticuerpos consisten en un apareamiento en homodímeros de dos proteínas heterodiméricas. Cada cadena proteica (una pesada y una ligera) del heterodímero consiste en un dominio variable

y un dominio constante. Cada dominio variable contiene tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) que contribuyen a la unión a antígeno. Las CDR están separadas en el dominio variable por regiones marco que proveen una estructura para presentación espacial adecuada de los sitios de unión en el anticuerpo. En conjunto, las CDR y las regiones marco contribuyen a la capacidad de los anticuerpos para unirse a su antígeno cognado. Se prevé que el injerto del dominio variable completo en la región constante respectiva tenga un impacto muy leve o nulo en la capacidad del anticuerpo de unirse a NGF. Para confirmar la identificación de la secuencia correcta de las regiones variables de cadena pesada y ligera y producir de forma simultánea material homogéneo, se diseñaron vectores de expresión para producir anticuerpos caninos o quiméricos recombinantes en sistemas de expresión en mamíferos. Los anticuerpos quiméricos descritos en la presente consisten en la secuencia variable (tanto CDR como marco) del anticuerpo de la especie hospedadora injertado en las regiones constantes pesada y ligera respectivas de una molécula de IgG canina. El anticuerpo quimérico descrito en la presente consiste en el segmento variable (tanto CDR como marco) de la molécula canina injertada en las respectivas regiones constantes pesada y ligera de una molécula de IgG felina. Dado que el dominio variable es responsable de la unión a antígeno, se espera que realizar injertos del dominio variable completamente canino en un dominio constante felino tenga poco impacto o no tenga impacto alguno en la capacidad del anticuerpo para unirse a NGF. Las secuencias de dominio variable quimérico fueron las siguientes: canfel_chimera 9L12 (841) cadena ligera variable (SEQ ID NO: 9), secuencia de nucleótidos correspondiente (SEQ ID NO: 19); canfel_chimera 9L12 (841) cadena pesada variable (SEQ ID NO: 10), secuencia de nucleótidos correspondiente (SEQ ID NO: 21); canfel_chimera 48L2 (842) cadena ligera variable (SEQ ID NO: 29), secuencia de nucleótidos correspondiente (SEQ ID NO: 39); canfel_chimera 48L2 (842) cadena pesada (SEQ ID NO: 30), secuencia de nucleótidos correspondiente (SEQ ID NO: 40). Se clonó cada segmento variable en un plásmido de expresión mamífero que contiene ya sea la cadena pesada o ligera de IgG felina. La secuencia de aminoácidos de la región constante pesada felina se representa como la SEQ ID NO: 62 y su secuencia de nucleótidos de correspondiente se representa como la SEQ ID NO: 63. La secuencia de aminoácidos de la constante ligera felina se representa como la SEQ ID NO: 64 y su secuencia de nucleótidos correspondiente se representa como la SEQ ID NO: 65.

Ejemplo 7:

Felinización de anticuerpos 48L2 y 9L12

La generación de anticuerpos antifármacos (ADA) se puede asociar con la pérdida de eficacia para cualquier proteína bioterapéutica que incluye anticuerpos monoclonales. La evaluación exhaustiva de la bibliografía ha demostrado que someter a los anticuerpos

monoclonales a especiación puede reducir la tendencia de los mAb a ser inmunogénicos. Se empleó una estrategia de felinización para ayudar a mitigar los riesgos asociados con la formación de ADA para los anticuerpos monoclonales anti-NGF caninos provistos en la presente para el uso definitivo de los anticuerpos en felinos. Esta estrategia de felinización se basa en identificar la secuencia de anticuerpos de línea germinal felina más adecuada para su uso en injertos de CDR. Luego de un análisis exhaustivo de todas las secuencias de líneas germinales felinas disponibles tanto para cadena pesada como ligera, se seleccionaron los candidatos de líneas germinales con base en su homología con los mAb caninos y se usaron las CDR de los segmentos progenitores caninos para reemplazar las CDR felinas nativas. Los mAb felinizados se expresaron y se caracterizaron por su capacidad de unión a NGF. El objetivo era conservar una actividad basada en células y afinidad elevadas utilizando marcos de anticuerpos de felinos para minimizar el potencial de inmunogenicidad *in vivo*. Se produjeron las construcciones sintéticas que representan las cadenas pesada y ligera variables felinizadas de mAb 48L2 (ZTS-842) con las SEQ ID NO: 21-26 y 9L12 (ZTS-841) con las SEQ ID NO: 1-6. Luego de la subclonación de cada cadena variable en plásmidos que contienen las regiones pesada constante felina (SEQ ID NO:62) y ligera constante felina (SEQ ID NO:64), se cotransfectaron los plásmidos para expresión de anticuerpos en células HEK293. Las versiones quiméricas, heteroquiméricas y felinizadas de mab 48L2 y 9L12 se expresaron y se caracterizaron por su capacidad para unirse a NGF mediante SPR.

Ejemplo 8:

Producción de anticuerpos a partir de plásmidos de glutamina sintetasa (GS)

Se clonaron los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de 9L12 y 48L2 caninos y felinizados (ZTS-841 y ZTS-842, respectivamente), tal como se describe en la presente, y de 9L12 felinizado en plásmidos de GS pEE 6.4 y pEE 12.4 (Lonza, Basilea, Suiza) de acuerdo con técnicas de biología molecular estándar conocidas por los expertos en la técnica. Los plásmidos individuales resultantes se digirieron conforme al protocolo del fabricante y se ligaron entre sí para formar un único plásmido de expresión en mamíferos. Para demostrar la producción transitoria de cada anticuerpo, se utilizó cada uno de los plásmidos para transfectar las células HEK 293 y la expresión se realizó en cultivos de diversos tamaños. La proteína se aisló de medio HEK acondicionado con cromatografía por afinidad de proteína A conforme a métodos de purificación de proteína estándar. Se cargó medio en resina cromatográfica y se eluyó mediante variación de pH. La proteína eludida se sometió a ajuste de pH, se dializó y se filtró en condiciones estériles antes del uso. Se evaluaron anticuerpos para determinar la afinidad y potencia.

Para la generación de una línea celular estable que produzca anticuerpos candidatos, el plásmido de GS se linealizó antes de la transfección con la enzima de restricción, PvuI, que se

corta en un único punto en la estructura principal del plásmido. Las células GS-CHOK1SV (clon 144E12) se transfectaron con ADN plásmido linealizado mediante electroporación. Tras la transfección, las células se colocaron en placas de 48 pocillos (48WP, por su sigla en inglés), para generar grupos estables. Cuando los grupos alcanzaron una confluencia del 50 % en los 48WP, se analizaron 100 µl de sobrenadante para expresión de IgG, utilizando los biosensores de proteína A y ForteBio Octet (Pall ForteBio, Fremont, CA). Los clones con mejor expresión se aumentaron de escala a placas de 6 pocillos (6 WP) y luego se colocaron en matraces de agitación (SF, por su sigla en inglés) de 125 mL. Luego de la adaptación de las células al cultivo de suspensión en matraces de 125 mL, se acumularon 2 frascos de cada grupo de líneas celulares para almacenamiento de LN. Dado que la fabricación de líneas celulares debe ser clonal, se subclonaron los 3 grupos principales de mayor expresión limitando la dilución en placas de cultivo de 96 pocillos. Con el fin de probar el potencial de clonación y evitar una segunda ronda de dilución por limitación, se tomaron imágenes de placas de 96 pocillos utilizando el captador de imágenes para selección de clones (CSI, por su sigla en inglés) de Molecular Devices (Molecular Devices LLC, San José, CA), que captura imágenes de células individuales y su crecimiento posterior. Los clones se seleccionaron en función de las imágenes de CSI satisfactorias, el crecimiento y la producción en 96WP.

Con el fin de evaluar la productividad y el crecimiento del cultivo celular, se evaluaron adicionalmente los principales grupos de expresión en un lote de suministro de 14 días en 125 mL de SF. Las células se sembraron en medios de plataforma y los suministros con CD CHO de Life Technologies más 4 aminoácidos, el suministro CDF v6.2 sujeto a derechos de propiedad y glucosa al 10 %. Tras el lote de suministro de 14 días, se centrifugaron los grupos y se aisló el mAb que producía CD CHO filtrando el sobrenadante con una membrana de polietersulfona (PES) 0.20 µm antes de la purificación.

Una purificación típica consiste en dos litros de medio acondicionado (del cultivo de células CHO, filtración de 0.2 µm) cargado en una columna de 235 mL de MabSelect (GE healthcare, n.º de cat. 17-5199-02). La columna se había equilibrado previamente con PBS. La muestra se cargó con un tiempo de permanencia de >2.5 minutos. Tras la carga, se lavó la columna nuevamente con PBS y luego con acetato de sodio 25 mM, pH ~ neutro. La columna se sometió a elución con ácido acético 25 mM, pH 3.6 y luego se depuraron con ácido acético 250 mM, cloruro de sodio 250 mM, pH ~2.2. Las fracciones (50 mL) se recolectaron durante las etapas de elución y depuración. La absorbancia UV a A280 se controló durante todo el proceso. Se agruparon las fracciones pico, se ajustó el pH a ~5.5 con adición de acetato de sodio 20 mM y luego se dializó con tres intercambios de amortiguador. Se recopiló el resultado de la diálisis, se filtró en condiciones estériles y se almacenó a 4 °C.

Ejemplo 9:

Neutralización de actividad biológica de NGF canino *in vitro*

Se midieron las afinidades de cada anticuerpo anti-NGF canino y felinizado con NGF canino mediante el uso de SPR (resonancia de plasmones superficiales) en un sistema Biacore (Biacore Life Sciences (GE Healthcare), Uppsala, Suiza) tal como se describió en el Ejemplo 5. Además, se desarrolló un ensayo funcional *in vitro* para medir las constantes de inhibición de la capacidad de los mAb para inhibir la unión de NGF a TrkA. Para determinar si los mAb anti-NGF de la invención bloquearon la señalización celular posterior como consecuencia de la inhibición de la unión de NGF a TrkA, se evaluaron los anticuerpos purificados en un ensayo que mide la fosforilación inducida por NGF canino de cinasa 1 y 2 regulada por señal extracelular (pERK 1/2). Las células usadas en el ensayo fueron células de TrkA caninas que expresan CHO-K1 (Life Technologies) que crecen en medio DMEM/F12 + GlutaMAX™-1 (Life technologies) complementado con FBS dializado al 10 %, HEPES 20 mM, 500 µg/ml de geneticina y antibiótico-antimicótico 1 vez por µg/ml (Life Technologies) a 37 °C en una incubadora con humedad con 5 % CO₂, 95 % aire. En el ensayo de pERK 1/2, se sembraron 5.0 x 10⁴ células por pocillo en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos (Costar) y se incubaron durante la noche a 37 °C para permitir la adherencia. Entonces, se privó de suero a las células durante 2 horas en HBSS que contiene cloruro de magnesio y calcio (Life Technologies). Se realizaron diluciones seriales de anticuerpos anti-NGF en HBSS y se preincubaron con NGF canino recombinante en HBSS/BSA al 0.1 % a temperatura ambiente durante 1 hora antes de agregarlas a las células. La concentración final de BSA y NGF canino en el ensayo fue de 15 ng/ml (EC90) y 0.025 %, respectivamente. Las células se estimularon durante 10 minutos a 37 °C antes de remover las mezclas de ensayo y agregar 100 µl de amortiguador de lisis celular provisto con un kit de ensayo pERK 1/2 AlphaLISA® SureFire® Ultra (PerkinElmer). Luego, se procesaron los lisados celulares de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se leyeron las placas con un lector de placas EnSpire® (PerkinElmer). Se define la respuesta máxima en el ensayo como la fosforilación de ERK 1/2 medida en presencia solo de NGF canino (sin mAb). La respuesta mínima se define como los niveles basales de fosforilación de ERK 1/2 (sin estímulo). Los valores de inhibición calculados para anticuerpos anti-NGF se expresan como un porcentaje de respuestas mínimas y máximas. Los datos de inhibición porcentual resultante se graficaron con GraphPad Prism 5 para determinar IC₅₀ (ajuste de curva de 4 parámetros). Vea la Figura 6.-7.

Ensayo de proliferación de células TF-1

Las células TF-1 (ATCC) crecieron de forma rutinaria en medio RPMI 1640 modificado con ATCC (Life Technologies) complementado con FBS al 10 % y 2 ng/ml GM-CSF humano

recombinante (R&D Systems Inc.). El medio de ensayo de proliferación de TF-1 fue RPMI 1640 complementado con BIT 9500 al 10 % (Stemcell Technologies) y 10 µg/ml de gentamicina. La proliferación de TF-1 se llevó a cabo en microplacas de 96 pocillos (Costar) mediante la incubación de 15 000 células por pocillo con anticuerpos anti-NGF caninos y felinizados en concentraciones indicadas y 2 ng/ml de NGF canino recombinante. Luego de un período de cultivo de 65 horas, se empleó un kit de ensayo luminiscente CellTiter-GLO (Promega) para evaluar los efectos de los anticuerpos anti-NGF en la proliferación celular inducida por NGF canino. Se define la respuesta máxima en el ensayo como proliferación en solo de NGF canino (sin anticuerpo). La respuesta mínima se define como proliferación medida sin NGF canino. Los valores de inhibición calculados (neutralización de NGF) para anticuerpos anti-NGF se expresan como un porcentaje de respuestas mínimas y máximas. Los datos de inhibición porcentual resultante se graficaron con GraphPad Prism 5 para determinar IC50 (ajuste de curva de 4 parámetros). Vea las Figuras 8-9.

Ejemplo 10:

Farmacocinética

Farmacocinética (PK) de mAb anti-NGF canino 48L2 (ZTS-842) y 9L12 (ZTS-841). Se realizaron ensayos en perros después de dos dosis subcutáneas (SC) y una dosis intravenosa (IV) de 2.0 mg/kg administradas en intervalos de 28 días. Los datos IV demostraron que la semivida fue de 13.3 ± 3.4 días (promedio $\pm$ desviación estándar) y que la depuración fue lenta, 3.9 ± 0.2 mL/día/kg. Luego de la administración SC, se observaron picos de concentraciones en suero 1-7 días después de la administración de dosis. El promedio de biodisponibilidad absoluta SC fue $88 \% \pm 41 \%$. Se confirmó la unión a NGF *in vivo* con un ensayo de NGF total (libre + complejo NGF-mAb) de alta sensibilidad). Antes de la dosis de 48L2 (ZTS-842), las concentraciones de NGF fueron menores que el límite inferior de cuantificación, 10 pg/mL. Luego de la administración de 48L2 (ZTS-842), las concentraciones de NGF total aumentaron en todos los animales y el promedio fue 1300 ± 500 pg/mL el día 84 del ensayo. Las concentraciones de 48L2 (ZTS-842) fueron excesivas durante el ensayo, con un promedio de 7.8 ± 1.3 µg/mL el día 84, 28 después de la última dosis, lo que sugiere que dosis incluso menores serían adecuadas para capturar NGF endógeno durante al menos un mes desde la administración de una dosis. Aunque no se evaluó directamente la inmunogenicidad, los datos de concentración de 48L2 (ZTS-842) en función de tiempo no indicaron la inducción de ningún anticuerpo antifármaco en los cuatro perros durante el ensayo de 84 días con tres dosis. Vea la Figura 11. De manera adicional, también se estudió ZTS-841 con los mismos parámetros anteriormente descritos: dosis de 20 mg/kg administradas por vía SC/SC/IV cada 28 días con una semivida de 11.8 ± 4.1 días. Biodisponibilidad SC de $94 \% \pm 12 \%$. Vea las Figuras 10-11.

Se estudió la PK del mAb anti-NGF felinizado fel48L21.1 (ZTS-205) en 3 gatos y 3 gatas luego de dos dosis subcutáneas (SC) y una dosis intravenosa (IV) de 1.5 mg/kg administrada en intervalos de 28 días. Los datos IV demostraron que la semivida fue de 10.8 ± 2.5 días (promedio $\pm$ desviación estándar) y que la depuración fue lenta, 3.0 ± 1.0 mL/día/kg. Luego de la administración SC, se observaron picos de concentraciones en suero 2-7 días después de la administración de dosis. El promedio de biodisponibilidad absoluta SC fue $88 \% \pm 17\%$. Las concentraciones de fel48L21.1 (ZTS-205) fueron elevadas durante el ensayo, con un promedio de 7.2 ± 4.0 μ g/mL el día 84, 28 después de la última dosis, lo que sugiere que dosis incluso menores serían adecuadas para capturar NGF endógeno durante al menos un mes desde la administración de una dosis. Aunque no se evaluó directamente la inmunogenicidad, los datos de concentración de ZTS-842 en función de tiempo no indicaron la inducción de ningún anticuerpo antifármaco en los seis gatos durante el ensayo de 84 días con tres dosis.

Metodología de ensayo bioanalítico

Se desarrolló un ensayo de unión a ligando 48L2 libre (ZTS-842) con base en la captura de mAb libre por NGF canino biotinilado en un disco de estreptavidina Gyrolab™ y detección de fluorescencia luego de la adición de anticuerpo monoclonal de IgG anticano murino etiquetado con AlexaFluor™. Se desarrolló un ensayo de unión a ligando fel48L21.1 libre (ZTS-205) con base en la captura de mAb libre por NGF canino biotinilado en un disco de estreptavidina Gyrolab™ y detección de fluorescencia luego de la adición de anticuerpo policlonal de IgG antifelino de cabra etiquetado con AlexaFluor™.

Ejemplo 11:

Evaluación de anticuerpo anti-NGF canino y felinizado en un modelo de MIA de rata

La osteoartritis (OA) es una enfermedad articular degenerativa caracterizada por dolor articular y una pérdida progresiva de cartílago articular. La inyección intraarticular de MIA induce una pérdida de cartílago articular con desarrollo de lesiones de hueso subcondral que imitan las de la OA. Este modelo ofrece un método rápido y mínimamente invasivo para reproducir lesiones similares a la OA en especies de roedores.

El efecto analgésico de anticuerpos anti-NGF sometidos a especiación (por ejemplo, caninizados, felinizados y similares) en una dosis de MIA en el modelo de MIA en ratas de osteoartritis se demostró mediante la administración de dosis independientes de anticuerpos monoclonales ZTS-841, ZTS-842 durante el ensayo, en el día 7 de estudio y el día 14 de estudio. Se evaluó el dolor con un ensayo de carga de peso para evaluar el dolor sostenido y compresión de articulación (Randall Selitto) en ensayos de hiperalgesia mecánica con un analgesímetro (Ugo

Basile). El ensayo se llevó a cabo mediante la aplicación de una presión a la pata trasera. Al presionar un pedal que activó un motor, la fuerza aumentó a una velocidad constante en la escala lineal. Cuando se notó vocalización del dolor o este provocó que se retirara la pata, se liberó inmediatamente el pedal y se leyó el umbral nociceptivo en una escala. Se usó un umbral de corte de 400 g para evitar posibles lesiones. Se realizó una prueba de Randall-Selitto en los días de estudio -1 (referencia), 20 y 28. Vea un esquema del procedimiento de MIA en ratas en la Figura 12.

Se induce la pérdida de cartílago mediante la administración del inhibidor metabólico monoyodoacetato (MIA). Se anestesió a las ratas con isoflurano (3-5 % en 100 % O₂). Una vez que se anestesió completamente a los animales, se administró una inyección de 50 µl de 40 mg de MIA por mililitro de solución salina en un espacio intraarticular de la babilla trasera izquierda con una jeringa de 1 cc con una aguja de 27G. Se retiró al animal del isoflurano, se permitió que se recuperara completamente y luego se devolvió a su jaula.

Se evaluó la carga de peso en los animales con un medidor de incapacidad para evaluar el efecto de los mAb anti-NGF de la invención en estos animales. Los animales se colocaron en la cámara de ensayo de acrílico y cuando se encontraron en la posición correcta, se realizó una evaluación de fuerza. Se realizaron tres evaluaciones en cada momento. Se calcula la calificación de carga de peso porcentual (WBS) para cada evaluación con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ WBS} = \left[\frac{\text{peso en pata izquierda}}{\text{peso en pata izquierda} + \text{peso en pata derecha}} \right] * 100$$

Se tomó el promedio de las 3 WBS como la WBS para dicho momento. El día -21, se calculó una WBS antes de la inducción con MIA. Se instiló MIA en la babilla izquierda en una dosis de 2 mg/0.05 mL. Se midió una WBS el día -1 para aleatorización. El día 0, se administró un mAb anti-NGF o placebo y luego se evaluó la carga de peso los días 7, 14, 21 y 28. Se registraron los pesos corporales semanalmente el día de evaluación de carga de peso.

Se tomaron muestras de suero el día 28, luego de la administración de dosis a través de una punción cardíaca terminal. Luego de la eutanasia con asfixia por CO₂, se recogió sangre entera de una punción cardíaca y se colocó en tubos de separación de suero, se permitió que coagulara a temperatura ambiente, se centrifugó (3500 rpm, 15 minutos) y se transfirió a placas de 96 pocillos en dos alícuotas de 300 µl cada una, tal como se indica en la tabla que se encuentra más adelante. Se congelaron muestras a ≤ -10°C hasta su análisis. Vea representaciones gráficas de ZTS-841 y ZTS-842 evaluados en el ensayo de MIA en ratas en las Figuras 13-15.

Ejemplo 12

Efectos en la cojera: evaluación del anticuerpo caninizado en el modelo de sinovitis

Los procesos inflamatorios en tejidos blandos son reconocidos como un componente significativo de la osteoartritis. En el modelo de dolor por sinovitis, se induce la inflamación transitoria de la membrana sinovial en una única babilla a través de la inyección intraarticular de lipopolisacárido (LPS) bacteriano. La cojera cuantificable tiene lugar a las 2 horas de la inducción de sinovitis, tiene sus picos a las 3-4 horas, disminuye a las 6 horas y se soluciona por completo a las 24 horas. Este modelo ha sido usado de forma rutinaria para investigar dianas en el control de dolor.

La administración de una dosis de 5 mg/kg de ZTS-841 mediante inyección intravenosa una vez en beagles machos intactos redujo la renguera, en comparación con placebo de solución salina, en un modelo de sinovitis LPS canino. Tal como se observa en la Tabla 2 a continuación, ZTS-841 demostró la eficacia luego de 3 horas de la inducción de sinovitis LPS.

La Tabla 2 y la Figura 16 representan medias de mínimos cuadrados (con error estándar) para determinar VAS de renguera en el caso de grupos de tratamiento luego de tres y cinco horas de la inducción de sinovitis. Las diferencias entre 5 mg/kg de ZTS-841 y el placebo fueron estadísticamente significativas.

96
Tabla 2

Escalas visuales analógicas (cm)

		Horas luego de administración	
Tratamiento		171	173
5 10	Sol. salina (0.167 mL/kg, IV)	Animal 1	8.2
		2	9.8
		3	9.8
		4	6.2
		5	9.6
		6	9.4
		7	9.6
		8	9.4
		9	9.7
		10	9.7
		11	9.8
		12	9.8
		13	9.9
15 20	ZTS-841 (5.0 mg/kg, IV)	14	6.6
		15	8.8
		16	9.5
		17	9.7
		18	3.3
		19	8.6
		20	3.4
		21	2.7
		22	9.8
		23	9.8
		24	5.9
		25	9.6
		26	8.7

Ejemplo 13

Humanización de los anticuerpos 48L2 (ZTS-842) y 9L12 (ZTS-841)

De manera similar a la estrategia de felinización descrita y conocida por los expertos en la técnica, se identificaron secuencias de anticuerpos de línea germinal adecuada a partir de todas las secuencias humanas disponibles para el injerto de CDR a partir de los mAb 48L2 y 9L12. Las cadenas ligeras variables y las cadenas pesadas variables se seleccionaron con base en la homología más elevada con sus marcos caninos respectivos. Se removieron las CDR de los segmentos humanos naturales y se reemplazaron con CDR caninas originales. Se produjeron 48L2 y 9L12 humanizados recombinantes mediante el uso de regiones variables seleccionadas unidas a sus secuencias de cadena de IgG pesada constante canina respectivas. Los anticuerpos se produjeron a partir de células HEK, se purificaron tal como se describió previamente, y luego se

evaluaron por su capacidad de unión a NGF humano, tal como se muestra en la Tabla 3 a continuación. Se construyeron las construcciones sintéticas que representan las cadenas pesada y ligera variable humanizada de mAb 48L2 (ZTS-842) y 9L12 (ZTS-841). Las diferentes combinaciones de cadenas ligera y pesada variables en ambos conjuntos se sometieron a síntesis y ensayos para su unión (ver más adelante). Las secuencias de CDR no cambiaron durante la construcción, solo cambiaron las secuencias marco.

Se determinaron las afinidades de unión a anticuerpo de los anticuerpos contra NGF humano (SEQ ID NO. 66) mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR). Se inmovilizó NGF humano en la superficie de un chip BIACORE mediante acoplamiento de amina directo. Se inyectaron varias concentraciones de anticuerpos anti-NGF humanizados en las superficies de NGF humano mientras que se monitorearon en tiempo real la asociación del anticuerpo al antígeno y la disociación del complejo formado. Se llevó a cabo un análisis cinético para obtener la constante de disociación de equilibrio (KD). Los resultados se muestran en la Tabla 3 que se encuentra a continuación.

Tabla 3

mAb humanizados				
Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	KD (M)
can9L12VH_HM855939 (SEQ ID NO.69)	can9L12VL (SEQ ID NO.7)	3.90E+05	1.61E-03	4.12E-09
can9L12VH_X92218 (SEQ ID NO.67)	can9L12VL (SEQ ID NO.7)	3.01E+05	3.78E-05	1.26E-10
can9L12VH (SEQ ID NO.8)	can9L12VL_M94116_65698 (SEQ ID NO.73)	2.14E+05	1.97E-03	9.19E-09
can48L2VH_HM855323.1 (SEQ ID NO. 79)	can48L2VL_Z22192.1 (SEQ ID NO.91)	1.67E+05	2.56E-04	1.54E-09
can48L2VH_HM855323.1 (SEQ ID NO. 79)	can48L2VL_Z22192.1_P8A (SEQ ID NO. 87)	2.05E+05	3.15E-04	1.54E-09
can48L2VH_HM855323.1 (SEQ ID NO. 79)	can48L2VL_Z22192.1_P14L (SEQ ID NO. 89)	1.44E+05	1.46E-07	1.02E-12
can48L2VH_HM855336.1 (SEQ ID NO. 75)	can48L2VL_Z22192.1 (SEQ ID NO.91)	2.69E+05	3.37E-04	1.25E-09
can48L2VH_HM855336.1 (SEQ ID NO. 75)	can48L2VL_Z22192.1_P8A (SEQ ID NO. 87)	2.52E+05	2.12E-04	8.41E-10
can48L2VH_HM855336.1 (SEQ ID NO. 75)	can48L2VL_Z22192.1_P14L (SEQ ID NO. 89)	2.83E+05	4.22E-04	1.49E-09

Ejemplo 14:**Mutagénesis de barrido de parátipo de los anticuerpos 48L2 (ZTS-841) y 9L12 (ZTS-842)**

La región de un anticuerpo responsable del reconocimiento de antígenos representa el parátipo. Un parátipo se crea mediante una combinación de aminoácidos en las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena tanto pesada como ligera de regiones variables. La unión entre anticuerpo y antígeno se suele mediar por cadenas laterales de residuos de CDR con cadenas laterales o restos carbohidratos del antígeno. Para ayudar a definir las cadenas laterales críticas implicadas en el reconocimiento de anticuerpos, se realizó mutagénesis de detección de alanina en cada residuo de CDR en las cadenas tanto pesada como ligera, la técnica tal como se describe en Cunningham y Wells (1989) *Science*, tomo 244, publicación 4908, págs. 1081 - 1085. Luego, estas mutaciones se evaluaron de forma individual para determinar la capacidad de NGF con Biacore. Se midió la afinidad de unión a NGF humano (hN debajo), NGF canino (cN debajo) y NGF de rata (rN debajo) y se generaron los valores KD mediante los mismos protocolos que se describieron en los Ejemplos 5 y 9 anteriores. Luego, los valores se compararon con los anticuerpos de tipo salvaje y se representan en las tablas como un porcentaje de unión de tipo salvaje. Los datos presentados en las Tablas 4 y 5 a continuación se muestran como una «puntuación de similitud porcentual» en comparación con el tipo salvaje.

A los efectos de determinar la afinidad relativa de los mAb mutantes de detección de alanina con los perfiles de unión de los mAb originales con los chips recubiertos de NGF se determinó a 100 nM usando un Biacore T200. La media de unidad de respuesta de cuatro réplicas del mAb original +/- 3 desviaciones estándares se usó para generar parámetros con el fin de definir un umbral de unidades de respuesta que comprende tanto la unión de anticuerpos a velocidades de asociación como de disociación. El porcentaje de puntos de datos para cada mutante se encuentra comprendido por este umbral que luego se usó para definir una «puntuación de similitud porcentual». La puntuación de similitud resultó de la sustitución de alanina en cada posición de CDR de cadena pesada y ligera de ZTS-841 y ZTS-842 para la cadena pesada y ligera se muestran como «porcentaje de inhibición con respecto al original» en las Tablas 4 y 5, respectivamente. Los resultados de la sustitución de alanina en cada posición de CDR

Las secuencias en la Tabla 4 están dirigidas a la mutagénesis de alanina de las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera variable y cadena pesada variable de ZTS-841 (9L12). La Tabla 5 está dirigida a las sustituciones de alanina de las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera y pesada variables de ZTS-842 (48L2). Los aminoácidos mutantes están descritos en la tabla de acuerdo con la numeración de tipo salvaje de las secuencias de cadena ligera variable y pesada variable, tal como se describió previamente y se incluye más adelante. A

continuación, se señalan las posiciones de aminoácidos 1, 25, 50, 75 y 100. En la columna «nombre de la muestra» se menciona la secuencia variable ligera o pesada con el número de posición de aminoácido de la sustitución de alanina.

VH de ZTS-841: SEQ ID NO.8:

5 E¹VQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVAS²⁵GFTFSSHGMHWVRQSPGKGLQWVAV⁵⁰INSGGSSTYYT
DAVKGRFTISRDNA⁷⁵KNTVYLQMNSLRAEDTAMYYCAKES¹⁰⁰VGGWEQLVGP¹⁰⁰PHFDYWGGGTLVI
VSS¹²⁴

VL de ZTS-841: SEQ ID NO. 7:

10 Q¹SVLTQPTSVSGSLGQRVTISCSGS²⁵TNNIGILGASWYQLFPGKAPKLLVY⁵⁰GNGNRPSGVPDRF
SGADSGDSVTLT⁷⁵ITGLQAEDEADYYCQSFD¹⁰⁰TTLGAHV¹⁰⁰FGGGTHLTVL¹¹⁰

Tabla 4

15		Puntuación de similitud porcentual (%)		
	<u>Nombre de la muestra</u>	<u>KD en hN</u>	<u>KD en cN</u>	<u>KD en rN</u>
20	can9L12VH_D113A	99.99	100	99.98
	can9L12VH_E105A	98.4	100	99.99
	can9L12VH_E99A	81.97	97.72	80.5
	can9L12VH_F112A	8	28.28	11.8
	can9L12VH_F27A	100	100	99.97
	can9L12VH_F29A	100	100	99.94
25	can9L12VH_G102A	3.4	11.04	4.7
	can9L12VH_G103A	38.2	99.81	62.48
	can9L12VH_G109A	40.05	99.96	62.02
	can9L12VH_G26A	97.44	99.97	94.8
	can9L12VH_G33A	99.99	100	99.91
	can9L12VH_G54A	96.2	100	93.78
	can9L12VH_G55A	99.97	100	99.34
	can9L12VH_H111A	2.79	10.1	3.25
	can9L12VH_H32A	13.81	38.24	51.46
	can9L12VH_I50A	96.56	99.95	92.04
30	can9L12VH_K98A	8.58	22.75	7.92
	can9L12VH_L107A	1.82	5.45	2
	can9L12VH_N52A	38.2	85.83	19.7
	can9L12VH_P110A	2.1	6.48	2.6

100

can9L12VH_Q106A	100	100	99.94
can9L12VH_S100A	42.09	76.22	51.57
can9L12VH_S30A	31.19	94.71	99.93
can9L12VH_S31A	99.88	99.99	99.98
can9L12VH_S53A	100	100	99.94
can9L12VH_S56A	40.45	96.76	96
can9L12VH_S57A	33.41	89.87	99.95
can9L12VH_T28A	96.58	99.96	99.96
can9L12VH_T58A	100	99.98	99.93
can9L12VH_V101A	5.29	13.61	4.27
can9L12VH_V108A	56.34	93.15	61.98
can9L12VH_W104A	5.2	19.21	8.2
can9L12VH_Y114A	99.86	100	99.19
can9L12VL_D93A	3.3	11	3.7
can9L12VL_F92A	2.7	7.2	2.3
can9L12VL_G30A	16.2	53.9	13.8
can9L12VL_G33A	2.3	7.5	2.9
can9L12VL_G51A	100	100	99.94
can9L12VL_G53A	10	34.2	11.7
can9L12VL_G97A	43.32	98.9	35.93
can9L12VL_H99A	56.91	99.99	43.73
can9L12VL_I29A	1.5	4.4	1.6
can9L12VL_I31A	11.4	41.21	12.6
can9L12VL_L32A	1.5	4.4	1.7
can9L12VL_L96A	34.25	96.97	37
can9L12VL_N27A	100	100	99.94
can9L12VL_N28A	2.1	6.6	2.5
can9L12VL_N52A	100	100	99.95
can9L12VL_Q90A	19.34	79.24	24.2
can9L12VL_S91A	11.6	39.3	14.5
can9L12VL_T26A	99.99	100	99.17
can9L12VL_T94A	52.48	99.99	40.02
can9L12VL_T95A	100	99.95	99.93
can9L12VL_V100A	15.7	58.2	20.2

Para la Tabla 5:

VH de ZTS-842: SEQ ID NO.28

E¹VQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVAS²⁵GFTFSTYGINWVRQAPGKGLQWVAY⁵⁰ISSGGSSSTYYAD
PVKGRFTI⁷⁵SRDDAKNMLYLQMNSLRAEDTAIYYCAGSRY¹⁰⁰TYAYGGGYEFHFWGQGLTVTVSS¹

VL de ZTS-842: SEQ ID NO. 27

Q¹AVLNQPASVSGALGQKVTISCSGS²⁵TMDIDIFGVSWYQQLPKGAPKLLVD⁵⁰SDGDRPSGIPDRF
 5 SGRSGNSGTLT⁷⁵ITGLQAEDEADYHCQSGDSTLGALAI¹⁰⁰FGGGTHVTVL¹¹⁰

Tabla 5

		Puntuación de similitud porcentual (%)		
<u>Nombre de la muestra</u>		<u>KD en hN</u>	<u>KD en cN</u>	<u>KD en rN</u>
can48L2VL_T26A		99.8	97.31	98.02
can48L2VL_M27A		72.11	28	37.9
can48L2VL_D28A		99.63	96.95	97.7
can48L2VL_I29A		97.83	47	57.2
can48L2VL_D30A		99.69	98.28	98.67
can48L2VL_I31A		86.16	32.9	39.9
can48L2VL_F32A		44.32	19.6	66.01
can48L2VL_G33A		56.61	17.5	21.2
can48L2VL_S51A		100	100	100
can48L2VL_D52A		100	99.7	99.9
can48L2VL_G53A		100	99.98	99.99
can48L2VL_Q90A		99.88	94.42	98.67
can48L2VL_S91A		97.52	59.6	76.68
can48L2VL_G92A		99.27	93.63	97.05
can48L2VL_D93A		99.93	98.68	99.51
can48L2VL_S94A		99.96	97.79	99.32
can48L2VL_T95A		99.6	94.87	99.44
can48L2VL_L96A		99.88	89.98	93.23
can48L2VL_G97A		99.97	92.43	99.59
can48L2VL_A98L		99.82	97.34	98.43
can48L2VL_L99A		99.8	96.85	98.39
can48L2VL_A100L		99.88	97.79	98.26
can48L2VL_I101A		99.99	97.27	99.6
can48L2VH_T31A		99.9	99.58	99.86
can48L2VH_I51A		81.81	24.2	37.2
can48L2VH_S52A		100	99.37	99.75
can48L2VH_S53A		99.96	97.84	99.4
can48L2VH_G54A		99.95	98.11	99.3

can48L2VH_G55A	99.97	99.26	99.71
can48L2VH_S56A	99.94	99.31	99.8
can48L2VH_S57A	99.98	98.37	99.72
can48L2VH_T58A	99.91	99.13	99.66
can48L2VH_H112A	51.2	40.31	98.46
can48L2VH_F113A	98.52	33.7	32.2
can48L2VL_T26A	99.8	97.31	98.02
can48L2VL_M27A	72.11	28	37.9
can48L2VL_D28A	99.63	96.95	97.7
can48L2VL_I29A	97.83	47	57.2
can48L2VL_D30A	99.69	98.28	98.67
can48L2VL_I31A	86.16	32.9	39.9
can48L2VL_F32A	44.32	19.6	66.01
can48L2VL_G33A	56.61	17.5	21.2
can48L2VL_S51A	100	100	100
can48L2VL_D52A	100	99.7	99.9
can48L2VL_G53A	100	99.98	99.99
can48L2VL_Q90A	99.88	94.42	98.67
can48L2VL_S91A	97.52	59.6	76.68
can48L2VL_G92A	99.27	93.63	97.05
can48L2VL_D93A	99.93	98.68	99.51
can48L2VL_S94A	99.96	97.79	99.32
can48L2VL_T95A	99.6	94.87	99.44
can48L2VL_L96A	99.88	89.98	93.23
can48L2VL_G97A	99.97	92.43	99.59
can48L2VL_A98L	99.82	97.34	98.43
can48L2VL_L99A	99.8	96.85	98.39

Los valores generados en las Tablas 4 y 5 con un porcentaje de similitud menor de 50% sugieren las posiciones de aminoácidos esenciales para la unión del parátipo de anticuerpo a NGF. La mutación del aminoácido de tipo salvaje en la posición indicada con una alanina que lleva a una menor unión o una unión inexistente a NGF sugiere cuáles aminoácidos son necesarios para la unión y cuáles aminoácidos se pueden sustituir, como mínimo, con sustituciones conservadoras de aminoácidos.