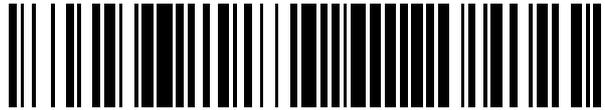


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 917**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2009 E 09708019 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 2252633**

54 Título: **Anticuerpos anti-Trk-A y derivados de los mismos**

30 Prioridad:

04.02.2008 US 25995 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.12.2013

73 Titular/es:

LAY LINE GENOMICS S.P.A. (100.0%)
Via Fonteiana 66
00152 Rome, IT

72 Inventor/es:

BENIGNI, FABIO y
D'AMBROSIO, DANIELE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 435 917 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-Trk-A y derivados de los mismos

La presente invención se refiere a anticuerpos y a derivados de los mismos, especialmente a anticuerpos humanizados y derivados de los mismos.

5 El Factor de crecimiento nervioso (NGF) actúa a través de dos receptores de membrana. Uno es el receptor p75 de afinidad relativamente baja. El otro es un receptor de 140 kDa de alta afinidad, conocido como TrkA.

El NGF tiene un uso potencial en el tratamiento de una amplia gama de trastornos, tales como diversos trastornos neurodegenerativos (incluyendo la enfermedad de Alzheimer), la diabetes y la lepra.

10 Sin embargo el NGF puede tener diversas propiedades agonísticas no deseadas. Estas incluyen un aumento en la sensibilidad al dolor. El sistema NGF-TrkA proporciona una diana potencial para las terapias contra el dolor.

Se han producido diversos anticuerpos anti-TrkA. Uno de estos anticuerpos es un anticuerpo monoclonal denominado 5C3 en el documento WO 97/21732 (McGill University). Sin embargo, se encontró que éste era un agonista de TrkA y por lo tanto no era útil para reducir el dolor. Específicamente, cuando se une a TrkA este anticuerpo no impide la activación funcional del mismo.

15 Un anticuerpo monoclonal anti-TrkA conocido como MNAC13 se describe en el documento WO 00/73344 (Societa Italiana per la Ricerca Scientifica), del cual deriva el documento EP-B-118138 (Lay Line Genomics SpA). Se dice que este anticuerpo y diversos derivados del mismo son eficaces en la prevención de la activación funcional de TrkA en una gama de sistemas biológicos. El anticuerpo monoclonal MNAC 13 se utilizó en un ensayo de nocicepción convencional y se encontró que proporcionaba una hipoalgesia notable.

20 Una variante Fv de cadena sencilla (scFv) de este anticuerpo también se describe en el documento WO 00/73344 y es referida allí como ScFv de MNAC13. Ésta contiene las regiones variables de la cadena ligera y pesada del anticuerpo más grande conectadas entre sí por un polipéptido conector, que une el extremo C de la región VL con el extremo N de la región VH. Se encontró que esta variante se unía a TrkA tan eficazmente como MNAC 13. La secuencia de las regiones variables ligeras y pesadas se comparó con la de las correspondientes regiones del anticuerpo descrito en el documento WO 97/21732 y se encontró que había solo un bajo nivel de identidad de secuencia global con el mismo.

25 El documento WO 06/131952 (Lay Line Genomics SpA) describe usos médicos de anticuerpos anti-TrkA en el tratamiento del dolor crónico. Se proporciona evidencia de esto mediante el uso de modelos de dolor persistente, en particular, el modelo de lesión por constricción crónica (CCI).

30 El documento WO 06/137106 (Lay Line Genomics SpA) describe el uso de un anticuerpo anti-TrkA capaz de inhibir la unión entre NGF y TrkA combinado con al menos un analgésico opiáceo para el tratamiento o la prevención del dolor. Se explica que esta terapia combinada permite una reducción de la dosificación de opiáceo para proporcionar el mismo nivel de alivio del dolor que una dosificación mucho más alta. Por tanto, esto puede ser útil en la reducción del nivel de efectos secundarios de los opiáceos en la terapia contra dolor, ya que las dosificaciones pueden reducirse.

35 El documento WO 05/061540 (Lay Line Genomics SpA) y Scuolo Intemazionale Superiore di Studi Avanzati-Sissa) describen un método para la humanización de anticuerpos en el que se utilizan los datos estructurales obtenidos de los estudios de cristalografía de llevar a cabo las primeras etapas de diseño de la humanización. Como ejemplos, el documento WO 05/061540 toma anticuerpos anti-TrkA, como los descritos en el documento WO 00/73344, y anticuerpos anti-NGF como puntos de partida y, a continuación, los rediseña utilizando el método descrito.

Si bien los anticuerpos humanizados descritos en el documento WO 05/061540 son útiles, existe una necesidad de proporcionar anticuerpos humanizados adicionales con el fin de ampliar las posibilidades de terapias eficaces.

45 Los autores de la presente invención han proporcionado ahora una serie de anticuerpos anti-TrkA y derivados de los mismos que no se describen en el documento WO 05/061540. Los autores de la presente invención también han proporcionado datos que indican la utilidad de tales anticuerpos. Antes de la presente invención, estos anticuerpos simplemente no eran conocidos en la técnica y no se podrían haber pronosticado los datos proporcionados.

De acuerdo con un aspecto de la presente descripción, se proporciona un anticuerpo anti-TrkA que comprende:

50 a) una cadena pesada variable que comprende una secuencia seleccionada de entre cualquiera de BXhVH1 (SEC ID NO: 1), BXhVH2 (SEC ID NO: 2), BXhVH3 (SEC ID NO: 3), BXhVH4 (SEC ID NO: 4), BXhVH5 (SEC ID NO 5), o HuVHWOv (SEC ID NO: 6), como se muestra en la Figura 1a; o entre variantes de cualquiera de dichas secuencias;

y/o

b) una cadena ligera variable que comprende una secuencia seleccionada de entre cualquiera de BXhVL1 (SEC ID NO: 7), BXhVL2 (SEC ID NO: 8), BXhVL3 (SEC ID NO: 9), BXhVL4 (SEC ID NO: 10), BXhVL5 (SEQ ID NO 11), BXhVL6 (SEC ID NO: 12), BXhVL7 (SEC ID NO: 13) o BXhVL8 (SEC ID NO: 14); como se muestra en la Figura 1b, o entre variantes de cualquiera de dichas secuencias.

5 También se proporciona un derivado de dicho anticuerpo, en donde el derivado es capaz de unirse a trkA.

Más preferiblemente, el anticuerpo comprende tanto una cadena pesada variable como se describe en el apartado a) anterior como una cadena ligera variable como se describe en el apartado b), es decir, comprende una de las siguientes combinaciones de cadenas ligeras y pesadas:

10 BXhVH1VL1, BXhVH1VL2, BXhVH1VL3, BXhVH1VL4, BXhVH1VL5, BXhVH1VL6, BXhVH1VL7, BXhVH1VL8,
 BXhVH2VL1, BXhVH2VL2, BXhVH2VL3, BXhVH2VL4, BXhVH2VL5, BXhVH2VL6, BXhVH2VL7, BXhVH2VL8,
 BXhVH3VL1, BXhVH3VL2, BXhVH3VL3, BXhVH3VL4, BXhVH3VL5, BXhVH3VL6, BXhVH3VL7, BXhVH3VL8,
 BXhVH4VL1, BXhVH4VL2, BXhVH4VL3, BXhVH4VL4, BXhVH4VL5, BXhVH4VL6, BXhVH4VL7, BXhVH4VL8,
 BXhVH5VL1, BXhVH5VL2, BXhVH5VL3, BXhVH5VL4, BXhVH5VL5, BXhVH5VL6, BXhVH5VL7, BXhVH5VL8,
 o HuVHWOv/HuVLWO.

15 Deseablemente, el derivado del anticuerpo tiene al menos una región CDR seleccionada entre las regiones subrayadas en las Figuras 1a y 1b para cada secuencia, o entre variantes de las mismas que tiene no más de dos cambios de aminoácidos (preferiblemente no más de un cambio de aminoácido) por región subrayada.

Más deseablemente, tiene una pluralidad de regiones CDR seleccionadas entre las regiones subrayadas en las figuras 1a y 1b para cada secuencia, o entre variantes de las mismo que tiene no más de dos cambios de aminoácidos (preferiblemente no más de un cambio de aminoácido) por región subrayada.

20 Por lo tanto, puede comprender una, dos, tres, cuatro, cinco o seis de tales regiones CDR (opcionalmente combinadas con una o más de otros regiones CDR diferentes).

Preferiblemente puede comprender al menos la tercera región CDR de la cadena pesada, más preferiblemente al menos la tercera región CDR de las cadenas pesada y ligera.

25 Muy deseablemente, sin embargo, tiene seis regiones CDR correspondientes a las seis regiones CDR subrayadas en las Figuras 1a y 1b para cada secuencia o correspondientes a las variantes de las mismas que tienen no más de dos cambios de aminoácidos por región subrayada.

30 De hecho, en la mayoría de los casos, se prefiere que se hayan realizado pocos o ningún cambio en las secuencias CDR. De este modo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, o incluso las seis regiones CDR pueden tener las mismas secuencias de aminoácidos que se muestran en las Figuras 1a y 1b.

Volviendo ahora a las regiones marco, se prefiere que el derivado tenga al menos una región de marco seleccionada entre las secuencias no subrayadas mostradas en las Figuras 1a y 1b o entre variantes de las mismas que tienen al menos 75% de identidad de secuencia de aminoácidos con la misma (por ejemplo, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% de identidad de secuencia con la misma).

35 El grado de identidad de secuencia de aminoácidos se puede determinar mediante alineamientos simples de las secuencias sin espacio alguno y determinando las diferencias de secuencia.

40 Las secuencias se pueden alinear de acuerdo con esquema de numeración de Kabat y a continuación se pueden determinar en consecuencia las identidades de secuencia (Véase Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda MD, 1987 y 1991). Este esquema de numeración se comenta en el documento WO 05/061540 (también se puede hacer referencia a Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196, 901 (1987) y a Chothia et al., Nature, 342, 878 (1989)).

Menos preferiblemente, se pueden permitir uno o más espacios (p. ej., para una o más inserciones/delecciones de aminoácidos) y después se pueden asignar penalizaciones para los espacios.

45 La identidad de secuencia se puede determinarse utilizando un programa de análisis de secuencia por ejemplo, BLASTN o BLASTP (disponible en www.Ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Los parámetros por defecto para la comparación de dos secuencias (por ejemplo, analizando por medio de "Blast" dos secuencias entre sí) mediante BLASTN (para secuencias de nucleótidos) son una recompensa para emparejamiento = 1, penalización para el emparejamiento erróneo = 2, para el espacio abierto = 5, la extensión del espacio = 2. Cuando se utiliza BLASTP para las secuencias de proteínas, los parámetros por defecto son una recompensa para el emparejamiento = 0, penalización para el emparejamiento erróneo = 0, para el espacio abierto = 11, y para la extensión del espacio = 1].

Más preferiblemente, se encuentra presente una pluralidad de regiones marco está presente y estas regiones se seleccionan entre secuencias subrayadas no mostradas en la Figura 1a y 1b o entre variantes de las mismas que tienen al menos 75% de identidad de secuencia de aminoácidos con las mismas (p. ej., al menos 80%, en menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% de identidad de secuencia).

5 Cada cadena mostrada en la Figura 1a y 1b tiene cuatro regiones marco. De este modo, se prefiere que estén presentes al menos dos, al menos tres o cuatro de tales regiones/variantes de las mismas.

Lo más preferiblemente, están presentes las cuatro regiones de marco o variantes de las mismas.

10 Cuando están presentes una o más regiones marco variantes, generalmente se prefiere que estas regiones no incluyan sustituciones de aminoácidos que darían como resultado un cambio de un aminoácido que está presente en una secuencia murina en la posición correspondiente.

15 Los aminoácidos murinos relevantes que se pueden utilizar para la comparación se muestran en mVHEP y mVLEP en las Figuras 1a y 1b, respectivamente, con la excepción de que, para los propósitos de esta discusión, los pocos aminoácidos en cursiva mostrados en mVHEP y mVLEP se consideran no murinos. En estas posiciones los residuos que se consideran murinos se proporcionan en la tabla siguiente, en el orden en el que los residuos en cursiva aparecen en las Figuras.

Posición	Residuo en cursiva mostrado en la Figura	Residuo murino correspondiente
Cadena pesada	M	V
Cadena pesada	Q	T
Cadena de Luz	D	Q
Cadena de Luz	S	T

De este modo, el porcentaje de humanización de una o más regiones marco se puede reducir por medio de sustituciones de aminoácidos que no aumentan necesariamente el porcentaje de residuos murinos presentes.

20 Estos pueden resultar de sustituciones conservativas de aminoácidos no murinos y/o sustituciones no conservativas no murinas.

Sin embargo las sustituciones conservativas son las más preferidas.

Los aminoácidos se pueden agrupar de la siguiente manera:

Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): M, A, V, L, I;

Grupo II (cadenas laterales hidrófilas neutras): C, S, T, N, Q;

25 Grupo III (cadenas laterales ácidas): D, E;

Grupo IV (cadenas laterales alcalinas): K, R;

Grupo V (residuos que influyen en la orientación de la cadena principal): G, P; y

Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): F, Y, W.

30 Las sustituciones de aminoácidos conservativas implican sustituciones entre aminoácidos de un mismo grupo, mientras que las sustituciones de aminoácidos no conservativas implican un intercambio entre miembros de diferentes grupos.

Independientemente de las secuencias que estén presentes en las diferentes regiones de las cadenas ligeras y/o pesadas, se prefiere que un anticuerpo o derivado de la presente invención tenga ciertas características funcionales.

35 Además de la unión a TrkA, se prefiere que un anticuerpo o derivado de la presente invención sea capaz de bloquear o reducir la unión del NGF a TrkA.

Preferiblemente, éste es capaz de bloquear o reducir una o más actividades biológicas que de otra forma serían inducidas por la unión del NGF al receptor TrkA.

De este modo, se prefiere que éste sea un antagonista de una o más de las actividades inducidas por la unión de NGF a TrkA (en lugar de un agonista). Así, los anticuerpos y derivados de los mismos de acuerdo con la invención evitan adecuadamente la activación funcional de TrkA. La inhibición de la activación funcional de TrkA por anticuerpos y derivados de los mismos puede conducir a analgesia *in vivo*.

5 Se pueden utilizar varios procedimientos de ensayo.

Un ensayo convencional es el clásico análisis *in vitro* PC12, en el que las células PC12 se incuban con NGF y los candidatos se evalúa para ver si son eficaces en la reducción de la extensión del crecimiento neurítico inducido por NGF. Este modelo se utilizó en el documento WO 00/73344, por ejemplo.

10 En otro análisis, los anticuerpos preferidos producen un valor DO450/630 nm de más de 0,1 en el análisis de unión TrkA-IgG ilustrado en la Figura 2. Más preferiblemente, el valor DO450/630 nm es mayor de 0,2. Lo más preferiblemente es mayor de 0,3.

15 En un análisis adicional, los anticuerpos o derivados de los mismos preferidos proporcionan un aumento de la tinción de FACS de células TF1 en un análisis basado en FACS descrito en los Ejemplos (véase la Tabla 2). Éste es preferiblemente un incremento de más de 1,0 veces. Más preferentemente, es un incremento de al menos 1,5 veces, al menos 2,0 veces o al menos 2,5 veces. Lo más preferiblemente es de al menos 3,0 veces.

Otros análisis incluyen análisis para la reducción del dolor, como se describe más adelante con respecto a los usos médicos de la presente invención (Es particularmente deseable para aplicaciones médicas que los anticuerpos/derivados de los mismos actúen como antagonistas en lugar de como agonistas con respecto a la respuesta de dolor).

20 Los anticuerpos/derivados deseados de la presente invención son selectivos ya que se unen con mayor afinidad a TrkA que a TrkB (Compárense las columnas en color negro y blanco en la Figura 2, por ejemplo).

Por ejemplo éstos tienen preferiblemente una afinidad de unión que es al menos 2 veces, al menos 4 veces, o al menos 6 veces más grande para TrkA que para TrkB.

25 Las altas afinidades de unión a TrkA con respecto a TrkB dan como resultado una mayor selectividad y un menor riesgo de efectos secundarios no deseados.

Las afinidades de unión se pueden analizar fácilmente mediante estudios de unión comparativos, tales como los ilustrados en la Figura 2.

Volviendo ahora a los anticuerpos altamente preferidos de la presente invención, éstos comprenden una de las siguientes combinaciones de cadenas ligera y pesada: BXhVH3VL3, BXhVH5VL1 o BXhVH5VL3.

30 Éstas proporcionaron los mejores resultados en el análisis ilustrado en la Figura 3.

Los derivados preferidos son los derivados de BXhVH3VL3, BXhVH5VL1 o BXhVH5VL3.

Se apreciará a partir de la discusión anterior que una amplia gama de anticuerpos y derivados de los mismos están dentro del alcance de la presente invención.

Estos tienen numerosas aplicaciones, incluyendo las descritas a continuación:

35 Aplicaciones médicas

Los anticuerpos o derivados de la presente invención pueden ser utilizados en medicina.

Se pueden ser utilizados para tratar diversos trastornos/afecciones, como se establece en diversas categorías a continuación.

40 La invención proporciona de este modo un método de tratamiento de las afecciones mencionadas a continuación, que comprende administrar a un sujeto, adecuadamente un sujeto mamífero, especialmente un sujeto humano, que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o derivado como se describe en la presente memoria de tal manera que la afección sea tratada de ese modo.

La invención también proporciona el uso de un anticuerpo o derivado como se describe en la presente memoria en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las afecciones mencionadas a continuación.

45 La invención también proporciona un kit de componentes que comprende un anticuerpo o derivado como se describe en la presente memoria junto con las instrucciones que dirigen el uso del mismo por un sujeto para el tratamiento de las afecciones mencionadas a continuación.

Aquí, el término "tratamiento" incluye el tratamiento terapéutico de un trastorno/afección existente. También incluye el tratamiento profiláctico. Se incluye, además, el alivio de uno o más síntomas adversos, incluso si un paciente no está curado de un trastorno/afección dados. Por ejemplo, el dolor puede aliviarse o reducirse.

Dolor

5 Un uso médico preferido es en el tratamiento del dolor.

De acuerdo la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor ("IASP") el dolor generalmente se define como "una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño tisular real o potencial o descrita en términos de tal daño o ambos". El elemento esencial en todas las formas de dolor es la activación de los receptores de umbral alto y fibras nerviosas especializados para advertir al organismo de los daños potenciales a los tejidos. La participación de las células y procesos inflamatorios es un elemento común en muchos estados de dolor. El término "dolor agudo" significa un dolor de umbral generalmente alto, inmediato, ocasionado por una lesión tal como corte, aplastamiento, quemadura, o estimulación química. El término "dolor crónico", según se utiliza en la presente memoria, significa dolor que no sea el dolor agudo, tanto de origen inflamatorio como neuropático. Se entiende que el dolor crónico a menudo es de duración relativamente larga, por ejemplo, meses o años y puede ser continuo o intermitente.

Los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse para tratar el dolor crónico o el dolor agudo.

Se prefiere el tratamiento del dolor crónico.

El uso de anticuerpos anti-TrkA en el tratamiento del dolor se comenta en los documentos WO 00/73344, WO 05/061540 y WO 06/131952 por ejemplo.

20 El dolor puede estar asociado por ejemplo con cualquiera de los siguientes: pancreatitis, cálculos renales, endometriosis, EII, enfermedad de Crohn, adherencias post-quirúrgicas, piedras de la vesícula biliar, dolor de cabeza, dismenorrea, dolor musculoesquelético, esguinces, dolor visceral, quistes en los ovarios, prostatitis, cistitis, cistitis intersticial, dolor post-operatorio, migraña, neuralgia del trigémino, dolor por quemaduras y/o heridas, dolor asociado con trauma, dolor neuropático, dolor asociado con enfermedades musculoesqueléticas, artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante, patologías periarticulares, dolor oncológico, dolor de metástasis óseas, infección por VIH.

Se conocen diferentes modelos para evaluar el dolor y se pueden utilizar en el escrutinio de anticuerpos/derivados de los mismos.

30 Por ejemplo, se puede utilizar la prueba de la placa caliente de nocicepción, como se describe en el documento WO 00/73344, por ejemplo. El experimento se puede llevar a cabo de acuerdo con McMahon et al., Nature Medicine, 1, 774-780 (1995) utilizando el anticuerpo/derivado como inmunoadhesina. El anticuerpo/derivado se infunde por ruta subcutánea en la pata trasera de una rata adulta durante un período de tres semanas o por medio de una mini-bomba osmótica. Se evalúa sensibilidad de la nocicepción a intervalos utilizando una prueba de placa caliente (Eddy y Leimbach, J. Phar. Exp. Ther., 107, 385-393 (1953)), que imita situaciones de hiperalgesia después de la inflamación o daño parcial del nervio. El estímulo nociceptivo induce en este caso una respuesta (lamedura de la pata y/o saltos) que supone una coordinación integrada mayor que el simple reflejo. De acuerdo con la prueba el animal se pone en una pluma que tiene una placa calentada a la temperatura deseada como base, por lo general 56°C. La latencia de cualquiera de las dos respuestas (lamedura de la pata y salto) se mide en animales de control (tratados con anticuerpo no relevante) y en los tratados con el anticuerpo/derivado anti-TrkA.

40 Como una alternativa a la prueba de la placa caliente, se puede evaluar la respuesta nociceptiva a la formalina. Esta prueba es descrita por Porro y Cavazzuti en Prog. Neurobiol., 41:565-607 (1993) y se utilizó en el documento WO 06/137106. Se trata de la evaluación de la reducción de la respuesta al dolor mediante el análisis de cualquier reducción posterior de la lamedura de la pata cuando se administra un candidato determinado antes de la prueba. Típicamente se utiliza solución salina se utiliza como control negativo.

45 El modelo de lesión por constricción crónica (CCI) es también un modelo animal bien conocido. Implica la constricción crónica del nervio ciático y se utiliza para la evaluación del dolor crónico de naturaleza neuropática. Este modelo es descrito por Bennett y Xie en Pain, 33, 87-107 (1988). Se utiliza en el documento WO 06/131592, por ejemplo.

Cáncer

50 Los anticuerpos/derivados también se pueden utilizar en el tratamiento del cáncer.

Varios tipos de cáncer expresan TrkA. La interacción de TrkA con NGF puede estar implicada en el desarrollo del tumor (por ejemplo, de cánceres de próstata y páncreas). De hecho, en ciertas formas de cáncer, un exceso de NGF puede facilitar el crecimiento y la infiltración de las fibras nerviosas. Mediante el bloqueo de la acción de NGF es posible reducir significativamente la formación de neuromas.

Además, como alternativa a la simple provisión de un efecto de bloqueo, los anticuerpos/derivados se pueden acoplar a un agente citotóxico y se pueden utilizar para dirigirse a las células cancerosas que expresan TrkA, como se comenta más adelante con más detalle.

- 5 No obstante, es necesario acoplar los anticuerpos/derivados a las toxinas. La ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) se presenta debido a una respuesta inmunitaria en la que los anticuerpos/derivados, recubriendo las células diana, pueden hacerlas vulnerables al ataque por el sistema (por ejemplo, por las células T, por la activación del complemento, etc.).

Trastornos neuronales

Los anticuerpos/derivados también se pueden utilizar en el tratamiento de diversos trastornos neuronales.

- 10 Como se indicó anteriormente los anticuerpos/derivados se pueden utilizar para reducir la formación de neuromas.

- También se pueden utilizar en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos. Como se discutió anteriormente, el NGF tiene un uso potencial en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, pero tiene propiedades agonísticas no deseadas, incluyendo un aumento en la sensibilidad al dolor. Los anticuerpos/derivados de la presente invención pueden ser útiles en tales tratamientos para reducir los efectos agonísticos no deseados del NGF (véase también la sección de "terapia combinada" más abajo).
- 15

Además, los anticuerpos/derivados se pueden utilizar para tratar el dolor neuropático, como se discutió anteriormente. Éste puede estar asociado con una lesión o una disfunción del sistema nervioso.

Trastornos inflamatorios

Una aplicación adicional es en el tratamiento de trastornos inflamatorios.

- 20 El NGF es liberado por los mastocitos, fibroblastos y otros tipos celulares en los sitios periféricos en los que se producen los procesos inflamatorios. En particular, los mastocitos parecen desempeñar un papel fundamental. Producen NGF y al mismo tiempo expresan los receptores TrkA funcionales en su superficie. El sistema de NGF/TrkA parece mediar la activación de los mastocitos a través de un mecanismo autocrino de retroalimentación positiva que permite la amplificación local de la señal inflamatoria alérgica. Los ejemplos de trastornos inflamatorios que se pueden tratar incluyen formas inflamatorias de las rutas urinarias y de la región pélvica, la osteoartritis, la artritis reumatoide, el asma.
- 25

Otros trastornos

- Como se discutió anteriormente, el NGF tiene un uso potencial en el tratamiento de la diabetes y la lepra, pero tiene propiedades agonísticas no deseadas, incluyendo un aumento en la sensibilidad al dolor. Los anticuerpos/derivados de la presente invención pueden ser útiles en tales tratamientos para reducir los efectos agonísticos no deseados del NGF (véase también la sección de "terapia combinada" más abajo).
- 30

Terapia combinada

- Los anticuerpos o derivados de los mismos de la presente invención se pueden utilizar junto con uno o más de otros agentes activos en la terapia combinada. Se pueden utilizar para la administración simultánea, secuencial o concertada en medicina.
- 35

Por ejemplo, el anticuerpo o derivado se pueden combinar con un analgésico opiáceo. En el documento WO 06/137106 explica que pequeñas cantidades de moléculas capaces de bloquear la actividad biológica de TrkA pueden potenciar los efectos analgésicos de los opiáceos.

- 40 Tales opiáceos incluyen uno o más compuestos seleccionados de entre los siguientes: morfina, codeína, dihidrocodeína diacetilmorfina, hidrocodona, hidomorfona, levorfanol, oximorfona, alfentanilo, buprenorfina, butorfanol, fentanilo, sufentanilo, meperidina, metadona, nabulfina, propoxifeno, pentazocina, y sus derivados farmacéuticamente aceptables (p. ej., sus sales farmacéuticamente aceptables).

Alternativamente, el anticuerpo o derivado se pueden utilizar en una terapia combinada con uno o más analgésicos no opiáceos.

- 45 Una combinación adicional es la del anticuerpo o derivado con NGF. Como se discutió anteriormente, se ha propuesto el uso de NGF en el tratamiento de diversos trastornos, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la diabetes mellitus, la lepra, etc., pero se han observado aumentos de la sensibilidad al dolor derivados de las propiedades agonísticas hacia dianas periféricas. Una vez más, mediante el uso de un anticuerpo o derivado de la presente invención, se puede reducir la sensibilidad al dolor, haciendo de ese modo las terapias basadas en NGF más atractivas.
- 50

Una combinación adicional es la de uno o más anticuerpos o derivados de la presente invención junto con uno o más de otros anticuerpos. Una combinación preferida es con uno o más de otros anticuerpos anti-TrkA o anti-NGF. Tales combinaciones pueden proporcionar una mayor eficacia en el tratamiento de uno o más de los trastornos discutidos en la presente memoria, con respecto al tratamiento con un único anticuerpo. Por ejemplo se pueden utilizar combinaciones de dos o más anticuerpos que se ha encontrado que están entre los más eficaces en los procedimientos de análisis usados en la presente memoria.

Composiciones farmacéuticas, vehículos y rutas de administración

Los anticuerpos/derivados de la presente invención se pueden administrar por cualquier ruta apropiada.

Ésta incluye (pero no se limita a) la administración intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intratraqueal, oral, entérica, parenteral, intranasal o dérmica.

Por lo tanto la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o derivado del mismo junto con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptables.

Los anticuerpos/derivados típicamente se pueden administrar para la aplicación local mediante inyección (intraperitoneal o intracraneal típicamente en un ventrículo cerebral o intrapericárdica o intrabursal) de formulaciones líquidas o mediante ingestión de formulaciones sólidas (en forma de píldoras, comprimidos, cápsulas) o de formulaciones líquidas (en forma de emulsiones y soluciones).

Las composiciones para administración parenteral comprenden normalmente una disolución de inmunoglobulina disuelta en una disolución compatible, preferiblemente acuosa. La concentración del anticuerpo/derivado en estas formulaciones puede variar de menos de 0,005% a 15-20% p/v. Ésta se selecciona principalmente en función de los volúmenes del líquido, la viscosidad, etc., y de acuerdo con el modo de administración particular deseado. Alternativamente, los anticuerpos/derivados se pueden preparar para la administración en forma sólida. Los anticuerpos se pueden combinar con diferentes sustancias inertes o excipientes, que pueden incluir ligandos tales como celulosa microcristalina, gelatina o goma arábiga; receptores tales como lactosa o almidón, agentes tales como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio, dióxido de silicio coloidal; edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; o aromas, tales como menta y salicilato de metilo. Otros sistemas de administración farmacéutica incluyen hidrogel, hidroximetilcelulosa, liposomas, microcápsulas, microemulsiones, microesferas, etc.

Las inyecciones locales directamente a un sitio afectado por un trastorno/próximo a éste es un modo preferido de administración si un trastorno está localizado.

En contraste con las terapias basadas en anti-tumorales, el documento WO 06/131952 discute el uso de varios anticuerpos anti-TrkA en el tratamiento del dolor.

Aquí se explica que los anticuerpos anti-TrkA son administrados adecuadamente por la ruta sistémica. La administración sistémica se puede llevar a cabo mediante inyección, p. ej., infusión continua intravenosa, infusión intravenosa en embolada, inyección subcutánea o intramuscular. Alternativamente, también se pueden utilizar otras formas de administración (por ejemplo oral, mucosal, por medio de inhalación, por la ruta sublingual, etc.).

Si se desea, sin embargo, la liberación del anticuerpo/derivado puede realizarse mediante administración local (por ejemplo, inyección intraarticular o inyección subcutánea, intramuscular) en las proximidades de los tejidos afectados.

El anticuerpo/derivado anti-TrkA se formulará adecuadamente en una composición farmacéutica apropiada para la ruta de administración prevista. Las disoluciones para inyectables contendrán adecuadamente el anticuerpo/derivado disuelto o dispersado en un medio acuoso (por ejemplo, agua para inyectables) apropiado, que contenga tampones y modificadores de molaridad apropiados (por ejemplo, fosfato, sal y/o dextrosa).

El régimen de tratamiento (es decir, dosis, programa y repetición), puede estar representado por las administraciones individuales o repetidas (por ejemplo, inyecciones) del producto, por medio de la ruta de administración seleccionada.

El intervalo de administración de la dosis puede estar sujeto a modificaciones dependiendo del grado y la duración de la respuesta clínica, así como del individuo concreto y de la historia clínica individual.

Adecuadamente, el anticuerpo/derivado anti-TrkA tiene una larga duración de la acción. En particular, el efecto clínico del anticuerpo después de la administración puede ser tan largo como 21 días determinados a partir de estudios en animales. Además, los anticuerpos/derivados anti-TrkA puede manifestar beneficios clínicos durante un período más largo que aquel en el que su presencia puede ser detectada en una matriz biológica relevante, tal como suero o plasma después de su administración.

A la luz de la larga duración de acción pretendida (es decir, un efecto adecuadamente duradero de al menos una semana, o preferiblemente al menos dos semanas, p. ej., al menos tres semanas, o al menos cuatro semanas), de manera adecuada el anticuerpo/derivado puede ser administrado a sujetos a una frecuencia de no más de una vez

por semana, p. ej., no más de una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas.

Una dosis diaria adecuada del anticuerpo/derivado anti-TrkA variará típicamente de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal.

- 5 (En el documento WO 06/131592 se informa de que utilizando anticuerpos anti-TrkA humanizados y un modelo de CCI se observaron propiedades analgésicas significativas en los animales de experimentación a una dosis de 2 mg/kg, aunque por supuesto pueden ser preferidas dosis inferiores para los seres humanos).

10 Volviendo ahora a la administración con respecto a los tumores, la administración puede ser a través de inyección directa y localizada en un tumor o un tejido próximo al sitio del tumor. Para la administración sistémica, las dosificaciones varían de 0,05 mg/kg por día a 500 mg/kg por día, aunque se prefieren dosificaciones en la región inferior del intervalo debido a que son más fáciles de administrar. Las dosificaciones se pueden calibrar, p. ej., para que garanticen un nivel concreto en el plasma del anticuerpo/derivado (en el intervalo de aproximadamente 5-30 mg/ml, preferiblemente entre 10-15 mg/ml) y mantener este nivel durante un período de tiempo determinado hasta que se consiguen los resultados clínicos.

15 Los métodos eficaces para medir o evaluar la fase de los tumores pancreáticos o prostáticos se basan en la medición del antígeno específico de la próstata (PSA) en sangre, en la medición del tiempo de supervivencia para los tumores de páncreas, en la medición de la disminución o inhibición de la difusión para las metástasis en el caso de ambos tipos de tumores.

20 Para la inyección directa al nivel de un sitio del tumor, la dosificación depende de diferentes factores, incluyendo el tipo, la fase y el volumen del tumor, junto con muchas otras variables.

Dependiendo del volumen del tumor, las dosis terapéuticas típicas pueden variar de inyecciones de 0,41 mg/ml a 10 mg/ml que pueden administrarse con la frecuencia necesaria.

25 Cualquiera que sea la naturaleza de la terapia, los anticuerpos/derivados humanizados se pueden eliminar mucho más lentamente y requieren dosificaciones más bajas para mantener un nivel eficaz en el plasma que los anticuerpos no humanizados. Por otra parte, con anticuerpos/derivados de alta afinidad, la administración puede ser menos frecuente y menos importante que con los anticuerpos que tienen menor afinidad.

La dosificación terapéuticamente eficaz de cada anticuerpo/derivado puede ser determinada durante el tratamiento por un médico experto. Si fuera necesario, las dosificaciones se pueden reducir (p. ej., para reducir los efectos secundarios) o aumentar (para aumentar la actividad).

30 Antes de la administración, las preparaciones de los anticuerpos/derivados de la invención se pueden almacenar congelándolas o liofilizándolas. Estas se pueden reconstituir inmediatamente antes del uso en un tampón adecuado. Dado que la liofilización y la reconstitución pueden dar como resultado una pérdida de actividad, los niveles de la administración de anticuerpos pueden ser calibrados para compensar este hecho. (Para las inmunoglobulinas convencionales, los anticuerpos IgM tienden a tener una mayor pérdida de actividad que los anticuerpos IgG).
35 También se puede asignar una vida útil de manera que los anticuerpos/derivados no se utilicen después de un cierto período de almacenamiento.

Aplicaciones de diagnóstico y pronóstico

Un anticuerpo o derivado del mismo de la presente invención se pueden utilizar en la diagnosis o prognosis de cualquiera de las enfermedades/afecciones comentadas anteriormente en relación con los usos médicos.

40 Por ejemplo, se puede utilizar para facilitar la detección de marcadores tumorales positivos para TrkA, como un marcador precoz de la insurgencia de la enfermedad de Alzheimer, etc.

También puede ser utilizado en el diagnóstico de la CIPA ("insensibilidad congénita al dolor con anhidrosis"). Esta es un síndrome autosómico, recesivo, hereditario caracterizado por fiebre episódica, recurrente, anhidrosis, ausencia de reacción a estímulos nociceptivos, retraso mental y una tendencia a la automutilación. Es el resultado de mutaciones en el gen TrkA. De hecho, un anticuerpo o derivado de la presente invención se pueden utilizar en el diagnóstico o pronóstico de una amplia gama de afecciones que implican la expresión aberrante de TrkA (en comparación con la expresión de TrkA en un individuo sano o una muestra de tejido sano).
45

Por consiguiente, la presente invención incluye dentro de su alcance un método que comprende obtener una muestra biológica obtenida de un paciente y poner en contacto la muestra con un anticuerpo o derivado de la presente invención.
50

Si se desea, el anticuerpo/derivado se puede inmovilizar. Se puede proporcionar en la forma de un kit de diagnóstico.

El método puede incluir en ese caso analizar la unión del anticuerpo/derivado a dicha muestra de una manera cuantitativa o cualitativa. Si se desea, esto se puede realizar con referencia y/o con respecto a un control positivo (que indica un buen estado de salud) o un control negativo (que indica la presencia/probabilidad de un trastorno).

5 Para fines de diagnóstico, los anticuerpos/derivados pueden estar ambos marcados con un marcador detectable o puede no estar marcados. (El término "marcador" se utiliza en la presente memoria para incluir marcas o cualquier otro radical detectable/resto que pueda desencadenar un cambio detectable.)

Se pueden utilizar anticuerpos no marcados combinados con otros anticuerpos marcados (anticuerpos secundarios), que son reactivos frente a anticuerpos humanizados, o humanos (por ejemplo, anticuerpos específicos para regiones constantes de inmunoglobulinas humanas).

10 Alternativamente, los anticuerpos pueden ser marcados directamente. Se puede utilizar una amplia variedad de marcadores, p. ej., radionúclidos, fluoróforos, colorantes, enzimas, sustratos enzimáticos, factores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, ligandos, etc.

15 En particular, para aplicaciones de formación de imágenes de diagnóstico o pronóstico, se conjuga un agente detectable con el anticuerpo que es detectable o está marcado con un radioisótopo detectable (p. ej. un radioisótopo tal como de yodo, indio, tecnecio) o en forma paramagnética (con átomos o iones paramagnéticos, tales como elementos de transición, actínidos y tierras raras, en particular, manganeso II, cobre II y cobalto II).

20 Los procedimientos de formación de imágenes pueden implicar la, inyección intravenosa, intraperitoneal o subcutánea (en las regiones de drenaje linfático para identificar metástasis de ganglios linfáticos) y pueden utilizar detectores de emisiones de radionúclidos (tales como contadores de centelleo β) en el caso de la inmunogammagrafía.

Si en lugar de eso se utiliza un marcaje paramagnético, se puede utilizar un espectrómetro de RMN.

Otras aplicaciones

Los anticuerpos/derivados de los mismos se pueden utilizar como puntos de partida para desarrollar anticuerpos adicionales. De este modo, se pueden utilizar como herramientas de diseño.

25 Se pueden escrutar mediante uno o más análisis de unión/funcionales y por lo tanto pueden ser parte de un programa de desarrollo de fármacos.

Se pueden utilizar para la tipificación de tejidos, para estudios forenses, etc.

Se pueden utilizar como herramientas de investigación

30 Por ejemplo, se pueden utilizar para la investigación adicional sobre TrkA y/o sobre trastornos en los que puede estar implicada la unión de TrkA a NGF (u otros agentes de unión a TrkA). Se pueden utilizar para estudiar la unión y/o activación.

Todas las aplicaciones anteriores de los anticuerpos/derivados están dentro del alcance de la presente invención.

Naturaleza de los anticuerpos y derivados de anticuerpos

35 Se apreciará a partir de la descripción anterior que se puede utilizar una amplia gama de anticuerpos y derivados de los mismos en la presente invención.

Para evitar dudas, los términos "anticuerpos" y "derivados de anticuerpo" se discuten a continuación con más detalle.

Anticuerpos

40 Los anticuerpos de la presente invención pueden estar en la forma de cualquier estructura de inmunoglobulina deseada.

Sin embargo se prefieren la IgG y la IgM, siendo la IgG la más preferida. De las isoformas de IgG, se prefiere la IgG1, pero se pueden utilizar otras formas incluyendo IgG4.

45 Los anticuerpos son quiméricos, es decir, incluyen una o más regiones que normalmente no se asocian entre sí en la naturaleza. Más específicamente, están presentes una o más regiones CDR de origen murino en los anticuerpos, pero otras regiones (regiones especialmente constantes) son preferiblemente humanas o humanizadas.

Las regiones humanizadas tienen más residuos en común con una región de inmunoglobulina humana dada que con una región de inmunoglobulina de ratón correspondiente. Preferiblemente, tienen al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% de identidad con la región humana al nivel de la

secuencia de aminoácidos. Más preferiblemente, hay 100% de identidad de secuencia a lo largo de una o más regiones distintas de CDR (p. ej. regiones constantes).

En algunos casos, sin embargo, puede ser beneficioso introducir ciertos cambios.

Por ejemplo, puede ser deseable introducir cambios que previenen/reducen uno o más de los siguientes:

- 5 a) activación del sistema del complemento
- b) lisis mediada por complemento
- c) activación de células T
- d) unión a un receptor de Fc.

10 Las mutaciones que se indica que permiten una más de las anteriores se pueden lograr como se comenta en diferentes patentes. Por lo tanto, una o más de dichas mutaciones se pueden estar incluidas en los anticuerpos/derivados de la presente invención.

Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.194.551 propone sustituciones de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 322, 329 y/o 331 (utilizando el sistema de numeración de Kabat) de la región de la cadena pesada constante de la molécula de IgG y sugiere que se pueden utilizar para prevenir/reducir la activación no deseada del sistema del complemento anulando la unión de Fc a Clq (véase también Ward y Ghetie, Therapeutic Immunology 2: 77-94 (1995)). La Patente de los Estados Unidos Núm. 6.194.551 explica que la prolina está conservada en la posición 329 en la IgG humano. Este residuo (que está glicosilado y pueden de este modo estar implicado en la activación del sistema del complemento) se reemplaza preferiblemente por alanina. Sin embargo, se contempla la sustitución por cualquier otro aminoácido, p. ej., serina, treonina, asparragina, glicina o valina. La Patente de los Estados Unidos Núm. 6.194.551 explica que la prolina también está conservada en la posición 331 en la IgG1, IgG2 e IgG3 humana, pero no en la IgG4, (que tiene un residuo de serina en la posición 331). El residuo 331 es reemplazado preferiblemente por alanina u otro aminoácido, p. ej., serina (para las regiones de IgG distintas de IgG4), glicina o valina. Otra posibilidad comentada es la introducción de sustituciones en la posición 322. La lisina 322 está conservada en las IgG humanas, y se dice que este residuo es reemplazado preferiblemente por un residuo de alanina, aunque se contempla una sustitución con cualquier otro residuo de aminoácido (p. ej. serina, treonina, glicina o valina).

La Patente de los Estados Unidos Núm. 6.491.916 describe que las mutaciones en la región que abarca aproximadamente de la posición 230 a aproximadamente la posición 240 de un anticuerpo humanizado puede producir ventajas concretas. Aquí se explica que las comparaciones de anticuerpos que se unen a Fc con los que no se unen a Fc sugieren que los cambios en esta región dan como resultado anticuerpos anti-CD3 que no activan las células T. Por ejemplo, algunos de los anticuerpos preferidos comprenden una mutación en la posición 234, en la posición 235, o en ambas. Se espera que los anticuerpos anti-CD3 que comprenden una, dos, tres, cuatro, cinco, o más mutaciones en una o más de las posiciones 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, o 240, tengan ventajas. Esta patente describe también que un anticuerpo que tiene una región Fc de IgG1 y mutada para que tenga alanina en ambas posiciones 234 y 235 no se une al componente Clq del complemento e inicia la cascada mediada por el complemento. Adicionalmente, se explica que la mutación Lys 320 por Gln tiene una afinidad por Clq sólo ligeramente más débil que el tipo salvaje, pero no es lítica.

La Patente de los Estados Unidos Núm. 5.624.821 describe que mediante el cambio de uno cualquiera de los residuos 318 (Glu), 320 (Lys) y 322 (Lys), por Ala, es posible anular la unión a Clq. Se señala que no es necesario reemplazar los residuos iónicos solo por Ala para anular la unión a Clq, sino que también será posible utilizar otros residuos no iónicos sustituidos con alquilo, tales como Gly, Ile, Leu o Val, o residuos no polares aromáticos tales como Phe, Tyr, Trp y Pro en lugar de uno cualquiera de los tres residuos con el fin de anular la unión a Clq. También será posible utilizar residuos no iónicos polares tales como Ser, Thr, Cys, y Met en lugar de los residuos 320 y 322, pero no 318, con el fin de anular la actividad de unión a Clq. La Patente de los Estados Unidos Núm. 5.624.821 describe adicionalmente que la sustitución del residuo 297 (Asn) por Ala da como resultado la eliminación de la actividad lítica si bien solo reduce ligeramente (aproximadamente tres veces más débil) la afinidad por Clq. Esto explica que se piense que esto surge debido a que la alteración destruye el sitio de glicosilación y que se requiere la presencia de hidratos de carbono para activación del complemento. Esto apunta a que cualquier otra sustitución en este sitio también destruirá el sitio de glicosilación. La Patente de los Estados Unidos Núm. 5.624.821 también describe que las mutaciones en sitios adyacentes o próximos en la región conectora bisagra (p. ej. sustitución de los residuos de 234, 236 o 237 por Ala) indican que las alteraciones en los residuos 234, 235, 236 y 237, afectan al menos a la afinidad por el receptor R1 gamma de Fc.

Por supuesto, se pueden incorporar cambios de uno o más aminoácidos (típicamente cambios de aminoácidos conservativos) que no afecten sustancialmente a las propiedades biológicas. Las mutaciones posibles por lo tanto, no están restringidas a las comentadas anteriormente.

Se pueden proporcionar anticuerpos de cualquier naturaleza en forma monoclonal (es decir, combinados con anticuerpos idénticos) o en forma policlonal (es decir, combinados con anticuerpos diferentes). Los hibridomas capaces de producir anticuerpos monoclonales de la presente invención también están dentro del alcance de la presente invención.

5 Derivados de anticuerpos

Se pretende que el término "derivados de anticuerpos" permita una amplia gama de cambios estructurales que se pueden realizar en relación a un anticuerpo, siempre que se conserven las propiedades funcionales deseadas.

De este modo, por ejemplo, es deseable conservar la afinidad de unión a TrkA.

10 Preferiblemente, los derivados son también eficaces en uno o más de los análisis funcionales descritos en la presente memoria.

Para evitar dudas, se considera que todos los siguientes son derivados de un anticuerpo de la presente invención:

- a) un fragmento de dicho anticuerpo
- b) un multímero que comprende una pluralidad de fragmentos de dicho anticuerpo (referido en la presente memoria como un " multímero de fragmentos")
- 15 c) un producto de fusión de dicho anticuerpo, fragmento o multímero de fragmentos y otro radical
- d) una variante de dicho anticuerpo, fragmento, multímero fragmentos, o producto de fusión, que tiene al menos 75% de identidad de secuencia con los mismos.

De este modo, el término "derivado" se interpreta en sentido amplio.

20 Volviendo ahora a los fragmentos de la presente invención, estos tienen preferiblemente al menos siete aminoácidos de longitud (Por lo tanto son al menos tan largos como la región CDR más corta mostrada en las Figuras 1a y 1b para las cadenas pesada y ligera de la presente invención). Más preferiblemente, tienen al menos diez, al menos quince, o al menos veinte aminoácidos de longitud.

25 Estos pueden ser producidos, por medio de digestión proteolítica a partir de anticuerpos intactos o por medio de inserción de codones de terminación en las posiciones deseadas en vectores que portan las secuencias de ADN codificantes para las regiones variables de la cadena pesada y ligera. Esto se puede realizar después de la región CH₁ para producir fragmentos Fab o después de la región bisagra para producir fragmentos F(ab')₂.

30 Los derivados en la forma de cadenas de ScFv se pueden obtener a través de la unión de regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera por medio de un conector (Huston et al, PNAS, 85, 5879 (1988); Bird et al, Science, 242 423 (1988)). Los fragmentos Fv o Fab pueden ser expresados en E. coli (Buchner y Rudolph, Bio/Technology, 9, 157 (1991); Skerra et al., Bio/Technology, 9, 273 (1991)) o también en células eucariotas, preferiblemente derivadas de mamífero.

En efecto, es posible una muy amplia gama de formas de fragmentos, incluyendo los descritos por Holliger y Hudson en Nature Biotechnology, Vol. 23, Núm. 9, 1126-1136 (2005).

35 Todos estos están dentro del alcance de la presente invención. Estos pueden incluir fragmentos que consisten en cadenas VH o VL individuales (a veces conocidas como "anticuerpos de dominio" o "dAb") o incluso fragmentos de dichas cadenas (p. ej. regiones CDR individuales). También están incluidas las formas multiméricas, tales como minicuerpos, bis (o superior)-ScFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, multímeros Fab, etc. (referidos en la presente memoria como "multímeros de fragmentos").

40 Además, varios otros residuos se pueden conectar covalentemente con los anticuerpos/fragmentos de la presente invención con el fin de proporcionar propiedades beneficiosas. Tales "productos de fusión" están dentro del alcance de los derivados de la presente invención. El radical puede ser por ejemplo un agente de diagnóstico, un agente terapéutico, un agente marcador, un agente que aumenta la vida media del producto, o un agente que reduce la inmunogenicidad (preferiblemente en un anfitrión humano).

45 Por ejemplo, se pueden proporcionar productos de fusión en la forma de anticuerpos/fragmentos PEGilados. El PEG se ha usado predominantemente para reducir la inmunogenicidad y aumentar las vidas medias circulantes de los anticuerpos. También puede tener un efecto beneficioso sobre el uso de anticuerpos en ciertos entornos clínicos, tales como la elección de tumores como diana.

Las partes de un producto de fusión se pueden conectar entre sí químicamente. Por ejemplo, esto se puede realizar mediante unión cruzada utilizando agentes heterobifuncionales (p. ej. SPDP, carbodiimida, glutaraldehído, etc.).

En el caso de las proteínas de fusión, estas se elaboran preferiblemente utilizando técnicas de ingeniería genética. De este modo, se pueden proporcionar secuencias codificantes apropiadas basadas en el código genético que codifican la proteína de fusión deseada y, a continuación se pueden clonar en una célula anfitriona utilizando un vector de expresión adecuado. La expresión puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o inducible. La proteína de fusión expresada se puede purificar utilizando técnicas convencionales (p. ej. mediante el uso de procedimientos de inmunoafinidad). Se pueden utilizar sistemas de expresión basados en células o libres de células.

Las proteínas de fusión pueden comprender, p. ej. anticuerpos/fragmentos de la presente invención fusionados a citotoxinas. Las proteínas de fusión resultantes se pueden utilizar a continuación para dirigirse a las células que expresan los receptores TrkA, p. ej., células tumorales que expresan TrkA.

La producción de diversas inmunotoxinas citotóxicas es referida por Thorpe et al, *Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*, Academic Press, 168 (1982). De hecho, un gran número de agentes citotóxicos son adecuados para su uso en inmunotoxinas. Tales agentes incluyen radionúclidos, tales como yodo 131 u otros isótopos de yodo, itrio 90, renio 188 y bismuto 212 u otros isótopos que emiten partículas alfa, un gran número de fármacos quimioterapéuticos, tales como vindesina, metotrexato, adriamicina y cisplatino; proteínas citotóxicas, tales como proteínas que inhiben ribosomas (p. ej. proteína antiviral de fitolaca, exotoxina A de *Pseudomonas*, toxina de la difteria, ricina A y clavina de origen vegetal), o agentes activos a nivel de la superficie celular (p. ej. enzimas fosfolipasa tales como Fosfolipasa C).

A veces, la región citotóxica de la inmunotoxina puede ser inmunogénica y por lo tanto limitar la utilidad clínica de la proteína de fusión en el caso de la terapia crónica o a largo plazo.

Una alternativa para evitar el problema de la inmunogenicidad es expresar en fusión con el dominio de unión del anticuerpo/derivado una proteína capaz de interactuar con el ADN y unir a esta proteína de fusión el vector (p. ej. plásmido) que contiene la casete de expresión de la toxina. Las numerosas cargas positivas de protamina, una proteína humana que se une al ADN, pueden interactuar de manera estable con las cargas negativas del ADN, generando un compañero de fusión para el anticuerpo/derivado de carga neutra. Éste es mucho más estable y menos inmunogénico que la propia toxina. Después de la internalización del complejo de anticuerpo-vector a través de endocitosis mediada por receptores, la expresión de la toxina ocasiona la muerte de la célula.

Por otra parte, si se desea, se pueden proporcionar promotores inducibles o específicos de células en el casete de expresión de la toxina. Este enfoque está orientado a maximizar la eliminación selectiva de las células tumorales, a la vez que se minimizan los efectos secundarios de la toxicidad (Chen et al, *Gene Ther.*, 2, 116 (1995)).

Las proteínas de fusión también pueden incluir fusiones con otros anticuerpos/derivados. Por ejemplo las fusiones de DABS a antígenos específicos con otros DABS capaces unirse a proteínas de suero de larga duración (p. ej. albúmina de suero) se han utilizado para aumentar la vida media en suero.

Las secuencias de la cadena pesada y ligera variables de la presente invención pueden formar parte de anticuerpos multivalentes que tienen especificidad para uno o más antígenos, uno de los cuales es TrkA, o uno o más epítomos dentro de TrkA.

Los anticuerpos multivalentes con especificidad para uno o más antígenos, uno de los cuales es TrkA

Sistemas de expresión

Muchos sistemas de expresión se pueden utilizar para proporcionar anticuerpos/derivados de la presente invención.

Por ejemplo, se pueden utilizar sistemas procarióticos y están bien caracterizados.

E. coli es uno de los anfitriones procarióticos que es particularmente útil para la clonación de las secuencias de ADN de la presente invención. Por otra parte, está disponible un gran número de promotores bien caracterizados, p. ej., del operón *lac* o *trp* o de la β -lactamasa o del fago λ . Típicamente, estos promotores controlan la expresión y portan sitio de unión para el ribosoma, para el correcto inicio y terminación de la transcripción y la traducción. Es posible aumentar la vida media de las inmunoglobulinas humanizadas de la invención producidas en sistemas procarióticos mediante conjugación con polietilenglicol (PEG).

Se pueden utilizar para la expresión otros organismos unicelulares, tales como las levaduras. El anfitrión de elección es *Saccharomyces*, que utiliza portadores adecuados provistos de control de la expresión, terminación de la replicación y secuencias de origen.

Se ha informado sobre bibliotecas de presentación de fagos que portan secuencias de las regiones variables de las inmunoglobulinas y se pueden utilizar en estudios de unión [Cesareni, *FEBS Letts*, 307, 66 (1992); Swimmer et al. *PNAS*, 89, 3756 (1992); Gram et al. *PNAS*, 89, 3576 (1992); Clackson et al. *Nature*, 352, 624 (1991); Scott y Smith, *Science*, 249, 386 (1990); Garrard et al. *Bio/Techniques*, 9, 1373 (1991)].

También se pueden utilizar cultivos de células de insecto, típicamente utilizando células S2 de *Drosophila* transfectadas en forma estable o células de *Spodoptera frugiperda* con el sistema de expresión basado en baculovirus (Putlitz et al. Bio/Technology, 8, 651 (1990)).

5 Incluso se puede utilizar plantas y cultivos de células vegetales, (Larrick y Fry, Hum. Antibodies Hybridomas, 2, 172 (1991); Benvenuto et al. Plant Mol. Biol., 17 865 (1991); Durin et al. Plant Mol. Biol., 15281 (1990); Hiatt et al. Nature, 342, 76 (1989))

10 También es posible utilizar cultivos de tejidos de células de mamífero para expresar los polipéptidos de la presente invención. Esto puede ser ventajoso en la obtención de patrones de glicosilación humanos. Se pueden expresar los diferentes isotipos. Se ha demostrado que IgG1 es el isotipo más eficaz en la inducción de la respuesta inmunitaria (Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N. Y., (1987)), mientras que IgG4 se utiliza a menudo para aplicaciones de diagnóstico (Riechmann et al., Nature, 332, 323 (1988)).

También se pueden proporcionar las formas mutadas que anulan/reducen la activación del complemento, como se ha comentado anteriormente con referencia a la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.194.551, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.624.821 y/o la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.491916..

15 En particular, se prefieren las células de mamífero. Se ha desarrollado un gran número de líneas de células anfitronas para la secreción de inmunoglobulinas intactas, entre ellas se encuentran las líneas de células CHO, varias líneas de células COS, las células HeLa, líneas celulares de mieloma (NSO, SP/2, YB/0 e P3X63.Ag8.653), células B transformadas o hibridomas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un intensificador (Queen et al, PNAS, 86:10029 (1989)), y las secuencias requeridas para la unión a los ribosomas, el empalme de ARN y la poliadenilación, y secuencias para la terminación de la transcripción. Las secuencias para el control de la expresión de elección son promotores derivados de genes de inmunoglobulina y de virus, tales como SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, citomegalovirus y similares. En general, el vector de expresión incluye un marcador seleccionable, tal como el de resistencia a la neomicina.

20 Para la expresión de anticuerpos humanizados, es preferible cultivar las líneas celulares de mamífero con un medio libre de suero. Por ejemplo, la línea celular HuDREG-55 puede ser cultivada fácilmente en Medio de Hibridoma Libre de Suero y Libre de Proteína. Núm. de Cat. S-2897 de Sigma (St. Louis, MO).

Ácidos Nucleicos, vectores, animales transgénicos

30 Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos/derivados/cadenas de anticuerpo de la presente invención pueden ser producidos mediante técnicas convencionales, puesto que las secuencias de aminoácidos para las regiones variables clave se proporcionan en la presente memoria y que las secuencias codificantes correspondientes se pueden proporcionar utilizando el código genético. Estas secuencias se pueden incorporar a vectores de expresión y/o clonar en células.

35 De hecho, las técnicas para producir y clonar "anticuerpos reformados" con regiones CDR de roedor y regiones marco humanizadas son bien conocidas en la actualidad. Son comentadas por ejemplo por Jones, Dear, Foote, Neuberger y Winter, en Nature, 321, 522-4 (1986); por Riechmann, Clark, Waldman y Winter, en Nature, 332, 323-327 (1988) y por Verhoeven, Milstein y Winter, en Science, 239, 1534-1536 (1988).

Dichos ácidos nucleicos pueden incorporarse a vectores de expresión, incluyendo plásmidos, fagos, etc., como es bien conocido en la técnica y se ha discutido anteriormente.

40 Los ácidos nucleicos de la presente invención también se pueden utilizar para diseñar sondas o cebadores. Estos pueden se pueden utilizar por ejemplo para aislar o amplificar ácidos nucleicos de la presente invención.

45 Las sondas o cebadores están por lo tanto, dentro del alcance de la presente invención. Típicamente existen tienen al menos 10, al menos 15 o al menos 20 bases de longitud. Preferiblemente hibridan en condiciones rigurosas con cadenas de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos/derivados de la presente invención o con cadenas complementarias de los mismos. Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas implica el uso de una disolución de prelavado de 5 X SSC, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0) y el intento de hibridación durante la noche a 55°C utilizando 5 X SSC. Sin embargo, hay muchas otras posibilidades. Algunas de ellas se enumeran en la Tabla 1 del documento WO98/45435, por ejemplo. (Véanse especialmente las condiciones expuestas en A-F de la tabla y, con menor preferencia, las enumeradas en G a L o M a R).

50 En un aspecto adicional de la presente invención, los ácidos nucleicos se pueden utilizar ventajosamente para proporcionar transgenes para su uso en la producción de animales transgénicos no humanos, preferiblemente ratones. Aquí el anticuerpo/derivado puede ser expresado en una forma inducible, o bajo el control de promotores constitutivos.

55 Tales animales pueden utilizarse ventajosamente para estudiar y someter a ensayo fármacos para patologías humanas en donde la interacción NGF/TrkA está inhibida y, en particular, patologías neurodegenerativas.

El anticuerpo/derivado se puede expresar ventajosamente en un fluido corporal recuperable, tal como leche o suero, del cual se puede recuperar y purificada utilizando técnicas convencionales.

5 Los transgenes utilizados para producir los animales transgénicos pueden comprender la secuencia o secuencias codificantes relevantes unidas operativamente a un promotor, normalmente combinadas con una secuencia intensificadora, tal como la de la inmunoglobulina de roedor o el promotor/intensificador del gen de la caseína (Buhler et al, Bio/Technology, 8140 (1990); Meade et al., Bio/Technology, 8, 443 (1990)).

Los transgenes se pueden transferir a células o embriones por medio de recombinación homóloga. Se puede producir una amplia gama de animales transgénicos no humanos, incluyendo ratones, ratas, ovejas, vacas, cabras, etc. (véase el documento WO 91/08216).

10 A partir de la descripción anterior se apreciará que la presente invención proporciona una gama de nuevos anticuerpos, derivados, ácidos nucleicos, etc.

Si se desea, éstos se pueden proporcionar en una forma sustancialmente purificada. Para los fines de la presente invención, esto significa que son la mayor parte del peso en seco de una composición concreta. Por ejemplo, pueden representar al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 98% de dicho peso seco.

Estos se pueden proporcionar en forma aislada. Esto significa que se separan de uno o más de otros componentes con los que se pueden asociar normalmente en la naturaleza (p. ej. se puede proporcionar un ácido nucleico en una forma que está aislada de una célula).

20 Estos se pueden proporcionar en una variedad de formas diferentes. Por ejemplo, pueden estar fusionados a radicales heterólogos y/o se pueden inmovilizar.

Todas las formas anteriores están dentro del alcance de la presente invención.

La presente invención se describirá a continuación a modo de ejemplo solamente, con referencia a los dibujos adjuntos, en donde:

25 Las Figuras 1a y 1b muestran alineamientos de secuencias de aminoácidos para diversas cadenas pesadas y ligeras.

La Figura 2 muestra los resultados para la especificidad de unión del antígeno hacia TrkA-IgG con respecto a sobrenadantes de diferentes clones resultantes de un experimento que implica la expresión transitoria de las variantes MNAC13 humanizadas en células COS-7.

30 La Figura 3 muestra los resultados de un experimento en el que se analizó la unión celular de los anticuerpos a TrkA expresado en células TF-1 mediante análisis citofluorimétrico.

La Figura 4 muestra los resultados de un análisis adicional en el que los mejores ligantes identificados a partir de Figura 3 (BXhVH3VL3, BXhVH5VL1, BXhVH5VL3 y HuMNACWOv) se compararon con HuMNACWO.

35 La Figura 5 muestra los resultados de un análisis en el que se analizaron diferentes candidatos humanizados en paralelo con el anticuerpo MNAC13 murino (muMNACEP), chimMNAC 13, HuMNACWO, e IgG1 humana como control convencional.

La Figura 6 muestra las cadenas pesada y ligera para BXhVH5VL1, incluyendo las regiones constantes (el primer aminoácido de la región constante está subrayado.)

La Figura 7 muestra la cadena pesada para BXhVH5VL1 N297A, incluyendo la región constante (el primer aminoácido de la región constante está subrayado y la posición 297A está en negrita y subrayada).

40 La Figura 8 muestra la unión de BXhVH5VL1 y BXhVH5VL1 N297A a las líneas celulares que expresan huTrkA.

La Figura 9 muestra el efecto de diversos anticuerpos en la producción de MIP-1 β inducida por NGF en la línea de mastocitos HMC-1 humana.

La Figura 10 muestra la unión de BXhVH5VL1 a los receptores de Fc unidos a células sobre la línea celular THP1 comparación con BXhVH5VL1 N297A.

45 La Figura 11 muestra un experimento que demuestra el efecto analgésico de la inyección intradérmica local de BXhVH5VL1 N297A o hIgG de control cuando se inyectan simultáneamente con rhNGF.

La Figura 12 muestra un experimento que demuestra el efecto analgésico de la inyección intradérmica local de muMNACEP o mIgG de control cuando se inyectan simultáneamente con rhNGF

La Figura 13 muestra un experimento que demuestra el efecto analgésico de la administración sistémica de BXhVH5VL1 N297A cuando se compara con hIgG de control en un modelo animal de dolor inducido por NGF.

La Figura 14 muestra un experimento que demuestra el efecto analgésico de la administración sistémica de muMNACEP cuando se compara con hIgG de control en un modelo animal de dolor inducido por NGF.

5 Ejemplos

Antes de discutir los ejemplos en detalle, se exponen más abajo alguna nomenclatura utilizada en los mismos:

muMNACEP

Este término se utiliza para indicar el anticuerpo murino MNAC13, como se describe en el documento EP1181318. La región variable de la cadena pesada de este anticuerpo se denomina en la presente memoria mVHEP (SEQ ID NO. 15). La región variable de cadena ligera se denomina en la presente memoria como mVLEP (SEQ ID NO. 16).

HuMNACWO

Este término se utiliza para indicar el anticuerpos humanizado MNAC13 descritos en el documento WO 05/061540

La región variable de la cadena pesada de este anticuerpo se denomina en la presente memoria HuVHWO (SEC ID NO.: 17). La región variable de cadena ligera se denomina en la presente memoria HuVLWO (SEQ ID NO. 18).

15 HuMNACWOv

Este término se utiliza para indicar una variante del anticuerpo descrito en HuMNACWO (véase más arriba) en el que la región CDR3 de cadena pesada ha sido reemplazada por una región CDR3 correspondiente a la presente en muMNACEP. La variante es novedosa y está dentro del alcance de la presente invención.

20 La región variable de la cadena pesada de este anticuerpo se denomina en la presente memoria HuVHWOv (SEQ ID NO: 6). La región variable de cadena ligera puede ser referida en la presente memoria como HuVLWOv. Sin embargo, con el fin de evitar la duplicación, no se muestra en la Figura 1b, ya que es la misma que HuVLWO (SEQ ID NO. 18).

ChimMNAC13

25 Esto corresponde a muMNACEP, pero tiene regiones constantes humanas en lugar de regiones constantes de ratón.

La región variable de la cadena pesada de este anticuerpo se denomina en la presente memoria mVHEP (SEQ ID NO. 15)

La cadena ligera se denomina en la presente memoria mVLEP (SEQ ID NO. 16)

3-23*01 (SEQ ID NO. 19), JH4 (SEQ ID NO. 20), L6*01 (SEQ ID NO. 21) y JK1 (SEQ ID NO. 22)

30 Éstas son secuencias codificantes derivadas de genes de la línea germinal humana.

Se utilizan para la evaluación de grados de humanización en la Tabla 1. Por lo tanto, si no hay cambios relativos a una secuencia de la línea germinal humana se considera que hay una humanización de 100%.

[Porcentaje de humanización = $\frac{\text{número de cambios}}{\text{número total de residuos comparados}} \times 100$]

35 La siguiente tabla muestra el porcentaje de humanización para las diferentes variantes:

Tabla 1

Variante de secuencia	Número de AA murinos en FW/número de AA totales en el FW	% de Humanización (con respecto a la secuencia de FW)	Número de AA murinos incluyendo los AA de CDR/número de AA totales en la región variable	% de Humanización (con respecto a la secuencia variable completa)
BXhVH1	0/87	100	36/123	70,7
BXhVH2	3/87	96,6	39/123	68,3
BXhVH3	3/87	96,6	39/123	68,3
BXhVH4	3/87	96,6	39/123	68,3
BXhVH5	5/87	94,2	41/123	66,7
BXhVHWO	12/87	86,2	48/123	61,0
BXhVL1	0/80	100	26/106	75,5
BXhVL2	4/80	95	30/106	71,7
BXhVL3	6/80	92,5	32/106	69,8
BXhVL4	6/80	92,5	32/106	69,8
BXhVL5	6/80	92,5	32/106	69,8
BXhVL6	8/80	90	34/106	67,9
BXhVL7	8/80	90	34/106	67,9
BXhVL8	11/80	86,2	37/106	65,1
BXhVLWO	9/80	88,8	35/106	67

Se puede observar que todas las cadenas variables de las variantes tienen un grado de humanización sobre las regiones marco de más de 85%.

5 Secuencias "BX"

Las secuencias marcadas con un código que comienza con "BX" son secuencias novedosas de la presente invención. Las letras que siguen a "BX" son o VH o VL para indicar una cadena variable pesada o ligera, respectivamente. Las secuencias son simplemente numeradas a continuación de manera consecutiva en el orden en el que se muestran en las Figuras 1a y 1b para una cadena dada.

10 Existen cinco secuencias de cadenas pesadas. De este modo éstas se enumeran:

BXhVH1 (SEQ ID NO. 1)

BXhVH2 (SEC ID NO. 2)

BXhVH3 (SEQ ID NO. 3)

BXhVH4 (SEC ID NO. 4)

15 BXhVH5 (SEQ ID NO. 5)

Existen ocho secuencias de cadena ligera. De este modo se enumeran:

BXhVL1 (SEQ ID NO. 7)

BXhVL2 (SEQ ID NO. 8)

BXhVL3 (SEQ ID NO. 9)

5 BXhVL4 (SEQ ID NO. 10)

BXhVL5 (SEQ ID NO. 11)

BXhVL6 (SEQ ID NO. 12)

BXhVL7 (SEQ ID NO. 13)

BXhVL8 (SEQ ID NO. 14)

10 Las cadenas se pueden combinar en anticuerpos o derivados de los mismos.

Las cuarenta combinaciones posibles han sido todas producidos y son:

BXhVH1VL1, BXhVH1VL2, BXhVH1VL3, BXhVH1VL4, BXhVH1VL5, BXhVH1VL6, BXhVH1VL7, BXhVH1VL8,

BXhVH2VL1, BXhVH2VL2, BXhVH2VL3, BXhVH2VL4, BXhVH2VL5, BXhVH2VL6, BXhVH2VL7, BXhVH2VL8,

BXhVH3VL1, BXhVH3VL2, BXhVH3VL3, BXhVH3VL4, BXhVH3VL5, BXhVH3VL6, BXhVH3VL7, BXhVH3VL8,

15 BXhVH4VL1, BXhVH4VL2, BXhVH4VL3, BXhVH4VL4, BXhVH4VL5, BXhVH4VL6, BXhVH4VL7, BXhVH4VL8,

BXhVH5VL1, BXhVH5VL2, BXhVH5VL3, BXhVH5VL4, BXhVH5VL5, BXhVH5VL6, BXhVH5VL7, BXhVH5VL8.

"N297A"

La denominación "N297A" después del nombre de un anticuerpo indica que la posición 297 de la región constante de la cadena pesada está mutada de N a A.

20 La secuencia de BXhVH5VL1 N297A se proporciona como SEC ID NO: 23.

Vectores de expresión

Las secuencias codificantes apropiadas se fusionaron con una secuencia codificante para una señal secretora 5' y una secuencia donadora de empalme 3' con respecto al ADNc para la clonación en un sistema de expresión de anticuerpos.

25 Los fragmentos de ADN fueron clonados en vectores de expresión de IgG1.

Estos vectores de expresión se basaron en secuencias genómicas que codificaban los dominios constantes humanos y las casetes de clonación para la inserción de los fragmentos de ADNc seleccionados de las secuencias de HVH y HVL.

30 Expresión transitoria de las variantes de MNAC13 humanizadas en células COS-7 y determinación de los títulos de anticuerpos

Cada combinación de cadena Pesada y Ligera se transfectaron transitoriamente en células COS-7 y se determinó el título de anticuerpo.

35 Los vectores de expresión que codificaban la cadena ligera y la cadena pesada se co-transfectaron transitoriamente en células COS-7 mediante lipofección utilizando Lipofectamina de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Alemania) en un formato de 24 pocillos.

Después de la transfección, el medio fue reemplazado por DMEM que contenía FCS al 10% y L-glutamina al 2% y los sobrenadantes de las células COS-7 se recogieron 4 días después de la transfección.

El título de anticuerpo de los anticuerpos humanizados secretados en los sobrenadantes de las células COS-7 transfectadas se analizó mediante un ELISA de tipo sándwich.

40 En resumen, se inmovilizó un anticuerpo que reconocía la cadena anti-kappa humana de ratón (BD) sobre una placa de 96 pocillos, se bloqueó y se incubó con sobrenadante diluido de células COS-7 transfectadas. La presencia de anticuerpos se detectó mediante un anticuerpo anti-IgG humana de conejo (H + L) conjugado con POD (Dianova, Alemania). Se utilizó un anticuerpo de control quimérico como patrón a concentraciones de 1 a 10 ng/ml. Las

ES 2 435 917 T3

concentraciones de anticuerpo determinadas se ajustaron adicionalmente mediante una muestra de patrón interno que tenía una concentración de anticuerpos normalizada.

Ejemplo 1

Comparación de la unión del anticuerpo humanizado a TrkA-IgG en ELISA

- 5 En base a la concentración de anticuerpo determinada, se ajustaron los sobrenadantes de todas las muestras a la misma concentración de anticuerpo.

Las actividades de unión de todas las variantes de anticuerpos humanizados se analizaron mediante un ELISA para antígeno TrkA-IgG. Éstas se compararon con las actividades de unión de ChimMNAC13 y HuMNACWOv.

- 10 Los anticuerpos y los antígenos se descongelaron, se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -20°C. Las alícuotas de los anticuerpos en uso se almacenaron a 4°C durante un máximo de dos semanas.

El ELISA para antígeno se realizó de la siguiente manera: se recubrieron placas Maxisorb (Nunc, Alemania) con 0,125, 0,25, 0,5, y 1 µg/ml de TrkA-IgG. Para verificar la especificidad de la unión anticuerpo-antígeno, se utilizó TrkB-IgG (1µg/ml) como control negativo.

Las variantes de anticuerpo expresadas transitoriamente se utilizaron a 1, 10, y 100 ng/ml.

- 15 El procedimiento se detalla de la siguiente manera:

Recubrimiento

Placas: Nunc MaxiSorp 96 pocillos

100 µl/pocillo de TrkA-IgG a 2 µg/ml en tampón de carbonato 0,1 M pH 9,6 (TrkB-IgG utilizado como control negativo)

- 20 Sellar la placa e incubar durante la noche a +4°C

Lavar 3 veces con 200 µl de tampón de lavado

Bloqueo

Bloquear las placas mediante la adición de 200 µl de tampón de bloqueo SuperBlock en PBS. (Pierce Núm. de Prod. 37515) a cada pocillo.

- 25 Vaciar inmediatamente la placa por inversión.

Repetir dos veces más.

Incubar a 37°C durante 2 horas.

Anticuerpo Primario

Desechar el sobrenadante y añadir 100 µl de mAb purificado apropiadamente diluido en Tampón TEST

- 30 (Intervalo de la curva patrón: 50-5000 pg/ml)

Sellar la placa e incubar a 37°C durante 2 horas.

(Con el fin de aumentar la sensibilidad incubar durante la noche a +4°C)

Lavar 4 veces con tampón de lavado

Anticuerpo secundario

- 35 Añadir 100 µl de anti-IgG de ratón de Cabra conjugado con HRP (Pierce cat. 31430) diluido 1:10000 en Tampón TEST

Incubar a 37°C durante 1 hora.

Lavar 4 veces con tampón de lavado.

Desarrollo

- 40 Añadir 100 µl de disolución de sustrato a cada pocillo. Incubar a temperatura ambiente.

Detener la reacción con 100 µl de H₂SO₄ 2M.

ES 2 435 917 T3

Determinar la densidad óptica de cada pocillo utilizando un lector de microtitulación a 450 nm.

Resultados

Los resultados de los sobrenadantes de los distintos clones evaluados para determinar la especificidad de unión al antígeno utilizando el análisis ELISA se muestran en la Figura 2.

- 5 En resumen, el antígeno específico TrkA-IgG (barras de color negro) y el control negativo TRKB-IgG (barras de color blanco) se aplicaron como recubrimiento a una concentración de 1 µg/ml sobre placas de 96 pocillos diferentes.

Los sobrenadantes de los anticuerpos se cuantificaron, se diluyeron apropiadamente, y se sometieron a ensayo a una concentración 5 ng/ml. Después del lavado, se detectó la unión con el anticuerpo secundario marcado con HRP apropiado, se reveló mediante una reacción cromogénica y se cuantificó mediante medición a una DO450/630 nm.

- 10 La mayoría de los anticuerpos humanizados muestran una afinidad selectiva comparable para el antígeno TrkA de alta densidad.

Además, su especificidad de unión no es significativamente diferente del anticuerpo murino anti-TrkA humano parental y su isoforma quimérica, lo que indica que la selectividad para el antígeno se ha conservado completamente a lo largo del procedimiento de humanización.

- 15 Ejemplo 2

Análisis de unión celular de nuevos candidatos mediante análisis citofluorimétrico de la expresión superficial de TrkA sobre células TF-1

Procedimiento

Cosechar las células de cultivo, preparar una suspensión de una sola célula.

- 20 (Con el fin de obtener la expresión máximos de antígeno dividir las células 1:03 el día anterior).

Distribuir 0,3-0,4 x 10⁶ células/muestra y lavar 1X con tampón FACS frío (PBS pH 7,4 + NaN₃ 0,1% + BSA al 0,1%).

Centrifugar a 350 xg durante 5 min.

Desechar el sobrenadante y mantener los tubos sobre hielo.

Bloqueo de los receptores de Fc

- 25 Añadir 50 µl/muestra de IgG humana [300 mg/ml] en tampón FACS y mezclar sometiendo a vórtice suavemente.

Incubar a 4°C durante 15 min.

Anticuerpo Primario

Añadir 100 µl/muestra de Anticuerpo Primario µmMNAC13 [4 µg/ml] en tampón FACS y mezclar sometiendo a vórtice suavemente.

- 30 Como control negativo utilizar control de isotipo de IgG1 de ratón purificado a la misma concentración. Incubar a 4°C durante 30 min.

Lavar 2 veces con 1 ml de tampón FACS, centrifugar 5 min a 350 xg, y descartar el sobrenadante.

Anticuerpo secundario

Añadir 100 µl/muestra de anti-IgG de ratón (H + L) de burro conjugado con R-ficoeritrina

- 35 Jackson ImmunoResearch Núm. de cat. 715-116-151 en tampón FACS y mezclar sometiendo a vórtice suavemente.

Incubar a 4°C durante 30 min.

Lavar 2x con 1 ml de tampón FACS, centrifugar 5 min a 350 xg, y descartar el sobrenadante. Volver a suspender en 0,5 ml de tampón FACS.

Tomar datos de la muestra en un citómetro de flujo.

- 40 Resultados

Las células TF-1 se tiñeron con los sobrenadantes de todos los clones así como de los anticuerpos HuMNACWO y HuMNACWOv como controles (4 µg/ml) durante 30 minutos a 4°C.

ES 2 435 917 T3

La tinción se reveló por medio de un anticuerpo secundario marcado con PE apropiado y se cuantificó mediante análisis citofluorométrico para evaluar la intensidad de fluorescencia de la unión.

Los resultados se muestran en la Figure 3, que se basa en tabla de más abajo.

Tabla 2

Núm.	Variantes	Fluorescencia Media Geo			Multiplicidad de Incremento		
		Media	±	D.T.	Media	±	D.T.
1	mVHEP/mVLEP	11,0	±	2,2	3,2	±	0,7
2	hVHW0v/hVLWO	8,9	±	1,9	2,6	±	0,6
3	hVH1/hVL1	5,7	±	0,4	1,7	±	0,1
4	hVH1/hVL2	4,6	±	0,4	1,3	±	0,1
5	hVH1/hVL3	6,1	±	0,6	1,8	±	0,2
6	hVH1/hVL4	5,1	±	0,5	1,5	±	0,2
7	hVH1/hVL5	4,5	±	0,3	1,3	±	0,1
8	hVH1/hVL6	4,9	±	0,4	1,4	±	0,1
9	hVH1/hVL7	5,1	±	0,4	1,5	±	0,1
10	hVH1/hVL8	5,2	±	0,1	1,5	±	0,0
11	hVH2/hVL1	9,2	±	1,3	2,6	±	0,4
12	hVH2/hVL2	6,4	±	0,7	1,8	±	0,2
13	hVH2/hVL3	10,8	±	1,3	3,1	±	0,4
14	hVH2/hVL4	6,1	±	0,3	1,8	±	0,1
15	hVH2/hVL5	6,4	±	0,2	1,8	±	0,1
16	hVH2/hVL6	6,4	±	0,7	1,8	±	0,2
17	hVH2/hVL7	6,5	±	0,8	1,9	±	0,3
18	hVH2/hVL8	6,5	±	1,0	1,9	±	0,3
19	hVH3/hVL1	8,6	±	1,5	2,5	±	0,5
20	hVH3/hVL2	7,1	±	2,1	2,0	±	0,6
21	hVH3/hVL3	12,6	±	0,6	3,6	±	0,2
22	hVH3/hVL4	7,1	±	0,1	2,0	±	0,0

ES 2 435 917 T3

Núm.	Variantes	Fluorescencia Media Geo			Multiplicidad de Incremento		
		Media	±	D.T.	Media	±	D.T.
23	hVH3/hVL5	6,9	±	0,5	2,0	±	0,2
24	hVH3/hVL6	6,4	±	0,5	1,8	±	0,2
25	hVH3/hVL7	7,1	±	1,0	2,0	±	0,3
26	hVH3/hVL8	6,5	±	1,2	1,9	±	0,3
27	hVH4/hVL1	10,4	±	2,4	3,0	±	0,7
28	hVH4/hVL2	8,3	±	2,5	2,4	±	0,7
29	hVH4/hVL3	10,9	±	3,0	3,1	±	0,9
30	hVH4/hVL4	8,0	±	2,2	2,3	±	0,6
31	hVH4/hVL5	8,6	±	1,7	2,5	±	0,5
32	hVH4/hVL6	8,0	±	1,4	2,3	±	0,4
33	hVH4/hVL7	8,7	±	2,5	2,5	±	0,7
34	hVH4/hVL8	8,3	±	1,9	2,4	±	0,6
35	hVH5/hVL1	11,3	±	2,7	3,2	±	0,8
36	hVH5/hVL2	8,6	±	2,3	2,5	±	0,7
37	hVH5/hVL3	13,7	±	2,1	3,9	±	0,6
38	hVH5/hVL4	9,1	±	2,2	2,6	±	0,7
39	hVH5/hVL5	8,3	±	2,0	2,4	±	0,6
40	hVH5/hVL6	9,1	±	1,5	2,6	±	0,5
41	hVH5/hVL7	8,6	±	2,0	2,5	±	0,6
42	hVH5/hVL8	8,3	±	1,6	2,4	±	0,5
43	hulgG	3,5	±	0,0	1,0	±	0,0

Los resultados demostraron que todos los clones sometidos a ensayo así como HuMNACWOv detectaron positivamente los receptores TrkA asociados a membrana sobre las células TF1 aunque en un grado diferente. HuMNACWO no es capaz de teñir las células TF1, que tienen una baja densidad de receptores TrkA en la superficie.

- 5 Para confirmarlo adicionalmente, de los 40 clones sometidos a ensayo, se seleccionaron los que mejor se unían para analizarlos adicionalmente.

Según se evalúa en dos experimentos separados (Figura 4) BXhVH3VL3, BXhVH5VL1, BXhVH5VL3, y HuMNACWOv se compararon con HuMNACWO.

Se confirmó que los cabezas de serie seleccionados se unían bien y funcionaban ligeramente mejor cuando se comparaban con HuMNACWOv.

5 Las isoformas de los anticuerpos humanizados BXhVH5VL1 N297A y BXhVH5VL1 junto con los anticuerpos de referencia muMNACEP y HuMNACWO también se analizaron para determinar su capacidad de unión sobre las líneas celulares TF-1, HMC-1 y PC12-hTrkA que expresan diferentes niveles de receptor hTrkA en la superficie.

10 Como se muestra en la Figura 8, los anticuerpos BXhVH5VL1 N297A y BXhVH5VL1 se unían de una manera comparable a todas las líneas celulares sometidas a ensayo, independientemente de la densidad del receptor sobre la superficie celular. Ambos anticuerpos parecen unirse más eficazmente cuando se comparan con el muMNACEP parental. El HuMNACWO solo se une a la línea celular PC12-hTrkA con una elevada densidad de receptores en la superficie.

Ejemplo 3

Comparación de la actividad biológica del anticuerpo humanizado in vitro con un análisis de proliferación sobre células TF1

15 Para medir la capacidad de los anticuerpos monoclonales anti-TrkA humano para bloquear la actividad biológica mediada por TrkA- β -NGF en la superficie celular, se utilizó un análisis de proliferación celular utilizando una línea celular eritroleucémica humana dependiente del factor, TF-1 (Kitamura, T. et al., 1989, J. Cell Physiol. 140:323-334).

Las células TF-1 se incubaron con diferentes concentraciones de los anticuerpo durante 0,5 horas a 37°C en una placa de cultivo de 96 pocillos planos.

20 Después de este período de preincubación, se añadió β -NGF humano recombinante (rec-hu- β -NGF, R&D Systems) a la mezcla de célula-anticuerpo.

La mezcla de análisis en un volumen total de 200 μ L, que contenía anticuerpo a diferentes concentraciones indicadas, β -NGF humano 5,0 ng/mL y células TF-1 a 5×10^3 células/pocillo, se incubó a 37°C durante 5 días en una incubadora con CO₂ humidificada.

25 Después de ese período, las placas se centrifugaron y después de la eliminación del sobrenadante se congelaron a -80°C con el fin de lisar las células.

Se utilizó el Kit de Análisis de Proliferación Celular CyQUANT (Molecular Probes) para medir la proliferación celular de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Este experimento se llevó a cabo dos veces.

Resultados

30 Los diferentes candidatos humanizados se analizaron en paralelo con el anticuerpo MNAC13 murino (muMNACEP), chimMNAC13, HuMNACWO e IgG1 Humana como control patrón (Figura 5).

Se calcularon las CI50 para cada curva y los resultados se proporcionan en la tabla siguiente.

Se encontró que el anticuerpo BXhVH5VL1 era el que mejor funcionaba entre los candidatos.

Las cadenas pesadas y ligeras para este anticuerpo se muestran por lo tanto en la Figura 6.

35 La CI50 media para MNAC13 murino a lo largo de una serie de experimentos fue de $0,54 \pm 0,47$ μ g/ml.

Tabla 3

Análisis de proliferación sobre células TF1 CI50 (µg/ml)			
		Media	DT
muMNACEP		0,54	0,47
	EXP-1	EXP-2	
	0,06	0,58	
ChimMNAC13			
BXhVH5VL1	0,17	1,84	
BXhVH3VL3	0,41	2,38	
BXhVH5VL3	1,40	1,21	
HuMNACWO	-	-	
HuIgGstd	-	-	

Ejemplo 4

Análisis de resonancia de plasmón superficial

5 El análisis de resonancia de plasmón superficial se utilizó para medir las constantes de velocidad de asociación y disociación para las cinéticas de unión de los diferentes anticuerpos (murinos, quiméricos, 5 variantes humanizadas) a TrkA-IgG utilizando BIACORE 2000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia). Se inmovilizó TrkA-IgG sobre un chip sensor CM-5 de acuerdo con las condiciones del fabricante, de manera que se lograra una densidad de inmovilización de 1100 UR. Cada muestra de anticuerpo se analizó a intervalos de concentración de anticuerpo de 20-0,63 µg/ml. Los cálculos a partir de los sensogramas se realizaron utilizando el programa de evaluación BIA versión 3 (1999).

10 El análisis de los conjuntos individuales de sensogramas se llevó a cabo con el programa de evaluación BIA versión 3 (1999). Entre los diferentes modelos sometidos a ensayo para ajustar los datos de la cinética, el mejor ajuste se obtuvo con el algoritmo "separado 1:1". En este modelo, solo se utilizó un intervalo definido de las primeras curvas de asociación y disociación para el cálculo. Se supone que durante estas fases tempranas de la curva, los efectos de superposición como la transferencia de masa, el re-enlace u otros no afectan a los cálculos.

Resultados

La constante de disociación (K_D) se determinó para diferentes anticuerpos y se expone en la siguiente tabla en un orden de valor creciente.

20 El valor K_D tiene unidades molares (M), que corresponden a la concentración de ligando a la cual un sitio de unión de una proteína concreta está semiocupado. Cuanto más pequeño es el valor más estrechamente se une el ligando, o mayor es la afinidad entre el ligando y la proteína, (aquí entre el antígeno y el anticuerpo).

Tabla 4

Anticuerpo	$K_{\text{unión}} (1/\text{Ms})$	$K_{\text{desunión}} (1/\text{s})$	$K_D [\text{M}]$
ChimMNAC13	$2,68 \times 10^5$	$3,53 \times 10^{-4}$	$1,51 \times 10^{-10}$
MNAC13	$8,50 \times 10^5$	$1,67 \times 10^{-4}$	$2,50 \times 10^{-10}$
BXhVH5VL1	$7,68 \times 10^5$	$4,70 \times 10^{-4}$	$6,15 \times 10^{-10}$
BXhVH5VL3	$1,00 \times 10^6$	$6,38 \times 10^{-4}$	$6,62 \times 10^{-10}$
BXhVH3VL3	$3,25 \times 10^5$	$4,42 \times 10^{-4}$	$1,45 \times 10^{-9}$
HuMNACWOv	$1,62 \times 10^6$	$3,86 \times 10^{-3}$	$2,48 \times 10^{-9}$
HuMNACWO (experimento separado)	$7,39 \times 10^5$	$3,09 \times 10^{-2}$	$4,18 \times 10^{-8}$

Se puede observar a partir de la tabla anterior que la K_D calculada para las isoformas murina y quimérica son muy comparables entre sí.

- 5 Son ligeramente inferiores pero del mismo orden de magnitud que las variantes humanizadas BXhVH5VL1 y BXhVH5VL3.

Por el contrario, las variantes humanizadas HuMNACWOv y BXhVH3VL3 presentan una K_D de orden de magnitud superior a la observada para las variantes murina y quimérica.

- 10 Sin embargo, los valores de K_D aquí todavía son inferiores a los del anticuerpo humanizado de la técnica anterior HuMNACWO.

En efecto, los valores de K_D preferidos para los anticuerpos/variantes de la presente invención utilizando este modelo están por debajo de $4,18 \times 10^{-8}$ (de este modo son inferiores al valor para el anticuerpo de la técnica anterior humanizado HuMNACWO).

- 15 Más preferiblemente están por debajo de $2,48 \times 10^{-9}$ (de este modo son inferiores a los de HuMNACWOv, que es una variante de HuMNACWO con las mismas regiones marco, pero con cambios en la tercera CDR de la cadena pesada).

Muy preferiblemente los valores de K_D están por debajo de 1×10^{-9} (de este modo tienen el mismo orden de magnitud general que las isoformas murina y quimérica).

- 20 Consecuentemente, la clasificación proporcionada en la tabla anterior, que se basa en los datos calculados utilizando el algoritmo "separado", reflejó muy bien la clasificación obtenida mediante inspecciones visuales de los sensogramas de todas las variantes investigadas en gráficos superpuestos.

Ejemplo 5

Comparación de la actividad biológica del anticuerpo humanizado in vitro con un análisis de secreción de quimioquina sobre la línea de mastocitos HMC-1

- 25 El NGF actúa como un importante intermedio en el dolor inflamatorio, contribuyendo a la sensibilización tanto periférica como central. La sensibilización de los nociceptores periféricos puede ser muy rápida y puede implicar a células no neurales tales como los mastocitos.

- 30 Para medir la capacidad de los anticuerpos monoclonales anti-TrkA humano para inhibir la secreción de MIP1 α inducida por β -NGF, se utilizó un análisis biológico que utilizaba una línea de mastocitos, HMC-1 (Ahamed, J. et al., J. Immunol. 2004 Jun 1;172(11):6961-8.).

Las células HMC-1 (0.1×10^6 /pocillo) se cultivaron en placa por triplicado en medio de crecimiento completo en una placa de cultivo de 96 pocillos planos y se incubaron con diferentes concentraciones de anticuerpo monoclonal durante 0,5 horas a 37°C.

Después de este período de pre-incubación, se añadió β -NGF humano recombinante (rec-hu- β -NGF, R&D Systems) a la mezcla de células-anticuerpo a una concentración final de 50 ng/ml y la incubación a 37°C se extendió durante 6 horas en una incubadora con CO₂ humidificada.

5 Los sobrenadantes se cosecharon a continuación y los niveles de MIP-1 β se cuantificaron mediante ELISA sándwich utilizando un Kit DuoSet® Elisa para CCL4/MIP1- β humano para R&D System (Núm. de Cat. DY271).

Los datos obtenidos se expresaron como % de respuesta y se analizaron con un programa GraphPad Prism 5 utilizando un análisis de regresión no lineal, log(inhibidor) vs. la ecuación de la pendiente de respuesta-variable normalizada.

Resultados

10 El anticuerpo BXhVH5VL1 N297A se sometió a ensayo en paralelo con μ MNACEP murino, HuMNACWO, e IgG1 Humana como control patrón. Los valores de CI50 se calcularon para cada curva y los resultados se muestran en la Figura 9. La actividad inhibidora de BXhVH5VL1 N297A fue significativamente superior a la del anticuerpo HuMNACWO humanizado.

Ejemplo 6

15 Caracterización in vitro de BXhVH5VL1 N297A y BXhVH5VL1. Evaluación de la unión a FcR celulares en células THP-1

Se cultivó la línea celular de leucemia monocítica aguda humana THP1 (ATCC) en RPMI1640/GLUTAMAX (Invitrogen) + suero bovino fetal al 10% (Invitrogen) + Pen/Strep. y se mantuvo entre 2-9x10⁶ células/ml.

20 Las células se recogieron del cultivo y se prepararon en forma de una suspensión de una sola célula. A continuación se distribuyeron 0,3-0,4 x 10⁶ células/muestra, en placas de cultivo de tejidos de fondo redondo de 96 pocillos (Costar. Cambridge, MA) y se lavaron 1X con tampón FACS frío.

25 Después de centrifugación a 3,50 xg durante 5 min., el sobrenadante se descartó y las placas se colocaron sobre hielo. La unión de IgG a FcyR sobre las células THP-1 se realizó mediante la incubación de las IgG monoméricas en Tampón FACS partiendo de 30 μ g/ml a 0,02 μ g/ml (diluciones 1:3) en un volumen total de 100 μ l a 4°C durante 30 min.

Las células se lavaron a continuación tres veces con 200 μ l de tampón FACS, y la detección de unión de IgG se logró mediante la adición de 100 μ l de anti-IgG humana (H + L) de burro conjugada con R-ficoeritrina (Jackson Immunoresearch Núm. cat. 709-116-149) 1:100 en tampón FACS. Después de someter a vórtice suavemente, las células se incubaron a 4°C durante 30 min.

30 Las placas se lavaron 2x 200 μ l de tampón FACS, las células se resuspendieron finalmente y se transfirieron a 0,5 ml de Tampón FACS y la adquisición se realizó utilizando un citómetro de flujo.

Resultados

35 La Figura 10 muestra claramente que como se esperaba en base a descripciones de la técnica anterior (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.624.821 Winter) la isoforma mutada BXhVH5VL1 N297A está desprovista de la capacidad de unión significativa a los receptores de Fc celulares.

Ejemplo 7

Experimentos in vivo

Los experimentos in vivo que se realizaron para analizar adicionalmente los anticuerpos/derivados de la presente invención se exponen a continuación;

40 Modelos de dolor mediado por NGF

El factor de crecimiento nervioso (NGF) y su receptor TrkA son mediadores cruciales de las sensaciones de dolor características del dolor inflamatorio.

45 Clásicamente, se sabe que el NGF es un factor de supervivencia de desarrollo para las neuronas sensoriales y simpáticas pero sigue siendo sintetizado en los animales adultos en la periferia, donde es transportado retrógradamente a los cuerpos celulares de las neuronas sensoriales (Hendry et al., 1974, Otten et al. 1980).

La inflamación y la lesión del nervio provocan la liberación de NGF que estimula las fibras aferentes primarias e induce la sensibilización conductual. El tratamiento crónico subcutáneo con NGF en ratas provoca hiperalgnesia y altera la sensación cutánea local (Lewin et al, 1993; Andreev et al, 1995).

La inyección intradérmica de rhNGF en antebrazo humano y el músculo masetero en seres humanos causa hiperalgesia, alodinia y altera la sensación cutánea local que comienzan 3 horas después de la inyección y alcanzaron su punto máximo 1-7 días después de la inyección y se recuperan alrededor del día 21 (Dyck et al, 1997; Svensson et al., 2003).

5 De este modo, las inyecciones de rhNGF en la pata trasera de rata se utilizaron aquí como un modelo de sensibilización conductual que fue generada específicamente por el NGF.

Los presentes experimentos implicaron dos protocolos diferentes:

10 1. Los autores de la presente invención examinaron en primer lugar si la inyección intradérmica de NGF humano recombinante (rh) solo en pata de la rata podría causar la sensibilización conductual medida mediante ensayos nociceptivos convencionales para determinar la hiperalgesia (ensayo plantar de Hargreave). Los autores de la presente invención establecieron a continuación, si la co-inyección intradérmica de anticuerpos IgG murina, muMNACEP, IgG humana, y BXhVH5VL1 N297A a una dosis de 100 µg podría afectar a la sensibilización inducida por el rhNGF. Los anticuerpos IgG₁ murina e IgG humana se utilizaron como controles negativos a las dosis apropiadas.

15 2. Los autores de la presente invención establecieron a continuación, si el pre-tratamiento sistémico con anticuerpo muMNACEP (a dosis de 8 y 1 mg/kg, ip) y BXhVH5VL1 N297A (dosis de 8, 3, y 1 mg/kg, ip) podrían afectar a la sensibilización por rhNGF inducida periféricamente.

20 En el primer protocolo, en el cual los tratamientos se administraron localmente, se utilizaron ratas Lewis macho (Charles River, 5-6 semanas 200 g) con 8-9 animales por grupo y 4 grupos experimentales, inyectados de acuerdo con el método establecido. Las inyecciones se llevaron a cabo a ciegas. Un resumen de los tratamientos se esboza en la siguiente tabla.

	muMNACEP/BXhVH5VL1 N297A	MIGG ₁ / HlgG
Tratamientos intradérmicos	100 microgramos + 500 ng de rhNGF, n = 9	100 microgramos + 500 ng de rhNGF, n = 9

25 En el segundo protocolo, en el cual los tratamientos se administraron sistémicamente (IP) 24 horas antes de la inyección en la pata de rhNGF, se utilizaron ratas Lewis macho (Charles River, 5-6 semanas 200 g) con 10-12 animales por grupo y 10 grupos experimentales. Las inyecciones se llevaron a cabo a ciegas. Un resumen de los tratamientos se esboza en la siguiente tabla.

	muMNACEP	MIGG ₁	BXhVH5VL1 N297A	hlgG
Pretratamientos sistémicos ip 24hr	1 mg/kg n = 10	1 mg/kg n = 12	1 mg/kg n = 10	1 mg/kg n = 10
	8 mg/kg n = 10	8 mg/kg n = 8	3 mg/kg n = 10	3 mg/kg n = 10
			8 mg/kg n = 12	8 mg/kg n = 12
rhNGF intradérmico	500 ng	500 ng	500 ng	500 ng

Análisis

30 Todos los animales se numeraron y después se habituaron a los procedimientos de comprobación de comportamiento, 24-48 hr antes del inicio del experimento. Las lecturas de comportamiento fueron la latencia de retirada de la pata para en ensayo plantar como una medida de la hiperalgesia.

35 Los registros en el momento inicial se tomaron para establecer las latencias en la retirada de la pata. La sensibilidad nociceptiva se indujo por medio de rhNGF intradérmico inyectado a tiempo 0 y se controló la sensibilidad nociceptiva conductual 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 24 horas y 48 horas después de la inyección de rhNGF. Los tratamientos se administraron a ciegas de la siguiente manera:

Protocolo 1: Administración del tratamiento mediante inyección intradérmica a tiempo 0.

Protocolo 2: Administración del tratamiento mediante una sola inyección sistémica IP 24 horas antes de la inyección en la pata con rhNGF.

5 Los ensayos plantares y de von Frey en el momento inicial se realizaron antes de administran los tratamientos con fármaco.

Las mediciones de la hiperalgesia se tomaron 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 24 horas y 48 horas después de la inyección de rhNGF. Se tomaron de tres a cuatro registros para cada pata trasera ipsilateral (pata derecha, inyectada con rhNGF) y contralateral (pata izquierda, no inyectada) para la inyección con rhNGF.

10 Se recogieron los datos de los animales procedentes de los grupos de tratamiento individuales, y se calcularon las medias y las desviaciones típicas de las respuestas de la pata contralateral e ipsilateral. La presencia de hiperalgesia se indicó por una reducción significativa en la latencia de retirada de la pata (registrada en segundos) en la pata trasera ipsilateral inyectada con rhNGF en comparación con la pata contralateral de control (mediante la prueba t pareada) y en comparación con el momento inicial pre-inyección/pre-tratamiento (mediante ANOVA de una vía).

15 Eficacia antihiperalgésica intradérmica

Los autores de la presente invención compararon la eficacia anti-hiperalgésica de BXhVH5VL1 N297A (Figura 11) y muMNACEP (Figura 12) (más mIgG₁ y hIgG como controles relativos) mediante inyección intradérmica en este modelo de hiperalgesia inducida por NGF.

20 Cuando se co-inyectaron BXhVH5VL1 N297A y muMNACEP con rhNGF, no hubo desarrollo significativo de hiperalgesia, como se indica mediante una diferencia no significativa entre las respuestas de retirada de la pata ipsilateral y contralateral (Figuras 11 y 12).

La hiperalgesia en las respuestas de la pata ipsilateral siempre estuvo presentes después de la co-inyección con los controles negativos (mIgG₁, hIgG).

25 Los datos se representan como las media \pm 95% de IC antes (momento inicial) y después de la inyección intradérmica de 500 ng de rhNGF con los respectivos tratamientos (flecha). La reducción significativa de la latencia de retirada de la pata ipsilateral se indica mediante *** (***) ($p < 0,05$, $p < 0,01$, prueba t pareada) cuando se compara con la retirada de la pata contralateral.

Eficacia antihiperalgésica Sistémica

30 Los autores de la presente invención compararon la eficacia anti-hiperalgésica de BXhVH5VL1 N297A, muMNACEP mIgG₁, y hIgG mediante inyección sistémica en este modelo de hiperalgesia inducida por NGF.

Se sometieron a ensayo tres dosis diferentes de BXhVH5VL1 N297A y hIgG de control (1, 3, y 8 mg/Kg) (Figura 13). Del mismo modo, se sometieron a ensayo dos dosis diferentes de muMNACEP y mIgG₁, 1 mg/Kg y 8 mg/kg (Figura 14). Todos los tratamientos se administraron ip 24 horas antes de la inyección intradérmica con rhNGF.

35 El pre-tratamiento sistémico con 8 y 3 mg/kg de BXhVH5VL1 N297A evitó significativamente el desarrollo de hiperalgesia después de la inyección de rhNGF, tal como se indica mediante una diferencia no significativa entre las respuestas de retirada de la pata ipsilateral y contralateral (Figura 13).

El pre-tratamiento sistémico con el anticuerpo parental murino mMNACEP (8 mg/kg) también evitó el desarrollo de hiperalgesia inducida por rhNGF (Figura 14). Sin embargo, la respuesta analgésica global de BXhVH5VL1 N297A pareció ser mejor en comparación con el anticuerpo mMNACEP.

40 A la misma dosis, la hiperalgesia en las respuestas de la pata ipsilateral siempre estuvo presente después de la co-inyección con el control negativo mIgG₁ y hIgG.

45 Los datos se representan como media \pm 95% de IC, antes (momento inicial) y después de la inyección intradérmica de 500 ng de rhNGF con los tratamientos respectivos (en la flecha). La reducción significativa de la latencia de retirada de la pata ipsilateral se indica mediante *** (***) ($p < 0.05$, $p < 0.01$, prueba t pareada) cuando se compara con la retirada de la pata contralateral.

Ejemplo 8

Además, otros experimentos in vivo que se pueden realizar para analizar adicionalmente los anticuerpos/derivados de la presente invención se exponen a continuación:

Ensayo con formalina

Se pretrataron ratones con el anticuerpo/derivado intraperitonealmente y 18 horas más tarde se inyectaron en la almohadilla de la pata dorsal derecha con formalina al 5%. El tiempo de lamedura (tiempo transcurrido lamiendo la pata lesionada) se mide durante un máximo de 1 hora.

5 Ensayo de lesión por constricción crónica

Los ratones se someten a constricción quirúrgica del nervio ciático, con el fin de inducir una alodinia neuropática. Los animales se tratan a continuación con anticuerpo/derivado y se mide la respuesta de retirada a un estímulo mecánico localizado en la extremidad lesionada frente a la extremidad contralateral.

Modelo de artritis

- 10 Se inyecta coadyuvante completo de Freund a ratas en la base de la cola intradérmicamente. Aproximadamente tres semanas más tarde, estas desarrollan una poliartritis sistémica caracterizada por dolor en las articulaciones. Los animales se tratan con el anticuerpo/derivado y se evalúa el efecto analgésico mediante un análisis de vocalización que consiste en la medición de la intensidad de la vocalización en la manipulación suave de las articulaciones.

Modelo de dolor inducido por carragenano en monos

- 15 Se tratan previamente intravenosamente macacos rhesus con el anticuerpo/derivado. El día siguiente, se inyecta subcutáneamente a los animales carragenano en la cola. Se mide el tiempo de retirada de un estímulo de calor.

Aspectos generales

A menos que el contexto indique lo contrario, se aplican los siguientes puntos generales:

- 20 El término "comprende" no es limitante ya que abarca "que incluye" así como "que consiste en". De este modo, el término 'comprende' y variaciones tales como 'comprenden' y 'que comprende', se entenderá que implican la inclusión de un número entero, etapa, grupo de números enteros o grupo de etapas establecidos, pero no la exclusión de ningún otro número entero, etapa, grupo de números enteros o grupos de etapas.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Lay Line Genomics SPA

<120> ANTICUERPOS ANTI-TRKA Y DERIVADOS DE LOS MISMOS

<130> 17539EP

5 <160> 5

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2

<211> 123

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

ES 2 435 917 T3

Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3

<211> 123

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 4

ES 2 435 917 T3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 5
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 5
 Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 6
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 6

ES 2 435 917 T3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 7
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 7
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 8
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 8

ES 2 435 917 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 9

<211> 106

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 9

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 10

<211> 106

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

ES 2 435 917 T3

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 11

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 11

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 12

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 12

ES 2 435 917 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Glu Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

5 <210> 13
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

10 <210> 14
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Glu Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

15 His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

ES 2 435 917 T3

35

40

45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 15

<211> 123

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 15

Glu Val Lys Leu Met Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Thr Met Ser Trp Ala Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gln Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16

<211> 106

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 16

ES 2 435 917 T3

Asp Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Leu Leu Ile Thr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 17

<211> 123

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 17

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Thr Met Ser Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ala Met Phe Gly Asn Asp Phe Phe Phe Pro Met Asp Arg
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 18

ES 2 435 917 T3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 19
<211> 98
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens

<400> 19
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys

10 <210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

15 <210> 21
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

ES 2 435 917 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
85 90 95

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 22

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 23

<211> 453

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

ES 2 435 917 T3

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

ES 2 435 917 T3

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Gly Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-TrkA que comprende:
 - una de las siguientes combinaciones de cadenas ligera y pesada: SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7, o SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 9.
- 5 2. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que se une con mayor afinidad a TrkA que a Trk B.
3. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que es capaz de bloquear o reducir la unión de NGF al receptor TrkA.
4. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que es capaz de bloquear o reducir una o más actividades biológicas que de otra manera serían inducidas por la unión de NGF al receptor TrkA.
- 10 5. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que comprende una región constante no derivada de roedor.
6. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que comprende una región constante humana o una región constante con al menos 75% de identidad de secuencia con una región constante humana.
- 15 7. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que comprende una región constante de IgG humana o una región constante con al menos 75% de identidad de secuencia con la misma.
8. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que comprende una región constante que tiene uno o más cambios de aminoácido con respecto a una región constante de inmunoglobulina humana que evita/reduce una o más de las siguientes,
 - a) activación del complemento
 - 20 b) lisis mediada por el complemento
 - c) activación de células T
 - d) unión a un receptor de Fc.
9. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que proporciona un valor de DO450/630 nm de más de 0,1 en un análisis de unión ELISA de TrkA-IgG.
- 25 10. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que proporciona un aumento de la tinción FACS de células TF1 en un análisis de unión celular basado en FACS de la expresión de TrkA en la superficie en células TF1 que es un aumento de más de 1,0 veces.
- 30 11. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que tiene un valor de K_D de menos de $4,18 \times 10^{-8}$ M con respecto a la unión de TrkA-IgG en un análisis de resonancia de plasmón superficial en donde TrkA-IgG se inmoviliza sobre un chip sensor CM-5.
12. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que tiene al menos 90% de humanización cuando se mide sobre las regiones marco totales de la región variable de al menos una cadena.
13. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que tiene al menos 95% de humanización cuando se mide sobre las regiones marco totales de la región variable de al menos una cadena.
- 35 14. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13 que tiene al menos el porcentaje de humanización proporcionado en cualquiera de dichas reivindicaciones con respecto a las regiones marco de las cadenas tanto pesada como ligera.
15. Un derivado de un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde el derivado es
 - 40 a) un fragmento de dicho anticuerpo, en donde el fragmento está en forma de cadenas ScFv, es un fragmento Fv o Fab,
 - b) un multímero de fragmentos tales como minicuerpos, bis(o más)-ScFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, multímeros Fab,
 - c) un producto de fusión de dicho anticuerpo fragmento o multímero de fragmentos y otro radical.
- 45 16. Un derivado de acuerdo con la reivindicación 15 en donde el derivado es un producto de fusión y otro radical es un agente seleccionado entre los siguientes: un agente de diagnóstico, un agente terapéutico, un agente de marcaje, un agente que aumenta la vida media y/o reduce la inmunogenicidad de dicho derivado en un anfitrión humano.

17. Un derivado del mismo de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el agente terapéutico es una citotoxina.
18. Un anticuerpo o derivado del mismo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que está PEGilado.
19. Un anticuerpo o derivado de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en forma inmovilizada.
20. Un anticuerpo o derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, para su uso en medicina.
- 5 21. Un anticuerpo o derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, para su uso en el tratamiento del dolor.
22. Un anticuerpo o derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, para su uso en el tratamiento del dolor crónico.
- 10 23. Un anticuerpo o derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, para su uso en el tratamiento del dolor agudo.
24. Un anticuerpo o derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, para su uso en el tratamiento del dolor asociado con una o más de las siguientes: pancreatitis, cálculos renales, endometriosis, EII, enfermedad de Crohn, adherencias post-quirúrgicas, piedras de la vesícula biliar, dolor de cabeza, dismenorrea, dolor musculoesquelético, esguinces, dolor visceral, quistes en los ovarios, prostatitis, cistitis, cistitis intersticial, dolor post-operatorio, migraña, neuralgia del trigémino, dolor por quemaduras y/o heridas, dolor asociado con trauma, dolor neuropático, dolor asociado con enfermedades musculoesqueléticas, artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante, patologías periarticulares, dolor oncológico, dolor de metástasis óseas, infección por VIH.
- 15 25. Un anticuerpo o derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, para su uso en el tratamiento del cáncer, un trastorno neuronal (p .ej. un trastorno neurodegenerativo), la enfermedad de Alzheimer, la diabetes mellitus, un trastorno viral, un trastorno mediado por VIH, lepra, o un trastorno inflamatorio.
- 20 26. Un anticuerpo o derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, considerando que el tratamiento implica ADCC.
27. Una combinación de un anticuerpo o derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 y un analgésico, para la administración simultánea, secuencial o concertada en medicina.
- 25 28. Una combinación de un anticuerpo o derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 y NGF, para la administración simultánea, secuencial o concertada en medicina.
29. Una combinación de un anticuerpo o derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 y un anticuerpo anti-TrkA adicional o derivado del mismo, para la administración simultánea, secuencial o concertada en medicina.
- 30 30. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o derivado del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
31. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 y otro agente farmacéuticamente activo.
- 35 32. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 31, en donde dicho otro agente es uno o más de:
- a) un agente analgésico
 - b) otro anticuerpo anti-TrkA o derivado del mismo
 - c) NGF
 - d) un agente contra el cáncer.
- 40 33. Un anticuerpo o derivado del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 para su uso en la diagnosis o prognosis.
34. Un anticuerpo o derivado del mismo para su uso en la diagnosis o prognosis de cualquiera de las enfermedades o trastornos especificados en las reivindicaciones 21 a 25.
- 45 35. Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o derivado del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.
36. Un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 35.

37. Un mamífero transgénico no humano que expresa un anticuerpo o derivado del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, o que puede ser inducido para proporcionar tal expresión.

38. Un kit de componentes que comprende un anticuerpo o derivado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 junto con instrucciones dirigidas al uso del mismo por un sujeto como analgésico.

Figura 1a

Alineamiento de secuencias

Subrayadas, CDR, de EP1181318

CADENA PESADA:

```

mVHEP
EVKLLSEGGGLVQPGGSLALSCAASGFTFTSTMSMARQTPKRLRWYIISKGGSTYIPDTVKGRTISRDNSKNTYLQMSLSRSEDVALVYCARGMNTGRDFTYPMDYWGCGTIVTVSS
(SEQ IN No. 15)
3-23*01
EVQLLESGGGLVQPGGSLALSCAASGFTFTSTMSMARQAPGKGLRWYIISGSGSTYIADSVKGRFTISRDNSKNTYLQMSLSRAEDTAVYCAK
(SEQ IN No. 19)
JH4
.....YFDYWGCGTIVTVSS
(SEQ IN No. 20)
B2H1
EVQLLESGGGLVQPGGSLALSCAASGFTFTSTMSWVRAQPGKGLRWYIISKGGSTYIPDTVKGRTISRDNSKNTYLQMSLSRAEDTAVYCAKGMNTGRDFTYPMDYWGCGTIVTVSS
(SEQ IN No. 1)
B2H2
EVQLLESGGGLVQPGGSLALSCAASGFTFTSTMSWVRAQPGKGLRWYIISKGGSTYIPDTVKGRTISRDNSKNTYLQMSLSRAEDTAVYCAKGMNTGRDFTYPMDYWGCGTIVTVSS
(SEQ IN No. 2)
B2H3
EVQLLESGGGLVQPGGSLALSCAASGFTFTSTMSWVRAQPGKGLRWYIISKGGSTYIPDTVKGRTISRDNSKNTYLQMSLSRAEDTAVYCAKGMNTGRDFTYPMDYWGCGTIVTVSS
(SEQ IN No. 3)
B2H4
EVQLLESGGGLVQPGGSLALSCAASGFTFTSTMSWVRAQPGKGLRWYIISKGGSTYIPDTVKGRTISRDNSKNTYLQMSLSRAEDTAVYCAKGMNTGRDFTYPMDYWGCGTIVTVSS
(SEQ IN No. 4)
B2H5
EVKLLSEGGGLVQPGGSLALSCAASGFTFTSTMSWVRAQPKRLRWYIISKGGSTYIPDTVKGRTISRDNSKNTYLQMSLSRAEDTAVYCAKGMNTGRDFTYPMDYWGCGTIVTVSS
(SEQ IN No. 5)
H4YH0
EVQLLESGGGLVQPGGSLALSCAASGFTFTSTMSMARQAPGKGLRWYIISKGGSTYIPDTVKGRTISRDNSKNTYLQMSLSRAEDTAVYCAKGMNTGRDFTYPMDYWGCGTIVTVSS
(SEQ IN No. 17)
H4YH0Y
EVQLLESGGGLVQPGGSLALSCAASGFTFTSTMSMARQAPGKGLRWYIISKGGSTYIPDTVKGRTISRDNSKNTYLQMSLSRAEDTAVYCAKGMNTGRDFTYPMDYWGCGTIVTVSS
(SEQ IN No. 6)
    
```

Figura 1b

CADENA LIGERA:

#VLEP
 DIVLQSPAINASLGEIITLTCSSASSVSVMH-WYQKSGTSPKLLIYTTSHLASGVPSRFGSGSGTFTLTISSLEVEDAANDYYCHQSSYFWTFGGGTRLEIK
 (SEQ IN No. 16)
 L6*01
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSSVYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRATGTPARFSGSGGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWF.....
 (SEQ IN No. 21)
 JK1
WFGGTRVLEIK
 (SEQ IN No. 22)
 BxhV11
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSVSVMH-WYQKPGQAPRLLIYTTSHLASGIPARFSGSGGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCHQSSYFWTFGGGTRLEIK
 (SEQ IN No. 7)
 BxhV12
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSVSVMH-WYQKPGQSPRLLIYTTSHLASGIPSRFSGSGGTDFTLTISLLEPEDAANDYYCHQSSYFWTFGGGTRLEIK
 (SEQ IN No. 8)
 BxhV13
 QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSVSVMH-WYQKPGQSPRLLIYTTSHLASGIPSRFSGSGGTFYTLTISSLEPEDFAVYYCHQSSYFWTFGGGTRLEIK
 (SEQ IN No. 9)
 BxhV14
 QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSVSVMH-WYQKPGQSPRLLIYTTSHLASGIPSRFSGSGGTDFTLTISLLEPEDAANDYYCHQSSYFWTFGGGTRLEIK
 (SEQ IN No. 10)
 BxhV15
 QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSVSVMH-WYQKPGQSPRLLIYTTSHLASGIPSRFSGSGGTDYTLTISSLEPEDAANDYYCHQSSYFWTFGGGTRLEIK
 (SEQ IN No. 11)
 BxhV16
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSVSVMH-WYQKPGQSPRLLIYTTSHLASGIPSRFSGSGGTFYTLTISSLEPEDAANDYYCHQSSYFWTFGGGTRLEIK
 (SEQ IN No. 12)
 BxhV17
 QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSVSVMH-WYQKPGQSPRLLIYTTSHLASGIPSRFSGSGGTFYTLTISSLEPEDAANDYYCHQSSYFWTFGGGTRLEIK
 (SEQ IN No. 13)
 BxhV18
 QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSVSVMH-WYQKSGTSPKLLIYTTSHLASGIPSRFSGSGGTFYTLTISSLEPEDAANDYYCHQSSYFWTFGGGTRLEIK
 (SEQ IN No. 14)
 HuVLW0
 DIVLTQSPSSLSASVGDRTVITCSASSVSVMH-WYQKPGQAPRLLIYTTSHLASGVPSRFGSGSGGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCHQSSYFWTFGGGTRVLEIK
 (SEQ IN No. 18)

Figura 2

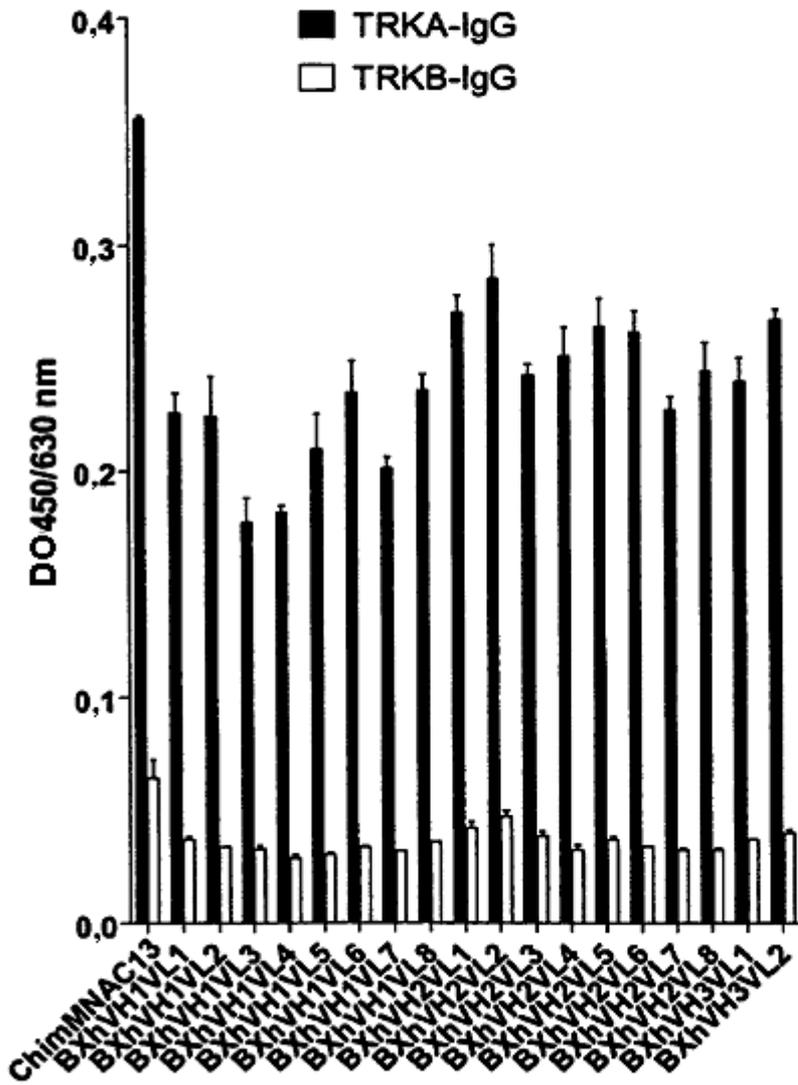


Figura 2 (cont.)

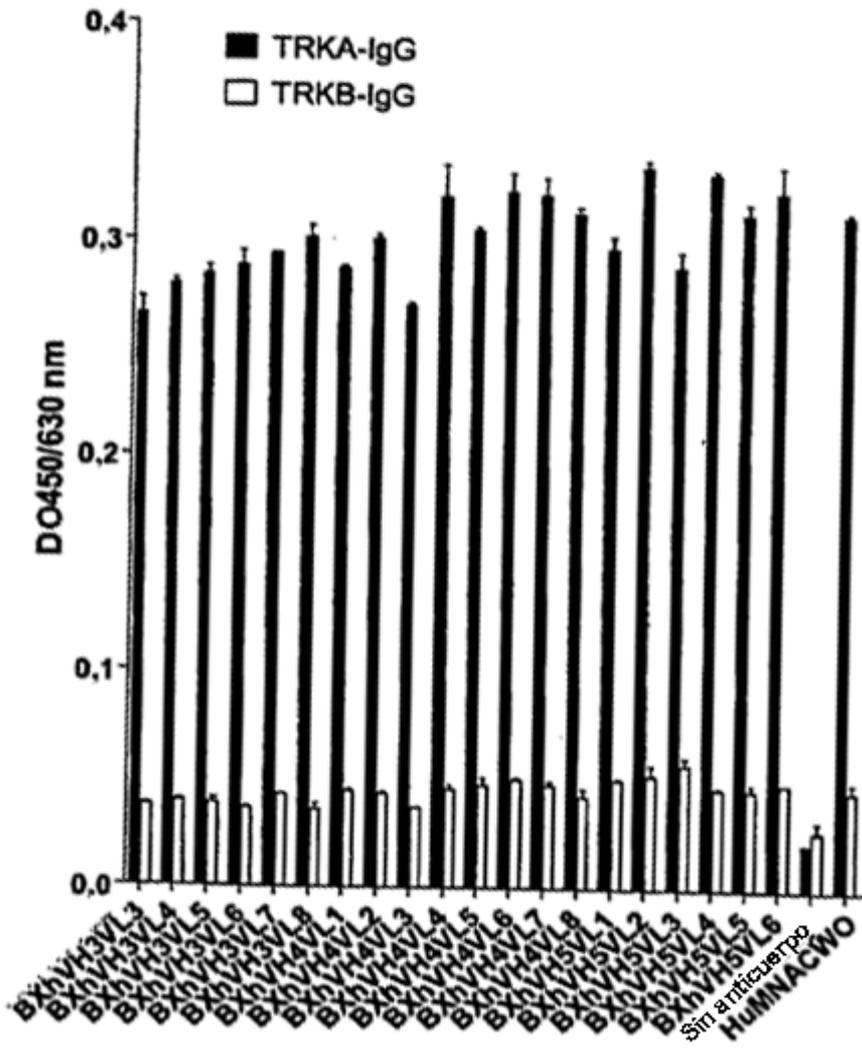


Figura 3

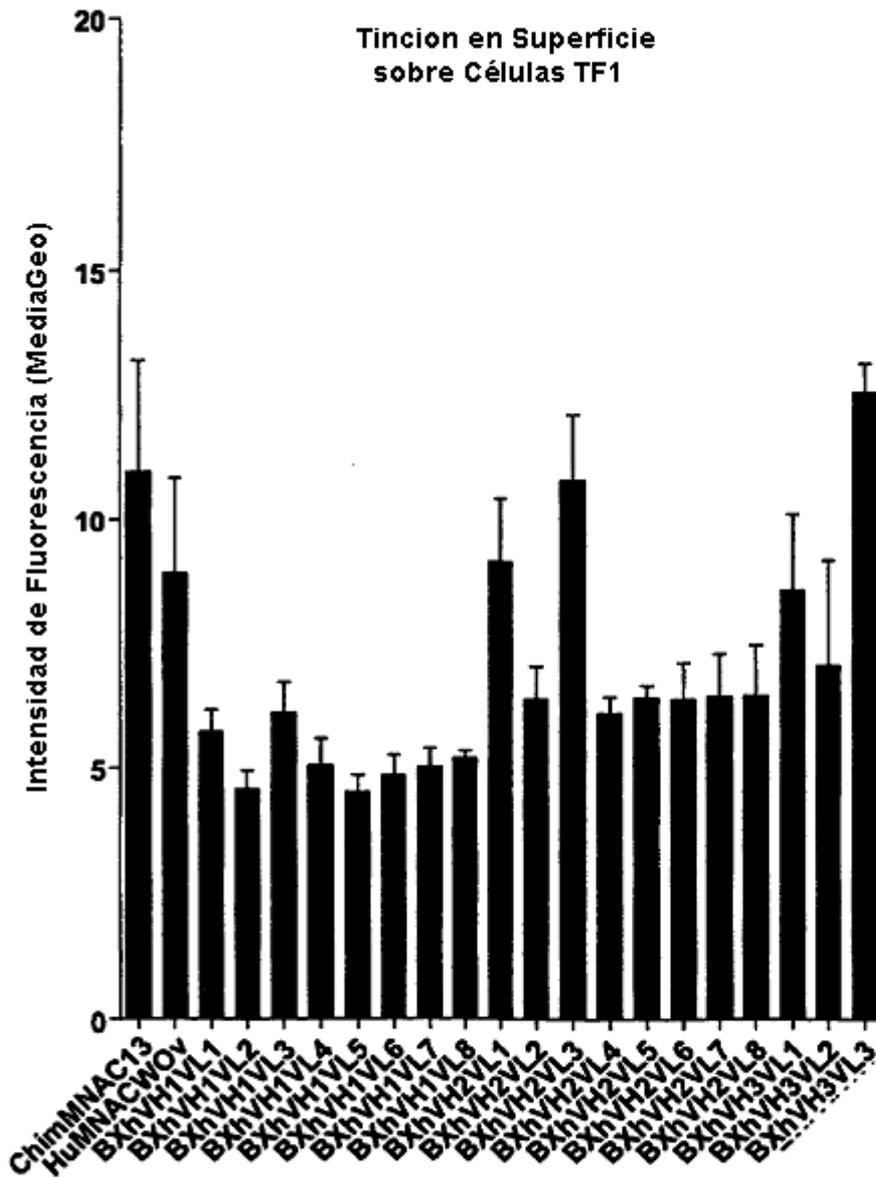


Figura 3 (cont.)

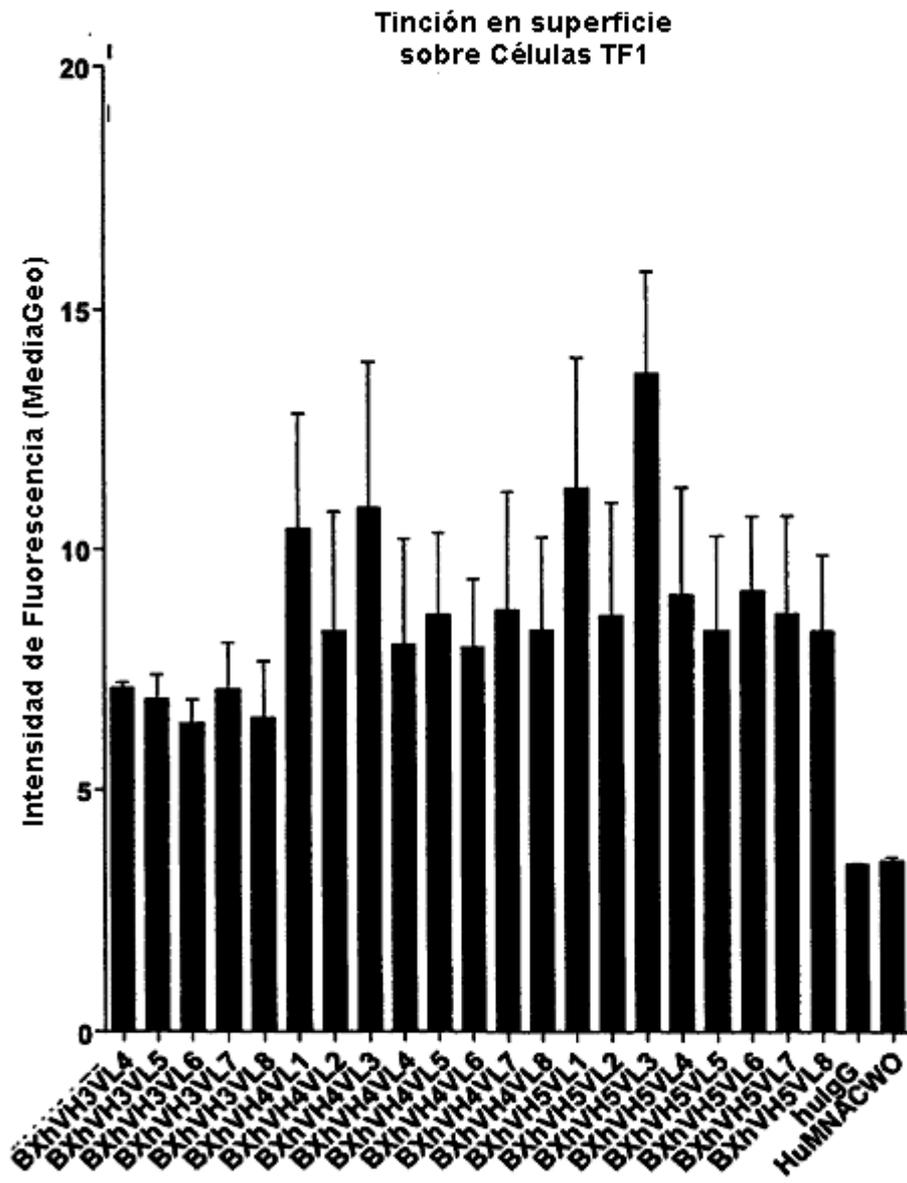


Figura 4

Unión a TF1

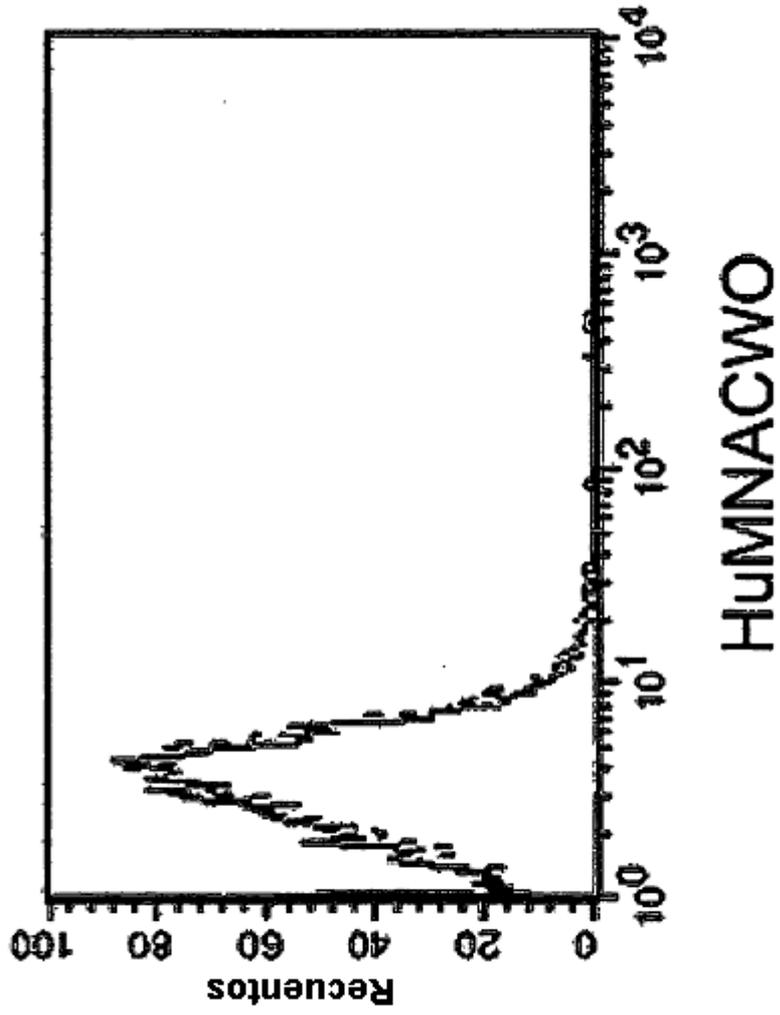


Figura 4 (cont.)

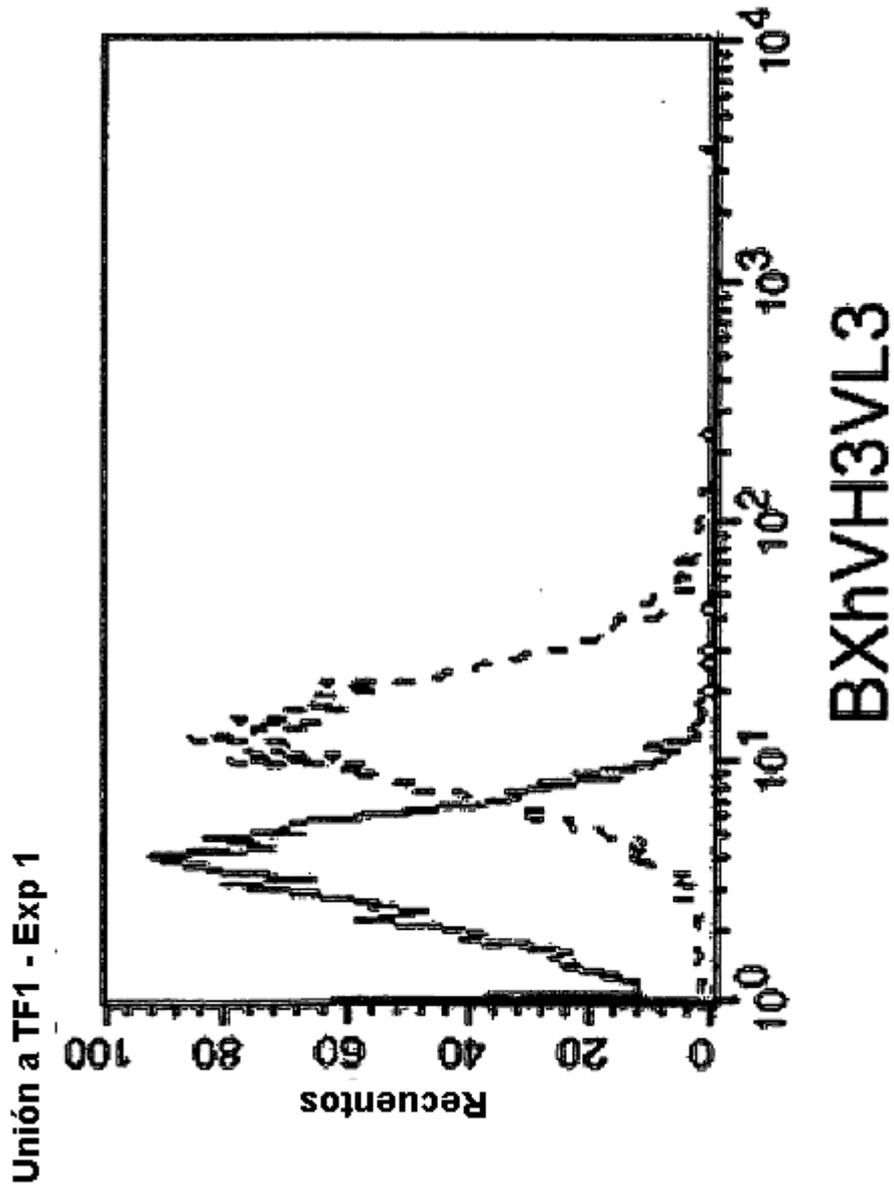
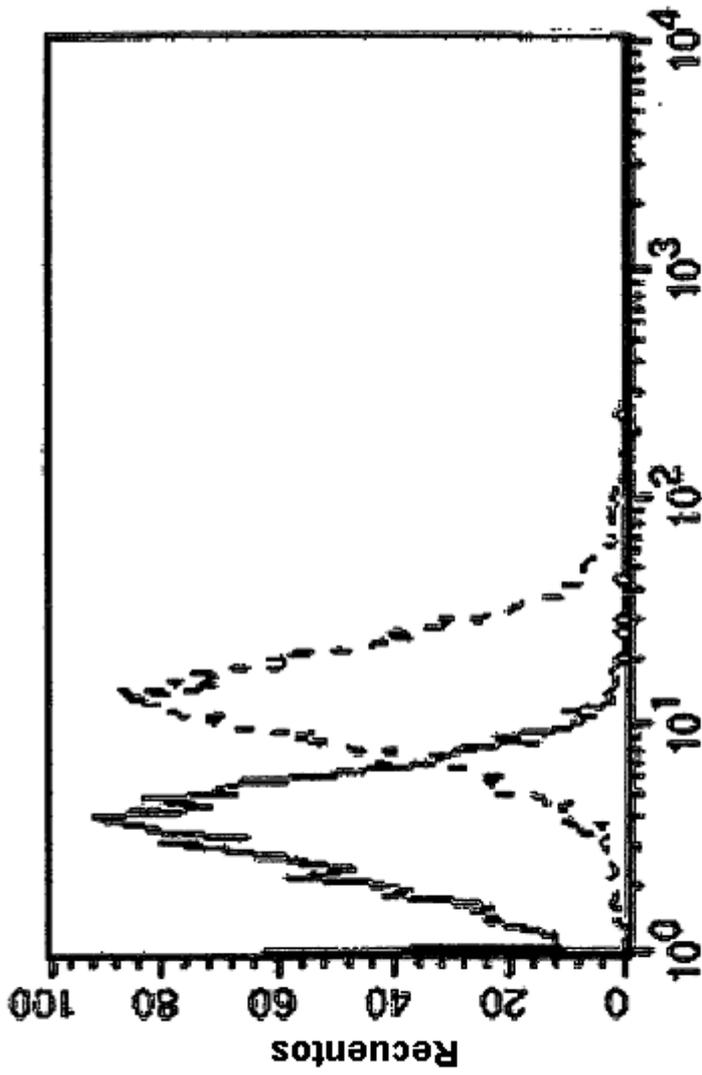


Figura 4 (cont.)

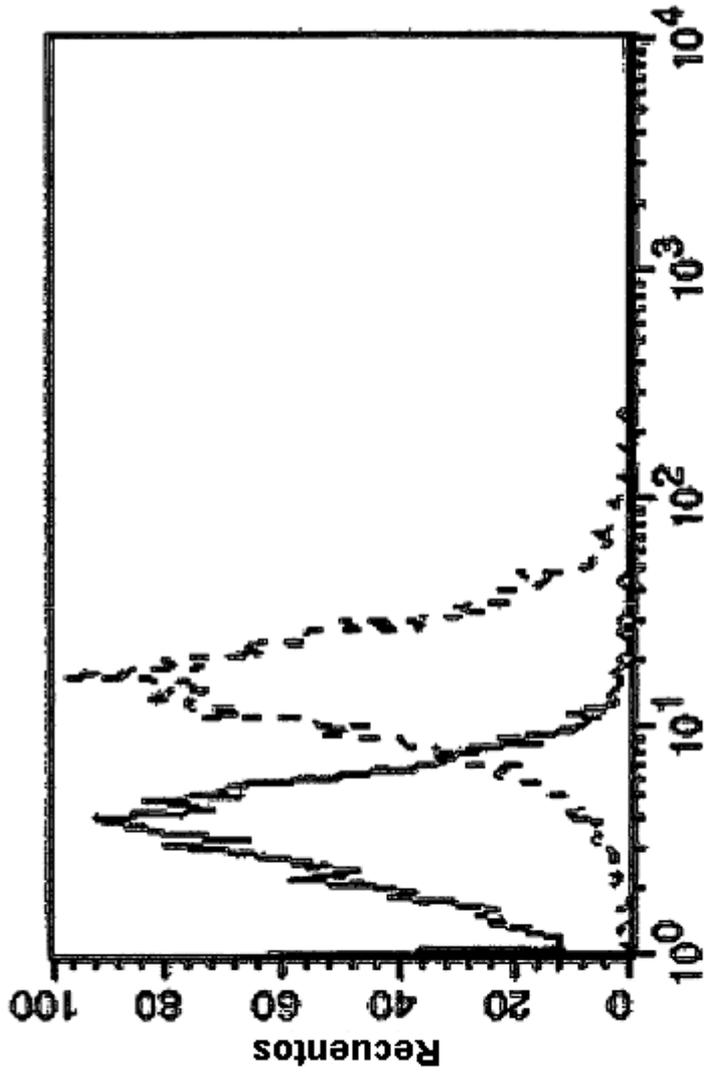
Unión a TF1 - Exp 1



BXhVH5VL1

Figura 4 (cont.)

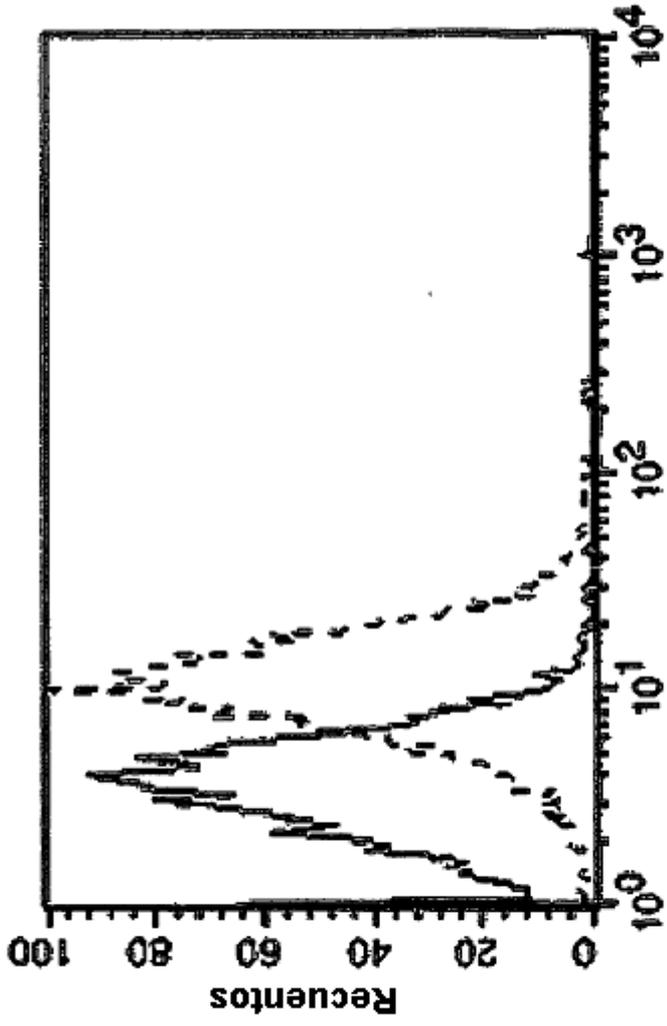
Union a TF1 - Exp 1



BXhVH5VL3

Figura 4 (cont.)

Unión a TF1 - Exp 1



HUMNACWOV

Figura 4 (cont.)

Unión a TF1 - Exp II

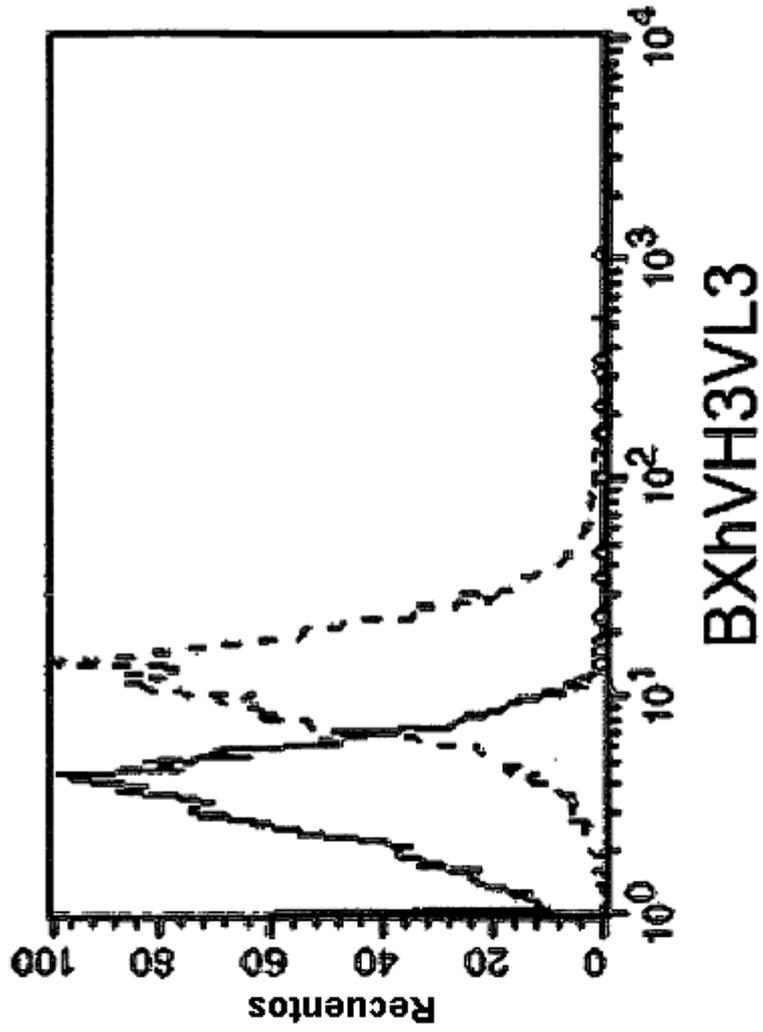


Figura 4 (cont.)
Unión a TF1 - Exp II

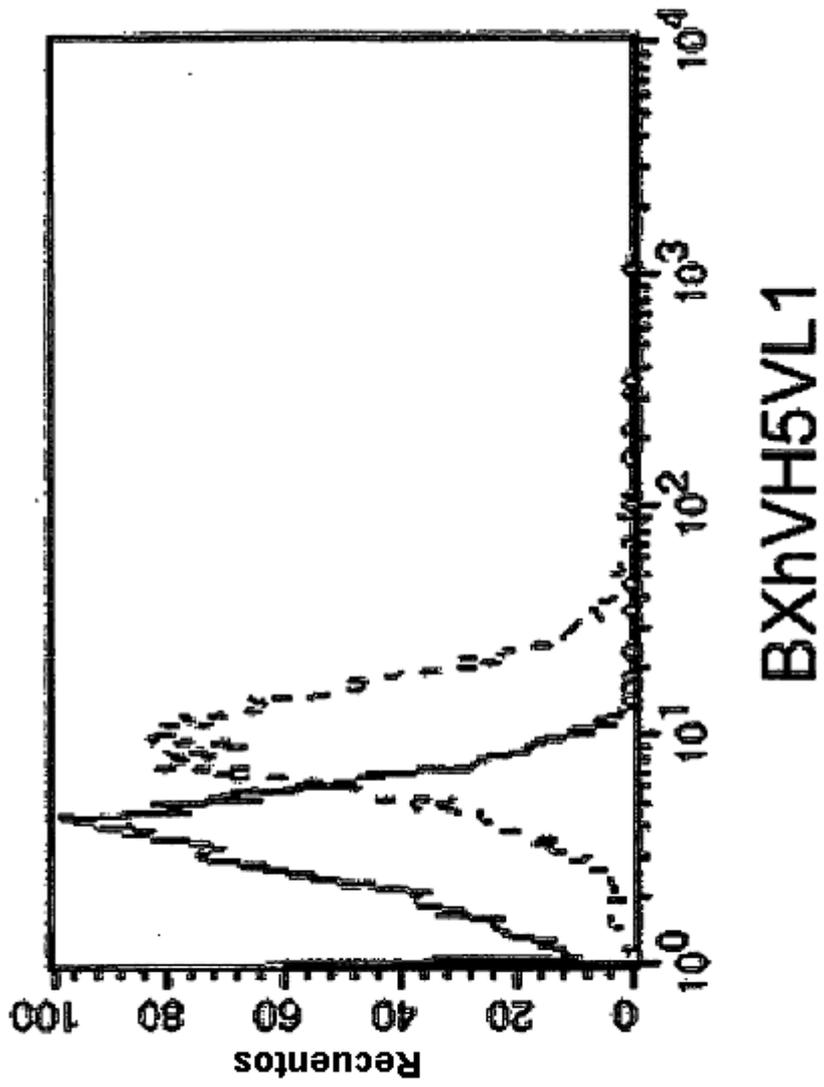


Figura 4 (cont.)

Unión a TF1 - Exp II

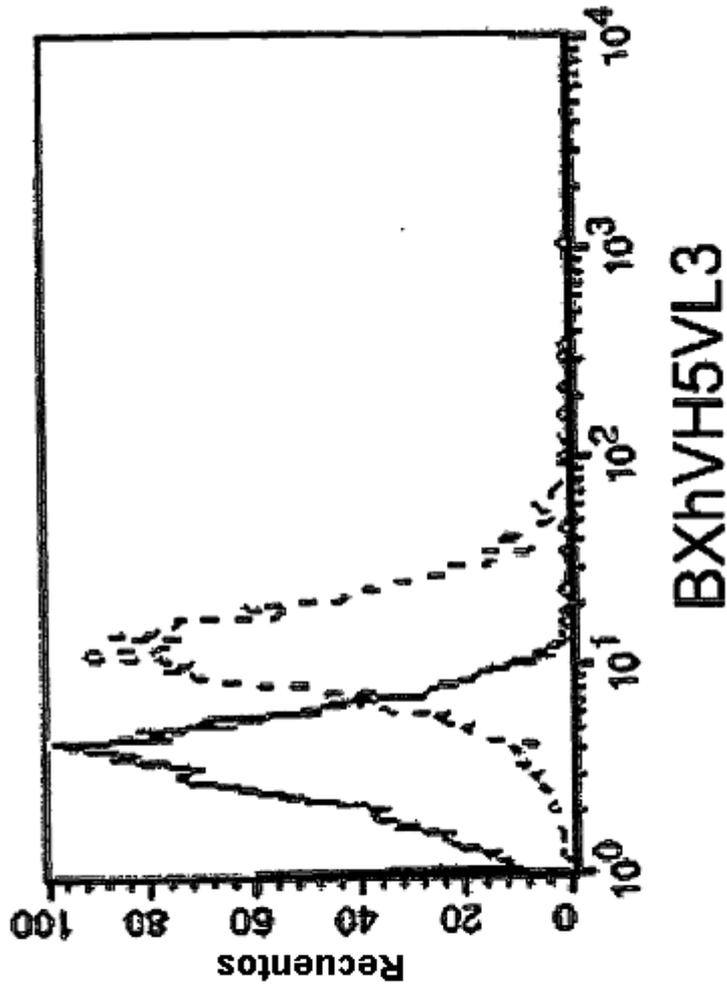
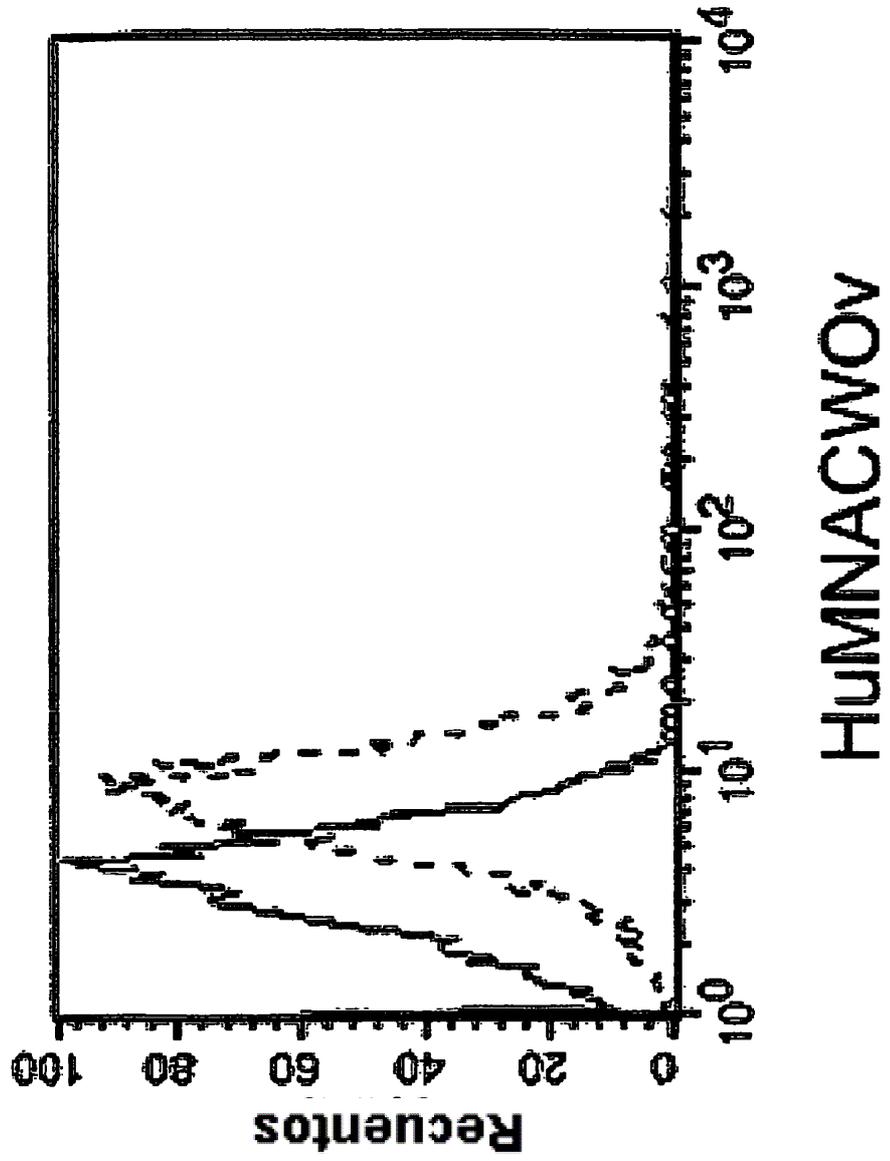


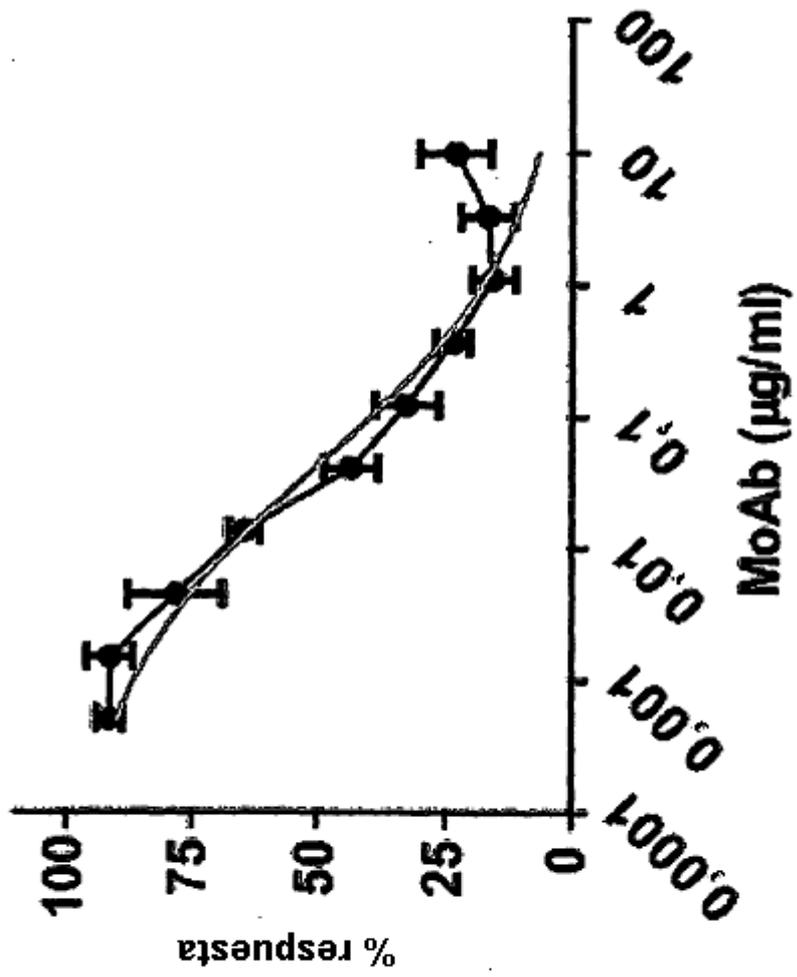
Figura 4 (cont.)
Unión a TF1 – Exp II



MuMNACEP

Figura 5

Ensayo de Proliferación en TF1



ChimMNAC13

Figura 5 (cont)

Ensayo de Proliferación en TF1

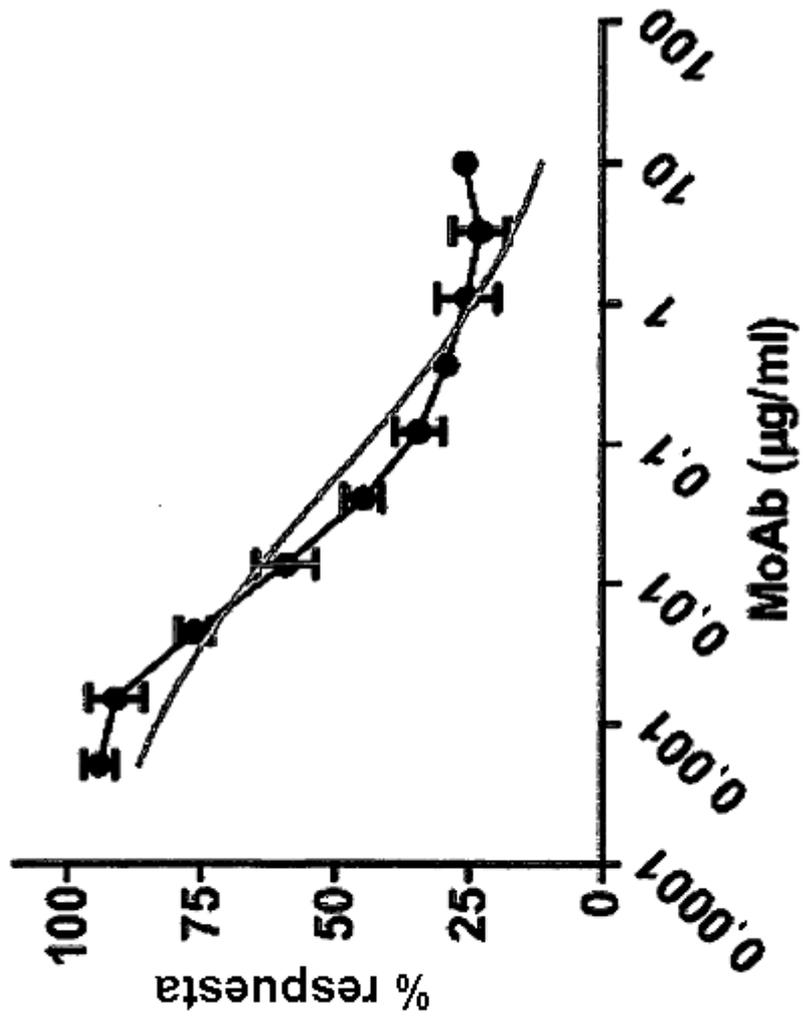


Figura 5 (cont.)
Ensayo de Proliferación en TF1
BXhVH5VL1

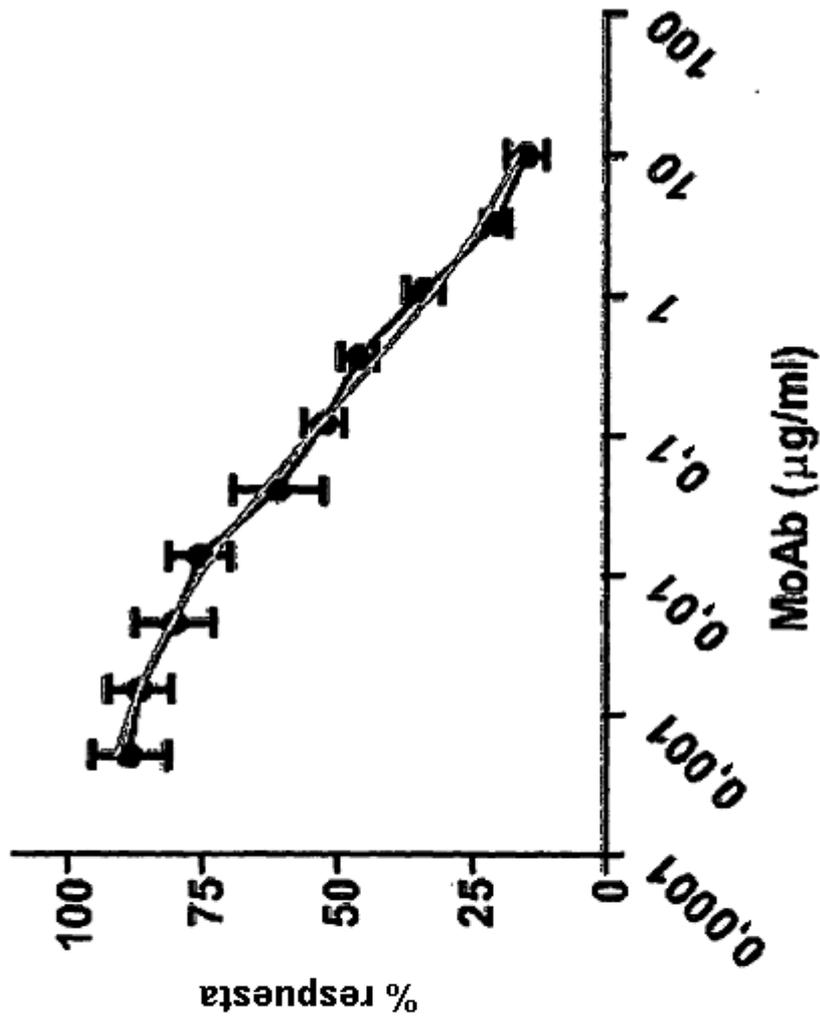


Figura 5 (cont.)
Ensayo de Proliferación en TF1
BXlhVH3VL3

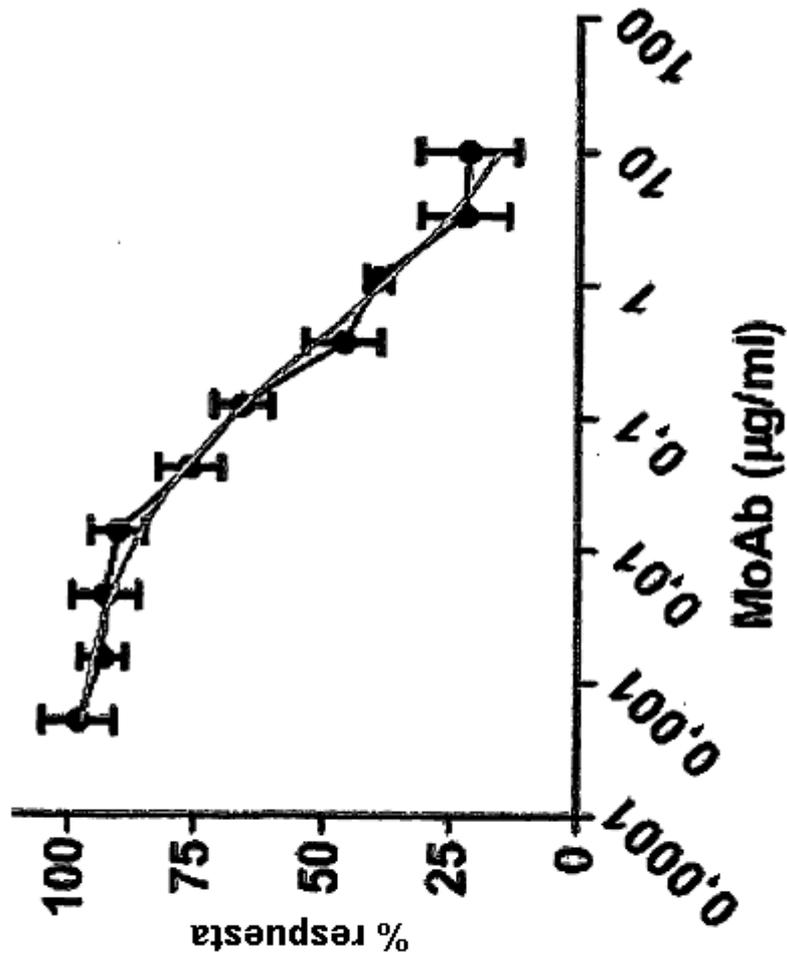


Figura (cont.)

Ensayo de Proliferación en TF1

BXhVH5VL3

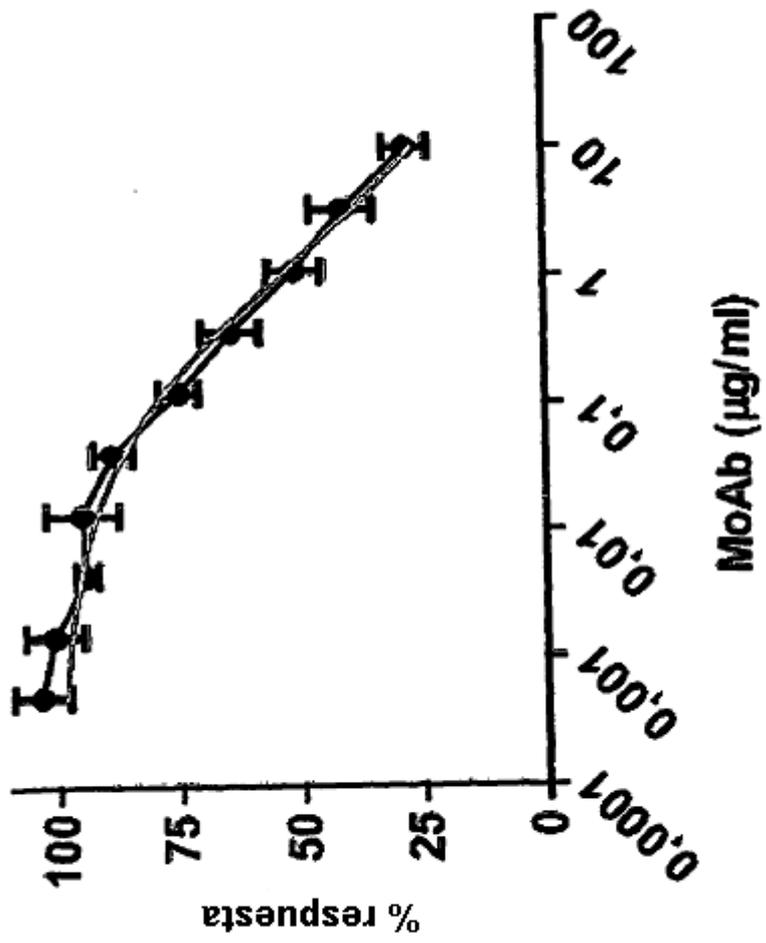


Figura 5 (cont.)

Ensayo de Proliferación en TF. HUMNACWO

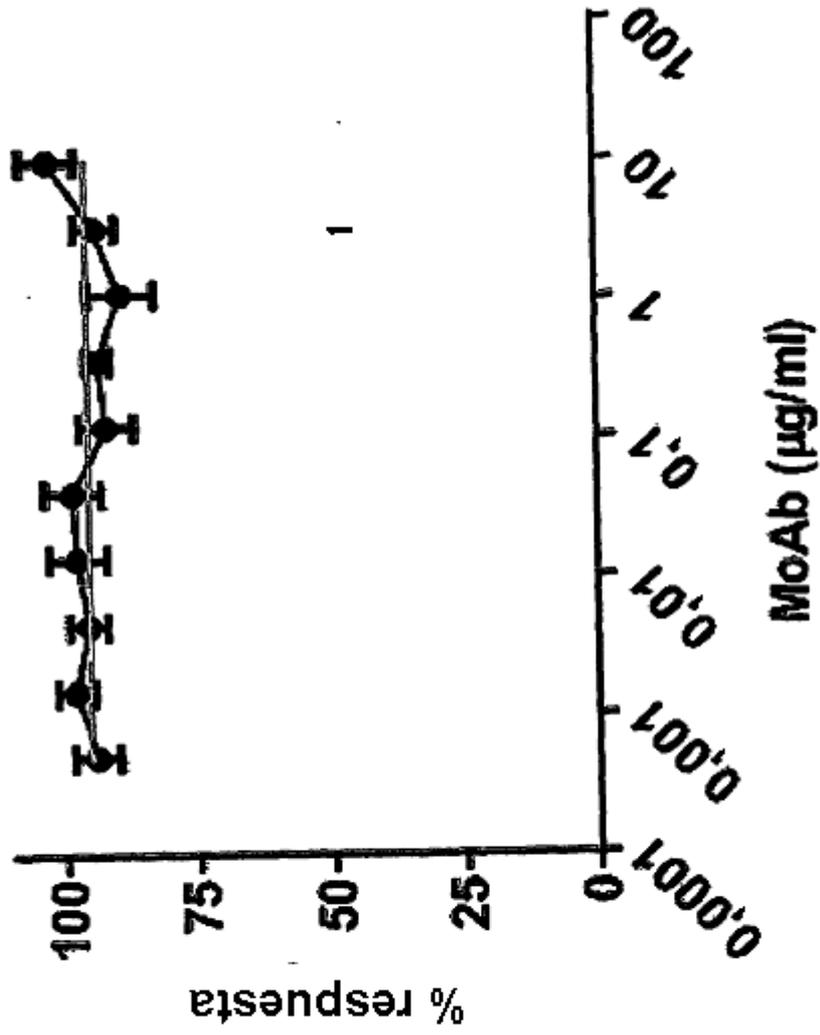


Figura 5 (cont.)

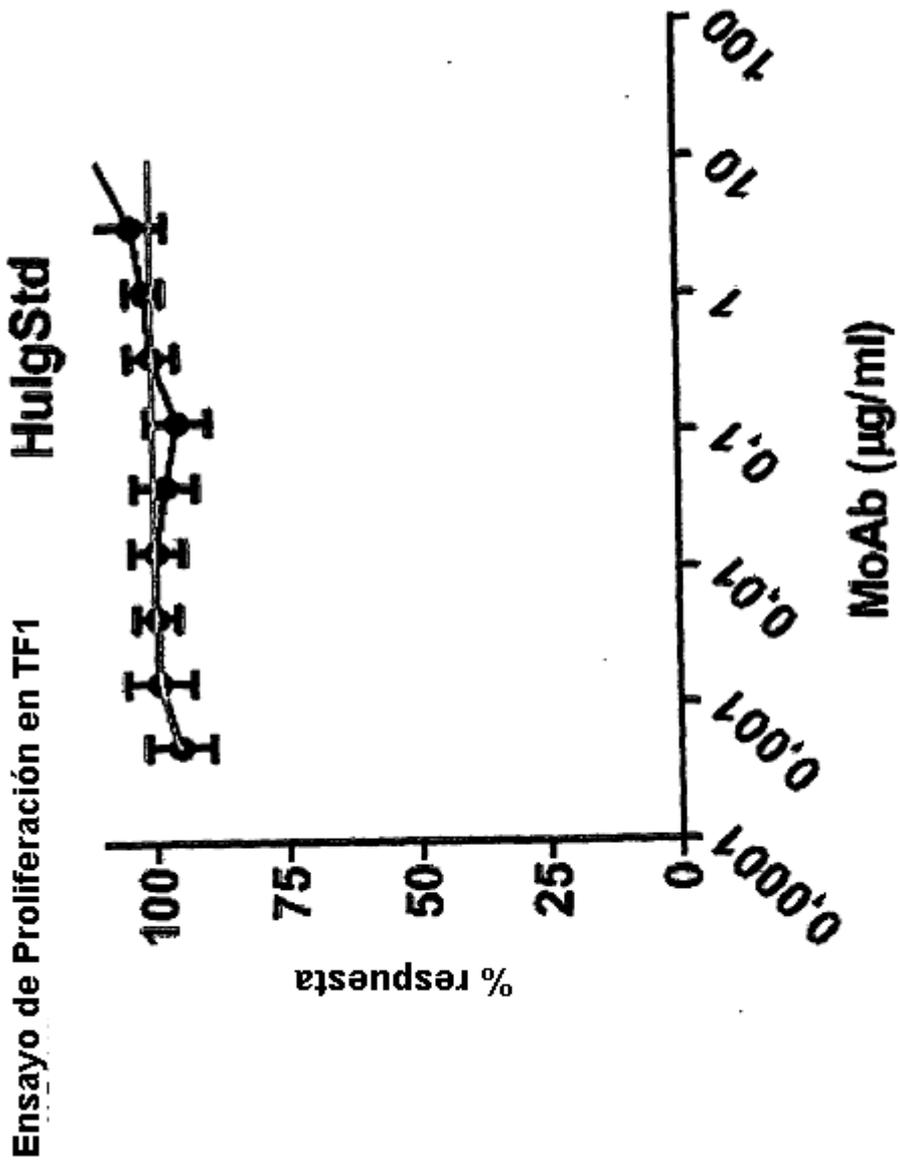


Figura 6

BXhVH5 cadena pesada con región constante
 EVKLLSEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFSTY^TMSWVRQTPGK
 RLEWAYISKGGSTY^PDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA
 EDTAVY^CCARGAMYGNDFY^PMDYWGQGT^TTVSSASTKGPSV
 FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP^TTVSWNSGALTSGVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSV^TVPSSSLGTQ^TYICNVNHKPSNTKVDKKV
 EPKSCDK^THTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
 CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK^TISKAKGQPREPQV
 YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTV^DKSRWQQGNV^FSCSVMHEGLHNHYT
 QKLSLSLSPGK

BXhVL1 cadena ligera con región constante
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSV^SYMHWYQQKPKGQAPRL
 LIYTTSNLASGIPARFSGSGGTDFLT^ISSLEPEDFAVY^YYCHQWS
 SYPWTFGGQGTKLEIK^RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV^VCLLN
 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK^DSTYSLSSTLTL
 SKADY^EKHKVYACEVTHQGLSSPVT^KSFNRGEC

Figura 7

BXhVH5 N297A cadena pesada con región constante

EVKLL ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTY TMSWVRQTGKRL^{EWVAYISKGGG}STYYPD^{TV}
 KGRFTISRDN SKNTLYLQMN^{SLRAEDTAVYYCARGAMYGNDF}FFPMDYWGQ^{TTVTVSSA}ST^{KG}
 PSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT^{VS^WNSGALTS}GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV^V
 TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK^{HTCP}PAPELLGGP^SVFLFPPKPK^{DDT}
 LMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ^{YA}STYRVVSVLTVLHQD^{WL}
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI^{SKAKGQPREPQVY}TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD^{IA}
 VEWESNGQPENNYK^{TPPVLDSDGSFF}LYSKLTVDKSRWQQGNV^{FSC}VMHEGLHNHYT^{QKS}LS
 LSPGK

Figura 8

TF1

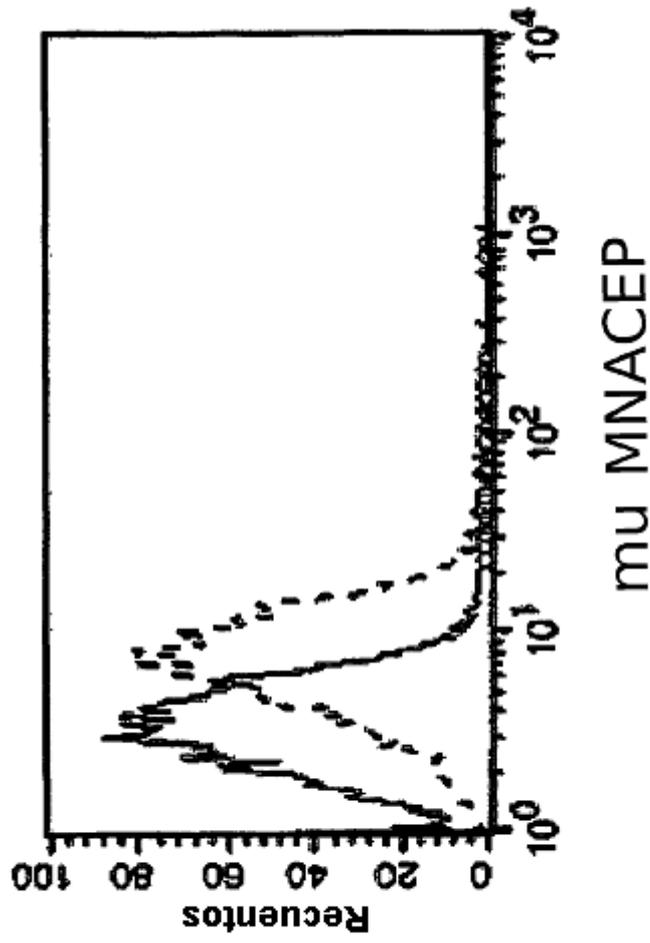


Figura 8 (cont.)

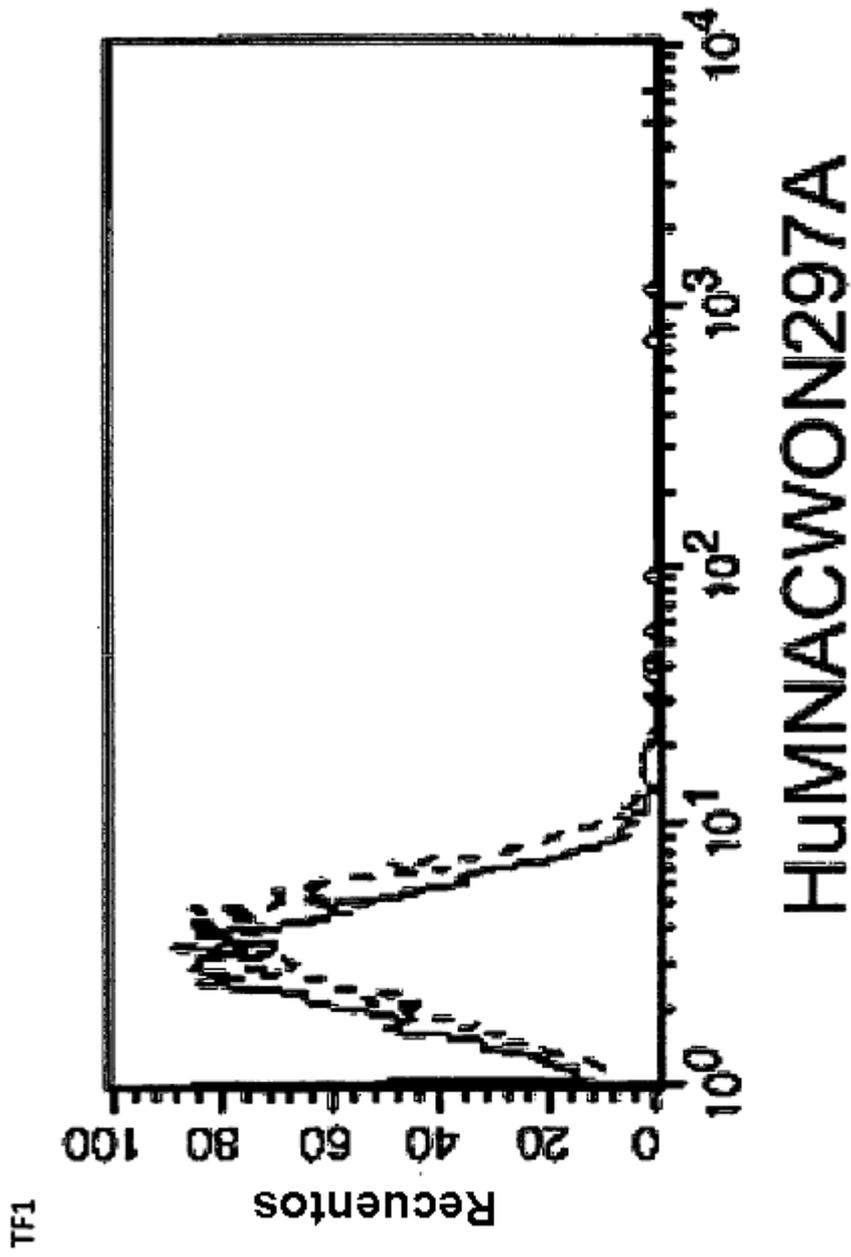


Figura 8 (cont.)

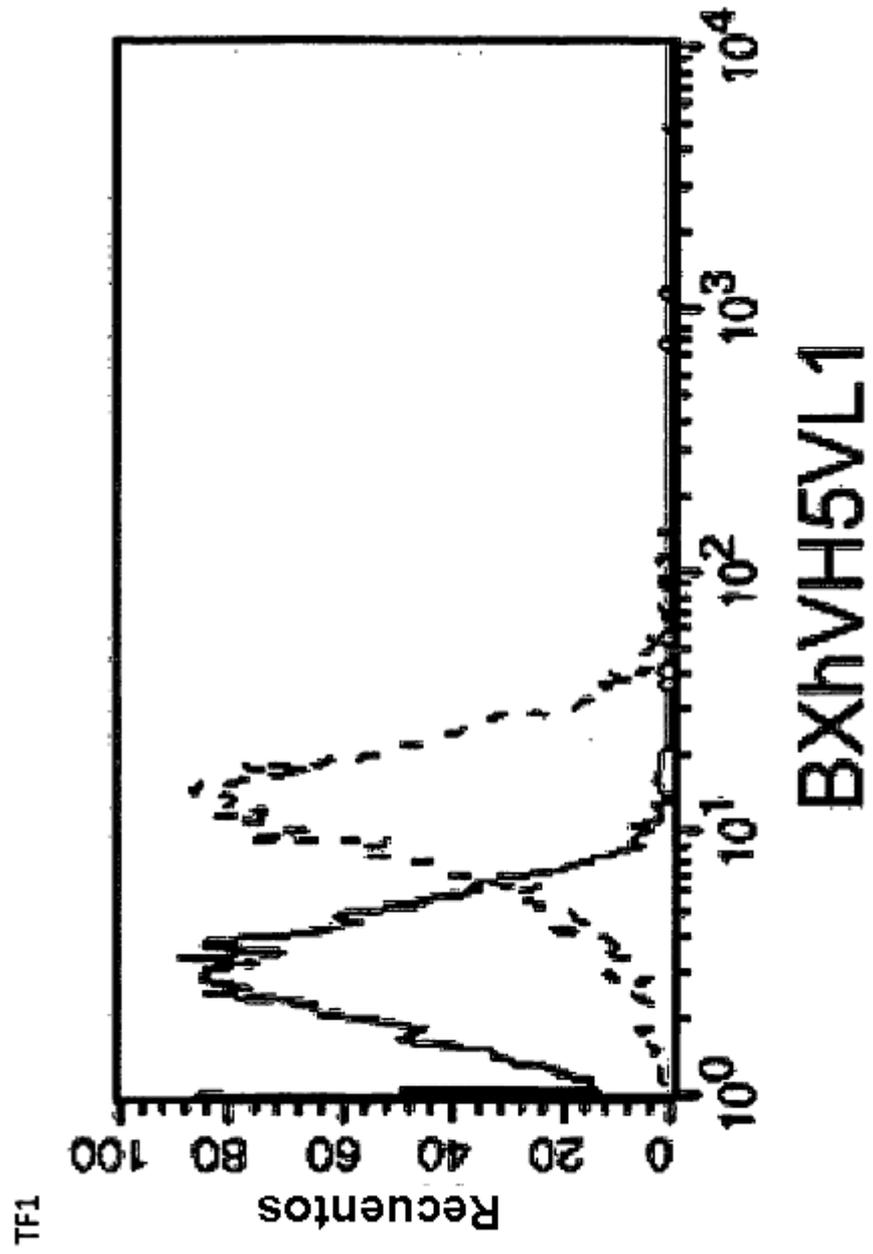
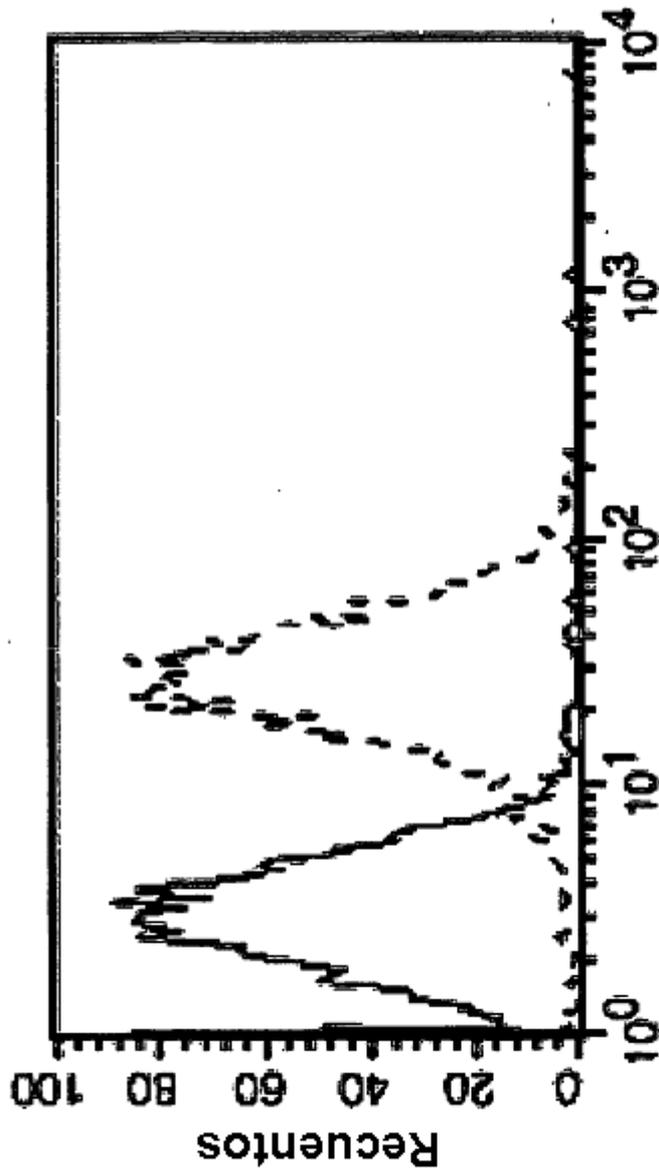


Figura 8 (cont.)

TF1



BXhVH5VL1N297A

Figura 8 (cont.)

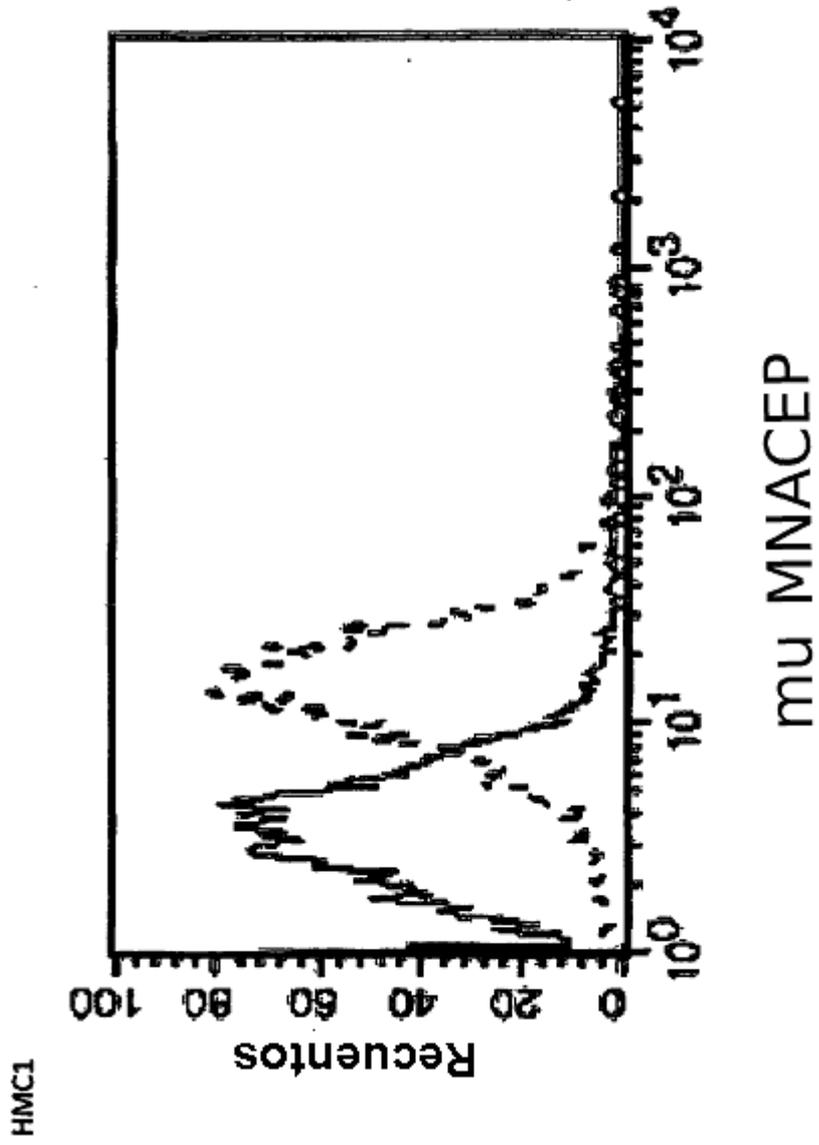


Figura 8 (cont.)

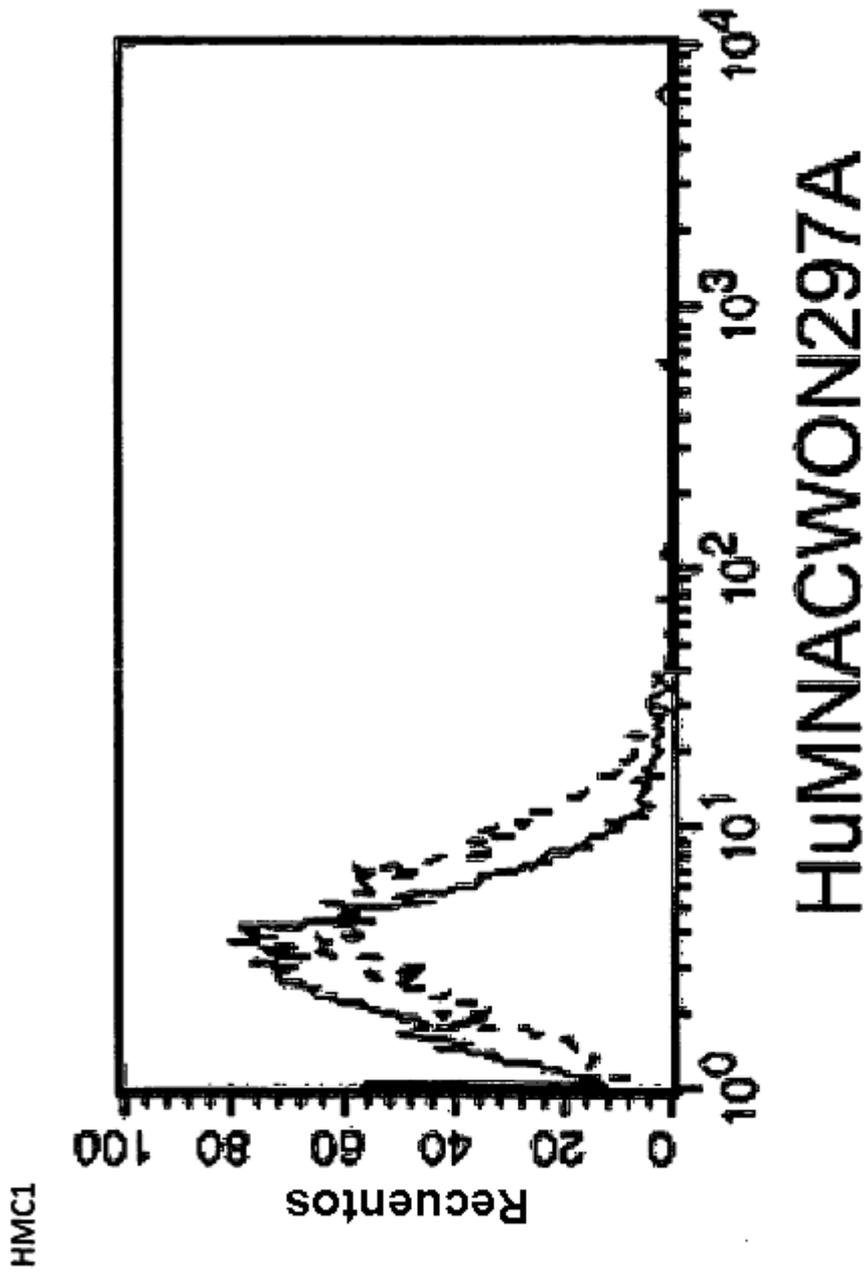


Figura 8 (cont.)

HMC1

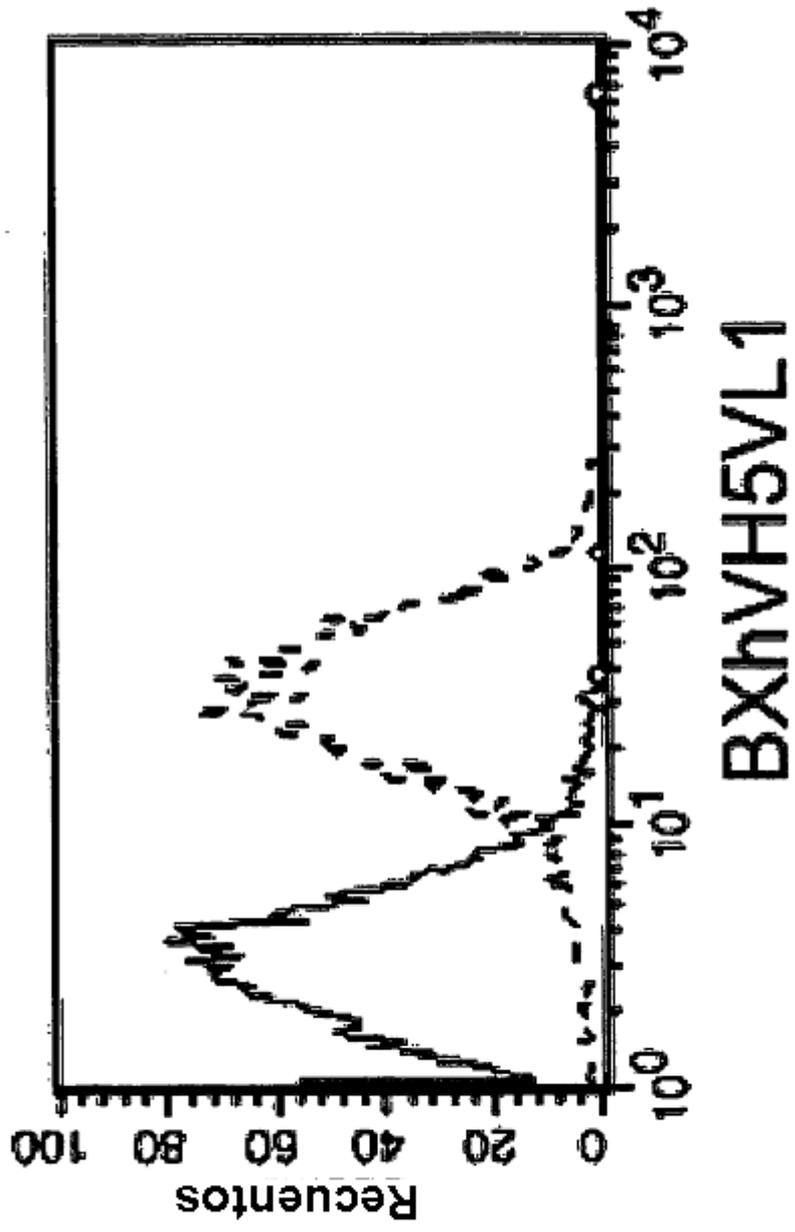
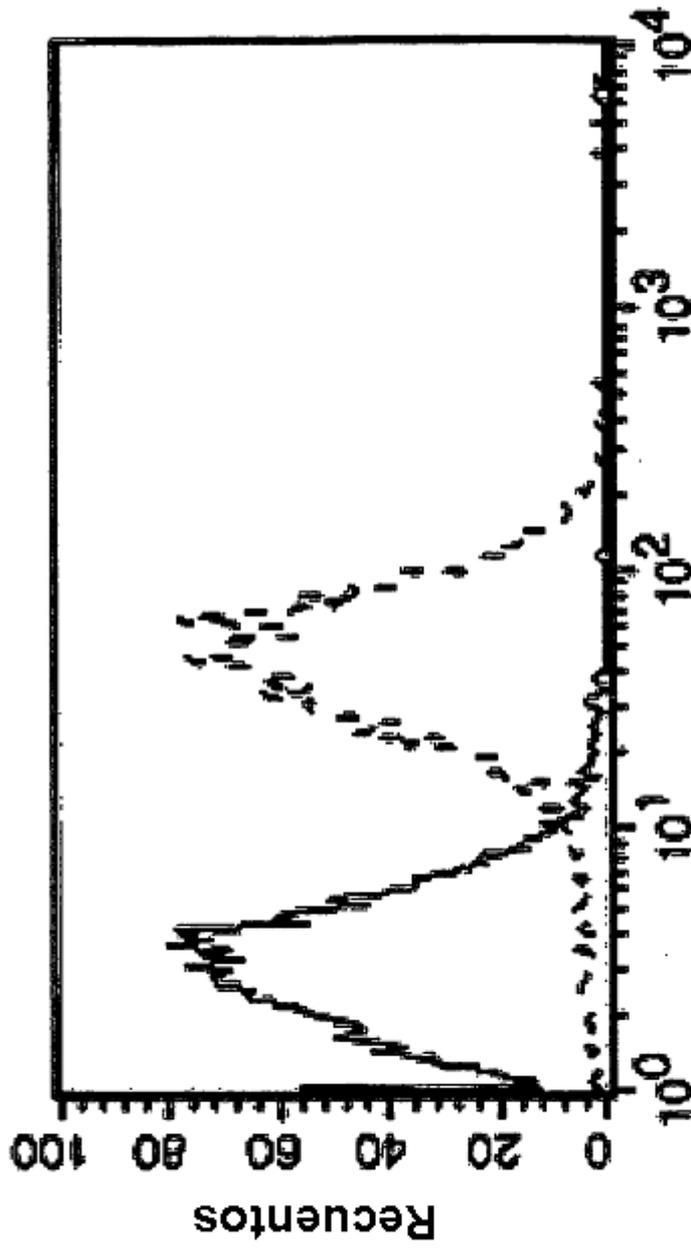


Figura 8 (cont.)

HMC1



BXhVH5VL1N297A

Figura 8 (cont.)

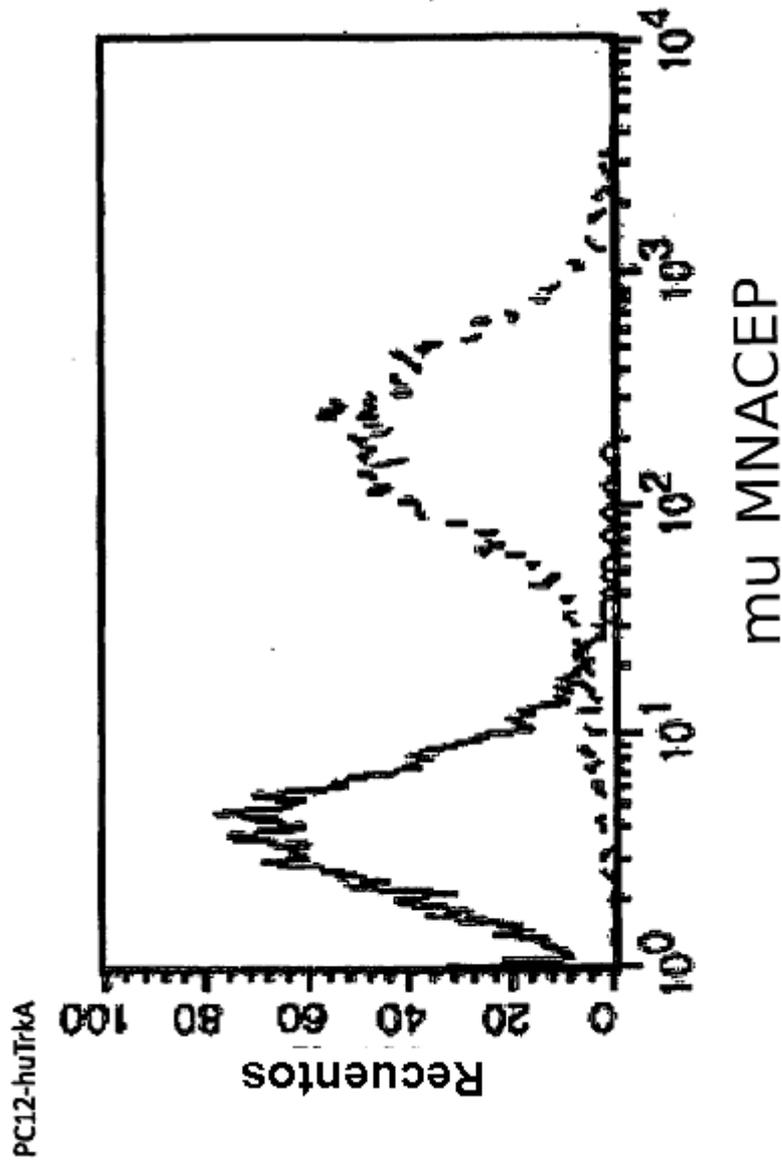


Figura 8 (cont.)

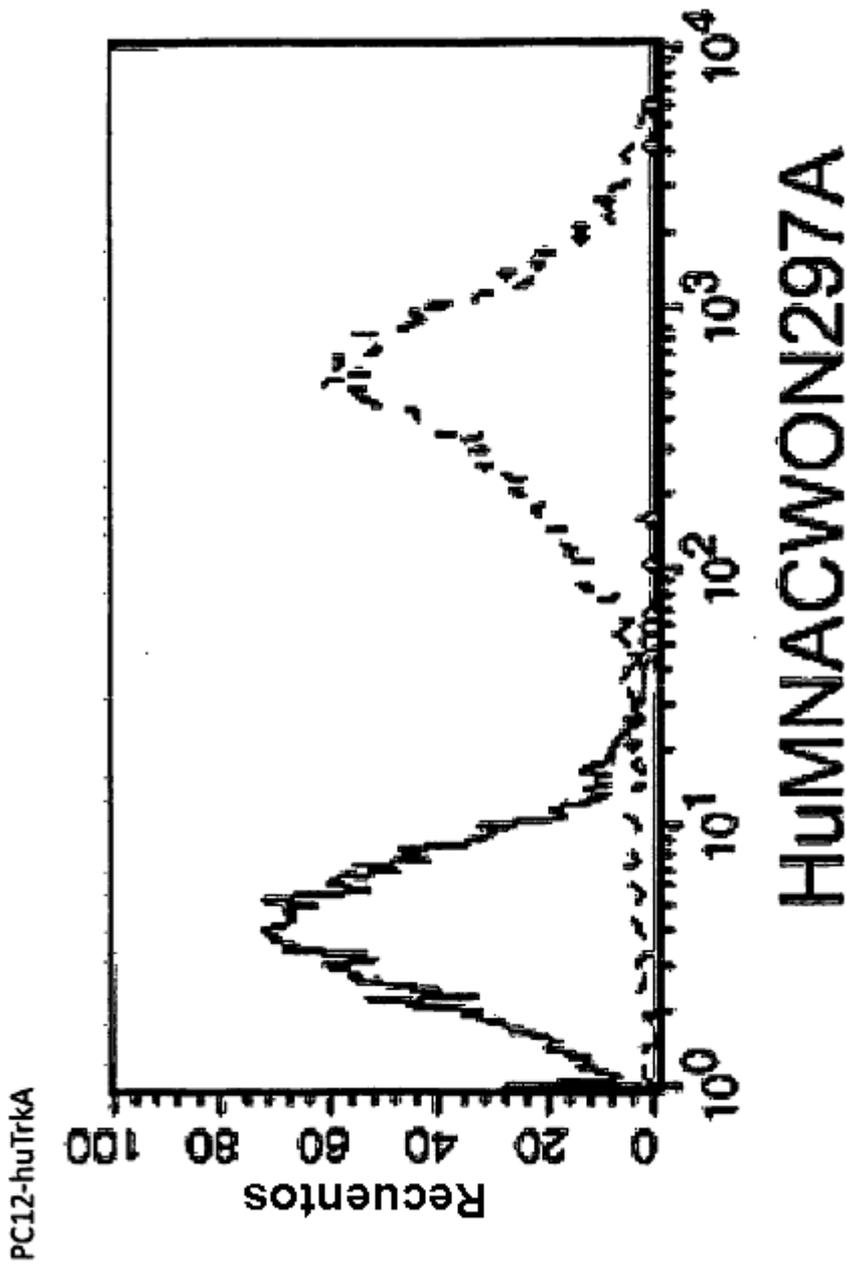


Figura 8 (cont.)

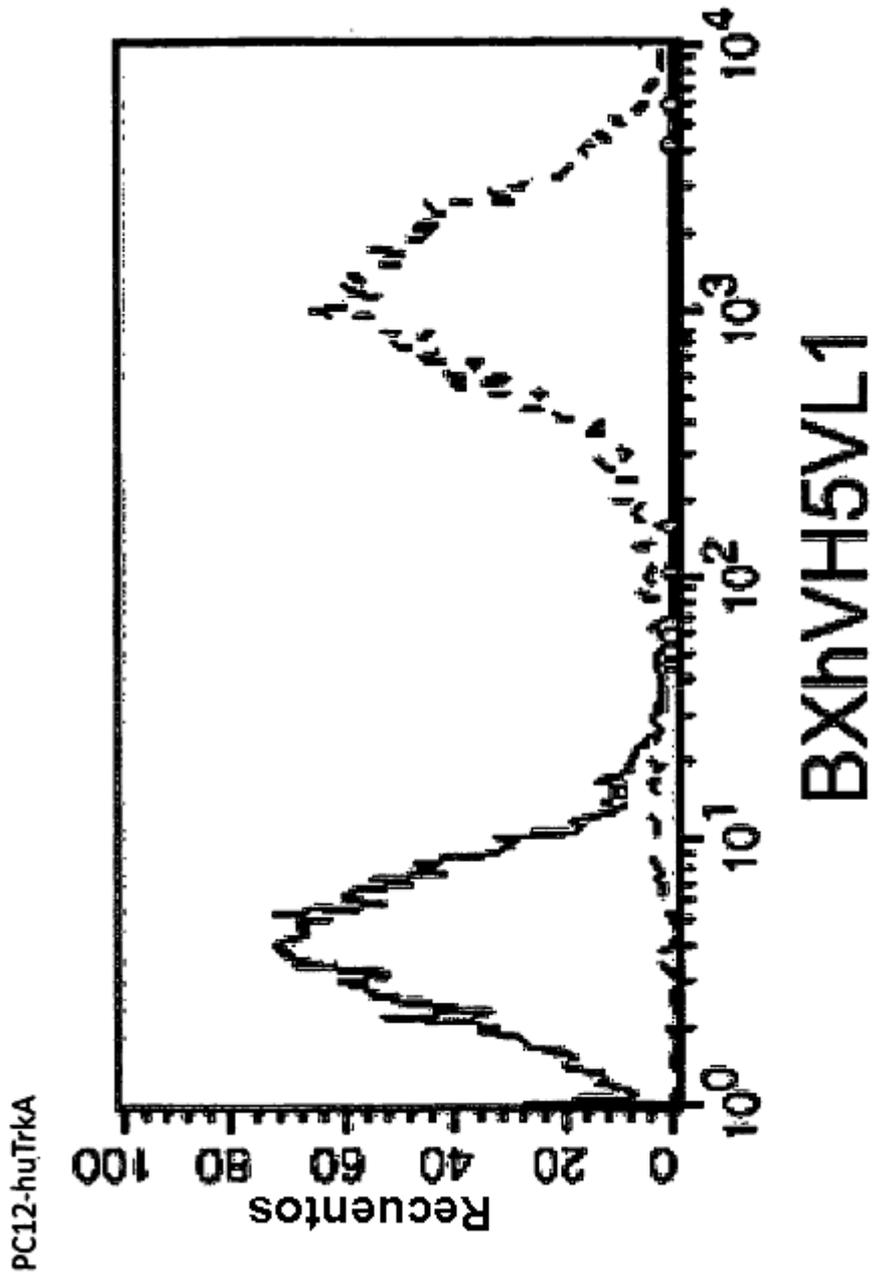


Figura 8 (cont.)

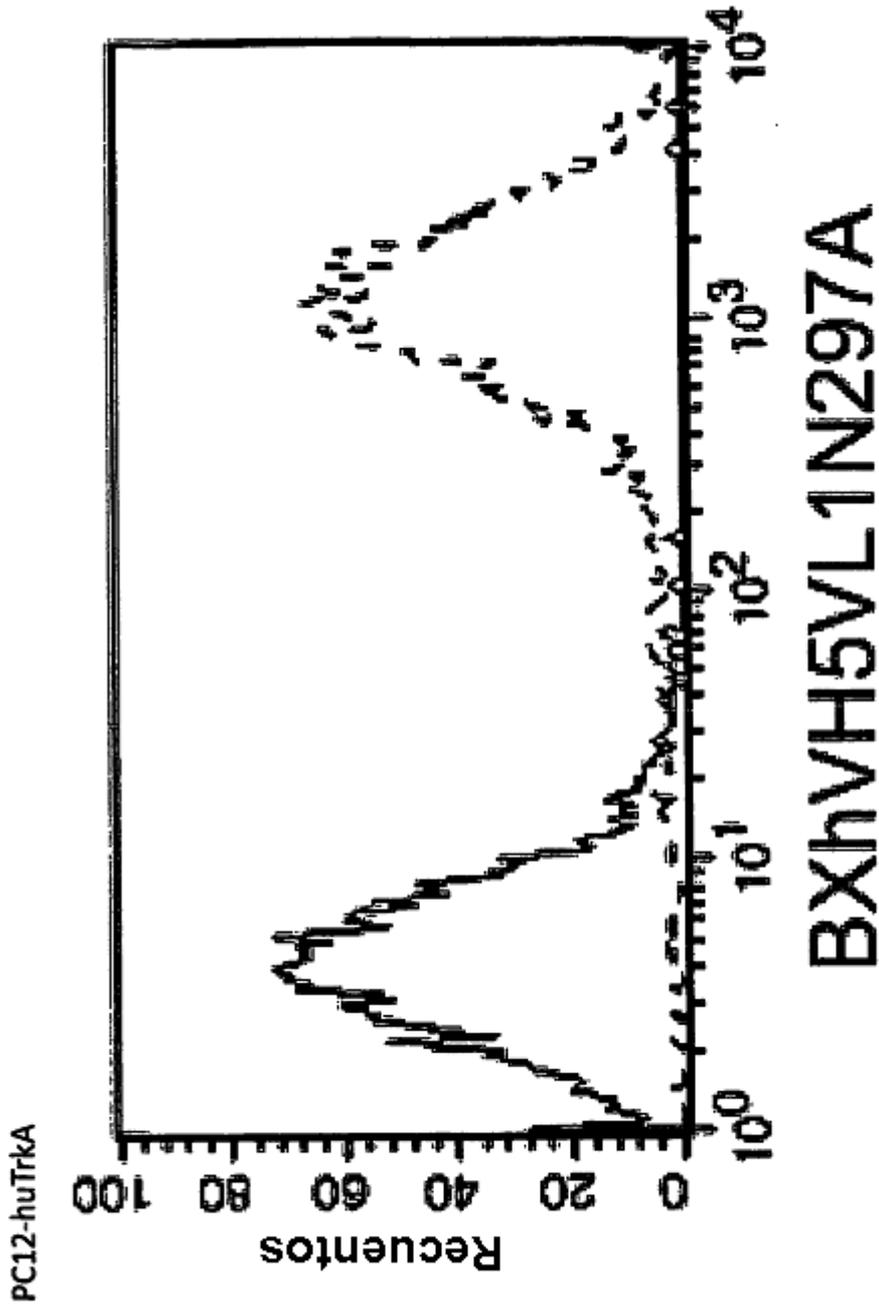


Figura 9

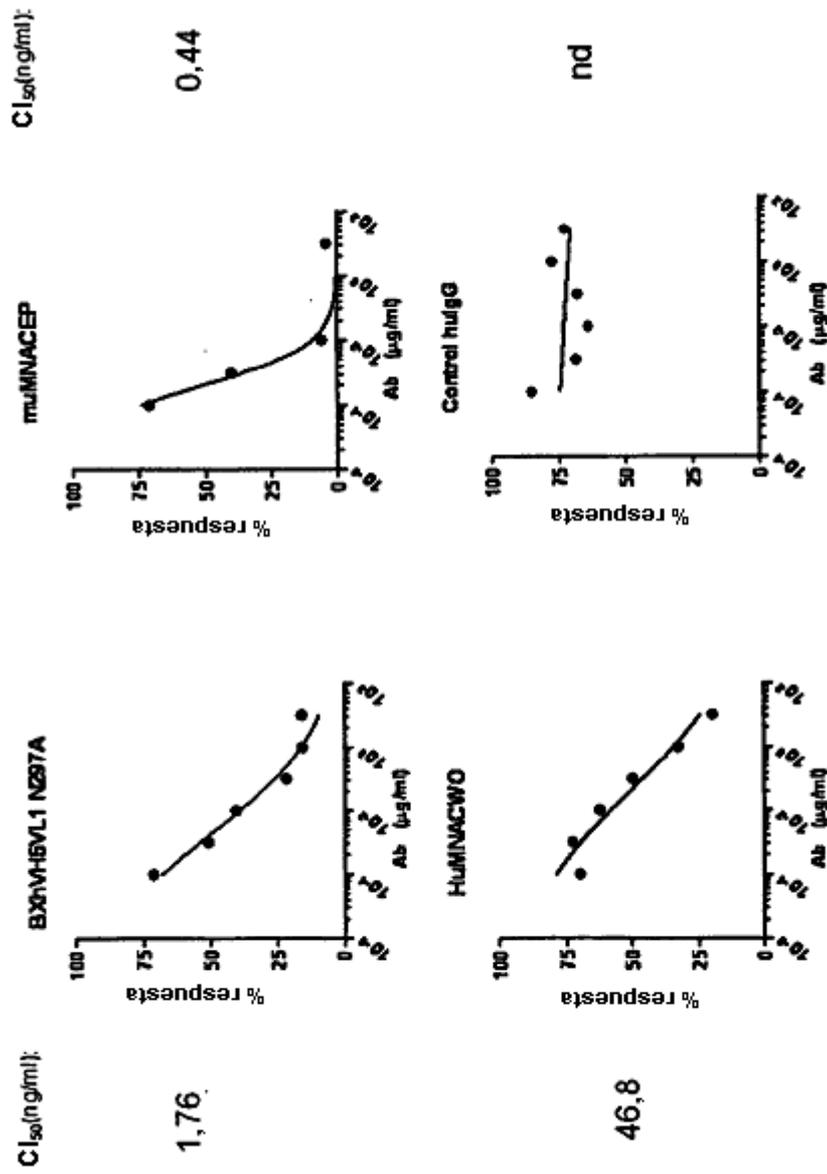


Figura 10

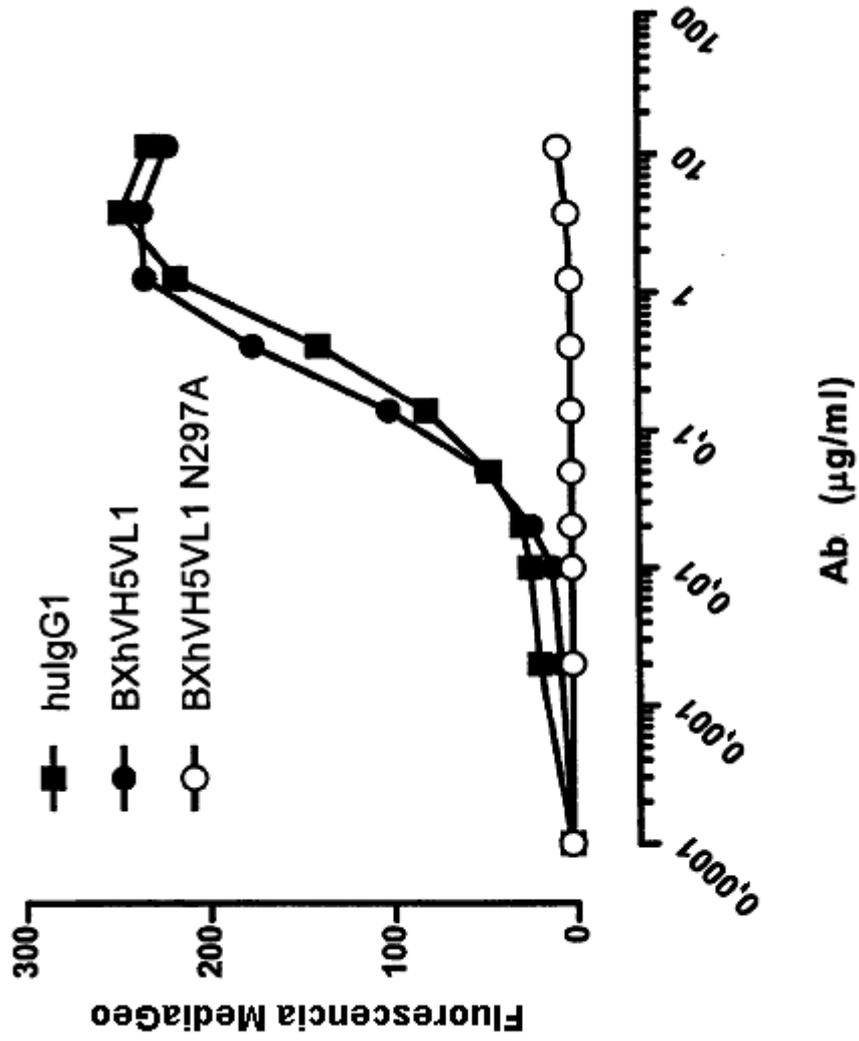


Figura 11

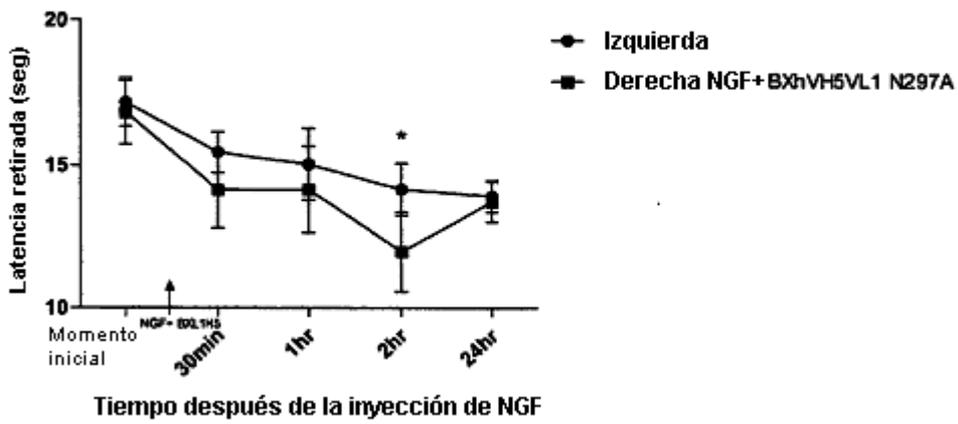
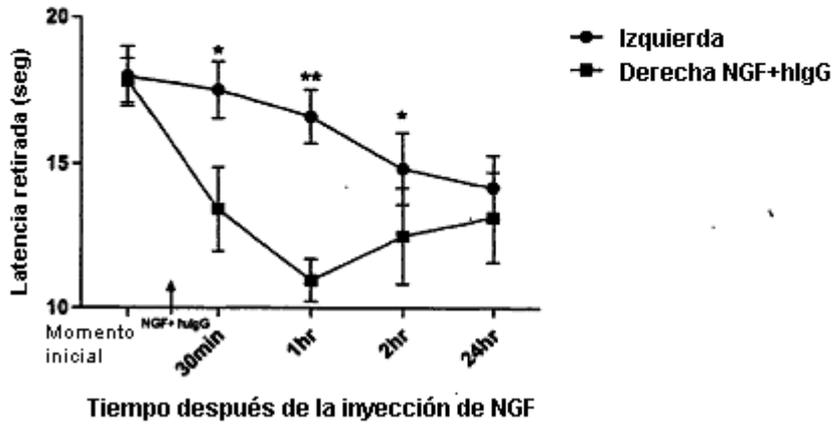


Figura 12

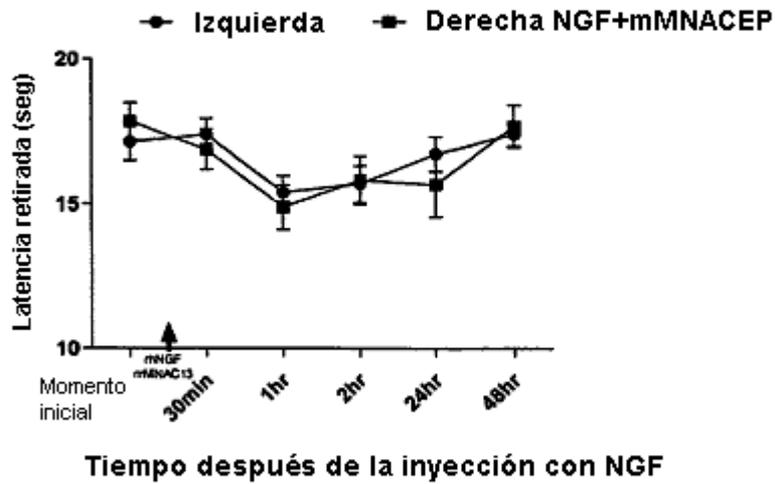
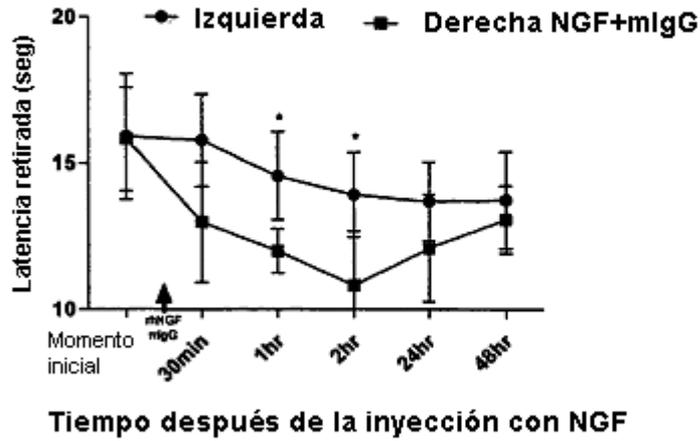


Figura 13

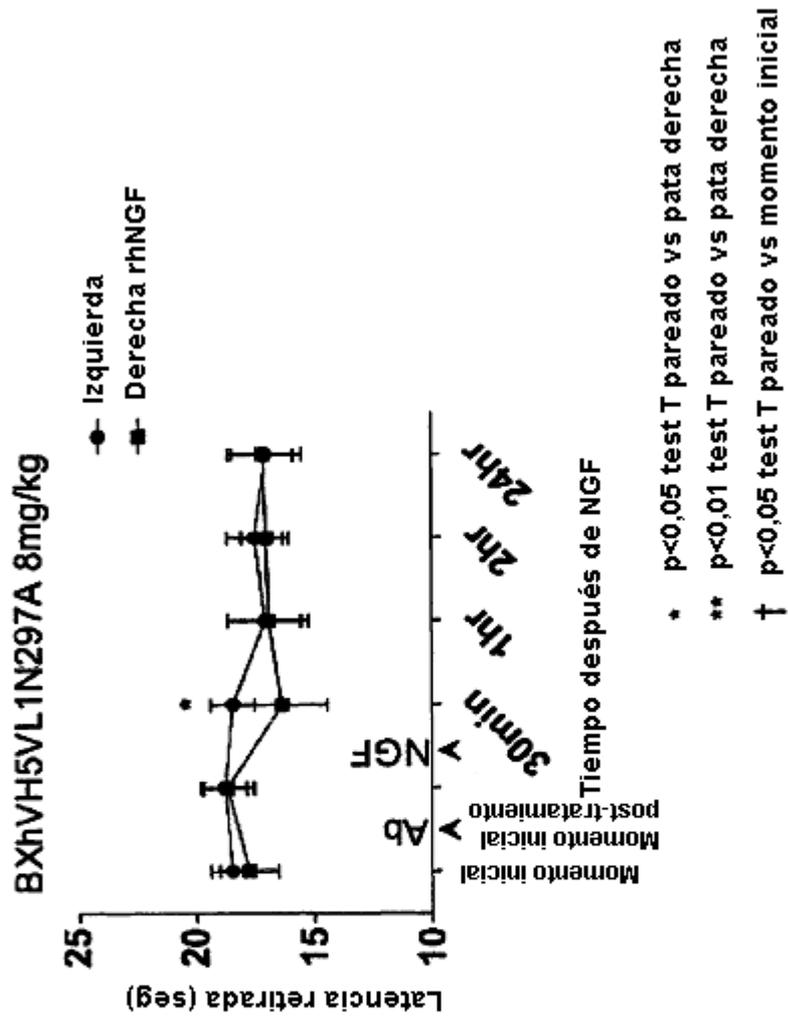
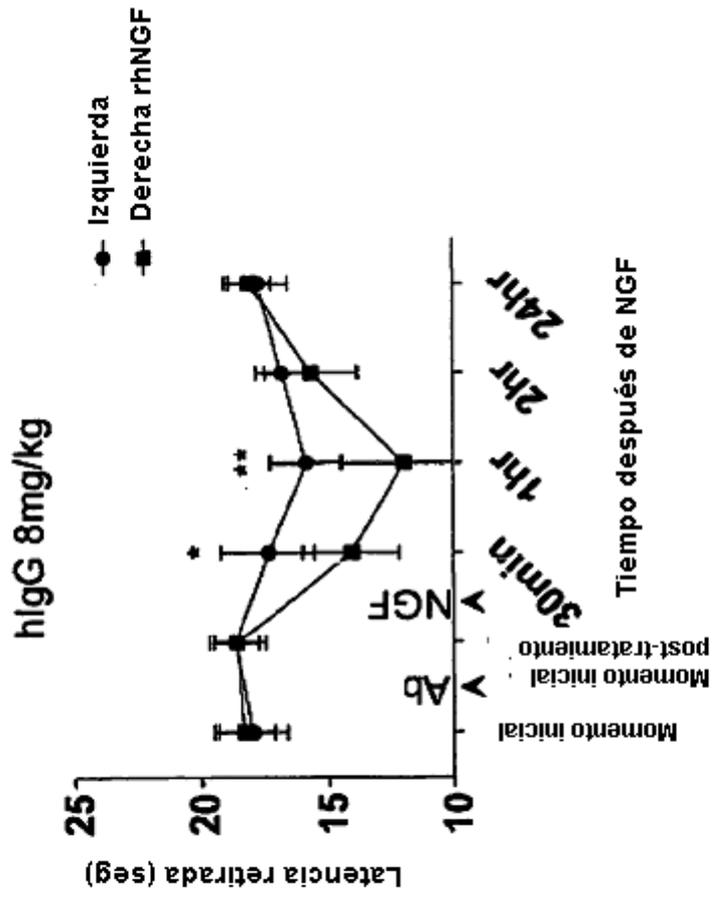


Figura 13 (cont.)



- * p<0,05 test T pareado vs pata derecha
- ** p<0,01 test T pareado vs pata derecha
- † p<0,05 test T pareado vs momento inicial

Figura 13 (cont.)

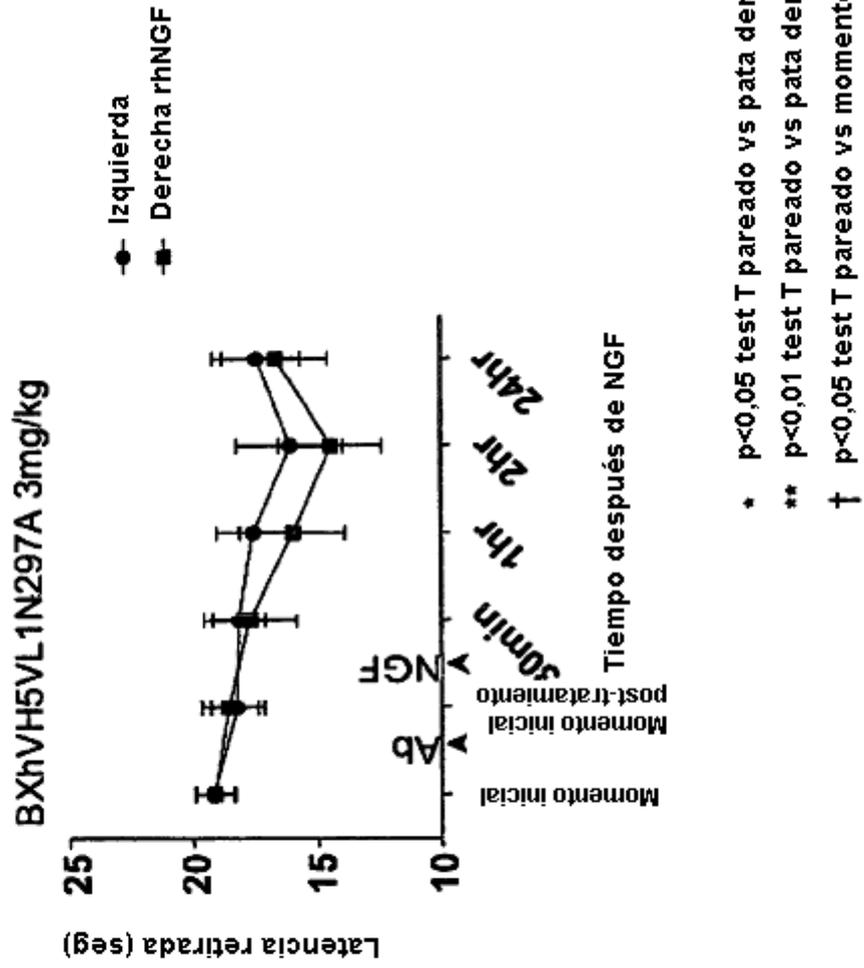


Figura 13 (cont.)

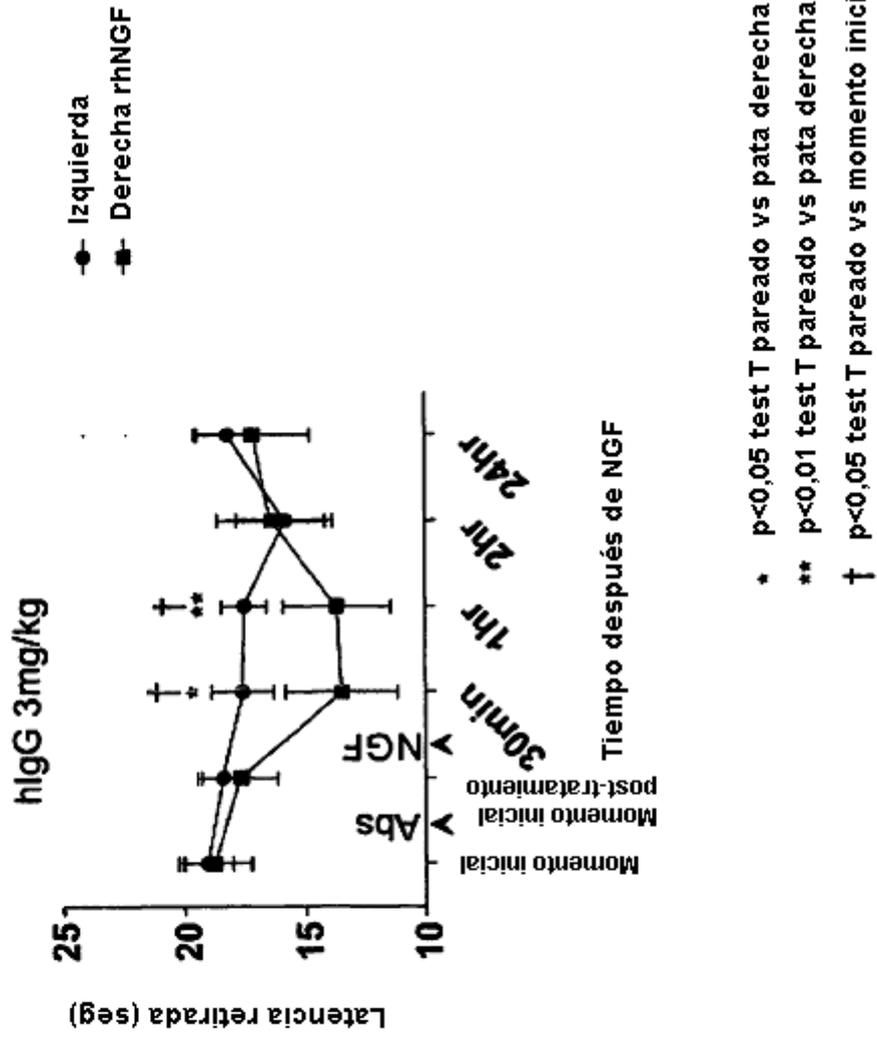


Figura 13 (cont.)

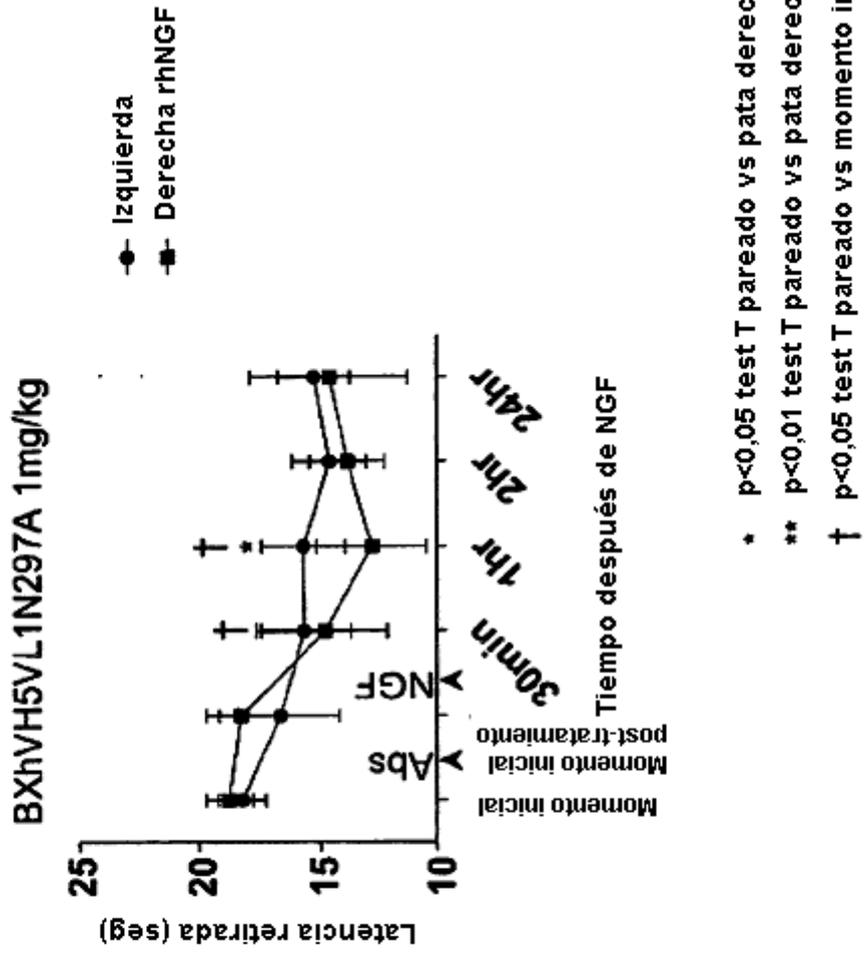
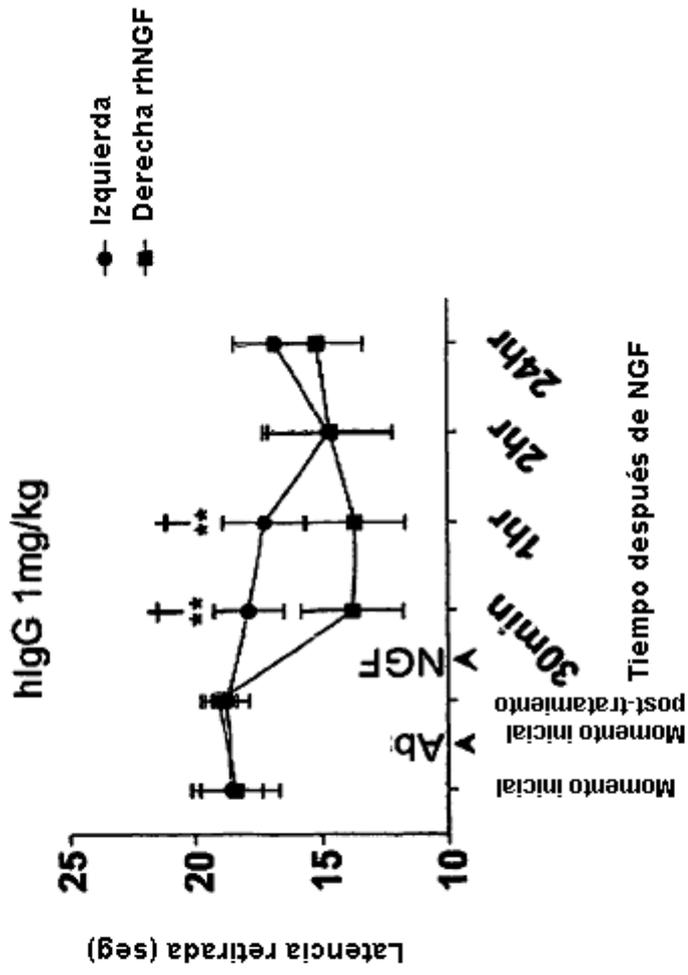
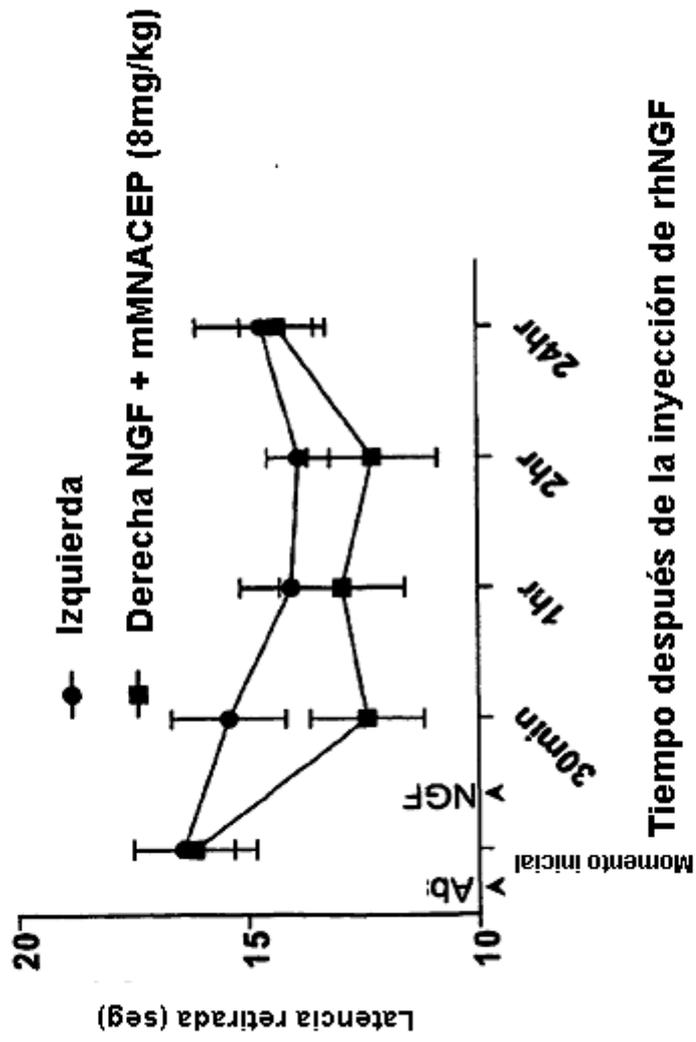


Figura 13 (cont.)



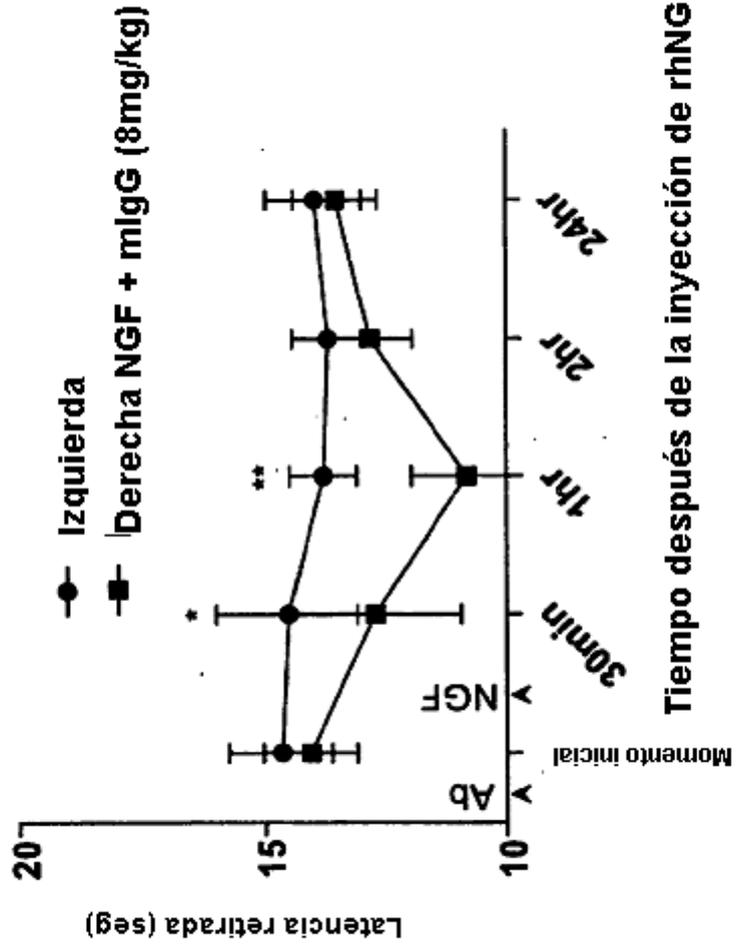
- * p<0,05 test T pareado vs pata derecha
- ** p<0,01 test T pareado vs pata derecha
- † p<0,05 test T pareado vs momento inicial

Figura 14



* p < 0,05 test T pareado vs pata derecha
 ** p < 0,01 test T pareado vs pata derecha

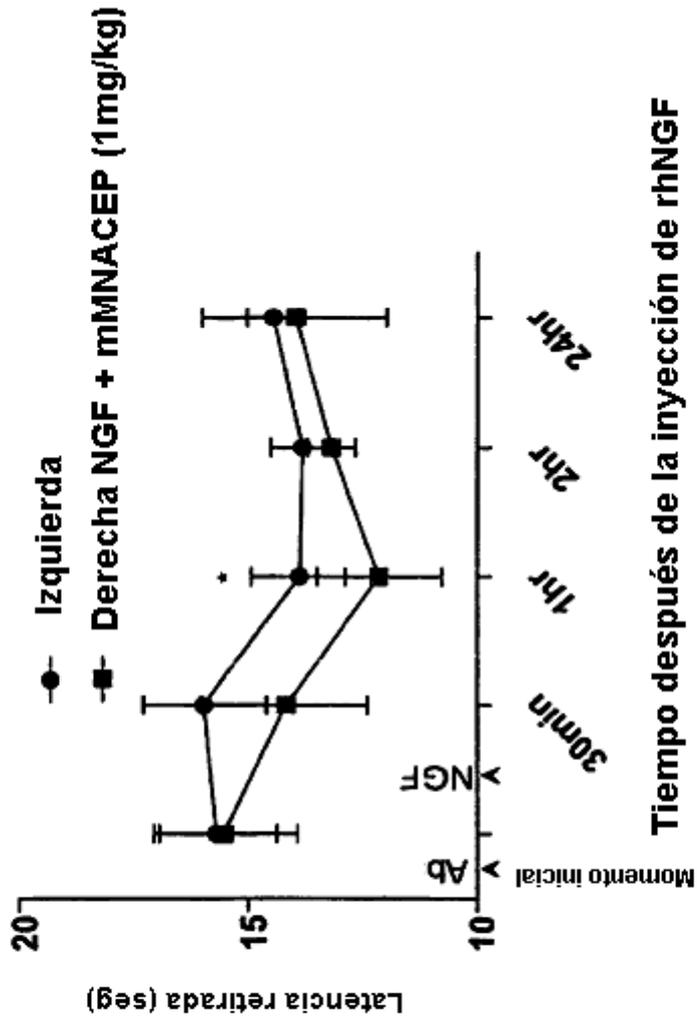
Figura 14 (cont.)



Tiempo después de la inyección de rhNGF

- * p<0,05 test T pareado vs pata derecha
- ** p<0,01 test T pareado vs pata derecha

Figura 14 (cont.)



Tiempo después de la inyección de rhNGF

- * p<0,05 test T pareado vs pata derecha
- ** p<0,01 test T pareado vs pata derecha

Figura 14 (cont.)

