(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 559 429**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
G06F 19/00 (2011.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2004 E 10003283 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2218737**

(54) Título: **Anticuerpos anti-NGF humanizados**

(30) Prioridad:

24.12.2003 IT RM20030601

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2016

(73) Titular/es:

ABBVIE RESEARCH B.V. (100.0%)
Meeuwenlaan 4
8011 BZ Zwolle, NL

(72) Inventor/es:

CATTANEO, ANTONINO;
COVACEUSZACH, SONIA y
LAMBA, DORIANO

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 559 429 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-NGF humanizados

Antecedentes

La presente divulgación se refiere a un método para la humanización de anticuerpos, por medio de la determinación y la comparación de estructuras tridimensionales, a los anticuerpos humanizados obtenidos de este modo y a sus usos en terapia y diagnóstico *in vivo*.

La aplicación terapéutica y de diagnóstico de anticuerpos monoclonales de origen animal en seres humanos tiene contraindicaciones fundamentales, especialmente para regímenes terapéuticos que necesitan administraciones repetidas. En particular, los anticuerpos monoclonales murinos tienen una semivida relativamente corta y, cuando se usan en seres humanos, carecen de algunas características funcionales fundamentales de las inmunoglobulinas, tales como citotoxicidad dependiente del complemento y citotoxicidad mediada por células.

Además, los anticuerpos monoclonales de origen no humano contienen secuencias de aminoácidos inmunogénicas si se inyectan en pacientes. Numerosos estudios han demostrado que después de la inyección de un anticuerpo exógeno, los sujetos desarrollan una reacción inmune más bien fuerte contra el propio anticuerpo (conocida como reacción HAMA - siglas en inglés de anticuerpos humanos anti-ratón), eliminando completamente su utilidad terapéutica, con la formación de complejos inmunes, la alteración de la farmacocinética, la producción de reacciones alérgicas, etc. Además, considerando el número creciente de anticuerpos monoclonales diferentes desarrollados en ratones o en otros mamíferos (y, por lo tanto, antigénicos para seres humanos) para la terapia de diferentes patologías, los tratamientos, también para terapias no correlacionadas, pueden ser ineficaces o incluso peligrosos debido a la reactividad cruzada. Aunque la producción de los denominados anticuerpos quiméricos (regiones murinas variables unidas a regiones constantes de origen humano) ha producido algún resultado positivo, sigue habiendo un problema de inmunogenicidad significativo.

Los anticuerpos humanizados tienen al menos tres ventajas potenciales con respecto a los anticuerpos de origen animal en el campo del uso terapéutico en seres humanos. En primer lugar, la región efectora, al ser humana, puede interaccionar mejor con las otras partes del sistema inmune humano, destruyendo las células diana más eficazmente por medio de citotoxicidad dependiente del complemento o citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por células. Además, el sistema inmune humano no reconoce la región marco o la región constante (C) del anticuerpo humanizado como exógena, y por lo tanto la respuesta de anticuerpos contra el anticuerpo humanizado se minimiza, tanto en relación con la respuesta contra un anticuerpo murino (totalmente extraño) como en relación con la respuesta inducida por un anticuerpo quimérico (parcialmente extraño).

Se ha notificado que los anticuerpos murinos inyectados en seres humanos tienen una semivida mucho más corta que los anticuerpos normales (Shaw *et al*., 1987). Los anticuerpos humanizados tienen una semivida muy similar a la de los anticuerpos humanos naturales, lo que permite una administración menos frecuente y dosis menores.

El principio básico de la humanización se configura transfiriendo la especificidad del reconocimiento de antígeno, es decir, los dominios de CDR, en el contexto de una inmunoglobulina humana ("CDR grafting", Winter y Milstein, 1991). Se han presentado varios ejemplos de anticuerpos humanizados, producidos con la intención de solucionar el problema de la inmunogenicidad (Maeda *et al*.,1991; Singer *et al*., 1993; Tempest *et al.,* 1994; Kettleborough *et al.,* 1991; Hsiao *et al.,* 1994; Baca *et al*., 1997; Leger *et al.,* 1997; Ellis *et al.,* 1995; Sato *et al.,* 1994; Jones *et al.,* 1986; Benhar *et al.,* 1994; Sha y Xiang, 1994; Shearman *et al.,* 1991; Rosok *et al*., 1996; Gussow & Seemann,1991; Couto *et al.,* 1994; Kashmiri *et al.,* 1995; Baker *et al.,* 1994; Riechmann *et al.,* 1988; Gorman *et al.,* 1991; Verhoeyen *et al*., 1988; Foote & Winter, 1992; Lewis & Crowe, 1991; Co *et al*.,1991; Co *et al.,* 1991; Verhoeyen *et al.,* 1991; Eigenbrot *et al*., 1994; Hamilton *et al.,* 1997; Tempest *et al.,* 1995; Verhoeyen *et al.,* 1993; Cook *et al.,* 1996; Poul *et al.,* 1995; Co *et al.,* 1992; Graziano *et al.,1995;* Presta *et al.,* 1993; Hakimi *et al.,* 1993; Roguska *et al*., 1996; Adair *et al*., 1994; Sato *et al.,* 1993; Tempest *et al*., 1991; Sato *et al.,* 1996; *Kolbinger et al.,* 1993; Zhu y Carter, 1995; Sims *et al.,* 1993; Routledge *et al.,* 1991; Roguska *et al.,* 1994; Queen *et al.,* 1989; Carter *et al*., 1992).

La transcripción de un anticuerpo desde animal (generalmente murino) a humanizado implica el compromiso entre requisitos opuestos, cuya solución varía de un caso a otro. Para minimizar la inmunogenicidad, la inmunoglobulina deberá mantener tanta cantidad de secuencia humana aceptora como sea posible. En cualquier caso, para conservar las propiedades de unión originales, la región marco de la inmunoglobulina debe contener un número suficiente de mutaciones en la secuencia humana aceptora como para garantizar que la conformación de las regiones CDR es tan similar como sea posible a la de la inmunoglobulina murina donadora. Como consecuencia de estas consideraciones opuestas, para muchos anticuerpos humanizados se ha notificado una pérdida significativa en afinidad de unión con respecto a los anticuerpos murinos correspondientes (Jones *et al.,* 1986; Shearman *et al.,* 1991; Kettleborough, 1991; Gorman *et al.,* 1991; Riechmann *et al.,* 1988).

Actualmente, el método más común para la producción de inmunoglobulinas humanizadas se basa en el uso de secuencias genómicas sintéticas apropiadas, así como ADNc (Reichmann *et al.,* 1988).

La solicitud de patente EP 592106 describe un método para la humanización de anticuerpos procedentes de roedores. El método se basa en la identificación de los restos de aminoácido expuestos en la superficie de la estructura tridimensional del anticuerpo a humanizar, en la identificación de los restos de aminoácido en las mismas posiciones en el anticuerpo humano correspondiente, y en el reemplazo de los restos identificados en la secuencia del anticuerpo de roedor por los identificados en el anticuerpo humano.

El documento WO 01/10203 describe animales transgénicos no humanos para el estudio de síndromes neurodegenerativos.

El documento WO 02/096458 describe anticuerpos anti-NGF para el tratamiento de diversos trastornos.

Queen C. *et al.*, PNAS, Vol. 86(24), 1 de diciembre de 1989, páginas 10029-10033, describen un anticuerpo humanizado que se une al receptor de IL-2.

El documento WO 92/22653 describe un método para la producción de anticuerpos humanizados.

El documento WO 93/16184 describe el diseño, clonación, y expresión de anticuerpos monoclonales humanizados contra IL-5 de humano.

El documento EP 0578515 describe anticuerpos monoclonales humanizados.

Descripción

Los autores de la presente invención establecen un método para obtener formas humanizadas optimizadas de inmunoglobulinas que son sustancialmente no inmunogénicas en seres humanos, con una estrategia que se basa sistemáticamente en datos estructurales, obtenidos experimentalmente, procedentes de estudios cristalográficos. El método divulgado en el presente documento permite obtener anticuerpos en una forma adaptada a la formulación terapéutica y a otras aplicaciones médicas y de diagnóstico.

La divulgación se refiere a un método basado completamente en datos estructurales para realizar las primeras etapas del diseño (en general más sujetas a error) de humanización. Las inmunoglobulinas humanizadas tienen dos pares de heterodímeros entre la cadena ligera y pesada, llevando al menos una de las cadenas una o más CDR de origen animal, unidas funcionalmente a segmentos de regiones de la región marco de origen humano. Por ejemplo, CDR de origen animal, junto con restos de aminoácido, asociados naturalmente, también de origen animal, se introducen en regiones marco de origen humano, para producir inmunoglobulinas humanizadas capaces de unirse a los antígenos respectivos, con afinidades comparables a las afinidades de las inmunoglobulinas originales de origen animal.

El método divulgado en el presente documento conduce a la obtención de anticuerpos humanizados adecuados para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. En particular, se han obtenido inmunoglobulinas humanizadas, derivadas de anticuerpos anti-NGF capaces de unirse con alta especificidad a NGF, neutralizando la interacción entre el ligando y los receptores. Tales moléculas son útiles para el tratamiento de tumores que dependen de NGF/TrkA, del dolor crónico y de formas inflamatorias, y para fines diagnósticos, para la formación de imágenes *in vivo*. En particular, los anticuerpos anti-NGF humanizados encuentran aplicación terapéutica y diagnóstica específica en patologías inducidas por el virus VIH, para inducir la apoptosis de células inmunitarias, tales como macrófagos dependientes de NGF infectados con VIH.

Por lo tanto, un objetivo divulgado en el presente documento es proporcionar un método para la humanización de las regiones variables VH y VL de un anticuerpo animal de secuencia conocida, que comprende las etapas de:

a) si no está disponible, obtención de la estructura cristalográfica de las regiones VH y VL del anticuerpo animal;
b) preselección de una serie de 0 a n aceptores de regiones marco posibles de anticuerpos de origen humano o humanizados, cuya estructura se determinó experimentalmente con una resolución no menor de 3 Å, basándose en el máximo nivel de homología e identidad con la secuencia primaria de la región marco del anticuerpo animal;
c) realización de una comparación estructural entre las regiones variables VH y VL del anticuerpo animal y las regiones VH y VL obtenidas en b), respectivamente, y cálculo para cada comparación del RMS (error cuadrático medio), para identificar la región VH y la región VL de origen humano con el RMS menor;
d) inserción en la posición apropiada de las secuencias de las regiones CDR del anticuerpo animal en las secuencias humanas identificadas en c);
e) si es necesario, retromutación de uno o más restos de aminoácido de las regiones VH y VL humanas identificadas en c).

Preferentemente, las modificaciones del anticuerpo se realizan con técnicas de ADN recombinante. En una realización preferida, el anticuerpo animal es un anticuerpo anti-NGF, preferentemente es el anticuerpo alfa D11, y las secuencias humanizadas esencialmente tienen las siguientes secuencias de VH: VH de alfa D11 Hum,

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGLEWVGGV
WAGGATDYNSALKSRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSS
STLYAMDAWGQGTLVTVSS, (SEC ID Nº: 17)

y VL: Vk de D11 alfa Hum,

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTL
HTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGTKVEIK
(SEC ID Nº: 18).

Las inmunoglobulinas humanizadas de la presente invención (o fragmentos derivados que mantienen actividades de unión y otros compuestos que pueden obtenerse a partir de las mismas), como se define en las reivindicaciones, pueden producirse por medio de técnicas de ADN recombinante conocidas. En función del uso posterior de las inmunoglobulinas humanizadas, pueden usarse animales transgénicos o células transfectadas para su expresión, preferentemente células eucariotas inmortalizadas (tales como células de mieloma o hibridoma), pero también células hospedadoras procariotas, células de insecto o vegetales. Los polinucleótidos codificantes de las secuencias resultantes de las inmunoglobulinas humanizadas también pueden obtenerse por síntesis.

Las inmunoglobulinas humanizadas de la presente invención, como se define en las reivindicaciones, pueden usarse solas o en combinación con otros agentes terapéuticos. En el caso del uso como agentes antitumorales, se preferirá un agente hemoterapéutico, que puede variar dependiendo de la aplicación farmacológica (tal como antraciclina, paclitaxel, cisplatino, gemcitabina, antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides o inmunosupresores), así como con todos los fármacos aplicados actualmente en la terapia de cada patología específica. Las inmunoglobulinas humanizadas o sus complejos pueden prepararse en forma de dosificaciones farmacológicamente aceptables, que varían dependiendo del tipo de administración.

Definiciones

La expresión “sustancialmente idéntico”, dentro del contexto de dos polinucleótidos o polipéptidos (respectivamente secuencias de ADN codificante de inmunoglobulinas humanizadas o secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas humanizadas, o partes de las mismas), se refiere a dos o más secuencias que tienen un mínimo de identidad del 80% (preferentemente del 90-95% o mayor) en los restos de nucleótido o aminoácido, cuando se comparan y alinean con la correspondencia máxima. Generalmente, la “identidad sustancial” se verifica en regiones que tienen una longitud de al menos 50 restos, más preferentemente en una región de al menos 100 restos o, en condiciones óptimas, en más de 150 restos o en las secuencias completas. Como se describe más adelante, dos secuencias cualesquiera de anticuerpos pueden alinearse solo de una manera, usando el esquema de numeración de Kabat. Por consiguiente, para los anticuerpos, el porcentaje de identidad tiene un significado único y bien definido. Los aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas maduras se denominan Hx y Lx, siendo x el número que indica la posición del aminoácido de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda MD, 1987, 1991). Kabat ha determinado una lista de secuencias de aminoácidos de anticuerpos para cada subgrupo así como una lista de los aminoácidos más frecuentes en cada posición en cada subgrupo para generar una secuencia consenso. Kabat usa un método para asignar un número a cada aminoácido de cada secuencia de la lista y este método para asignar el número de cada resto se ha convertido en un método estándar en este campo. El esquema de Kabat puede extenderse a otros anticuerpos no presentes en su estudio, alineando el anticuerpo en cuestión con una de las secuencias consenso identificadas por Kabat, basándose en los aminoácidos conservados. El uso del sistema de numeración de Kabat permite identificar fácilmente los aminoácidos en posiciones equivalentes en diferentes anticuerpos. Por ejemplo, un aminoácido en la posición L10 en un anticuerpo de origen humano ocupa la posición equivalente de un aminoácido en la posición L10 en un anticuerpo de origen murino.

Es bien sabido que la unidad estructural básica de un anticuerpo comprende un tetrámero. Cada tetrámero está constituido por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, de las que cada una está compuesta por una cadena ligera (25 KDa) y por una cadena pesada (50-75 KDa). La región amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100-110 o más aminoácidos, que están implicados en el reconocimiento del antígeno. La región carboxi-terminal de cada cadena comprende la región constante que media la función efectora. Las regiones variables de cada par de cadenas pesada y ligera forma el sitio de unión del anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión.

Las cadenas ligeras se clasifican como κ o λ. Las cadenas pesadas se clasifican como γ, μ, α, ε y definen el isotipo del anticuerpo como, respectivamente, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Dentro de la cadena ligera y de la cadena pesada,

las regiones variables y constantes están unidas por una región “J” de aproximadamente 12 aminoácidos o más, mientras que únicamente las cadenas pesadas incluyen una región “D” de aproximadamente 10 aminoácidos (Paul, 1993).

Las regiones variables de cada par de cadenas ligera y pesada forman el sitio de unión del anticuerpo. Se caracterizan por la misma estructura general constituida por regiones relativamente conservadas denominadas regiones marco (FR) unidas por tres regiones hipervariables denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR) (Kabat *et al.,* 1987; Chothia y Lesk, 1987). Las CDR de las dos cadenas de cada par se alinean por las regiones marco, adquiriendo la función de unión a un epítopo específico. Empezando desde la región amino-terminal hacia la región carboxi-terminal, los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada comprenden una alternancia de regiones FR y CDR: FR, CDR, FR, CDR, FR, CDR, FR; por consiguiente, tanto la cadena pesada como la cadena ligera se caracterizan por tres CDR, respectivamente CDRH1, CDRH2, CDRH3 y CDRL1, CDRL2, CDRL3. La asignación de aminoácidos a cada región se realizó de acuerdo con las definiciones de Kabat (1987 y 1991) y/o Chothia y Lesk (1987), Chothia *et al.* (1989).

Preferentemente, los análogos de las inmunoglobulinas humanizadas ejemplificadas difieren de las inmunoglobulinas originales debido a sustituciones de aminoácidos conservativas. Para clasificar las sustituciones de aminoácidos como conservativas o no conservativas, los aminoácidos pueden agruparse como se indica a continuación:

Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): M, A, V, L, I;
Grupo II (cadenas laterales hidrófilas neutras): C, S, T, N, Q;
Grupo III (cadenas laterales ácidas): D, E;
Grupo IV (cadenas laterales básicas): K, R;
Grupo V (restos que influyen en la orientación de la cadena principal): G, P;
Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): F, Y, W.

Las sustituciones de aminoácidos conservativas se refieren a sustituciones entre aminoácidos de la misma clase, mientras que las sustituciones de aminoácidos no conservativas implican un intercambio entre miembros de clases diferentes.

El término “epítopo” incluye todos los determinantes proteicos capaces de unirse a una inmunoglobulina de una forma específica. En general, los epítopos se forman por series de superficies de macromoléculas químicamente activas, tales como cadenas laterales de aminoácidos o azúcares, y generalmente tienen características químico-físicas y conformacionales específicas.

El término “inmunoglobulina” se refiere a proteínas que consisten en uno o más polipéptidos codificados por genes de las inmunoglobulinas. Las inmunoglobulinas pueden existir en una diversidad de formas, además de la forma de anticuerpo tetramérica: por ejemplo, incluyen fragmentos Fv, Fab y F(ab’) así como anticuerpos híbridos bifuncionales (Lanzavecchia *et al.,* 1987) y fragmentos Fv monocatenarios (Hood *et al.,* 1984; Harlow y Lane, 1988; Hunkapiller y Hood, 1986).

Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyos genes para las cadenas ligera y pesada se han modificado por ingeniería genética empezando a partir de regiones de genes de inmunoglobulinas que pertenecen a diferentes especies. Por ejemplo, pueden unirse segmentos variables (V) de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón a segmentos constantes (C) de un anticuerpo de origen humano. Por lo tanto, un anticuerpo quimérico terapéutico es una proteína híbrida que consiste en el dominio V que reconoce el antígeno procedente de un anticuerpo de ratón y en el dominio efector C procedente de un anticuerpo humano (aunque pueden usarse otras combinaciones de especies de mamífero).

La expresión “región marco” se refiere a las partes de las regiones variables de la cadena ligera y pesada de las inmunoglobulinas que están relativamente conservadas (que no pertenecen a las CDR) entre diferentes inmunoglobulinas dentro de una especie, de acuerdo con la definición de Kabat. Por lo tanto, una región marco humana es una región marco que es sustancialmente idéntica (al menos en un 85% o más) a la región marco que se encuentra naturalmente en los anticuerpos humanos.

La expresión “inmunoglobulina humanizada” se refiere a una inmunoglobulina que comprende una región marco humana y al menos una CDR que procede de un anticuerpo no humano y en la que cada región constante presente es sustancialmente idéntica a una región de inmunoglobulina humana (idéntica en al menos un 85%, preferentemente en al menos un 90-95%). Por lo tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada excepto la CDR son sustancialmente idénticas a las regiones correspondientes de una o más secuencias de inmunoglobulinas humanas naturales. Por ejemplo, los anticuerpos quiméricos, constituidos por regiones variables de ratón y regiones constantes de origen humano, no se incluyen entre las inmunoglobulinas humanizadas.

Descripción detallada de la invención

El método se basa en la comparación estructural de alta resolución para la humanización de anticuerpos de interés terapéutico y diagnóstico *in vivo*. Además, se proporcionan inmunoglobulinas humanizadas, capaces de reaccionar específicamente con los antígenos respectivos (es decir, neurotrofina NGF). Las inmunoglobulinas humanizadas tienen una región marco de origen humano y tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) derivadas de la inmunoglobulina original (es decir, αD11, una inmunoglobulina de rata, reactiva específicamente con NGF). Por lo tanto, las inmunoglobulinas de la presente invención (como se define en las reivindicaciones), que pueden producirse fácilmente a gran escala, encuentran aplicación terapéutica no solo en la terapia de formas tumorales dependientes de NGF/TrkA, sino también en el tratamiento del dolor crónico y formas inflamatorias.

La presente divulgación usa los segmentos recombinantes de ADN que codifican las regiones CDR de la cadena ligera y/o pesada, capaces de unirse a un epítopo de interés en NGF, como en el caso del anticuerpo monoclonal de rata αD11. Los segmentos de ADN codificantes de estas regiones se unen a los segmentos de ADN que codifican regiones marco apropiadas de origen humano. Las secuencias de ADN que codifican las cadenas polipeptídicas que comprenden las CDR de la cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal αD11 se incluyen en la Figura 4A y 4B respectivamente. Debido a la degeneración del código genético y a las sustituciones de aminoácidos no críticos, las secuencias de ADN pueden modificarse fácilmente. Además, los segmentos de ADN típicamente incluyen una secuencia de control adicional para la expresión, unida operativamente a las secuencias codificantes de inmunoglobulinas humanizadas, y que comprende regiones de promotores heterólogos o asociados de forma natural. Preferentemente, las secuencias de control de la expresión son sistemas con promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células hospedadoras eucariotas, pero también pueden usarse secuencias de control procariotas. Una vez que se ha incorporado el vector en el hospedador apropiado, el hospedador se mantiene en condiciones adecuadas para asegurar un alto nivel de expresión. A continuación se realiza una purificación adicional de las cadenas ligera y pesada individualmente en forma de dímeros, de anticuerpos intactos o de otras formas de inmunoglobulinas.

Las secuencias de ADN codificante para la región constante humana pueden aislarse por medio de procedimientos bien conocidos a partir de una diversidad de células humanas, pero preferentemente a partir de células B inmortalizadas. Las CDR presentes en las inmunoglobulinas de la presente invención proceden, de forma similar, del anticuerpo monoclonal αD11 capaz de unirse a NGF en rata. Las células hospedadoras adecuadas para la expresión y secreción de inmunoglobulinas, pueden obtenerse a partir de muchas fuentes tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo (Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, Quinta edición (1985) Rockville, Maryland, Estados Unidos). Preferentemente, las CDR incorporadas en los anticuerpos humanizados tienen secuencias correspondientes a las de las CDR de αD11 y MNAC 13 y pueden incluir secuencias de nucleótidos degeneradas que codifican las secuencias de aminoácidos correspondientes de los propios anticuerpos. En general, el procedimiento de diseño de humanización es cíclico e iterativo y comprende: El análisis de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo murino.

El modelado de la región Fv correspondiente;

El análisis y selección de la secuencia de aminoácidos de la región marco aceptora del anticuerpo humano;

La identificación de supuestas retromutaciones en la región marco seleccionada;

El diseño y la construcción real del anticuerpo humanizado;

La verificación, por medio de ensayos *in vitro* y/o *in vivo*, de la afinidad y especificidad mantenidas de la unión.

Si estas actividades se ven influenciadas negativamente por la región marco humana, será necesario cambiar la selección de la región marco de los anticuerpos humanos aceptores, o introducir mutaciones de compensación.

Aunque la elección de la región marco humana esté configurada como la fase más crítica del ciclo, hasta la fecha no se han establecido reglas generales. Esto depende del hecho de que las ventajas de las diversas elecciones (en términos de inmunogenicidad en el paciente) no se hayan estudiado de forma precisa desde el punto de vista clínico. Por lo tanto, para realizar la elección correcta de la región marco, solo se dispone de una serie de estrategias, que deben combinarse con los resultados obtenidos previamente.

En particular, es posible usar regiones marco fijas (normalmente NEW para la cadena pesada y REI para la cadena ligera, ya que sus estructuras están disponibles desde hace mucho tiempo).

Otra estrategia permite el uso de las regiones marco consideradas más homólogas en términos de secuencia con el anticuerpo a humanizar. Hay muchas bases de datos para buscar anticuerpos humanos homólogos: la elección generalmente tiene en cuenta la longitud de las CDR, la identidad a nivel de restos canónicos y de los restos a nivel

de la interfaz, además de un mayor porcentaje de identidad entre las secuencias del donante y del aceptor. Como comparación entre estos dos métodos, véase Graziano *et al.* (1995).

Además, de acuerdo con una variante de la segunda estrategia, la cadena ligera y la cadena pesada pueden elegirse de dos anticuerpos humanos diferentes caracterizados por una mayor homología de secuencia. Esta estrategia se propuso por Riechmann *et al.* (1988) y por Shearman *et al.* (1991). A este respecto, en general, las cadenas ligera y pesada que proceden del mismo anticuerpo tienen una mayor probabilidad de asociarse correctamente, formando un sitio de unión funcional, con respecto a las cadenas ligera y pesada que proceden de anticuerpos diferentes, aunque el hecho de que la interfaz entre las dos cadenas esté bastante conservada puede asegurar igualmente una interacción correcta. Como comparación entre estos dos métodos, véase Roguska *et al.* (1996 y 1996).

La limitación de la estrategia a una región marco que procede de un anticuerpo humano particular puede implicar el riesgo de incurrir en mutaciones somáticas que producen epítopos inmunogénicos aunque las regiones marco sean de origen humano. Una estrategia alternativa es usar regiones marco basadas en secuencias consenso humanas, en las que se han eliminado mutaciones somáticas idiosincráticas. Las dos estrategias se han comparado: en un caso, no se detectaron diferencias en la avidez de la unión (Kolbinger *et al.,* 1993), y en el otro caso, sin embargo, la unión resultó superior en el caso de regiones marco individuales (Sato *et al.,* 1994).

En cualquier caso, las propias secuencias consenso son artificiales y, por lo tanto, aunque no tengan restos idiosincráticos, pueden crear motivos no naturales que son inmunogénicos. La alternativa (Rosok *et al.,* 1996) es usar secuencias humanas de línea germinal recogidas en la base de datos V-BASE.

La yuxtaposición no natural de las regiones CDR murinas con las regiones variables de la región marco de origen humano puede dar lugar a límites conformacionales no representados en la naturaleza que, a menos que se corrijan mediante la sustitución de restos de aminoácido particulares, determinan la pérdida de afinidad de unión. La selección de los restos de aminoácido a sustituir se determina parcialmente por medio de la creación de modelos por ordenador. Se dispone de hardware y software para producir imágenes tridimensionales de moléculas de inmunoglobulina. En general, los modelos moleculares se producen a partir de estructuras cristalográficas ya resueltas de dominios o cadenas de inmunoglobulinas. Las cadenas a modelar se comparan basándose en la similitud de aminoácidos con cadenas o dominios de estructuras tridimensionales resueltas y las cadenas o los dominios que muestran la mayor similitud en términos de secuencia se seleccionan como puntos de partida en la construcción del modelo molecular. Sin embargo, la predicción de la estructura del anticuerpo no siempre es precisa. En particular, la tercera región CDR es difícil de modelar y siempre representa un punto de incertidumbre en la predicción estructural de un anticuerpo (Chothia *et al.,* 1987). Por esta razón, por norma, los anticuerpos humanizados, como una primera aproximación, tienen bastante menos afinidad de unión y/o especificidad hacia el antígeno que el anticuerpo monoclonal de partida. Esto requiere muchos ciclos sucesivos de mutaciones puntuales con la intención de reconstituir las propiedades del anticuerpo de partida, con un procedimiento de ensayo y error que no puede racionalizarse completamente. Considerando el número creciente de estructuras de rayos X de alta resolución de anticuerpos humanos y humanizados disponibles, la intención era evitar las incertidumbres y ambigüedades derivadas del uso de la creación de modelos por ordenador, obteniendo datos estructurales de alta resolución para los fragmentos Fab de los dos anticuerpos de la invención por medio de cristalografía de rayos X. Para este fin, los dos anticuerpos se purificaron a partir de hibridomas, tratados proteolíticamente con papaína (una proteasa que corta a nivel de la unión entre el dominio CH1 y CH2 de la cadena pesada), que da lugar a los fragmentos Fab. Como resultado de la purificación adicional, los dos fragmentos Fab se cristalizaron y a partir de dos bases de datos (de baja y alta resolución), fue posible resolver las estructuras con el método de Sustitución Molecular y posteriormente refinarlas.

La estrategia propuesta en el presente documento, basada en datos estructurales obtenidos experimentalmente, proporciona un punto de partida mucho más sólido y racional, tanto en la fase crítica de la selección de la región marco del anticuerpo humano aceptor, como para la identificación de supuestas retromutaciones en las regiones marco seleccionadas dentro del proceso de humanización de los dos anticuerpos neutralizantes.

Entre los diversos criterios presentados que pueden guiar la selección de la región marco del anticuerpo humano, el usado fue el grado de identidad entre el anticuerpo de origen murino y humano en la secuencia primaria, para extender y completar sus resultados con un análisis basado en el alineamiento estructural. Un análisis comparado de las estructuras correspondientes asociado con el criterio original asegura una comparación mucho más precisa y, por consiguiente, una mayor probabilidad de que el anticuerpo humanizado resultante pueda conservar las características de afinidad y especificidad del anticuerpo murino original. Por consiguiente, la estrategia empleada combina la información procedente del análisis y comparación de las secuencias de aminoácidos, tanto en términos del grado de identidad como del nivel de homología, con la comparación de las estructuras tridimensionales respectivas.

En particular, la información procedente del alineamiento óptimo de las estructuras primarias tiene un papel doble. En primer lugar, este análisis permite reducir el número de estructuras terciarias posibles a comparar, limitándose a las caracterizadas por un alto grado de homología e identidad. Entre estas secuencias caracterizadas por un

alineamiento óptimo a nivel de la estructura primaria y para las que se dispone de datos estructurales, se realizó una selección adicional, que se concentra solo en las estructuras resueltas con alta resolución o, de otra manera, con una resolución comparable a la de las estructuras obtenidas por nosotros (es decir, no mayores de 2,5 Å). Esta estrategia asegura un alineamiento mucho más preciso de las estructuras terciarias y una estimación mucho más significativa de las diferencias estructurales, expresadas en RMS (desviación del valor cuadrático medio: raíz cuadrada de la desviación cuadrática media; Carugo y Pongor, 2001 y 2003). Los datos de baja resolución proporcionan una información más bien indicativa, y definitivamente menos precisa sobre la posición relativa real de cada átomo individual en el espacio.

Para evaluar el grado de superposición de cada estructura individual, de origen humano o modificada por ingeniería genética, se calculó la RMS entre átomos de carbono alfa que constituyen los esqueletos de aminoácidos respectivos, sin considerar los pares de átomos con una RMS superior a 2 Å. A partir de este análisis, se obtiene una información que, por lo tanto, debe tener en cuenta no solo la diversidad entre las estructuras (expresada por el valor de RMS), sino también el porcentaje de átomos de carbono alfa realmente empleados para calcular cada RMS.

Estos datos de similitud a nivel de la estructura terciaria se asociaron con el análisis comparativo de las secuencias primarias tanto en términos de identidad como en términos de homología.

Por lo tanto, se deduce que la selección de la región marco óptima para la humanización se configura como un problema de tres variables, que por lo tanto puede representarse en el espacio, cuando se asocia el nivel de homología y el grado de identidad con el alineamiento estructural. Este tipo de análisis después se realizó también reduciendo las regiones en cuestión en los dos tipos de alineamiento a las regiones de los marcos respectivos. Comparando las distribuciones de los anticuerpos considerados en el espacio de las tres variables analizadas (respectivamente, valor de RMS, porcentajes de átomos sobre los que se calculó la RMS e índice de similitud entre las estructuras primarias, es decir porcentaje de identidad global, de homología global, de identidad a nivel de la región marco, y de homología a nivel de la región marco) con la posición óptima en el espacio de las tres variables que ocuparía cada anticuerpo si fuera de origen humano, es posible identificar claramente el anticuerpo de origen humano que se aproxima más a esta posición ideal a nivel de la estructura primaria y terciaria. Para racionalizar este resultado, en cada uno de los cuatro análisis se calculan las desviaciones desde la posición óptima hipotética para cada posición de los anticuerpos humanizados o de origen humano considerados.

Basándose en este método de selección, es posible elegir la región marco aceptora en el posterior proceso de injerto de CDR para la humanización de un anticuerpo dado.

En general, es necesario minimizar las sustituciones de restos de aminoácido de origen humano con restos de origen murino, ya que la introducción de restos murinos aumenta el riesgo de que el anticuerpo induzca una respuesta HAMA en el paciente humano. Por otra parte, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) contienen los restos con la mayor probabilidad de interacción con el antígeno y, por esta razón, tienen que mantenerse en el anticuerpo humanizado. Se definen por medio de la secuencia de acuerdo con Kabat o por medio de la estructura de acuerdo con Chothia. La ventaja de usar el segundo sistema para definirlos es que, en general, las CDR son más cortas y, por lo tanto, el anticuerpo humanizado se constituye por una menor fracción de fragmentos xenogénicos. En cualquier caso, se ha demostrado que generalmente siguiendo las definiciones de Kabat es posible reducir espectacularmente el número de ciclos necesarios para la humanización. Una vez definidas las CDR, es necesario identificar las clases canónicas (definidas por Chothia y Lesk) a las que pertenecen y posteriormente mantener los restos canónicos en los anticuerpos humanizados.

También es esencial analizar los restos que medían la interacción entre la cadena ligera y la cadena pesada de los dominios variables (Tabla 1), manteniendo cualquier resto poco habitual en el anticuerpo humanizado (Singer *et al.,* 1993; Daugherty *et al.;* 1991; De Martino *et al.*, 1991).

Además, los aminoácidos adicionales a mantener se seleccionan basándose en su posible influencia sobre la conformación de las CDR y/o sobre la interacción con el antígeno. Cuando el aminoácido difiere entre la región marco de origen animal y la región marco aceptora equivalente de origen humano, el aminoácido de la región marco aceptora debe sustituirse por el resto murino equivalente, si es razonable esperar que el aminoácido esté en contacto directo no covalente con el antígeno, o esté adyacente a una región CDR, o en cualquier caso interacciona con una región CDR (está situado dentro de una distancia de 4-6 Å de una región CDR).

TABLA 1

Restos que medían la interacción entre la cadena ligera y la cadena pesada de los dominios variables					
CADENA VARIABLE LIGERA L			CADENA VARIABLE PESADA H		
Posición de Kabat	**Ratón**	**Humano**	**Posición de Kabat**	**Ratón**	**Humano**
34	H678 N420 A408 Y147 E114	A531 N147 D66	**35**	H1001 N636 S402 E184	S527 H340 G167 A143
36	Y153 F198 L96	Y748 F80	**37**	V2336 I200	V1037 I477 L27

Restos que medían la interacción entre la cadena ligera y la cadena pesada de los dominios variables					
CADENA VARIABLE LIGERA L			CADENA VARIABLE PESADA H		
Posición de Kabat	**Ratón**	**Humano**	**Posición de Kabat**	**Ratón**	**Humano**
38	Q1865 H47	Q799 H22	**39**	Q2518K67	Q1539R16
44 (A)	P1767 V132 I40	P839 L5	**45** (A)	L2636P16	L1531 P24
46	L1381 R374 P97	L760 V37	**47**	W2518 L64 Y50	W1534 Y21
87	Y1457 F448	Y795 F41	**91**	Y2149 F479	Y1429 F116
89	Q1170 L206 F144	Q687 M107	**93**	A2202 T222 V102	A1346 T90 V71
91	W376 S374 G356 Y295 H182	Y404 R115 S105 A84	95	Y399 G375 S340 D340 R226	D268 G266 R109 E100
96 (A)	L537 Y380 W285	L134Y215F78 W73 171	100k (A)	F1285 M450	F540 M109 L33
98 (A)	F1724	F654	**103** (A)	W1469	W323

En particular, un análisis adicional implica otros restos que definen la denominada zona Vernier, una zona que estabiliza la estructura de las CDR; es importante mantener las características de esta región.

Otros restos candidatos para la mutación son aminoácidos de la región marco aceptora que son poco habituales para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos restos pueden sustituirse con aminoácidos que proceden de la posición equivalente de inmunoglobulinas humanas más típicas o, como alternativa, pueden introducirse restos que proceden de la posición equivalente de la región marco donadora en la región marco aceptora cuando dichos aminoácidos son típicos para las inmunoglobulinas humanas en esas posiciones particulares.

Además, de nuevo basándose en las secuencias consenso de inmunoglobulinas humanas, se introducen mutaciones en la forma humanizada que insertan restos conservados en el humano en lugar de los restos poco habituales presentes tanto en la región marco donadora como en la región marco aceptora.

Después se modifican los pares respectivos de estructuras cristalográficas, realizando primero el injerto de las CDR de origen animal en las regiones marco humanas. Después se introducen todas las mutaciones y retromutaciones descritas anteriormente. Las estructuras modificadas después se ensamblan en inmunoglobulinas compuestas. Los modelos resultantes se refinan minimizando la energía mecánica (en términos de ángulos de torsión y ángulos y distancias de unión) usando el campo de fuerzas.

Para todas las demás regiones, diferentes de las sustituciones de aminoácidos específicas analizadas anteriormente, las regiones marco de las inmunoglobulinas inmunizadas normalmente son sustancialmente idénticas a las regiones marco de los anticuerpos humanos de los que proceden. En cualquier caso, en estas proteínas modificadas por ingeniería genética obtenidas por injerto, las regiones marco pueden variar con respecto a la secuencia nativa a nivel de la estructura primaria debido a muchas sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos, terminales o intermedias, y otros cambios. Naturalmente, la mayoría de los restos en la región marco aportan una contribución muy pequeña o incluso inexistente a la especificidad o afinidad de un anticuerpo. Por lo tanto, muchas sustituciones conservativas individuales en los restos de la región marco pueden tolerarse sin variaciones apreciables de la especificidad o afinidad en la inmunoglobulina humanizada resultante. En general, sin embargo, dichas sustituciones no son deseables. Es posible obtener modificaciones en la secuencia de nucleótidos con una diversidad de técnicas empleadas generalmente, tales como mutagénesis dirigida (Gillman & Smith, 1979; Roberts *et al.,* 1987).

Pueden producirse fragmentos polipeptídicos alternativos que comprenden solo parte de la estructura primaria del anticuerpo, reteniendo dichos fragmentos una o más actividades peculiares de las inmunoglobulinas (es decir, la actividad de unión). Estos fragmentos polipeptídicos pueden producirse por medio de digestión proteolítica a partir de anticuerpos intactos o insertando codones de terminación en las posiciones deseadas en los vehículos que llevan las secuencias de ADN codificantes de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera por medio de mutagénesis dirigida (en particular, después de la región CH1 para producir fragmentos Fab o después de la región de bisagra para producir fragmentos $(Fab')_2$). Pueden obtenerse anticuerpos en forma de scFv uniendo las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera por medio de un enlazador (Huston *et al.*, 1988; Bird *et al.*, 1988). Los fragmentos Fv o Fab pueden expresarse en *E. coli* (Buchner y Rudolph, 1991; Skerra *et al.*, 1991) o también en células eucariotas, preferentemente procedentes de mamífero. Considerando que, al igual que muchos otros genes, los genes de la superfamilia de las inmunoglobulinas contienen regiones funcionales distintas, cada una caracterizada por una o más actividades biológicas específicas, los genes pueden fusionarse a regiones funcionales procedentes de otros genes (por ejemplo, enzimas) para producir proteínas de fusión (por ejemplo, inmunotoxinas) que disponen de nuevas propiedades.

La expresión de secuencias de inmunoglobulina humanizadas en bacterias puede usarse para seleccionar secuencias de inmunoglobulinas humanizadas caracterizadas por una mayor afinidad, mutagenizando las regiones CDR y produciendo bibliotecas de fagos para la presentación en fagos. Usando estas bibliotecas, es posible realizar

una selección para buscar variantes a nivel de las CDR de las inmunoglobulinas humanizadas que tienen una mayor afinidad y/o especificidad de unión por los antígenos. Se han presentado ampliamente métodos para obtener bibliotecas de presentación en fagos que llevan secuencias de las regiones variables de inmunoglobulinas (Cesareni, 1992; Swimmer *et al.,* 1992; Gram *et al.,* 1992; Clackson *et al.,* 1991; Scott & Smith, 1990; Garrard *et al.,* 1991). Las secuencias resultantes de las variantes de inmunoglobulinas humanizadas, cuyas CDR se remodelaron de esta manera, posteriormente se expresan en un hospedador que es adecuado para asegurar una alta expresión de las mismas.

Como se ha indicado anteriormente, las secuencias de ADN se expresan en las células hospedadoras después de unirse operativamente (es decir, colocarse de tal forma que se asegure su funcionalidad) a secuencias de control de la expresión. Estos vehículos típicamente pueden replicarse en el organismo hospedador como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico. Comúnmente, los vehículos de expresión contienen un marcador de selección que permite identificar las células que se han transformado con las secuencias de ADN de interés.

Para la producción de las inmunoglobulinas humanizadas de la invención en forma recombinante de scFv o en forma de Fab, se prefieren los sistemas procariotas. *E. coli* es uno de los hospedadores procariotas que es particularmente útil para clonar las secuencias de ADN de la presente invención. Además, se dispone de un gran número de promotores bien caracterizados, por ejemplo, el operón lac o trp, o la β-lactamasa o el fago λ. Típicamente, estos promotores controlan la expresión y llevan sitios de unión para el ribosoma, para el inicio y terminación correctos de la transcripción y traducción. Es posible aumentar la semivida de las inmunoglobulinas humanizadas de la invención producidas en sistemas procariotas por conjugación por polietilenglicol (PEG).

Para la expresión pueden usarse otros organismos unicelulares, tales como levaduras. El hospedador de elección es *Saccharomyces*, usando vehículos adecuados que disponen de secuencias de control de la expresión, terminación y origen de replicación.

También pueden usarse cultivos de células de insecto para producir las inmunoglobulinas humanizadas de la invención, típicamente usando células de *Drosophila* S2 transfectadas de forma estable o células de *Spodoptera frugiperda* con el sistema de expresión basado en el Baculovirus (Putlitz *et al.,* 1990).

Pueden usarse plantas y cultivos de células vegetales para la expresión de las inmunoglobulinas humanizadas de la invención. (Larrick& Fry, 1991; Benvenuto *et al.,* 1991; Durin *et al.,* 1990; Hiatt *et al.,* 1989).

Sin embargo, en todos estos casos es imposible obtener el tipo correcto de glucosilación necesaria para asegurar la función efectora en la activación del sistema inmune humano. Para este fin, es posible usar cultivos de tejidos de células de mamífero para expresar los polipéptidos de la presente invención en forma integral de IgG1, que han resultado ser el isotipo más eficaz entre inmunoglobulinas séricas en la inducción de la respuesta inmune (Winnacker, 1987). Debe subrayarse que, considerando que el isotipo determina el potencial lítico de un anticuerpo, generalmente se usa el isotipo IgG1 con fines terapéuticos (ya que induce la respuesta inmune, tanto mediada por células como mediada por el sistema del complemento), mientras que la IgG4 se usa para aplicaciones de diagnóstico (Riechmann *et al.,* 1988). En particular, se prefieren las células de mamífero, considerando el gran número de líneas de células hospedadoras desarrolladas para la secreción de inmunoglobulinas intactas, entre ellas las líneas celulares CHO, varias líneas de COS, las células HeLa, líneas celulares de mieloma (NS0, SP/2, YB/0 e P3X63.Ag8.653), células B transformadas o hibridoma. Los vehículos de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen *et al.,* 1986) y las secuencias necesarias para la unión al ribosoma, corte y empalme del ARN y poliadenilación, y secuencias para la terminación de la transcripción. Las secuencias de control de la expresión de elección son promotores que proceden de genes de inmunoglobulinas y de virus, tales como SV40, Adenovirus, Virus del Papiloma Bovino, Citomegalovirus y similares. En general, el vector de expresión incluye un marcador de selección, tal como la resistencia a neomicina.

Para la expresión de anticuerpos humanizados, es preferible cultivar las líneas celulares de mamífero con un medio sin suero. Por ejemplo, la línea celular HUDREG-55 puede cultivarse fácilmente en Medio Sin Suero y Medio de Hibridoma Sin Proteína con el Nº de Cat. 5-2897 de Sigma (St. Louis, Mo.).

Los genes que codifican las inmunoglobulinas humanizadas de la invención pueden usarse para generar animales transgénicos no humanos que expresan las inmunoglobulinas humanizadas de interés, típicamente en un fluido corporal recuperable tal como leche o suero. Dichos transgenes comprenden la secuencia polinucleotídica que codifica las inmunoglobulinas humanizadas unida operativamente a un promotor, normalmente con una secuencia potenciadora, tal como la de la inmunoglobulina de roedor o el promotor/potenciador del gen de caseína (Buhler *et al.,* 1990; Meade *et al.,* 1990). Los transgenes pueden transferirse a las células o embriones por medio de construcciones de recombinación homóloga. Entre los animales no humanos usados: ratón, rata, oveja, vaca y cabra (documento (WO 91/08216).

Una vez que se expresan como anticuerpos intactos, sus dímeros, las cadenas ligera y pesada individuales o en otras formas, las inmunoglobulinas de la presente invención pueden purificarse siguiendo procedimientos

convencionales tales como precipitación con sulfato amónico, columnas de afinidad o cromatografía en columna (Scopes, 1982). Para aplicaciones farmacéuticas, se necesitan inmunoglobulinas sustancialmente puras, con una homogeneidad mínima comprendida entre el 90 y el 95%, pero preferentemente entre el 98 y 99% o incluso superior. Una vez purificadas, parcialmente o hasta la homogeneidad deseada, las proteínas pueden usarse para uso terapéutico (también en forma extracorpórea), para uso de diagnóstico (formando imágenes para el diagnóstico de tumores o de la Enfermedad de Alzheimer) o para crear y realizar ensayos bioquímicos, tinciones inmunofluorescentes y similares (véase, en general, Lefkovits y Pernis, 1979 y 1981).

Los anticuerpos y las composiciones farmacéuticas de esta invención son particularmente útiles para la administración siguiendo cualquier metodología eficaz para tratar los anticuerpos a nivel del tejido implicado en la patología. Esto incluye (pero sin limitación): la administración intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intratraqueal, oral, entérica, parenteral, intranasal o dérmica. Los anticuerpos de la presente invención típicamente pueden ser para administración para aplicación local por inyección (intraperitoneal o intracraneal - típicamente en un ventrículo cerebral - o intrapericárdica o intrabursal) de formulaciones líquidas o por 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 comúnmente comprenden una solución de inmunoglobulina disuelta en una solución compatible, preferentemente acuosa. La concentración del anticuerpo en estas formulaciones puede variar de menos del 0,005% al 15-20% y se selecciona principalmente de acuerdo con los volúmenes del líquido, su viscosidad, etc., y de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado. Como alternativa, los anticuerpos pueden prepararse para administración en forma sólida. Los anticuerpos pueden combinarse con diferentes sustancias inertes o excipientes, que pueden incluir ligandos tales como celulosa microcristalina, gelatina o goma arábiga; recipientes 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 saporíferos tales como menta y salicilato de metilo. Otros sistemas de administración farmacéutica incluyen hidrogel, hidroximetilcelulosa, liposomas, microcápsulas, microemulsiones, microesferas, etc. Las inyecciones locales directamente en los tejidos afectados por enfermedades tales como tumores es un método preferentemente para la administración de los anticuerpos de la presente invención.

Los anticuerpos de la invención pueden congelarse o liofilizarse y reconstituirse inmediatamente antes del uso en un tampón adecuado. Considerando que la liofilización y reconstitución pueden determinar una pérdida variable en la actividad de un anticuerpo (para inmunoglobulinas convencionales, los anticuerpos de clase IgM tienden a tener una mayor pérdida de actividad que los anticuerpos de clase IgG), los niveles de administración tienen que calibrarse para compensar este hecho.

Gracias a su alta capacidad de bloqueo, las composiciones que contienen los anticuerpos de la presente invención pueden ser para su uso en tratamientos profilácticos y/o terapéuticos para prevenir o reducir el componente inflamatorio asociado con situaciones patológicas o dolor crónico, en particular dolor visceral crónico (asociado con trastornos fisiológicos tales como dismenorrea, dispepsia, reflujo gastrointestinal, pancreatitis, visceralgia o síndrome del intestino irritable).

En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen anticuerpos de la presente invención son para su uso en la administración a pacientes que aún no sufren una patología particular, para aumentar su resistencia.

Los anticuerpos divulgados en el presente documento también proporcionan un método para reducir el volumen de tumores de próstata o páncreas y para prevenir el crecimiento adicional del tumor o reducir la velocidad de crecimiento del tumor. Este efecto puede mediarse por los anticuerpos humanizados de la presente divulgación porque son extremadamente eficaces en la neutralización da la interacción entre NGF y TrkA, necesaria para mantener el crecimiento y la progresión del tumor de forma autocrina o paracrina. Su administración en el sitio del tumor preferentemente se realiza mediante inyección directa y localizada en el tejido o cerca del sitio del tumor. Para la administración sistémica, las dosis varían de 0,05 mg/kg al día a 500 mg/kg al día, aunque se prefieren dosificaciones en la región inferior del intervalo porque son más fáciles de administrar. Las dosificaciones pueden calibrarse, por ejemplo, para garantizar un nivel particular en el plasma del anticuerpo (en el intervalo de aproximadamente 5-30 mg/ml, preferentemente entre 10-15 mg/ml) y mantener este nivel durante un periodo de tiempo dado hasta que se consiguen los resultados clínicos. Los anticuerpos humanizados se eliminarían mucho más lentamente y requerirían menores dosificaciones para mantener un nivel eficaz en el plasma; además, considerando la alta afinidad, la administración es menos frecuente y menos grande que con los anticuerpos que tienen menor afinidad. La dosificación terapéuticamente eficaz de cada anticuerpo puede determinarse durante el tratamiento, basándose en la reducción del volumen del tumor o en la velocidad de crecimiento del tumor o, idealmente, en la desaparición total del estado patológico canceroso. Los métodos eficaces para medir o evaluar el estadio de tumores pancreáticos o prostáticos se basan en la medición del antígeno prostático específico (PSA) en sangre, en la medición del tiempo de supervivencia para tumores pancreáticos, o en la medición de la ralentización o inhibición de la difusión para metástasis en el caso de los dos tumores.

Para inyección directa a nivel del sitio del tumor, la dosificación depende de diferentes factores que incluyen el tipo, estadio y volumen del tumor, junto con muchas otras variables. Dependiendo del volumen del tumor, las dosis terapéuticas típicas pueden variar de inyecciones de 0,01 mg/mm a inyecciones de 10 mg/mm que pueden

administrarse con la frecuencia necesaria. Otro método para evaluar la eficacia de un tratamiento particular es evaluar la inhibición del receptor TrkA, por ejemplo, midiendo su actividad por medio de ensayos ELISA (Angeles *et al.,* 1996).

Es importante destacar que TrkA está configurado no solo como una diana terapéutica sino también como una diana de diagnóstico para la formación de imágenes *in vivo*, por ejemplo para la formación de imágenes de tumores positivos para TrkA (como un marcador positivo o negativo, dependiendo del tipo y origen del tumor) y la formación de imágenes en células del proencéfalo basal (como un marcador precoz de la insurgencia de la enfermedad de Alzheimer).

Para fines diagnósticos, los anticuerpos pueden estar marcados y no marcados. Los anticuerpos no marcados pueden usarse en combinación con otros anticuerpos marcados (anticuerpos secundarios), que son reactivos contra anticuerpos humanizados o humanos (por ejemplo, anticuerpos específicos para las regiones constantes de inmunoglobulinas humanas). Como alternativa, los anticuerpos pueden marcarse directamente. Pueden usarse una amplia diversidad de marcadores, por ejemplo radionúclidos, fluoróforos, colorantes, enzimas, sustratos enzimáticos, factores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, ligandos (en particular hapténicos), etc. En el sector se dispone de numerosos tipos de ensayos inmunológicos.

En particular, para las aplicaciones de formación de imágenes para diagnóstico, está conjugado al anticuerpo un agente que sea detectable, o está marcado, de manera isotópica (usando radioisótopos de yodo, indio, tecnecio) o de una manera paramagnética (átomos o iones paramagnéticos, tales como elementos de transición, actínidos y tierras raras; en particular manganeso II, cobre II y cobalto II) como se describe por Goding (1986) y Paik *et al.* (1982). Los procedimientos de formación de imágenes implican la inyección intravenosa, intraperitoneal o subcutánea (en regiones de drenaje linfático para identificar metástasis de ganglios linfáticos) y usan detectores de emisiones de radionúclidos (tales como contadores de centelleo β) en el caso de inmunoescintografía; si en su lugar se usa un marcador paramagnético, se usa un espectrómetro de RMN (Resonancia Magnética Nuclear).

La invención se describirá a continuación en sus realizaciones no limitantes, haciendo referencia a las siguientes figuras:

Figura 1: A) Análisis por medio de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE 12%) y tinción con Azul de Coomassie del resultado de la purificación del fragmento Fab del anticuerpo αD11 (pocillo 1: muestra de anticuerpo αD11 digerida proteolíticamente con papaína; pocillo 2: fragmento Fab del anticuerpo αD11 purificado y concentrado; pocillo 3: pesos moleculares; B) cristal típico del fragmento Fab del anticuerpo αD11; C) espectro de difracción de alta resolución obtenido con un cristal del fragmento Fab del anticuerpo αD11; D) Diagrama de Ramachandran de los ángulos de torsión de la cadena principal de los dominios pesado y ligero del fragmento Fab del anticuerpo αD11.

Figura 2: A) B) C) D) Distribuciones de los anticuerpos humanizados o de origen humano (nombrados usando los códigos PDB de sus estructuras cristalográficas) de acuerdo con las tres variables analizadas; E) F) Desviaciones de los anticuerpos humanizados o de origen humano del valor óptimo hipotético de αD11 (calculado considerando tanto el grado de identidad total y de homología - **en azul** - como el nivel de la región marco - **en magenta** -) G) Alineamiento estructural con el fragmento Fv de αD11 de las regiones respectivas de los anticuerpos humanizados o de origen humano, seleccionado de acuerdo con el grado de identidad y homología con los anticuerpos murinos y con el grado de resolución de datos estructurales disponibles; H) I) alineamiento estructural con el fragmento Fv de αD11 (mostrado **en cian**) de la región respectiva del anticuerpo humanizado seleccionado 1JPS (mostrado **en rojo**) en H); del modelo de los anticuerpos resultantes después del injerto de CDR (mostrado en amarillo a nivel de la región marco, en blanco a nivel de la CDR) en I); L) modelo del fragmento Fv del anticuerpo humanizado αD11 obtenido como resultado de la identificación de supuestas retromutaciones en la región marco elegida (los restos de origen humano se muestran en cian y los restos de origen murino se muestran en morado).

Figura 3: Alineamiento de las estructuras primarias de las regiones variables de la cadena pesada (A) y de la cadena ligera (B) respectivamente de αD11 (SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 4), del anticuerpo humanizado seleccionado para la humanización (1JPS; SEC ID Nº: 19, SEC ID Nº: 20), de la forma humanizada de αD11 después del injerto de CDR en la región marco de 1AD0 y de las retromutaciones y mutaciones descritas (αD11 Hum; SEC ID Nº: 17, SEC ID Nº: 18). Las CDR se destacan en la secuencia de la forma humanizada de las dos cadenas de αD11 por caracteres subrayados.

Figura 4: A) secuencia de nucleótidos del ADNc de la región variable de la cadena ligera de la forma de rata de αD11 (SEC ID Nº: 3); B) secuencia de nucleótidos del ADNc de la región variable de la cadena pesada de la forma murina de αD11 (SEC ID Nº:1); C) y E) secuencia de los oligonucleótidos trazados para obtener la forma humanizada de la región variable de la cadena ligera de αD11 (SEC ID Nº: 18): L1S: SEC ID Nº: 11; L2AS: SEC ID Nº: 12; L3S: SEC ID Nº: 13; L4AS: SEC ID Nº: 14; L5S: SEC ID Nº: 15; L6AS: SEC ID Nº: 16, por medio de solapamiento-ensamblaje. Técnica de PCR, mostrada junto con la correspondiente traducción de la secuencia de

aminoácidos; D y F) secuencia de los oligonucleótidos trazados para obtener la forma humanizada de la región variable de la cadena pesada de αD11 (SEC ID Nº: 17): H1S: SEC ID Nº: 5; H2AS: SEC ID Nº: 6; H3S: SEC ID Nº: 7; H4AS: SEC ID Nº: 8; H5S: SEC ID Nº: 9; H6AS: SEC ID Nº: 10, por medio de la técnica de PCR de solapamiento-ensamblaje, mostrada junto con la correspondiente traducción en la secuencia de aminoácidos.

Figura 5: Mapas de los plásmidos usados para clonar las secuencias de las regiones variables humanizadas del anticuerpo obtenido por PCR de solapamiento-ensamblaje. A) *pVLexpress* para el dominio variable de la cadena ligera, B) *pVHexpress* para el dominio variable de la cadena pesada, C) plásmido resultante de la clonación en *pVLexpress* de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado, D) construcciones alternativas obtenidas como resultado de la clonación en *pVHexpress* de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado: 1) para la expresión en inmunoglobulina intacta de forma IgG1, 2) para expresión en forma de fragmento Fab, 3) para expresión en forma de inmunotoxina.
Figura 6: Ensayo de la actividad de unión del anticuerpo αD11 en forma humanizada por medio de ensayo ELISA, realizado por inmovilización en NGF plástico.

Resultados

ESTRUCTURAS DE RAYOS X DEL FRAGMENTO FAB DEL ANTICUERPO MONOCLONAL αD11

El anticuerpo monoclonal se obtuvo y purificó de acuerdo con procedimientos convencionales. La inmunoglobulina IgG2a αD11 se expresó en el sobrenadante por medio de cultivo de células de hibridoma y se concentró por precipitación con sulfato amónico al 29% seguido de diálisis en PBS. La inmunoglobulina se purificó por cromatografía de afinidad usando una columna de Proteína G Sepharose (Pharmacia).

Después de la diálisis en tampón fosfato 10 mM pH 7, EDTA 20 mM usando membranas Spectra-Por 12/14K (Spectrum) a 4º C, la muestra se concentró por medio de unidades de ultrafiltración Centricon 50KDa (Amicon) y se incubó con Cys 13 mM y se trató con papaína inmovilizada (Pierce) (con una relación de enzima:sustrato de 1:15) durante 5 h a 37 ºC. El procedimiento para purificar los respectivos fragmentos Fab esta diversificado, aunque siempre se basa en cromatografía de intercambio iónico.

En términos de la purificación del fragmento Fab del anticuerpo αD11, la muestra tratada con papaína se dializó frente a tampón fosfato 10 mM pH 7,8; los fragmentos Fc se eliminaron mediante una columna de DEAE-Sephacel (Pharmacia) equilibrada con este mismo tampón. El fragmento Fab de αD11 se recogió en el volumen excluido, mientras que los fragmentos Fc y una fracción de IgG2a no digerida se eluyeron con tampón fosfato 250 mM pH 6,8. El fragmento Fab se separó de la IgG2a no digerida por medio de un gel de filtración en una columna Superdex G75 (Pharmacia) equilibrada con tampón fosfato 10 mM pH 7,8, NaCl 150 mM. La homogeneidad y la pureza de las fracciones se controlaron por separación electroforética en gel de poliacrilamida al 12% seguido de tinción con Coomassie (Figura 2A). La concentración de la proteína purificada se determinó por medio del ensayo de Lowry (Bio-Rad). A partir de 11 sobrenadantes de hibridoma, fue posible obtener hasta 6 mg de Fab αD11 (excediendo la pureza del 99%).

El fragmento Fab del anticuerpo αD11 purificado en fosfato Na 10 mM pH 7,8 y NaCl 50 mM se concentró a 5-10 mg/ml por medio de una unidad de ultrafiltración Centricon 30 KDa (Amicon). Los experimentos de cristalización se realizaron siguiendo el método de gota colgante a 16 ºC siguiendo una estrategia de combinación factorial (Jancarik & Kim, 1991) usando el Kit Crystal Screen I y II (Hampton Research -Laguna Niguel, CA, Estados Unidos) y el Kit Screening (Jena BioSciences).

Se añadieron gotas de 2 μl de la muestra proteica concentrada a un volumen igual de la solución que contenía el agente de precipitación y se equilibró por difusión con una solución en el depósito (0,7 ml) en placas Linbro de 24 pocillos.

En términos del fragmento Fab del anticuerpo αD11, los resultados iniciales más prometedores, obtenidos usando volúmenes iguales de proteína y de agente de precipitación que contenía PEG4000 al 20%, NaCl 0,6 M, MES 100 mM pH 6,5 (número de Kit 4, solución C2), requirieron un largo proceso de optimización, modificando la composición del agente de precipitación a PEG4000, NaCl 0,6 M, BTP 100 mM pH 5,5 y las relaciones entre proteína y solución de precipitación (1,5:1) hasta que se obtuvieron cristales que crecían en aproximadamente una semana, de forma similar a lo que se muestra en la Figura 1B.

Se recogió una serie inicial de datos de baja resolución en la línea de difracción de XRD1 del sincrotrón ELETTRA (Trieste, Italia) y después una segunda serie de datos más completa a mayor resolución en la línea de difracción ID14-EH1 del sincrotrón ESRF (Grenoble, Francia). Los cristales se congelaron bajo un flujo de nitrógeno líquido con el sistema de refrigeración de Oxford Cryosystems (Oxford, Reino Unido).

En la Figura 1B se muestra un espectro de difracción de alta resolución representativo para la proteína.

Los datos de difracción de rayos X se procesaron, indexaron, integraron y posteriormente se aumentaron a escala usando los programas *DENZO* y *SCALEPACK* (Otwinowski & Minor, 1997) respectivamente, mientras que para la reducción de los datos se usó el paquete *CCP4* (Collaborative Computational Project, Número 4, 1994).

La siguiente tabla resume los parámetros estadísticos para recoger y procesar los datos de alta y baja resolución de los cristales del fragmento Fab del anticuerpo αD11:

Fuente de rayos X	ELETTRA	ESRF
Longitud de onda (Å)	1,000	0,934
Detector	marCCD	marCCD
Grupo espacial	P1	C2
Parámetros de la celda unitaria		
a (Å)	42,685	114,801
b (Å)	50,626	69,354
c (Å)	102,697	64,104
α (º)	81,977	90
β (º)	89,116	117,02
γ (º)	85,957	90
Mosaicidad (º)	0,44	0,40
Intervalo de resolución (A)	47,6-2,57 (2,8-2,7)	17,0-1,70 (1,75-1,70)
Nº de mediciones	124456	492594
Nº de reflejos observados con I ≥ 0	74241	399184
Nº de reflejos únicos con I ≥ 0	23413(2162)	47951 (3198)
Completitud (%)	98,2 (92,4)	97,2 (78,4)
Redundancia	5,7 (5,2)	6,7 (7,5)
<I/σ > de los datos medidos	29,6 (6,7)	9,5(2,1)
R_{sym} (%)	11,0(33,5)	5,8 (27,8)

Donde los valores entre paréntesis se refieren a la cubierta con la mayor resolución. Considerando el alto número de estructuras disponibles de fragmentos Fab, el método más conveniente para determinar la estructura de las proteínas fue Sustitución Molecular. En la búsqueda en el Banco de Datos de Proteínas (Berman *et al.,* 2000) de estructuras homologas, los criterios de selección dieron prioridad a la combinación entre resolución comparable y máximo nivel de identidad de secuencia. Sobres estas bases, se seleccionaron para αD11:1ClC: la estructura del complejo de fragmentos Fab idiotipo-antiidiotipo FabD1.3-FabE225 (Bentley *et al.,* 1990), resuelta a una resolución de 2,5 Å y proporcionada con una identidad de secuencia respectivamente del 82 y 82,65% para la cadena pesada y ligera. La determinación de la estructura se obtuvo por el método de Sustitución Molecular usando el *AMo*Re program (Navaza, 1994), usando los modelos respectivos por separado los dominios constantes y dominios variables, considerando la variabilidad extrema del ángulo formado por el eje de seudosimetría binaria entre las regiones variable y constante.

La solución obtenida en la determinación de la estructura del fragmento Fab de αD11 después del refinado con cuerpo rígido para el grupo espacial C2 se muestra en la siguiente tabla:

Pico	α	β	γ	x	y	z	C_f	R_f	C_I	C_p
V	151,0	155,4	43,0	0,1424	0,0005	0,449				
C	17,8	63,7	73,2	0,3625	0,9532	0,1991	55,0	38,9	49,7	35,9

Donde V = dominio variable
C = dominio constante
α, β, γ = Ángulos eulerianos (º).
x,y,z = Translación (fraccionaria).
C_f = Correlación de las amplitudes (x100).
R_f = Factor R cristalográfico (x100).
C_i = Correlación de las intensidades (x100).
C_p= Correlación de la función de Patterson truncada (x100).

El posterior refinado de la estructura se obtuvo por medio de un procedimiento cíclico, que comprendía dos fases alternas: construcción manual del modelo usando el software interactivo para gráficos informáticos “O” (Kleywegt y Jones, 1994); refinado posicional y refinado de factores térmicos isotrópicos B usando protocolos automáticos del kit CNS, Cristalografía y RMN (Brünger *et al.,* 1998). El procedimiento después de algunas fases de refinado con cuerpo rígido, contempló diferentes ciclos de refinado. Una vez completada la inserción de todas las mutaciones y

deleciones para completar los modelos, se realizó la localización de las moléculas de agua y cualquier ión y ligando. Al final, manteniendo el modelo tan próximo como fuera posible a los valores ideales en términos de estereoquímica, se optimizaron el peso posicional *wa* y el peso del factor térmico B *r-weight*.

Los parámetros estadísticos y los parámetros finales que describen la calidad del modelo obtenido para el fragmento Fab del anticuerpo αD11 se resumen en la siguiente tabla:

Número de átomos de proteína	3229
Número de átomos de disolvente	403
Número de iones cloruro	1
Intervalo de Resolución (Å)	30-1,70
Factor R final	19,54%
Factor R_{libre} final (calculado sobre el 10% de los datos)	24,22%
Desviaciones de Rms	
Distancias de unión (Å)	0,0096
Ángulos de unión (º)	1,6571
Ángulo Diédrico (º)	27,40
Ángulos incorrectos (º)	1,048
Factor Térmico Isotrópico Medio (A^2)	
Proteína completa	25,58
Cadena ligera	24,14
Cadena pesada	22,99
Moléculas de agua	38,80
Iones (cloruro)	20,58

Además, el modelo se examinó por análisis geométrico final con el kit PROCHECK (Laskowski *et al.,* 1993) como se muestra en la tabla y en el diagrama de Ramachandran respectivo (Figuras 1D).

USO DE ESTRUCTURAS DE RAYOS X DEL FRAGMENTO FAB DEL ANTICUERPO MONOCLONAL αD11 EN LA SELECCIÓN DE UNA REGIÓN MARCO DE ORIGEN HUMANO

En la selección de regiones marco de anticuerpos humanos, se siguió la estrategia descrita anteriormente, que combina el grado de identidad entre el anticuerpo de origen murino y humano a nivel de la secuencia primaria con el grado de similitud estructural de los esqueletos de los polipéptidos.

En particular, se seleccionó una serie de posibles regiones marco aceptoras de origen humano o anticuerpos humanizados basándose en el máximo nivel de homología y de identidad de las estructuras primarias mediante una búsqueda en la base de datos BLAST. Esta selección se realizó para los dos anticuerpos bloqueantes considerando las regiones variables enteras de los anticuerpos y estrechando la búsqueda a las regiones marco.

Dentro de cada grupo de anticuerpos seleccionados, solo se consideraron aquellos para los que se disponía de datos estructurales con alta resolución o, de otra manera, con una resolución comparable a la de las estructuras obtenidas por nosotros (es decir no mayor de 2,5 Å), realizando una búsqueda en PDB (siglas en inglés de Banco de Datos de Proteínas). Los esqueletos de aminoácidos respectivos después se superpusieron usando el software “superimpose” (Diederichs, 1995).

La Figura 2G muestra el resultado del alineamiento entre la región Fv de αD11 y las estructuras terciarias de los esqueletos de átomos de carbono alfa de los anticuerpos humanizados o de origen humano, seleccionados basándose en el alineamiento óptimo de las estructuras primarias con el anticuerpo a humanizar y en la alta resolución de los datos estructurales disponibles.

Para evaluar el grado de superposición de cada estructura individual, de origen humano u obtenida por ingeniería genética, con αD11, se calculó la RMS entre átomos de carbono alfa que constituían los esqueletos de aminoácidos respectivos, sin considerar pares de átomos con una RMS superior a 2 Å.

La selección de la región marco óptima para la humanización se configura como un problema de tres variables, que por lo tanto puede representarse en el espacio, cuando se asocia el nivel de homología y el grado de identidad con el alineamiento estructural. Este tipo de análisis después se realizó reduciendo también las regiones en cuestión en los dos tipos de alineamiento a las regiones de los marcos respectivos.

Como se muestra en la Figura 2 las distribuciones de los anticuerpos considerados en el espacio de las tres variables analizadas (respectivamente, valor de RMS, porcentajes de átomos sobre los que se calculó la RMS y un índice de similitud entre estructuras primarias, es decir, porcentaje de identidad global -A-, de homología global -C-, de identidad a nivel de la región marco -B-, de homología a nivel de la región marco -D-) son mutuamente coherentes y sistemáticos para los dos casos considerados.

Además, comparando estas distribuciones con la posición óptima en el espacio de las tres variables que ocuparía cada anticuerpo si fuera de origen humano, es posible identificar claramente el anticuerpo de origen humano que se aproxima más a esta posición ideal a nivel de la estructura primaria y terciaria. Para racionalizar, en el caso de los dos anticuerpos, este resultado, en cada uno de los cuatro análisis se calcularon las desviaciones de la posición óptima hipotética para cada posición de los anticuerpos humanizados o de origen humano considerados (Figuras 2E y 2F para αD11).

En este caso, también, los resultados son coherentes y confirman las indicaciones previas.

Basándose en este método de selección, se seleccionaron dos anticuerpos humanizados diferentes como regiones marco aceptoras en el proceso posterior de injerto de CDR para la humanización de los dos anticuerpos que neutralizaban la interacción NGF/TrkA. En particular, la Figura 2H muestra el alineamiento estructural a nivel de la región Fv de los dos anticuerpos bloqueantes con el anticuerpo humanizado seleccionado respectivo, es decir, usando los códigos PDB, 1JPS para αD11. La Figura 2 compara la misma región del anticuerpo murino con el modelo del mismo anticuerpo después del injerto de CDR.

Una vez definidas las CDR, se identificaron las clases canónicas (definidas por Chothia y Lesk) a las que pertenecen y posteriormente se mantuvieron los restos canónicos en el anticuerpo humanizado: para el anticuerpo, se destacaron con caracteres subrayados en la Figura 3.

Con respecto al análisis posterior de las retromutaciones a introducir, para mantener los restos que median la interacción entre la cadena ligera y la cadena pesada de los dominios variables, se insertaron las siguientes retromutaciones para mantener la interfaz entre los dos dominios:

L34, L46, L92 y H35 para αD11.

Además, para mantener las características de la zona Vernier, se realizaron las siguientes retromutaciones:

H71 para αD11 (que, en cualquier caso, considera sustituciones de restos de aminoácidos representados en secuencias consenso humanas).

Posteriormente, después de la comparación con las secuencias consenso principales de inmunoglobulinas humanas, se realizaron las siguientes retromutaciones:

L56 para αD11

Además, de nuevo basándose en las secuencias consenso de inmunoglobulinas humanas, en la forma humanizada de αD11 se introdujo la siguiente mutación con restos de inserto conservados en el humano en lugar de los restos poco habituales presentes tanto en las regiones marco donadoras como en las regiones marco aceptoras.

H67 (V→F).

El par : de estructuras cristalográficas se modificó, realizando primero el injerto de las CDR de origen animal en las regiones marco humanizadas. Después, se introdujeron todas las mutaciones y retromutaciones descritas anteriormente. Después se ensamblaron las estructuras modificadas en inmunoglobulinas compuestas. Los modelos resultantes se refinaron minimizando la energía mecánica (en términos de ángulos de torsión y ángulos y distancias de unión) usando el campo de fuerzas.

HUMANIZACIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL αD11

Después de seleccionar el anticuerpo humanizado donante de la región marco para conseguir el injerto de CDR de αD11, se diseñan las regiones variables respectivas que combinan las CDR de rata de αD11 con la región marco del anticuerpo humanizado modificado de acuerdo con las mutaciones indicadas anteriormente.

Sustancialmente, la región variable humanizada puede obtenerse por un procedimiento basado en el método de PCR de solapamiento-ensamblaje, usando oligonucleótidos de aproximadamente 80 bases, que alternan filamentos con sentido y antisentido con superpuestos consecutivos durante una longitud de 20 bases de tal forma que se permite la formación de moléculas de filamento parcialmente dobles como resultado de la hibridación (Figura 4B). Después de rellenar las discontinuidades por medio de la Vent polimerasa, el filamento doble se amplifica por PCR usando como cebadores dos oligonucleótidos cortos que llevan las secuencias en el extremo 5' del propio filamento doble junto con sitios de restricción adecuados para la posterior clonación direccional (respectivamente ApaLI/BglII para la clonación del dominio variable de la cadena ligera y BssHII/BstEII para la clonación del dominio variable de la cadena pesada), después de la digestión con enzimas de restricción respectivas, en el plásmido *pVLexpress* para el dominio variable de la cadena ligera (Figura 5A) y en el plásmido *pVHexpress* para el dominio variable de la cadena pesada (Figura 5B). Estos vehículos permiten expresar en fusión con las secuencias clonadas los dominios

constantes de origen humano, respectivamente, C_K y CH1, CH2 y CH3. Usando estos vectores, por lo tanto, es posible expresar el anticuerpo en forma de moléculas de IgG1 (Figura 5C y 5D1) en líneas celulares humanas tales como las indicadas anteriormente. Para obtener el anticuerpo humanizado en forma de fragmentos Fab, es suficiente actuar únicamente sobre el vehículo en el que se clona la cadena pesada. En particular, es posible sustituir la parte constante entera con el único dominio CH1 amplificado por PCR usando cebadores específicos que disponen de sitios de restricción en los extremos para la clonación direccional *SacII-XbaI* (como se muestra en la Figura 5D2).

EXPRESIÓN Y ENSAYO DE UNIÓN DEL ANTICUERPO αD11 HUMANIZADO

Se cotransfectaron 250.000 células COS con 1 μg de ADN plasmídico codificante de VH en VK del anticuerpo humanizado (un total de 2 μg) por medio de FuGENE de acuerdo con el protocolo recomendado (Roche). Las construcciones se usaron para obtener los anticuerpos humanizados en forma de IgG1.

En paralelo a las cotransfecciones de las construcciones descritas anteriormente, se cotransfectaron las formas quiméricas correspondientes para el anticuerpo, es decir:

la VH de rata se clona en fusión con la Cγ de origen humano en pcDNAI y la Vk de rata se clona en fusión con la Cγ de pcDNAI de origen humano. Después de 72 horas desde la transfección, se recogió el sobrenadante que contenía las inmunoglobulinas expresadas por las células hospedadoras y se concentró usando Centriprep 50 (Amicon).

La capacidad de reconocer los ligandos respectivos del anticuerpo humanizado se verificó por medio de un ensayo ELISA y se comparó con formas quiméricas respectivas. Los resultados se muestran en la Figura 6.

Para la inmovilización en placas Maxi sorb de 96 pocillos de plástico, éstas se incubaron a 4 ºC durante una noche con una solución que contenía los ligandos del anticuerpo (el NGF murino purificado a partir de glándulas submandibulares) a una concentración de 10 μg/ml en tampón carbonato sódico 0,1 M pH 9,6.

Después de una hora de bloqueo con PBS que contenía leche al 3% (MPBS) a temperatura ambiente, los sobrenadantes concentrados se incubaron con diluciones en serie (1:2,1:20; 1:200) y en paralelo también con el sobrenadante de células COS no transfectadas (control negativo).

Después de la incubación con el anticuerpo primario (que reconoce la región constante Cγ de origen humano) y con el anticuerpo secundario (anti-conejo conjugado con peroxidasa), es posible detectar la actividad de unión como la densidad óptica a 450 nm (DO450) por medio de incubación con el substrato TMB (TECNA). Como control positivo se incluyó el anticuerpo monoclonal a una concentración de 500 ng/ml.

Bibliografía

Adair *et al.* Hum.Antibod.Hybridomas 5:41 (1994)
Angeles *et al.* Anal Biochem; 236, 49 (1996)
Baca *et al.* J.Biol.Chem. 272:10678 (1997)
Baker *et al.* "Antigen and Antbody Molecular Engineering":61 (1994)
Barinaga, Science; 264, 272 (1994)
Benharetal. P.N.A.S. 91:12051 (1994)
Bentley *et al.* Nature; 348, 254 (1990)
Benvenuto *et al.* Plant Mol. Biol; 17 865 (1991)
Berardi *et al.* PNAS; 91, 684 (1994)
Berman *et al.* Nucleic Acids Res.; 28, 235 (2000).
Bird *et al.* Science; 242, 423 (1988)
Bold *et al.* J. Neurochem.; 64, 2622 (1995)
Buhler *et al.* Bio/Technology, 8, 140 (1990)
Buchnerand Rudolph, Bio/Technology; 9, 157 (1991)
Brunger, Acta Cryst.; D54, 905 (1998)
Carter *et al.* P.N.A.S. 89:4285 (1992)
Carugo and Pongor Protein Science 10, 1470 (2001)
Carugo, J. Appl. Cryst.; 36, 125 (2003)
Cattaneo *et al.* J. Neurosci.; 19, 9687 (1999)
Cesareni, FEBS Lett; 307, 66 (1992)
Clackson *et al.* Nature; 352, 624 (1991)
Chaudhary *et al.*, Nature; 339, 394 (1989)
Chen *et al.*, Gene Ther; 2, 116 (1995)
Chothia y Lesk, J. Mol. Biol.; 196, 901 (1987)
Chothia *et al.* Nature; 342, 878 (1989).

Co *et al*. PNAS; 88, 2869 (1991)
Co *et al*. J.Immunol. 148:1149-1154 (1992)
Cook *et al*. Prot.Engng. 9:623-628 (1996)
Couto *et al*. "Antigen and Antbody Molecular Engineering" 55 (1994)
Daugherty *et al*. Nucleic Acid Res. 19:2471 (1991)
De Martino *et al*. Antibody. Immunoconj. Radiopharmaceut. 4:829 (1991).
Delsite *et al*. J. Androl.; 17, 481 (1996)
De Sehryver-Keeskemeti *et al*. Arch. Pathol.; 111, 833 (1987)
Diederichs, Proteins: 23 187 (1995)
Djakiew *et al*. Cancer Res.; 51, 3304 (1991)
Domenici *et al*. Vis Neurosci.; 11,1093 (1994)
Durin *et al*. Plant Mol. Biol.; 15, 281 (1990)
Eigenbrot *et al*. Proteins 18: 49 (1994)
Ellis *et al*. J Immunol. 155:925 (1995)
Foote y Winter J.Mol. Biol. 224:487 (1992)
Garrard *et al*. Bio/Techniques; 9, 1373 (1991)
Gillman y Smith, Gene; 8, 81 (1979)
Goretzki *et al*. Surgery; 102, 1035 (1987)
Gorman *et al*. PNAS; 88, 4181 (1991)
Graziano *et al*. J.Immunol. 155:4996 (1995)
Gram *et al*. PNAS; 89, 3576 (1992)
Geldof *et al*. J. Cancer Res. Clin. Oncol.; 123, 107 (1997)
George *et al*. The Prostrate; 36, 172 (1998)
Goding, Monoclonal Antibodies: Principle and practise, 2ª edición, Academic Press (1986)
Gussow y Seemann Meth.Enzymol. 203:99 (1991)
Hakimi *et al*. J.Immunol. 151:1075 (1993)
Hamilton *et al*. J. Infect. Diseases 176:59 (1997)
Harlow and Lane, Antbodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)
Hiatt *et al*. Nature; 342, 76 (1989)
Hood *et al*. Immunology, Benjamin, N. Y., 2nj ed. (1984)
Hsiao *et al*. Prot.Engng. 7:815 (1994)
Hunkapillerand Hood, Nature; 323,15 (1986)
Huston *et al*. PNAS; 85, 5879 (1988)
Jancarik y Kim, Appl. Cryst.; 24, 409 (1991)
Jones *et al*. Nature; 321, 522 (1986)
Kashmiri *et al*. Hybridoma 14:461 (1995)
Kettleborough, Protein Engineering; 4, 773 (1991)
Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda MD, 1987 e 1991)
Kleywegt y Jones, Structure; 2, 1241 (1994).
Kolbinger *et al*. Prot.Engng. 6:971-980 (1993)
Kodandapani *et al*. Biochem. Biophys., Res. Comm.; 251, 61 (1998)
Koizumi *et al*. Pathol. Int.; 48, 93 (1998)
Lachyankar *et al*. Cancer Res; 57, 532 (1997)
Lanzavecchia *et al*. Eur. J. Immunol.; 17, 105 (1987)
Larrick y Fry, Hum. Antbodies Hybridomas; 2, 172 (1991)
Laskowski *et al*. J. Appl. Cryst.; 26, 283 (1993)
Lefkovits e Pemis, Immunological Methods, Vols. I and II (Academic Press, NY, 1979 and 1981).
Leger *et al*. Hum. Antibod. 8:3-16 (1997)
Lewin y Mendell, Trends Neurosci; 16, 353 (1993)
Lewis y Crowe Gene 101:297 (1991)
Lindsay, Ciba Foundation Symposium; 196, 39, (1996)
MacGrogan *et al*., J. Neurochem.; 59, 1381 (1992)
Maeda *et al*. Hum. Antibody. Hybridomas 2:124 (1991)
Maffei *et al*. JNeurosci; 12, 4651 (1992)
Marchetti *et al*. Cancer Res.; 56, 2856 (1996)
Matsushima y Bogenmann, Mol Cell Biol.; 13, 7447 (1993)
Meade *et al*. Bio/Technology; 8, 443 (1990)
McGregor *et al*. PNAS; 96, 4540 (1999)
Miknyoczki *et al*. Int. J. Cancer; 81, 417 (1999)
Miknyoczki *et al*. Crit. Rev. Oncogenesis; 7, 89 (1996).
Miralles *et al*. J. Endocrinology; 156, 431 (1998)
Molnar *et al*. Eur JNeurosci; 10, 3127 (1998)
Molnar *et al*. Neuroreport; 8, 575 (1997)
Monoclonal Antibobies for Cancer Detection and Therapy (eds. Baldwin y Byers, Academic Press, 1985), 159,224
Muragaki *et al*. JNeurosci; 17, 530 (1997)

Nakagawara *et al*. N Engl J Med.; 328, 847 (1993)
Navaza Acta Cryst.; A50, 157 (1994).
Oelmann *et al*. Cancer Res.; 55, 2212 (1995)
Ohta *et al*. J. Pathol.; 181, 405 (1997)
Oikawa, *et al*. Int. J. Pancreat.; 18, 15, (1995)
Olsnes and Phil, Pharmac. There; 25, 355 (1982)
Otwinowski y Minor, Methods Enzymol.; 276, 307 (1997)
Paik *et al*. J. Nucl. Med.; 23, 37 (1982)
Passaniti *et al*. Int. J. Cancer; 51, 318 (1992)
Paul, Fundamental Immunology, 3ª ed. Raven Press, N.Y., (1993)
Pflug *et al*. Mol. Carcin.; 12, 106 (1998)
Pflug *et al*. Endocrinology; 136, 262 (1995)
Pflug *et al*. Cancer Res.; 52, 5403 (1992)
Poul *et al*. Mol. Immunol. 32:101 (1995)
Presta *et al*. J.Immunol. 151:2623 (1993)
Putlitz *et al*. Bio/Technology; 8, 651 (1990)
Queen *et al*. P.N.A.S. 86:10029 (1989)
Remington's Pharmaceutical Science (15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980)
Revoltella y Butler, J. Cell. Physiol.; 104,27 (1980)
Riechmann *et al*., Nature; 332, 323 (1988)
Roberts *et al*., Nature; 328, 731 (1987)
Roguska *et al*. Prot.Engng. 9:895(1996)
Roguska *et al*. Prot.Engng. 9:895 (1996)
Roguska *et al*. PNAS, 91:969 (1994)
Rosok *et al*. J.Biol.Chem. 271:22611 (1996)
Routledge *et al*. Eur. J .Immunol. 21:2717 (1991)
Ruberti *et al*. J Neurosci.; 20, 2589 (2000)
Ruggeri *et al*. Current Medicinal Chemistry; 6, 845 (1999)
Sato *et al*. Canc.Res. 53:851 (1993)
Sato *et al*. Mol.Immunol. 31:371 (1994)
Sato *et al*. Hum.Antibod.Hybridomas 7:175 (1996)
Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., 1982).
Scott y Smith, Science; 249, 386 (1990)
Sha and Xiang Canc. Biother. 9:341 (1994)
Shearman *et al*. J. Immunol.; 147, 4366 (1991)
Skerra *et al*. Bio/Technology; 9, 273 (1991)
Sijmons *et al*. BiolTechnology; 8, 217 (1990)
Sims *et al*. J.Immunol. 151:2296 (1993)
Singer*et al*. J.Immunol. 150:2844 (1993)
Swimmer *et al*. PNAS; 89, 3756 (1992)
Tagliabue *et al*. J. Biol. Chem.; 275, 5388 (2000)
Tempest *et al*. Prot.Engng. 7:1501 (1994)
Tempest *et al*. Int. J. Biol. Macromol. 17:37 (1995)
Tempest *et al*. Biotechnology; 9, 266 (1991)
Thorpe *et al*. Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Academic Press, 168 (1982) U.S. Ser. No. 07/290,968
Verhoeyen *et al*. Science 239:1534 (1988)
Verhoeyen *et al*. "Monoclonal Antibodies":37 (1991)
Verhoeyen *et al*. Immunol. 78:364 (1993)
Winnacker, From Genes to Clones (VCH Publishers, NY, 1987)
Winter y Milstein, Nature; 349, 293 (1991)
Woolf *et al*., Neuroscience; 62, 327 (1994).
WO91/08216, 1991
Zhu *et al*., J. Clin. Oncol., 17, 2419 (1999)
Zhu and Carter J.Immunol. 155:1903 (1995)

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> LAY LINE GENOMICS SPA SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI - S.I.S.S.A.

<120> Anticuerpos anti-NGF humanizados

<130> N108279

<150> EP 04806887.8
<151> 23-12-2004

<150> PCT/IT2004/000722
<151> 23-12-2004

<150> RM2003000601
<151> 24-12-2003

<160> 40

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1
<211> 369
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 1

```
caggtgcagc tggtggaatc aggacctggt ctggtgcagc cctcacagac cctgtccctc      60

acctgcactg tctctgggtt ctcactaacc aacaacaatg tgaactgggt tcgacaggct     120

acaggaagag gtctggagtg gagtggagga gtctgggctg gtggagccac agattacaat     180

tcagctctca aatcccgact gctgaccatc actagggaca cctccaagag ccaagttttc     240

ttaaaaatgc acatgctgca atctgaagac acagccactt actactgtgc cagagacggg     300

ggctatagca gctctaccct ctatgctatg gatgcctggg gtcaaggaac ttcggtcacc     360

gtctcctca                                                             369
```

<210> 2
<211> 122
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 2

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
20 25 30

Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Arg Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

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

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 3
<211> 321
<212> ADN
<213> *Rattus* sp.

<400> 3

gacatccaga tgacccagtc tccagcttcc ctgtctgcat ctctgggaga aactgtcacc 60

atcgaatgtc gagcaagtga ggacatttat aatgctttag catggtatca gcagaagcca 120

gggaaatctc ctcagctcct gatctataat acagatacct tgcatactgg ggtcccatca 180

cgattcagtg gcagtggatc tggtacacaa tattctctca agataaacag cctgcaatct 240

gaagatgtcg caagttattt ctgtcagcac tatttccatt atcctcggac gttcggtgga 300

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> *Rattus* sp.

<400> 4

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

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

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

Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

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

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

<210> 5
<211> 81
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

```
acaggcgcgc actccgaggt gcagctggtg gaatcaggag gtggtctggt gcagcccgga      60

gggtccctgc gcctcagctg c                                                81
```

<210> 6
<211> 81
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

```
tcctggagcc tgtcgaaccc agttcacatt gttgttggtt agtgagaagc cagaggcagc      60

gcagctgagg cgcagggacc c                                                81
```

<210> 7
<211> 81
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

```
aactgggttc gacaggctcc aggaaaaggt ctggagtggg tgggaggagt ctgggctggt      60

ggagccacag attacaattc a                                                81
```

<210> 8
<211> 84
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 8

catttgtaag taagctgtgt tcttggagtt gtcgcgactg atggtgaatc gggatttgag 60

agctgaattg taatctgtgg ctcc 84

<210> 9
<211> 84
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 9

aagaacacag cttacttaca aatgaacagt ctgcgcgctg aagacacagc cgtttactac 60

tgtgccagag acgggggcta tagc 84

<210> 10
<211> 81
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 10

tgaggagacg gtgaccagag ttccttgacc ccaggcatcc atagcataga gggtagagct 60

gctatagccc ccgtctctgg c 81

<210> 11
<211> 78
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

acaggcgtgc actccgacat ccagatgacc cagtctccat cttccctgtc tgcatctgtg 60

ggagaccgcg tcaccatc 78

<210> 12
<211> 78
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

tggcttctgc tgataccatg ctaaagcatt ataaatgtcc tcacttgctc gacatgtgat 60

ggtgacgcgg tctcccac 78

<210> 13
<211> 78
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 13

gcatggtatc agcagaagcc agggaaagct cctaagctcc tgatctataa tacagatacc 60

ttgcatacag gggtccca 78

<210> 14
<211> 78
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 14

caggctgctt atcgtgagag tatagtctgt accagatcca ctgccactga atcgtgatgg 60

gacccctgta tgcaaggt 78

<210> 15
<211> 75
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

actctcacga taagcagcct gcaacctgaa gatttcgcaa cttatttctg tcagcactat 60

ttccattatc ctcgg 75

<210> 16
<211> 75
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 16

caatctagaa ttctactcac gtttgatctc caccttggtc ccttgaccga acgtccgagg 60

ataatggaaa tagtg 75

<210> 17
<211> 122
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val 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 Ser Leu Thr Asn Asn
20 25 30

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

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
100 105 110

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

<210> 18
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 18

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

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

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

Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg
85 90 95

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

<210> 19
<211> 117
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 19

Glu Val Gln Leu Val 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 Asn Ile Lys Glu Tyr
20 25 30

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

Gly Leu Ile Asp Pro Glu Gln Gly Asn Thr Ile Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Ala Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala 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 Asp Thr Ala Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 20

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Trp
85 90 95

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

<210> 21
<211> 369
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 21

gaggtgaagc tggtggagtc tgggggaggt ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt acctatacca tgtcttgggc tcgccagaca 120

ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcatac attagtaaag gtggtggtag tacctactat 180

ccagacactg taaagggccg attcaccatc tccagggaca atgcgaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagaggggct 300

atgtatggta acgatttttt ctatcctatg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc 360

gtctcctca 369

<210> 22
<211> 124
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 22

Glu Val Lys Leu Val 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 Phe Gly Asn Asp Phe Phe Phe Pro Met Asp Arg
100 105 110

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

<210> 23
<211> 318
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 23

gacattgttc tctcccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctctagggga ggagatcacc 60

ctaacctgca gtgccagctt gagtgtaagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc 120

acttctccca agctcttgat ttatactaca tccaacctgg cttctggagt cccttctcgc 180

ttcagtggca gtgggtctgg gaccttttat tctctcacaa tcagtagtgt ggaggctgaa 240

gatgctgccg attattactg ccatcagtgg agtagttatc catggacgtt cggtggaggc 300

accaagctgg aaatcaaa 318

<210> 24
<211> 106
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 24

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

Glu Glu Val 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 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 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> 25
<211> 81
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 25

```
acaggcgcgc actccgaggt gcagctgctg gagtctgggg gaggtttagt gcagcctgga      60

gggtccctgc gcctctcctg t                                                81
```

<210> 26
<211> 81
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 26

```
ccctggggcc tggcgagccc agctcatggt ataggtactg aaagtgaatc cagaggctgc      60

acaggagagg cgcagggacc c                                                81
```

<210> 27
<211> 81
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 27

```
tgggctcgcc aggccccagg gaaggggctg gagtgggtcg catacattag taaaggtggt      60

ggtagtacct actatccaga c                                                81
```

<210> 28
<211> 81
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 28

ttgcaggtac agggtgttct tcgagttgtc cctggagatg gtgaatcggc cctttacagt 60

gtctggatag taggtactac c 81

<210> 29
<211> 81
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 29

aagaacaccc tgtacctgca aatgaacagt ctgcgggctg aggacagcgc cgtctattac 60

tgtgcaagag gggctatgtt t 81

<210> 30
<211> 81
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 30

ggagacggtg accagggttc cttgacccca gcggtccata ggaaagaaaa aatcgttacc 60

aaacatagcc cctcttgcac a 81

<210> 31
<211> 78
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 31

acaggcgtgc actccgacat tgttctcacc cagtctccat ccagcctgtc tgcgtctgtc 60

ggggaccggg tcaccatt 78

<210> 32
<211> 78
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 32

gcctggcttc tgctggtacc agtgcatgta actcacacta gagctggcgc tgcaggtaat 60

ggtgacccgg tccccgac 78

<210> 33
<211> 78
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 33

tggtaccagc agaagccagg caaggctccc aagctcctga tttatactac atccaacctg 60

gcttctggag tcccttct 78

<210> 34
<211> 75
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 34

cagactactg attgtgaggg tataatcggt cccagaccca ctgccgctga agcgagaagg 60

gactccagaa gccag 75

<210> 35
<211> 78
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 35

accctcacaa tcagtagtct gcagcctgaa gatttcgcca cctattactg ccatcagtgg 60

agtagttatc catggacg 78

<210> 36
<211> 75
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 36

taagttagat ctattctact cacgttttat ttccaccttg gtgcctccac cgaacgtcca 60

tggataacta ctcca 75

<210> 37
<211> 124
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 37

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 Ala
115 120

<210> 38
<211> 106
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 38

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> 39
<211> 122
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 39

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 Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Phe Ile Gly Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ser Lys Ser Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Gln Ala Glu Asp Ser Ala Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

<210> 40
<211> 106
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 40

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

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

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

Ala 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 Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-NGF humanizado o un fragmento del mismo que mantiene la actividad de unión a NGF, donde el anticuerpo anti-NGF humanizado comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que tiene una primera CRD que comprende la secuencia de aminoácidos GFSLTNNNVN, una segunda CDR que comprende la secuencia de aminoácidos GVWAGGATDYNSALKS, y una tercera CDR que comprende la secuencia de aminoácidos DGGYSSSTLYAMDA; y
(b) una región variable de la cadena ligera que tiene una primera CDR que comprende la secuencia de aminoácidos RASEDIYNALA, una segunda CDR que comprende la secuencia de aminoácidos HT, y una tercera CDR que comprende la secuencia de aminoácidos QHYFHYPRT;

donde la región marco de la región variable de la cadena pesada es al menos el 85% idéntica a la región marco de SEC ID Nº: 19; y la región marco de la región variable de la cadena ligera es al menos el 85% idéntica a la región marco de SEC ID Nº: 20; y donde el aminoácido de la región variable de la cadena pesada que corresponde a la posición 67 de SEC ID Nº: 19 es Phe, y donde el aminoácido de la región variable de la cadena pesada que corresponde a la posición 71 de SEC ID Nº: 19 es Arg; y
donde el aminoácido de la región variable de la cadena ligera que corresponde a la posición 46 de SEC ID Nº: 20 es Leu, donde el aminoácido de la región variable de la cadena ligera que corresponde a la posición 50 de SEC ID Nº: 20 es Asn, donde el aminoácido de la región variable de la cadena ligera que corresponde a la posición 51 de SEC ID Nº: 20 es Thr, donde el aminoácido de la región variable de la cadena ligera que corresponde a la posición 52 de SEC ID Nº: 20 es Asp, donde el aminoácido de la región variable de la cadena ligera que corresponde a la posición 53 de SEC ID Nº: 20 es Thr, donde el aminoácido de la región variable de la cadena ligera que corresponde a la posición 54 de SEC ID Nº: 20 es Leu, y donde el aminoácido de la región variable de la cadena ligera que corresponde a la posición 87 de SEC ID Nº: 20 es Phe.

2. El anticuerpo anti-NGF humanizado o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, donde el isotipo del anticuerpo es IgG o IgM.

3. Un fragmento del anticuerpo anti-NGF humanizado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que mantiene la actividad de unión a NGF, donde el fragmento es un fragmento Fab, un fragmento $(Fab')_2$, un fragmento Fv, o un fragmento Fv monocatenario (scFv).

4. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-NGF humanizado o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, para su uso en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico para prevenir o reducir el componente inflamatorio asociado con una situación patológica o dolor crónico.

6. Uso de un anticuerpo anti-NGF humanizado o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la preparación de una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico para prevenir o reducir el componente inflamatorio asociado con una situación patológica o dolor crónico.

7. Un secuencia polinucleotídica que codifica el anticuerpo anti-NGF humanizado o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

8. Una célula que expresa la secuencia polinucleotídica de la reivindicación 7, donde la célula es una célula procariota o una línea celular eucariota inmortalizada.

FIG. 1

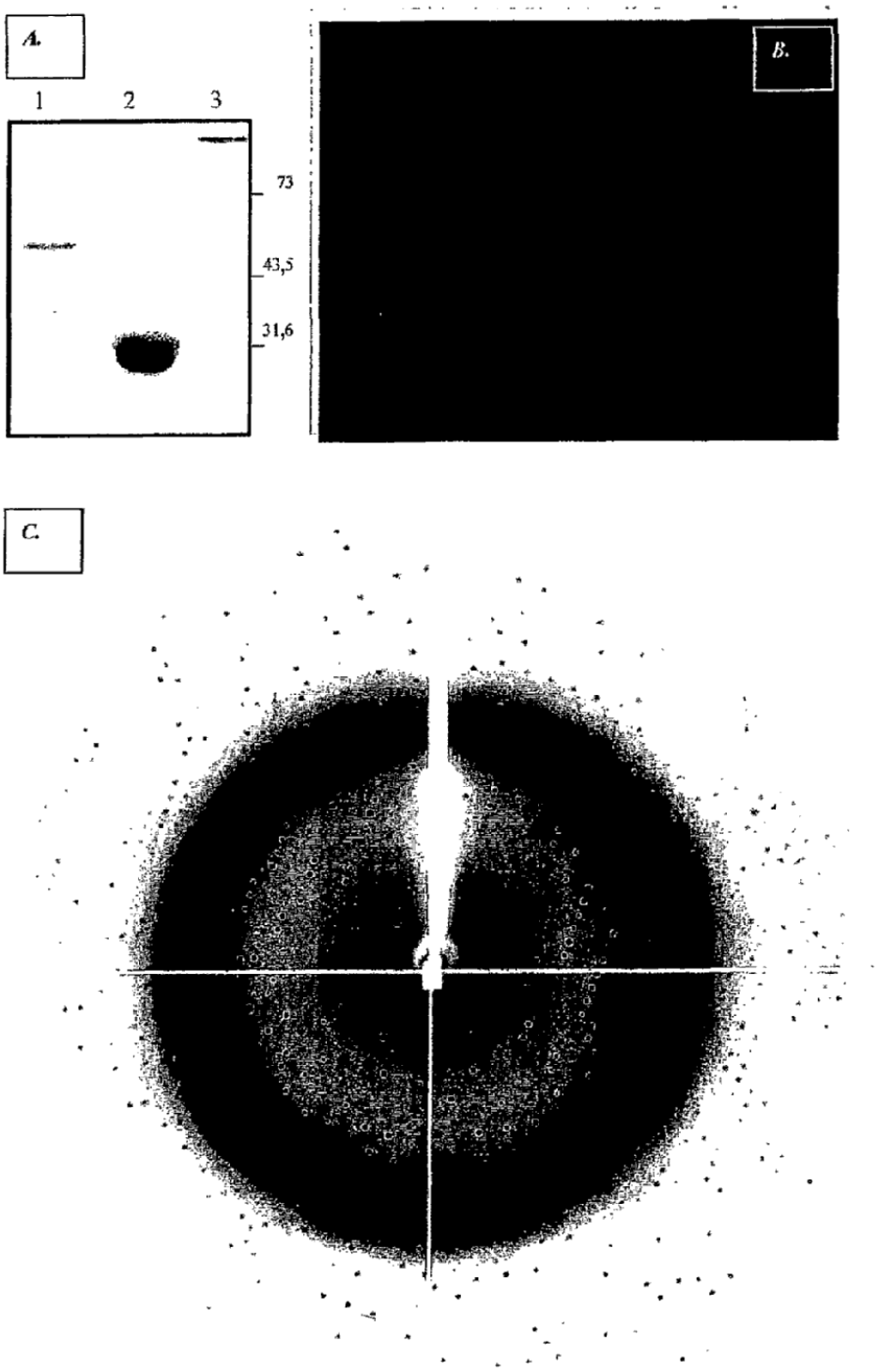


FIG. 1

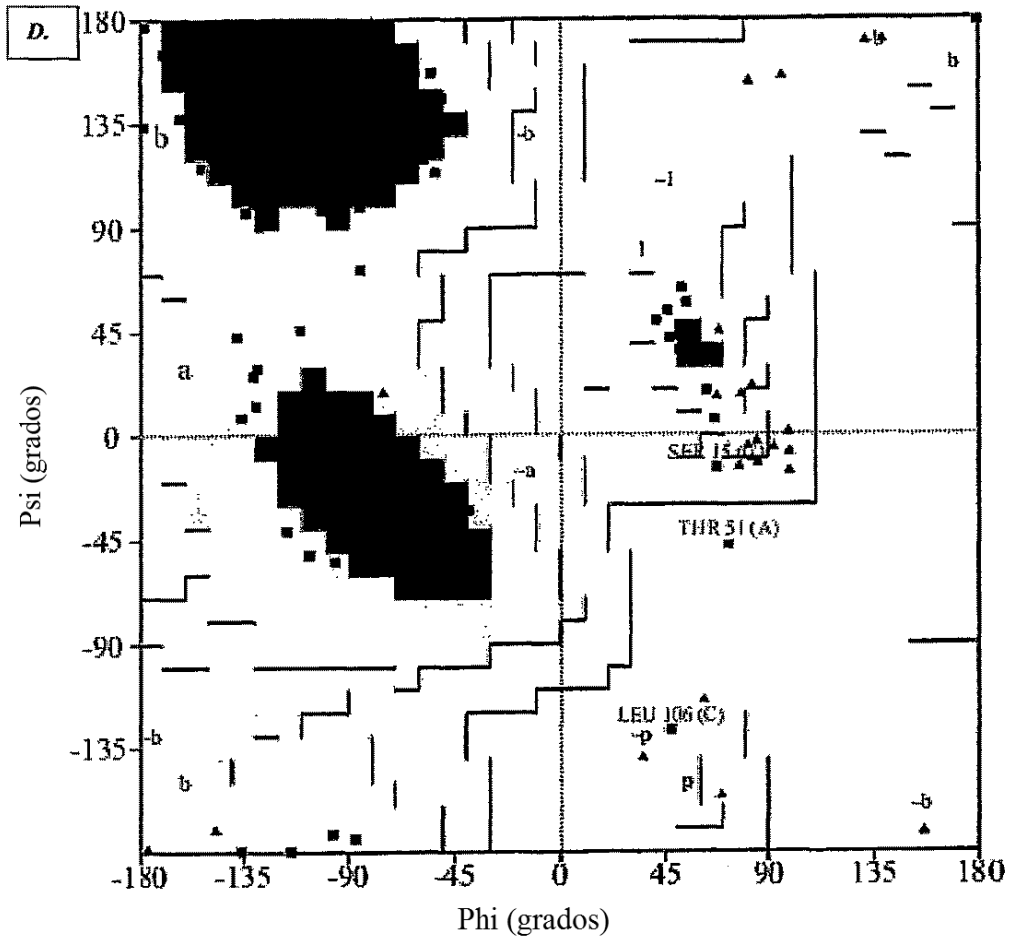
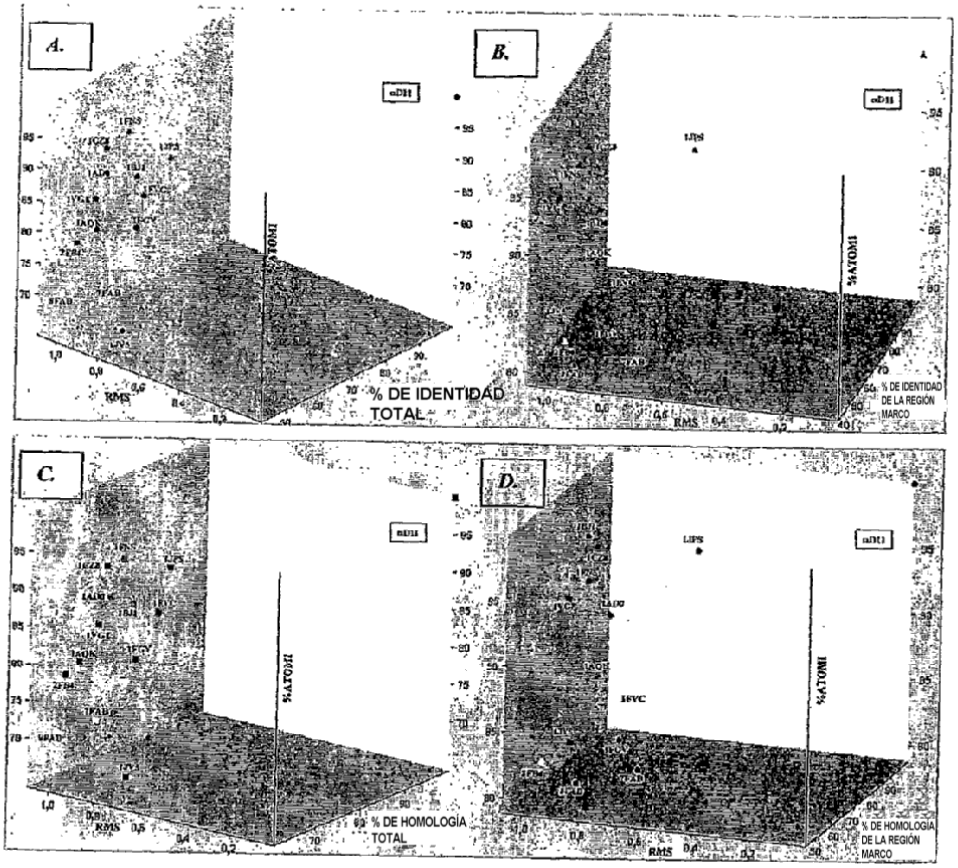
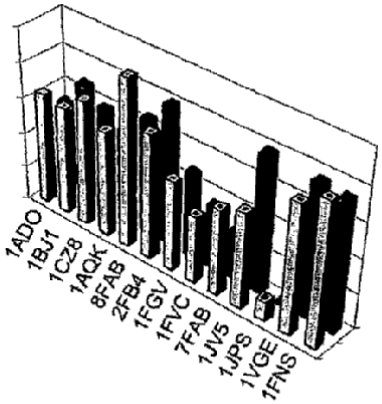

D.
180
135
90
45
0
-45
-90
-135
-180
-135
-90
-45
0
45
90
135
180
Psi (grados)
Phi (grados)
a
b
SER 15 (A)
THR 51 (A)
LEU 106 (C)

FIG. 2



A. Identidad con αD11



B. Homologia con αD11

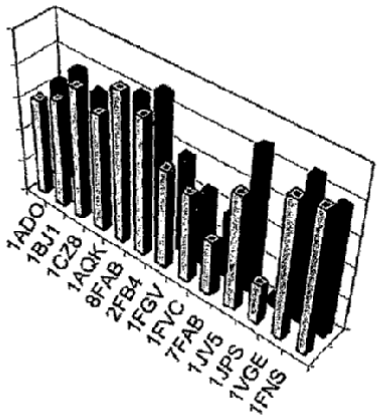


FIG. 2

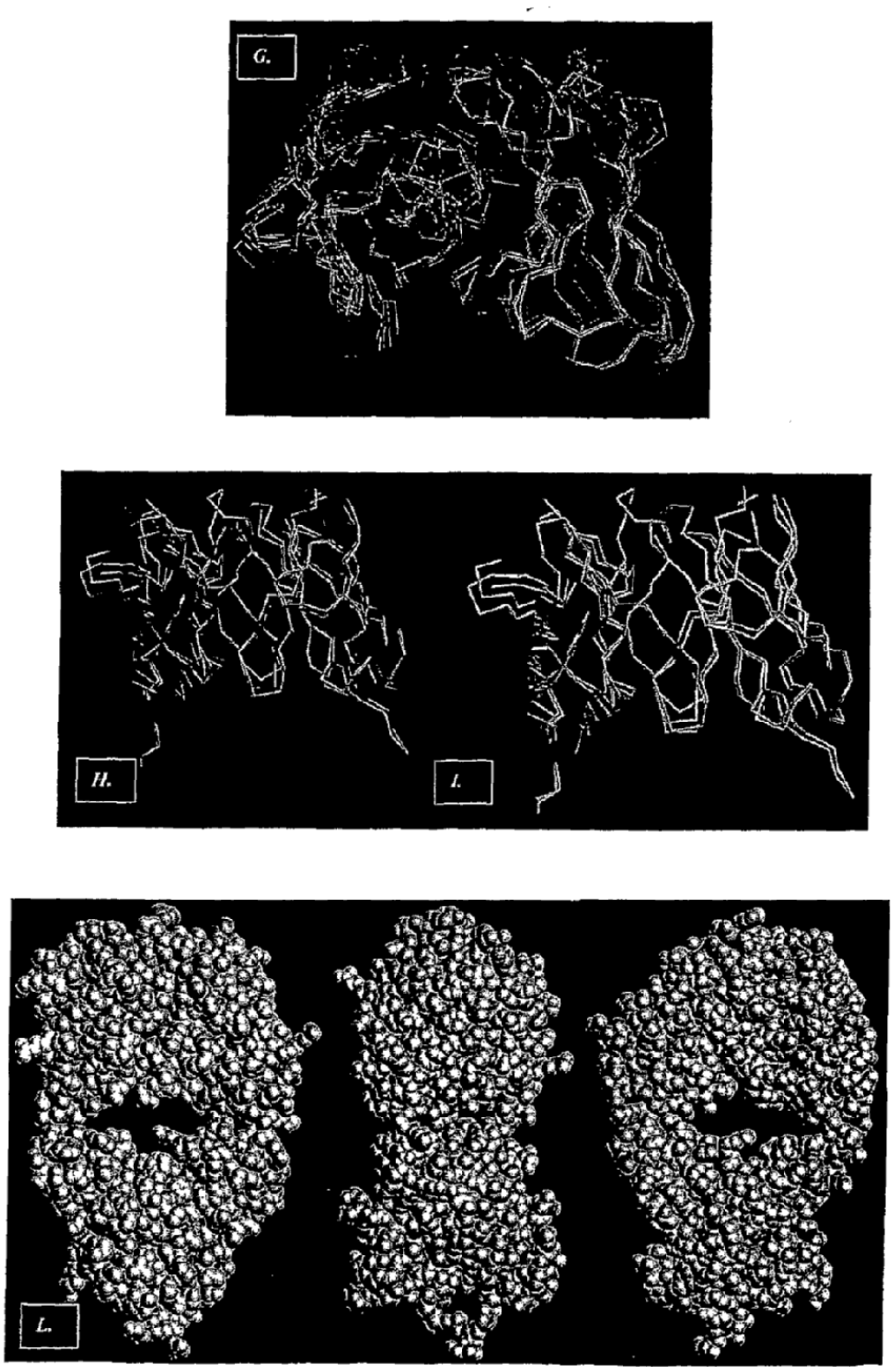


FIG. 3

A. Fragmento Fv de cadena pesada

```
                                20                  40
αD11        QVQLKESGPGLVQPSQTLSLTCTVSGFSLTNNNVNWVRQATGRGLEWMGGVWAG-G
            ||| ||| |||||   | | |  |||        ||||| | |||| |      |
1JPS        EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKEYYMHWVRQAPGKGLEWVGLIDPEQG
Hum αD11    EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGLEWVGGVWAG-G

                60                  80                      100
αD11        ATDYNSALKSRLTITRDTSKSQVFLKMHSLQSEDTATYYCARDGGYSSSTLYAMD
            | |      | ||  | ||    | | ||  |||| ||||||          |
1JPS        NTIYDPKFQDRATISADNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTAA------YFD
Hum αD11    ATDYNSALKSRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMD

αD11        AWGQGTTVTVSA
            ||||| ||||
1JPS        YWGQGTLVTVSS
Hum αD11    AWGQGTLVTVSS
```

B. Fragmento Fv de cadena ligera

```
                                20                  40
αD11        DIQMTQSPASLSASLGETVTIECRASEDIYNALAWYQQKPGKSPQLLIYNTDTL
            ||||||||| ||||| |  ||| |||| ||   | |||||||| |  |||    |
1JPS        DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRDIKSYLNWYQQKPGKAPKVLIYYATSL
Hum αD11    DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTL

                60                  80                  100
αD11        HTGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDVASYFCQHYFHYPRTFGGGTKLELK
            ||||||||||||| | | | ||| || | | |      | ||| ||| | |
1JPS        AEGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQHGESPWTFGQGTKVEIK
Hum αD11    HTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGTKVEIK
```

FIG. 4

A) VL de αD11

GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GCT TCC CTG TCT GCA TCT CTG GGA GAA ACT GTC ACC ATC GAA TGT CGA GCA AGT GAG GAC ATT
TAT AAT GCT TTA GCA TGG TAT CAG CAG AAG CCA GGG AAA TCT CCT CAG CTC CTG ATC TAT AAT ACA GAT ACC TTG CAT ACT GGG GTC
CCA TCA CGA TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGT ACA CAA TAT TCT CTC AAG ATA AAC AGC CTG CAA TCT GAA GAT GTC GCA AGT TAT TTC
TGT CAG CAC TAT TTC CAT TAT CCT CGG ACG TTC GGT GGA GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

B) VH de αD11

CAG GTG CAG CTG GTG GAA TCA GGA CCT GGT CTG GTG CAG CCC TCA CAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGG TTC TCA CTA
ACC AAC AAC AAT GTG AAC TGG GTT CGA CAG GCT ACA GGA AGA GGT CTG GAG TGG AGT GGA GGA GTC TGG GCT GGT GGA GCC ACA GAT
TAC AAT TCA GCT CTC AAA TCC CGA CTG CTG ACC ATC ACT AGG GAC ACC TCC AAG AGC CAA GTT TTC TTA AAA ATG CAC ATG CTG CAA
TCT GAA GAC ACA GCC ACT TAC TAC TGT GCC AGA GAC GGG GGC TAT AGC AGC TCT ACC CTC TAT GCT ATG GAT GCC TGG GGT CAA GGA
ACT TCG GTC ACC GTC TCC TCA

FIG. 4

C) VL injertado en αD11

```
                    D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R   V   T   I   T   C   R
5'                                          OLIGO L1S                                                           3'
ACA GGC GTG CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCT TCC CTG TCT GCA TCT GTG GGA GAC CGC GTC ACC ATC
                                                                            CAC CCT CTG GCG CAG TGG TAG TGT ACA GCT
3'                                                                                                                  5'

 A   S   E   D   I   Y   N   A   L   A   W   Y   Q   Q   K   P   G   K   A   P   K   L   L   I   Y   N   T   D   T
5'                                          OLIGO L3S                                                           3'
                                        GCA TGG TAT CAG CAG AAG CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT AAT ACA GAT ACC
CGT TCA CTC CTG TAA ATA TTA CGA AAT CGT ACC ATA GTC GTC TTC GGT                                                     TGG
3'                                          OLIGO L2AS                                                          5'

 L   H   T   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   Y   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D
5'                                                                                                                  3'
TTG CAT ACA GGG GTC CCA                                                 ACT CTC ACG ATA AGC AGC CTG CAA CCT GAA GAT
AAC GTA TGT CCC CAG GGT AGT GCT AAG TCA CCG TCA CCT AGA CCA TGT CTG ATA TGA GAG TGC TAT TCG TCG GAC
3'                                          OLIGO L4AS                                                          5'

 F   A   T   Y   F   C   Q   H   Y   F   H   Y   P   R   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K
5'                                          OLIGO L5S                                                           3'
TTC GCA ACT TAT TTC TGT CAG CAC TAT TTC CAT TAT CCT CGG
                                GTG ATA AAG GTA ATA GGA GCC TGC AAG CCA GTT CCC TGG TTC CAC CTC TAG TTT GCA CTC ATC TTA
3'                                          OLIGO L6AS                                                          5'


AGA TCT AAC
3'        5'
```

FIG. 4

D) VH injertado en αD11

```
                    E   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   G   S   L   R   L   S   C   A   A
5'                                              OLIGO H1S                                                           3'
ACA GGC GCG CAC TCC GAG GTG CAG CTG GTG GAA TCA GGA GGT GGT CTG GTG CAG CCC GGA GGG TCC CTG CGC CTC AGC TGC
                                                                                        CCC AGG GAC GCG GAG TCG ACG CGA CGG
3'                                                                                                                  5'

 S   G   F   S   L   T   N   N   N   V   N   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   G   G   V   W   A
5'                                              OLIGO H3S                                                           3'
                                            AAC TGG GTT CGA CAG GCT CCA GGA AAA GGT CTG GAG TGG GTG GGA GGA GTC TGG GCT
AGA CCG AAG AGT GAT TGG TTG TTG TTA CAC TTG ACC CAA GCT GTC CGA GGT CCT
3'                                                  OLIGO H2AS                                                      5'

 G   G   A   T   D   Y   N   S   A   L   K   S   R   F   T   I   S   R   D   N   S   K   N   T   A   Y   L   Q   M
5'                                                                                                                  3'
GGT GGA GCC ACA GAT TAC AAT TCA                                                         AAG AAC ACA GCT TAC TTA CAA ATG
    CCT CGG TGT CTA ATG TTA AGT CGA GAG TTT AGG GCT AAG TGG TAG TCA GCG CTG TTG AGG TTC TTG TGT CGA ATG AAT GTT TAC
3'                                                  OLIGO H4AS                                                      5'

 N   S   L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   D   G   G   Y   S   S   S   T   L   Y   A   M   D   A
5'                                              OLIGO 5S                                                            3'
AAC AGT CTG CGC GCT GAA GAC ACA GCC GTT TAC TAC TGT GCC AGA GAC GGG GGC TAT AGC
                                                    CGG TCT CTG CCC CCG ATA TCG TCG AGA TGG GAG ATA CGA TAC CTA CGG
3'                                                  OLIGO H6AS                                                      5'

 W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S

ACC CCA GTT CCT TGA GAC CAG TGG CAG AGG AGT
3'                                      5'
```

FIG. 4

E) Oligonucleótidos para sintetizar VL de αD11

OLIGO L1S
ACA GGC GTG CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCT TCC CTG TCT GCA TCT GTG GGA GAC CGC GTC ACC ATC

OLIGO L2AS
TGG CTT CTG CTG ATA CCA TGC TAA AGC ATT ATA AAT GTC CTC ACT TGC TCG ACA TGT GAT GGT GAC GCG GTC TCC CAC

OLIGO L3S
GCA TGG TAT CAG CAG AAG CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT AAT ACA GAT ACC TTG CAT ACA GGG GTC CCA

OLIGO L4AS
CAG GCT GCT TAT CGT GAG AGT ATA GTC TGT ACC AGA TCC ACT GCC ACT GAA TCG TGA TGG GAC CCC TGT ATG CAA GGT

OLIGO L5S
ACT CTC ACG ATA AGC AGC CTG CAA CCT GAA GAT TTC GCA ACT TAT TTC TGT CAG CAC TAT TTC CAT TAT CCT CGG

OLIGO L6AS
CAA TCT AGA ATT CTA CTC ACG TTT GAT CTC CAC CTT GGT CCC TTG ACC GAA CGT CCG AGG ATA ATG GAA ATA GTG

E) Oligonucleótidos para sintetizar VH de αD11

OLIGO H1S
ACA GGC GCG CAC TCC GAG GTG CAG CTG GTG GAA TCA GGA GGT GGT CTG GTG CAG CCC GGA GGG TCC CTG CGC CTC AGC TGC

OLIGO H2AS
TCC TGG AGC CTG TCG AAC CCA GTT CAC ATT GTT GTT GGT TAG TGA GAA GCC AGA GGC AGC GCA GCT GAG GCG CAG GGA CCC

OLIGO H3S
AAC TGG GTT CGA CAG GCT CCA GGA AAA GGT CTG GAG TGG GTG GGA GGA GTC TGG GCT GGT GGA GCC ACA GAT TAC AAT TCA

OLIGO H4AS
CAT TTG TAA GTA AGC TGT GTT CTT GGA GTT GTC GCG ACT GAT GGT GAA TCG GGA TTT GAG AGC TGA ATT GTA ATC TGT GGC TCC

OLIGO H5S
AAG AAC ACA GCT TAC TTA CAA ATG AAC AGT CTG CGC GCT GAA GAC ACA GCC GTT TAC TAC TGT GCC AGA GAC GGG GGC TAT AGC

OLIGO H6AS
TGA GGA GAC GGT GAC CAG AGT TCC TTG ACC CCA GGC ATC CAT AGC ATA GAG GGT AGA GCT GCT ATA GCC CCC GTC TCT GGC

FIG. 5

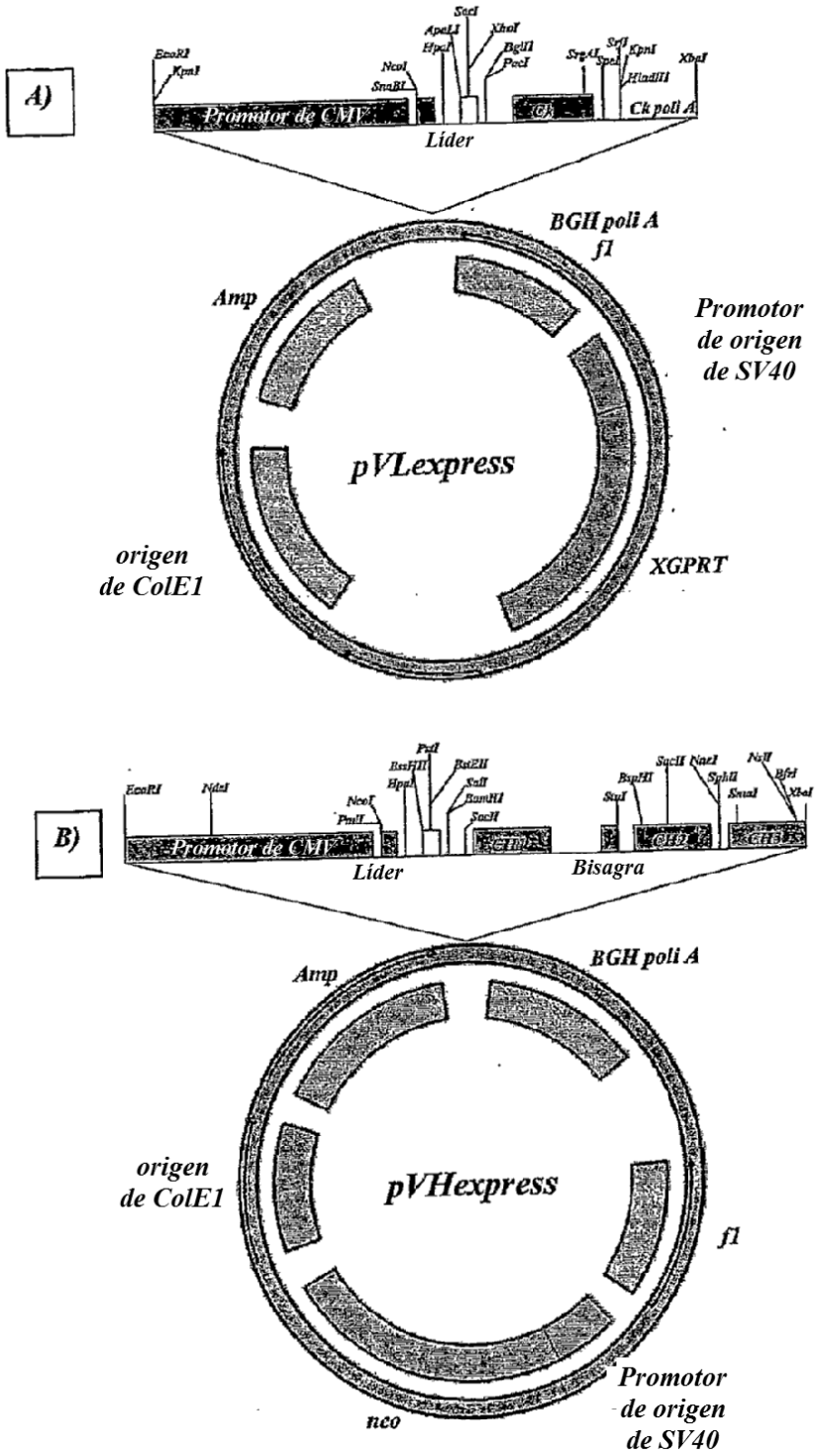

A)
Promotor de CMV
Líder
Ck poli A
BGH poli A
f1
Amp
Promotor
de origen
de SV40
pVLexpress
origen
de ColE1
XGPRT
B)
Promotor de CMV
Líder
Bisagra
Amp
BGH poli A
origen
de ColE1
pVHexpress
f1
Promotor
de origen
de SV40
nco

FIG. 5

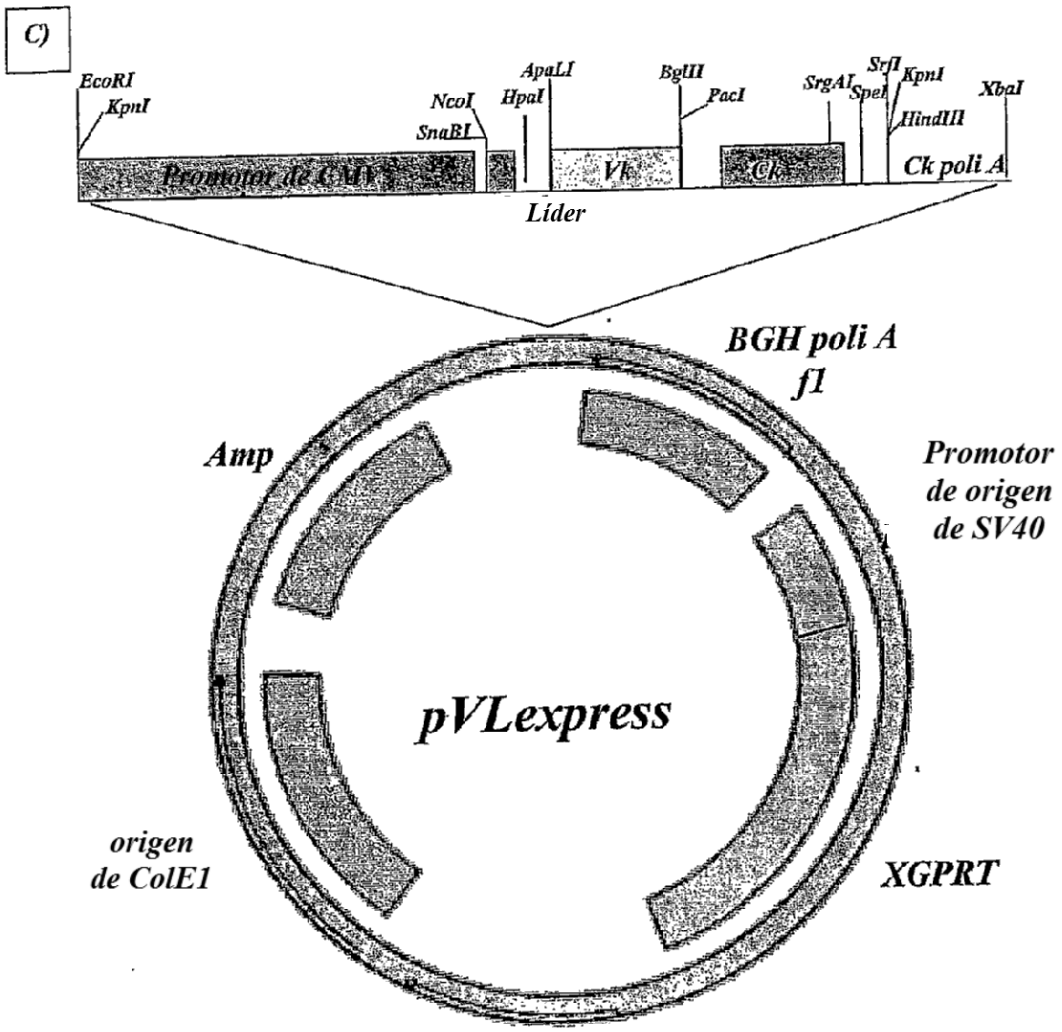

C)
EcoRI
KpnI
NcoI
SnaBI
ApaLI
HpaI
BglII
PacI
SrgAI
SrfI
SpeI
KpnI
HindIII
XbaI
Promotor de CMV
Vk
Ck
Ck poli A
Líder
BGH poli A
f1
Amp
Promotor
de origen
de SV40
pVLexpress
origen
de ColE1
XGPRT

FIG. 5

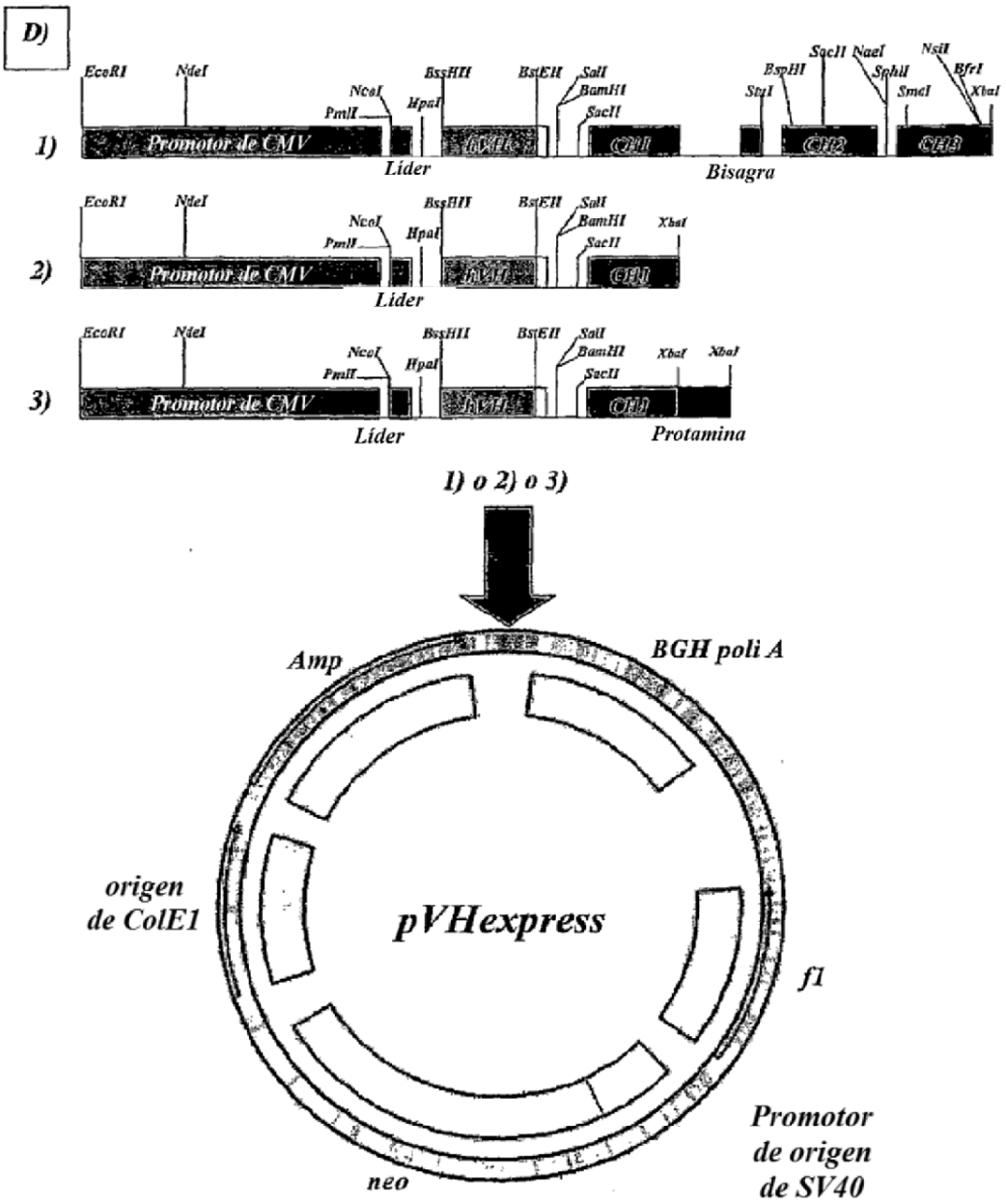
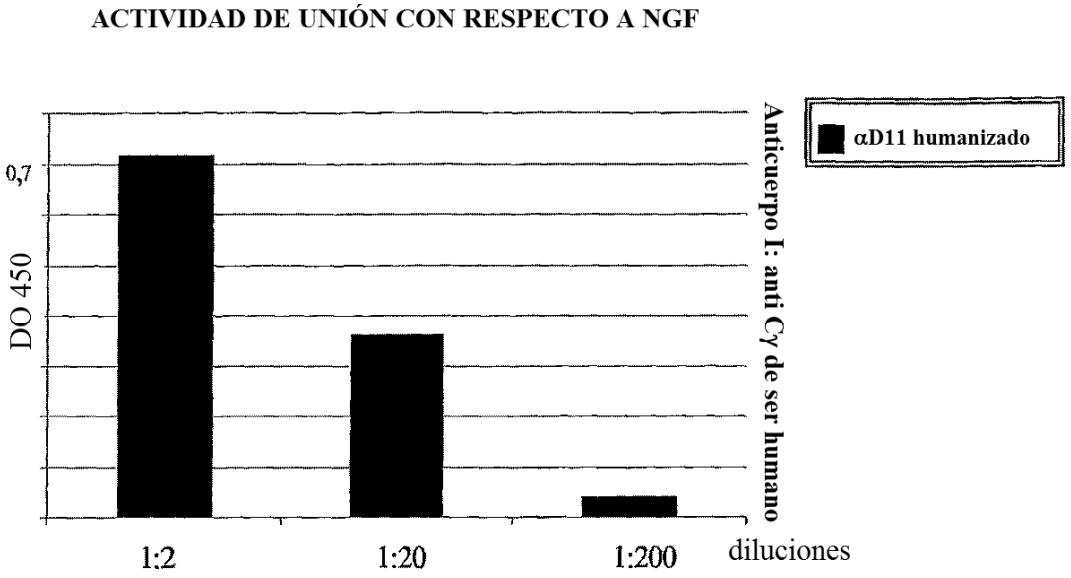

D)
EcoRI
NdeI
NcoI
PmlI
HpaI
BssHII
BstEII
SalI
BamHI
SacII
SacII
NaeI
NsiI
BspHI
SphI
BfrI
StuI
SmaI
XbaI
1)
Promotor de CMV
VH
CH1
CH2
CH3
Líder
Bisagra
2)
Promotor de CMV
VH
CH1
Líder
3)
Promotor de CMV
VH
CH1
Líder
Protamina
1) o 2) o 3)
Amp
BGH poli A
origen de ColE1
pVHexpress
f1
Promotor de origen de SV40
neo

FIG. 6


ACTIVIDAD DE UNIÓN CON RESPECTO A NGF
αD11 humanizado
0,7
DO 450
Anticuerpo I: anti Cγ de ser humano
1:2
1:20
1:200
diluciones