

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 752**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/22** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 25/04** (2006.01)

**C07K 14/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.12.2003 E 10176627 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 2270048**

54 Título: **Anticuerpos anti-NGF y procedimientos de uso los mismos**

30 Prioridad:

**24.12.2002 US 436905 P**

**28.01.2003 US 443522 P**

**08.10.2003 US 510006 P**

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

**28.03.2016**

73 Titular/es:

**RINAT NEUROSCIENCE CORP. (100.0%)**

**230 East Grand Avenue**

**South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**SHELTON, DAVID L.;**

**PONS, JAUME y**

**ROSENTHAL, ARNON**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 564 752 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 y procedimientos de uso los mismos

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere a anticuerpos anti-NGF (tales como anticuerpos antagonistas anti-NGF). La invención se refiere además al uso de tales anticuerpos en el tratamiento de osteoartrítico.

**Antecedentes de la invención**

10 El factor de crecimiento nervioso (NGF) fue la primera neurotrofina que se identificó y su papel en el desarrollo y supervivencia de neuronas tanto periféricas como centrales se han caracterizado bien. Se ha mostrado que NGF es un factor de supervivencia y mantenimiento crítico en el desarrollo de neuronas sensoriales simpáticas periféricas y embrionarias y de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal. Smeyne y col., Nature 368: 246-249 (1994) y Crowley y col., Cell 76: 1001-1011 (1994). NGF regula positivamente la expresión de neuropéptidos en neuronas sensoriales (Lindsay y Harmer, Nature 337: 362-364 (1989)) y su actividad está mediada a través de dos receptores unidos a membrana diferentes, el receptor TrkA y el receptor de neurotrofina común p75 (en ocasiones denominados receptores de NGF de "alta afinidad" y de "baja afinidad" respectivamente). Chao y col., Science 232: 518-521 (1986). Para una revisión sobre NGF, véase Huang y col., Annu. Rev. Neurosci. 24: 677-736 (2001); Bibel y col., Genes Dev. 14: 2919-2937 (2000). Se ha determinado la estructura cristalina de NGF y NGF en complejo con receptor trkA. Véase Nature 254: 411 (1991); Nature 401:184-188 (1996).

20 El factor de crecimiento nervioso (NGF) fue la primera neurotrofina que se identificó y su papel en el desarrollo y supervivencia de neuronas tanto periféricas como centrales se han caracterizado bien. Se ha mostrado que NGF es un factor de supervivencia y mantenimiento crítico en el desarrollo de neuronas sensoriales simpáticas periféricas y embrionarias y de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal. (Smeyne y col., Nature 368: 246-249 (1994) y Crowley y col., Cell 76: 1001-1011 (1994)). NGF regula positivamente la expresión de neuropéptidos en neuronas sensoriales (Lindsay y Harmer, Nature 337: 362-364 (1989)) y su actividad está mediada a través de dos receptores unidos a membrana diferentes, el receptor de tirosina quinasa TrkA y el receptor de p75 que está estructuralmente relacionado con otros miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (Chao, y col., Science 232: 518-521 (1986)).

25 Además de sus efectos en el sistema nervioso, NGF se ha implicado crecientemente en procesos fuera del sistema nervioso. Por ejemplo, se ha mostrado que NGF potencia la permeabilidad vascular (Otten, y col., Eur J Pharmacol. 106: 199-201 (1984)), potencia las respuestas inmunes de linfocitos T y B (Otten, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10059-10063 (1989)), induce diferenciación de linfocitos y proliferación de mastocitos y provoca la liberación de señales biológicas solubles de mastocitos (Matsuda, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6508-6512 (1988); Pearce, y col., J. Physiol. 372: 379-393 (1986); Bischoff, y col., Blood 79: 2662-2669 (1992); Horigome, y col., J. Biol. Chem. 268: 14881-14887 (1993)). Aunque se ha mostrado que NGF añadido de forma exógena es capaz de tener todos estos efectos, es importante observar que se ha mostrado sólo en pocas ocasiones que NGF endógeno es importante en cualquiera de estos procesos *in vivo* (Torcia, y col., Cell. 85(3): 345-56 (1996)). Por lo tanto, no está claro cuál podría ser el efecto, si lo hubiera, de inhibir la bioactividad de NGF endógeno.

30 NGF se produce por varios tipos celulares incluyendo mastocitos (Leon, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3739-3743 (1994)), linfocitos B (Torcia, y col., Cell 85: 345-356 (1996)), queratinocitos (Di Marco, y col., J. Biol. Chem. 268: 22838-22846), células de músculo liso (Ueyama, y col., J. Hypertens. 11: 1061-1065 (1993)), fibroblastos (Lindholm, y col., Eur. J. Neurosci. 2:795-801 (1990)), células epiteliales bronquiales (Kassel, y col., Clin. Exp. Allergy 31: 1432-40 (2001)), células mesangiales renales (Steiner, y col., Am. J. Physiol. 261: F792-798 (1991)) y miotubos de músculo esquelético (Schwartz, y col., J Photochem. Photobiol. B66: 195-200 (2002)). Se han descubierto receptores de NGF en una diversidad de tipos celulares fuera del sistema nervioso. Por ejemplo se ha descubierto TrkA en monocitos humanos, linfocitos T y B y mastocitos.

45 Se ha observado una asociación entre aumento de los niveles de NGF y una diversidad de afecciones inflamatorias en pacientes humanos así como varios modelos animales. Estas incluyen lupus eritematoso sistémico (Bracci-Laudiero, y col., Neuroreport 4: 563-565 (1993)), esclerosis múltiple (Bracci-Laudiero, y col., Neurosci. Lett. 147: 9-12 (1992)), psoriasis (Raychaudhuri, y col., Acta Derm. l'enereol. 78: 84-86 (1998)), artritis (Falcim, y col., Ann. Rheum. Dis. 55: 745-748 (1996)), cistitis intersticial (Okragly, y col., J. Urology 161: 438-441 (1999)) y asma (Braun, y col., Eur. J Immunol. 28: 3240-3251 (1998)).

50 Sistemáticamente, un nivel elevado de NGF en tejidos periféricos está asociado con hiperalgesia e inflamación y se ha observado en varias formas de artritis. El sinovio de los pacientes afectados por artritis reumatoide expresa altos niveles de NGF mientras que se ha indicado que en sinovio no inflamado NGF es indetectable (Aloe, y col., Arch. Rheum. 35: 351-355 (1992)). Se vieron resultados similares en ratas con artritis reumatoide inducida experimentalmente (Aloe, y col., Clin. Exp. Rheumatol. 10: 203-204 (1992)). Se han indicado niveles elevados de NGF en ratones artríticos transgénicos junto con una aumento del número de mastocitos (Aloe, y col., Int. J. Tissue Reactions-Exp. Clin. Aspects 15: 139-143 (1993)). La Publicación de PCT N° WO 02/096458 desvela el uso de

anticuerpos anti-NGF de ciertas propiedades en el tratamiento de diversos trastornos relacionados con NGF tales como afección inflamatoria (por ejemplo, artritis reumatoide). Se ha indicado que un anticuerpo anti-NGF purificado inyectado en ratones transgénicos artríticos que portan el gen del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) humano provocó reducción del número de mastocitos, así como una reducción de los niveles de histamina y sustancia P dentro del sinovio de ratones artríticos (Aloe y col., *Rheumatol. Int.* 14: 249-252 (1995)). Se ha mostrado que la administración exógena de un anticuerpo de NGF redujo el nivel potenciado de TNF- $\alpha$  que aparece en ratones artríticos (Manni y col., *Rheumatol. Int.* 18: 97-102 (1998)).

Además, se observó expresión aumentada de NGF y receptor de NGF de alta afinidad (TrkA) en condrocitos de osteoartritis humana (Iannone y col., *Rheumatology* 41: 1413-1418 (2002)).

Woolf y col *Neuroscience* 62(2): 327-331 (1994) desvela la inyección de adyuvante completo de Freund que da como resultado hiperalgesia mecánica y térmica que se inhibió por antisuero anti NGF. Theodosiou y col *Pain* 81(3): 245-255 (1999) desvela daño nervioso provocado por transección e hiperalgesia mecánica y térmica aliviada por medio de antisuero anti NGF. Leem y col Abstracts of the Annual Meeting of the Society for Neuroscience 26(1/02) (Noviembre 2000) desvela que un anticuerpo anti NGF es capaz de aliviar el dolor debido a lesión de la médula espinal. Lewin y col *The European Journal of Neuroscience* 6(12): 1903-1912 (1994) desvela la administración de una única embolada de NGF que conduce a hiperalgesia mecánica y térmica en ratas y que un tratamiento anti NGF inhibe la hiperalgesia térmica. Gould y col *Brain Research* 854 (1-2): 19-29 (2000) desvela que la administración de NGF regula positivamente la expresión de canales de sodio en neuronas sensoriales y que esta regulación positiva coincide con el desarrollo de hiperalgesia térmica y mecánica. Djouhri y col *The Journal of neuroscience* 21(22): 8722-8733 (2001) desvela que NGF regula las reducciones inducidas por inflamación en la duración de potenciales de acción de neuronas sensoriales, aumenta la velocidad de activación de neuronas y la actividad espontánea. Ma y col *Neuroreport* 8(4): 807-810 (1997) desvela que la inflamación periférica mediada por adyuvante de Freund y la hipersensibilidad táctil/hiperalgesia resultante de la misma está provocada directamente por NGF. Tanaka Tomohiro y col *Environmental Medicine* 44(2): 72-74 (2000) muestra que la terapia con anticuerpo anti NGF es ineficaz contra artritis inducida por adyuvante.

Se han indicado anticuerpos antagonistas anti-NGF de roedores. Véase., por ejemplo, Hongo y col, *Hybridoma* (2000) 19(3): 215-227; Ruberti y col. (1993) *Cell. Molec. Neurobiol.* 13(5): 559-568. Sin embargo, cuando se usan anticuerpos de roedores de forma terapéutica en seres humanos, se desarrolla una respuesta de anticuerpo anti-murino humano en números significativos de individuos tratados. Además, las funciones efectoras de anticuerpos de ratón han demostrado ser menos eficaces en el contexto humano. Por lo tanto, existe una necesidad importante de anticuerpos antagonistas anti-NGF incluyendo anticuerpos antagonistas anti-NGF humanizados.

### **Breve resumen de la invención**

La invención desvelada en el presente documento se refiere a anticuerpos para factor de crecimiento nervioso. En un aspecto, la invención es un anticuerpo antagonista anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento del dolor osteoartítico en un individuo. En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo antagonista anti NGF o un fragmento de unión a antígeno del mismo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del dolor osteoartítico en un individuo.

En otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado y con afinidad madurada, E3, que se une específicamente a factor de crecimiento nervioso ("NGF") humano y de roedor. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de E3 se muestran en las Figuras 1A (SEC ID N° 1) y 1B (SEC ID N° 2), respectivamente. Las partes de CDR del anticuerpo E3 (incluyendo CDR de Chothia y Kabat) se representan en forma de diagrama en las Figuras 1A y 1B. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de E3, y de las CDR extendidas individuales también se muestran posteriormente (véase, "secuencias de anticuerpo" posteriormente).

En otro aspecto, el anticuerpo comprende un fragmento o una región del anticuerpo E3 (denominado de forma intercambiable "E3" en el presente documento). En una realización, el fragmento es una cadena ligera del anticuerpo E3 como se muestra en la Figura 1B. En otra realización, el fragmento es una cadena pesada del anticuerpo E3 como se muestra en la Figura 1A. En otra realización más, el fragmento contiene una o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo E3. En otra realización más, el fragmento contiene una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo E3 como se muestra en la Figura 1A y 1B.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una cadena ligera que se codifica por un polinucleótido que se produce por una célula huésped con un número de depósito de ATCC N° PTA-4893 o ATCC N° PTA-4894. En otro aspecto, el anticuerpo comprende una cadena pesada que está codificada por un polinucleótido que se produce por una célula huésped con un número de depósito de ATCC N° PTA-4895. En otro aspecto, el anticuerpo comprende (a) una cadena ligera que está codificada por un polinucleótido que se produce por una célula huésped con un número de depósito de ATCC N° PTA-4894 o ATCC N° PTA-4893; y (b) una cadena pesada que está codificada por un polinucleótido que se produce por una célula huésped con un número de depósito de ATCC N° PTA-4895 (por conveniencia en el presente documento, el polinucleótido o los polinucleótidos producidos por una célula huésped

depositada se denominan con un número de depósito de ATCC N° PTA-4894, PTA-4893 y PTA-4895). En otro aspecto, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que se codifica por un polinucleótido que se produce por una célula huésped con un número de depósito de ATCC N° PTA-4894 o ATCC N° PTA-4893. En otro aspecto, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que está codificada por un polinucleótido que se produce por una célula huésped con un número de depósito de ATCC N° PTA-4895. En otro aspecto, el anticuerpo comprende (a) una región variable de cadena ligera de una cadena ligera que está codificada por un polinucleótido que se produce por una célula huésped con un número de depósito de ATCC N° PTA-4894 o ATCC N° PTA-4893 y (b) una región variable de cadena pesada que está codificada por un polinucleótido que se produce por una célula huésped con un número de depósito de ATCC N° PTA-4895. En otro aspecto más, el anticuerpo comprende una o más CDR codificadas por (a) un polinucleótido que se produce por una célula huésped con un número de depósito de ATCC N° PTA-4894; y/o (b) una cadena pesada que está codificada por un polinucleótido que se produce por una célula huésped con un número de depósito de ATCC N° PTA-4895.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende la región constante de IgG2a de cadena pesada humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende la región constante kappa de cadena ligera humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante modificada tal como una región constante que es inmunológicamente inerte, por ejemplo, no desencadena lisis mediada por complemento, o no estimula citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). En otras realizaciones, la región constante se modifica como se describe en Eur. J. Immunol. (1999) 29: 2613-2624; Publicación de PCT N° WO 99/58572. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende una región constante de IgG2a de cadena pesada humana que comprende las siguientes mutaciones: A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos con referencia a la secuencia de IgG2a de tipo silvestre). Eur. J. Immunol. (1999) 29: 2613-2624.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende uno cualquiera o más de los siguientes: a) una o más CDR del anticuerpo E3 mostradas en las Figuras 1A y 1B; b) CDR H3 de la cadena pesada del anticuerpo E3 mostrada en la Figura 1A; c) CDR L3 de la cadena ligera del anticuerpo E3 mostrada en la Figura 1B; d) tres CDR de la cadena ligera del anticuerpo E3 mostradas en la Figura 1B; e) tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo E3 mostradas en la Figura 1A; y f) tres CDR de la cadena ligera y tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo E3 mostradas en las Figuras 1A y 1B. La invención proporciona adicionalmente un anticuerpo que comprende uno cualquiera o más de los siguientes: a) una o más (una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) CDR derivadas del anticuerpo E3 mostradas en las Figuras 1A y 1B; b) una CDR derivada de CDR H3 de la cadena pesada de anticuerpo E3 mostrada en la Figura 1A; y/o c) una CDR derivada de CDR L3 de la cadena ligera de anticuerpo E3 mostrada en la Figura 1B. En algunas realizaciones, las CDR pueden ser CDR de Kabat, CDR de Chothia CDR o una combinación de CDR de Kabat y Chothia (denominadas CDR "extendidas" o "combinadas" en el presente documento). En algunas realizaciones, los anticuerpos se unen a NGF (tal como NGF humano). En algunas realizaciones, los anticuerpos comprenden cualquiera de las configuraciones de CDR (incluyendo combinaciones, variantes, etc.) descritas en el presente documento.

En un aspecto, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N° 9, en la que 134 es S, L, V, A o I; y N35 se sustituye con N, T o S. Por conveniencia en el presente documento, "sustituido" o "es" en este contexto o referencia a un aminoácido se refieren a selección de aminoácido o aminoácidos para una posición dada. Como resulta evidente, la sustitución, o selección, puede ser el aminoácido representado en una SEC ID o Figura.

En otro aspecto, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N° 10, en la que M50 es M, I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V.

En otro aspecto, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N° 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y07 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; y en la que Y110 es Y, K, S, R o T.

En otro aspecto, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N° 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido.

En otro aspecto, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena pesada que comprende SEC ID N° 11, en la que G98 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que G99 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A, o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido.

En otro aspecto, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena ligera que comprende SEC ID N° 12, en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q.

En otro aspecto, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena ligera que comprende SEC ID N° 13, en

la que I51 es I, T, V o A; y S56 es S o T.

En otro aspecto, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena ligera que comprende SEC ID N° 14, en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R.

5 En otro aspecto, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena ligera que comprende SEC ID N° 14, en la que S91 es S o E; K92 es cualquier aminoácido; T93 es cualquier aminoácido; y en la que Y96 es Y o R.

En otro aspecto, los anticuerpos comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 9, en la que 134 es S, L, V, A o I; y N35 es N, T o S.

En otro aspecto, los anticuerpos comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 10, en la que M50 es M, I, G, Q, S o L; A62 es A, o S; y L63 es L o V.

10 En otro aspecto, los anticuerpos comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F 108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; y en la que Y110 es Y, K, S, R o T.

15 En otro aspecto, los anticuerpos comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F 108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido.

20 En otro aspecto, los anticuerpos comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 11, en la que G98 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que G99 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido.

En otro aspecto, los anticuerpos comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 12, en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q.

25 En otro aspecto, los anticuerpos comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 13, en la que 151 es I, T, V o A; y S56 es S o T.

En otro aspecto, los anticuerpos comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 14, en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R.

30 En otro aspecto, los anticuerpos comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 14, en la que S91 es S o E; K92 es cualquier aminoácido; T93 es cualquier aminoácido; y en la que Y96 es Y o R.

35 En otro aspecto, los anticuerpos (incluyendo anticuerpos humanizados) comprenden una región variable de cadena pesada que comprende la región CDR1 de la SEC ID N° 9, en la que 134 es S, L, V A o I; y N35 es N, T o S; la región CDR2 de SEC ID N° 10, en la que M50 es M, I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V; y la región CDR3 de SEC ID N° 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G 103 es G, A o S; en la que T 104 es T o S; en la que S 105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; en la que Y110 es Y, K, S, R o T. En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la región CDR3 de SEC ID N° 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; en la que Y110 es cualquier aminoácido. En otras realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la región variable de CDR3 de SEC ID N° 11, en la que G98 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que G99 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A, o T; en la que Y106 es Y, R, T, o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende adicionalmente una región variable de cadena ligera de anticuerpo.

40 En otro aspecto, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena ligera que comprende la región CDR1 de SEC ID N° 12, en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q; la región CDR2 de SEC ID N° 13, en la que 151 es I, T, V o A; y S56 es S o T; y la región CDR3 de SEC ID N° 14, en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, la región variable de cadena ligera comprende la región CDR3 de SEC ID N° 14, en la que S91 es S o E; K92 es cualquier aminoácido; T93 es cualquier aminoácido; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende adicionalmente una cadena pesada de anticuerpo.

50 En otro aspecto, los anticuerpos comprenden (a) una región variable de cadena pesada que comprende la región CDR1 de SEC ID N° 9, en la que 134 es S, L, V A o I; y N35 es N, T o S; la región CDR2 de SEC ID N° 10, en la que

M50 es M, I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V; y la región CDR3 de SEC ID N° 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T 104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D 109 es D, N o G; en la que Y110 es Y, K, S, R o T; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la región CDR1 de SEC ID N° 12, en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q; la región CDR2 de SEC ID N° 13, en la que I51 es I, T, V o A; y S56 es S o T; y la región CDR3 de SEC ID N° 14, en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, la región variable de cadena ligera comprende la región CDR3 de SEC ID N° 14, en la que S91 es S o E; K92 es cualquier aminoácido; T93 es cualquier aminoácido; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la región CDR3 de SEC ID N° 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G 103 es G, A o S; en la que T 104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; en la que Y110 es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la región CDR3 de SEC ID N° 11, en la que G98 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que G99 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende adicionalmente una cadena ligera de anticuerpo.

En otro aspecto, los anticuerpos (incluyendo un anticuerpo humanizado) comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 9, en la que I34 es S, L, V, A o I; y N35 es N, T o S; una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 10, en la que M50 es M, I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V; y una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N, o G; en la que Y110 es Y, K, S, R o T. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 11, en la que Y100 es Y, L o R; y en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T 104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es un aminoácido cualquiera. En otras realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 11, en la que G98 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que G99 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende adicionalmente una región variable de cadena ligera de anticuerpo.

En otro aspecto, los anticuerpos comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 12, en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q; una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 13, en la que I51 es I, T, V o A; y S56 es S o T; y una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 14, en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 14, en la que S91 es S o E; K92 es cualquier aminoácido; T93 es cualquier aminoácido; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende adicionalmente una región variable de cadena pesada de anticuerpo.

En otro aspecto, los anticuerpos comprenden (a) una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 9, en la que I34 es S, L, V, A o I; y N35 es N, T o S; una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 10, en la que M50 es M, I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V; y una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; y en la que Y110 es Y, K, S, R o T; y (b) una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 12, en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N, o Q; una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 13, en la que I51 es I, T, V o A; y S56 es S o T; y una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 14, en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 14, en la que S91 es S o E; K92 es cualquier aminoácido; T93 es cualquier aminoácido; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T 104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D 109 es S, A, C, G, D, N, T o G; en la que Y110 es cualquier aminoácido. En otras realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 11, en la que G98 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que G99 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A, o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende adicionalmente una región variable de cadena ligera de anticuerpo.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende: (a) una región CDR1 de SEC ID N° 9, en la que I34 es S, L, V A o I; y N35 se sustituye con N, T o S; (b) una región CDR2 de SEC ID N° 10, en la que M50 es I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V; y (c) una región CDR3 de SEC ID N° 11, en

## ES 2 564 752 T3

la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; y en la que Y110 es Y, K, S, R o T; en la que el anticuerpo se une a NGF.

5 En otro aspecto, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende: (a) una región CDR1 de SEC ID N° 12, en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N, o Q; (b) una región CDR2 de SEC ID N° 13, en la que I51 es I, T, V o A; y S56 es S o T; y (c) una región CDR3 de SEC ID N° 14, en la que K92 es K, H, R, o S; y en la que Y96 es Y o R; en la que el anticuerpo se une a NGF.

10 En otro aspecto, el anticuerpo comprende (a) una región variable de cadena pesada que comprende: (i) una región CDR1 de SEC ID N° 9, en la que 134 se sustituye con S, L, V A o I; y N35 se sustituye con N, T o S; (ii) una región CDR2 de SEC ID N° 10, en la que M50 es I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V; y (iii) una región CDR3 de SEC ID N° 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F 108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; en la que Y110 es Y, K, S, R o T; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende: (i) una región de CDR1 de SEC ID N° 12, en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q; (ii) una región de CDR2 de SEC ID N° 13, en la que I51 es I, T, V o A; y S56 es S o T; y (iii) una región de CDR3 de SEC ID N° 14, en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R; en la que el anticuerpo se une a NGF.

A no ser que se indique de otro modo, la selección (por ejemplo, sustitución) de un aminoácido en un localización se selecciona de forma independiente de la selección de un aminoácido en cualquier otra localización.

20 En algunas realizaciones, los anticuerpos se unen a NGF (tal como NGF humano). En algunas realizaciones, los anticuerpos comprenden cualquiera de las configuraciones de CDR (incluyendo combinaciones, variaciones, etc.) descritas en el presente documento.

25 Como resulta evidente a partir de la descripción del presente documento, la numeración de región variable usada en el presente documento es numeración secuencial. Un experto en la materia entiende fácilmente que existen varios sistemas de numeración de anticuerpos (tales como numeración de Kabat y Chothia) y como convertir la numeración secuencial a otro sistema de numeración, tal como numeración de Kabat o numeración de Chothia.

30 En otro aspecto, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una secuencia de CDR3) seleccionada de SEC ID N° 46 o 50. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende adicionalmente una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID N° 3, 4, 5, 6, 7 y 8. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende adicionalmente una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID N° 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.

35 En otro aspecto, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDR, tal como una región CDR H1 y/o CDR H2) seleccionada de (a) SEC ID N° 28 y/o 29; (b) SEC ID N° 30 y/o 31; (c) SEC ID N° 32 y/o 33; (d) SEC ID N° 34 y/o 35; (e) SEC ID N° 36 y/o 37; (f) SEC ID N° 38 y/o 39; y (g) SEC ID N° 40 y 41. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDR H1) seleccionada de SEC ID N° 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDR H2) seleccionada de SEC ID N° 29, 31, 33, 35, 37, 39 y 41. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende adicionalmente una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID N° 3, 4, 5, 6, 7 y 8. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende adicionalmente una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID N° 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.

40 En otro aspecto, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDR, tal como una región CDRL1 y/o CDR L2) seleccionada de (a) SEC ID N° 18 y/o 19; (b) SEC ID N° 20 y/o 21; y (c) SEC ID N° 22 y/o 23. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDR L1) seleccionada de SEC ID N° 18, 20 y 22. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDR L2) seleccionada de SEC ID N° 19, 21 y 23. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende adicionalmente una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID N° 3, 4, 5, 6, 7, 8. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende adicionalmente una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID N° 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.

45 En otro aspecto, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDR, tal como una región CDR3 y/o CDR H3) seleccionada de (a) SEC ID N° 51 y/o 52; (b) SEC ID N° 55 y/o 56; (c) SEC ID N° 57 y/o 58; (c) SEC ID N° 59 y/o 60; (d) SEC ID N° 61 y/o 62; (e) SEC ID N° 63 y/o 64. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDR L3) seleccionada de SEC ID N° 51, 55, 57, 59, 61 y 63. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDR H3) seleccionada de SEC ID N° 52, 56, 58, 60, 62 y 64. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende adicionalmente una secuencia de aminoácidos mostrada en una o más de SEC ID N° 18, 19, 30 y 31. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende adicionalmente una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID N° 3, 4, 5, 6, 7 y 8. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende adicionalmente una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID N° 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una o más de una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDR) mostrada en SEC ID N° 61, 63, 18, 19, 30 y 31.

5 En un aspecto, el anticuerpo antagonista anti-NGF se une a NGF (tal como NGF humano) con una alta afinidad. En algunas realizaciones, la alta afinidad es (a) unión de NGF con una  $K_D$  de menos de aproximadamente 2 nM (tal como cualquiera de aproximadamente 1 nM, 800 pM, 600 pM, 400 pM, 200 pM, 100 pM, 90 pM, 80 pM, 70 pM, 60 pM, 50 pM o menos) y/o una  $k_{off}$  más lenta de aproximadamente  $6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ; y/o (b) inhibición (reducción y/o bloqueo) de supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI50 (en presencia de NGF aproximadamente 15 pM) de aproximadamente cualquiera de 200 pM, 150 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 20 pM, 10 pM o menos; y/o (c) inhibición (reducción y/o bloqueo) de la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI50 (en presencia de NGF aproximadamente 1,5 pM) de aproximadamente cualquiera de 50 pM, 40 pM, 30 pM, 10 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, 2 pM, 1 pM o menos; y/o (d) inhibición (reducción y/o bloqueo) de supervivencia dependiente de NGF de rata de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI50 (en presencia de NGF aproximadamente 15 pM) de aproximadamente cualquiera de 150 pM, 125 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 30 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM o menos; y/o (e) inhibición (reducción y/o bloqueo) de supervivencia dependiente de NGF de rata de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI50 (en presencia de NGF aproximadamente 1,5 pM) de aproximadamente cualquiera de 30 pM, 25 pM, 20 pM, 15 pM, 10 pM, 5 pM, 4 pM, 3 pM, 2 pM, 1 pM o menos; y/o (f) unión de NGF con afinidad más alta que el receptor trkA.

20 En otro aspecto, los anticuerpos (a) se unen a NGF (tal como NGF humano) con una  $K_D$  de menos de aproximadamente 2 nM (tal como cualquiera de aproximadamente 1 nM, 800 pM, 600 pM, 400 pM, 200 pM, 100pM, 90 pM, 80 pM, 70 pM, 60 pM, 50 pM o menos) y/o una  $k_{off}$  más lenta de aproximadamente  $6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ; y/o (b) inhiben la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI50 (en presencia de NGF aproximadamente 15 pM) de aproximadamente cualquiera de 200 pM, 150 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 20 pM, 10 pM o menos; y/o (c) inhiben la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI50 (en presencia de NGF aproximadamente 1,5 pM) de aproximadamente cualquiera de 50 pM, 40 pM, 30 pM, 10 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, 2 pM, 1 pM o menos; y/o se unen a NGF con afinidad más alta que el receptor trkA. En algunas realizaciones, los anticuerpos (a) se unen a NGF con una  $K_D$  de menos de aproximadamente 2 nM; (b) inhiben la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI50 de aproximadamente 100 pM o menos, en la que la CI50 se mide en presencia de NGF aproximadamente 15 pM; y/o (c) inhiben la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI50 de aproximadamente 10 pM o menos, midiéndose la CI50 en presencia de NGF aproximadamente 1,5 pM, midiéndose la CI50 en presencia de NGF aproximadamente 15 pM. En algunas realizaciones, los anticuerpos (a) se unen a NGF con una  $K_D$  de menos de aproximadamente 100 pM; (b) inhiben la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI50 de aproximadamente 20 pM o menos, midiéndose la CI50 en presencia de NGF aproximadamente 15 pM; y/o (c) inhiben la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI50 de aproximadamente 2 pM o menos, midiéndose la CI50 en presencia de NGF aproximadamente 1,5 pM.

40 Como resulta evidente a partir de la descripción del presente documento, se excluyen específicamente de la invención realizaciones de polipéptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de aminoácidos de anticuerpo monoclonal de ratón, 911. Las secuencias de CDR extendidas de Mab 911 se muestran en las Figuras 1A y 1B y en SEC ID N° 9-14.

45 En algunas realizaciones, la invención proporciona cualquiera de los anticuerpos anteriores, adicionalmente estando el anticuerpo aislado. En algunas realizaciones, el anticuerpo está sustancialmente purificado. En otras realizaciones más, el anticuerpo tiene afinidad madurada. En otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo antagonista. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende secuencias marco humanas. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende uno o más restos marco no humanos. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a NGF (tal como NGF humano) con una  $K_D$  de 2 nM o menos. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una o más (tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) sustituciones de aminoácidos humanos en relación con una secuencia de aminoácidos no humana (tal como una secuencia de región variable, tal como una secuencia de CDR, tal como una secuencia marco). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende al menos 1, al menos 2 o más, tal como al menos 3, 4, 5, 6 o más sustituciones de aminoácidos en relación con una secuencia de aminoácidos de polipéptido parental (tal como una secuencia de aminoácidos de anticuerpo 911, tal como una cualquiera o más de SEC ID N° 9-14). En algunas realizaciones, la afinidad de unión del anticuerpo se ha alterado (en algunas realizaciones se ha aumentado) en relación con la afinidad de un anticuerpo parental (tal como Mab 911). En otras realizaciones más, la afinidad de unión del anticuerpo es más baja que la afinidad de unión del receptor trkA por NGF (tal como NGF humano). En algunas realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos humanos. En otras realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos humanizados. En otras realizaciones más, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo con afinidad madurada.

La divulgación proporciona polinucleótidos (incluyendo polinucleótido aislado) que comprenden polinucleótidos que codifican cualquiera de las realizaciones anteriores.

60 En otro aspecto, la divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende un polinucleótido que codifica un fragmento o una región del anticuerpo E3 (denominado de forma intercambiable "E3" en el presente documento).

En una realización, el fragmento es una cadena ligera del anticuerpo E3 como se muestra en la Figura 1B. En otra realización, el fragmento es una cadena pesada del anticuerpo E3 como se muestra en la Figura 1A. En otra realización más, el fragmento contiene una o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo E3. En otra realización más, el fragmento contiene una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo E3 como se muestra en las Figuras 1A y 1B.

En otro aspecto, la invención es un polinucleótido aislado que comprende un polinucleótido que codifica anticuerpo E3. En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende uno o ambos de los polinucleótidos mostrados en las Figuras 2 y 3.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un polinucleótido aislado que codifica una cadena ligera de E3 con un número de depósito de ATCC N° PTA-4893 o ATCC N° PTA-4894. En otro aspecto, la divulgación proporciona un polinucleótido aislado que codifica una cadena pesada de E3 con un número de depósito de ATCC N° PTA-4895. En otro aspecto más, la divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende (a) una región variable codificada en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC N° PTA-4893 o PTA-4894 y (b) una región variable codificada en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC N° PTA-4895. En otro aspecto, la divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende (a) una o más CDR codificadas en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC N° PTA-4893 o PTA-4894 y/o (b) una o más CDR codificadas en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC N° PTA-4895.

En otro aspecto, la divulgación proporciona polinucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpo) o polipéptidos descritos en el presente documento.

En otro aspecto, la divulgación proporciona vectores (incluyendo vectores de expresión y clonación) y células huésped que comprenden cualquiera de los polinucleótidos desvelados en el presente documento.

Como resulta evidente a partir de la descripción del presente documento, se incluyen específicamente de la invención realizaciones de polinucleótidos que consisten en la secuencia polinucleotídica idéntica a una secuencia polinucleotídica de anticuerpo monoclonal de ratón, 911. Las secuencias de CDR extendidas de Mab 911 se muestra en las Figuras 1A y 1B y en SEC ID N° 9-14.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una célula huésped que comprende un polinucleótido que codifica cadena ligera de E3 y un polinucleótido que codifica cadena pesada de E3, en la que el polinucleótido o los polinucleótidos que codifican la cadena ligera de E3 tienen un número de depósito de ATCC N° PTA-4893 y/o ATCC N° PTA-4894, y el polinucleótido que codifica la cadena pesada de E3 de un número de depósito de ATCC N° PTA-4895. En algunas realizaciones, la célula huésped que comprende polinucleótido que comprende (a) una región variable codificada en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC N° PTA-4893 o PTA-4894; y/o (b) una región variable codificada en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC N° PTA-4895. En algunas realizaciones, la célula huésped comprende un polinucleótido que codifica (a) una o más CDR codificadas en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC N° PTA-4893 o PTA-4894; y/o (b) una o más CDR codificadas en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC N° PTA-4895. En algunas realizaciones, la célula huésped es una célula de mamífero.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un complejo de NGF unido por anticuerpo E3. En otro aspecto, el complejo está aislado. En otro aspecto, el complejo está sustancialmente purificado.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un complejo de NGF unido con cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos descritos en el presente documento. En otro aspecto, el complejo está aislado. En otro aspecto, el complejo está sustancialmente purificado.

En otro aspecto, la invención es una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos tales como anticuerpo E3 o polinucleótidos descritos en el presente documento, tales como composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo E3 o un anticuerpo que comprende un fragmento del anticuerpo E3 y un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de dolor osteoartrítico en un individuo.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para generar anticuerpo E3 que comprende preparar una célula huésped que comprende un vector de expresión que codifica anticuerpo E3; cultivar la célula huésped o descendencia de la misma en condiciones que permiten la producción de anticuerpo E3; y purificar el anticuerpo E3. En algunas realizaciones, el vector de expresión comprende una o ambas de las secuencias polinucleotídicas mostradas en las Figuras 2 y 3.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para generar anticuerpo E3 que comprende expresar un polinucleótido que codifica cadena ligera de E3 y un polinucleótido que codifica cadena pesada de E3 en una célula adecuada, en el que el polinucleótido que codifica cadena ligera de E3 tiene un número de depósito ATCC N° PTA-4893 y/o ATCC N° PTA-4894, y el polinucleótido que codifica cadena pesada de E3 tiene un número de depósito ATCC N° PTA-4895; generalmente seguido de recuperación y/o aislamiento del anticuerpo.

5 En otro aspecto, la divulgación proporciona procedimientos para generar cualquiera de los polipéptidos (tales como anticuerpos) descritos en el presente documento expresando uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo (que puede expresarse de forma separada como una cadena ligera o pesada sencilla, o puede expresarse tanto una cadena ligera como una pesada de un vector) en una célula adecuada, generalmente seguido de recuperación y/o aislamiento del anticuerpo o los polipéptidos de interés.

10 En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para antagonizar la actividad biológica de NGF (tal como NGF humano) usando cualquiera de los polipéptidos (incluyendo anticuerpos tales como anticuerpo E3) desvelados en el presente documento. En una realización, el procedimiento comprende poner en contacto el factor de crecimiento nervioso humano con cualquiera de los polipéptidos (incluyendo anticuerpo E3) descritos en el presente documento, por lo que la actividad de NGF (tal como una actividad de factor de crecimiento nervioso humano) se antagoniza, reduce, bloquea o suprime.

15 En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para detectar NGF usando cualquiera de los polipéptidos (incluyendo anticuerpos tales como anticuerpo E3) descritos en el presente documento. La presencia de NGF se detecta detectando un complejo entre NGF y cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento (tales como anticuerpo E3). El término "detección" como se usa en el presente documento incluye detección cualitativa y/o cuantitativa (medición de los niveles) con o sin referencia a un control.

20 En otro aspecto, la invención es una cantidad eficaz de una composición que comprende el anticuerpo E3 o cualquiera de las realizaciones de anticuerpos descritas en el presente documento para su uso en el tratamiento de dolor osteoartístico.

25 En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para prevenir o tratar dolor de artritis reumatoide en un individuo administrando una cantidad eficaz de anticuerpo antagonista anti-NGF al individuo. Se ha mostrado de acuerdo con la divulgación que un anticuerpo antagonista anti-NGF es capaz de inhibir o bloquear el dolor asociado con artritis reumatoide. En algunas realizaciones, el dolor se alivia en un periodo de aproximadamente 24 horas después de la administración del anticuerpo antagonista anti-NGF. En algunas realizaciones, el dolor se alivia en un periodo de aproximadamente 4 días después de administrar el anticuerpo antagonista anti-NGF. En algunas realizaciones, el dolor se alivia antes de observar o en ausencia de un indicio de mejora de la afección inflamatoria en el individuo.

30 En otro aspecto, la divulgación proporciona procedimientos para reducir la incidencia de dolor de artritis reumatoide, aliviar el dolor de artritis reumatoide, suprimir el dolor de artritis reumatoide, paliar el dolor de artritis reumatoide y/o retardar la aparición, desarrollo o progresión del dolor de artritis reumatoide en un individuo, comprendiendo dicho procedimiento administrar una cantidad eficaz de anticuerpo antagonista anti-NGF al individuo.

35 En otro aspecto, la invención posibilita el tratamiento del dolor osteoartístico en un individuo administrando una cantidad eficaz de anticuerpo antagonista anti-NGF al individuo.

40 En otro aspecto, la divulgación proporciona procedimientos para tratar caquexia inflamatoria (pérdida de peso) asociada con artritis reumatoide en un individuo que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-NGF. En otro aspecto, la invención posibilita la reducción de la incidencia de dolor osteoartístico, aliviar el dolor osteoartístico, suprimir el dolor osteoartístico, paliar el dolor osteoartístico y/o retardar la aparición, desarrollo o progresión de dolor osteoartístico en un individuo, administrando una cantidad eficaz de anticuerpo antagonista anti-NGF al individuo.

45 En otro aspecto, la divulgación proporciona kits y composiciones que comprenden una cualquiera o más de las composiciones descritas en el presente documento. Estos kits, generalmente en envasado adecuado y proporcionados con instrucciones adecuadas, son útiles para cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

50 La invención también proporciona cualquiera de las composiciones y los kits descritos bien en el contexto de su uso como medicamento y/o bien en el de su uso para preparación de un medicamento, en el tratamiento del dolor osteoartístico en un individuo.

### **Breve descripción de las figuras**

55 FIGURA 1A: muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo E3 (marcado "6" y "5 + H3 de maduración de afinidad"). Las CDR de Chothia y CDR de Kabat se representan por texto subrayado y texto en negrita y en cursiva, respectivamente. La Figura 1A también muestra el alineamiento de las siguientes secuencias de aminoácidos de región variable de cadena pesada; (2) secuencia aceptora de línea germinal humana VH4-59 (marcada "VH4-59" o "2"); (3) las secuenciasceptoras con injertos de las CDR extendidas del anticuerpo de ratón 911 (marcado como "injertado con CDR" o "3"); (4) las secuenciasceptoras con injertos de CDR que incluyen la sustitución V71K (marcada "'3 + una mutación de región marco" o "4"); (5) el clon que contiene CDR H1 y H2 (marcado "5" o "4 + H1, H2 con maduración de afinidad"); y anticuerpo E3 (como se ha descrito anteriormente).

FIGURA 1B: muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo E3

(marcado "5" o "4 + L3 con maduración de afinidad"). Las CDR de Chothia y CDR de Kabat se representan por texto subrayado y texto en negrita y cursiva, respectivamente. La Figura 1B también muestra el alineamiento de las siguientes secuencias de aminoácidos de región variable de cadena ligera: (2) secuencia aceptora de línea germinal humana 08 (marcada "O8" o "2"); (3) las secuenciasceptoras con injertos de las CDR extendidas del anticuerpo de ratón 911 (marcadas "injerto de CDR" o "3"); (4) las secuenciasceptoras con injertos de CDR (marcadas "3 + L1, L2 con maduración de afinidad" o "4"); (5) el clon que contiene CDR L1 y L2 con afinidad madurada (marcado "5" o "4 + L3 con maduración de afinidad"); y el anticuerpo E3 (como se ha descrito anteriormente).

FIGURA 2: muestra un polinucleótido que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo E3.

FIGURA 3: muestra un polinucleótido que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo E3.

FIGURA 4: es una gráfica que representa supervivencia dependiente de NGF de neuronas E13.5 en presencia de diversas concentraciones de NGF humano y de rata. El eje X corresponde a concentración de NGF (ng/ml) y el eje Y corresponde a neuronas contadas.

FIGURA 5: es una gráfica que compara el efecto de bloqueo de NGF de diversos Fab en presencia de NGF humano 0,04 ng/ml (aproximadamente 1,5 pM; mostrado en el panel inferior) o NGF humano 0,4 ng/ml (aproximadamente 15 pM; mostrado en el panel superior). Se evaluó la supervivencia de las neuronas trigeminales de ratón E13.5 en diversas concentraciones de Fab E3; Fab 911 murino; y Fab H19-L129 y Fab 8L2-6D5. La CI50 (en pM) se calculó para cada Fab a cada concentración de NGF y se muestra en la Tabla 9. Fab E3 bloqueó fuertemente la supervivencia de neuronas trigeminales dependiente de NGF humano, con una CI50 de aproximadamente 21 pM en presencia de NGF humano 15 pM y una CI50 de aproximadamente 1,2 pM en presencia de NGF humano 1,5 pM. Los Fab 3C y H19-L129 también bloquearon fuertemente la supervivencia de neuronas trigeminales dependiente de NGF humano. En ambos paneles, el eje X corresponde a concentración de anticuerpo (nM) y el eje Y corresponde a neuronas contadas. NGF 1,5 pM estaba cerca de la CI50, mientras que 15 pM representaba una concentración saturante de NGF.

FIGURA 6: es una gráfica que compara el efecto de bloqueo de NGF de diversos Fab en presencia de NGF de rata 0,04 ng/ml (aproximadamente 1,5 pM; mostrado en el panel inferior) o NGF de rata 0,4 ng/ml (aproximadamente 15 pM; mostrado en el panel superior). Se evaluó la supervivencia de neuronas trigeminales de ratón E13.5 en diversas concentraciones de Fab E3; Fab 911 murino; y Fab H19-L129 y 8L2-6D5 como se ha descrito anteriormente. Se calculó la CI50 (en pM) para cada Fab a cada concentración de NGF y se muestran en la Tabla 9. Fab E3 bloqueó fuertemente la supervivencia de neuronas trigeminales dependiente de NGF humano, con una CI50 de aproximadamente 31,6 pM en presencia de NGF de rata 15 pM y una CI50 de aproximadamente 1,3 pM en presencia de NGF de rata 1,5 pM. Los Fab 3C y H19-L129 también bloquearon fuertemente la supervivencia de neuronas trigeminales dependiente de NGF de rata. NGF 1,5 pM era aproximadamente la CI50, mientras que 15 pM representó una concentración de saturación de NGF. En ambos paneles, el eje de las X corresponde a la concentración de anticuerpo (nM) y el eje Y corresponde a neuronas contadas.

FIGURA 7: es una gráfica que representa el dolor en reposo evaluado 24 horas después de la cirugía y que muestra que el tratamiento con anticuerpo anti-NGF E3 0,02 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,6 mg/kg o 1 mg/kg redujo el dolor. "\*" indica una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,5$ ) del control negativo.

FIGURA 8: es una gráfica que representa el dolor en reposo evaluado 24 horas después de la cirugía y que muestra que el tratamiento con anticuerpo anti-NGF E3 0,5 mg/kg redujo significativamente ( $p < 0,005$ ) el dolor en reposo cuando se inyectó dos horas después de la cirugía.

FIGURA 9: es una gráfica que muestra los resultados de análisis de BIAcore de la afinidad de unión con NGF humano del anticuerpo de ratón 911 (Fab). El anticuerpo de ratón 911 se unió a NGF con una KD de 3,7 nM,  $k_{off}$  de  $8,4 \times 10^{-5} s^{-1}$  y  $k_{on}$  de  $2,2 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ .

FIGURA 10: es una gráfica que muestra los resultados de análisis de BIAcore de la afinidad de unión por NGF humano del anticuerpo E3 (Fab) (denominado "Fab 3E"). E3 se unió a NGF humano con una KD de aproximadamente 0,07 nM (y con una  $k_{on}$  de aproximadamente  $6,0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$  y una  $k_{off}$  de aproximadamente  $4,2 \times 10^{-5} s^{-1}$ ).

FIGURA 11: es una gráfica que representa que el anticuerpo E3 bloquea la interacción de NGF con sus receptores, trkA y p75, según se evalúa por porcentaje de unión detectado entre NGF y trkA (mostrado en círculos negros) y NGF y p75 (mostrado como cuadrados vacíos). El eje X corresponde a la concentración de anticuerpo 3E (Fab) y el eje Y corresponde a unión de NGF (porcentaje de UR máximo). Concentraciones aumentadas de Fab E3 bloquearon la interacción de NGF tanto con p75 como con trkA, como se muestra por la reducción de la señal (medida en UR). Cuando la concentración de anticuerpo E3 (Fab) se igualó con la concentración de NGF no se observó unión de NGF (como se muestra por una señal de cero).

FIGURA 12: es una gráfica que representa la capacidad de bloqueo de NGF humano del anticuerpo completo E3 y Fab E3. Se evaluaron la supervivencia de neuronas trigeminales de ratón E13.5 en presencia de NGF humano y diversas concentraciones de Fab E3 y anticuerpo E3. El eje X corresponde a sitios de unión a NGF (nM) y el eje Y corresponde a conteo normalizado de neuronas trigeminales (TG). El anticuerpo completo 3E y Fab E3 mostraron niveles similares de inhibición de supervivencia dependiente de NGF de neuronas trigeminales cuando la concentración de anticuerpo completo y Fab se normalizaron al número de sitios de unión a NGF (Fab tiene un sitio de unión y el anticuerpo completo tiene dos sitios de unión).

FIGURA 13: es una gráfica que representa la capacidad de diversas concentraciones (20, 4, 0,8, 0,16, 0,032,

0,0064, 0,00128 y 0,0 nM) del anticuerpo E3 (triángulos sólidos; denominado "3E"), anticuerpo 911 (círculos sólidos) y una inmunoadhesina de receptor trkA (cuadrados sombreados; denominada "trkA-Fc) para inhibir supervivencia dependiente de NGF de neuronas trigeminales E13,5 en presencia de NGF humano 0,4 ng/ml (condiciones de saturación). El eje X corresponde a la concentración de anticuerpo (nM) y la concentración de Y corresponde a neuronas contadas. Estos resultados demostraron que el anticuerpo E3 bloqueaba NGF significativamente mejor que el anticuerpo anti-NGF monoclonal de ratón 911 o la inmunoadhesina de trkA.

FIGURA 14: es un gráfico que representa que el anticuerpo antagonista anti-NGF E3 (denominado "3E en la figura") o Fab 911 no inhibió la supervivencia neuronal promovida por NT3, NT4/5 y MSP, incluso a concentraciones de anticuerpo tan altas como 200 nM. Los datos representaron la media del porcentaje de supervivencia después de 48 horas en cultivo ( $\pm$  error típico de la media,  $n = 3$  para cada punto de datos) en relación con la supervivencia observada en el control positivo para cada experimento (100 % de supervivencia de neuronas trigeminales crecidas en presencia de concentración de NGF saturante). Se usaron diversas concentraciones (20 nM, 2 nM o 0,2 nM) de Fab E3 (denominado "3E" en la figura) y Fab de anticuerpo de ratón 911 sin neurotrofina añadida (denominado "control"), en presencia de NGF 400 pM (denominado "NGF-400 pM), NT3 10 nM (denominado "NT3-10nM) o MSP 600 pM (denominado "MSP-600 pM).

FIGURA 15: es una gráfica que representa que el anticuerpo antagonista anti-NGF E3 (Fab o anticuerpo completo) (denominado "3E en la figura") o anticuerpo de ratón 911 (Fab o anticuerpo completo) no inhibió la supervivencia neuronal promovida por NT3, NT4/5 y MSP, incluso a concentraciones de anticuerpo tan altas como 200 nM. Se usaron diversas concentraciones (200 nM y 80 nM) de Fab y anticuerpo completo E3 y anticuerpo completo y Fab de anticuerpo de ratón 911 sin neurotrofinas añadidas (denominado "sin factor"), en presencia de NGF 400 pM (denominado "NGF-400 pM), NT3 10 nM (denominado "NT3-10nM) o MSP 600 pM (denominado "MSP-600 pM).

FIGURA 16: es una gráfica que representa que el anticuerpo antagonista anti-NGF E3 o Fab E3 no inhibió la supervivencia de neuronas nodosas E17 promovida por BDNF, NT4/5 o LIF. También se ensayó el anticuerpo anti-NGF de ratón 911, y se observaron resultados similares. Se ensayaron diversas concentraciones (200 nM o 80 nM) de anticuerpo completo E3 (denominado "3E en la figura"), Fab E3, anticuerpo completo 911 o Fab 911 sin neurotrofinas añadidas (denominado "sin factores"), en presencia de BDNF 400 pM (denominado "BDNF-400 pM), NT4/5 400 pM (denominado "NT4/5-400 pM) o LIF 2,5 nM (denominado "LIF-2,5 nM).

FIGURA 17: es una gráfica que representa que el anticuerpo antagonista anti-NGF E3 o Fab E3 no inhibió la supervivencia de neuronas nodosas E17 promovida por BDNF, NT4/5 o LIF. Se ensayaron diversas concentraciones (200 nM, 20 nM, 2 nM) de Fab E3 (denominado "3E en la figura"), o Fab 911 sin neurotrofinas añadidas (denominado "control"), en presencia de BDNF 400 pM (denominado "BDNF 400 pM), NT4/5 400 pM (denominado "NT4, 5-400 pM) o LIF 2,5 nM (denominado "LIP-2,5 nM).

FIGURA 18: es una gráfica que demuestra la respuesta nociceptiva en ratas artríticas (modelo de artritis reumatoide) después de administración de anticuerpos anti-NGF (E3 y 911) en D14 y D19. Se administró E3 (1 mg/kg, i.v. el día 14 y día 19), 911 (10 mg/kg, i.v. el día 14 y día 19) o indo (indometacina 3 mg/kg, p.o. diariamente durante 10 días) a ratones artríticos. Los valores de intensidad de vocalización se expresan en mV como media  $\pm$  e.t.m.

FIGURA 19: es una gráfica que demuestra los efectos de anticuerpos anti-NGF en el peso corporal en artritis en ratas (modelo de artritis reumatoide) después de administración de anticuerpos anti-NGF en D14 y D19. Se administraron E3 (1 mg/kg, i.v. el día 14 y día 19), 911 (10 mg/kg, i.v. el día 14 y día 19) o indo (indometacina 3 mg/kg, p.o. diariamente durante 10 días) a ratones artríticos. Los valores de peso corporal se expresan en gramos como media  $\pm$  e.t.m.

FIGURA 20: es una gráfica que demuestra la respuesta nociceptiva en ratas artríticas (modelo de artritis reumatoide) después de administración de diferentes dosis de anticuerpo anti-NGF E3 (0,003 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,3 mg/kg y 5 mg/kg) en D14 y D18. Los valores de intensidad de vocalización se expresan en mV como media  $\pm$  e.t.m.

FIGURA 21: es una gráfica que demuestra los efectos de anticuerpo anti-NGF E3 en el porcentaje de peso el día 14 (normalizado el día 14) en ratas artríticas (modelo de artritis reumatoide) después de administración de diferentes dosis de anticuerpo anti-NGF E3 (0,03 mg/kg, 0,3 mg/kg y 5 mg/kg) en D14 y D18.

FIGURA 22: es una gráfica que demuestra los efectos de anticuerpo anti-NGF E3 en la pérdida de peso en ratas artríticas (modelo de artritis reumatoide) después de administración de diferentes dosis de anticuerpo anti-NGF E3 (0,03 mg/kg, 0,3 mg/kg y 5 mg/kg) en D14 y D18. Los valores de peso corporal se normalizaron al día 0.

FIGURA 23: representa la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de E3 (Fig. 23A) y secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera (Fig. 23B), numeradas usando numeración secuencial, numeración de Kabat y numeración de Chothia.

### **Descripción detallada de la invención**

La invención desvelada en el presente documento proporciona anticuerpos antagonistas anti-NGF para su uso en el tratamiento del dolor osteoartrítico. Los anticuerpos pueden unirse a NGF (tales como NGF humano) con alta afinidad. La invención proporciona adicionalmente anticuerpos derivados de E3 que se unen a NGF y desvela procedimientos para preparar y usar estos anticuerpos. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, E3, que se une a factor de crecimiento nervioso ("NGF"). La divulgación también proporciona polipéptidos de E3 que se unen a NGF, y polinucleótidos que codifican anticuerpo y/o polipéptido E3.

La invención desvelada en el presente documento también posibilita el tratamiento de dolor osteoartítico en un individuo mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antagonista anti NGF.

5 La divulgación también proporciona procedimientos para prevenir y/o tratar dolor de artritis reumatoide en un individuo por administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antagonista anti-NGF.

La divulgación también proporciona procedimientos para ajustar la afinidad de un anticuerpo y procedimientos para caracterizar una región CDR.

#### *Técnicas generales*

10 La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook y col., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987);  
 15 Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather y P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, y D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel y col., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis y col., eds., 1994); Current  
 20 Protocols in Immunology (J.E. Coligan y col., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley y Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway y P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y  
 25 Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita y col., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

#### *Definiciones*

Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unión específica con una diana, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígenos, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, el  
 30 término abarca no solamente anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), cadena sencilla (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígenos. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM (o subclase de la misma), y el anticuerpo no necesita ser de ninguna clase particular.  
 35 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del dominio constante de sus cadenas pesadas, pueden asignarse inmunoglobulinas a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, epsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras  
 40 subunitarias y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien.

"Fv" es un fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y unión a antígeno completo. En una especie de Fv de dos cadenas, esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de ligera en asociación estrecha no covalente. En una especie de Fv de cadena sencilla, un dominio variable de  
 45 cadena pesada y uno de ligera pueden estar ligados covalentemente por un enlazador peptídico flexible de modo que las cadenas ligera y pesada pueden asociarse en una estructura dimérica análoga a la de una especie de Fv de dos cadenas. Es en esta configuración en la que interaccionan tres CDR de cada dominio variable para definir una especificidad de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Sin embargo, incluso un dominio variable sencillo (o la mitad de un Fv que comprende solamente 3 CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque generalmente a una afinidad menor que el sitio de unión completo.

50 El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de fragmentos Fab por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo terminal del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de las regiones bisagra de anticuerpo.

55 Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de anticuerpos homogénea en la que el anticuerpo monoclonal está comprendido por aminoácidos (de origen natural y de origen no natural) que están implicados en la unión selectiva de un antígeno. Una población de anticuerpos monoclonales es altamente específica, dirigiéndose contra un sitio antigénico sencillo. La expresión "anticuerpo monoclonal" abarca no solamente anticuerpos monoclonales intactos y anticuerpos monoclonales de longitud completa, sino también fragmentos de los mismos

(tales como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), cadena sencilla (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprende una parte de anticuerpo y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígenos de la especificidad requerida y la capacidad para unirse a un antígeno. No se pretende que se limite con respecto a la fuente del anticuerpo o la manera en la que se prepara (por ejemplo, por hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, animales transgénicos, etc.).

Como se usa en el presente documento, "anticuerpo humano" significa un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos conocidas en la materia o desveladas en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de cadena pesada humana o al menos un polipéptido de cadena ligera humana. Un ejemplo tal es un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena ligera murina y cadena pesada humana. Pueden producirse anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la materia. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona de una biblioteca de fagos, cuando esa biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan y col., 1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets y col., 1998, *PNAS*, (USA) 95:6157-6162; Hoogenboom y Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*; 227:381 Marks y col., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581). También pueden prepararse anticuerpos humanos introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcial o completamente. Este enfoque se describe en las patentes de Estados Unidos N° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425 y 5.661.016. Como alternativa, el anticuerpo humano puede prepararse inmortalizando linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (tales linfocitos B pueden recuperarse de un individuo o puede haberse inmunizado *in vitro*). Véase, por ejemplo, Cole y col., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner y col., 1991, *J. Immunol.*, 147 (1): 86-95; y patente de Estados Unidos N° 5.750.373.

"Anticuerpos quiméricos" se refiere a los anticuerpos en los que una parte de cada una de las secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras es homóloga de las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase particular, mientras que el segmento restante de las cadenas es homólogo de las secuencias correspondientes en otra. Típicamente, en estos anticuerpos quiméricos, la región variable de las cadenas tanto ligera como pesada se asemeja a las regiones variables de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos, mientras que las partes constantes son homólogas de las secuencias en anticuerpos derivados de otra. Una ventaja clara de tales formas quiméricas es que, por ejemplo, las regiones variables pueden derivarse convenientemente a partir de fuentes conocidas en la actualidad usando hibridomas fácilmente disponibles o linfocitos B de organismos huéspedes no humanos en combinación con regiones constantes derivadas de, por ejemplo, preparaciones de células humanas. Aunque la región variable tiene la ventaja de facilidad de preparación y la especificidad no se ve afectada por su fuente, siendo la región constante humana, es menos probable inducir una respuesta inmune a partir de un sujeto humano cuando los anticuerpos se inyectan que la región constante de una fuente no humana. Sin embargo, la definición no se limita a este ejemplo particular.

Una "región Fc funcional" posee al menos una función efectora de una región Fc de secuencia nativa. Las "funciones efectoras" ejemplares incluyen unión de C1q; citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); unión del receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B, BCR), etc. Tales funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y puede evaluarse usando diversos ensayos conocidos en la técnica para evaluar tales funciones efectoras de anticuerpo.

Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácido, pero conserva al menos una función efectora de la región Fc de secuencia nativa. Preferentemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente uno a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante en el presente documento preferentemente poseerá al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, y más preferentemente al menos aproximadamente 90 % de identidad de secuencia con la misma, más preferentemente al menos aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia con la misma.

Como se usa en el presente documento "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (FcR) (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen anticuerpo unido en una célula y posteriormente provocan lisis de la célula diana. Puede evaluarse la actividad ADCC de una molécula de interés usando un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en las patentes de Estados Unidos N° 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica

(PBMC) y linfocitos NK. Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como el desvelado en Clynes y col., 1998, PNAS (USA), 95:652-656.

Como se usa en el presente documento, "receptor de Fc" y "FcR" describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativo de estos receptores. Los receptores Fc $\gamma$ RII incluyen Fc $\gamma$ RIIA (un "receptor de activación") y Fc $\gamma$ RIIB (un "receptor de inhibición") que tiene secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de las mismas. Se revisan FcR en Ravetch y Kinet, 1991, Ann. Rev. Immunol., 9:457-92; Capel y col., 1994, Immunomethods, 4:25-34; y de Haas y col., 1995, J. Lab Clin. Med. 126:330-41. "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer y col., 1976, J. Immunol., 117:587; y Kim y col., 1994, J. Immunol., 24:249).

"Citotoxicidad dependiente de complemento" y "CDC" se refiere a la lisis de una diana en presencia de complemento. La ruta de activación del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) con una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) en complejo con un antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro y col., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996).

Como se usa en el presente documento, los términos "E3", "3E" y "anticuerpo E3" se usan de forma intercambiable para referirse a un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera mostradas en las Figuras 1A (SEC ID N°: 1) y 1B (SEC ID N°: 2), respectivamente. Las partes de CDR del anticuerpo E3 (incluyendo CDR de Chothia y Kabat) se representan en diagramas en las Figuras 1A y 1B. Las Figuras 2 y 3 muestran polinucleótidos que codifican cadenas pesadas y ligeras, respectivamente, que comprende las regiones variables de cadena pesada y ligera mostradas en las Figuras 1A y 1B, respectivamente. La generación y caracterización de E3 se describe en los ejemplos. Se asocian funciones biológicas diferentes con E3, incluyendo, pero sin limitación, la capacidad para unirse a NGF e inhibir la actividad biológica de NGF y/o ruta o rutas corriente abajo mediadas por señalización de NGF; y la capacidad para inhibir supervivencia dependiente de NGF de neuronas trigeminales E13.5 de ratón. Como se analiza en el presente documento, los anticuerpos de la invención pueden tener una cualquiera o más de estas características. En algunas realizaciones, el término "E3" se refiere a la inmunoglobulina codificada por (a) un polinucleótido que codifica cadena ligera de E3 que tiene un número de depósito de ATCC N° PTA-4893 o ATCC N° PTA-4894 y (b) un polinucleótido que codifica cadena pesada de E3 que tiene un número de depósito de ATCC N° PTA-4895.

Como se usa en el presente documento, la unión "inmuno-específica" de anticuerpos se refiere a la interacción de unión específica de antígeno que se produce entre el sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo y el antígeno específico reconocido por ese anticuerpo (es decir, el anticuerpo reacciona con la proteína en un ELISA u otro inmunoensayo, y no reacciona de forma detectable con proteínas no relacionadas).

Un epítipo que "se une específicamente" o "se une preferentemente" (usados de forma intercambiable en el presente documento) con un anticuerpo o un polipéptido es una expresión bien entendida en la técnica, y también se conocen bien en la técnica procedimientos para determinar tal unión específica o preferente. Se dice que una molécula muestra "unión específica" o "unión preferente" si reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una sustancia o célula particular que con células o sustancias alternativas. Un anticuerpo "se une específicamente" o "se une preferentemente" con una diana si se une con mayor afinidad, avidéz, más fácilmente y/o con mayor duración de lo que se une a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente o preferentemente con un epítipo de NGF es un anticuerpo que se une este epítipo con mayor afinidad, avidéz, más fácilmente y/o con mayor duración de lo que se une a otros epítipos de NGF o epítipos no de NGF. También se entiende leyendo esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o resto o epítipo) que se une específica o preferentemente a una primera diana puede unirse o no específica o preferentemente a una segunda diana. Como tal, la "unión específica" o "unión preferente" no requiere necesariamente (aunque pueda incluir) unión exclusiva. Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a unión significa unión preferente.

Los términos "polipéptido", "oligopéptido", "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede interrumpirse por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácido que se ha modificado de forma natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlace disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que, debido a que los polipéptidos de la presente invención se basan en un anticuerpo, los polipéptidos pueden aparecer como cadenas sencillas o cadenas asociadas.

“Polinucleótido” o “ácido nucleico”, como se usa de forma intercambiable en el presente documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificadas y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero por ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, puede transmitirse modificación a la estructura de nucleótidos antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de polimerización, tal como por conjugación con un componente de marcaje. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, “extremos”, sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, con engarces no cargados (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con engarces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforditioatos, etc.), las que contienen restos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, ply-L-lisina, etc.), con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), las que contienen queladores (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), las que contienen alquilantes, con engarces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos anoméricos alfa, etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido o los polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilo presentes habitualmente en los azúcares puede reemplazarse, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse por grupos de protección convencionales o activarse para preparar engarces adicionales a nucleótidos adicionales o pueden conjugarse con soportes sólidos. El OH 5' y 3' terminal puede fosforilarse o sustituirse con aminas o restos de grupos de protección orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos de protección convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa que se conocen en general en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil, 2'-O-alil, 2'-fluoro o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclico, azúcares  $\alpha$ -anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como metil ribósido. Uno o más engarces fosfodiéster pueden reemplazarse por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero sin limitación, realizaciones en las que el fosfato se reemplaza por P(O)S (“tioato”), P(S)S (“ditioato”), “(O)NR<sub>2</sub> (“amidato”), P(O)R, P(O)OR', CO o CH<sub>2</sub> (“formacetal”), en los que cada R o R' es de forma independiente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que contiene opcionalmente un engarce éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todos los engarces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos referidos en el presente documento, incluyendo ARN y ADN.

Una “región variable” de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera de anticuerpo o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, sola o en combinación. Las regiones variables de la cadena pesada y ligera consisten cada una en cuatro regiones marco (FR) conectadas por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en proximidad cercana por las FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión de antígeno de los anticuerpos. Existen al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) un enfoque basado en variabilidad de secuencia entre especies (es decir, Kabat y col. *Sequences of Protein of Immunological Interest*, (5<sup>a</sup> ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Chothia y col (1989) *Nature* 342:877; Al-lazikani y col (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948)). Como se usa en el presente documento, una CDR puede referirse a CDR definidas por uno de los enfoques o por una combinación de ambos enfoques.

Una “región constante” de un anticuerpo se refiere a la región constante de la cadena ligera del anticuerpo o la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, sola o en combinación.

Como se usa en el presente documento, la expresión “factor de crecimiento nervioso” y “NGF” se refiere al factor de crecimiento nervioso y variantes del mismo que conservan al menos parte de la actividad biológica de NGF. Como se usa en el presente documento, NGF incluye todas las especies de mamífero de NGF de secuencia nativa, incluyendo humano, canino, felino, equino o bovino.

El “receptor de NGF” se refiere a un polipéptido que se une a o se activa por NGF. Los receptores de NGF incluyen el receptor TrkA y el receptor p75 de cualquier especie de mamífero, incluyendo, pero sin limitación, humano, canino, felino, equino, primate o bovino.

Como se usa en el presente documento, un “anticuerpo antagonista anti-NGF” (denominado de forma intercambiable “anticuerpo anti-NGF”) se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a NGF e inhibir la actividad biológica de NGF y/o ruta o rutas corriente abajo mediadas por señalización de NGF. Un anticuerpo antagonista anti-NGF abarca anticuerpos que bloquean, antagonizan, suprimen o reducen (incluyendo de forma significativa) la actividad biológica de NGF, incluyendo rutas corriente abajo mediadas por señalización de NGF, tales como unión del receptor y/o inducción de una respuesta celular a NGF. Para el fin de la presente invención, se entenderá explícitamente que la expresión “anticuerpo antagonista anti-NGF” abarca todas las expresiones, títulos y estados funcionales y características identificados previamente por los que el NGF en sí mismo, una actividad biológica de NGF (incluyendo pero sin limitación su capacidad para mediar cualquier aspecto del dolor postquirúrgico) o las consecuencias de la actividad biológica, se anulan, reducen o neutralizan sustancialmente en cualquier grado

significativo. En algunas realizaciones, un anticuerpo antagonista anti-NGF se une a NGF y evita la dimerización de NGF y/o unión a un receptor de NGF (tal como p75 y/o trkA). En otras realizaciones, un anticuerpo anti-NGF se une a NGF y evita la dimerización del receptor trkA y/o autofosforilación de trkA. Se proporcionan en el presente documento ejemplos de anticuerpos antagonistas anti-NGF.

5 “Actividad biológica” de NGF se refiere en general a la capacidad para unirse a receptores de NGF y/o activar rutas de señalización de receptor de NGF. Sin limitación, una actividad biológica incluye una cualquiera o más de las siguientes: la capacidad para unirse a un receptor de NGF (tal como p75 y/o trkA); la capacidad para promover la dimerización del receptor trkA y/o autofosforilación; la capacidad para activar una ruta de señalización del receptor de NGF; la capacidad para promover la diferenciación, proliferación, supervivencia, crecimiento celular y otros cambios en la fisiología celular, incluyendo (en el caso de neuronas, incluyendo neurona periférica y central) cambio en la morfología neuronal, sinaptogénesis, función sináptica, liberación de neurotransmisor y/o neuropéptido y regeneración después de daño; la capacidad para promover la supervivencia de neuronas trigeminales E13.5 de ratón; y la capacidad para mediar en el dolor, incluyendo dolor postquirúrgico.

10 Como se usa en el presente documento, “sustancialmente puro” se refiere a material que es al menos 50 % puro (es decir, sin contaminantes), más preferentemente al menos 90 % puro, más preferentemente al menos 95 % puro, más preferentemente al menos 98 % puro, más preferentemente al menos 99 % puro.

15 Una “célula huésped” incluye una célula individual o cultivo celular que puede ser o ha sido receptor de vector o vectores para la incorporación de insertos polinucleotídicos. Las células huésped incluyen descendencia de una célula huésped sencilla, y la descendencia puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN genómico) a la célula parental original debido a mutación natural, accidental o deliberada. Una célula huésped incluye células transfectadas *in vivo* con un polinucleótido o polinucleótidos de la presente invención.

20 Como se usa en el presente documento, “tratamiento” es un enfoque para obtener resultados clínicos deseados o beneficiosos. Para fines de la presente invención, los resultados beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: mejora o alivio de cualquier aspecto del dolor, incluyendo dolor agudo, crónico, inflamatorio, neuropático, postquirúrgico, dolor de artritis reumatoide o dolor osteoartítico. Para fines de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: incluyendo reducir la gravedad, alivio de uno o más síntomas asociados con dolor incluyendo cualquier aspecto del dolor (tales como acortamiento de la duración del dolor, reducción de la sensibilidad o sensación de dolor).

25 Una “cantidad eficaz” de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados incluyendo resultados clínicos tales como alivio o reducción de la sensación de dolor. Puede administrarse una cantidad eficaz en una o más administraciones. Para fines de la presente invención, una cantidad eficaz de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para tratar, aliviar, reducir la intensidad de y/o evitar el dolor, incluyendo dolor postquirúrgico, dolor de artritis reumatoide y/o dolor osteoartítico. En algunas realizaciones, la “cantidad eficaz” puede reducir el dolor en reposo (dolor de reposo) o dolor inducido mecánicamente (incluyendo dolor después de movimiento) o ambos, y puede administrarse antes, durante o después de una incisión, corte, desgarrar o lesión y/o antes, durante o después del estímulo doloroso. Como se entiende en el contexto clínico, una cantidad eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede o no conseguirse junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por lo tanto, una “cantidad eficaz” puede considerarse en el contexto de administrar uno o más agentes terapéuticos, y puede considerarse que un agente sencillo se proporciona en una cantidad eficaz si, junto con uno o más agentes adicionales, puede conseguirse o se consigue un resultado deseable.

30 Una “cantidad eficaz” de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados incluyendo resultados clínicos tales como alivio o reducción de la sensación de dolor. Puede administrarse una cantidad eficaz en una o más administraciones. Para fines de la presente invención, una cantidad eficaz de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para tratar, aliviar, reducir la intensidad de y/o evitar el dolor, incluyendo dolor postquirúrgico, dolor de artritis reumatoide y/o dolor osteoartítico. En algunas realizaciones, la “cantidad eficaz” puede reducir el dolor en reposo (dolor de reposo) o dolor inducido mecánicamente (incluyendo dolor después de movimiento) o ambos, y puede administrarse antes, durante o después de una incisión, corte, desgarrar o lesión y/o antes, durante o después del estímulo doloroso. Como se entiende en el contexto clínico, una cantidad eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede o no conseguirse junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por lo tanto, una “cantidad eficaz” puede considerarse en el contexto de administrar uno o más agentes terapéuticos, y puede considerarse que un agente sencillo se proporciona en una cantidad eficaz si, junto con uno o más agentes adicionales, puede conseguirse o se consigue un resultado deseable.

35 “Reducir la incidencia” de dolor significa cualquiera de reducir la gravedad (que puede incluir reducir la necesidad de y/o cantidad de (por ejemplo, exposición a) otros fármacos y/o terapias usados generalmente para estas afecciones, incluyendo, por ejemplo, opiáceos), duración y/o frecuencia (incluyendo, por ejemplo, retardar o aumentar el tiempo hasta dolor postquirúrgico en un individuo). Como se entiende por el experto en la materia, los individuos pueden variar con respecto a su respuesta a tratamiento y, como tales, por ejemplo, un “procedimiento para reducir la incidencia del dolor de artritis reumatoide o dolor osteoartítico en un individuo” refleja administrar el anticuerpo antagonista anti-NGF basándose en una expectativa razonable de que dicha administración pueda provocar probablemente una reducción tal de la incidencia en ese individuo particular.

40 “Aliviar” un dolor o uno o más síntomas de un dolor (tal como dolor de artritis reumatoide o dolor osteoartítico) significa una reducción o mejora de uno o más síntomas de un dolor en comparación con no administrar un anticuerpo antagonista anti-NGF. “Aliviar” también incluye acortamiento o reducción de la duración de un síntoma.

45 “Paliar” un dolor o uno o más síntomas de un dolor (tal como dolor de artritis reumatoide o dolor osteoartítico) significa reducir el alcance de una o más manifestaciones clínicas no deseables de dolor postquirúrgico en un individuo o población de individuos tratados con un anticuerpo antagonista anti-NGF de acuerdo con la invención.

Como se usa en el presente documento, “retardar” el desarrollo del dolor significa aplazar, impedir, ralentizar,

retardar, estabilizar y/o posponer la progresión de dolor, tal como dolor post-quirúrgico, dolor de artritis reumatoide o dolor osteoartrítico. Este retardo puede ser de diversas longitudes de tiempo, dependiendo del historial de la enfermedad y/o los individuos que se tratan. Como resulta evidente para un experto en la materia, un retardo suficiente o significativo puede, de hecho, abarcar prevención, por que el individuo no desarrolla dolor. Un procedimiento que “retarda” el desarrollo del síntoma es un procedimiento que reduce la probabilidad de desarrollar el síntoma en un periodo de tiempo dado y reduce el alcance de los síntomas en un periodo de tiempo dado, en comparación con no usar el procedimiento. Tales comparaciones se basan típicamente en estudios clínicos, usando un número estadísticamente significativo de sujetos.

“Dolor” como se usa en el presente documento se refiere a dolor de cualquier etiología, incluyendo dolor agudo y crónico, y cualquier dolor con un componente inflamatorio. Los ejemplos de dolor incluyen dolor post-quirúrgico, dolor post-operatorio (incluyendo dolor dental), migraña, cefalea y neuralgia del trigémino, dolor asociado con quemadura, herida o piedra en el riñón, dolor asociado con traumatismo (incluyendo lesión traumática de la cabeza), dolor neuropático, dolor asociado con trastornos musculoesqueléticos tales como artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante, artropatías seronegativas (no reumatoides), reumatismo no articular y trastornos periarticulares, y dolor asociado con cáncer (incluyendo “dolor inter-recurrente” y dolor asociado con cáncer terminal), neuropatía periférica y neuralgia post-herpética. Los ejemplos de dolor con un componente inflamatorio (además de los descritos anteriormente) incluyen dolor reumático, dolor asociado con mucositis y dismenorrea.

“Dolor post-quirúrgico” (denominado de forma intercambiable “post-incisional” o “dolor post-traumático”) se refiere a dolor que surge o resulta de un traumatismo externo tal como un corte, punción, incisión, desgarro o herida en tejido de un individuo (incluyendo el que surge de todos los procedimientos quirúrgicos, bien invasivos o bien no invasivos). Como se usa en el presente documento, el dolor post-quirúrgico no incluye dolor que aparezca (surja o se origine) sin un traumatismo físico externo. En algunas realizaciones, el dolor post-quirúrgico es dolor interno o externo (incluyendo periférico) y la herida, corte, traumatismo, desgarro o incisión puede producirse accidentalmente (como con una herida traumática) o deliberadamente (como con una incisión quirúrgica). Como se usa en el presente documento, “dolor” incluye nocicepción y la sensación de dolor, y el dolor puede evaluarse de forma objetiva y subjetiva, usando puntuaciones de dolor y otros procedimientos bien conocidos en la técnica. El dolor post-quirúrgico, como se usa en el presente documento, incluye alodinia (es decir, aumento de la respuesta a un estímulo normalmente no nocivo) e hiperalgesia (es decir, aumento de la respuesta a un estímulo normalmente nocivo o desagradable), que puede, a su vez, ser de naturaleza térmica o mecánica (táctil). En algunas realizaciones, el dolor se caracteriza por sensibilidad térmica, sensibilidad mecánica y/o dolor en reposo. En algunas realizaciones, el dolor post-quirúrgico comprende dolor inducido de forma mecánica o dolor en reposo. En otras realizaciones, el dolor post-quirúrgico comprende dolor en reposo. El dolor puede ser dolor primario o secundario, como se conoce bien en la técnica.

Una “muestra biológica” abarca una diversidad de tipos de muestras obtenidos de un individuo y puede usarse en un ensayo de diagnóstico o de control. La definición abarca sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólidas tales como una muestra de ensayo de biopsia o cultivos tisulares o células derivadas de los mismos, y la descendencia de los mismos. La definición también incluye muestras que se han manipulado de cualquier manera después de su obtención, tal como por tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento para ciertos componentes, tales como proteínas o polinucleótidos, o inclusión en una matriz sólida o semi-sólida para fines de sección. La expresión “muestra biológica” abarca una muestra clínica y también incluye células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, fluido biológico y muestras tisulares.

Un “individuo” es un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales de granja (tales como vacas), animales deportivos, mascotas (tales como gatos, perros y caballos), primates, ratones y ratas.

Como se usa en el presente documento, “vector” significa una construcción, que es capaz de suministrar, y preferentemente expresar, uno o más genes o secuencias de interés en una célula huésped. Los ejemplos de vectores incluyen, pero sin limitación, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudo, vectores plasmídicos, cosmídicos o de fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónica, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas y ciertas células eucariotas tales como células productoras.

Como se usa en el presente documento, “secuencia de control de la expresión” significa una secuencia de ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Una secuencia de control de la expresión puede ser un promotor, tal como un promotor constitutivo o inducible, o un potenciador. La secuencia de control de la expresión se liga operativamente a la secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir.

Como se usa en el presente documento, “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye cualquier material que, cuando se combina con un principio activo, permite que el ingrediente conserve actividad biológica y no es sensible al sistema inmune del sujeto. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión de aceite/agua y diversos tipos de agentes humectantes. Son diluyentes preferidos para aerosol o administración parenteral, solución salina tamponada con fosfato o solución salina normal (0,9 %). Las composiciones que

comprenden tales vehículos se formulan por procedimientos convencionales bien conocidos (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; y Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20ª Ed. Mack Publishing, 2000).

5 El término "K<sub>off</sub>", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de tasa de disociación para disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno.

El término "K<sub>d</sub>", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación de una interacción anticuerpo/antígeno.

### ANTICUERPO E3, ANTICUERPOS DERIVADOS DE E3, COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS DE USO

#### Composiciones de E3, composiciones derivadas de E3 y procedimientos para preparar las composiciones

10 La presente invención abarca composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden un anticuerpo o polipéptido E3; y polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican un anticuerpo o polipéptido E3. Como se usa en el presente documento, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos o polipéptidos (que pueden o no ser un anticuerpo) que se unen a NGF y/o uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias  
15 que codifican uno o más anticuerpos o polipéptidos que se unen a NGF. Estas composiciones pueden comprender adicionalmente excipientes adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables incluyendo tampones, que se conocen bien en la técnica.

La invención también abarca realizaciones de anticuerpo, polipéptido y polinucleótido aislados. La invención también abarca realizaciones de anticuerpo, polipéptido y polinucleótido sustancialmente puros.

20 Los anticuerpos y polipéptidos de la invención se caracterizan por cualquiera (una o más) de las siguientes características: (a) capacidad de unión a NGF; (b) capacidad de reducir y/o inhibir la actividad biológica de NGF y/o ruta o rutas corriente abajo mediadas por señalización de NGF; (c) capacidad para reducir y/o inhibir supervivencia dependiente de NGF de neuronas trigeminales E13.5 de ratón; (d) ausencia de cualquier actividad cruzada significativa para NT3, NT4/5 y/o BDNF; (e) capacidad para tratar y/o prevenir el dolor (incluyendo dolor post-quirúrgico); (f) capacidad para aumentar la eliminación de NGF; (g) capacidad para reducir o inhibir la activación del  
25 receptor trkA, como se detecta, por ejemplo, usando ensayo de activación del receptor de quinasa (KIRA) (véase Patente de estados Unidos N° 6.027.927).

30 Las propiedades de unión del anticuerpo E3, que se une a NGF humano con cinética de disociación lenta y alta afinidad, en comparación con anticuerpo monoclonal anti-NGF murino parental 911, se resumen posteriormente. E3 se une a NGF humano con una afinidad de unión aproximadamente 50 veces más alta que el anticuerpo de ratón parental 911.

Anticuerpo	k <sub>D</sub>	K <sub>off</sub>	K <sub>on</sub>
911 (Fab)	3,7 nM	9x10 <sup>-5</sup> s <sup>-1</sup>	2,2x10 <sup>4</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
E3 (Fab)	0,07 nM	<4x10 <sup>-5</sup> s <sup>-1</sup>	6x10 <sup>5</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>

El anticuerpo E3 y anticuerpos relacionados también muestran una fuerte capacidad para antagonizar NGF humano, como se evalúa por ensayos *in vitro* (véase Ejemplos 2 y 3). Por ejemplo, el anticuerpo E3 antagoniza la supervivencia de NGF de neuronas trigeminales E3 de ratón a una CI50 de aproximadamente 21 pM en presencia de NGF humano 15 pM, y aproximadamente 1,2 pM en presencia de NGF humano 1,5 pM.

35 En consecuencia, en otro aspecto, los anticuerpos y polipéptidos de la invención se identifican y caracterizan adicionalmente por: (h) unión de alta afinidad con NGF humano con baja cinética de disociación (en algunas realizaciones, con una K<sub>D</sub> de menos de aproximadamente 2 nM y/o una koff más lenta que aproximadamente 6x10<sup>-5</sup>s<sup>-1</sup>) y/o (i) capacidad para inhibir (bloquear) la supervivencia dependiente de NGF de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI50 de aproximadamente 100 pM o menos a NGF aproximadamente 15 pM (en algunas  
40 realizaciones, NGF humano) y/o una CI50 de 200 pM o menos a NGF aproximadamente 1,5 pM.

En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a NGF humano y no se une significativamente a un NGF de otra especie de vertebrado (en alguna realización mamífero). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a NGF humano así como uno o más NGF de otra especie de vertebrado (en algunas realizaciones, mamíferos). En otras realizaciones más, el anticuerpo se une a NGF y no reacciona significativamente de forma cruzada con otras neurotrofinas (tales como las neurotrofinas relacionadas, NT3, NT4/5 y/o BDNF). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a NGF así como al menos otra neurotrofina. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a una especie de NGF de mamífero, tal como caballo o perro, pero no se une significativamente a NGF de otra especie de mamífero.

En algunas realizaciones, la invención es un anticuerpo que comprende una cadena ligera que se codifica por un

polinucleótido que se produce por una célula huésped con un número de depósito de ATCC N° PTA-4893 o ATCC N° PTA-4894. En otro aspecto, la invención es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que se codifica por un polinucleótido que se produce por una célula huésped con un número de depósito de ATCC N° PTA-4895. La presente invención también abarca diversas formulaciones de E3 y fragmentos de anticuerpo equivalentes (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fc, etc.), cadena sencilla (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo y cualquier otra configuración modificada de E3 que comprenda un sitio de reconocimiento de antígenos (NGF) de la especificidad requerida. Los anticuerpos equivalentes de E3, incluyendo fragmentos polipeptídicos (que pueden o no ser anticuerpos) y de anticuerpos de E3, y polipéptidos que comprenden fragmentos polipeptídicos de E3 se identifican y caracterizan por cualquiera (uno o más) de los criterios descritos anteriormente.

En consecuencia, la invención proporciona cualquiera de los siguientes, o composiciones (incluyendo composiciones farmacéuticas) que comprenden cualquiera de los siguientes: (a) anticuerpo E3; (b) un fragmento o una región del anticuerpo E3; (c) una cadena ligera del anticuerpo E3 como se muestra en la Figura 1B; (d) una o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo E3; (e) una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR) del anticuerpo E3 mostradas en las Figuras 1A y 1B; (f) CDR H3 de la cadena pesada del anticuerpo E3 mostrada en la Figura 1A; (g) CDR L3 de la cadena ligera del anticuerpo E3 mostrada en la Figura 1B; (h) tres CDR de la cadena ligera del anticuerpo E3 mostradas en la Figura 1B; (i) tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo E3 mostradas en la Figura 1A; (j) tres CDR de la cadena ligera y tres CDR de la cadena pesada, del anticuerpo E3 mostradas en las Figuras 1A y 1B; y (k) un anticuerpo que comprende uno cualquiera de (b) a (j). Como resulta evidente a partir de la descripción del presente documento, se excluyen específicamente de la invención realizaciones de polipéptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal de ratón 911. Las secuencias de CDR extendidas de Mab 911 se muestran en las Figuras 1A y 1B, y en SEC ID N° 9-14.

Las partes de CDR del anticuerpo E3 (incluyendo CDR de Chothia y Kabat) se representan en forma de diagrama en las Figuras 1A y 1B, y consisten en las secuencias de aminoácidos: (a) CDR 1 de cadena pesada ("CDR H1") GFSLIGYDLN (SEC ID N° 3); (b) CDR 2 de cadena pesada ("CDR H2") IHWGDGTTDYN SAVKS (SEC ID N° 4); (c) CDR 3 de cadena pesada ("CDR H3") GGYWYATSYFDY (SEC ID N° 5); (d) CDR 1 de cadena ligera ("CDR L1") RASQSI SNLN (SEC ID N° 6); (e) CDR 2 de cadena ligera ("CDR L2") YTSRFHS (SEC ID N° 7); y (f) CDR 3 de cadena ligera ("CDR L3") QQEHTLPYT (SEC ID N° 8). La determinación de regiones CDR está dentro de la experiencia de la técnica. Se entiende que en algunas realizaciones, las CDR pueden ser una combinación de las CDR de Kabat y de Chothia (también denominadas "CDR combinadas" o "CDR extendidas"). En algunas realizaciones, las CDR comprenden las CDR de Kabat. En otras realizaciones las CDR son las CDR de Chothia.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo que comprende al menos una CDR que es sustancialmente homóloga de al menos una CDR, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos 5 CDR de E3 (o, en algunas realizaciones sustancialmente homóloga de las 6 CDR de E3, o derivada de E3). Otras realizaciones incluyen anticuerpos que tienen al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR que son sustancialmente homólogas de al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR de E3 o derivadas de E3. Se entiende que, para fines de la presente invención, la especificidad de unión y/o actividad global (que puede estar en términos de tratamiento y/o prevención del dolor o inhibición de la supervivencia dependiente de NGF de neuronas trigeminales de ratón E13.5) se conserva en general, aunque el alcance de la actividad puede variar en comparación con E3 (puede ser mayor o menor).

La invención también proporciona un polipéptido (que puede ser o no un anticuerpo) que comprende una secuencia de aminoácidos de E3 (mostrada en las Figuras 1A y 1B) que tiene cualquiera de los siguientes: al menos 5 aminoácidos contiguos, al menos 8 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 10 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 15 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 20 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 25 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos, de una secuencia de E3, en la que al menos 3 de los aminoácidos son de una región variable de E3, con el entendimiento de que se excluyen específicamente las realizaciones que consisten en la secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de aminoácidos de anticuerpo monoclonal de ratón 911. Las secuencias de CDR extendidas de Mab 911 se muestran en las Figuras 1A y 1B, y en SEC ID N° 9-14. En una realización, la región variable es de una cadena ligera de E3. En otra realización, la región variable es de una cadena pesada de E3. En otra realización, los 5 (o más) aminoácidos contiguos son de una región determinante de complementariedad (CDR) de E3 mostrada en las Figuras 1A y 1B.

En otra realización, la invención proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de E3 que tiene cualquiera de los siguientes: al menos 5 aminoácidos contiguos, al menos 8 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 10 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 15 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 20 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 25 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos, de una secuencia de E3, en los que en la secuencia de E3 comprende uno cualquiera o más de: resto de aminoácido L29 de CDRH1, I50 de CDRH2, W101 de CDRH3 y/o A103 de CDRH3; y/o resto de aminoácido S28 de CDRL1, N32 de CDRL1, T51 de CDRL2, 91E de CDRL3 y/o H92

de CDRL3, con el entendimiento de que las realizaciones que consisten en la secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de aminoácidos de anticuerpo monoclonal de ratón 911 se excluyen específicamente.

Como resulta evidente, a lo largo de la presente divulgación, se usa un esquema de numeración de aminoácidos secuencial para referirse a los restos de aminoácidos en las regiones variables (es decir, los restos de aminoácidos en cada región variable están numerados en secuencia). Como se conoce bien en la técnica, los sistemas de numeración de Kabat y/o Chothia son útiles cuando se comparan dos anticuerpos o polipéptidos, tales como un anticuerpo E3 y una variante E3 (o polipéptido sospechoso de ser una variante de E3). Se entiende bien en la técnica como convertir numeración secuencial a numeración de Chothia y/o Kabat, si se desea, por ejemplo, para su uso en la realización de comparaciones entre E3 y otro polipéptido. La Figura 23 representa las regiones variables de E3 numeradas usando numeración secuencial, de Chothia y de Kabat. Además, para facilitar la comparación, generalmente se entiende que los restos marco generalmente, pero no siempre, tienen aproximadamente el mismo número de restos. Sin embargo, las CDR pueden variar de tamaño (es decir, es posible tener inserciones y/o deleciones de uno o más restos de aminoácidos). Cuando se compara un anticuerpo E3 y una variante de E3 candidata (por ejemplo, en el caso de una región CDR de una secuencia candidata que es más larga en la secuencia del anticuerpo E3 con la que se alinea), pueden seguirse las siguientes etapas (aunque se conocen otros procedimientos en la técnica). La secuencia de anticuerpo candidata se alinea con regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de anticuerpo E3. El alineamiento puede realizarse a mano o por ordenador usando programas informáticos aceptados habitualmente. El alineamiento puede facilitarse usando algunos restos de aminoácidos que son comunes para la mayoría de las secuencias Fab. Por ejemplo, las cadenas ligera y pesada tienen típicamente cada una dos cisteínas, que con frecuencia se encuentran en una posición conservada. Se entiende que la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo variante candidato puede ser más larga (es decir tener restos de aminoácidos insertados) o más corta (tener restos de aminoácidos delecionados). Pueden añadirse sufijos al número de resto para indicar la inserción de restos adicionales, por ejemplo, resto 34 abc. Para secuencias candidatas que, por ejemplo, se alinean con una secuencia de E3 para, por ejemplo, los restos 33 y 35, pero no tienen restos entre ellas para alinearse con el resto 35, el resto 35 simplemente no se asigna a un resto. En otro enfoque, se conoce generalmente bien que puede realizarse comparación entre aminoácidos equivalentes estructurales (por ejemplo, misma posición en el complejo antígeno-anticuerpo) cuando se comparan CDR de diferentes longitudes. Por ejemplo, la numeración de Chothia (Al-Lazikani y col, mencionado anteriormente) generalmente (pero no en todos los casos), sitúa inserciones y deleciones en las posiciones estructuralmente correctas. También puede deducirse o demostrarse equivalencia estructural usando cristalografía de rayos-X o análisis de ciclo de doble mutante (véase Pons y col. (1999) Prot. Sci. 8: 958-968).

La afinidad de unión de un anticuerpo anti-NGF por NGF (tal como hNGF) puede ser de aproximadamente 0,10 a aproximadamente 0,80 nM, de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,75 nM y de aproximadamente 0,18 a aproximadamente 0,72 nM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es de aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 40 pM o más de aproximadamente 40 pM. En una realización, la afinidad de unión está entre aproximadamente 2 pM y 22 pM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es menor de aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 4 nM, aproximadamente 3,5 nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 2,5 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 1,5 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 900 pM, aproximadamente 800 pM, aproximadamente 700 pM, aproximadamente 600 pM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 400 pM, aproximadamente 300 pM, aproximadamente 200 pM, aproximadamente 150 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 90 pM, aproximadamente 80 pM, aproximadamente 70 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 40 pM, aproximadamente 30 pM, aproximadamente 10 pM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es de aproximadamente 10 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es menor de aproximadamente 10 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es de aproximadamente 0,1 nM o aproximadamente 0,07 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es menos de aproximadamente 0,1 nM o menos de aproximadamente 0,07 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es cualquiera de aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 4 nM, aproximadamente 3,5 nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 2,5 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 1,5 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 900 pM, aproximadamente 800 pM, aproximadamente 700 pM, aproximadamente 600 pM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 400 pM, aproximadamente 300 pM, aproximadamente 200 pM, aproximadamente 150 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 90 pM, aproximadamente 80 pM, aproximadamente 70 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 40 pM, aproximadamente 30 pM, aproximadamente 10 pM a cualquiera de aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM o aproximadamente 40 pM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es cualquiera de aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 4 nM, aproximadamente 3,5 nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 2,5 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 1,5 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 900 pM, aproximadamente 800 pM, aproximadamente 700 pM, aproximadamente 600 pM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 400 pM, aproximadamente 300 pM, aproximadamente 200 pM, aproximadamente 150 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 90 pM, aproximadamente 80 pM, aproximadamente 70 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 40 pM, aproximadamente 30 pM, aproximadamente 10 pM. En otras realizaciones más, la afinidad de unión es de aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10

pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 40 pM o más de aproximadamente 40 pM.

La afinidad de unión del anticuerpo por NGF puede determinarse usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Una forma de determinar la afinidad de unión de los anticuerpos por NGF es midiendo la afinidad de fragmentos Fab monofuncionales del anticuerpo, como se describe en los ejemplos. Para obtener fragmentos Fab monofuncionales, un anticuerpo (por ejemplo IgG) puede escindirse con papaína o expresarse de forma recombinante. La afinidad de un fragmento Fab anti-NGF de un anticuerpo puede determinarse por resonancia de plasmón superficial (sistema de resonancia de plasmón superficial (SPR) BIAcore3000™, BIAcore, INC, Piscaway NJ), como se describe en los Ejemplos. Este protocolo es adecuado para su uso en la determinación de afinidad de unión de un anticuerpo por NGF de cualquier especie, incluyendo NGF humano, NGF de otro vertebrado (en algunas realizaciones, mamífero) (tal como NGF de ratón, NGF de rata, NGF de primate), así como para su uso con otras neurotrofinas, tales como las neurotrofinas relacionadas NT3, NT4/5 y/o BDNF.

En algunas realizaciones, los anticuerpos o péptidos de la invención pueden inhibir (reducir y/o bloquear) la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI50 (en presencia de NGF aproximadamente 15 pM) de aproximadamente cualquiera de 200 pM, 150 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 20 pM, 10 pM o menos. En algunas realizaciones, los anticuerpos o péptidos de la invención pueden inhibir (reducir y/o bloquear) la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI50 (en presencia de NGF aproximadamente 1,5 pM) de aproximadamente cualquiera de 50 pM, 40 pM, 30 pM, 10 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, 2 pM, 1 pM; o menos. En algunas realizaciones, los anticuerpos o péptidos de la invención pueden inhibir (reducir y/o bloquear) la supervivencia dependiente de NGF de rata de las neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI50 (en presencia de NGF aproximadamente 15 pM) de aproximadamente cualquiera de 150 pM, 125 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 30 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM o menos. En algunas realizaciones, los anticuerpos o péptidos de la invención pueden inhibir (reducir y/o bloquear) la supervivencia dependiente de NGF de rata de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI50 (en presencia de NGF aproximadamente 1,5 pM) de aproximadamente cualquiera de 30 pM, 25 pM, 20 pM, 15 pM, 10 pM, 5 pM, 4 pM, 3 pM, 2 pM, 1 pM o menos. Se conocen en la técnica procedimientos para medición de la supervivencia dependiente de NGF de neuronas trigeminales E13 de ratón y se describen, por ejemplo en el Ejemplo 2.

La divulgación también proporciona procedimientos para preparar cualquiera de estos anticuerpos o polipéptidos. Los anticuerpos de la presente invención pueden prepararse por procedimientos conocidos en la técnica, algunos de los cuales se ilustran en los Ejemplos. Los polipéptidos pueden producirse por degradación proteolítica u otra de los anticuerpos, por procedimientos recombinantes (es decir, polipéptidos sencillos o de fusión) como se ha descrito anteriormente o por síntesis química. Los polipéptidos de los anticuerpos, especialmente polipéptidos más cortos hasta aproximadamente 50 aminoácidos, se preparan convenientemente por síntesis química. Se conocen en la técnica procedimientos de síntesis química y están disponibles en el mercado. Por ejemplo, podría producirse un anticuerpo E3 por un sintetizador de polipéptidos automático empleando el procedimiento de fase sólida. Véase también, Patente de Estados Unidos N° 5.807.715; 4.816.567; y 6.331.415. También pueden prepararse anticuerpos quiméricos o híbridos *in vitro* usando procedimientos conocidos de química de proteínas sintéticas, incluyendo los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

En otra alternativa, los anticuerpos pueden prepararse de forma recombinante usando procedimientos que se conocen bien en la técnica. En una realización, se clona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica las reacciones de cadena variable y ligera del anticuerpo E3 (mostradas en las Figuras 1A y 1B) en un vector para expresión o propagación en una célula huésped (por ejemplo, células CHO). En otra realización, las secuencias polinucleotídicas mostradas en las Figuras 2 y 3 se clonan en uno o más vectores para expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse en un vector en una célula huésped y la célula huésped puede después expandirse y congelarse para su uso futuro. Se describen adicionalmente en el presente documento vectores (incluyendo vectores de expresión) y células huésped. Se han desvelado procedimientos para expresar anticuerpos de forma recombinante en plantas o leche. Véase, por ejemplo, Peeters y col. (2001) Vaccine 19: 2756; Lonberg, N. y D. Huszar (1995) Int.Rev.Immunol 13: 65; y Pollock y col. (1999) J Immunol Methods 231: 147. Se conocen en la técnica procedimientos para preparar derivados de anticuerpos, por ejemplo, humanizados, cadena sencilla, etc.

La invención también abarca fragmentos de región variable de cadena sencilla ("scFv") de anticuerpos de la presente invención, tales como E3. Se preparan fragmentos de región variable de cadena sencilla ligando regiones variables de cadena ligera y/o pesada usando un péptido de enlace corto. Bird y col. (1988) Science 242: 423-426. Un ejemplo de un péptido de enlace es (GGGGS)<sub>3</sub> (SEC ID N° 15), que salva una distancia de aproximadamente 3,5 nm entre el extremo carboxilo terminal de una región variable y el extremo amino terminal de la otra región variable. Se han diseñado y usado engarces de otras secuencias (Bird y col. (1988)). Los engarces pueden a su vez modificarse para funciones adicionales tales como unión de fármacos o unión a soportes sólidos. Las variantes de cadena sencilla pueden producirse de forma recombinante o sintética. Para producción sintética de scFv, puede usarse un sintetizador automático. Para producción recombinante de scFv, puede introducirse un plásmido

5 adecuado que contenga polinucleótido que codifique el scFv en una célula huésped adecuada, eucariota, tal como células de levadura, vegetales, de insecto o de mamífero, o procarionta, tal como *E. coli*. Los polinucleótidos que codifican el scFv de interés pueden prepararse por manipulaciones rutinarias tales como ligación de polinucleótidos. El scFv resultante puede aislarse usando técnicas de purificación de proteínas convencionales conocidas en la materia.

10 También se abarcan otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos en los que se expresan dominios VH y VL en una cadena polipeptídica sencilla, pero usando un engarce que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de este modo a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P., y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R. J., y col. (1994) Structure 2: 1121-1123).

15 El anticuerpo puede ser un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo monoclonal que tiene especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. Un anticuerpo biespecífico puede prepararse usando los anticuerpos desvelados en el presente documento. Se conocen en la técnica procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo Suresh y col., 1986, Methods in Enzymology 121: 210). Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basó en la co-expresión de dos pares de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina, teniendo las dos cadenas pesadas diferentes especificidades (Millstein y Cuello, 1983, Nature 305, 537-539).

20 De acuerdo con un enfoque para preparar anticuerpos biespecíficos, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferentemente está con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene sitio necesario para unión a cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Se insertan ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, en vectores de expresión separados, y se co-transfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones cuando las relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es, sin embargo, posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las relaciones no son de importancia particular.

35 En un enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en una rama y un par de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina híbrida (que proporcionan una segunda especificidad de unión) en la otra rama. Esta estructura asimétrica, con una cadena ligera de inmunoglobulina solo en una mitad de la molécula biespecífica, facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas. Este enfoque se describe en la Publicación de PCT N° WO 94/04690, publicada el 3 de marzo de 1994.

40 Los anticuerpos heteroconjugados, que comprenden dos anticuerpos unidos covalentemente, también están dentro del alcance de la invención. Tales anticuerpos se han usado para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de Estados Unidos N° 4.676.980) y para tratamiento de infección por VIH (publicación de solicitud de PCT N° WO 91/00360 y WO 92/200373; documento EP 03089). Pueden prepararse anticuerpos heteroconjugados usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Se conocen bien en la materia agentes y técnicas de reticulación adecuados, y se describen en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980.

45 El anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado, por ejemplo, como se conoce en la técnica, y como se describe en el presente documento.

50 Los anticuerpos pueden modificarse como se describe en la Publicación de PCT N° WO 99/58572, publicada el 18 de noviembre de 1999. Estos anticuerpos comprenden, además de un dominio de unión dirigido a la molécula diana, un dominio efector que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga de todo o parte de un dominio constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. Estos anticuerpos son capaces de unirse a la molécula diana sin desencadenar lisis dependiente de complementos significativa o destrucción mediada por células de la diana. Preferentemente, el dominio efector es capaz de unirse específicamente a FcRn y/o FcγRIIb. Estos se basan típicamente en dominios quiméricos derivados de dos o más dominios CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina humanos. Se prefieren anticuerpos modificados de esta manera para su uso en terapia de anticuerpos crónica, para evitar reacciones inflamatorias u otras adversas a terapia de anticuerpos convencional.

55 La invención abarca modificaciones del anticuerpo E3, incluyendo anticuerpos funcionalmente equivalentes que no afectan de forma significativa a sus propiedades y variantes que tienen actividad potenciada o reducida. La modificación de polipéptidos es práctica rutinaria en la técnica y se ejemplifica adicionalmente en los Ejemplos. Los ejemplos de polipéptidos modificados incluyen polipéptidos con sustituciones (incluyendo sustituciones conservativas) de restos de aminoácidos, una o más deleciones o adiciones de aminoácidos que no cambian de

forma significativamente deletérea la actividad funcional o uso de análogos químicos.

Una "variante" polipeptídica, como se usa en el presente documento, es un polipéptido que difiere de una proteína nativa en una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones, de modo que la inmunorreactividad del polipéptido no se reduce sustancialmente. En otras palabras, la capacidad de una variante para unirse específicamente a antígeno puede potenciarse o no cambiarse, en relación con la proteína nativa, o puede reducirse en menos del 50 % y preferentemente menos del 20 %, en relación con la proteína nativa. Las variantes polipeptídicas preferentemente muestran al menos aproximadamente 80 %, más preferentemente al menos aproximadamente 90 % y más preferentemente al menos aproximadamente 95 % de identidad (determinada como se describe en el presente documento) con los polipéptidos identificados.

Pueden prepararse variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN del anticuerpo o por síntesis peptídica. Tales variantes incluyen, por ejemplo, deleciones de, inserciones en y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos de SEC ID N° 1 o 2 descritas en el presente documento. Cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución se realiza para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos post-traduccionales del anticuerpo, tales como cambiar el número o posición de sitios de glucosilación.

Un procedimiento útil para identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para mutagénesis o modificación se denomina "mutagénesis de exploración de alanina" y se describe por Cunningham y Wells, 1989, Science, 244: 1081-1085. Se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplaza por un aminoácido cargado negativo o neutro (más preferentemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Las localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan después introduciendo variaciones adicionales u otras en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación en sí misma no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar la realización de una mutación en un sitio dado, se realiza mutagénesis aleatoria o exploración de alanina en el codón o región diana y las variantes de anticuerpo expresado se exploran con respecto a la actividad deseada. También puede usarse mutagénesis de exploración de bibliotecas, como se describe en el presente documento, para identificar localizaciones en un anticuerpo que sean adecuadas para mutagénesis o modificación.

Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminal que varían en longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos sencillos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto de metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado con un marcador epitópico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión con el extremo N- o C-terminal del anticuerpo de una enzima o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

Las variantes de sustitución tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo retirado y un resto diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Se muestran sustituciones conservativas en la Tabla 1 bajo el encabezamiento "sustituciones conservativas". Si tales sustituciones dan como resultado un cambio de la actividad biológica, entonces pueden introducirse más cambios sustanciales denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 1, o como se describe adicionalmente posteriormente en referencia a clases de aminoácidos, y pueden explorarse los productos.

Tabla 1: Sustituciones de aminoácidos

Resto original	Sustituciones conservativas	Sustituciones ejemplares
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala

(continuación)

His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina
Leu (L)	Ile	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

Se consiguen modificaciones sustanciales de las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto en el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basándose en las propiedades de cadena lateral comunes:

5

(1) Hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) Hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr;

(3) Ácidos: Asp, Glu;

(4) Básicos: Asn, Gln, His, Lys, Arg;

10

(5) Restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y

(6) Aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Se realizan sustituciones no conservativas intercambiando un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo, también puede sustituirse, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar reticulación aberrante. Por el contrario, puede añadirse enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad, particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv.

15

Las modificaciones de aminoácidos pueden variar de cambiar o modificar uno o más aminoácidos a rediseño completo de una región, tal como la región variable. Los cambios en la región variable pueden alterar la afinidad de unión y/o especificidad. En alguna realización, se realizan no más de una a cinco sustituciones de aminoácidos conservativas dentro de un dominio CDR. En otras realizaciones, se realizan no más de una a tres sustituciones de aminoácidos conservativas dentro de un dominio CDR3. En otras realizaciones más, el dominio CDR es CDRH3 y y/o CDR L3.

20

Las modificaciones también incluyen polipéptidos glucosilados y no glucosilados, así como polipéptidos con otras modificaciones post-traduccionales, tales como, por ejemplo, glucosilación con diferentes azúcares, acetilación y fosforilación. Los anticuerpos se glucosilan en posiciones conservadas en sus regiones constantes (Jefferis y Lund, 1997, Chem. Immunol. 65: 111-128; Wright y Morrison, 1997, TibTECH 15: 26-32). Las cadenas laterales de oligosacáridos de las inmunoglobulinas afectan a la función de la proteína (Boyd y col., 1996, Mol. Immunol. 32: 1311-1318; Wittwe y Howard, 1990, Biochem. 29:4175-4180) y la interacción intramolecular entre partes de la glucoproteína, que puede afectar a la conformación y superficie tridimensional presentada de la glucoproteína (Hefferis y Lund, mencionado anteriormente; Wyss y Wagner, 1996, Current Opin. Biotech. 7: 409-416). Los oligosacáridos también pueden actuar para dirigir una glucoproteína dada a ciertas moléculas basándose en estructuras de reconocimiento específicas. También se ha indicado que la glucosilación de anticuerpo afecta a citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En particular, se ha indicado que células CHO con expresión regulada por tetraciclina de  $\beta$  (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de GlcNAc de bisección, han mejorado la actividad de ADCC (Umana y col., 1999, Mature Biotech. 17: 176-180).

30

35

La glucosilación de anticuerpo está típicamente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento de unión enzimática del resto de carbohidrato con la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de una de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa con un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxi prolina o 5-hidroxi lisina.

La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también puede realizarse por la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

El patrón de glucosilación de anticuerpos también puede alterarse sin alterar la secuencia de nucleótidos subyacente. La glucosilación depende en gran medida de la célula huésped usada para expresar el anticuerpo. Puesto que el tipo de célula usado para expresión de glucoproteínas recombinantes, por ejemplo anticuerpos, como agentes terapéuticos potenciales en pocas ocasiones es una célula nativa, pueden esperarse variaciones en el patrón de glucosilación de los anticuerpos (véase, por ejemplo, Hse y col., 1997, J. Biol. Chem. 272: 9062-9070).

Además de la selección de células huésped, los factores que afectan a glucosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen modo de crecimiento, formulación de medio, densidad de cultivo, oxigenación, pH, esquemas de purificación y similares. Se han propuestos diversos procedimientos para alterar el patrón de glucosilación conseguido en un organismo huésped particular incluyendo introducción o sobreexpresión de ciertas enzimas implicadas en producción de oligosacáridos (Patente de Estados Unidos N° 5.047.335; 5.510.261 y 5.278.299). La glucosilación, o ciertos tipos de glucosilación, puede retirarse enzimáticamente de la glucoproteína, por ejemplo usando endoglucosidasa H (Endo H). Además, la célula huésped recombinante puede modificarse por ingeniería genética para ser deficiente en el procesamiento de ciertos tipos de polisacáridos. Estas y técnicas similares se conocen bien en la materia.

Otros procedimientos de modificación incluyen usar técnicas de acoplamiento conocidas en la materia, incluyendo, pero sin limitación, medios enzimáticos, sustitución oxidativa y quelación. Pueden usarse modificaciones, por ejemplo, para unión de marcadores para inmunoensayo. Se preparan polipéptidos E3 modificados usando procedimientos establecidos en la técnica y pueden explorarse usando ensayos convencionales conocidos en la materia, algunos de los cuales se describen posteriormente y en los Ejemplos.

Otras modificaciones de anticuerpos incluyen anticuerpos que se han modificado como se describe en la Publicación de PCT WO 99/58572, publicada el 18 de noviembre de 1999. Estos anticuerpos comprenden, además de un dominio de unión dirigido a la molécula diana, un dominio efector que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga de todo o parte de un dominio constante de una cadena pesada de inmunoglobulina humana. Estos anticuerpos son capaces de unirse a la molécula diana sin desencadenar lisis de complemento significativa o destrucción mediada por células de la diana. En algunas realizaciones, el dominio efector es capaz de unirse específicamente a FcRn y/o FcγRIIb. Estos se basan típicamente en dominios quiméricos derivados de dos o más dominios CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos modificados de esta manera son particularmente adecuados para su uso en terapia de anticuerpos crónica, para evitar reacciones inflamatorias y otras reacciones adversas a terapia de anticuerpos convencional.

La invención también abarca proteínas de fusión que comprenden uno o más fragmentos o regiones de los anticuerpos (tales como E3) o polipéptidos de la presente invención. En una realización, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de la región variable de cadena ligera mostrada en la Figura 1B y/o al menos 10 aminoácidos de la región variable de cadena pesada mostrada en la Figura 1A. En otra realización, el polipéptido de fusión comprende una región variable de cadena ligera y/o una región variable de cadena pesada de E3, como se muestra en las Figuras 1A y 1B. En otra realización, el polipéptido de fusión comprende una o más CDR de E3. En otras realizaciones más, el polipéptido de fusión comprende CDR H3 y/o CDR L3 del anticuerpo E3. En otra realización, el polipéptido de fusión comprende uno cualquiera o más de: resto de aminoácido L29 de CDRH1, I50 de CDRH2, W101 de CDRH3 y/o A103 de CDRH3; y/o resto de aminoácido S28 de CDRL1, N32 de CDRL1, T51 de CDRL2, 91E de CDRL3 y/o H92 de CDRL3. Para los fines de la presente invención, una proteína de fusión E3 contiene uno o más anticuerpos E3 y otra secuencia de aminoácidos con la que no está unida en la molécula nativa, por ejemplo, una secuencia heteróloga o una secuencia homóloga de otra región. Las secuencias heterólogas ejemplares incluyen, pero sin limitación, un "marcador" tal como un marcador FLAG o un marcador 6His. Los marcadores se conocen bien en la técnica.

Un polipéptido de fusión de E3 puede crearse por procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, de forma sintética o recombinante. Típicamente, las proteínas de fusión de E3 de la presente invención se realizan preparando y expresando un polinucleótido que las codifica usando procedimientos recombinantes descritos en el presente documento, aunque también pueden prepararse por otros medios conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, síntesis química.

La presente invención también proporciona composiciones que comprenden anticuerpos o polipéptidos E3 conjugados (por ejemplo, ligados) con un agente que facilita el acoplamiento a un soporte sólido (tal como biotina o avidina). Para simplificar, generalmente se hará referencia a E3 o a anticuerpos con el entendimiento de que estos procedimientos se aplican a cualquiera de las realizaciones de unión a NGF descritas en el presente documento. La conjugación se refiere en general a ligar estos componentes como se describe en el presente documento. La ligación (que es generalmente fijar estos componentes en asociación próxima al menos para la administración) puede conseguirse de cualquiera de varias maneras. Por ejemplo, es posible una reacción directa entre un agente y un anticuerpo cuando cada uno posee un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleófilo, tal como un grupo amino o sulfhidrilo, en uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, tal como un anhídrido o un haluro de ácido, o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo saliente (por ejemplo, un haluro) en el otro.

Un anticuerpo o polipéptido de la presente invención puede ligarse a un agente de marcaje (denominado como alternativa "marcador") tal como una molécula fluorescente, una molécula radiactiva o cualquier otro marcador conocido en la técnica. Se conocen en la técnica marcadores que generalmente proporcionan (directa o indirectamente) una señal. En consecuencia, la invención incluye anticuerpos y polipéptidos marcados.

Las capacidades de los anticuerpos y polipéptidos de la presente invención, tal como unión de NGF; reducción o inhibición de una actividad biológica de NGF; o reducción y/o bloqueo de la supervivencia inducida por NGF de neuronas trigeminales de ratón E13.5, pueden ensayarse usando procedimientos conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en los ejemplos.

La invención también proporciona composiciones (incluyendo composiciones farmacéuticas) y kits que comprenden anticuerpo E3 y, como aclara la presente divulgación, todos y cada uno de los anticuerpos y/o polipéptidos descritos en el presente documento.

#### *Polinucleótidos, vectores y células huésped*

La divulgación también proporciona polinucleótidos aislados que codifican los anticuerpos y polipéptidos de la invención (incluyendo un anticuerpo que comprende las secuencias polipeptídicas de las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada mostradas en las Figuras 1A y 1B) y vectores y células huésped que comprenden el polinucleótido.

En consecuencia, la divulgación proporciona polinucleótidos (o composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas) que comprenden polinucleótidos que codifican cualquiera de los siguientes: (a) anticuerpo E3; (b) un fragmento o una región del anticuerpo E3; (c) una cadena ligera del anticuerpo E3 como se muestra en las Figuras 1B; (d) una cadena pesada del anticuerpo E3 como se muestra en la Figura 1A; (e) una o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo E3; (f) una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR) del anticuerpo E3 mostrado en las Figuras 1A y 1B; (g) CDR H3 de la cadena pesada del anticuerpo E3 mostrada en la Figura 1A; (h) CDR L3 de la cadena ligera del anticuerpo E3 mostrada en la Figura 1B; (i) tres CDR de la cadena ligera del anticuerpo E3 mostradas en la Figura 1B; (j) tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo E3 mostradas en la Figura 1A; (k) tres CDR de la cadena ligera y tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo E3 mostradas en las Figuras 1A y 1B; o (l) un anticuerpo que comprende cualquiera de (b) a (k). En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende uno o los dos polinucleótidos mostrados en las Figuras 2 y 3.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un polinucleótido aislado que codifica una cadena ligera de E3 con un número de depósito de ATCC número PTA-4893 o ATCC número PTA-4894. En otro aspecto, la divulgación proporciona un polinucleótido aislado que codifica una cadena pesada de E3 con un número de depósito de ATCC número PTA-4895. En otro aspecto más, la divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende (a) una región variable codificada en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC número PTA-4894 y (b) una región variable codificada en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC número PTA-4895. En otro aspecto, la divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende (a) una o más CDR codificadas en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC número PTA-4894; y/o (b) una o más CDR codificadas en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC número PTA-4895.

En otro aspecto, la divulgación proporciona polinucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpo) y polipéptidos descritos en el presente documento. Pueden prepararse polinucleótidos por procedimientos conocidos en la técnica.

En otro aspecto, la divulgación proporciona composiciones (tales como una composición farmacéutica) que comprenden cualquiera de los polinucleótidos de la invención. En algunas realizaciones, la composición comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo E3 como se describe en el presente documento. En otra realización, la composición comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos descritos en el presente documento. En otras realizaciones más, la composición comprende uno o los dos polinucleótidos mostrados en las Figuras 2 y 3. Se describen adicionalmente en el presente documento vectores de expresión, y la administración de composiciones de polinucleótidos.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para preparar cualquiera de los polinucleótidos descritos en el presente documento.

También están abarcados por la presente invención polinucleótidos complementarios a cualquiera de tales secuencias. Los polinucleótidos pueden ser monocatenarios (codificantes o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o ARN. Las moléculas de ARN incluyen moléculas de ARNHn, que contienen intrones y corresponden a una molécula de ADN una a una, y moléculas de ARNm, que no contienen intrones. Las secuencias codificantes o no codificantes adicionales pueden, pero no necesitan, estar presentes dentro de un polinucleótido de la presente invención, y un polinucleótido puede, pero no necesita, estar ligado a otras moléculas y/o materiales de soporte.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un anticuerpo o una parte del mismo) o pueden comprender una variante de dicha secuencia. Las variantes polinucleotídicas contienen una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones de modo que no disminuya la inmunorreactividad del polipéptido codificado, en relación con una molécula inmunorreactiva nativa. El efecto del polipéptido codificado sobre la inmunorreactividad puede evaluarse generalmente como se describe en el presente documento. Las variantes muestran preferentemente al menos aproximadamente un 70 % de identidad, más preferentemente al menos aproximadamente un 80 % de identidad y aún más preferentemente al menos aproximadamente un 90 % de identidad con una secuencia polinucleotídica que codifica un anticuerpo nativo o una parte del mismo.

Se dice que dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para conseguir la máxima correspondencia como se describe posteriormente. Las comparaciones entre dos secuencias se realizan típicamente comparando las secuencias sobre una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, habitualmente de 30 a aproximadamente 75, de 40 a aproximadamente 50, en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alineen de forma óptima.

El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede realizarse usando el programa Megalign en el grupo de software bioinformático Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, WI), usando parámetros por defecto. Este programa incorpora varios esquemas de alineamiento descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. En Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Supl. 3, págs. 345-358; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenesis págs. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. y Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. and Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. y Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.

Preferentemente, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias alineadas de forma óptima sobre una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, pudiendo comprender la parte de la secuencia polinucleotídica o polipeptídica en la ventana de comparación adiciones o deleciones (es decir, huecos) de un 20 por ciento o menos, habitualmente de un 5 a un 15 por ciento, o de un 10 a un 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones o deleciones) para alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que las bases de ácido nucleico o restos de aminoácido idénticos aparecen en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de ventana) y multiplicando los resultados por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

Las variantes pueden también, o como alternativa, ser sustancialmente homólogas a un gen nativo; o una parte o complemento del mismo. Tales variantes de polinucleótidos son capaces de hibridar en condiciones moderadamente rigurosas con una secuencia de ADN de origen natural que codifica un anticuerpo nativo (o una secuencia complementaria).

Las condiciones "moderadamente rigurosas" adecuadas incluyen prelavado en una solución de SSC 5 X, SDS 0,5 %, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); hibridación a 50 °C-65 °C, SSC 5 X, durante una noche; seguido de lavado dos veces a 65 °C durante 20 minutos con cada uno de SSC 2 X 0,5 X y 0,2 X que contienen SDS 0,1 %.

Como se usan en el presente documento, "condiciones altamente rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad" son las que: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para lavar, por ejemplo cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico 0,1 % a 50 °C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50 % (v/v) con albúmina de suero bovino 0,1 %/Ficoll 0,1 %/polivinilpirrolidona 0,1 %/tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato

sódico 75 mM a 42 °C; o (3) emplean formamida al 50 %, SSC 5 X (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico 0,1 %, solución de Denhardt 5 X, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS 0,1 % y dextrán sulfato 10 % a 42 °C, con lavados a 42 °C en SSC 0,2 X (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50 % a 55 °C, seguido de un lavado de alta rigurosidad que consiste en SSC 0,1 X que contiene EDTA a 55 °C. El experto en la materia reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc., según sea necesario para adaptarse a factores tales como longitud de la sonda y similares.

Se apreciará por los expertos en la materia que, como resultado de la degeneración del código genético, existen muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido como se describe en el presente documento. Algunos de estos polinucleótidos portan mínima homología con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. No obstante, la presente divulgación contempla específicamente polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso codónico. Además, dentro del alcance de la presente invención se incluyen alelos de los genes que comprenden las secuencias polinucleotídicas proporcionadas en el presente documento. Los alelos son genes endógenos que se alteran como resultado de una o más mutaciones, tales como deleciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El ARNm y proteína resultantes pueden, pero no necesitan, tener una estructura o función alterada. Los alelos pueden identificarse usando técnicas convencionales (tales como hibridación, amplificación y/o comparación de secuencias de bases de datos).

Los polinucleótidos de la presente divulgación pueden obtenerse usando síntesis química, procedimientos recombinantes o PCR. Se conocen bien en la técnica procedimientos de síntesis química de polinucleótidos y no es necesario describirlos en detalle en el presente documento. Un experto en la materia puede usar las secuencias proporcionadas en el presente documento y un sintetizador de ADN comercial para producir una secuencia de ADN deseada.

Para preparar polinucleótidos usando procedimientos recombinantes, puede insertarse un polinucleótido que comprende una secuencia deseada en un vector adecuado, y el vector a su vez puede introducirse en una célula huésped adecuada para replicación y amplificación, como se analiza adicionalmente en el presente documento. Pueden insertarse polinucleótidos en células huésped por cualquier medio conocido en la técnica. Las células se transforman introduciendo un polinucleótido exógeno por captación directa, endocitosis, transfección, acoplamiento de F o electroporación. Una vez introducido, el polinucleótido exógeno puede mantenerse dentro de la célula como un vector no integrado (tal como un plásmido) o integrarse en el genoma de la célula huésped. El polinucleótido amplificado de este modo puede aislarse de la célula huésped por procedimientos bien conocidos dentro de la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col (1989).

Como alternativa, la PCR permite la reproducción de secuencias de ADN. La tecnología de PCR se conoce bien en la técnica y se describe en las patentes de Estados Unidos N° 4.683.195, 4.800.159, 4.754.065 y 4.683.202, así como PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis y col. eds., Birkaswer Press, Boston (1994).

Puede obtenerse ARN usando el ADN aislado en un vector apropiado e insertándolo en una célula huésped adecuada. Cuando la célula se replica y el ADN se transcribe a ARN, el ARN puede después aislarse usando procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia, como se expone en Sambrook y col., (1989), por ejemplo.

Pueden construirse vectores de clonación adecuados de acuerdo con técnicas convencionales o pueden seleccionarse de un gran número de vectores de clonación disponibles en la técnica. Aunque el vector de clonación seleccionado puede variar de acuerdo con la célula huésped que se pretende usar, los vectores de clonación útiles generalmente tendrán la capacidad de autorreplicarse, pueden poseer una sola diana para una endonucleasa de restricción particular y/o pueden portar genes para un marcador que pueden usarse en la selección de clones que contienen el vector. Los ejemplos adecuados incluyen plásmidos y virus bacterianos, por ejemplo, pUC18, pUC19, Bluescript (por ejemplo, pBS SK+) y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColEI, pCR1, RP4, ADN de fagos y vectores lanzadera tales como pSA3 y pAT28. Estos y muchos otros vectores de clonación están disponibles en proveedores comerciales tales como BioRad, Strategene e Invitrogen.

Los vectores de expresión generalmente son construcciones polinucleotídicas replicables que contienen un polinucleótido de acuerdo con la invención. Se supone que un vector de expresión debe ser replicable en las células huésped como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico. Los vectores de expresión adecuados incluyen, pero sin limitación, plásmidos, vectores virales, incluyendo adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, cósmidos y uno o más vectores de expresión desvelados en la publicación de PCT N° WO 87/04462. Los componentes de vector pueden incluir generalmente, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal; un origen de replicación; uno o más genes marcadores; elementos de control de la transcripción adecuados (tales como promotores, potenciadores y terminador). Para la expresión (es decir, traducción), también se requieren habitualmente uno o más elementos controladores de la traducción, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de inicio de la traducción y codones de parada.

Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés pueden introducirse en la célula huésped por cualquiera de varios medios apropiados, incluyendo electroporación, transfección empleando cloruro cálcico, cloruro de rubidio, fosfato cálcico, DEAE-dextrano u otras sustancias; bombardeo de microproyectiles; lipofección; e infección (por

ejemplo, en la que el vector es un agente infeccioso tal como virus vaccinia). La elección de introducir vectores o polinucleótidos con frecuencia depende de las características de la célula huésped.

La divulgación también proporciona células huésped que comprenden cualquiera de los polinucleótidos descritos en el presente documento. Puede usarse cualquier célula huésped capaz de sobreexpresar ADN heterólogos para el fin de aislar los genes que codifican el anticuerpo, polipéptido o proteína de interés. Los ejemplos no limitantes de células huésped de mamífero incluyen, pero sin limitación, células COS, HeLa y CHO. Véase también la publicación de PCT N° WO 87/04462. Las células huésped que no son de mamífero adecuadas incluyen procariotas (tales como *E. coli* o *B. subtilis*) y levadura (tales como *S. cerevisiae*, *S. pombe*; o *K. lactis*). Preferentemente, las células huésped expresan los ADNc a un nivel de aproximadamente 5 veces más alto, más preferentemente 10 veces más alto, incluso más preferentemente 20 veces más alto que el del anticuerpo endógeno correspondiente o proteína de interés, si está presente, en las células huésped. La exploración de las células huésped con respecto a una unión específica con NGF se efectúa por un inmunoensayo o FACS. Puede identificarse una célula que sobreexpresa el anticuerpo o proteína de interés.

#### *Procedimientos que usan anticuerpos E3 y derivados de E3*

El anticuerpo E3 que se une a NGF puede usarse para identificar o detectar la presencia o ausencia de NGF. Para simplificar, se hará referencia en general a E3 o anticuerpos con el entendimiento de que estos procedimientos se aplican a cualquiera de las realizaciones de unión a NGF (tales como polipéptidos) descritas en el presente documento. La detección generalmente implica poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo descrito en el presente documento que se une a NGF y la formación de un complejo entre NGF y un anticuerpo (por ejemplo, E3) que se une específicamente a NGF. La formación de dicho complejo puede ser *in vitro* o *in vivo*. El término "detección", como se usa en el presente documento, incluye detección cualitativa y/o cuantitativa (medición de niveles) con o sin referencia a un control.

Puede usarse cualquiera de una diversidad de procedimientos conocidos para detección, incluyendo, pero sin limitación, inmunoensayo, usando un anticuerpo que se une al polipéptido, por ejemplo, por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y similares; y ensayo funcional para el polipéptido codificado, por ejemplo, actividad de unión o ensayo enzimático. En algunas realizaciones, el anticuerpo se marca de forma detectable.

#### *Uso para el diagnóstico del E3 y derivados*

Los anticuerpos y polipéptidos de la invención pueden usarse en la detección, diagnóstico y control de una enfermedad, afección o trastorno asociado con una expresión de NGF alterada o aberrante (en algunas realizaciones, aumento o reducción de la expresión de NGF (en relación con una muestra normal) y/o expresión inapropiada, tal como presencia de expresión en uno o más tejidos y/o células que normalmente carecen de expresión de NGF, o ausencia de expresión de NGF en uno o más tejidos o células que normalmente poseen expresión de NGF). Los anticuerpos y polipéptidos de la invención son útiles además para la detección de la expresión de NGF, por ejemplo, en una enfermedad asociada con sensibilidad o respuesta a NGF alterada o aberrante. En algunas realizaciones, se detecta expresión de NGF en una muestra de un individuo sospechoso de tener una enfermedad, trastorno que presenta o está asociado con una sensibilidad o respuesta a la expresión de NGF alterada o aberrante (por ejemplo, un cáncer en el que NGF promueve el crecimiento y/o metástasis).

Por lo tanto, en algunas realizaciones, la divulgación proporciona procedimientos que comprenden poner en contacto una muestra de ensayo (muestra) de un individuo sospechoso de tener expresión de NGF alterada o aberrante con un anticuerpo o polipéptido de la invención y determinar si el nivel de NGF difiere del de una muestra de ensayo de control o comparación. En algunas realizaciones, el individuo tiene una arritmia cardíaca, enfermedad de Alzheimer y/o disfunción autónoma.

En otras realizaciones, la divulgación proporciona procedimientos que comprenden poner en contacto una muestra de ensayo (muestra) de un individuo y determinar el nivel de expresión de NGF. En algunas realizaciones, el individuo es sospechoso de tener una enfermedad, trastorno que presenta o está asociado con una sensibilidad o respuesta a expresión de NGF alterada o aberrante. En algunas realizaciones, el individuo tiene cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de pancreático, cáncer de próstata, carcinoma de ovario, carcinoma hepatocelular o melanoma.

Para aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo típicamente estará marcado con un resto detectable incluyendo, pero sin limitación, radioisótopos, marcadores fluorescentes y diversos marcadores de sustratos enzimáticos. Se conocen en la técnica procedimientos para conjugar marcadores con un anticuerpo. En otra realización de la invención, no se necesita marcar los anticuerpos de la invención, y la presencia de los mismos puede detectarse usando un anticuerpo marcado que se une a los anticuerpos de la invención.

Los anticuerpos de la presente invención pueden emplearse en cualquier procedimiento de ensayo conocido, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directo e indirecto y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, págs.147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

Los anticuerpos también pueden usarse para ensayos de diagnóstico *in vivo*, tales como captura de imágenes *in vivo*. En general, el anticuerpo se marca con un radionúclido (tal como  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$  o  $^3\text{H}$ ) de modo que las células o tejidos de interés pueden localizarse usando inmunoescintigrafía.

5 El anticuerpo también puede usarse como reactivo de tinción en patología, siguiendo técnicas bien conocidas en este campo.

#### *Procedimientos para usar E3 y derivados para fines terapéuticos*

10 El anticuerpo E3 es útil para reducir y/o bloquear la actividad biológica de NGF. Se cree que esta actividad antagonista es útil en el tratamiento de afecciones patológicas asociadas con producción de NGF endógeno, tales como dolor. En general, en estas realizaciones se administra una cantidad eficaz a un individuo. En consecuencia, en un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para antagonizar la actividad biológica de NGF humano usando cualquiera de los polipéptidos (incluyendo anticuerpos tales como anticuerpos E3) desvelados en el presente documento. En una realización, el procedimiento comprende poner en contacto el factor de crecimiento nervioso humano con cualquiera de los polipéptidos (incluyendo anticuerpo E3) descritos en el presente documento, con lo que la actividad del factor de crecimiento nervioso humano se antagoniza, reduce, bloquea o suprime. En otra realización más, se proporciona a un individuo con dolor (tal como dolor post-quirúrgico o dolor de artritis reumatoide) tratamiento con E3.

15 Para simplificar, en general se hará referencia a E3 o a anticuerpo con el entendimiento de que estos procedimientos se aplican a cualquiera de los anticuerpos variantes de E3 y polipéptidos descritos en el presente documento.

20 Para la administración, pueden usarse diversas formulaciones de E3 o fragmentos de E3 (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fc, etc.), tales como fragmentos monocatenarios (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo y cualquier otra configuración modificada de E3 que comprenda un sitio de reconocimiento de NGF de antígeno de la especificidad requerida. En algunas realizaciones, pueden administrarse anticuerpos E3 o diversas formulaciones de E3 de los mismos en estado puro. En otras realizaciones, se administra E3 o diversas formulaciones de E3 (incluyendo cualquier realización de composición descrita en el presente documento) de los mismos y un excipiente farmacéuticamente aceptable, y pueden estar en diversas formulaciones. Se conocen en la técnica excipientes farmacéuticamente aceptables y son sustancias relativamente inertes que facilitan la administración de una sustancia farmacológicamente eficaz. Por ejemplo, un excipiente puede dar forma o consistencia, o actuar como un diluyente. Los excipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, agentes de estabilización, agentes humectantes y emulsionantes, sales para variar la osmolaridad, agentes de encapsulación, tampones y potenciadores de la penetración de la piel. Se exponen excipientes así como formulaciones para administración de fármaco parenteral y no parenteral en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20<sup>a</sup> Ed. Mack Publishing (2000).

35 En algunas realizaciones, estos agentes se formulan para administración por inyección (por ejemplo, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intramuscular, etc.), aunque también pueden usarse otras formas de administración (por ejemplo, oral, mucosa, mediante inhalación, por vía sublingual, etc.). En consecuencia, el anticuerpo E3 y sus equivalentes se combinan preferentemente con vehículos farmacéuticamente aceptables tales como solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y similares. El régimen de dosificación particular, es decir, la dosis, temporización y repetición, dependerá del individuo particular y la historia médica de ese individuo. En general, puede usarse cualquiera de las siguientes dosis: se administra una dosis de al menos aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 750 µg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 500 µg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 250 µg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 50 µg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 10 µg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 1 µg/kg de peso corporal o menos. Para administraciones repetidas durante varios días o más largas, dependiendo de la afección, el tratamiento se prolonga hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Un régimen de dosificación ejemplar comprende administrar una dosis inicial de aproximadamente 2 mg/kg seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 1 mg/kg del anticuerpo anti-NGF, o seguida de una dosis de mantenimiento de aproximadamente 1 mg/kg cada dos semanas. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación, dependiendo del patrón de desintegración farmacocinética que el facultativo desee conseguir. Las consideraciones empíricas, tales como la semivida, generalmente contribuirán a la determinación de la dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

55 En algunos individuos, puede requerirse más de una dosis. La frecuencia de administración puede determinarse y ajustarse a lo largo del ciclo de terapia. Por ejemplo, la frecuencia de administración puede determinarse o ajustarse basándose en el tipo y gravedad del dolor que va a tratarse, si el agente se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al agente, y la discreción del médico a cargo. Típicamente, el médico administrará un anticuerpo antagonista anti-NGF (tal como E3), hasta que se alcance una dosificación que consiga el resultado deseado. En algunos casos, pueden ser apropiadas las formulaciones de

60

liberación continua prolongada de anticuerpos E3. Se conocen en la técnica diversas formulaciones y dispositivos para conseguir liberación prolongada.

5 En una realización, las dosificaciones para anticuerpos E3 (o polipéptidos) pueden determinarse de forma empírica en individuos a los que se ha proporcionado una o más administraciones. A los individuos se les proporcionan dosificaciones crecientes de E3. Para evaluar la eficacia de E3 u otro anticuerpo equivalente, pueden controlarse marcadores de los síntomas de enfermedad (tales como dolor).

10 La administración de un anticuerpo (tal como E3) o polipéptido de acuerdo con el procedimiento en la presente invención puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, del estado fisiológico del receptor, de si el fin de la administración es terapéutico o profiláctico, y de otros factores conocidos por los facultativos expertos en la materia. La administración de un anticuerpo puede ser esencialmente continua durante un periodo de tiempo preseleccionado o puede ser en una serie de dosis espaciadas, por ejemplo, antes, durante o después de la aparición de dolor, antes, durante, antes y después, durante y después o antes, durante y después de la aparición del dolor. La administración puede ser antes, durante y/o después de una herida, incisión, traumatismo, cirugía y cualquier otro acontecimiento que probablemente dé lugar a dolor post-quirúrgico.

15 Otras formulaciones incluyen formas de suministro adecuadas conocidas en la técnica incluyendo, pero sin limitación, vehículos tales como liposomas. Véase, por ejemplo, Mahato y col. (1997) Pharm. Res. 14: 853-859. Las preparaciones liposomales incluyen, pero sin limitación, citofectinas, vesículas multilamelares y vesículas unilamelares.

20 En algunas realizaciones, puede estar presente más de un anticuerpo o polipéptido. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Tales composiciones pueden contener al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco anticuerpos diferentes. Una mezcla de anticuerpos, como se indica con frecuencia en la técnica, puede ser particularmente útil en el tratamiento de una serie más amplia de poblaciones de individuos.

25 Un polinucleótido que codifique cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos de la invención (tales como anticuerpos E3) también puede usarse para suministro y expresión de cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos de la invención (tal como anticuerpo E3) en una célula deseada. Resulta evidente que puede usarse un vector de expresión para dirigir la expresión de un anticuerpo o polipéptido E3. El vector de expresión puede administrarse por cualquier medio conocido en la técnica, tal como por vía intraperitoneal, vía intravenosa, vía intramuscular, vía subcutánea, vía intratecal, vía intraventricular, vía oral, vía entérica, vía parenteral, vía intranasal, vía dérmica, vía sublingual o por inhalación. Por ejemplo, la administración de vectores de expresión incluye la administración local o sistémica, incluyendo inyección, administración oral, pistola de partículas o administración por catéter, y administración tópica. Un experto en la materia estará familiarizado con la administración de vectores de expresión para obtener expresión de una proteína exógena *in vivo*. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 6.436.908; 6.413.942; y 6.376.471.

35 También puede usarse suministro dirigido de composiciones terapéuticas que comprenden un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos de la invención (tal como el anticuerpo E3). Se describen técnicas de suministro de ADN mediadas por receptor en, por ejemplo, Findeis y col., Trends Biotechnol. (1993) 11: 202; Chiou y col., Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu y col., J. Biol. Chem. (1988) 263: 621; Wu y col., J. Biol. Chem. (1994) 269: 542; Zenke y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1990) 87: 3655; Wu y col., J. Biol. Chem. (1991) 266: 338. Se administran composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido en un intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para administración local en un protocolo de terapia génica. También pueden usarse intervalos de concentración de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg y de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 100 µg de ADN durante un protocolo de terapia génica. Los polinucleótidos y polipéptidos terapéuticos de la presente invención pueden suministrarse usando vehículos de suministro génico. El vehículo de suministro génico puede ser de origen viral o no viral (véase, en general, Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1: 51; Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5: 845; Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1: 185; y Kaplitt, Nature Genetics (1994) 6:148). La expresión de tales secuencias codificantes puede inducirse usando promotores endógenos de mamífero o heterólogos. La expresión de la secuencia codificante puede ser constitutiva o regulada.

50 Se conocen bien en la técnica vectores basados en virus para suministro de un polinucleótido deseado y expresión en una célula deseada. Los ejemplos de vehículos basados en virus incluyen, pero sin limitación, retrovirus recombinantes (véanse, por ejemplo, las Publicaciones de PCT N° WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; Patentes de estados Unidos N° 5.219.740; 4.777.127; Patente de Gran Bretaña N° 2.200.651; y Patente EP N° 0 345 242), vectores basados en alfa virus (por ejemplo, vectores de virus Sindbis, virus del bosque de Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), virus del Rio Ross (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) y virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), y vectores de virus adenoasociados (AAV) (véanse, por ejemplo, las Publicaciones de PCT N° WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 y WO 95/00655). También puede emplearse administración de ADN ligado a adenovirus muerto como se describe en Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3: 147.

60

También pueden emplearse vehículos y procedimientos de suministro no virales, incluyendo, pero sin limitación, ADN condensado policatiónico ligado o no ligado a adenovirus muerto sólo (véase, por ejemplo, Curriel, Hum. Gene Ther. (1992) 3: 147); ADN ligado a ligandos (véase, por ejemplo, Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264: 16985); células de vehículos de suministro de células eucariotas (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.814.482; Publicaciones de PCT N° WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; y WO 97/42338) y neutralización de carga nucleica o fusión con membranas celulares. También puede emplearse ADN desnudo. Se describen procedimientos de introducción de ADN desnudo ejemplares en la Publicación de PCT N° WO 90/11092 y la Patente de Estados Unidos N° 5.580.859. Se describen liposomas que pueden actuar como vehículos de suministro génico en la Patente de Estados Unidos N° 5.422.120; Publicaciones de PCT N° WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; y Patente EP N° 0 524 968. Se describen enfoques adicionales en Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14:2411 y en Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91: 1581.

Con respecto a todos los procedimientos descritos en el presente documento, la referencia a anticuerpos antagonistas anti-NGF también incluye composiciones que comprenden uno o más de estos agentes. Estas composiciones pueden comprender adicionalmente excipientes adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables incluyendo tampones, que se conocen bien en la técnica. La presente invención también puede usarse sola o en combinación con otros procedimientos convencionales de tratamiento.

### **PROCEDIMIENTOS DE USO DE ANTICUERPO ANTAGONISTA ANTI-NGF PARA TRATAR O PREVENIR EL DOLOR DE ARTRITIS REUMATOIDE**

En algunos aspectos, la divulgación proporciona procedimientos para tratar y/o prevenir dolor de artritis reumatoide en individuos, incluyendo mamíferos tanto humanos como no humanos. En consecuencia, en un aspecto, la divulgación proporciona procedimientos para tratar el dolor de artritis reumatoide en un individuo, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-NGF. Se conocen en la técnica anticuerpos antagonistas anti-NGF y se describen en el presente documento.

En otro aspecto, la divulgación proporciona procedimientos para reducir la incidencia de, aliviar, suprimir, paliar y/o retardar la aparición, el desarrollo o la progresión del dolor de artritis reumatoide en un individuo. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF se administra antes de la aparición del dolor o de un episodio de dolor en un individuo que tiene artritis reumatoide.

En otro aspecto, la divulgación proporciona procedimientos para tratar la caquexia inflamatoria (pérdida de peso) asociada con la artritis reumatoide en un individuo, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-NGF (Roubenoff y col., Arthritis Rheum. 40(3): 534-9 (1997); Roubenoff y col., J. Clin. Invest. 93(6): 2379-86 (1994)).

El diagnóstico o evaluación del dolor de artritis reumatoide están bien establecidos en la técnica. La evaluación puede realizarse basándose en medidas conocidas en la técnica, tales como caracterización por el paciente del dolor usando diversas escalas de dolor. Véase, por ejemplo, Katz y col., Surg Clin North Am. (1999) 79 (2): 231-52; Caraceni y col. J Pain Symptom Manage (2002) 23(3): 239-55. También existen escalas usadas habitualmente para medir patologías tales como el Colegio Americano de Reumatología (ACR) (Felson, y col., Arthritis and Rheumatism (1993) 36(6): 729-740), el Cuestionario de Evaluación de la Salud (HAQ) (Fries, y col., (1982) J. Rheumatol. 9: 789-793), la Escala de Paulus (Paulus, y col., Arthritis and Rheumatism (1990) 33: 477-484), y la Escala de Medida de Impacto de Artritis (AIMS) (Meenam, y col., Arthritis and Rheumatology (1982) 25: 1048-1053). El anticuerpo antagonista anti-NGF puede administrarse a un individuo por cualquier vía adecuada. En el presente documento se describen ejemplos de diferentes vías de administración.

El alivio del dolor puede caracterizarse por la evolución en el tiempo del alivio. En consecuencia, en algunas realizaciones, se observa alivio del dolor en un periodo de aproximadamente 24 horas después de la administración de anticuerpo antagonista anti-NGF. En otras realizaciones, se observa alivio del dolor en un periodo de aproximadamente 36, 48, 60, 72 horas o 4 días después de la administración de anticuerpo antagonista anti-NGF. En otras realizaciones más, se observa alivio del dolor antes de observar un indicio de mejora de la afección inflamatoria asociada con la artritis reumatoide. En algunas realizaciones, la frecuencia y/o intensidad del dolor se reduce y/o aumenta la calidad de vida de los que padecen la enfermedad.

En secciones posteriores se describe la preparación y uso de anticuerpos anti-NGF para estos procedimientos ("Anticuerpo antagonista anti-NGF"; "Identificación de anticuerpos antagonistas anti-NGF"; Administración de un anticuerpo antagonista anti-NGF").

### **ANTICUERPO ANTAGONISTA ANTI-NGF PARA SU USO EN EL TRATAMIENTO DEL DOLOR OSTEOARTRÍTICO**

En algunos aspectos, la invención posibilita el tratamiento del dolor osteoartrítico en individuos, incluyendo mamíferos, tanto humanos como no humanos. En consecuencia, en un aspecto, la invención proporciona una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-NGF o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento del dolor osteoartrítico en un individuo. La invención también proporciona el uso de un anticuerpo

antagonista anti-NGF o fragmento de unión a antígeno del mismo en la fabricación de un medicamento para tratar el dolor osteoartítico en un individuo. Se conocen en la técnica anticuerpos antagonistas anti-NGF y se describen en el presente documento.

5 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo antagonista anti-NGF para su uso para reducir la incidencia de, aliviar, suprimir, paliar y/o retardar la aparición, el desarrollo o la progresión del dolor osteoartítico en un individuo. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF se administra antes del desarrollo del dolor o un episodio de dolor en un individuo que tenga osteoartritis.

10 El diagnóstico o la evaluación del dolor osteoartítico están bien establecidos en la técnica. La evaluación puede realizarse basándose en medidas conocidas en la técnica, tales como caracterización por el paciente del dolor usando diversas escalas de dolor. Véase, por ejemplo, Katz y col., Surg Clin North Am. (1999) 79 (2): 231-52; Caraceni y col. J Pain Symptom Manage (2002) 23(3): 239-55. Por ejemplo, puede emplearse la Escala de Dolor Ambulatorio WOMAC (que incluye, dolor, agarrotamiento y función física) y la Escala Analógica Visual de 100 mm (VAS) para evaluar el dolor y evaluar la respuesta al tratamiento.

15 El anticuerpo antagonista anti-NGF puede administrarse a un individuo mediante cualquier vía adecuada. En el presente documento se describen ejemplos de vías de administración diferentes.

20 El alivio del dolor puede caracterizarse por la evolución en el tiempo del alivio. En consecuencia, en algunas realizaciones, se observa alivio del dolor en un periodo de aproximadamente 24 horas después de administración del anticuerpo antagonista anti-NGF. En otras realizaciones, se observa alivio del dolor en un periodo de aproximadamente 36, 48, 60, 72 horas o 4 días después de la administración del anticuerpo antagonista anti-NGF. En otras realizaciones, se reduce la frecuencia y/o intensidad del dolor y/o se aumenta la calidad de vida de los que padecen la enfermedad.

La preparación y uso de anticuerpos anti-NGF para estos procedimientos se describe en secciones posteriores ("Anticuerpo antagonista anti-NGF"; "Identificación de anticuerpos antagonistas anti-NGF"; Administración de un anticuerpo antagonista anti-NGF").

#### 25 Anticuerpo antagonista anti-NGF

Los usos de la invención (que conciernen al dolor osteoartítico) usan un anticuerpo antagonista anti-NGF, que se refiere a cualquier molécula de anticuerpo que bloquee, suprima o reduzca (incluyendo de forma significativa) la actividad biológica de NGF, incluyendo rutas corriente abajo mediadas por señalización de NGF, tales como unión a receptores y/o inducción de una respuesta celular a NGF.

30 Un anticuerpo antagonista anti-NGF debería mostrar una cualquiera o más de las siguientes características: (a) unirse a NGF e inhibir la actividad biológica de NGF o rutas corriente abajo mediadas por la función de señalización de NGF; (b) prevenir, aliviar o tratar cualquier aspecto de dolor osteoartítico; (c) bloquear o reducir la activación del receptor de NGF (incluyendo dimerización del receptor TrkA y/o autofosforilación); (d) aumentar la eliminación de NGF; (e) inhibir (reducir) la síntesis, producción o liberación de NGF. Se conocen en la técnica anticuerpos antagonistas anti-NGF, véanse, por ejemplo, las Publicaciones de PCT N° WO 01/78698, WO 01/64247, Patentes de Estados Unidos N° 5.844.092, 5.877.016 y 6.153.189; Hongo y col., Hybridoma, 19: 215-227 (2000); Cell. Molec. Biol. 13: 559-568 (1993); N° de Acceso de GenBank U39608, U39609, L17078 o L17077.

40 Para los fines de la presente invención, el anticuerpo reacciona con NGF de una manera que inhibe NGF y/o rutas corriente abajo mediadas por la función de señalización de NGF. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF reconoce el NGF humano. En otras realizaciones más, el anticuerpo antagonista anti-NGF se une específicamente al NGF humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF no se une específicamente a neurotrofinas relacionadas, tales como NT-3, NT4/5 y/o BDNF. En otras realizaciones más, el anticuerpo anti-NGF es capaz de unirse a NGF e inhibir eficazmente la unión de NGF a su receptor TrkA y/o p75 *in vivo* y/o inhibir eficazmente la activación por NGF de su receptor TrkA y/o p75. En otra realización más, el anticuerpo antagonista anti-NGF es un anticuerpo monoclonal. En otras realizaciones más, el anticuerpo antagonista anti-NGF está humanizado (tal como el anticuerpo E3 descrito en el presente documento). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF es humano. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano que reconoce uno o más epítomos de NGF humano. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de rata o de ratón que reconoce uno o más epítomos de NGF humano. En otra realización, el anticuerpo reconoce uno o más epítomos de un NGF seleccionado del grupo que consiste en: primate, canino, felino, equino y bovino. En más realizaciones adicionales, el anticuerpo antagonista anti-NGF se une esencialmente al mismo epítomo 6 de NGF que un anticuerpo seleccionado de uno cualquiera o más de los siguientes: MAb 911, MAb 912 y MAb 938 (Véase Hongo, y col., Hybridoma 19: 215-227 (2000)). En otras realizaciones adicionales, el anticuerpo se une al mismo epítomo que MAb 911. En otra realización, el anticuerpo comprende una región constante que es inmunológicamente inerte (por ejemplo, no desencadena lisis mediada por complemento o citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC)). La actividad ADCC puede evaluarse usando procedimientos desvelados en la Patente de Estados Unidos N° 5.500.362. En algunas realizaciones, la región constante se modifica como se describe en Eur. J. Immunol. (1999) 29: 2613-2624; Solicitud de PCT N° PCT/GB99/01441; y/o Solicitud de Patente del Reino Unido N°

9809951.8.

En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF es un anticuerpo monoclonal anti-NGF de ratón humanizado denominado anticuerpo "E3", cualquiera de los anticuerpos relacionados con E3 descritos en el presente documento, o cualquier fragmento de los mismos, que son antagonistas de NGF.

5 Los anticuerpos útiles en la presente invención pueden abarcar anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos heteroconjugados, monocatenarios (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo, anticuerpos humanizados y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento de antígenos de la especificidad requerida,  
10 incluyendo variantes de glucosilación de anticuerpos, variantes de secuencia de aminoácidos de anticuerpos, y anticuerpos modificados de forma covalente. Los anticuerpos pueden ser murinos, de rata, humanos, o de cualquier otro origen (incluyendo anticuerpos quiméricos o humanizados).

La afinidad de unión de un anticuerpo antagonista anti-NGF por NGF (tal como hNGF) puede ser de aproximadamente 0,10 a aproximadamente 0,80 nM, de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,75 nM y de aproximadamente 0,18 a aproximadamente 0,72 nM. En una realización, la afinidad de unión está entre aproximadamente 2 pM y 22 pM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es de aproximadamente 10 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es menor de aproximadamente 10 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es de aproximadamente 0,1 nM o aproximadamente 0,07 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es menor de aproximadamente 0,1 nM o menor de aproximadamente 0,07 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es cualquiera de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM o aproximadamente 50 pM a cualquiera de aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM o aproximadamente 40 pM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es cualquiera de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM o aproximadamente 50 pM, o menor de aproximadamente 50 pM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es menor de cualquiera de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM o aproximadamente 50 pM. En otras realizaciones más, la afinidad de unión es de aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 40 pM o mayor de aproximadamente 40 pM.

Un modo de determinar la afinidad de unión de los anticuerpos por NGF es midiendo la afinidad de unión de fragmentos Fab monofuncionales del anticuerpo. Para obtener fragmentos Fab monofuncionales, puede escindirse un anticuerpo (por ejemplo IgG) con papaína o expresarse de forma recombinante. La afinidad de un fragmento Fab anti-NGF de un anticuerpo puede determinarse por resonancia de plasmón superficial (sistema de resonancia de plasmón superficial (SPR) BIAcore3000™, BIAcore, INC, Piscaway NJ). Pueden activarse microplacas CM5 con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El NGF humano (o cualquier otro NGF) puede diluirse en acetato sódico 10 mM pH 4,0 e inyectarse sobre la microplaca activada a una concentración de 0,005 mg/ml. Usando tiempo de flujo variable a través de los canales de microplacas individuales, pueden conseguirse dos intervalos de densidad de antígenos:  
35 100-200 unidades de respuesta (UR) para estudios cinéticos detallados y 500-600 UR para ensayos de exploración. La microplaca puede bloquearse con etanolamina. Los estudios de regeneración han mostrado que una mezcla de tampón de elución de Pierce (Nº de Producto 21004, Pierce Biotechnology, Rockford IL) y NaCl 4 M (2:1) retira eficazmente el Fab unido mientras que mantiene la actividad de hNGF en la microplaca durante más de 200 inyecciones. Para los ensayos de BIAcore se usa tampón HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15, EDTA 3 mM, Tensioactivo P29 0,005 %) como tampón de ejecución. Se inyectan diluciones seriadas ( $K_D$  estimada 0,1-10x) de muestras de Fab purificadas durante 1 minuto a 100 µl/minuto y se permiten tiempos de disociación de hasta 2 horas. Las concentraciones de las proteínas Fab se determinan por ELISA y/o electroforesis SDS-PAGE usando un Fab de concentración conocida (como se determina por análisis de aminoácidos) como patrón. Se obtienen tasas de asociación (kon) y tasas de disociación (koff) cinéticas ajustando simultáneamente los datos a un modelo de unión de Langmuir 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). Methods Enzymology 6. 99-110) usando el programa BIAevaluation. Los valores de constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) se calculan como  $k_{off}/k_{on}$ . Este protocolo es adecuado para su uso en la determinación de la afinidad de unión de un anticuerpo con cualquier NGF, incluyendo NGF humano, NGF de otro vertebrado (en algunas realizaciones, mamífero) (tal como NGF de ratón, NGF de rata, NGF de primate), así como para su uso con otras neurotrofinas, tales como las neurotrofinas relacionadas NT3, NT4/5 y/o BDNF.

En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a NGF humano, y no se une significativamente a un NGF de otra especie de vertebrado (en algunas realizaciones, mamífero). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a NGF humano así como a uno o más NGF de otra especie de vertebrado (en algunas realizaciones, mamífero). En otras realizaciones más, el anticuerpo se une a NGF y no reacciona de forma significativamente cruzada con otras neurotrofinas (tales como las neurotrofinas relacionadas NT3, NT4/5 y/o BDNF). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a NGF así como al menos a otra neurotrofina. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a

una especie de mamífero de NGF, tal como caballo o perro, pero no se une significativamente a NGF de otra especie de mamífero.

- El epítipo o los epítipos pueden ser continuos o discontinuos. En una realización, el anticuerpo se une esencialmente a los mismos epítipos de hNGF que un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en MAb 911 MAb 912 y MAb 938 como se describe en Hongo y col., *Hybridoma*, 19:215-227 (2000). En otra realización, el anticuerpo se une esencialmente al mismo epítipo de hNGF que el MAb 911. En otra realización más, el anticuerpo se une esencialmente al mismo epítipo que MAb 909. Hongo y col., mencionado anteriormente. Por ejemplo, el epítipo puede comprender uno o más de: restos K32, K34 y E35 dentro de la región variable 1 (aminoácidos 23-35) de hNGF; restos Y79 y T81 dentro de la región variable 4 (aminoácidos 81-88) de hNGF; restos H84 y K88 dentro de la región variable 4; resto R103 dentro de la región variable 5 (aminoácidos 94-98) de hNGF y el extremo C terminal (aminoácidos 111-118) de hNGF; resto E11 dentro de la región prevariable 1 (aminoácidos 10-23) de hNGF; Y52 entre la región variable 2 (aminoácidos 40-49) de hNGF y la región variable 3 (aminoácidos 59-66) de hNGF; restos L112 y S113 dentro del extremo C terminal de hNGF; restos R59 y R69 dentro de la región variable 3 de hNGF; o restos V18, V20 y G23 dentro de la región prevariable 1 de hNGF. Además, un epítipo puede comprender una o más de la región variable 1, región variable 3, región variable 4, región variable 5, la región N terminal y/o el extremo C terminal de hNGF. En otra realización más, el anticuerpo reduce significativamente la accesibilidad al disolvente del resto R103 de hNGF. Se entiende que aunque los epítipos descritos anteriormente se refieren a NGF humano, un experto en la materia puede alinear las estructuras de NGF humano con el NGF de otra especie e identificar homólogos probables de estos epítipos.
- En un aspecto, pueden prepararse anticuerpos (por ejemplo, humanos, humanizados, de ratón, quiméricos) que pueden inhibir NGF usando inmunógenos que expresan la longitud completa o secuencia parcial de NGF. En otro aspecto, puede usarse un inmunógeno que comprende una célula que sobreexpresa NGF. Otro ejemplo de un inmunógeno que puede usarse es proteína NGF que contiene NGF de longitud completa o una parte de la proteína NGF.
- Los anticuerpos antagonistas anti-NGF pueden prepararse por cualquier procedimiento conocido en la técnica. La vía y el programa de inmunización del animal huésped generalmente se ajustan a las técnicas establecidas y convencionales para estimulación y producción de anticuerpos, como se describe adicionalmente en el presente documento. En este campo se conocen técnicas generales para la producción de anticuerpos humanos y de ratón y se describen en el presente documento.
- Se contempla que cualquier sujeto mamífero, incluyendo seres humanos o células productoras de anticuerpo de los mismos, pueden manipularse para actuar como la base para producción de líneas celulares de hibridoma de mamífero, incluyendo humanos. Típicamente, se inocula al animal huésped por vía intraperitoneal, vía intramuscular, vía oral, vía subcutánea, intraplantar y/o vía intradérmica con una cantidad de inmunógeno, incluyendo como se describe en el presente documento.
- Pueden prepararse hibridomas a partir de los linfocitos y las células de mieloma inmortalizadas usando la técnica de hibridación de células somáticas general de Kohler, B. y Milstein, C. (1975) *Nature* 256:495-497 o como se modificó por Buck, D. W., y col., *In Vitro*, 18:377-381 (1982). Pueden usarse líneas de mieloma disponibles, incluyendo pero sin limitación X63-Ag8.653 y las del Instituto Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif. Estados Unidos, en la hibridación. En general, la técnica implica fusionar células de mieloma y células linfoides usando un fusógeno tal como polietilenglicol, o por medios eléctricos bien conocidos por los expertos en la materia. Después de la fusión, las células se separan del medio de fusión y se dejan crecer en un medio de crecimiento selectivo, tal como medio de hipoxantina-aminopterin-timidina (HAT), para eliminar células parentales no hibridadas. Puede usarse cualquiera de los medios descritos en el presente documento, complementados con o sin suero, para cultivar hibridomas que secreten anticuerpos monoclonales. Como otra alternativa a la técnica de fusión celular, pueden usarse linfocitos B inmortalizados con VEB para producir los anticuerpos monoclonales anti-NGF de la presente invención. Los hibridomas se expanden y subclonan, si se desea, y los sobrenadantes se ensayan con respecto a la actividad anti-inmunógeno por procedimientos de inmunoensayo convencionales (por ejemplo, radioinmunoensayo, e inmunoensayo enzimático o inmunoensayo de fluorescencia).
- Los hibridomas que pueden usarse como fuente de anticuerpos abarcan todos los derivados, células descendientes de los hibridomas parentales que producen anticuerpos monoclonales específicos para NGF, o una parte de los mismos.
- Pueden cultivarse hibridomas que producen tales anticuerpos *in vitro* o *in vivo* usando procedimientos conocidos. Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse del medio de cultivo o fluidos corporales, por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como precipitación con sulfato de amonio, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía y ultrafiltración, si se desea. Si está presente actividad no deseada, ésta puede retirarse, por ejemplo, procesando la preparación sobre adsorbentes compuestos del inmunógeno unido a una fase sólida y eluyendo o liberando los anticuerpos deseados del inmunógeno. La inmunización de un animal huésped con un NGF humano, o un fragmento que contiene la secuencia de aminoácidos diana conjugada con una proteína que es inmunogénica en la especie que se va a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o de derivatización, por

ejemplo éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de resto de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl<sub>2</sub> o R1N=C=NR, en el que R y R1 son grupos alquilo diferentes, puede producir una población de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales).

Si se desea, el anticuerpo antagonista anti-NGF (monoclonal o policlonal) de interés puede secuenciarse y la secuencia polinucleotídica puede después clonarse en un vector para expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse en el vector en una célula huésped y la célula huésped puede después expandirse y congelarse para su uso futuro. En una alternativa, la secuencia polinucleotídica puede usarse para la manipulación genética para "humanizar" el anticuerpo o para mejorar la afinidad, u otras características del anticuerpo. Por ejemplo, la región constante puede modificarse por ingeniería genética para asemejarse más a regiones constantes humanas para evitar la respuesta inmune si el anticuerpo se usa en ensayos clínicos y tratamientos en seres humanos. Puede ser deseable manipular genéticamente la secuencia de anticuerpos para obtener mayor afinidad por NGF y mayor eficacia en la inhibición de NGF. Resultará evidente para un experto en la materia que pueden realizarse uno o más cambios de polinucleótidos en el anticuerpo antagonista anti-NGF y mantener aún su capacidad de unión con NGF.

Hay cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Éstas son: (1) determinar la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos predicha de los dominios variables ligeros y pesados del anticuerpo de partida, (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región marco de anticuerpo usar durante el procedimiento de humanización, (3) las propias metodologías/técnicas de humanización y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; 6.331.415; 5.530.101; 5.693.761; 5.693.762; 5.585.089 y 6,180.370.

Se han descrito varias moléculas de anticuerpo "humanizadas" que comprenden un sitio de unión a antígeno derivado de una inmunoglobulina no humana, incluyendo anticuerpos quiméricos que tienen regiones V de roedor o de roedor modificado y sus regiones determinantes de complementariedad (CDR) asociadas fusionadas con dominios constantes humanos. Véase, por ejemplo, Winter y col. Nature 349:293-299 (1991), Lobuglio y col. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:4220-4224 (1989), Shaw y col. J Immunol. 138:4534-4538 (1987) y Brown y col. Cancer Res 47:3577-3583 (1987). Otras referencias describen CDR de roedor injertadas en una región marco (FR) de soporte humana antes de la fusión con un dominio constante de anticuerpo humano apropiado. Véase, por ejemplo, Riechmann y col. Nature 332:323-327 (1988), Verhoeven y col. Science 239:1534-1536 (1988) y Jones y col. Nature 321:522-525 (1986). Otra referencia describe CDR de roedor soportadas por regiones marco de roedor revestidas de forma recombinante. Véase, por ejemplo, la publicación de patente europea N° 0519596. Estas moléculas "humanizadas" se diseñan para minimizar la respuesta inmunológica no deseada hacia moléculas de anticuerpo anti-humano de roedor que limita la duración y eficacia de las aplicaciones terapéuticas de esos restos en destinatarios humanos. Por ejemplo, la región constante de anticuerpo puede modificarse por ingeniería genética de modo que sea inmunológicamente inerte (por ejemplo, no desencadene lisis de complemento). Véanse, por ejemplo, la publicación de PCT N° PCT/GB99/PCT/01441; solicitud de patente del Reino Unido N° 9809951.8. Se desvelan otros procedimientos para humanizar anticuerpos que también pueden utilizarse en Daugherty y col., Nucl. Acids Res. 19:2471-2476 (1991) y en las patentes de Estados Unidos N° 6.180.377; 6.054.297; 5.997.867; 5.866.692; 6.210.671 y 6.350.861; y en la publicación de PCT N° WO 01/27160.

En otra alternativa más, pueden obtenerse anticuerpos completamente humanos usando ratones disponibles en el mercado que se han modificado por ingeniería genética para expresar proteínas de inmunoglobulina humana específicas. También pueden usarse animales transgénicos que se diseñan para producir una respuesta inmune más deseable (por ejemplo, anticuerpos completamente humanos) o más sólida para la generación de anticuerpos humanizados o humanos. Son ejemplos de dicha tecnología Xenomouse™ de Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y HuMAb-Mouse® y TC Mouse™ de Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

En una alternativa, pueden prepararse anticuerpos de forma recombinante y expresarse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. En otra alternativa, pueden prepararse anticuerpos de forma recombinante por tecnología de presentación de fagos. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743 y 6.265.150; y Winter y col, Annu. Rev. Immunol. 12:433-455 (1994). Como alternativa, la tecnología de presentación de fagos (McCafferty y col., Nature 348:552-553 (1990)) puede usarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominios variables (V) de inmunoglobulinas de donadores no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, se clonan genes de dominios V de anticuerpos en fase en un gen de proteína de revestimiento mayoritaria o minoritaria de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenaria del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B. Puede realizarse presentación en fagos en una diversidad de formatos; para revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinión in Structural Biology 3:564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de gen V para presentación en fagos. Clackson y col., Nature 352:624-628 (1991) aislaron una serie de anticuerpos anti-oxazolona diversa a partir de una biblioteca combinatoria aleatoria pequeña de genes V derivada de los bazos de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V a partir de

donadores humanos no inmunizados y pueden aislarse anticuerpos para una serie de antígenos diversa (incluyendo auto antígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Mark y col., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), o Griffith y col., EMBO J. 12:725-734 (1993). En una respuesta inmune natural, los genes de anticuerpo acumulan mutaciones a una alta tasa (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán afinidad mayor y los linfocitos B que presentan inmunoglobulina en superficie de alta afinidad se replican y diferencian preferentemente durante la presentación al antígeno posterior. Este proceso natural puede imitarse empleando la técnica conocida como "redistribución de cadenas". Mark y col., Bio/Technol. 10:779-783 (1992)). En este procedimiento, la afinidad de anticuerpos humanos "primarios" obtenidos por presentación en fagos puede mejorarse por reemplazo secuencial de los genes de región V de cadena pesada y ligera con repertorios de variantes de origen natural (repertorios) de genes de dominio V obtenidos a partir de donadores no inmunizados. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con afinidades en el intervalo de pM-nM. Se ha descrito una estrategia para preparar repertorios de anticuerpos de fago muy grandes (también conocidos como "la madre de todas las bibliotecas") por Waterhouse y col., Nucl. Acids. Res 21:2265-2266 (1993). También puede usarse redistribución de genes para obtener anticuerpos humanos a partir de anticuerpos de roedor, teniendo el anticuerpo humano afinidades y especificidades similares al anticuerpo de roedor de partida. De acuerdo con este procedimiento, que también se denomina "impronta de epítomos", el gen de dominio V de cadena pesada o ligera de anticuerpos de roedor obtenidos por técnica de presentación en fagos se reemplaza por un repertorio de genes de dominio V humanos, creando quimeras roedor-humano. La selección del antígeno da como resultado el aislamiento de regiones variables humanas capaces de restaurar un sitio de unión a antígeno funcional, es decir, el epítipo dirige (imprime) la elección del compañero. Cuando el procedimiento se repite para reemplazar el dominio V de roedor restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase la publicación de PCT N° WO 93/06213, publicada el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos de roedor por injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen restos marco o de CDR de origen de roedor.

Resulta evidente que aunque el análisis anterior concierne a anticuerpos humanizados, los principios generales analizados son aplicables a la adaptación de anticuerpos para su uso, por ejemplo, en perros, gatos, primates, equinos y bovinos. Resulta evidente además que uno o más aspectos de la humanización de un anticuerpo descrita en el presente documento pueden combinarse, por ejemplo, injerto de CDR, mutación de regiones marco y mutación de CDR.

Pueden prepararse anticuerpos de forma recombinante aislando primero los anticuerpos y células productoras de anticuerpos de animales huésped, obteniendo la secuencia génica y usando la secuencia génica para expresar el anticuerpo de forma recombinante en células huésped (por ejemplo, células CHO). Otro procedimiento que puede emplearse es expresar la secuencia del anticuerpo en plantas (por ejemplo, tabaco) o leche transgénica. Se han desvelado procedimientos para expresar anticuerpos de forma recombinante en plantas o leche. Véase, por ejemplo, Peeters, y col. Vaccine 19:2756 (2001); Lonberg, N. y D. Huszar Int. Rev. Immunol 13:65 (1995); y Pollock, y col., J Immunol Methods 231:147 (1999). Se conocen en la técnica procedimientos para preparar derivados de anticuerpos, por ejemplo, humanizados, de cadena sencilla, etc.

También pueden emplearse inmunoensayos y técnicas de clasificación por citometría de flujo tales como separación de células activada por fluorescencia (FACS) para aislar anticuerpos que son específicos para NGF.

Los anticuerpos pueden unirse a muchos vehículos diferentes. Los vehículos pueden ser activos y/o inertes. Los ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen polipropileno, poliestireno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, vidrio, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o insoluble para los fines de la invención. Los expertos en la materia conocerán otros vehículos adecuados para la unión de anticuerpos o serán capaces de determinarlos usando experimentación rutinaria. En algunas realizaciones, el vehículo comprende un resto que se dirige al miocardio.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma actúan como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede situarse en vectores de expresión (tales como vectores de expresión desvelados en la publicación de PCT N° WO 87/04462), que transfectan después a células huésped tales como células *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otro modo proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Véase, por ejemplo, la publicación de PCT N° WO 87/04462. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas, Morrison y col., Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851 (1984), o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no de inmunoglobulina. De esa manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal anti-NGF en el mismo.

Pueden caracterizarse anticuerpos antagonistas anti-NGF usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento es identificar el epítipo al que se une, o "mapeo de epítipo". Se conocen muchos procedimientos en la técnica para el mapeo y caracterización de la localización de epítomos en proteínas, incluyendo

la resolución de la estructura cristalina de un complejo anticuerpo-antígeno, ensayos de competición, ensayos de expresión de fragmentos génicos y ensayos basados en péptidos sintéticos, como se describe, por ejemplo, en el capítulo 11 de Harlow y Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1999. En un ejemplo adicional, puede usarse mapeo de epítomos para determinar la secuencia a la que se une un anticuerpo antagonista anti-NGF. El mapeo de epítomos está disponible en el mercado de diversas fuentes, por ejemplo, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, Países bajos). El epítomo puede ser un epítomo lineal, es decir, contenido en un tramo sencillo de aminoácidos, o un epítomo conformacional formado por una interacción tridimensional de aminoácidos que pueden no estar necesariamente contenidos en un tramo sencillo. Pueden aislarse o sintetizarse (por ejemplo, de forma recombinante) péptidos de diversas longitudes (por ejemplo, al menos 4-6 aminoácidos de longitud) y usarse para ensayos de unión con un anticuerpo antagonista anti-NGF. En otro ejemplo, el epítomo al que se une el anticuerpo antagonista anti-NGF puede determinarse en una exploración sistemática usando péptidos solapantes derivados de la secuencia de NGF y determinando la unión por el anticuerpo antagonista anti-NGF. De acuerdo con los ensayos de expresión de fragmentos génicos, la fase de lectura abierta que codifica NGF se fragmenta de forma aleatoria o por construcciones genéticas específicas y se determina la reactividad de los fragmentos expresados de NGF con el anticuerpo a ensayar. Los fragmentos génicos pueden, por ejemplo, producirse por PCR y después transcribirse y traducirse en proteínas *in vitro*, en presencia de aminoácidos radiactivos. La unión del anticuerpo a los fragmentos de NGF marcados de forma radiactiva se determina después por inmunoprecipitación y electroforesis en gel. También pueden identificarse ciertos epítomos usando bibliotecas grandes de secuencias de peptídicas aleatorias presentadas en la superficie de partículas de fagos (bibliotecas de fagos). Como alternativa, puede ensayarse una biblioteca definida de fragmentos peptídicos solapantes con respecto a la unión con el anticuerpo de ensayo en ensayos de unión sencillos. En un ejemplo adicional, puede realizarse mutagénesis de un dominio de unión a antígeno, experimentos de intercambio de dominios y mutagénesis de alanina para identificar restos requeridos, suficientes y/o necesarios para la unión de epítomos. Por ejemplo, pueden realizarse experimentos de intercambio de dominios usando un NGF mutante en el que se han reemplazado (intercambiado) diversos fragmentos del polipéptido NGF con secuencias de una proteína muy relacionada pero antigénicamente distinta (tal como otro miembro de la familia de proteínas de neurotrofina). Evaluando la unión del anticuerpo al NGF mutante, puede evaluarse la importancia del fragmento de NGF particular para la unión del anticuerpo.

Otro procedimiento más que puede usarse para caracterizar un anticuerpo antagonista anti-NGF es usar ensayos de competición con otros anticuerpos que se sabe que se unen al mismo antígeno, es decir, diversos fragmentos en NGF, para determinar si el anticuerpo antagonista anti-NGF se une al mismo epítomo que otros anticuerpos. Se conocen bien ensayos de competición por los expertos en la materia. Los ejemplos de anticuerpos que pueden usarse en los ensayos de competición para la presente invención incluyen los MAb 911, 912, 938, como se describe en Hongo, y col., *Hybridoma* 19:215-227 (2000).

Puede usarse un vector de expresión para dirigir la expresión de un anticuerpo antagonista anti-NGF. Un experto en la materia estará familiarizado con la administración de vectores de expresión para obtener expresión de una proteína exógena *in vivo*. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 6.436.908; 6.413.942 y 6.376.471. La administración de vectores de expresión incluye la administración local o sistémica, incluyendo inyección, administración oral, pistola de partículas o administración por catéter, y administración tópica. En otra realización, el vector de expresión se administra directamente al ganglio o tronco simpático o a una arteria coronaria, aurícula, ventrículo o pericardio.

También puede usarse suministro dirigido de composiciones terapéuticas que contienen un vector de expresión, o polinucleótidos subgenómicos. Se describen técnicas de suministro de ADN mediadas por receptor en, por ejemplo, Findeis y col., *Biotechnol.* (1993) 11:202; Chiou y col., *Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer* (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu y col., *J. Biol. Chem.* (1988) 263:621; Wu y col., *J. Biol. Chem.* (1994) 269:542; Zenke y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990) 87:3655; Wu y col., *J. Biol. Chem.* (1991) 266:338. Se administran composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido en un intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para administración local en un protocolo de terapia génica. También pueden usarse intervalos de concentraciones de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg y de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 100 µg de ADN durante un protocolo de terapia génica. Los polinucleótidos y polipéptidos terapéuticos pueden suministrarse usando vehículos de suministro génico. El vehículo de suministro génico puede ser de origen viral o no viral (véase, en general, Jolly, *Cancer Gene Therapy* (1994) 1:51; Kimura, *Human Gene Therapy* (1994) 5:845; Connely, *Human Gene Therapy* (1995) 1:185; y Kaplitt, *Nature Genetics* (1994) 6:148). Puede inducirse la expresión de tales secuencias codificantes usando promotores heterólogos o de mamífero endógenos. La expresión de la secuencia codificante puede ser constitutiva o regulada.

Se conocen bien en la técnica vectores basados en virus para el suministro de un polinucleótido deseado y la expresión en una célula deseada. Los vehículos basados en virus ejemplares incluyen, pero sin limitación, retrovirus recombinantes (véanse, por ejemplo, las publicaciones de PCT N° WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; patentes de Estados Unidos N° 5.219.740 y 4.777.127; patente de Gran Bretaña N° 2.200.651; y patente EP N° 0 345 242), vectores basados en virus alfa (por ejemplo, vectores de virus Sindbis, virus del bosque de Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), virus del río Ross (ATCC VR-

373; ATCC VR-1246) y virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)) y vectores de virus adenoasociados (AAV) (véanse, por ejemplo, las publicaciones de PCT N° WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 y WO 95/00655). También puede emplearse administración de ADN ligado a adenovirus muertos como se describe en Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147.

- 5 También pueden emplearse vehículos y procedimientos de suministro no virales, incluyendo, pero sin limitación, ADN condensado policatiónico ligado o no ligado a adenovirus muerto solo (véase, por ejemplo, Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147); ADN ligado a ligando (véase, por ejemplo, Wu, J. Biol. Chem (1989) 264:16985); células de vehículos de suministro de células eucariotas (véanse, por ejemplo, patentes de Estados Unidos N° 5.814.482; publicaciones de PCT N° WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763 y WO 97/42338) y neutralización de carga nucleica o fusión con membranas celulares. También puede emplearse ADN desnudo. Se describen procedimientos de introducción de ADN desnudo ejemplares en la publicación de PCT N° WO 90/11092 y en la patente de Estados Unidos N° 5.580.859. Se describen liposomas que pueden actuar como vehículos de suministro génico en la patente de Estados Unidos N° 5.422.120; publicaciones de PCT N° WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445 y EP 0524968. Se describen enfoques adicionales en Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14:2411, y en Woffendin, Proc. Natl. Acad Sci. 91:1581 (1994).

#### Identificación de anticuerpos antagonistas anti-NGF

Pueden identificarse o caracterizarse anticuerpos antagonistas anti-NGF usando procedimientos conocidos en la técnica, con los que se detecta y/o mide reducción, alivio o neutralización de una actividad biológica de NGF. Por ejemplo, puede usarse un ensayo de activación del receptor quinasa (KIRA) descrito en las patentes de Estados Unidos N° 5.766.863 y 5.891.650, para identificar agentes anti-NGF. Este ensayo de tipo ELISA es adecuado para la medición cuantitativa o cualitativa de la activación de quinasa mediante la medición de la autofosforilación del dominio quinasa de una proteína tirosina quinasa receptora (en lo sucesivo en el presente documento "rPTK"), por ejemplo, el receptor TrkA, así como para la identificación y caracterización de antagonistas potenciales de una rPTK seleccionada, por ejemplo, TrkA. La primera etapa del ensayo implica la fosforilación del dominio quinasa de un receptor quinasa, por ejemplo, un receptor TrkA, en la que el receptor está presente en la membrana celular de una célula eucariota. El receptor puede ser un receptor endógeno o puede ser un ácido nucleico que codifica el receptor, o una construcción del receptor, que pueden usarse para transformar la célula. Típicamente, una primera fase sólida (por ejemplo, un pocillo de una primera placa de ensayo) se reviste con una población sustancialmente homogénea de tales células (habitualmente una línea celular de mamífero) de modo que las células se adhieren a la fase sólida. Con frecuencia, las células son adherentes y por lo tanto se adhieren de forma natural a la primera fase sólida. Si se usa una "construcción receptora", habitualmente comprende una fusión de un receptor quinasa y un polipéptido marcador. El polipéptido marcador se reconoce por el agente de captura, con frecuencia un anticuerpo de captura, en la parte de ELISA del ensayo. Se añade después un analito, tal como un anticuerpo antagonista anti-NGF candidato junto con NGF a los pocillos que tienen las células adherentes, de modo que la tirosina quinasa receptora (por ejemplo, el receptor TrkA) se expone a (o se pone en contacto con) NGF y el analito. Este ensayo permite la identificación de anticuerpos que inhiben la activación de TrkA por su ligando NGF. Después de la exposición a NGF y el analito, las células adherentes se solubilizan usando un tampón de lisis (que tiene un detergente de solubilización en el mismo) y agitación suave, liberando de este modo el lisado celular que puede someterse a la parte de ELISA del ensayo directamente, sin la necesidad de concentración o clarificación del lisado celular.

El lisado celular preparado de este modo está entonces listo para someterse a la etapa de ELISA del ensayo. Como una primera etapa en la fase de ELISA, se reviste una segunda fase sólida (habitualmente un pocillo de una placa de microtitulación) con un agente de captura (con frecuencia un anticuerpo de captura) que se une específicamente a la tirosina quinasa receptora o, en el caso de una construcción de receptor, al polipéptido marcador. El revestimiento de la segunda fase sólida se lleva a cabo de modo que el agente de captura se adhiera a la segunda fase sólida. El agente de captura generalmente es un anticuerpo monoclonal pero, como se describe en los ejemplos del presente documento, también pueden usarse anticuerpos policlonales. El lisado celular obtenido se expone después a, o se pone en contacto con, el agente de captura adherente de modo que el receptor o la construcción de receptor se adhiere a (o se captura en) la segunda fase sólida. Se lleva a cabo después una etapa de lavado, de modo que se retire el lisado celular no unido, dejando capturado el receptor o construcción del receptor. El receptor o la construcción de receptor capturado o adherente se expone después a, o se pone en contacto con, un anticuerpo anti-fosfotirosina que identifica restos de tirosina fosforilados en el receptor de tirosina quinasa. En una realización, el anticuerpo anti-fosfotirosina se conjuga (directa o indirectamente) con una enzima que cataliza un cambio de color de un reactivo de color no radiactivo. En consecuencia, puede medirse la fosforilación del receptor por un cambio de color posterior del reactivo. La enzima puede unirse directamente al anticuerpo anti-fosfotirosina, o una molécula de conjugación (por ejemplo, biotina) puede conjugarse con el anticuerpo anti-fosfotirosina y la enzima puede unirse posteriormente con el anticuerpo anti-fosfotirosina mediante la molécula de conjugación. Finalmente, se mide la unión del anticuerpo anti-fosfotirosina con el receptor o la construcción de receptor capturada, por ejemplo, por un cambio de color en el reactivo de color.

El anticuerpo antagonista anti-NGF también puede identificarse incubando un agente candidato con NGF y controlando una cualquiera o más de las siguientes características: (a) unión a NGF e inhibición de la actividad biológica de NGF o rutas corriente abajo mediadas por la función de señalización de NGF; (b) inhibición, bloqueo o

reducción de la activación del receptor de NGF (incluyendo dimerización y/o autofosforilación de TrkA); (c) aumento de la eliminación de NGF; (d) tratamiento o prevención de cualquier aspecto de dolor de artritis reumatoide o dolor osteoartrítico; y (e) inhibición (reducción) de la síntesis, producción o liberación de NGF. En algunas realizaciones, un anticuerpo antagonista anti-NGF se identifica incubando un agente candidato con NGF y controlando la unión y/o reducción o neutralización consiguiente de una actividad biológica de NGF. El ensayo de unión puede realizarse con uno o más polipéptidos de NGF purificados, o con células que expresan de forma natural, o se transfectan para expresar, uno o más polipéptidos de NGF. En una realización, el ensayo de unión es un ensayo de unión competitiva, en el que se evalúa la capacidad de un anticuerpo candidato para competir con un antagonista anti-NGF conocido por unión a NGF. El ensayo puede realizarse en diversos formatos, incluyendo el formato ELISA. En otras realizaciones, un anticuerpo antagonista anti-NGF se identifica incubando un agente candidato con NGF y controlando la unión e inhibición consiguiente de la dimerización y/o autofosforilación del receptor trkA.

Después de la identificación inicial, la actividad de un anticuerpo antagonista anti-NGF candidato puede confirmarse adicionalmente y refinarse por bioensayos, que se sabe que ensayan las actividades biológicas diana. Como alternativa, pueden usarse bioensayos para explorar los candidatos directamente. Por ejemplo, NGF promueve varios cambios morfológicamente reconocibles en células sensibles. Estos incluyen, pero sin limitación, promoción de la diferenciación de células PC12 y potenciación del crecimiento de neuritas a partir de estas células (Greene y col., Proc Natl Acad Sci U.S.A 73 (7):2424-8, 1976), promoción del crecimiento de neuritas a partir de explantes de ganglios simpáticos y sensoriales sensibles (Levi-Montalcini, R. y Angeletti, P. Nerve growth factor. Physiol Rev. 48:534-569, 1968) y promoción de la supervivencia de neuronas dependientes de NGF tales como neuronas de ganglio de la raíz dorsal embrionaria, ganglio trigeminal o ganglio simpático (por ejemplo, Chun & Patterson, Dev. Biol. 75:705-711, (1977); Buchman & Davies, Development 118:989-1001 (1993)). Por lo tanto, el ensayo para inhibición de la actividad biológica de NGF implica cultivar células sensibles a NGF con NGF más un analito, tal como un anticuerpo antagonista anti-NGF candidato. Después de un tiempo apropiado, se ensayará la respuesta celular (diferenciación celular, crecimiento de neuritas o supervivencia celular).

La capacidad de un anticuerpo antagonista anti-NGF candidato para bloquear o neutralizar una actividad biológica de NGF también puede evaluarse controlando la capacidad del agente candidato para inhibir la supervivencia mediada por NGF en el bioensayo de supervivencia de ganglios de la raíz dorsal de rata embrionaria como se describe en Hongo y col., Hybridoma 19:215-227 (2000).

#### Administración de un anticuerpo antagonista anti-NGF

El anticuerpo antagonista anti-NGF puede administrarse a un individuo (para artritis reumatoide y osteoartritis) por cualquier vía adecuada. Debería resultar evidente para un experto en la materia que no se pretende que los ejemplos descritos en el presente documento sean limitantes sino ilustrativos de las técnicas disponibles. En consecuencia, en algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF se administra a un individuo de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como una embolada o por infusión continua durante un período de tiempo, por las vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intraarticular, sublingual, intrasinovial, mediante insuflación, intratecal, oral, inhalación o tópica. La administración puede ser sistémica, por ejemplo, administración intravenosa, o localizada. Los nebulizadores disponibles en el mercado para formulaciones líquidas, incluyendo nebulizadores a chorro y nebulizadores ultrasónicos son útiles para administración. Pueden nebulizarse directamente formulaciones líquidas y puede nebulizarse polvo liofilizado después de reconstitución. Como alternativa, puede aerosolizarse el anticuerpo antagonista anti-NGF usando una formulación de fluorocarbono y un inhalador de dosis medida, o inhalarse como un polvo liofilizado y molido.

En una realización, se administra un anticuerpo antagonista anti-NGF mediante técnicas de suministro local específicas de sitio o dirigidas. Los ejemplos de técnicas de suministro local específico de sitio o dirigido incluyen diversas fuentes de depósito implantable del anticuerpo antagonista anti-NGF o catéteres de suministro local, tales como catéteres de infusión, un catéter permanente o un catéter de aguja, injertos sintéticos, vendajes adventicios, derivaciones (shunts) y endoprótesis vasculares u otros dispositivos implantables, vehículos específicos de sitio, inyección directa o aplicación directa. Véase, por ejemplo, la publicación de PCT N° WO 00/53211 y la patente de Estados Unidos 5.981.568.

Pueden usarse diversas formulaciones de un anticuerpo antagonista anti-NGF para administración. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF puede administrarse puro. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF y un excipiente farmacéuticamente aceptable pueden estar en diversas formulaciones. Se conocen en la técnica excipientes farmacéuticamente aceptables y son sustancias relativamente inertes que facilitan la administración de una sustancia farmacológicamente eficaz. Por ejemplo, un excipiente puede dar forma o consistencia, o actuar como un diluyente. Los excipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, agentes estabilizadores; agentes humectantes y emulsionantes, sales para variar la osmolaridad, agentes de encapsulación, tampones y potenciadores de la penetración de la piel. Se exponen excipientes, así como formulaciones para suministro parenteral y no parenteral de fármacos, en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20A Ed. Mack Publishing (2000).

En algunas realizaciones, estos agentes se formulan para administración por inyección (por ejemplo, por vía

intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscular, etc.). En consecuencia, estos agentes pueden combinarse con vehículos farmacéuticamente aceptables tales como solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y similares. El régimen de dosificación particular, es decir, la dosis, temporización y repetición, dependerá del individuo particular y de la historia médica de ese individuo.

5 Puede administrarse un anticuerpo anti-NGF usando cualquier procedimiento adecuado, incluyendo por inyección (por ejemplo, por vía intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscular, etc.). También pueden administrarse anticuerpos anti-NGF mediante inhalación, como se describe en el presente documento. En general, para la administración de anticuerpos anti-NGF, una dosificación candidata inicial puede ser de aproximadamente 2 mg/kg. Para el fin de la presente invención, una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente cualquiera de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a 3 mg/kg, a 30 mg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, puede administrarse un anticuerpo anti-NGF a aproximadamente 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , aproximadamente 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , aproximadamente 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , aproximadamente 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , aproximadamente 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , aproximadamente 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , aproximadamente 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , aproximadamente 1 mg/kg o aproximadamente 2 mg/kg. Para administraciones repetidas durante varios días o más largas, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de síntomas o hasta que se consiguen niveles terapéuticos suficientes para reducir el dolor. Un régimen de dosificación ejemplar comprende administrar una dosis inicial de aproximadamente 2 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 1 mg/kg del anticuerpo anti-NGF, o seguida de una dosis de mantenimiento de aproximadamente 1 mg/kg cada dos semanas. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación, dependiendo del patrón de desintegración farmacocinética que el facultativo desee conseguir. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se contempla dosificar de una a cuatro veces por semana. El progreso de la terapia de la presente invención se controla fácilmente por técnicas y ensayos convencionales. El régimen de dosificación (incluyendo el antagonista o los antagonistas anti-NGF usados) puede variar a lo largo del tiempo.

Para el fin de la presente invención, la dosificación apropiada de un anticuerpo antagonista anti-NGF dependerá del anticuerpo antagonista anti-NGF (o composiciones del mismo) empleado, el tipo y gravedad del dolor que va a tratarse, si el agente se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, la historia clínica del paciente y la respuesta al agente y la discreción del médico a cargo. Típicamente el especialista clínico administrará un anticuerpo antagonista anti-NGF, hasta que se alcance una dosificación que consiga el resultado deseado. La dosis y/o frecuencia puede variar a lo largo del ciclo del tratamiento.

Las consideraciones empíricas, tales como la semivida, generalmente contribuirán a la determinación de la dosificación. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos que son compatibles con el sistema inmune humano, tales como anticuerpos humanizados o anticuerpos completamente humanos, para prolongar la semivida del anticuerpo y prevenir que el anticuerpo sea atacado por el sistema inmune del huésped. La frecuencia de administración puede determinarse y ajustarse a lo largo del ciclo de terapia y se basa, en general pero no necesariamente, en el tratamiento y/o supresión y/o alivio y/o retardo del dolor. Como alternativa, pueden ser apropiadas formulaciones de liberación continua prolongada de anticuerpos antagonistas anti-NGF. Se conocen en la técnica diversas formulaciones y dispositivos para conseguir la liberación prolongada.

En una realización, pueden determinarse las dosificaciones para un anticuerpo antagonista anti-NGF de forma empírica en individuos a los que se han proporcionado una o más administraciones de un anticuerpo antagonista anti-NGF. Se proporciona a los individuos dosificaciones crecientes de un anticuerpo antagonista anti-NGF. Para evaluar la eficacia de un anticuerpo antagonista anti-NGF, puede seguirse un indicador de dolor.

La administración de un anticuerpo antagonista anti-NGF de acuerdo con el procedimiento de la presente invención puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, del estado fisiológico del receptor, de si el fin de la administración es terapéutico o profiláctico y de otros factores conocidos por los facultativos expertos en la materia. La administración de un anticuerpo antagonista anti-NGF puede ser esencialmente continua durante un periodo de tiempo preseleccionado o puede ser en una serie de dosis espaciadas, por ejemplo, antes, durante o después de desarrollar el dolor; antes; durante; antes y después; durante y después; antes y durante; o antes, durante y después de desarrollar el dolor.

En algunas realizaciones, puede estar presente más de un anticuerpo antagonista anti-NGF. Puede estar presente al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o más anticuerpos antagonistas anti-NGF diferentes. Generalmente, estos anticuerpos antagonistas anti-NGF tienen actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí.

Las formulaciones terapéuticas del anticuerpo antagonista anti-NGF usado de acuerdo con la presente invención se preparan para almacenamiento mezclando un anticuerpo que tenga el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20<sup>a</sup> Ed. Mack Publishing (2000)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas y pueden comprender tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; sales tales como cloruro sódico; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio;

fenol, butilo o alcohol bencílico; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albumina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína-Zn); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Los liposomas que contienen el anticuerpo antagonista anti-NGF se preparan por procedimientos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688 (1985); Hwang, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030 (1980); y Patentes de Estados Unidos N° 4.485.045 y 4.544.545. Se desvelan liposomas con tiempo de circulación potenciado en la Patente de Estados Unidos N° 5.013.556. Pueden generarse liposomas particularmente útiles por el procedimiento de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado.

Los principios activos también puede atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo) respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20ª Ed. Mack Publishing (2000).

Pueden prepararse preparaciones de liberación prolongada. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación prolongada incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos moldeados, por ejemplo películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación prolongada incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(alcohol vinílico), polilactidas (Patente de Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y 7 etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), acetato isobutirato de sacarosa y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones para usarse para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Generalmente las composiciones de anticuerpo antagonista anti-NGF terapéuticas se ponen en un recipiente que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden estar en formas farmacéuticas unitarias tales como comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones, en supositorios, para administración oral, parenteral, o rectal, o administración por inhalación o insuflación.

Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, el principio activo principal se mezcla con un vehículo farmacéutico, por ejemplo, ingredientes de preparación de comprimidos convencionales tales como almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato dicálcico o gomas, y otros diluyentes farmacéuticos, por ejemplo agua, para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable no tóxica del mismo. Cuando se hace referencia a estas composiciones de preformulación como homogéneas, se entiende que el principio activo se dispersa uniformemente por toda la composición de modo que la composición puede subdividirse fácilmente en formas farmacéuticas unitarias igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta composición de preformulación sólida se subdivide después en formas farmacéuticas unitarias del tipo descrito anteriormente que contienen de 0,1 a aproximadamente 500 mg del principio activo de la presente invención. Los comprimidos o píldoras de la nueva composición pueden revestirse o formar compuestos de otro modo para proporcionar una forma farmacéutica que proporcione la ventaja de acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender un componente de dosificación interna y uno de dosificación externa, estando este último en forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden separarse por una capa entérica que sirve para resistir la disgregación en el estómago y permite que el componente interno pase intacto al duodeno o se retarde su liberación. Puede usarse una diversidad de materiales para tales capas o revestimientos entéricos, incluyendo tales materiales varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Los agentes tensioactivos adecuados incluyen, en particular, agentes no iónicos, tales como polioxietilensorbitanes (por ejemplo, Tween™ 20, 40, 60, 80 u 85) y otros sorbitanes (por ejemplo, Span™ 20, 40, 60, 80 u 85). Las composiciones con un agente tensioactivo comprenderán convenientemente entre 0,05 y 5 % de agente tensioactivo y pueden ser entre 0,1 y 2,5 %. Se apreciará que pueden añadirse otros ingredientes, por ejemplo manitol u otros vehículos farmacéuticamente aceptables, si fuera necesario.

5 Pueden prepararse emulsiones adecuadas usando emulsiones de grasa disponibles en el mercado, tales como Int-alipidTM, LiposynTM, InfonutrolTM, LipofundinTM y LipiphysanTM. El principio activo puede estar disuelto en una composición de emulsión premezclada o como alternativa puede estar disuelto en un aceite (por ejemplo, aceite de soja, aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de maíz o aceite de almendra) y una emulsión puede formarse tras mezclar con un fosfolípido (por ejemplo, fosfolípidos del huevo, fosfolípidos de soja o lecitina de soja) y agua. Se apreciará que pueden añadirse otros ingredientes, por ejemplo glicerol o glucosa, para ajustar la tonicidad de la emulsión. Las emulsiones adecuadas típicamente contendrán hasta 20 % de aceite, por ejemplo, entre 5 y 20 %. La emulsión grasa puede comprender gotas de grasa entre 0,1 y 1,0  $\mu\text{m}$ , particularmente 0,1 y 0,5  $\mu\text{m}$  y tienen un pH en el intervalo de 5,5 a 8,0.

10 Las composiciones de emulsión pueden ser las preparadas mezclando un anticuerpo de factor de crecimiento nervioso con IntralipidTM o los componentes del mismo (aceite de soja, fosfolípidos del huevo, glicerol y agua).

15 Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se ha expuesto anteriormente. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por la vía respiratoria oral o nasal para efecto local o sistémico. Pueden nebulizarse composiciones en disolventes farmacéuticamente aceptables preferentemente estériles mediante el uso de gases. Las soluciones nebulizadas pueden respirarse directamente desde el dispositivo nebulizador o el dispositivo nebulizador puede unirse a una máscara facial, tienda o máquina de respiración de presión positiva intermitente. Pueden administrarse composiciones en solución, suspensión o polvo, preferentemente por vía oral o vía nasal, a partir de dispositivos que suministran a la formulación de una manera apropiada.

20 La eficacia del tratamiento puede evaluarse por procedimientos bien conocidos en la técnica.

#### **KITS QUE COMPREDEN ANTICUERPOS Y POLINUCLEÓTIDOS DE LA INVENCIÓN**

25 La invención también proporciona kits que comprenden anticuerpos o polipéptidos para su uso en detección y/o terapia. En consecuencia, en algunas realizaciones, los kits comprenden un anticuerpo E3. En algunas realizaciones, el kit comprende cualquier anticuerpo o polipéptido descrito en el presente documento.

30 En otros aspectos, los kits pueden usarse para cualquiera de los procedimientos y usos descritos en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, para tratar a un individuo con dolor osteoartístico. Los kits de la presente invención están en un envase adecuado, y pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales tales como tampones e instrucciones para uso del anticuerpo en cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, los kits incluyen instrucciones para tratar el dolor. En algunas realizaciones, el kit comprende un anticuerpo antagonista anti-NGF descrito en el presente documento e instrucciones para tratar dolor osteoartístico en un individuo. En algunas de las realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF es anticuerpo E3.

35 En otro aspecto, la invención proporciona kits que comprenden un polinucleótido que codifica un polipéptido E3 como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, los kits comprenden adicionalmente instrucciones para uso del polinucleótido en cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

#### **PROCEDIMIENTOS PARA AJUSTAR LA AFINIDAD DE UN ANTICUERPO Y PROCEDIMIENTOS PARA CARACTERIZAR UNA CDR**

40 Los inventores han desarrollado un nuevo procedimiento para caracterizar una CDR de un anticuerpo y/o alterar (tal como mejorar) la afinidad de unión de un polipéptido, tal como un anticuerpo, denominado "mutagénesis de exploración de bibliotecas". Generalmente, la mutagénesis de exploración de bibliotecas funciona como sigue. Una o más posiciones de aminoácido en la CDR se reemplazan con dos o más (tales como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20) aminoácidos usando procedimientos reconocidos en la técnica. Esto genera pequeñas bibliotecas de clones (en algunas realizaciones, una por cada posición de aminoácido que se analice), cada una con una complejidad de dos o más miembros (si se sustituyen dos o más aminoácidos en cada posición). En general, la biblioteca también incluye un clon que comprende el aminoácido nativo (no sustituido). Se explora un pequeño número de clones, por ejemplo, aproximadamente 20-80 clones (dependiendo de la complejidad de la biblioteca) de cada biblioteca con respecto a afinidad de unión por el polipéptido diana, y se identifican candidatos con unión aumentada, la misma, reducida o ninguna. Se conocen bien en la técnica procedimientos para determinar la afinidad de unión. En algunas realizaciones, la afinidad de unión se determina usando análisis de resonancia de plasmón superficial BIAcore, que detecta diferencias en la afinidad de unión de aproximadamente 2 veces o más. BIAcore es particularmente útil cuando el anticuerpo de partida ya se une con una afinidad relativamente alta, por ejemplo una  $K_D$  de aproximadamente 10 nM o más baja. Se describe exploración usando resonancia de plasmón superficial BIAcore en los Ejemplos, en el presente documento.

55 En otras realizaciones, la afinidad de unión se determina usando Kinexa Biocensor, ensayos de proximidad de centelleo, ELISA, inmunoensayo ORIGEN (IGEN), interrupción de fluorescencia, transferencia de fluorescencia y/o

presentación de levadura. En otras realizaciones, la afinidad de unión se explora usando un bioensayo adecuado.

En algunas realizaciones, cada posición de aminoácido en una CDR se reemplaza (en algunas realizaciones, una cada vez) con los 20 aminoácidos naturales usando procedimientos de mutagénesis reconocidos en la técnica (algunos de los cuales se describen en el presente documento). Esto genera pequeñas bibliotecas de clones (en algunas realizaciones, una por cada posición de aminoácido que se analiza), cada una con una complejidad de 20 miembros (si los 20 aminoácidos se sustituyen en cada posición).

En algunas realizaciones, la biblioteca para explorar comprende sustituciones en dos o más posiciones, que pueden estar en la misma CDR o en dos o más CDR. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la biblioteca comprende sustituciones en dos o más posiciones en una CDR. En otras realizaciones, la biblioteca comprende sustitución en dos o más posiciones en dos o más CDR. En otras realizaciones más, la biblioteca comprende sustitución en 3, 4, 5 o más posiciones, dichas posiciones halladas en dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR. En algunas realizaciones, la sustitución se prepara usando codones de baja redundancia. (Véase, por ejemplo, Tabla 2 de Balint y col., (1993) Gene 137 (1): 109-18).

En algunas realizaciones, la CDR es CDRH3 y/o CDRL3. En otras realizaciones, la CDR es una o más de CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 y/o CDRH3. En algunas realizaciones, la CDR es una CDR de Kabat, una CDR de Chothia o una CDR extendida.

Los candidatos con unión mejorada pueden secuenciarse, identificando de este modo un mutante de sustitución de CDR que da como resultado afinidad mejorada (también denominada sustitución "mejorada"). Por ejemplo, como se demuestra en el Ejemplo 1, el uso de este procedimiento permitió la identificación de una sustitución sencilla que mejoró la unión, incluso cuando otras 18 sustituciones estimadas en la misma posición de aminoácido no dieron como resultado unión (es decir, pérdida de función de anticuerpo). También pueden secuenciarse candidatos que se unen, identificando de este modo una sustitución de CDR que conserva la unión.

En algunas realizaciones, se realizan múltiples ciclos de exploración. Por ejemplo, los candidatos (comprendiendo cada uno una sustitución de aminoácido en una o más posiciones de una o más CDR) con unión mejorada también son útiles para el diseño de una segunda biblioteca que contenga al menos el aminoácido original y sustituido en cada posición de CDR mejorada (es decir, posición de aminoácido en la CDR en la que un mutante de sustitución mostró unión mejorada). La preparación, y exploración o selección de esta biblioteca se analiza adicionalmente posteriormente.

La mutagénesis de exploración de bibliotecas también proporciona un medio para caracterizar una CDR, siempre que la frecuencia de clones con unión mejorada, la misma unión, unión reducida o ninguna unión también proporcionen información relacionada con la importancia de cada posición de aminoácido para la estabilidad del complejo anticuerpo-antígeno. Por ejemplo, si una posición de la CDR conserva unión cuando se cambia a los 20 aminoácidos, esa posición se identifica como una posición que probablemente no se requiera para unión de antígenos. Por el contrario, si una posición de CDR conserva unión en solamente un pequeño porcentaje de sustituciones, esa posición se identifica como una posición que es importante para función de CDR. Por lo tanto, los procedimientos de mutagénesis de exploración de bibliotecas generan información con respecto a posiciones en las CDR que pueden cambiarse a muchos aminoácidos diferentes (incluyendo los 20 aminoácidos) y posiciones en las CDR que no pueden cambiarse o que pueden cambiarse solamente a unos pocos aminoácidos. Este aspecto se analiza y se ejemplifica en el Ejemplo 1.

En algunas realizaciones, se combinan candidatos con afinidad mejorada en una segunda biblioteca, que incluye el aminoácido mejorado, el aminoácido original en esa posición y puede incluir además sustituciones adicionales en esa posición, dependiendo de la complejidad de la biblioteca que se desee, o se permite usando el procedimiento de exploración o selección deseado. Además, si se desea, la posición de aminoácido adyacente puede seleccionarse de forma aleatoria de al menos dos o más aminoácidos. La selección aleatoria de aminoácidos adyacentes puede permitir flexibilidad conformacional adicional en la CDR mutante, que puede a su vez permitir o facilitar la introducción de un número mayor de mutaciones de mejora. En algunas realizaciones, la biblioteca también comprende sustitución en posiciones que no mostraron afinidad mejorada en el primer ciclo de exploración.

La segunda biblioteca se explora o selecciona con respecto a miembros de biblioteca con afinidad de unión mejorada y/o alterada usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo exploración usando análisis de resonancia de plasmón superficial BIAcore y selección usando cualquier procedimiento conocido en la técnica para selección, incluyendo presentación de fagos, presentación de levadura y presentación de ribosomas.

#### *Ventajas de los procedimientos para ajustar la afinidad de un anticuerpo y caracterizar una CDR*

Los procedimientos son útiles para pre-explorar posiciones de aminoácidos de CDR para identificar sustituciones de aminoácidos que mejoran la unión o conserva la unión. La pre-identificación de restos importantes, sustitución que mejora la unión y/o sustituciones que conservan la función del anticuerpo permite el diseño y la exploración eficaces de una biblioteca de maduración de afinidad.

El presente procedimiento también es útil para caracterizar una CDR y proporciona información exhaustiva con

respecto a la importancia de cada posición de aminoácido en una CDR para unión a antígeno. El presente procedimiento también puede usarse para identificar sustituciones que mejoran la unión.

5 El uso de pequeñas bibliotecas, en las que cada posición puede seleccionarse de forma aleatoria (en algunas realizaciones, una cada vez), permite la exploración de mutantes de sustitución usando procedimientos sensibles tales como BIAcore que proporcionan información cinética detallada. Los procedimientos de exploración son generalmente poco prácticos cuando se exploran bibliotecas más grandes. En su lugar, se usan habitualmente procedimientos de selección, tales como presentación de fagos, presentación de levadura y presentación de ribosomas, para identificar clones que conservan la unión. Los ensayos de presentación de fagos y ELISA pueden depender en gran medida de la concentración de la muestra de proteína preparada a partir del clon y por lo tanto tienden a desviarse fuertemente hacia clones que tienen expresión aumentada, estabilidad aumentada o toxicidad reducida, en lugar de identificar clones con afinidad de unión aumentada. Además, las diferencias del nivel de expresión de los clones pueden enmascarar pequeñas mejoras en la afinidad de unión. Estas desventajas son particularmente agudas cuando se usa un anticuerpo con alta afinidad de unión como el material de partida, debido a que deben usarse niveles muy bajos de antígeno para que la exploración sea suficientemente rigurosa.

15 Por el contrario, los procedimientos de la invención, tales como selección aleatoria en cada posición (en algunas realizaciones, una posición cada vez), permite la introducción y caracterización del efecto de la sustitución de, por ejemplo, los 20 aminoácidos en una posición dada. Este análisis proporciona información sobre cuántas sustituciones se toleran en una posición dada (es decir, conservan unión de anticuerpo), que, a su vez, proporciona información con respecto a la importancia de cada aminoácido para la función de los anticuerpos. Además, pueden identificarse sustituciones que dan como resultado unión mejorada, incluso en circunstancias en las que muchas o la mayoría de las sustituciones en una posición dada producen anticuerpos no funcionales (sin unión). Por el contrario, la mutagénesis de exploración de alanina, que se usa habitualmente para identificar posiciones de CDR importantes, proporciona información con respecto a si la sustitución de alanina permite o evita la unión. En general, se retiran posiciones en las que una sustitución de alanina evite la unión de la biblioteca de maduración de afinidad. En muchos casos, sin embargo, la alanina puede ser un sustituto poco eficaz en la posición de CDR.

Los presentes procedimientos también permiten la identificación y caracterización del efecto de mutaciones de CDR sencillas. Por el contrario, procedimientos tales como presentación de fagos introducen y seleccionan muchas mutaciones simultáneamente, y de este modo aumentan potencialmente el riesgo de que las mutaciones positivas se enmascaren por la presencia de una mutación perjudicial presente en un clon particular.

30 Los presentes procedimientos también son útiles para mejorar la afinidad conservando aún la especificidad de unión del anticuerpo original (de partida), en la medida en que los presentes procedimientos permiten la identificación de pequeños números de mutaciones (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 mutaciones en una CDR sencilla) que dan como resultado afinidad de unión mejorada. Por el contrario, procedimientos tales como presentación de fagos típicamente mejoran la afinidad de unión usando múltiples mutaciones a la vez, lo que puede dar como resultado desplazamiento de la especificidad del anticuerpo y/o aumento de reactividad cruzada no deseable.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar, pero no para limitar, la invención.

## Ejemplos

### *Ejemplo 1: Humanización y maduración de afinidad de anticuerpo antagonista anti-NGF 911 de ratón*

#### **A. Procedimientos generales**

40 Se usaron los siguientes procedimientos generales en este ejemplo.

#### **Generación de bibliotecas**

Se generaron bibliotecas por mutagénesis de casete de PCR con oligonucleótidos degenerados como se describe en Kay y col (1996), Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual, San Diego, Academic Press (véase, páginas 277-291). El codón de adición NNK se usó para seleccionar de forma aleatoria una posición de aminoácido para incluir 20 posibles aminoácidos. Para seleccionar de forma aleatoria una posición de aminoácido para incluir solamente un subconjunto de aminoácidos con propiedades específicas, se usaron codones de adición como se describe en Balint y col., (1993) Gene 137 (1):109-18). Se realizó mutagénesis dirigida usando PCR recombinante como se describe en Innis y col. (1990) PCR protocols: A guide to methods and applications (véase, páginas 177-183).

#### **Preparación de Fab a pequeña escala**

Se optimizó la expresión a pequeña escala en placas de 96 pocillos con respecto a exploración de bibliotecas de Fab. A partir de *E. coli* transformadas con una biblioteca de Fab, se seleccionaron colonias para inocular tanto una placa maestra (agar LB + ampicilina (50 µg/ml) + glucosa 2 %) y una placa de trabajo (2 ml/pocillo, 96 pocillos/placa que contienen 1,5 ml de LB + ampicilina (50 µg/ml) + glucosa 2 %). Ambas placas se cultivaron a 30 °C durante 8-12 horas. La placa maestra se almacenó a 4 °C y las células de la placa de trabajo se sedimentaron a 5000 rpm y se

resuspendieron con 1 ml de LB + ampicilina (50 µg/ml) + IPTG 1 mM para inducir expresión de Fab. Las células se recogieron por centrifugación después de 5 horas de tiempo de expresión a 30 °C, después se resuspendieron en 500 µl de tampón HBS-EP (tampón HEPES 100 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, P20 0,005 %, EDTA 3 mM). Se obtuvo lisis de células resuspendidas en HBS-EP por un ciclo de congelación (-80 °C) y después descongelación a 37 °C.

5 Los lisados celulares se centrifugaron a 5000 rpm durante 30 minutos para separar los residuos celulares de los sobrenadantes que contenían Fab. Los sobrenadantes se inyectaron después en el aparato de resonancia de plasmón BIAcore para obtener información de afinidad para cada Fab. Se rescataron clones que expresaban Fab de la placa maestra para secuenciar el ADN y para producción de Fab a gran escala y caracterización detallada como se describe posteriormente.

#### 10 **Preparación de Fab a gran escala**

Para obtener parámetros cinéticos detallados, se expresaron Fab y se purificaron a partir de cultivos grandes. Se inocularon matraces de Erlenmeyer que contenían 200 ml de LB + ampicilina (50 µg/ml) + glucosa 2 % con 5 ml de cultivo de una noche de un clon de *E. coli* que expresa Fab seleccionado. Los clones se incubaron a 30 °C hasta que se consiguió una  $DO_{550\text{ nm}}$  de 1,0 y después se indujeron reemplazando con el medio 200 ml de LB + ampicilina (50 µg/ml) + IPTG 1 mM. Después de 5 horas de tiempo de expresión a 30 °C, las células se sedimentaron por centrifugación, después se resuspendieron en 10 ml de PBS (pH 8). Se obtuvo lisis de las células por dos ciclos de congelación/descongelación (a -80 °C y 37 °C, respectivamente). El sobrenadante de los lisados celulares se cargó en columnas de sepharose superflow Ni-NTA (Qiagen, Valencia, CA) equilibradas con PBS, pH 8, después se lavaron con 5 volúmenes de columna de PBS, pH 8. Los Fab individuales eluyeron en diferentes fracciones con PBS (pH 8) + imidazol 300 mM. Las fracciones que contenían Fab se agruparon y dializaron en PBS, después se cuantificaron por ELISA antes de caracterización de afinidad.

#### 20 **Preparación de anticuerpo completo**

Para expresión de anticuerpos completos, se clonaron regiones variables de cadena pesada y ligera en 2 vectores de expresión de mamíferos (Eb.911.E3 o Eb.pur.911.3E para cadena ligera y Db.911.3E para cadena pesada; descritos en el presente documento) y se transfectaron usando lipofectamina en células HEK 293 para expresión transitoria. Los anticuerpos se purificaron usando proteína A usando procedimientos convencionales.

#### 25 **Ensayo de Biacore**

Se determinaron las afinidades de Fab y anticuerpos monoclonales anti-NGF usando el sistema de resonancia de plasmón superficial (SPR) BIAcore3000™ (BIAcore, INC, Piscaway NJ). Se activaron microplacas CM5 con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diluyó NGF humano en acetato sódico 10 mM pH 4,0 y se inyectó sobre la microplaca activada a una concentración de 0,005 mg/ml. Usando tiempo de flujo variable a través de los canales de microplacas individuales, se consiguieron dos intervalos de densidad de antígenos: 100-200 unidades de respuesta (UR) para estudios cinéticos detallados y 500-600 UR para ensayos de exploración. La microplaca se bloqueó con etanolamina. Los estudios de regeneración mostraron que una mezcla de tampón de elución de Pierce (Nº de producto 21004, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) y NaCl 4 M (2:1) retiró eficazmente el Fab unido manteniendo a la vez la actividad de hNGF en la microplaca durante más de 200 inyecciones. Se usó tampón HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15, EDTA 3 mM, tensioactivo P29 0,005 %) como tampón de ejecución para todos los ensayos de BIAcore.

#### 30 **Ensayo de exploración**

Se optimizó un ensayo de exploración BIAcore para determinar la afinidad de los clones de Fab de las bibliotecas. Se inyectaron sobrenadantes de lisados de cultivo pequeños a 50 µl/minuto durante 2 minutos. Se usaron tiempos de disociación de 10 a 15 minutos para determinación de una tasa de disociación exponencial sencilla ( $k_{\text{off}}$ ) usando software BIAevaluation. Las muestras que mostraron tasas de  $k_{\text{off}}$  en el mismo intervalo que el molde usado para crear la biblioteca (clon 8L2-6D5,  $k_{\text{off}} 1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) se inyectaron para confirmación y se permitieron tiempos de disociación de hasta 45 minutos para obtener mejores valores de  $k_{\text{off}}$ . Los clones que mostraban valores de  $k_{\text{off}}$  mejorados (más lentos) se expresaron a gran escala y se determinaron los parámetros cinéticos completos,  $k_{\text{on}}$  y  $k_{\text{off}}$ , en proteína purificada. El ensayo fue capaz de detectar diferencias en la afinidad que eran aproximadamente 2 veces o mayores.

#### 35 **Ensayo de determinación de afinidad**

Se inyectaron diluciones seriadas ( $K_D$  estimada 0,1-10 x) de muestras de Fab purificadas durante 1 minuto a 100 µl/minuto y se permitieron tiempos de disociación de hasta 2 horas. Las concentraciones de las proteínas Fab se determinaron por ELISA y/o electroforesis de SDS-PAGE usando como un patrón un Fab de concentración conocida (como se determinó por análisis de aminoácidos). Se obtuvieron tasas de asociación ( $k_{\text{on}}$ ) y tasas de disociación ( $k_{\text{off}}$ ) cinéticas simultáneamente ajustando los datos a un modelo de unión de Langmuir 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). Methods Enzymology 6. 99-110) usando el programa BIAevaluation. Se calcularon los valores de constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) como  $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ .

*B. Humanización y maduración de afinidad de anticuerpo antagonista anti-NGF 911 de ratón*

El anticuerpo antagonista anti-NGF de ratón, 911 (véase Hongo y col., (2000) *Hybridoma* 19(3):215-227) se seleccionó para humanización y maduración de afinidad. Mab 911 se une a NGF humano y de rata con alta afinidad y no muestra reactividad cruzada significativa con las neurotrofinas NT3, NT4/5 o BDNF. Véase Hongo, misma fuente. La afinidad del fragmento Fab escindido por papaína de Mab 911 de ratón se determinó usando análisis de BIAcore como se ha descrito anteriormente. El fragmento Fab escindido por papaína de Mab 911 de ratón se unió a NGF humano con una  $K_D$  de aproximadamente 10 nM.

Se realizó humanización y maduración de afinidad en varias etapas, como sigue:

**(1) Preparación de molde con injerto de CDR.** Las CDR escindidas de cadena ligera del anticuerpo 911 (es decir, incluyendo las regiones CDR tanto de Kabat como de Chothia) se injertaron en las secuenciasceptoras de línea germinal humana 08 con JK2 y las CDR extendidas de cadena pesada del anticuerpo 911 se injertaron en la secuencia aceptora de línea germinal humana VH4-59 con JH4. Las secuencias de aminoácidos de las secuenciasceptoras de línea germinal humana se muestran en las Figuras 1A y 1B. La numeración de los aminoácidos es secuencial. Usando las regiones marco proteicas observadas anteriormente, se diseñaron secuencias de ADN para genes sintéticos que codificaban regiones marco humanas con las CDR murinas. Estos dominios variables pesados y ligeros humanizados se denominaron hVH y hVL respectivamente. Los codones se optimizaron para uso en hámster y *E. coli*. Se usaron varios oligonucleótidos solapantes (69-90 bases de longitud) que se extendían por la longitud completa del hVL y hVH con dos cebadores flanqueantes cortos para cada cadena para sintetizar de forma separada los dos genes por PCR recursiva esencialmente como se describe en Prodromou y col., (1992) *Protein Eng* 5(8): 827-9. Se purificaron en gel fragmentos de ADN resultantes de la longitud correcta y después se clonaron en un plásmido de expresión bicistrónico de *E. coli* (resistente a ampicilina). La expresión de los anticuerpos estaba bajo el control de un promotor lacZ inducible por IPTG similar al descrito en Barbas (2001) *Phage display: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press (véase Vector pComb3X, a pg 2,10), sin embargo, las modificaciones incluían adición y expresión de los siguientes dominios adicionales: el dominio constante de cadena ligera Kappa humano (véase N° de Acceso de GenBank CAA09181) y el dominio constante CHI de inmunoglobulina humana IgG2a (N° de Acceso de GenBank P01859).

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo con CDR injertada (también denominado el "molde"), denominado 8L2-4D5, también se muestran en las Figuras 1A y 1B. La afinidad de 8L2-4D5 se determinó usando análisis de BIAcore como se ha descrito anteriormente. 8L2-4D5 se unió a NGF humano con una  $K_D$  de aproximadamente 38 nM.

**(2) Introducción de una mutación puntual en la secuencia marco.** La sustitución V71K se introdujo en la cadena pesada con CDR injertada usando mutagénesis dirigida por PCR recombinante como se describe en Innis y col., (1995) *PCR strategies*, San Diego, Academic Press. Esta sustitución reemplazó el resto marco humano con el resto marco de ratón correspondiente. El anticuerpo resultante se denominó 8L2-6D5, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 8L2-6D5 se muestra en la Figura 1A. La afinidad de 8L2-6D5 se determinó usando análisis de BIAcore como se ha descrito anteriormente. El fragmento Fab de 8L2-6D5 se unió a NGF humano con una  $K_D$  de aproximadamente 15 nM. 8L2-6D5 se seleccionó como el molde de maduración de afinidad.

**(3) Humanización y maduración de afinidad de las CDR L1, L2, H1 y H2.** Se sometió a las CDR L1, L2, H1 y H2 a humanización y maduración de afinidad. Se identificaron posiciones de aminoácidos en CDR L1, L2, H1 y H2 que no eran esenciales para la estructura de las CDR basándose en la estructura canónica de Chothia (véase Al-Lazikani y col. (1997) *J. Mol. Biol.* 273(4): 927-48); y se sometieron a selección aleatoria como sigue. Se prepararon dos bibliotecas que contenían las mutaciones de cadena ligera o mutaciones de cadena pesada mostradas en la Tabla 2, y las CDR L3 o CDR H3 injertadas (de ratón), respectivamente, usando mutagénesis de casete de PCR con oligonucleótidos degenerados como se describe en Kay y col. (1996), *Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual*, San Diego, Academic Press, usando codones de adición como se describe en Balint y col., (1993) *Gene* 137(1): 109-18). Generalmente, los restos de aminoácidos se alteraron a restos que son más habituales en anticuerpos humanos, basándose en alineamientos de las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo 911 con secuencias de anticuerpo de línea germinal humana. El resto de aminoácido de tipo silvestre (no sustituido) también se representó en la biblioteca con la excepción del resto de CDR H2 50, una metionina, en el que la metionina de tipo silvestre no estaba representada en la biblioteca. Los restos de metionina se someten a oxidación; por lo tanto, se esperaba que el reemplazo de ese resto mejorara la estabilidad del anticuerpo resultante. Las bibliotecas de Fab se clonaron en vector pComb3X más las regiones CH1 y C $\kappa$  humanas, como se ha descrito anteriormente.

**Tabla 2:**

CDR-H1

I34 se cambio a F, L, V, S, P, T, A o I

1. Biblioteca de H1/H2 de cadena pesada:

N35 se cambió a N, T, S o Y

CDR-H2

M50 se cambió a los 20 aminoácidos naturales

A62 se cambió a A o S

L63 se cambió a L o V

CDR-L1

2. Biblioteca de L1/L2 de cadena ligera

S26 se cambió a S, A, V o F

D28 se cambió a D, A, S o Y

H32 se cambió a H, N, K, D, E, Q o Y

CDR-L2

Y50 se cambió a Y, D, A o S

I51 se cambió a I, T, A o V

F54 se cambió a F o L

S56 se cambió a S y T

- 5 Para experimentos de exploración de afinidad, cada biblioteca se emparejó adicionalmente con la cadena ligera o pesada con injerto de CDR correspondiente (por ejemplo, la biblioteca H1/H2 se emparejó con cadena ligera con injerto de CDR), el anticuerpo se expresó y la afinidad por NGF humano de los clones individuales se exploró usando el sistema de resonancia de plasmón superficial (SPR) de BIACORE (BIAcore, Inc. Piscataway, NJ) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y como se ha descrito anteriormente. Se determinaron las  $k_{off}$ ,  $k_{on}$  y  $K_D$ . Los clones de anticuerpos se clasificaron basándose en las tasas de  $k_{off}$ , puesto que en general se ve la mayor variación de afinidad en las tasas  $k_{off}$  y además porque las tasas de  $k_{off}$  son independientes de la concentración de anticuerpo.
- 10 Se determinó la secuencia de los clones que se unían y la secuencia de clones que se unían se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3:** secuencias de aminoácidos de L1 y L2, secuencias de aminoácidos de H1 y H2 y datos cinéticos para clones que se unieron después de la exploración de afinidad de clones de bibliotecas H1/H2 o L1/L2.

<b>Datos cinéticos de mutantes CDR 1-2</b>				
Clones de biblioteca de cadena ligera Emparejados con cadena pesada 8L2	secuencia de AA de CDRL1	secuencia de AA de CDRL2	$k_{off}$ (s- 1)	* $K_D$ (nM)
8L2-6D5 (control)	RASQDISNHLN (SEC ID N° 12)	YISRFHS (SEC ID N° 13)	**1e-3	25
L129	RASQISISNNLN (SEC ID N° 18)	YTSRFHS (SEC ID N° 19)	4,5e-4	11
L208	RASQYISNHLN (SEC ID N° 20)	YTSRFHS (SEC ID N° 21)	4,6e-4	11

(continuación)

L97	RASQSISNQLN (SEC ID N° 22)	YVSRFHS (SEC ID N° 23)	5,6e-4	14
L81	RAFQAISNQLN (SEC ID N° 24)	YISRFHT (SEC ID N° 25)	7,4e-4	18
L6	RAFQSISNQLN (SEC ID N° 26)	YASRFHS (SEC ID N° 27)	8,2e-4	20
8L2-6D5 (control)	GFSLIGYDIN (SEQ ID N° 9)	MIWGDGTTDYNSAL (SEC ID N° 10)	1e-3	25
H109	GFSLIGYDSN (SEC ID N° 28)	IIWGDGTTDYNSAL (SEC ID N° 29)	1,6e-4	4
H19	GFSLIGYDLN (SEC ID N° 30)	IIWGDGTTDYNSAV (SEC ID N° 31)	2,4e-4	6
H222	GFSLIGYDVT (SEC ID N° 32)	GIWGDGTTDYNSAV (SEC ID N° 33)	3,8e-4	9,5
H225	GFSLIGYDVT (SEC ID N° 34)	GIWGDGTTDYNSSV (SEC ID N° 35)	3,8e-4	9,5
H18	GFSLIGYDAT (SEC ID N° 36)	GIWGDGTTDYNSAV (SEC ID N° 37)	4,2e-4	10,5
H9	GFSLIGYDVS (SEC ID N° 38)	IIWGDGTTDYNSSV (SEC ID N° 39)	4,1e-4	10,2
H227	GFSLIGYDIS (SEC ID N° 40)	QIWGDGTTDYNSSV (SEC ID N° 41)	5,4e-4	13,5
H17	GFSLIGYDAS (SEC ID N° 42)	GIWGDGTTDYNSSV (SEC ID N° 43)	6,1e-4	15,2
H28	GFSLIGYDST (SEC ID N° 44)	SIWGDGTTDYNSAL (SEC ID N° 45)	7,5e-4	18,7
Los aminoácidos en negrita se seleccionaron de forma aleatoria como se ha indicado anteriormente				
*KD calculada usando $k_{on} 4e4 M^{-1}s^{-1}$				
**Por conveniencia, "e" como se usa en el presente documento indica "x10". Por lo tanto, 4e4 significa de forma intercambiable $4 \times 10^4$ .				

Las CDR que contenían las siguientes sustituciones conservaron la unión:

CDR-H1

- 5 134: S, L, V, I y A unido.  
N35: N, T y S unido.

CDR-H2

- M50: M, I, G, Q, S L unido.  
A62: A y S unido.  
L63: L y V unido.

10

CDR-L1

- S26: S y F unido.  
D28: D, S, A, Y unido.  
H32: H, N, Q unido.

CDR-L2

Y50: Y unido.  
 I51: I, T, V, A unido.  
 F54: F unido.  
 S56: S y T unido.

Las CDR que contenían las siguientes sustituciones se seleccionaron basándose en general en la afinidad de unión y se combinaron en un clon sencillo, denominado H19-L129:

CDR-H1: I34L; N35N (sin cambios)  
CDR-H2: M50I; A62A (sin cambios); L63V  
CDR-L1: S26S (sin cambios); D28S; H32N  
CDR-L2: Y50Y (sin cambios); I51T; F54F (sin cambios); S56S (sin cambios)

Estas mutaciones se combinaron (amplificando las cadenas H y L por PCR, cortando los productos de PCR y el vector (pRN8) con enzima de restricción y realizando una ligación de 3 fragmentos) en un clon sencillo, denominado H19-L129, que también incluía las CDR injertadas H3 y L3. La frecuencia de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de H19-L129 se muestra en las Figuras 1A y 1B, y la Tabla 4 muestra la secuencia de aminoácidos de las CDR L1, L2, H1 y H2. H19-L129 se unió a NGF con una KD de aproximadamente 1 nM, como se determinó usando análisis de BIAcore como se describe en el presente documento.

**Tabla 4:** secuencia de aminoácidos de las CDR H1, H2, L1 y L2 y datos cinéticos para el clon combinado H19-L129,

Clon de combinación: mutaciones en las CDR H1, H2, L1, L2	secuencia de AA de CDRL1 CDRH1	secuencia de AA de CDRL2 CDRH2	k <sub>off</sub> (s <sup>-1</sup> )	*K <sub>D</sub> (nM)
H19-L129	CDR-L1:RASQSI>NNLN(SEC ID N° 18) CDR H1: GFSLIGYDLN(SEC ID N° 30)	CDRL2:YTSRFHS(SEC ID N° 19) CDR- H2:IIWGDGTTDYNSAV(SEC ID N° 31)	1,1e-4	3,5
*KD calculada usando k <sub>on</sub> 4e4 M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>				

**(4) Maduración de afinidad de CDR H3 y L3.** Se llevó a cabo maduración de afinidad de las CDR H3 y L3 en dos etapas. En primer lugar, en un procedimiento denominado “mutagénesis de exploración de bibliotecas”, cada resto de aminoácido en H3 y L3 se exploró previamente de forma individual para identificar posiciones de aminoácidos en las que una mutación dio como resultado aumento de la afinidad de unión con NGF humano. Basándose en los resultados de la mutagénesis de exploración de bibliotecas (también denominada “análisis de selección aleatoria de biblioteca pequeña”), un subconjunto de posiciones de aminoácidos en H3 y L3 se seleccionó para preparación de la biblioteca de maduración de afinidad y la biblioteca de maduración de afinidad se exploró con respecto a afinidad por NGF humano usando análisis de BIAcore como se ha descrito en el presente documento. Se aprecia que estas técnicas pueden aplicarse de forma general.

**(a) Mutagénesis de exploración de bibliotecas**

Cada posición de aminoácido en las CDR H3 y L3 se exploró previamente de forma individual con respecto a sustituciones que daban como resultado aumento de la afinidad de unión por NGF humano. La frecuencia de sustituciones de aminoácidos en cualquier posición dada que dio como resultado unión mejorada, la misma unión, peor unión o ninguna unión proporcionó información relacionada con posiciones en las CDR que pueden cambiarse a muchos aminoácidos diferentes (incluyendo los 20 aminoácidos) y posiciones en las CDR que no pueden cambiarse o que solamente pueden cambiarse a unos pocos aminoácidos. También se identificaron sustituciones de aminoácidos que daban como resultado afinidad de unión mejorada. Basándose en los resultados de esta exploración, se seleccionó un subconjunto de posiciones de aminoácidos en las CDR H3 y L3 para preparación de una biblioteca de maduración de afinidad.

Se prepararon bibliotecas de Fab individuales en las que cada aminoácido de CDR L3 y H3 se seleccionó de forma aleatoria de los 20 aminoácidos, uno cada vez, dando como resultado varias bibliotecas pequeñas (5 bibliotecas para la cadena ligera y 13 bibliotecas para la cadena pesada), cada una con una complejidad de 20 posibilidades de aminoácidos en cada posición de aminoácido. En todos los casos, el aminoácido nativo (es decir, no cambiado) se representó en la biblioteca. Se prepararon bibliotecas por mutagénesis de casete de PCR con oligonucleótidos degenerados como se describe en Kay y col. (1996), Phage display of Peptides and Proteins: a laboratory manual, San Diego, Academic Press, usando el codón de adición NNK para seleccionar de forma aleatoria una posición de aminoácido para incluir 20 posibles aminoácidos. El 8L2-6D5 (el anticuerpo con injerto de CDR, que tiene la mutación de región marco V71K) actuó como el molde para la construcción de bibliotecas debido a que la afinidad

más baja del anticuerpo con injerto de CDR permitió una detección más fácil de diferencias de la afinidad en mutantes H3 y L3 durante la exploración. Por lo tanto, cada miembro de una biblioteca contenía una CDR3 (H3 o L3) con una sustitución de aminoácido y 5 CDR injertadas.

5 Se exploraron 20-80 clones de cada biblioteca pequeña usando análisis de BIAcore como se ha descrito en el presente documento. Las muestras se analizaron simultáneamente por BIAcore con respecto a afinidad de unión por NGF en un canal de la microplaca de BIAcore y con respecto a la presencia de Fab por unión con un anticuerpo con marcador penta-his en otro canal de la microplaca sensora para detectar el marcador his en el extremo C-terminal de la cadena pesada. Los clones que expresaban la proteína se clasificaron como con la misma afinidad, peor afinidad, mejor afinidad o sin unión, usando koff para clasificar. Los resultados de este análisis se muestran en la  
10 Tabla 5.

**Tabla 5:** Los clones que expresaron proteínas se clasificaron como con la misma afinidad, peor afinidad, mejor afinidad o sin unión basándose en koff.

mutación	mejor 1e-3<	igual ≥ 1e-3, 2e-3<	Peor ≥ 2e-3	sin unión	Porcentaje de AA que conserva la capacidad de unión
<b>Cadena ligera</b>					
L_S91X	13 %	40 %	20 %	26 %	50 %
L_K92X		100 %			~100 %
L_T93X		93 %	7 %		93 %
L_L94X		40 %	60 %		40 %
L_Y96X		13 %	80 %	7 %	13 %
<b>Cadena pesada</b>					
H_G98X		50 %	37 %	13 %	50 %
H_G99X		46 %	54 %		46 %
HY100X		26 %		73 %	26 %
H_Y101X	6 %		12 %	82 %	6 %
H Y102X		7 %	25	68 %	7 %
H_G103X	4 %	21 %	16 %	58 %	25 %
H_T104X		20 %	30 %	50 %	20 %
H S105X	10 %	25 %	26 %	39 %	35 %
H Y106X		75 %	25 %		75 %
H_Y107XX		8 %	46 %	46 %	8 %
H F108X		23 %	27 %	50 %	23 %
H D109X		29 %	46 %	25 %	29 %
H_Y110X		90 %	5 %	5 %	90 %

15 Se determinó la secuencia de todos los clones con afinidad mejorada, revelando la frecuencia e identidad de sustituciones de aminoácidos que dieron como resultado afinidad aumentada. Además, se seleccionaron unos pocos clones que conservaban una afinidad similar al clon 812-6D5 de cada biblioteca, para determinar las sustituciones de secuencia de aminoácidos que se permitían en una posición dada, incluso aunque la sustitución no aumentó necesariamente la afinidad de unión. Los resultados de este análisis se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6.

<b>Mutaciones de CDR H3</b>	$k_{off}(s^{-1})$	$K_D'(nM)$
(molde 8L2-6D5, que incluye la secuencia de aminoácidos CDR-H3 del anticuerpo 911: GGYYYGTSYYFDY (SEC ID N° 11))	1E-3	25
Y100L	1,2E-3	30
Y100R	1,1E-3	27
Y101W	5,6E-4	14
G103A	1,6E-4	4
T104S	2,2E-3	55
S105A	5,1E-4	13
S105T	6,4E-4	16
Y106R	1,6E-3	40
Y106T	2,0E-3	50
Y106M	2,7E-3	67
Y107F	1,4E-3	35
F108W	1,22E-3	30
D109N	1,5E-3	37
D109G	1E-3	25
Y110K	1,4E-3	35
Y110S	1,5E-3	37
Y110R	1,6E-3	40
Y110T	1,7E-3	42
S91E	2,5E-4	6
Y96R	1,7E-3	42
*KD calculada usando $k_{on} 4e4 M^{-1}s^{-1}$		

Varias mutaciones dieron como resultado afinidad de unión aumentada. Al menos las siguientes mutaciones dieron como resultado afinidad de unión significativamente aumentada en comparación con el molde 8L2-6D5: (H\_Y101W (secuencia de CDR GGYWYGTSYYFDY (SEC ID N° 46)); H\_S105A (secuencia de CDR GGYYYGTAYYFDY (SEC ID N° 47)); H\_S105T (secuencia de CDR GGYYYGTTYFDY (SEC ID N° 48)); H\_G103A (secuencia de CDR GGYYYATSYYFDY (SEC ID N° 49); y L\_S91E (secuencia de CDR QQEKTLPYT (SEC ID N° 50)).

Los resultados de este experimento se usaron para guiar la selección de posiciones de aminoácidos para generación de las bibliotecas de maduración de afinidad.

Este experimento también proporcionó información con respecto a la frecuencia de sustituciones de aminoácidos en cualquier posición dada que dieron como resultado unión mejorada, la misma unión, peor unión o ninguna unión, como se muestra en la Tabla 5. Esta información permitió la identificación de posiciones de aminoácidos en las CDR que podrían cambiarse a muchos aminoácidos diferentes (incluyendo los 20 aminoácidos) y posiciones en las CDR que podrían cambiarse a unos pocos aminoácidos o muy pocos aminoácidos (en algunas realizaciones, ningún aminoácido). Estos resultados también demostraron sustituciones de aminoácidos que aumentaron la afinidad de unión.

#### (b) Maduración de afinidad

A continuación, los resultados del análisis de selección aleatoria de bibliotecas pequeñas (anteriormente) se usaron para seleccionar restos para producción de las bibliotecas H3 y L3 para maduración de afinidad de las CDR H3 y L3.

Los restos Y101 y G103 de CDR H3 y restos S91 y K92 de CDR L3 se seleccionaron para producción de las bibliotecas H3 y L3 para maduración de afinidad de las CDR H3 y L3.

5 Esta biblioteca combinó mutaciones en H3 y L3 a la vez en el clon con injerto de CDR 8L2-6D5, y de forma separada en el fondo de H19-L129, y tuvo una diversidad de 80 clones diferentes. La Tabla 7 muestra los restos de aminoácidos seleccionados para sustitución y los aminoácidos que se sustituyeron en cada posición.

**Tabla 7.** Restos de aminoácidos en H3 y L3 seleccionados para sustitución y los aminoácidos que se sustituyeron en cada posición

**CDR-H3:**

Y101 se cambió a Y y W, C. (obsérvese que se incluyó C porque el uso de codón TRS en un oligonucleótido degenerado también generaba codón C).

G103 se cambió a A, P, S

**CDR-L3:**

S91 se cambió a E.

K92 se cambió a los veinte aminoácidos. A, R, K y H unidos.

10 Cada polipéptido se expresó como un Fab y la afinidad por NGF humano de 96 clones individuales se exploró para cada biblioteca usando análisis de BIACORE de acuerdo con las instrucciones del fabricante y como se ha descrito anteriormente. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8.**

<b>Mutaciones de COMBINACIÓN de CDR L3 H3</b> (molde 8L2-6D5)	$k_{off}$ (s <sup>-1</sup> ) 1E-3	$K_D^*$ (nM) 25
L_S91E; L_K92A(secuencia de CDR QQEATLPYT (SEC ID N° 51))H_Y101W; H_G103A(secuencia de CDR GGYWYATSYFFDY (SEC ID N° 52))	5,5E-4	13
L_S91E; L_K92R(secuencia de CDR QQERTLPYT (SEC ID N° 53))H_Y101W; H_G103A(secuencia de CDR GGYWYATSYFFDY (SEC ID N° 54))	1,0E-4	25
<b>Mutaciones de COMBINACIÓN de CDR L3 H3</b> (molde H19-L129, H1H2L1L2 madurado)	$k_{off}$ (s <sup>-1</sup> ) 1,1e-4	$K_D^*$ (nM)
L_S91E; L_K92H(secuencia de CDR QQEHTLPYT (SEC ID N° 55))H_Y101W; H_G103A(secuencia de CDR GGYWYATSYFFDY (SEC ID N° 56))(CLONE E3)	1,2E-5	0,3
L_S91E; L_K92S(secuencia de CDR QQUESTLPYT (SEC ID N° 57))H_Y101W; H_G103S(secuencia de CDR GGYWYSTSYFFDY (SEC ID N° 58))	4,7E-5	1,1
L_S91E; L_K92K(secuencia de CDR QQEKTLPYT (SEC ID N° 59)) H_Y101Y; H_G103A(secuencia de CDR GGYYYATSYFFDY (SEC ID N° 60))	2E-5	0,5
L_S91E; L_K92R(secuencia de CDR QQERTLPYT (SEC ID N° 61))H_Y101W; H_G103A(secuencia de CDR GGYWYATSYFFDY (SEC ID N° 62))(CLONE 3C)	1,4E-5	0,35
L_S91E; L_K92R(secuencia de CDR QQERTLPYT (SEC ID N° 63))H_Y101Y; H_G103A(secuencia de CDR GGYYYATSYFFDY (SEC ID N° 64))	1,5E-5	0,37
*KD calculada usando $k_{on}$ 4e4 M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>		

Basándose en la afinidad de unión, los mejores clones, E3 (denominado de forma intercambiable "3E") y 3C, se seleccionaron para caracterización adicional. E3 comprendía las siguientes sustituciones de CDR: CDR-H3: Y101W, G103A; y CDR-L3: S91E, K92H, que se combinaron en un clon sencillo que también incluía las siguientes mutaciones L1, L2, H1 y H2:

- 5           CDR-H1: I34L;  
               CDR-H2: M50I; L63V;  
               CDR-L1: D28S; H32N;  
               CDR-L2: I51T.

10           La secuencia de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de E3 se muestra en las Figuras 1A y 1B. 3C comprendía las siguientes sustituciones de CDR: CDR-L3: S91E; K92R; CDR-H3: Y101W; G103A, que se combinaron en un clon sencillo que también incluía las mutaciones de L1, L2, H1 y H2 descritas para el clon E3.

Se clonaron secuencias de 3E y 3C en vectores de expresión de mamíferos para producción de Fab y anticuerpo completo, y se expresaron en células HEK293 y se purificaron usando cromatografía de proteína A o Ni-NTA. La proteína pura se cuantificó de forma precisa por análisis de aminoácidos.

15           Las afinidades de unión por NGF humano de Fab E3 y 3C se midieron usando análisis de BIAcore de acuerdo con las instrucciones del fabricante y como se ha descrito anteriormente, excepto que se usaron 100 UR de NGF en microplaca para evitar un efecto de nueva unión. Brevemente, se inyectaron varias concentraciones de anticuerpos (Fab) durante 2 minutos en una microplaca CM5 con 100 UR de NGF humano inmovilizado en ella y se permitió que se disociara durante 1.800 segundos. El anticuerpo de ratón 911 (Fab) se analizó como un control. Los datos se analizaron usando software BIAevaluation siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados del análisis del anticuerpo E3 y 911 se muestran en las Figuras 9 y 10. E3 se unió a NGF humano con una KD de aproximadamente 0,07 nM (con una  $k_{on}$  de aproximadamente  $6,0e5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  y a  $k_{off}$  de aproximadamente  $4,2e^{-5} \text{ s}^{-1}$ ). 3C se unió a NGF humano con una KD de aproximadamente 0,35 nM (con una  $k_{off}$  de aproximadamente  $1,4E^{-5}$ ). Por el contrario, el anticuerpo de ratón 911 se unió a NGF con una KD de 3,7 nM,  $k_{off}$  de  $8,4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  y  $k_{on}$  de  $2,2 \times 10^4 \text{ Ms}^{-1}$ .

25           El anticuerpo E3 (denominado de forma intercambiable 3E) se seleccionó para análisis adicional basándose en la alta afinidad de unión. Para ensayar la capacidad de E3 para evitar la interacción de NGF con los receptores de NGF trkA y p75, se premezcló NGF humano 2,5 nM y se incubó durante una hora con anticuerpo E3 de 0 a 50 nM (Fab). Después de la incubación, las muestras se inyectaron a 10 ul/minuto en una microplaca CM5 de BIAcore que contenía 260 UR de p75 (canal 2) y 600 UR de trkA (canal 3), y se determinó el porcentaje de unión. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 11. El aumento de las concentraciones de Fab E3 bloqueó la interacción de NGF tanto con p75 como con trkA, como se muestra por reducción de la señal (medida en UR), que indica que Fab E3 bloquea la interacción de NGF tanto con trkA como con p75. Cuando la concentración de anticuerpo E3 (Fab) igualó la concentración de NGF (a concentración de NGF aproximadamente 2,5 nM), no se observó unión de NGF (como se muestra por una señal de cero). El hecho de que se produjera cero por ciento de unión NGF-receptor cuando la concentración de NGF era igual a la concentración de anticuerpo 3E sugirió que NGF 2,5 nM era al menos diez veces más alto que la KD de E3 para NGF y en equilibrio.

**Ejemplo 2: evaluación de la capacidad de bloqueo de NGF de los anticuerpos anti-NGF usando ensayo de supervivencia de neuronas trigeminales de E13.5 de ratón**

40           La capacidad de Fab E3 o anticuerpo completo E3 para bloquear la actividad de NGF se evaluó midiendo la capacidad del anticuerpo para inhibir la supervivencia dependiente de NGF de neuronas trigeminales E13.5 de ratón *in vitro*. El ganglio trigeminal está comprendido por neuronas sensoriales cutáneas que inervan la región facial. La supervivencia de neuronas trigeminales E13.5 de ratón es un ensayo sensible para evaluar la actividad de bloqueo de NGF de anticuerpos antagonistas anti-NGF debido a que se requiere NGF para soportar la supervivencia de estas neuronas. Por ejemplo, a concentraciones en saturación de NGF, la supervivencia es cercana al 100 % a las 48 horas en cultivo. Por el contrario, menos del 5 % de las neuronas sobreviven a las 48 horas en ausencia de NGF.

50           El ensayo de supervivencia se realizó como sigue: se sacrificaron ratones hembra Swiss Webster embarazadas coincidentes en el tiempo por inhalación de CO<sub>2</sub>. Los cuernos uterinos se retiraron y se extrajeron los embriones en la etapa embrionaria E13.5 y se decapitaron. Los ganglios trigeminales se disociaron usando agujas de tungsteno afiladas de forma electrolítica. Después los ganglios se tripsinizaron, se disociaron de forma mecánica y se sembraron a una densidad de 200-300 células por pocillo en medio definido sin suero en placas de 96 pocillos revestidas con poli-L-orнитina y laminina.

55           La actividad de bloqueo de Fab o anticuerpos anti-NGF se evaluó añadiendo a las neuronas trigeminales diversas dosis de anticuerpos anti-NGF Mab 911 (Fab), 8L2-6D5; H19-L129; E3 y 3C; y NGF humano o de rata a las siguientes concentraciones: 0,4 ng/ml (~15 pM; esta concentración representó una concentración de saturación de NGF para la supervivencia) y 0,04 ng/ml (~1.5 pM; esta concentración es aproximadamente la CI50). Después de 48 horas en cultivo, las células se sometieron a un protocolo de inmunocitoquímica automático realizado en una estación de trabajo de manipulación de líquidos Biomek FX (Beckman Coulter) como sigue: fijación usando formaldehído 4 %, sacarosa 5 % y PBS; permeabilización usando Triton X-100 0,3 % en PBS; bloqueo de sitios de

unión no específicos usando suero de cabra normal 5 %, BSA 0,11 % en PBS; e incubación secuencial con anticuerpos primarios y secundarios para detectar neuronas. El anticuerpo primario fue anticuerpo policlonal de conejo frente al producto génico proteico 89,5 (PGP9.5, Chemicon), un marcador fenotípico neuronal establecido. El anticuerpo secundario fue anti-conejo de cabra Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), junto con el colorante nuclear Hoechst 33342 (Molecular Probes) para marcar los núcleos de todas las células presentes en el cultivo. Se realizó adquisición de imágenes y análisis de imágenes en un instrumento de captura de imágenes Discovery-I/GenII (Universal Imaging Corporation). Se adquirieron imágenes automáticamente a dos longitudes de onda para Alexa Fluor 488 y Hoechst 33342, usándose la tinción nuclear como punto de referencia para el sistema de enfoque automático basado en imágenes del instrumento de captura de imágenes, puesto que la tinción nuclear está presente en todos los pocillos. Se seleccionaron objetivos apropiados y número de sitios de los que se capturaron imágenes por pocillo para abarcar la superficie completa de cada pocillo. El análisis de imágenes automático se preparó para contar el número de neuronas presente en cada pocillo después de 48 horas en cultivo basándose en su tinción específica con el anticuerpo anti-PGP9.5. La umbralización cuidadosa de la imagen y aplicación de filtro de selectividad basado en intensidad de fluorescencia y morfología dio como resultado un conteo preciso de neuronas por pocillo.

Los resultados de este experimento demostraron que Fab E3 bloqueó la actividad de NGF con una alta afinidad. Los resultados se muestran en las Figura 4-6 y Tabla 9.

La Figura 4 es una gráfica que muestra la supervivencia dependiente de NGF de neuronas E13.5 en presencia de diversas concentraciones de NGF humano y de rata.

La Figura 5 es una gráfica que compara el efecto de bloqueo de NGF de diversos Fab en presencia de NGF humano 0,04 ng/ml (aproximadamente 1,5 pM; mostrado en el panel inferior) o NGF humano 0,4 ng/ml (aproximadamente 15 pM; mostrado en el panel superior). NGF 1,5 pM era aproximadamente la CE50 de NGF que promueve supervivencia, mientras que 15 pM representaba una concentración de saturación de NGF. La supervivencia de neuronas trigeminales de ratón E13.5 en diversas concentraciones de Fab E3; Fab murino 911; y Fab H19-L129 y Fab 8L2-6D5 se evaluó como se ha descrito anteriormente. La CI50 (en pM) se calculó para cada Fab a cada concentración de NGF y se muestra en la Tabla 9. Fab E3 bloqueó fuertemente la supervivencia de neuronas trigeminales dependientes de NGF humano con una CI50 de aproximadamente 21 pM en presencia de NGF humano 15 pM y una CI50 de aproximadamente 1,2 pM en presencia de NGF 1,5 pM. Los Fab 3C y H19-L129 también bloquearon fuertemente la supervivencia de neuronas trigeminales dependientes de NGF humano.

La Figura 6 es una gráfica que compara el efecto de bloqueo de NGF de diversos Fab en presencia de NGF de rata 0,04 ng/ml (aproximadamente 1,5 pM; mostrado en el panel inferior) o NGF de rata 0,4 ng/ml (aproximadamente 15 pM; mostrado en el panel superior). NGF 1,5 pM era aproximadamente la CE50, mientras que 15 pM representaba una concentración de saturación de NGF. La supervivencia de neuronas trigeminales de ratón E13.5 en diversas concentraciones de Fab E3; Fab murino 911; y Fab H19-L129 y 8L2-6D5 se evaluó como se ha descrito anteriormente. La CE50 (en pM) se calculó para cada Fab a cada concentración de NGF y se muestra en la Tabla 9. Fab E3 bloqueó fuertemente la supervivencia de neuronas trigeminales dependiente de NGF humano, con una CI50 de aproximadamente 31,6 pM en presencia de NGF de rata 15 pM y una CI50 de aproximadamente 1,3 pM en presencia de NGF de rata 1,5 pM. Los Fab 3C y H19-L129 también bloquearon fuertemente la supervivencia de neuronas trigeminales dependiente de NGF de rata.

**Tabla 9:**

<b>NGF Humano</b>	CI50 (en presencia de NGF 15 pM)	CI50 (en presencia de NGF 1,5 pM)
	pM	pM
Fab 8L2-6D5	1580,5	461,8
Fab H19-L129	60,1	9,6
Fab 3E	<21,0	<1,2
Fab 3C	80,9	5,6
Fab 911	322,3	63,5
<b>NGF de Rata</b>	CI50 (NGF 15 pM)	CI50 (NGF 1,5 pM)
	pM	pM

(continuación)

Fab 8L2-6D5	730,3	169,4
Fab H19-L129	31,0	6,0
Fab 3E	<8,3	<1,3
Fab 3C	31,6	6,0
<b>NGF Humano</b>	CI50 (en presencia de NGF 15 pM)	CI50 (en presencia de NGF 1,5 pM)
Fab 911	161,0	34,6

5 En un experimento diferente, los inventores compararon la capacidad de anticuerpo completo E3 y Fab 3E para inhibir la supervivencia dependiente de NGF de neuronas E13.5 en presencia de NGF humano 0,4 ng/ml (concentración de saturación). Los resultados del análisis se muestran en la Figura 12. El anticuerpo completo E3 y Fab 3E mostraron niveles similares de inhibición de supervivencia dependiente de NGF cuando la concentración de anticuerpo completo y Fab se normalizó al número de sitios de unión a NGF (Fab tiene un sitio de unión y el anticuerpo completo tiene dos sitios de unión). Estos resultados demostraron que no hubo efecto en la avidéz debido a la unión de un anticuerpo completo con el dímero de NGF.

10 En otros experimentos, los inventores compararon la capacidad de diversas concentraciones (20, 4, 0,8, 0,16, 0,032, 0,0064, 0,00128 y 0,0 nM) del anticuerpo E3, anticuerpo 911 y una inmunoadhesina de receptor trkA (consistente en el dominio extracelular del receptor de NGF trkA fusionado con el dominio Fc de inmunoglobulina, CH2-CH3) para inhibir la supervivencia dependiente de NGF de neuronas E13.5 en presencia de 0,4 ng/ml (condiciones de saturación). Estos resultados se muestran en la Figura 13. Estos resultados demostraron que el anticuerpo E3  
15 bloqueó NGF mejor que el anticuerpo 911 o la inmunoadhesina de trkA.

*Ejemplo 3: Evaluación de la especificidad del anticuerpo anti-NGF E3 usando ensayos de supervivencia de neuronas nodosas y trigeminales de ratón*

20 La capacidad del anticuerpo E3 para bloquear específicamente la actividad de NGF se evaluó midiendo la capacidad del anticuerpo para inhibir la supervivencia de neuronas trigeminales E17/18 de ratón *in vitro* en presencia de concentraciones de saturación de NGF, la neurotrofina relacionada con NGF NT3 o el factor neurotrófico no relacionado con NGF, proteína estimuladora de macrófagos (MSP). La supervivencia de las neuronas trigeminales E17/18 de ratón es un ensayo sensible para evaluar la actividad de bloqueo de NGF de anticuerpos antagonistas anti-NGF debido a que se requiere NGF para soportar a supervivencia de estas neuronas a concentraciones más altas que el nivel de NGF requerido para soportar la supervivencia de neuronas TG E13.5. La supervivencia de estas  
25 neuronas también se soporta por NT3 o MSP; por lo tanto, la supervivencia de estas neuronas también es un ensayo sensible para evaluar si el anticuerpo antagonista anti-NGF también bloqueaba NT3 o MSP.

30 La capacidad del anticuerpo E3 para bloquear específicamente la actividad de NGF también se evaluó midiendo la capacidad del anticuerpo para inhibir la supervivencia de neuronas E17 nodosas de ratón en presencia de concentraciones en saturación de BDNF o NT4/5. La supervivencia de neuronas nodosas está apoyada por BDNF o NT4/5; por lo tanto, la supervivencia de estas neuronas es un ensayo sensible para evaluar la capacidad de bloqueo de BDNF o NT4/5 del anticuerpo antagonista anti-NGF.

35 El ensayo de supervivencia se realizó como sigue: se sacrificaron ratones hembra Swiss Webster embarazadas coincidentes en el tiempo por inhalación de CO<sub>2</sub>. Los cuernos uterinos se retiraron y los embriones (el día embrionario 17 o 18) se extrajeron y decapitaron. Los ganglios nodosos y trigeminales se diseccionaron y se limpiaron. Después los ganglios se tripsinizaron, se disociaron mecánicamente y se sembraron a una densidad de 100-300 células por pocillo en medio sin suero definido en placas de 4 pocillos (Greiner) revestidas con poli-L-ornitina y laminina.

40 Se dejaron crecer neuronas trigeminales E17/18 sin factores neurológicos añadidos (control negativo) o en presencia de concentraciones de saturación de NGF humano (400 pM y 15 pM) (control positivo); NT3 (400 pM); o MSP (600 pM). Se prepararon cultivos por duplicado que incluían diversas concentraciones de Fab y anticuerpos completos E3 y 911. La concentración de Fab y anticuerpos completos se indicó por sitio de unión (por ejemplo, un anticuerpo completo contiene dos sitios de unión, mientras que un Fab contiene un sitio de unión).

45 Se dejaron crecer las neuronas nodosas E17 en ausencia de factores neurotróficos añadidos (control negativo) o con concentraciones en saturación de BDNF (400 pM) (control positivo) o NT4/5 (400 pM) o factor de crecimiento no relacionado con NGF ILF (factor inhibidor de interleucina). Se usaron altas concentraciones de neurotrofinas, puesto que el objetivo de este experimento era ensayar la especificidad de los anticuerpos. Se prepararon cultivos por duplicado que incluían variación de nuevo con y sin la adición de anticuerpos E3 y 911. Después de 48 horas en cultivo, el número total de neuronas que sobrevivieron en cada pocillo en cada condición se determinó por conteo

manual usando un microscopio de contraste de fases.

Los resultados de estos experimentos demostraron que los anticuerpos E3 y 911 bloqueaban completamente los efectos promotores de la supervivencia de NGF en neuronas trigeminales E18. Por el contrario, los anticuerpos E3 y 911 no tuvieron efecto en la supervivencia de neuronas trigeminales promovida por NT3 o MSP, o supervivencia de neuronas nodosas promovida por BDNF, NT4/5 o LIF. Estos resultados demostraron que el anticuerpo E3 poseía especificidad selectiva para NGF, puesto que no hubo interacción detectada entre estos anticuerpos y otras neurotrofinas relacionadas con NGF (NT3, NT4/5, BDNF) a concentraciones de 1.000 veces a 10.000 veces más altas que la concentración eficaz para bloqueo de NGF. Además, estos resultados demostraron que la muerte neuronal vista en cultivos complementados con NGF de neuronas dependientes de NGF además del anticuerpo o Fab E3 se debía a una interacción específica entre estos anticuerpos y NGF y no se debía a un efecto tóxico generalizado. También se ensayó anticuerpo antagonista anti-NGF de ratón 911 y se observaron resultados similares. Obsérvese que debido a las altas concentraciones de neurotrofinas usadas, tanto el anticuerpo E3 como el 911 están muy cerca de sus condiciones de valoración y se esperaba que se unieran a NGF a niveles similares debido a que las diferencias de afinidad de unión de estos anticuerpos por NGF serían menos evidentes en estas condiciones.

Los resultados de estos experimentos se muestran en las Figuras 14, 15, 16 y 17. Los datos mostraron la media del porcentaje de supervivencia después de 48 horas en cultivo ( $\pm$  error típico de la media,  $n=3$  para cada punto de datos) en relación con la supervivencia vista en el control positivo para cada experimento (por ejemplo, 100 % de supervivencia de neuronas trigeminales crecidas en presencia de concentración de NGF en saturación y 100 % de supervivencia de neuronas nodosas crecidas en presencia de concentración de BDNF en saturación, respectivamente). Las Figuras 14-15 son gráficas que muestran que el anticuerpo antagonista anti-NGF E3 o Fab E3 no inhibió la supervivencia promovida por NT3, y MSP, incluso a concentraciones de anticuerpo tan altas como 200 nM. Por el contrario, el anticuerpo E3 o Fab 3E y Fab 911 20 nM bloquearon completamente la supervivencia inducida por NGF. También se ensayó anticuerpo antagonista anti-NGF de ratón 911 y se observaron resultados similares. Específicamente, la Figura 14 es una gráfica que muestra la comparación del efecto de diversas concentraciones (20 nM, 2 nM o 0,2 nM) de Fab E3 (denominado "3E" en la figura) y Fab de anticuerpo de ratón 911 en la supervivencia de neuronas trigeminales E18 sin neurotrofina añadida (denominada "control"), en presencia de NGF 400 pM (denominado "NGF 400 pM"), NT3 10 nM (denominado "NT3-10nM") o MSP 600 pM (denominado "MSP-600 pM"). La Figura 15 es una gráfica que representa la comparación del efecto de diversas concentraciones (200 nM y 80 nM) de Fab y anticuerpo completo E3 y Fab y anticuerpo completo de anticuerpo de ratón 911 en la supervivencia de neuronas trigeminales E17 sin neurotrofinas añadidas (denominado "sin factor"), en presencia de NGF 400 pM (denominado "NGF-400pM"), NT3 10 nM (denominado "NT3-10nM") o MSP 600 pM (denominado "MSP-600 pM").

Las Figuras 16-17 son gráficas que muestran que el anticuerpo antagonista anti-NGF E3 o Fab E3 no inhibieron la supervivencia de neuronas nodosas E17 promovida por BDNF, NT4/5 o LIF. También se ensayó el anticuerpo antagonista anti-NGF de ratón 911 y se observaron resultados similares. Específicamente, la Figura 16 es un gráfica que muestra comparación del efecto de diversas concentraciones (200 nM u 80 nM) del anticuerpo completo E3 (denominado "3E en la figura"), Fab E3, anticuerpo completo 911 o Fab 911 en la supervivencia de neuronas nodosas E17 sin neurotrofinas añadidas (denominado "sin factores"), en presencia de BDNF 400 pM (denominado "BDNF-400pM"), NT4/5 400 pM (denominado "NT4/5-400pM") o LIF 2,5 nM (denominado "LIP-2.5 nM"). La Figura 17 es un gráfica que muestra comparación del efecto de diversas concentraciones (200 nM, 20 nM, 2nM) de Fab E3 (denominado "3E en la figura"), o Fab 911 en la supervivencia de neuronas nodosas E17 sin neurotrofinas añadidas (denominado "control"), en presencia de BDNF 400 pM (denominado "BDNF-400pM"), NT4/5 400 pM (denominado "NT4/5-400pM") o LIF 2,5 nM (denominado "LIP-2.5 nM").

#### *Ejemplo 5: Preparación de vectores de expresión de mamíferos y expresión de anticuerpo E3 en células de mamífero*

Se diseñaron tres vectores de expresión de mamíferos y se construyeron para su uso en la expresión de anticuerpo E3 en células de mamífero.

El vector Db.911.3E es un vector de expresión que comprende la región variable de cadena pesada del anticuerpo E3 y la región constante de IgG2a humana, y es adecuado para expresión transitoria o estable de la cadena pesada. Db.911.3E consiste en secuencias de nucleótidos que corresponden a las siguientes regiones: la región promotora de citomegalovirus murino (nucleótidos 1-612); un intrón sintético (nucleótidos 619-1507); la región codificante de DHFR (nucleótidos 707-1267); péptido señal de la hormona del crecimiento humana (nucleótidos 1525-1602); región variable de cadena pesada de anticuerpo 3E (nucleótidos 1603-1965); región constante de IgG2a de cadena pesada humana que contiene las siguientes mutaciones: A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos con referencia a la secuencia de IgG2a de tipo silvestre; véase Eur. J. Immunol. (1999) 29: 2613-2624); señal de poliadenilación tardía de SV40 (nucleótidos 2974-3217); región potenciadora de SV40 (nucleótidos 3218-3463); región de fago fl (nucleótidos 3551-4006) y región codificante de beta lactamasa (AmpR) (nucleótidos 4443-5300). Db.911.3E se depositó en la ATCC el 8 de enero de 2003 y se le asignó el N° de Acceso de ATCC PTA-4895.

El vector Eb.911.3E es un vector de expresión que comprende la región variable de cadena ligera del anticuerpo E3

y la región constante de cadena kappa humana y es adecuado para expresión transitoria de la cadena ligera. Eb.911.3E consiste en secuencias de nucleótidos correspondientes a las siguientes regiones: la región promotora de citomegalovirus murino (nucleótidos 1-612); intrón humano EF-1 (nucleótidos 619-1142); péptido señal de hormona del crecimiento humana (nucleótidos 1173-1150); región variable de cadena ligera de anticuerpo E3 (nucleótidos 1251-1571); región constante de cadena kappa humana (nucleótidos 1572-1892); señal de poliadenilación tardía de SV40 (nucleótidos 1910-2153); región potenciadora de SV40 (nucleótidos 2154-2399); región de fago fl (nucleótidos 2487-2942) y región codificante de beta lactamasa (AmpR) (nucleótidos 3379-4236). Eb.911.3E se depositó en la ATCC el 8 de enero de 2003 y se le asignó el N° de Acceso de ATCC PTA-4893.

El vector Eb.pur.911.3E es un vector de expresión que comprende la región variable de cadena ligera del anticuerpo E3 y la región constante kappa humana y es adecuado para expresión estable de la cadena ligera. Eb.pur.911.3E consiste en secuencias de nucleótidos correspondientes a las siguientes regiones: la región promotora de citomegalovirus murino (nucleótidos 1-612); intrón humano EF-1 (nucleótidos 619-1758); región codificante del gen pac (puromicinaR) (nucleótidos 739-1235); región 5'UTR de hsp70 humano (nucleótidos 1771-1973); péptido señal de hormona del crecimiento humana (nucleótidos 1985-2062); región variable de cadena ligera de anticuerpo E3 (nucleótidos 2063-2383); región constante de cadena kappa humana (nucleótidos 2384-2704); señal de poliadenilación tardía de SV40 (nucleótidos 2722-2965); región potenciadora de SV40 (nucleótidos 2966-3211); región de fago f1 (nucleótidos 3299-3654) y región codificante de beta lactamasa (AmpR) (nucleótidos 4191-5048). Eb.pur.911.E3 se depositó en la ATCC el 8 de enero de 2003 y se le asignó el N° de Acceso de ATCC PTA-4894.

Se realizó expresión transitoria en células como sigue: se co-transfectaron de forma transitoria células CHO y HEK293T en placas de 150 mm con 25 ug de cada plásmido (es decir, un plásmido que contenía la cadena pesada y un plásmido que contenía la cadena ligera). El ADN se mezcló con 100 ul de lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se permitió que los complejos de ADN-lípido entraran en contacto con las células en medio DMEM/F12 sin suero o antibióticos durante 5 horas. Después de esta incubación, el medio se cambió para expresión a Opti-MEM (Invitrogen) sin ningún aditivo durante dos días. Los sobrenadantes celulares que contenían anticuerpos se recogieron secuencialmente hasta cuatro veces con reemplazo de medio posterior. Los sobrenadantes se purificaron por cromatografía de afinidad usando resina de Proteína A MapSelect (Amersham biosciences 17-5199-02). El anticuerpo se unió a la resina de proteína A en glicina 0,3 M, tampón de NaCl 0,6M a pH 8, después se eluyó con tampón citrato 0,1 M a pH 3. Las fracciones que contenían anticuerpos se neutralizaron inmediatamente con tampón Tris 1 M a pH 8,0. Después las fracciones de anticuerpo se dializaron y se concentraron en PBS.

*Ejemplo 6: El anticuerpo anti-NGF E3 es eficaz en el tratamiento de dolor postquirúrgico*

Los inventores usaron un modelo de dolor que se asemeja al dolor postquirúrgico para evaluar la eficacia del tratamiento con anticuerpo E3. El anticuerpo E3 comprendía la región constante de IgG2a de cadena pesada humana que contenía las siguientes mutaciones: A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos en referencia a la secuencia de IgG2a de tipo silvestre; véase Eur. J. Immunol. (1999) 29: 2613-2624); la región constante kappa de cadena ligera humana; y las regiones variables de cadena pesada y ligera mostradas en las Tablas 1A y 1B.

Animales. Se obtuvieron ratas macho Sprague Dawley que pesaban entre 220-240 gramos de Harlan (Wisconsin) y se aclimataron a las instalaciones animales durante una semana antes de la cirugía.

Cirugía. La cirugía se basó en el procedimiento descrito por Brennan, y col. Pain 64: 493-501 (1996). Se anestesió a los animales con una mezcla de isoflurano 2 % en aire que se mantuvo durante la cirugía a través de un cono nasal. La superficie plantar de la pata posterior derecha se preparó con una almohadilla de povidona-yodo y se realizó una incisión longitudinal central de 1 cm a través de la piel y la fascia, comenzando a 0,5 cm del borde del talón y extendiéndose hacia los dedos. Se realizaron mediciones con una regla con el pie mantenido en una posición flexionada. El músculo plantar se elevó usando fórceps curvados y se le realizó una incisión longitudinal. Se realizó una incisión en el músculo a través de su profundidad completa, entre el origen y la inserción. Se controló la hemorragia durante la cirugía mediante presión aplicada a través de una gasa. La herida se cerró con dos suturas con puntos colchoneros (monofilamento negro ethilon 5-0). Estas suturas se anudaron 5-6 veces, con el primer nudo atado ligeramente. El sitio de herida se limpió con un hisopo con solución de bacitracina. Se permitió que los animales se recuperaran y descansaran en jaulas limpias durante dos horas o más antes de que comenzara el ensayo conductual.

Evaluación de dolor en reposo. Se usó una puntuación de dolor acumulativa para evaluar el dolor relacionado con la carga de peso. Se situó a los animales en una malla plástica (rejilla: 8 mm<sup>2</sup>) en jaulas de plástico transparentes que se elevaron en una plataforma (h: 18") permitiendo la inspección de la parte inferior de sus patas. Después de un periodo de aclimatación de 20 minutos, se evaluó la carga de peso en una escala de 0 a 2. Se vio una puntuación de 0 si la pata se blanqueó o se presionó contra la malla, lo que indicaba carga de peso completa. Se dio una puntuación de 1 si la pata se favorecía con la piel apenas tocando la malla, sin blanqueamiento o indentación de la piel. Se dio una puntuación de 2 si la pata se mantenía completamente fuera de la malla. La retirada de la pata se consideró un 2 si la rata aún estaba en reposo. Cada animal se observó durante 1 minuto cada 5 minutos durante 30 minutos. Se usó la suma de 6 puntuaciones (0-12) obtenidas durante media hora para evaluar el dolor en la pata con incisión. También se calculó la frecuencia de puntuaciones de 2 y se usó para evaluar la incidencia de dolor grave o

protección total de la pata por el animal. Cada animal se ensayó 24 horas antes de la cirugía (línea basal) y 2 h, 24 h, 48 h y 72 h después de la operación. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 1, que representa la puntuación de dolor en reposo acumulativa observada en animales tratados con anticuerpo de ratón anti-NGF 911 35 mg/kg. Estos resultados demostraron que el tratamiento con anticuerpo anti-NGF redujo significativamente el dolor en reposo postquirúrgico. La carga de peso fue una buena correlación de la propensión del animal a usar la extremidad y por lo tanto fue una medida eficaz del alivio del dolor.

El anticuerpo E3 se inyectó por vía intraperitoneal (i.p.) a diversas concentraciones del anticuerpo (0,004, 0,01, 0,02, 0,1, 0,6 y 1 mg por kilogramo de peso del animal) a las 15 horas antes de la incisión. El grupo de control negativo no recibió anticuerpo pero se le inyectó i.p. una solución salina. Se inyectó fentanilo a 0,01 mg/kg i.p. como un control positivo 30 minutos antes de ensayar a las 24 horas después de la cirugía. Cada experimento implicó 8 animales (n=8 por grupo) para cada condición y el grupo de control tenía 56 animales. Se realizó cirugía y se midió una puntuación de dolor acumulativa como se ha descrito anteriormente. El dolor en reposo se evaluó 24 horas después de la cirugía.

Como se muestra en la Figura 7, el anticuerpo humanizado anti-NGF E3 redujo significativamente el dolor en reposo ( $p < 0,05$ ) después de la cirugía cuando se administró a una dosificación de 0,02 mg/kg a 1 mg/kg. Un “\*” indica una diferencia significativamente significativa del control ( $p < 0,05$ ). El tratamiento con 0,02 mg/kg alivió el comportamiento de dolor al menos tan eficazmente como el tratamiento con fentanilo 0,01 mg/kg. Esta dosis de fentanilo es 10 veces la dosis humana normal de este potente opioide.

En otro experimento, se ensayó la eficacia del anticuerpo E3 en la reducción de dolor postquirúrgico cuando se administró después de la cirugía. El anticuerpo E3 (0,5 mg/kg) se inyectó por vía intravenosa (i.v.) dos horas después de la cirugía. El grupo de control no recibió anticuerpo sino que se le inyectó i.v. una solución salina. Se realizó cirugía y se evaluó el dolor en reposo expresado como una puntuación de dolor acumulativa 24 horas después de la cirugía. Como se muestra en la Figura 8, el tratamiento con anticuerpo anti-NGF redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) el dolor en reposo a las veinticuatro horas después de incisión cuando el anticuerpo se administró 2 horas después de la incisión. Estos resultados demostraron que el anticuerpo E3 aliviaba eficazmente el dolor postquirúrgico cuando se administró después de la cirugía.

*Ejemplo 7: Evaluación de los efectos analgésicos de anticuerpo antagonista anti-NGF 911 en un modelo de rata de artritis reumatoide*

Los efectos analgésicos del anticuerpo anti-NGF 911 (véase Hongo y col., *Hybridoma* 19(3): 215-227 (2000)) en artritis crónica inducida por adyuvante completo de Freund (CFA) en ratas se investigaron usando el ensayo de vocalización, en comparación con indometacina usada como sustancia de referencia.

Se incluyeron cincuenta (50) ratas macho Lewis (LEWIS LEW / Crl Ico) (Charles River Bélgica) que pesaban de 150 g a 220 g al comienzo de la fase experimental en este estudio. Todos los animales se mantuvieron durante al menos 5 días antes del experimento y se albergaron en una habitación controlada con respecto a temperatura (19,5-24,5 °C), humedad relativa (45-65 %) y ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con acceso a voluntad a agua del grifo filtrada y pienso de laboratorio en microgránulos convencional (U.A.R., Francia) a lo largo del estudio. Los animales se identificaron individualmente en la cola.

El día 0 (D0), se indujo artritis en ratas por inyección intradérmica en la cola de 0,05 ml de una suspensión de *Mycobacterium butyricum* (Difco, Estados Unidos) en aceite mineral (10 mg/ml). El día 14 (D14), se incluyeron ratas artríticas en el estudio de acuerdo con su capacidad para vocalizar tras flexión suave de la pata trasera y por su índice artrítico, evaluado usando una mutación de inflamación para cada pata delantera y trasera (véase Kuzuna y col., *Chem. Pharm. Bull. (Tokio)* 23: 1184-1191 (1975); Pearson y col., *Arthritis Rheum.* 2: 440-459 (1959)). Se puntuó a los animales basándose en los siguientes criterios: Puntuación 0: aspecto normal; Puntuación 1: eritema; Puntuación 2: eritema con ligero edema; Puntuación 3: inflamación fuerte con anquilosis; Puntuación 4: anquilosis. Sólo se incluyeron animales capaces de vocalizar tras flexión suave y que presentaban una puntuación de 2 o 3 en el estudio.

Se incluyeron cuatro grupos de 10 ratas cada uno en el estudio. Para el grupo 1 (vehículo), el día 14 (D14), después de la selección, se administró por vía intravenosa a las ratas vehículo (solución salina). El día 18 (D18), se evaluó la intensidad nociceptiva por flexión suave de la pata trasera y se registró la intensidad del nivel de vocalización para cada animal. Para el grupo 2 (4 días), en D14, después de la selección, se administró por vía intravenosa a las ratas 911 (10 mg/kg). El día 18 (D18), se evaluó la intensidad nociceptiva por flexión suave de la pata trasera y se registró la intensidad del nivel de vocalización para cada animal. Para el grupo 3 (24 horas), el día 17 después de la inyección de CFA, se administró por vía intravenosa a las ratas 911 (10 mg/kg). Se evaluó la intensidad nociceptiva por flexión suave de la pata trasera 24 horas después y la intensidad del nivel de vocalización se registró para cada animal. Para el grupo 4 (indometacina), el día 18 (D18), se evaluó la intensidad nociceptiva por flexión suave de la pata trasera una hora después de administración oral de indometacina (10 mg/kg). La intensidad del nivel de vocalización también se registró para cada animal. Las sustancias de ensayo se administraron de una manera ciega y aleatoria por vía intravenosa en un volumen de 5 ml/kg, mientras que se administró indometacina por vía oral en un volumen de 10 ml/kg.

Los efectos analgésicos de anticuerpo anti-NGF 911 se muestran en la Tabla 10. Los resultados se expresaron para cada grupo como la intensidad nociceptiva evaluada, la intensidad del nivel de vocalización registrado para cada animal en mV (media  $\pm$  ETM) y el porcentaje de variación de la intensidad nociceptiva calculada a partir del valor medio del grupo tratado con vehículo. La significación estadística entre los grupos tratados y el grupo de vehículo se determinó con un ensayo de Dunnett usando la varianza residual después de análisis de varianza de una vía ( $P < 0,05$ ).

Tabla 10. Efectos analgésicos de 911 en artritis crónica inducida por adyuvante completo de Freund en ratas

Sustancias (Día de dosificación)	Vehículo (D14)	911 (D14)	911 (D17)	Indometacina (D18)
Dosis (mg/kg)		10	10	10
Intensidad nociceptiva (mV)	971,0 $\pm$ 116,2	234,7 $\pm$ 34,4*	247,2 $\pm$ 41,8*	145,8 $\pm$ 29,9*
% de variación	-	-76	-75	-85

Los resultados se expresan como media  $\pm$  etm  
n=10 ratas por grupo  
Día 0 (D0): Inducción de artritis Crónica por administración de CFA  
Vehículo: solución salina  
Se administró por vía intravenosa 911 (10 mg/kg) el D14 o D17 y se realizó medición del dolor el D18. Se proporcionó por vía oral indometacina (10 mg/kg) el D18 y se realizó medición del dolor una hora después de la dosificación. Ensayo de Dunnett: \* indica una diferencia significativa en comparación con el grupo tratado con vehículo para  $P < 0,05$

Como se muestra en la Tabla 10, el anticuerpo anti-NGF 911 redujo significativamente el dolor en un modelo de rata de artritis reumatoide 24 horas o 4 días después de una administración sencilla del anticuerpo.

#### 10 Ejemplo 8: Efectos farmacológicos de anticuerpo antagonista anti-NGF E3 y 911 en un modelo de rata de artritis reumatoide

Se investigaron los efectos farmacológicos (efectos antiinflamatorios y analgésicos) de anticuerpo antagonista anti-NGF E3 y 911 en un modelo de artritis crónica inducida por adyuvante completo de Freund (CFA) en ratas en comparación con indometacina usada como una sustancia de control positivo interno. Se evaluaron los efectos analgésicos de E3 y 911 por la medición de respuesta nociceptiva. Se evaluaron los efectos antiinflamatorios por volumen de pata, índice artrítico (puntuación de inflamación), peso corporal y de patas traseras. Al final del experimento se realizaron niveles de citocina en las patas (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ 1), TGF- $\beta$ 1 en circulación en suero, concentraciones de E3 y 911 en plasma, parámetros biológicos y radiografías de rayos X.

#### Protocolo experimental

##### 20 1. Diseño del estudio

Se incluyeron 80 ratas Lewis macho (LEWIS Lew / Ico) (Charles River Laboratories-Bélgica) de 5 semanas de edad en este estudio. Se albergaron en una habitación controlada con respecto a temperatura (19,5-24,5 °C) y humedad relativa (45-65 %) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, con acceso a voluntad a agua del grifo filtrada y pienso de laboratorio en micropartículas convencional (SAFE, Francia) a lo largo del estudio. Tras su recepción en las instalaciones animales, se albergaron 5 por jaula y se observó un periodo de aclimatación de 10 días antes de cualquier ensayo. Los animales se identificaron individualmente en la cola.

Se incluyeron cinco grupos de 10 animales (ratas LEWIS macho de 5 semanas de edad-LEWIS Lew/Ico, de Charles River Laboratories-Bélgica) cada uno en este estudio: Grupo 1: ratas no artríticas/solución salina (vehículo), embolada i.v., n=10; Grupo 2: ratas artríticas/solución salina (vehículo), embolada i.v., n=10; Grupo 3: ratas artríticas / Indometacina 3 mg/kg, p.o. diariamente durante 10 días, n=10; Grupo 4 : ratas artríticas / E3, 1 mg/kg, embolada i.v., n=10; Grupo 5 : ratas artríticas / 911, 10 mg/kg, embolada i.v., n=10. Las dosis se expresaron con respecto a sustancia activa libre (mg/kg). Se prepararon E3 y 911 de forma extemporánea en solución salina a partir de la solución madre a la concentración deseada. E3 1 mg/kg: 3,41 ml de la solución madre (0,88 mg/ml) q.s.p. 15 ml de solución salina. 911 10 mg/kg: 12 ml de la solución madre (2,5 mg/ml) q.s.p. 15 ml de solución salina. Todas las soluciones diluidas (antes de inyección i.v.) se esterilizaron usando una unidad de filtro estéril de 0,20  $\mu$ m. Los valores de pH y osmolaridad de las soluciones diluidas se midieron antes de cada inyección i.v. Antes de la primera i.v., la osmolaridad (mosm/l) para solución salina, E3 y 911 fue de 278, 269 y 308 respectivamente; pH para solución

salina, E3 y 911 fueron de 5,93, 6,76, 6,71 respectivamente. Antes de la segunda i.v., la osmolaridad (mosm/l) para solución salina, E3 y 911 fue 280, 270 y 309 respectivamente; el pH para la solución salina, E3 y 911 fue de 5,86, 6,72 y 6,59 respectivamente.

5 Se administró E3, 911 o solución salina por inyección de embolada i.v. el Día 14 y Día 19 después de la inducción de artritis en un orden codificado y aleatorio con un volumen de 5 ml/kg. Se proporcionó al grupo no artrítico por inyección de embolada i.v. de solución salina del Día 14 y el Día 19 con un volumen de 5 ml/kg. La indometacina se preparó de forma extemporánea en metilcelulosa 1 %. Se administró indometacina por vía oral (p.o.) una vez al día durante 10 días desde el Día 14 al Día 23 después de inducción de artritis en un orden codificado y aleatorio con un volumen de 10 ml/kg.

## 10 2. Inducción de artritis

El Día 0 (D 0), se indujo artritis en 70 ratas por inyección intradérmica en la cola de 0,05 ml de una suspensión de *Mycobacterium butyricum*. Un grupo de 10 ratas no recibió ninguna inyección intradérmica (ratas no artríticas). El Día 14 (D 14), las ratas artríticas se incluyeron en el estudio usando los siguientes criterios: todas las ratas incluidas presentaron un aumento del volumen de pata medio (media del volumen de la pata izquierda y derecha) de al menos 0,30 ml en comparación con el volumen de pata medio (media del volumen de pata izquierda y derecha) en el grupo no artrítico (medición del volumen de la pata como se ha descrito anteriormente); todas las ratas incluidas presentaron una vocalización tras flexión suave (medición de respuesta nociceptiva como se describe posteriormente); y todas las ratas incluidas presentaron una puntuación de índice artrítico de 2-3 en cada pata trasera (medición del índice artrítico como se describe posteriormente) (los animales con una puntuación de 0, 1 o 4 se descartaron).

### 3. Peso corporal

Los animales se pesaron una vez diariamente desde el Día 0 al Día 24 (excepto durante los días de fin de semana antes del tratamiento: D 1, D 2, D 8, D 9, D10). Todas las mediciones se realizaron entre las 9:00 y 12:00 am excepto el D 14 (7:30 - 9:00 am) y D 24 (7:30 - 8:00 am).

## 25 3. Medición del volumen de la pata

Se midió el volumen de la pata trasera derecha e izquierda de cada rata (ratas artríticas y no artríticas) usando un pletismómetro. Las mediciones se realizaron a los siguientes tiempos (después de inducción de artritis): Día 14 (antes de embolada i.v. o administración p.o.); y Día 24 (5 días después de la última inyección de embolada i.v. o 24 horas después de la última administración p.o.). Todas las mediciones se realizaron entre las 9:00 y 12:00 am. Todos los datos se recogieron y se almacenaron por el software WinDas.

### 4. Índice artrítico

El índice artrítico se evaluó usando una mutación de inflamación para cada pata delantera y trasera (ratas artríticas): Puntuación 0: aspecto normal; Puntuación 1: eritema; Puntuación 2: eritema con ligero edema; Puntuación 3: inflamación fuerte sin anquilosis; Puntuación 4: anquilosis. Esta evaluación se realizó en los siguientes tiempos (después de inducción de artritis): Día 14 (antes de embolada i.v. o administración p.o.); y Día 24 (5 días después de la última inyección de embolada i.v. o 24 horas después de la última administración p.o.). Todas las mediciones se realizaron entre las 2:00 y 3:00 pm (D 14), 8:00 y 9:00 am (D 24). Todos los datos se recogieron y se almacenaron por el software WinDas.

### 5. Medición de respuesta nociceptiva (ensayo de vocalización)

40 La respuesta nociceptiva se evaluó por flexión suave de la parte trasera derecha e izquierda repetidamente 2 veces a intervalos de 4 a 5 segundos con un dedo del operador (ratas artríticas). La intensidad del nivel de vocalización se registró para cada animal para cada pata trasera (2 veces: en la pata trasera derecha: s1 y s3; 2 veces: en la pata trasera izquierda: s2 y s4). Esta evaluación se realizó en los siguientes tiempos (después de inducción de artritis): Días 14 (antes de embolada i.v. o administración p.o.); Día 18 (antes de la segunda inyección de embolada i.v. o 1 hora después de la administración p.o.); y Día 24 (5 días después de la última inyección de embolada i.v. o 24 horas después de la última administración p.o.). Todas las mediciones se realizaron entre las 9:00 y 12:00 am excepto el D 14 (7:30 - 9:00 am) y D 24 (7:30 - 9:00 am).

### 6. Recogida de sangre para medición de concentración de E3 o 911 y TGF-β1 en circulación y parámetros hematológicos

50 El Día 24 (después de mediciones del volumen de la pata e índice artrítico y ensayo de vocalización), con anestesia general usando isoflurano (en una mezcla de oxígeno y óxido nitroso), las muestras sanguíneas (aproximadamente 800-1000 µl) se recogieron por acción capilar con una micropipeta del seno retroorbital.

Medición de concentración de E3 o 911 (grupos 2, 4 y 5): Se recogió una parte de la muestra sanguínea en tubos que contenían Li-Heparina (mantenido en hielo) y se centrifugó a 2500-3000 g durante 10 minutos. Se obtuvieron

muestras de plasma (al menos 100  $\mu$ l), se congelaron en nitrógeno líquido, se almacenaron a -80 °C. Una muestra se hemolizó ligeramente (rata artrítica tratada con vehículo N° 36).

5 *Medición de TGF- $\beta$ 1 en circulación* (grupos 1-2-3-4-5): Una parte de la muestra sanguínea se recogió en microtubos para preparación de suero a temperatura ambiente. Después de la recogida de muestras, la sangre se mezcló y se permitió que coagulara durante 30 minutos antes de la centrifugación. Los tubos se centrifugaron a aproximadamente 6000 g durante 3 minutos. Cada muestra de suero (al menos 100  $\mu$ l, excepto para ratas N° 52 y N° 53) se separó en alícuotas y se almacenó a -20 °C hasta la activación de la muestra para análisis de TGF- $\beta$ 1. Estas alícuotas (50 viales) se mantuvieron durante un periodo de 6 meses, comenzando desde el final del estudio. 10 Algunas muestras se hemolizaron ligeramente (rata no artrítica tratada con vehículo: N° 2, N° 5, N° 9, N° 10; rata artrítica tratada con vehículo: N° 53, N° 63; rata artrítica tratada con E3 N° 31, N° 51; rata artrítica tratada con 911; N° 52, 62, N° 64). Los niveles de TGF- $\beta$ 1 se midieron usando kit de ELISA de TGF- $\beta$ 1 humano (ref. DB100, Lote 212258 y 213610, R&D Systems - Francia).

15 Recogida de sangre para parámetros hematológicos (grupos 1-2-3-4-5: 50 viales): Se recogió una parte de muestra sanguínea en tubos que contenían K3 - EDTA (al menos 100  $\mu$ l). La determinación de los parámetros se realizó el día de la recogida y las muestras no se almacenaron. Los parámetros hematológicos que incluían glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas, hemoglobina, hematocrito se midieron con un contador de células de hematología (D 24). Algunos parámetros hematológicos no se midieron debido a las muestras coaguladas (rata no artrítica tratada con vehículo: N° 10; ratas artríticas tratadas con E3: N° 59, N° 67; ratas artríticas tratadas con 911: N° 16).

#### 7. Niveles de citocinas en las patas

20 El Día 24 (5 días después de la última inyección de embolada i.v. o 24 horas después de la última administración p.o.) (después de radiografías de rayos X), cada pata trasera de los animales (ratas artríticas y no artríticas) se pesó y se recogió en un frasco de polietileno marcado. Las muestras tisulares se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

25 *Preparación de homogeneizados unidos*: Se pulverizaron patas traseras congeladas usando un Bio-Pulverizer. Las patas traseras pulverizadas se colocaron después en un tubo de centrifuga cónico de 50 ml que contenía 3 ml de PBS complementado con 50  $\mu$ l de cóctel antiproteasa y se homogeneizaron en hielo usando un homogeneizador Ultra-Turrax (50 % de la velocidad máxima). Los homogeneizados se centrifugaron después a 2000 x g durante 15 minutos a 4 °C y los sobrenadantes se filtraron a través de filtros Sartorius de 0,2  $\mu$ m; se separaron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

30 *Medición de los niveles de citocinas*: Los niveles de citocinas de TNF- $\alpha$  (kit de ELISA de TNF- $\alpha$  de rata, ref. RTA00, Lote 213718, R&D Systems, Francia), IL-1 $\beta$  (kit de ELISA de IL-1 $\beta$  de Rata, ref. RLB00, Lote 212435, R&D Systems, Francia), IL-6 (kit de ELISA de IL-6 de rata, ref. R6000, Lote 211773, 214008 y 214362, R&D Systems, Francia), y TGF- $\beta$ 1 (kit de ELISA de TGF- $\beta$ 1 humano, ref. DB100, Lote 212258 y 213610, R&D Systems, Francia) se determinaron por duplicado, de acuerdo con el procedimiento del fabricante. Las alícuotas de homogeneizados de 35 pata trasera se almacenaron a -80 °C.

#### 8. Análisis de rayos X

40 El Día 24, después de recogida de sangre los animales se sacrificaron y se obtuvieron radiografías de rayos X (patas traseras) para evaluación de lesiones de las articulaciones. El análisis de rayos X se centró en erosiones articulares, espacio articular, anomalías del periostio en ambas patas traseras. Todas las radiografías se analizaron observando siete elementos diferentes: el daño al tejido blando, deformidad, desmineralización, espacio de la articulación, erosiones, osteogénesis y reacción del periostio. Para cada animal, los primeros seis elementos se analizaron de forma independiente observando la peor pata trasera. La reacción del periostio se analizó observando la cola. Para cada elemento, la puntuación va de 0 (normal) a 4 (daño máximo). Por lo tanto, la puntuación total va de 0 a 28. La interpretación radiográfica se realizó por el mismo lector sin saber nada acerca de los animales 45 (tratados o no tratados).

#### 9. Observaciones

Un animal (N° 65) murió el D 23 después de administración de indometacina (antes de la administración el D 23) debido a una causa desconocida.

#### 10. Análisis y expresión de resultados

50 Todos los resultados se presentaron como Media  $\pm$  E.T.M de 10 ratas en cada grupo en cada punto temporal. El volumen de la pata se expresó en ml calculados a partir del valor medio del volumen de pata derecha e izquierda. El índice artrítico se calculó a partir de la suma de la puntuación obtenida para cada una de las 4 patas. La respuesta nociceptiva se evaluó por la intensidad del nivel de vocalización registrado para cada animal (media de 4 valores: 2 veces/pata) en mV. El porcentaje de inhibición de la respuesta nociceptiva se calculó a partir del valor medio del grupo artrítico tratado con vehículo [(valor medio de grupo artrítico tratado con vehículo – valor medio de grupo 55

artrítico tratado / valor medio de grupo artrítico tratado con vehículo)\* 100]. El peso corporal se expresó en gramos. El peso de las patas traseras (izquierda y derecha) se expresó en gramos. Los niveles de citocina (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ 1) de cada pata trasera se expresaron en pg/ml. Los niveles en circulación de TGF- $\beta$ 1 se expresaron en pg/ml. El índice radiológico para cada parámetro (desmineralización, erosiones, reacción del periostio, daño del tejido blando, espacio de la articulación, deformidad de osteogénesis) e índice radiológico total (puntuación total) se calcularon a partir de la suma de las puntuaciones obtenidas para cada parámetro. Las significaciones intergrupo de las desviaciones entre los valores de grupo tratado con vehículo (ratas artríticas) y grupo tratado con vehículo (ratas no artríticas) se evaluaron por el ensayo de *t* de Student o Ensayo de Suma de Rangos de Mann-Whitney cuando falló el ensayo de normalidad o varianza igual. Las significaciones intergrupo de las desviaciones entre los valores de grupo tratado con vehículo (ratas artríticas) y grupos tratados con E3, 911 e indometacina se evaluaron por el análisis de varianza ANOVA de una vía seguido del ensayo de *t* de Dunnett para muestras no relacionadas. Se consideró una probabilidad de  $P \leq 0,05$  como significativa. Todos los análisis estadísticos se realizaron por el software Sigmastat™.

## Resultados

### 1. Respuesta nociceptiva (ensayo de vocalización)

Como se muestra en la Tabla 11 y Figura 18, el D 14, la respuesta nociceptiva fue  $4147 \pm 331$ ,  $4386 \pm 235$ ,  $4644 \pm 367$  y  $4468 \pm 143$  en grupos artríticos tratados con vehículo, indometacina, E3 y 911, respectivamente. La indometacina redujo fuerte y significativamente la respuesta nociceptiva después de p.o. 3 mg/kg/día (durante 10 días) en aproximadamente -3768 mV (% de inhibición: 71 %) y -4353 mV (% de inhibición: 74 %) el D 18 y D 24, respectivamente en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo (D 18:  $1511 \pm 398$  frente a  $5279 \pm 326$  mV; D 24:  $1552 \pm 508$  frente a  $5905 \pm 345$  mV). E3 (i.v. 1 mg/kg el D 14 y D 19) redujo fuerte y significativamente la respuesta nociceptiva en aproximadamente -4167 mV (% de inhibición: 79 %) y -5905 mV (% de inhibición: 100 %) el D 18 y D 24, respectivamente en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo (D 18:  $1112 \pm 401$  frente a  $5279 \pm 326$  mV; D 24:  $0 \pm 0$  frente a  $5905 \pm 345$  mV). 911 (i.v. 10 mg/kg 2 días el D 14 y D 19) redujo fuerte y significativamente la respuesta nociceptiva en aproximadamente -3932 (% de inhibición: 74 %) y -5358 mV (% de inhibición: 91 %) el D 18 y D 24, respectivamente, en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo (D 18:  $1347 \pm 492$  frente a  $5279 \pm 326$  mV; D 24:  $547 \pm 307$  frente a  $5905 \pm 345$  mV).

Tabla 11. Efectos de E3 y 911 después de inyección i.v. (2 días: D 14- D 19) en la respuesta nociceptiva en artritis reumatoide en ratas

	Día	D14	D 18	D 24
Ratas artríticas	vehículo i.v.	$4147 \pm 331$	$5279 \pm 326$	$5905 \pm 345$
	E3 1 mg/kg i.v.	$4644 \pm 367$	$1112 \pm 401$ *	$0 \pm 0$ *
	% de inhibición	0	79	100
	911 10 mg/kg	$4468 \pm 143$	$1347 \pm 492$ *	$547 \pm 307$ *
	% de inhibición	0	74	91
	Indometacina 3 mg/kg p.o. (durante 10 días)	$4386 \pm 235$	$1511 \pm 398$ *	$1552 \pm 508$
	% de inhibición	0	71	74

Los valores se expresan en mV como Media  $\pm$  E.T.M.

n=10 animales por grupo excepto el D 24 para indometacina (n=9)

Ensayo de *t* de Dunnett: \*  $P \leq 0,05$  frente a ratas artríticas tratadas con vehículo

### 2. Peso corporal

Como se muestra en la Tabla 12 y la Figura 19, se observó una reducción notable del aumento de peso corporal en ratas artríticas en comparación con ratas no artríticas de D 0 a D 14 debido al establecimiento de artritis. El D 14 (día de selección) las ratas artríticas presentaron una reducción significativa del peso en comparación con las ratas no artríticas ( $289 \pm 2$  frente a  $217 \pm 4$  g) (ensayo de *t* de Student  $P < 0,05$ ). Sin embargo, no se detectó diferencia significativa en el peso (D 14) en todos los grupos artríticos (ensayo de *t* de Dunnett  $P > 0,05$ ). El peso corporal aumentó moderada y significativamente en el grupo tratado con indometacina (3 mg/kg/día durante 10 días) del D 17 a D 24 con un máximo de aproximadamente 43 g el D 24 en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo

5 (261 ± 5 frente a 218 ± 3 g). Después del tratamiento con E3 (i.v. 1 mg/kg el D 14 y D 19), el peso corporal aumentó moderada y significativamente del D 17 a D 24 con un máximo de aproximadamente 46 g el D 24 en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo (264 ± 5 g frente a 218 ± 3 g). Después de tratamiento con 911 (i.v. 10 mg/kg el D 14 y D 19), el peso corporal aumentó moderada y significativamente del D 18 a D 24 con un máximo de aproximadamente 47 g el D 24 en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo (265 ± 7 frente a 218 ± 3 g).

Tabla 12. Efectos de E3 y 911 después de inyección i.v. (2 días: D 14 - D 19) en el peso corporal y artritis reumatoide en ratas

	Día	D0	D3	D4	D5	D6	D7	D11	D12	D13	D14
<b>Ratas No Artríticas</b>	<b>vehículo i.v.</b>	197 ± 2	215 ± 2	222 ± 2	232 ± 2	236 ± 2	244 ± 2	272 ± 2	277 ± 2	282 ± 2	289 ± 2
<b>Ratas artríticas</b>	<b>vehículo i.v.</b>	199 ± 2	214 ± 2	221 ± 2	230 ± 2	236 ± 2	241 ± 3	229 ± 6	223 ± 5	218 ± 5	217 ± 4
	<b>E3 1 mg/kg i.v.</b>	206 ± 4	222 ± 3	230 ± 3	241 ± 3	243 ± 3	249 ± 3	242 ± 6	237 ± 6	230 ± 5	225 ± 5
	<b>911 10 mg/kg i.v.</b>	201 ± 2	211 ± 5	218 ± 5	227 ± 5	231 ± 5	239 ± 5	234 ± 8	228 ± 7	221 ± 7	218 ± 6
	<b>Indometacina 3 mg/kg p.o. durante 10 días</b>	202 ± 3	217 ± 4	225 ± 4	235 ± 4	239 ± 4	246 ± 4	242 ± 7	235 ± 7	227 ± 6	224 ± 5
	Día	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24
<b>Ratas No Artríticas</b>	<b>vehículo i.v.</b>	285 ± 2	291 ± 2	297 ± 2	302 ± 3	307 ± 3	308 ± 3	312 ± 3	316 ± 3	321 ± 3	326 ± 3
<b>Ratas artríticas</b>	<b>vehículo i.v.</b>	213 ± 4	212 ± 4	211 ± 3	210 ± 3	208 ± 3	210 ± 3	212 ± 3	214 ± 3	216 ± 3	218 ± 3
	<b>E3 1 mg/kg i.v.</b>	223 ± 5	224 ± 5	227 ± 4*	232 ± 4*	235 ± 4*	238 ± 4*	245 ± 4*	250 ± 5*	257 ± 5*	264 ± 5*
	<b>911 10 mg/kg i.v.</b>	217 ± 5	221 ± 5	226 ± 5	229 ± 5*	233 ± 6*	239 ± 6*	246 ± 6*	253 ± 6*	258 ± 6*	265 ± 7*
	<b>Indometacina 3 mg/kg p.o. durante 10 días</b>	230 ± 4	230 ± 5	231 ± 4*	234 ± 4*	236 ± 4*	241 ± 4*	246 ± 4*	248 ± 5*	253 ± 5*	261 ± 5*

Los valores se expresan en gramos como Media ± E.T.M. n=10 animales por grupo excepto el D 23 y D 24 (n=9) para Indometacina

Ensayo de t de Dunnett test : \* P ≤ 0,05 frente a ratas artríticas tratadas con vehículo

10 3. Volumen de las patas

El D 14, se realizó una selección aleatoria para obtener grupos homogéneos con respecto a volumen de las patas. Como se muestra en la Tabla 13, el D 14, el volumen de las patas traseras (media del volumen de la pata derecha e izquierda) fue significativamente mayor en el grupo artrítico que en el grupo no artrítico (2,10 ± 0,05 frente a 1,44 ± 0,02 ml (ensayo t de Student P<0,05)). La indometacina (3 mg/kg/día p.o. durante 10 días) redujo significativamente el volumen de las patas en aproximadamente -0,75 ml (D 24) en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo (1,59 ± 0,03 ml frente a 2,34 ± 0,08 ml). E3 (i.v. 1 mg/kg en D 14 y D 19) aumentó ligera y significativamente el volumen de las patas en aproximadamente 0,37 ml en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo (2,71 ± 0,09 ml frente a 2,34 ± 0,08 ml). 911 (i.v. 10 mg/kg en D 14 y D 19) aumentó ligera y significativamente el volumen de las patas en aproximadamente 0,36 ml en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo (2,70 ± 0,11 ml frente a 2,34 ± 0,08 ml).

Tabla 13. Efectos de E3 y 911 después de inyección i.v. (2 días: D 14 - D 19) en el volumen de las patas en artritis reumatoide en ratas

	Día	D14	D 24
<b>Ratas No Artríticas</b>	<b>vehículo i.v.</b>	<b>1,44 ± 0,02</b>	<b>1,47 ± 0,02</b>
<b>Ratas artríticas</b>	<b>vehículo i.v.</b>	<b>2,10 ± 0,05</b>	<b>2,34 ± 0,08</b>
	<b>E3 1 mg/kg i.v.</b>	<b>2,06 ± 0,03</b>	<b>2,71 ± 0,09 *</b>
	<b>911 10 mg/kg i.v.</b>	<b>2,02 ± 0,07</b>	<b>2,70 ± 0,11 *</b>
	<b>Indometacina 3 mg/kg p.o. durante 10 días</b>	<b>2,08 ± 0,06</b>	<b>1,59 ± 0,03 *</b>

Los valores se expresan en ml como Media ± E.T.M.

n=10 animales por grupo excepto el D 24 para indometacina (n=9)

Ensayo de *t* de Dunnett: \*  $P \leq 0,05$  frente a ratas tratadas con vehículo

#### 4. Índice artrítico

- 5 Como se muestra en la Tabla 14, el D 14, el índice artrítico fue de  $10,1 \pm 0,8$ ,  $8,7 \pm 0,6$ ,  $10,2 \pm 0,4$  y  $9,4 \pm 0,7$  y en grupos artríticos tratados con vehículo, indometacina, E3 y 911, respectivamente. La indometacina redujo fuerte y significativamente el índice artrítico después de p.o. 3 mg/kg/día (durante 10 días) en un máximo de aproximadamente -8,0, en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo ( $2,7 \pm 0,7$  frente a  $10,7 \pm 0,6$ ). E3 (i.v. 1 mg/kg en D 14 y D 19) no afectó al índice artrítico en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo ( $11,4 \pm 0,4$  frente a  $10,7 \pm 0,6$ ). 911 (i.v. 10 mg/kg en D 14 y D 19) no afectó al índice artrítico en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo ( $10,9 \pm 0,7$  frente a  $10,7 \pm 0,6$ ).

Tabla 14. Efectos de E3 y 911 después de inyección i.v. (2 días: D 14 - D 19) en el índice artrítico en artritis reumatoide en ratas

	Día	D14	D 24
<b>Ratas artríticas</b>	<b>vehículo i.v.</b>	<b>10,1 ± 0,8</b>	<b>10,7 ± 0,6</b>
	<b>E3 1 mg/kg i.v.</b>	<b>10,2 ± 0,4</b>	<b>11,4 ± 0,4</b>
	<b>911 10 mg/kg i.v.</b>	<b>9,4 ± 0,7</b>	<b>10,9 ± 0,7</b>
	<b>Indometacina 3 mg/kg p.o. durante 10 días</b>	<b>8,7 ± 0,6</b>	<b>2,7 ± 0,7 *</b>

Los valores se expresan como Media ± E.T.M. (puntuación)

n=10 animales por grupo excepto para indometacina (n=9)

Ensayo de *t* de Dunnett: \*  $P \leq 0,05$  frente a ratas artríticas tratadas con vehículo

#### 15 5. Niveles de citocinas en las patas

- 20 Como se muestra en la Tabla 15, el D 24, los niveles de citocinas en las patas izquierda y derecha aumentó en el grupo artrítico tratado con vehículo en un máximo de aproximadamente 3,5 (IL-1 $\beta$ ), 4 (TNF- $\alpha$ ) y 1,8 (TGF- $\beta$ 1) veces en comparación con el grupo no artrítico tratado con vehículo. No se observó diferencia significativa para los niveles de IL-6, en la pata derecha e izquierda, entre los dos grupos. Los niveles de citocinas del grupo artrítico fueron similares en la pata izquierda y derecha:  $259,7 \pm 38,5$  frente a  $219,2 \pm 32,4$ ,  $4802,8 \pm 365,5$  frente a  $4007,1 \pm 380,4$ ,  $17,8 \pm 1,6$  frente a  $18,6 \pm 1,9$  y  $9735,0 \pm 1219,8$  frente a  $9161,4 \pm 846,1$  pg/ml para IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ 1 respectivamente. La indometacina redujo ligera, pero significativamente, el nivel de TGF- $\beta$ 1 en la pata derecha después de p.o. 3 mg/kg/día (durante 10 días) en aproximadamente 1,3 veces, en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo ( $7057,4 \pm 335,6$  frente a  $9161,4 \pm 846,1$ ), mientras que no modificó los niveles de IL-6, TNF- $\alpha$  o

IL-1 $\beta$ . Se observó un efecto similar pero no significativo en la pata izquierda. E3 (i.v. 1 mg/kg el D 14 y D 19) no afectó a los niveles de IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  o TGF- $\beta$ 1, en ambas patas, en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo. 911 (i.v. 10 mg/kg el D 14 y D 19) aumentó el nivel de IL-1 $\beta$  en la pata derecha en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo (6215,3  $\pm$  666,7 frente a 4007,1  $\pm$  380,4). No tuvo efecto en otros niveles de citocinas en ambas patas.

5

Tabla 15. Efecto de E3 y 911 después de inyección i.v. (2 días el D 14 y D 19) en los niveles de citocinas en las patas en ratas artríticas reumatoides

<b>Niveles de citocinas en la pata izquierda</b>					
<b>Ratas No Artríticas</b>		<b>Ratas Artríticas</b>			
vehículo i.v.		vehículo i.v.	E3 1 mg/kg i.v.	911 10 mg/kg i.v.	Indometacina 3 mg/kg p.o.
<b>IL-6</b>	298,6 $\pm$ 35,6	259,7 $\pm$ 38,5	234,4 $\pm$ 35,2	262,5 $\pm$ 42,5	249,7 $\pm$ 60,4
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	1383,0 $\pm$ 57,9	4802,8 $\pm$ 365,5	5060,0 $\pm$ 473,5	5500,8 $\pm$ 625,3	4029,1 $\pm$ 449,9
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	4,3 $\pm$ 2,9	17,8 $\pm$ 1,6	23,6 $\pm$ 2,5	29,9 $\pm$ 4,8	29,9 $\pm$ 3,6
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	5264,7 $\pm$ 209,2	9735,0 $\pm$ 1219,8	9796,7 $\pm$ 491,2	11053,5 $\pm$ 713,3	7708,2 $\pm$ 293,9

<b>Niveles de citocinas en la pata derecha</b>					
<b>Ratas No Artríticas</b>		<b>Ratas Artríticas</b>			
vehículo i.v.		vehículo i.v.	E3 1 mg/kg i.v.	911 10 mg/kg i.v.	Indometacina 3 mg/kg p.o.
<b>IL-6</b>	286,4 $\pm$ 76,1	219,2 $\pm$ 32,4	214,6 $\pm$ 47,2	284,9 $\pm$ 38,9	295,9 $\pm$ 47,8
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	1342,1 $\pm$ 86,1	4007,1 $\pm$ 380,4	4853,5 $\pm$ 605,0	6215,3 $\pm$ 666,7 *	3884,4 $\pm$ 534,4
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	15,7 $\pm$ 4,8	18,6 $\pm$ 1,9	21,5 $\pm$ 2,5	33,4 $\pm$ 5,7	30,6 $\pm$ 5,7
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	5024,8 $\pm$ 148,4	9161,4 $\pm$ 846,1	9362,7 $\pm$ 423,4	10861,2 $\pm$ 604,6	7057,4 $\pm$ 335,6 *

Los valores se expresan en pg/ml, como Media  $\pm$  E.T.M.

n=10 animales por grupo excepto para no artrítica/vehículo (pata derecha), artrítica/vehículo (pata izquierda) e indometacina (n=9)

Ensayo de *t* de Dunnett: \* P  $\leq$  0,05 frente a ratas artríticas tratadas con vehículo

#### 6. Medición de TGF- $\beta$ 1 en circulación

- 10 Como se muestra en la Tabla 16, el D 24, el nivel en suero de TGF- $\beta$ 1 aumentó en el grupo artrítico tratado con vehículo en comparación con el grupo no artrítico tratado con vehículo (81715,7  $\pm$  1984,1 frente a 60269,9  $\pm$  2142,8). La indometacina redujo significativamente el nivel en suero de TGF- $\beta$ 1 después de p.o. 3 mg/kg/día p.o. (durante 10 días) en aproximadamente 1,5 veces, en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo (57222,2  $\pm$  3194,1 frente a 81715,7  $\pm$  1984,1). E3 (i.v. 1 mg/kg el D 14 y D 19) y 911 (i.v. 10 mg/kg el D 14 y D 19) aumentó
- 15 significativamente el nivel en suero de TGF- $\beta$ 1 de modo que el nivel de citocinas en grupos tratados con E3 y 911 era comparable con el observado en grupo no artrítico tratado con vehículo (69408,8  $\pm$  3926,7 y 67214,5  $\pm$  3649,4 respectivamente, frente a 60269,9  $\pm$  2142,8).

Tabla 16. Efecto de E3 y 911 después de inyección i.v. (2 días en D 14 y D 19) en los niveles en suero de TGF-β1 en ratas artríticas reumatoides

<b>Ratas No Artríticas</b>		<b>Ratas Artríticas</b>			
vehículo i.v.		vehículo i.v.	E3 1 mg/kg i.v.	911 10 mg/kg i.v.	Indometacina 3 mg/kg p.o.
<b>TGF-β1</b>	<b>60269,9 ± 2142,8</b>	<b>81715,7 ± 1984,1</b>	<b>69408,8 ± 3926,7*</b>	<b>67214,5 ± 3649,4*</b>	<b>57222,2 ± 3194,1*</b>

Los valores se expresan en pg/ml, como Media ± E.T.M.

n=10 animales por grupo excepto para no artrítica/vehículo (pata derecha), artrítica/vehículo (pata izquierda) e indometacina (n=9)

Ensayo de *t* de Dunnett: \*  $P \leq 0,05$  frente a ratas artríticas tratadas con vehículo

### 7. Parámetros hematológicos

- 5 Como se muestra en la Tabla 17, los parámetros hematológicos tales como glóbulos blancos y plaquetas fueron mayores en ratas artríticas tratadas con vehículo en comparación con ratas no artríticas tratadas con vehículo (ensayo de *t* de Student  $P < 0,05$ ), mientras que los glóbulos rojos, hemoglobina y el hematocrito (ensayo de *t* de Student  $P > 0,05$ ) no cambiaron. La indometacina no afectó a los parámetros sanguíneos después de p.o. 3 mg/kg/día (durante 10 días) en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo. E3 (i.v. 1 mg/kg en D 14 y D 19) no afectó a los parámetros sanguíneos en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo. 911 (i.v. 10 mg/kg el D 14 y D 19) no afectó a los parámetros sanguíneos en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo.

Tabla 17. Efectos de E3 y 911 después de inyección i.v. (2 días el D 14 y D 19) en los parámetros sanguíneos en artritis reumatoide en ratas (Medición el D 24)

	Día	Glóbulos blancos $10^3/\text{mm}^3$	Glóbulos rojos $10^6/\text{mm}^3$	Hemoglobina g/dl	Hematocrito %	Plaquetas $10^3/\text{mm}^3$
<b>Ratas No Artríticas</b>	vehículo i.v.	<b>8,7 ± 0,9</b> n=9	<b>7,98 ± 0,31</b> n=9	<b>15,1 ± 0,7</b> n=9	<b>42,6 ± 1,6</b> n=9	<b>322 ± 89</b> n=9
	vehículo i.v.	<b>19,0 ± 0,9</b> n=10	<b>7,54 ± 0,31</b> n=10	<b>13,2 ± 0,7</b> n=10	<b>37,4 ± 1,6</b> n=10	<b>10,43 ± 89</b> n=10
<b>Ratas Artríticas</b>	E3 1 mg/kg i.v.	<b>19,1 ± 1,2</b> n=7	<b>7,74 ± 0,17</b> n=8	<b>12,9 ± 0,3</b> n=8	<b>38,5 ± 1,0</b> n=8	<b>827 ± 77</b> n=8
	911 10 mg/kg i.v.	<b>22,6 ± 2,9</b> n=8	<b>7,30 ± 0,40</b> n=9	<b>12,1 ± 0,7</b> n=9	<b>36,5 ± 2,1</b> n=9	<b>799 ± 121</b> n=9
	Indometacina 3 mg/kg p.o. durante 10 días	<b>21,7 ± 2,5</b> n=9	<b>6,93 ± 0,31</b> n=9	<b>11,8 ± 0,6</b> n=9	<b>35,0 ± 1,5</b> n=9	<b>705 ± 111</b> n=9

Los valores se expresan como Media ± E.T.M

Anova:  $P > 0,05$  frente a ratas artríticas tratadas con vehículo

### 15 7. Peso de las patas traseras

Como se muestra en la Tabla 18, el peso de las patas traseras izquierda y derecha fue mayor en ratas artríticas tratadas con vehículo que en ratas no artríticas tratadas con vehículo ( $3,43 \pm 0,11$  frente a  $1,98 \pm 0,01$  y  $3,32 \pm 0,12$  frente a  $1,99 \pm 0,02$  g, respectivamente) (ensayo de *t* de Student o Mann-Whitney  $P < 0,05$ ). La indometacina redujo

significativamente el peso de las patas traseras después de p.o. 3 mg/kg/día (durante 10 días) en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo (pata trasera izquierda:  $2,23 \pm 0,04$  frente a  $3,43 \pm 0,11$  g; pata trasera derecha:  $2,20 \pm 0,05$  frente a  $3,32 \pm 0,12$  g). E3 (i.v. 1 mg/kg el D 14 y D 19) sólo aumentó significativamente el peso de la pata trasera izquierda en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo (pata trasera izquierda:  $3,86 \pm 0,14$  frente a  $3,43 \pm 0,11$  g; pata trasera derecha:  $3,72 \pm 0,13$  frente a  $3,32 \pm 0,12$  g). 911 (i.v. 10 mg/kg el D 14 y D 19) sólo aumentó significativamente el peso de la pata trasera derecha en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo (pata trasera izquierda:  $3,73 \pm 0,12$  frente a  $3,43 \pm 0,11$  g; pata trasera derecha:  $3,83 \pm 0,15$  frente a  $3,32 \pm 0,12$  g).

10 Tabla 18. Efectos de E3 y 911 después de inyección i.v. (2 días el D 14 y D 19) en el peso de las patas traseras en artritis reumatoide en ratas (Medición el D 24)

		<b>Pata izquierda</b>	<b>Pata derecha</b>
<b>Ratas No Artríticas</b>	<b>vehículo i.v</b>	<b>1,98 ± 0,01</b>	<b>1,99 ± 0,02</b>
	<b>vehículo i.v.</b>	<b>3,43 ± 0,11</b>	<b>3,32 ± 0,12</b>
<b>Ratas Artríticas</b>	<b>E3 1 mg/kg i.v.</b>	<b>3,86 ± 0,14 *</b>	<b>3,72 ± 0,13</b>
	<b>10 mg/kg i.v.</b>	<b>3,73 ± 0,12</b>	<b>3,83 ± 0,15 *</b>
	<b>Indometacina 3 mg/kg p.o.</b>	<b>2,23 ± 0,04 *</b>	<b>2,20 ± 0,05 *</b>

*durante 10 días*

Los valores se expresan en gramos como Media ± E.T.M.

n=10 animales por grupo excepto para indometacina (n=9)

Ensayo de *t* de Dunnett: \* P ≤ 0,05 frente a ratas artríticas tratadas con vehículo

### 8. Análisis de rayos X

15 Como se muestra en la Tabla 19, se observó una puntuación total de  $0,0 \pm 0,0$  en las ratas no artríticas tratadas con vehículo. Las ratas artríticas tratadas con vehículo tienen un puntuación total de  $15,1 \pm 1,3$  con altas puntuaciones para desmineralización ( $2,4 \pm 0,3$ ), erosiones ( $2,7 \pm 0,3$ ), daño del tejido blando ( $3,1 \pm 0,2$ ) y espacio articular ( $3,3 \pm 0,2$ ), una puntuación moderada para reacción de periostio ( $1,0 \pm 0,3$ ), osteogénesis ( $0,8 \pm 0,2$ ) y deformidad ( $1,8 \pm 0,2$ ). La indometacina (p.o. 3 mg/kg/día durante 10 días) redujo fuerte y significativamente la puntuación total en aproximadamente 10,7 en comparación con ratas artríticas tratadas con vehículo ( $4,4 \pm 0,9$  frente a  $15,1 \pm 1,3$ ). E3 (i.v. 1 mg/kg el D 14 y D 19) no afectó a la puntuación total en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo ( $14,2 \pm 1,3$  frente a  $15,1 \pm 1,3$ ). 911 (i.v. 10 mg/kg el D 14 y D 19) no afectó a la puntuación total en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo ( $15,4 \pm 1,0$  frente a  $15,1 \pm 1,3$ ).

Tabla 19. Efectos de E3 y 911 después de inyección i.v. (2 días el D 14 y D 19) en los parámetros de rayos X en artritis reumatoide en ratas

Día	Desmineralización	Erosiones	Reacción del periostio	Daño del tejido blando	Espacio articular	Osteogénesis	Deformidad	Puntuación TOTAL
<b>Ratas No Artríticas</b>	vehículo i.v.	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<b>Ratas Artríticas</b>	vehículo i.v.	2,4 ± 0,3	1,0 ± 0,3	3,1 ± 0,2	3,3 ± 0,2	0,8 ± 0,2	1,8 ± 0,2	15,1 ± 1,3
	E3 1 mg/kg i.v.	2,0 ± 0,2	0,8 ± 0,2	3,3 ± 0,3	2,7 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,8 ± 0,2	14,2 ± 1,3
	911 10 mg/kg i.v.	2,3 ± 0,3	2,5 ± 0,2	1,0 ± 0,3	3,4 ± 0,2	0,9 ± 0,2	2,0 ± 0,2	15,4 ± 1,0
	Indometacina 3 mg/kg p.o.	0,3 ± 0,2 *	0,9 ± 0,2 *	0,7 ± 0,3	1,0 ± 0,2 *	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,2 *	4,4 ± 0,9 *

Los valores se expresan como Media ± E.T.M. (puntuación)

n=10 animales por grupo excepto para indometacina (n=9)

Ensayo de t Dunnett. \* P ≤ 0,05 frente a ratas artríticas tratadas con vehículo

Conclusión

En las condiciones experimentales descritas anteriormente, E3 (i.v. 1 mg/kg 2 días: D 14 - D 19) y 911 (i.v. 10 mg/kg 2 días: D 14 - D 19) mostraron efectos analgésicos fuertes, pero no mostraron efectos antiinflamatorios significativos en este modelo de artritis.

5 *Ejemplo 9 Efectos de diferentes dosis de anticuerpo anti-NGF E3 en un modelo de rata de artritis reumatoide*

La capacidad de E3 para producir reducción del dolor en ratas artríticas se investigó adicionalmente examinando la relación de respuesta a dosis entre la administración de E3 y reducción del dolor. Las ratas se trataron con adyuvante para inducir artritis como se ha descrito anteriormente. Se usaron diez ratas no inyectadas con adyuvante como controles no artríticos. Catorce días después de la inyección de adyuvante, los animales se clasificaron en el estudio basándose en los criterios indicados anteriormente, se separaron de forma aleatoria en ocho grupos de diez ratas y se ensayaron con respecto a la intensidad de su respuesta de vocalización. Se les dosificó el día 14 con solución salina, o anticuerpo E3 0,003 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg o 5 mg/kg como se ha descrito anteriormente. Se ensayó a los animales con respecto a su respuesta de vocalización los días 16, 18, 20 y 24. Se volvió a dosificar a los animales con solución salina o la misma dosis de E3 el día 18 después del ensayo de vocalización. Los animales también se pesaron cada día, comenzando el día 14. Por lo tanto, se dosificó a los animales dos veces con una dosis dada de anticuerpo o solución salina los días 14 y 18, y se evaluaron con respecto a dolor cinco veces, los días 14, 16, 18, 20 y 24. Los datos se muestran en las Tablas 20-22 y en las Figuras 20-22.

20 Tabla 20. Efectos de diferentes dosis de E3 en la respuesta nociceptiva (intensidad de vocalización) en ratas artríticas reumatoideas. Los valores de intensidad de vocalización se expresan en mV como media ± e.t.m.

		vehículo	0,003 mg/kg	0,01 mg/kg	0,03 mg/kg	0,1 mg/kg	0,3 mg/kg	1,0 mg/kg	5,0 mg/kg
día 14	Media	112925	981,75	1007,28	963,18	1159,30	1191,58	1067,00	896,25
	e.t.m.	143,06	71,00	66,50	62,12	132,76	123,44	69,73	57,53
día 16	Media	1042,85	825,60	576,88	448,43	283,71	151,85	98,62	79,18
	e.t.m.	130,51	57,94	49,71	81,01	60,00	26,08	29,17	27,30
día 18	Media	968,10	427,43	334,45	292,52	262,96	194,19	174,13	200,42
	e.t.m.	117,85	48,55	35,10	52,36	62,32	53,56	88,61	120,15
día 20	Media	942,18	448,00	313,13	209,48	79,74	66,27	71,23	63,57
	e.t.m.	100,69	33,73	61,98	24,43	33,18	31,34	42,37	23,47
día 24	Media	913,68	724,50	596,38	513,60	432,45	176,32	19,21	12,35
	e.t.m.	131,29	115,90	44,76	63,67	70,38	66,61	10,14	12,35

25 El efecto de tratar a los animales con diversas dosis de anticuerpo anti-NGF E3 en la vocalización inducida por dolor (datos mostrados en la Tabla 20) se analizó estadísticamente usando ANOVA de dos vías para comparar los resultados obtenidos por parejas entre animales artríticos tratados con vehículo y los tratados con una dosis dada de anticuerpo E3. Hubo un efecto altamente significativo en todos los niveles de E3 ensayados ( $p < 0,0001$ ). Incluso a la dosis más baja ensayada (E3 0,003 mg/kg), la diferencia en la vocalización fue significativa ( $p < 0,0001$ ).

Como se muestra en la Tabla 20 y la Figura 20, de acuerdo con los experimentos anteriores, el tratamiento con anticuerpo E3 a 1 mg/kg mostró un alivio rápido y robusto del dolor. En un periodo de dos días (el punto temporal

más temprano ensayado) la intensidad de vocalización cayó en 90 %. El tratamiento con concentraciones más bajas de E3 también proporcionó alivio robusto del dolor, aunque a dosis más bajas el alivio del dolor tardó algo más en manifestarse. Es probable que la reducción aparente de la eficacia el día 24 de todas las dosis excepto la más alta ensayadas se deba a un aumento del nivel real de E3 en plasma secundario a una respuesta inmune por las ratas objeto. Resulta evidente que dosis tan bajas como 0,003 mg/kg proporcionan al menos alivio parcial del dolor en este modelo.

5

Tabla 21. Efectos de diferentes dosis de E3 en el peso corporal en ratas artríticas reumatoides (normalizado al día 14).

Día	No Artríticas		Vehículo		0,003 mg/kg		0,01 mg/kg		0,03 mg/kg	
	Media	E.T.M	Media	E.T.M	Media	E.T.M	Media	E.T.M	Media	E.T.M
14	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
15	99,53	0,30	99,14	0,37	99,20	0,48	99,18	0,43	100,34	0,36
16	102,52	0,45	99,57	0,60	99,58	0,79	99,33	0,72	100,89	0,57
17	103,31	0,41	99,50	0,64	100,46	0,77	99,69	0,73	101,80	0,82
18	106,11	0,72	100,26	0,93	100,90	1,19	100,69	0,72	102,70	0,92
20	109,62	0,85	101,46	1,22	102,26	1,58	102,70	1,07	104,51	0,75
21	110,52	0,93	102,73	1,49	103,16	1,87	102,63	1,18	105,08	0,98
23	114,28	1,19	104,54	1,92	106,09	1,67	104,41	1,33	106,14	1,06
24	115,44	1,15	105,12	1,92	106,16	1,90	104,23	1,46	106,23	1,26
Día	0,1 mg/kg		0,3 mg/kg		1,0 mg/kg		5,0 mg/kg			
	Media	E.T.M	Media	E.T.M	Media	E.T.M	Media	E.T.M		
14	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00		
15	99,83	0,59	101,05	0,38	100,53	0,37	101,61	0,41		
16	101,07	0,82	102,88	0,50	102,95	0,56	104,09	0,60		
17	101,89	1,12	104,76	0,70	105,74	0,76	106,85	0,79		
18	103,69	1,47	107,11	0,78	108,46	0,82	109,53	1,00		
20	107,36	1,78	111,26	0,77	113,57	0,83	115,32	1,11		
21	108,50	2,01	113,31	0,87	116,71	0,92	119,11	1,21		
23	109,25	2,15	115,59	1,38	123,35	1,13	126,36	1,94		
24	108,77	2,08	115,58	1,43	124,41	1,00	127,25	1,79		

ES 2 564 752 T3

Tabla 22. Efectos de diferentes dosis de E3 en el peso corporal en ratas artríticas reumatoides (normalizado al día 0).

Día	No Artríticas		Vehículo		0,003 mg/kg		0,01 mg/kg		0,03 mg/kg	
	Media	E.T.M	Media	E.T.M	Media	E.T.M	Media	E.T.M	Media	E.T.M
0	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
1	100,45	0,19	98,34	0,48	98,37	0,35	98,86	0,33	98,67	0,34
2	105,94	0,33	101,75	0,71	102,47	0,59	102,61	0,40	102,05	0,53
3	109,29	0,33	105,04	1,04	106,54	0,99	106,29	0,60	105,31	0,85
4	113,13	0,46	109,14	1,15	110,09	0,72	110,61	0,41	109,24	0,82
7	124,15	0,70	119,90	1,39	121,29	1,32	121,59	0,72	117,15	1,36
8	127,82	0,80	123,38	1,52	124,44	1,43	124,47	1,24	118,52	1,89
9	132,40	0,80	125,50	1,59	125,91	1,69	125,82	1,95	118,60	2,62
10	135,91	0,83	123,51	1,77	123,30	2,47	123,87	2,59	115,26	3,19
11	140,42	1,13	119,82	1,98	119,55	2,76	121,20	2,99	112,94	3,48
14	152,59	1,72	111,79	1,40	111,50	1,87	111,80	1,65	108,37	2,75
15	151,87	1,87	110,82	1,41	110,63	2,05	110,85	1,44	108,68	2,45
16	156,47	2,25	111,33	1,74	111,08	2,32	110,98	1,31	109,21	2,16
17	157,65	2,08	111,24	1,62	112,06	2,36	111,42	1,66	110,16	2,03
18	161,98	2,71	112,16	2,21	112,60	2,78	112,54	1,64	111,14	2,11
20	167,36	2,93	113,49	2,37	114,17	3,24	114,82	2,12	113,17	2,49
21	168,73	3,07	114,93	2,62	115,25	3,68	114,76	2,30	113,80	2,68
23	174,51	3,54	116,96	3,02	118,48	3,49	116,76	2,51	114,93	2,62
24	176,27	3,50	117,63	3,13	118,58	3,71	116,56	2,57	114,99	2,51
Día	0,1 mg/kg		0,3 mg/kg		1,0 mg/kg		5,0 mg/kg			
	Media	E.T.M	Media	E.T.M	Media	E.T.M	Media	E.T.M		
0	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00		
1	99,31	0,61	99,26	0,28	98,81	0,27	98,25	0,58		
2	102,87	0,73	102,98	0,43	103,18	0,50	101,82	0,53		
3	106,26	0,82	106,95	0,50	106,52	0,55	105,47	0,58		
4	110,20	0,64	110,50	0,58	110,52	0,67	109,29	0,58		
7	120,50	1,20	120,03	0,82	121,54	1,15	119,77	1,19		
8	123,48	1,58	121,38	1,31	124,28	1,59	121,96	1,72		
9	125,46	2,47	121,57	2,09	125,60	2,23	123,04	2,42		
10	123,95	3,38	118,27	3,07	124,11	2,97	120,00	2,81		

(continuación)

Día	0,1 mg/kg		0,3 mg/kg		1,0 mg/kg		5,0 mg/kg	
	Media	E.T.M	Media	E.T.M	Media	E.T.M	Media	E.T.M
11	121,98	3,93	116,02	3,32	121,27	3,42	117,97	2,98
14	113,90	2,14	108,43	1,94	111,72	2,27	111,58	2,59
15	113,66	1,91	109,59	2,12	112,30	2,23	113,33	2,37
16	115,06	2,00	111,54	2,02	115,00	2,36	116,06	2,30
17	115,99	2,18	113,57	2,04	118,08	2,32	119,14	2,42
18	118,01	2,29	116,13	2,14	121,16	2,55	122,14	2,61
20	122,17	2,57	120,62	2,20	126,90	2,87	128,60	2,77
21	123,49	2,90	122,88	2,49	130,41	2,98	132,82	2,84
23	124,35	3,02	125,36	2,83	137,81	3,09	140,79	2,83
24	123,77	2,80	125,33	2,75	138,93	2,76	141,77	2,61

- 5 El efecto de tratar los animales con diversas dosis de anticuerpo anti-NGF E3 en el peso corporal se analizó estadísticamente usando ANOVA de dos vías para comparar los resultados obtenidos en parejas entre animales artríticos tratados con vehículo y los tratados con una dosis dada de anticuerpo E3. Usando datos normalizados al peso el día 14 (Tabla 21), las dosis de E3 de 0,03 mg/kg dieron como resultado un cambio significativo de peso corporal ( $p < 0,005$ ). A todas las dosis más altas de E3, la diferencia entre animales artríticos tratados y no tratados fue significativa ( $p =$  o  $< 0,0001$ ). Usando datos normalizados al peso el día 0 (Tabla 22), la dosis de E3 de 0,03 mg/kg dio como resultado un cambio significativo del peso corporal ( $p < 0,002$ ). A todas las dosis más altas de E3, la diferencia entre animales artríticos tratados y no tratados fue significativa ( $p < 0,0001$ ).
- 10 De nuevo de acuerdo con estudios anteriores, las ratas tratadas con E3 mostraron menor pérdida de peso aparente que las ratas artríticas tratadas con solución salina (Tabla 22 y Figura 22). De hecho, las ratas tratadas con dosis altas de anticuerpo E3 se estaban recuperando de la pérdida de peso anterior y estaban de hecho ganando peso más rápidamente que sus cohortes no artríticas (Tabla 21 y Figura 21).

#### **Depósito de material biológico**

- 15 Los siguientes materiales se han depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia, Estados Unidos (ATCC):

<b>Material</b>		<b>Nº de Acceso de ATCC</b>	<b>Fecha del Depósito</b>
Eb.911.3E	E3 cadena ligera	PTA-4893	8 de enero de 2003
Eb.pur.911.3E	E3 cadena ligera	PTA-4894	8 de enero de 2003
Db.911.3E	E3 cadena pesada	PTA-4895	8 de enero de 2003

El vector Eb.911.3E es un polinucleótido que codifica la región variable de cadena ligera de E3; el vector Eb.pur.911.3E es un polinucleótido que codifica la región variable de cadena ligera de E3 y el vector Db.911.3E es un polinucleótido que codifica la región variable de cadena pesada de E3.

- 20 Este depósito se realizó según las Cláusulas del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para Fines de Patentes y las Regulaciones del mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años desde la fecha del depósito. El depósito se pondrá a disposición por ATCC según los términos del Tratado de Budapest y sujeto a un acuerdo entre Rinat Neuro-science Corp. y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y no restringida de la descendencia del cultivo del depósito al público tras emisión de la patente de Estados Unidos pertinente o tras abrir al público cualquier solicitud de patente de Estados Unidos o extranjera, lo que suceda primero, y asegura la disponibilidad de la descendencia a quién determine el Comisionado de Patentes y Marcas de Estados Unidos que está autorizado a ello de acuerdo con 38 USC Sección 122 y las normas del Comisionado de acuerdo con la misma (incluyendo 37 CFR Sección 1.14 con referencia particular a 886 OG 638).
- 25

5 El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales en depósito muriera o se perdiera o destruyera cuando se cultive en condiciones adecuadas, los materiales se reemplazarán puntualmente tras la notificación con otro de los mismos. La disponibilidad del material depositado no debe interpretarse como una licencia para practicar la invención en contravención de los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes.

**Secuencias de anticuerpos**

Región variable de cadena pesada (las CDR de Kabat están subrayadas; las CDR de Chothia están *EN NEGRITA Y CURSIVA*)

**QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIHWGDGTTD  
YNSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGGYWYATSYYFDYWGQG  
 TLVTVS (SEC ID Nº: 1)**

10 Región variable de cadena ligera (las CDR de Kabat están subrayadas; las CDR de Chothia están en *NEGRITA Y EN CURSIVA*)

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSG  
VPSRFSGSGSGTDFITFISSLQPEDIATYYCQOEHTLPYTFGQGTKLEIKRT (SEC ID  
 Nº: 2)**

- CDR extendidas de cadena pesada de E3
- 15 CDRH1: GFSLIGYDLN (SEC ID Nº: 3)
- CDRH2: IHWGDGTTDYNSAVKS (SEC ID Nº: 4)
- CDRH3: GGYWYATSYYFDY (SEC ID Nº: 5)
- CDR extendidas de cadena ligera de E3
- CDRL1: RASQISNNLN (SEC ID Nº: 6)
- CDRL2: YTSRFHS (SEC ID Nº: 7)
- 20 CDRL3: QOEHTLPYT (SEC ID Nº: 8)
- CDR extendidas de anticuerpo monoclonal de ratón 911
- CDR extendidas de cadena pesada de 911
- CDRH1: GFSLIGYDIN (SEC ID Nº: 9)
- CDRH2: MIWGDGTTDYNSALKS (SEC ID Nº: 10)
- 25 CDRH3: GGYYYGTSYYFDY (SEC ID Nº: 11)
- CDR extendidas de cadena ligera de 911
- CDRL1: RASQDISNHLN (SEC ID Nº: 12)
- CDRL2: YISRFHS (SEC ID Nº: 13)
- CDRL3: QQSKTLPYT (SEC ID Nº: 14)
- 30 Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de E3 (completa)

**QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIHWGDGTT  
DYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDYW  
 GQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL  
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC  
 CVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV  
 DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK  
 TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  
 YKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
 GK(SEC ID Nº: 16)**

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 3E (anticuerpo completo)

DIQMTQSPSSLSASVVGDRVTITCRASQSSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSG  
VPSRFGSGSGTDFFTISSLQPEDIAITYYCQEHLPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSV  
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS  
TYSLSSTLTLSKADYEKHXVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N°: 17)

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 3E (anticuerpo completo)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAA GCCTTCCGAGACCCT  
GTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGGTTCTCACTTATCGGCTATGATCTTAACTGG  
ATCCGACAGCCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGATTATCTGGGGTG  
ATGGAACCACAGACTATAATTCAGCTGTCAAATCCCGCGTCACCATCTCAAAGA  
CACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACAC  
GGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTIATTGGTACGCCACTAGCTACTACTT  
TGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGG  
CCCATCTGTCTTCCACTGGCCCCATGCTCCCGCAGCACCTCCGAGAGCACAGCC  
GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCAGAACCTGTGACCGTGTCTCTGG  
AACTCTGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTCTGCAGTCC  
TCAGGTCTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCATCCAGCAACTTCGGC  
ACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAAGCAACACCAAGGTCGAC  
AAGACCGTGGAGAGAAAGTGTGTGTGGAGTGTCCACCTTGTCCAGCCCCTCCA  
GTGGCCGGACCATCCGTGTTCTGTTCCTTCCAAAGCCAAAGGACACCCTGATG  
ATCTCCAGAACCCAGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGA  
CCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTATGTGGACGGAGTGGAGGTGCACAACGCCA  
AGACCAAGCCAAGAGAGGAGCAGTTCAACTCCACCTTCAGAGTGGTGAGCGTG  
CTGACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTATAAGTGTAAAGGT  
GTCCAACAAGGGACTGCCATCCAGCATCGAGAAGACCATCTCCAAGACCAAGGG  
ACAGCCAAGAGAGCCACAGGTGTATACCCTGCCACCATCCAGAGAGGAGATGA  
CCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGATTCTATCCATCCGACA  
TCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCAGAGAACA ACTATAAGACCACC  
CCTCCAATGCTGGACTCCGACGGATCCTTCTTCTGTATTCCAAGCTGACCGTGG  
ACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTTGTTCCTGATGCACGAG  
GCCCTGCACAACCACTATAACCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCAGGAAAGTAA (  
SEC ID N°: 65)

Secuencia de nucleótidos de dominio variable de cadena pesada de 3E

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCCGAGACCCT  
GTCCCTCACCTGCACGTCTCTGGGTTCTCACITATCGGCTATGATCTTAACTGG  
ATCCGACAGCCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGATTATCTGGGGTG  
ATGGAACCACAGACTATAATTCAGCTGTCAAATCCCGCGTCACCATCTCAAAAGA  
CACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACAC  
GGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTTATTGGTACGCCACTAGCTACTACTT  
TGACTIONTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEC ID N°: 66)

Secuencia de nucleótidos de cadena ligera de 3E (anticuerpo completo)

GATATCCAGATGACACAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCCTCTGTGGGTGACCGC  
GTCACCATCACCTGCCGCGCATCTCAGTCCATTAGCAATAATCTGAACTGGTATC  
AGCAGAAGCCAGGCAAAGCCCCAAAACCTCCTGATCTACTACACCTCACGCTTCCA  
CTCAGGTGTCCCATCACGCTTCAGTGGCAGTGGCTCTGGTACAGATTTACCTTC  
ACCATTAGCAGCCTGCAACCAGAAGATATTGCCACTTATTACTGCCAACAGGAG  
CATAACCTTCCATATACTTCGGTCAAGGCACCAAGCTGGAGATCAAACGCACTG  
TGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTTCCTCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCCGG  
AACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCACGCGAGGCCAAAGT  
ACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCCGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA  
CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACCCTGA  
GCAAAGCAGACTACGAGAAACACMAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG  
GGCCTGAGTTCTCCAGTCACAAAGAGCTTCAACCGCGGTGAGTGCTAA (SEC ID  
N°: 67)

5

Secuencia de nucleótidos de dominio variable de cadena ligera de 3E

GATATCCAGATGACACAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCCTCTGTGGGTGACCGC  
GTCACCATCACCTGCCGCGCATCTCAGTCCATTAGCAATAATCTGAACTGGTAT  
CAGCAGAAGCCAGGCAAAGCCCCAAAACCTCCTGATCTACTACACCTCACGCTT  
CCACTCAGGTGTCCCATCACGCTTCAGTGGCAGTGGCTCTGGTACAGATTTAC  
CTTACCATTAGCAGCCTGCAACCAGAAGATATTGCCACTTATTACTGCCAAC  
GGAGCATAACCTTCCATATACTTCGGTCAAGGCACCAAGCTGGAGATCAAAC  
GC (SEC ID N°: 68)

LISTADO DE SECUENCIAS

10

<110> Rinat Neuroscience Corp.

<120> ANTICUERPOS ANTI-NGF Y PROCEDIMIENTOS QUE USAN LOS MISMOS

<130> PC19489A

<150> US 60/510.006  
<151> 08-10-2003

5 <150> US 60/443.522  
<151> 28-01-2003

<150> US 60/436.905  
<151> 24-12-2002

10 <160> 77

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

15 <210> 1  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Construcción sintética

<400> 1

```

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

25

<210> 2  
<211> 109  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Construcción sintética

35 <400> 2

```

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 Gln Ser Ile Ser Asn Asn
 20
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35      40      45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Phe His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65      70      75      80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Glu His Thr Leu Pro Tyr
 85      90      95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100      105
    
```

ES 2 564 752 T3

5  
<210> 3  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Construcción sintética

10  
<400> 3

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Leu Asn  
1 5 10

15  
<210> 4  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Construcción sintética

20  
<400> 4

Ile Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Val Lys Ser  
1 5 10 15

25  
<210> 5  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30  
<220>  
<223> Construcción sintética

<400> 5

Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

35

40  
<210> 6  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Construcción sintética

45  
<400> 6

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu Asn  
1 5 10

50  
<210> 7  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 7

5 Tyr Thr Ser Arg Phe His Ser  
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15 <400> 8

Gln Gln Glu His Thr Leu Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 9

20 <211> 10

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 9

25

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ile Asn  
1 5 10

<210> 10

30 <211> 16

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 10

35

Met Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 11

40 <211> 13

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 11

45

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 12

5 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn His Leu Asn  
1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

10 <213> *Mus musculus*

<400> 13

Tyr Ile Ser Arg Phe His Ser  
1 5

15

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

20 <213> *Mus musculus*

<400> 14

Gln Gln Ser Lys Thr Leu Pro Tyr Thr  
1 5

25

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

35

1

5

10

15

<210> 16

<211> 447

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Construcción sintética

45

<400> 16

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr  
 20 Asp Leu Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 Gly Ile Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Val Lys  
 50 Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 Arg Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala  
 130 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 165 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 180 Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His  
 195 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys  
 210 Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val  
 225 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 245 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 260 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 275 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser  
 290 Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 305 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
 325 Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 340 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 355 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 370 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser  
 385 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 405 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 420 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 17  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Construcción sintética

10

<220>

<221> VARIANTE  
 <222> 190  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

5 <400> 17

```

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

10 <210> 18  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 18

```

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu Asn
 1           5           10
    
```

20 <210> 19  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Construcción sintética

30 <400> 19

```

Tyr Thr Ser Arg Phe His Ser
 1           5
    
```

5  
<210> 20  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>

10  
<223> Construcción sintética  
<400> 20

15  
Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Asn His Leu Asn  
1 5 10

20  
<210> 21  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>

25  
<223> Construcción sintética  
<400> 21

Tyr Thr Ser Arg Phe His Ser  
1 5

30  
<210> 22  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35  
<220>  
<223> Construcción sintética  
<400> 22

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Gln Leu Asn  
1 5 10

40  
<210> 23  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45  
<220>  
<223> Construcción sintética  
<400> 23

50  
Tyr Val Ser Arg Phe His Ser  
1 5

55  
<210> 24  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

ES 2 564 752 T3

<220>  
<223> Construcción sintética

5 <400> 24

Arg Ala Phe Gln Ala Ile Ser Asn Gln Leu Asn  
1 5 10

10 <210> 25  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Construcción sintética

<400> 25

Tyr Ile Ser Arg Phe His Thr  
1 5

20 <210> 26  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Construcción sintética

<400> 26

Arg Ala Phe Gln Ser Ile Ser Asn Gln Leu Asn  
1 5 10

30 <210> 27  
<211> 7  
<212> PRT  
35 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Construcción sintética

40 <400> 27

Tyr Ala Ser Arg Phe His Ser  
1 5

45 <210> 28  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Construcción sintética

<400> 28

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ser Asn  
 1 5 10

5 <210> 29  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 29

Ile Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu  
 1 5 10

15 <210> 30  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 30

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Leu Asn  
 1 5 10

25 <210> 31  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 35 <400> 31

Ile Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Val  
 1 5 10

40 <210> 32  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 32

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Val Thr

1 5 10

5 <210> 33  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 33

Gly Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Val  
 1 5 10

15 <210> 34  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 34

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Val Thr  
 1 5 10

30 <210> 35  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 35

Gly Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ser Val  
 1 5 10

40 <210> 36  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 36

ES 2 564 752 T3

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ala Thr  
1 5 10

5 <210> 37  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Construcción sintética  
<400> 37

Gly Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Val  
1 5 10

15 <210> 38  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Construcción sintética  
<400> 38

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Val Ser  
1 5 10

25 <210> 39  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Construcción sintética  
<400> 39

Ile Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ser Val  
1 5 10

35 <210> 40  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Construcción sintética  
<400> 40

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ile Ser  
1 5 10

50 <210> 41

<211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 41

Gln Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ser Val  
 1 5 10

10 <210> 42  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética  
 20 <400> 42

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ala Ser  
 1 5 10

25 <210> 43  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 30 <223> Construcción sintética  
 <400> 43

Gly Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ser Val  
 1 5 10

35 <210> 44  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 45 <400> 44

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ser Thr  
 1 5 10

50 <210> 45  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 45

Ser Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu  
1 5 10

5 <210> 46  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Construcción sintética

<400> 46

Gly Gly Tyr Trp Tyr Gly Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

15 <210> 47  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Construcción sintética

25 <400> 47

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ala Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

30 <210> 48  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Construcción sintética

<400> 48

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

40 <210> 49  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Construcción sintética

<400> 49

50 Gly Gly Tyr Tyr Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

ES 2 564 752 T3

5  
<210> 50  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Construcción sintética  
  
<400> 50

Gln Gln Glu Lys Thr Leu Pro Tyr Thr  
1 5

15  
<210> 51  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Construcción sintética  
  
20  
<400> 51

Gln Gln Glu Ala Thr Leu Pro Tyr Thr  
1 5

25  
<210> 52  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
30  
<220>  
<223> Construcción sintética  
  
<400> 52

Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

35  
  
  
40  
<210> 53  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Construcción sintética  
  
45  
<400> 53

Gln Gln Glu Arg Thr Leu Pro Tyr Thr  
1 5

50  
<210> 54  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>

<223> Construcción sintética

<400> 54

5 Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15 <400> 55

Gln Gln Glu His Thr Leu Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 56

20 <211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Construcción sintética

<400> 56

Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

30 <210> 57

<211> 9

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 57

40 <400> 57

Gln Gln Glu Ser Thr Leu Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 58

45 <211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Construcción sintética

<400> 58

Gly Gly Tyr Trp Tyr Ser Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

- 5 <210> 59
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> Construcción sintética
  
- 10 <400> 59

Gln Gln Glu Lys Thr Leu Pro Tyr Thr  
1 5

- 15 <210> 60
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 20 <220>
- <223> Construcción sintética
  
- <400> 60

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

- 25 <210> 61
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 30 <220>
- <223> Construcción sintética
  
- 35 <400> 61

Gln Gln Glu Arg Thr Leu Pro Tyr Thr  
1 5

- 40 <210> 62
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 45 <220>
- <223> Construcción sintética
  
- <400> 62

Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

50

<210> 63  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 63

10

Gln Gln Glu Arg Thr Leu Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> 64  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Construcción sintética

20

<400> 64

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 65  
 <211> 1344  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25

<220>  
 <223> Construcción sintética

30

<400> 65

35

```

caggtgcagc tgcaggagtc tggcccagga ctggtgaagc cttccgagac cctgtccctc 60
acctgcaact tctctgggtt ctcacttata ggctatgata ttaactggat ccgacagcct 120
ccaggaagg gactggagtg gattgggatt atctggggtg atggaaccac agactataat 180
tcagctgtca aatcccgcgt caccatctca aaagacacct ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag aggaggttat 300
tggtagcca ctagctacta cttgactac tggggccagg gcaccctggt caccgtctcc 360
tcagcctcca ccaagggccc atctgtcttc ccactggccc catgctcccg cagcacctcc 420
gagagcacag ccgccctggg ctgacctggtc aaggactact tcccagaacc tgtgaccgtg 480
tcctggaact ctggcgtctc gaccagcggc gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtcc 540
tcaggtctct actccctcag cagcgtggtg accgtgceat ccagcaactt cggcaccag 600
acctacacct gcaacgtaga tcacaagcca agcaacacca aggtcgacaa gaccgtggag 660
agaaagtgtt gtgtggagtg tccacctgtt ccagccccctc cagtggcccg accatccgtg 720
ttcctgttcc ctccaaagcc aaaggacacc ctgatgatct ccagaacccc agaggtgacc 780
tgtgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac ccagaggtgc agttcaactg gtatgtggac 840
ggagtggagg tgcacaacgc caagaccaag ccaagagagg agcagttcaa ctccacctc 900
agagtggtag gcgtgctgac cgtgggtgac caggactggc tgaacggaaa ggagtataag 960
tgtaagggtg ccaacaaggg actgccatcc agcatcgaga agaccatctc caagaccaag 1020
ggacagccaa gagagccaca ggtgtatacc ctgccaccat ccagagagga gatgaccaag 1080
aaccaggtgt ccctgacctg tctggtgaag ggattctatc catccgacat cgccgtggag 1140
tgggagtcca acggacagcc agagaacaac tataagacca cccctccaat gctggactcc 1200
gacggatcct tcttctgtga ttccaagctg accgtggaca agtccagatg gcagcagggg 1260
aacgtgttct cttgttccgt gatgcacgag gccctgcaca accactatac ccagaagagc 1320
ctgtccctgt ctccaggaaa gtaa 1344
    
```

ES 2 564 752 T3

5 <210> 66  
 <211> 363  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

10 <400> 66

```

caggtgcagc tgcaggagtc tggcccagga ctggtgaagc cttccgagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggtt ctcaactatc ggctatgac ttaactggat ccgacagcct 120
ccaggaagg gactggagtg gattgggatt atctggggtg atggaaccac agactataat 180
tcagctgtca aatcccgcgt caccatctca aaagacacct ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag aggaggttat 300
tggtagcca ctagctacta ctttgactac tggggccagg gcaccctggt caccgtctcc 363
tca
  
```

15 <210> 67  
 <211> 645  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

20 <400> 67

```

gatatccaga tgacacagtc cccatcctcc ctgtctgctt ctgtgggtga ccgcgtcacc 60
atcacctgcc gcgcatctca gtccattagc aataatctga actggtatca gcagaagcca 120
ggcaaagccc caaaactcct gatctactac acctcacgct tccactcagg tgtcccatca 180
cgcttcagtg gcagtggtc tggtacagat ttcacctca ccattagcag cctgcaacca 240
gaagatattg ccacttatta ctgccaacag gagcatacc ttccatatac cttcgggtcaa 300
ggcaccaagc tggagatcaa acgcactgtg gctgcaccat ctgtcttcat ctttccctcca 360
tctgatgagc agttgaaatc cggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
ccacgcgagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgcc tccaatccgg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacc 540
ctgagcaaa gagactacga gaaacacmaa gtctacgctt gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagttctc cagtcacaaa gagcttcaac cgcggtgagt gctaa 645
  
```

25 <210> 68  
 <211> 324  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

30 <400> 68

```

gatatccaga tgacacagtc cccatcctcc ctgtctgctt ctgtgggtga ccgcgtcacc 60
atcacctgcc gcgcatctca gtccattagc aataatctga actggtatca gcagaagcca 120
ggcaaagccc caaaactcct gatctactac acctcacgct tccactcagg tgtcccatca 180
cgcttcagtg gcagtggtc tggtacagat ttcacctca ccattagcag cctgcaacca 240
gaagatattg ccacttatta ctgccaacag gagcatacc ttccatatac cttcgggtcaa 300
ggcaccaagc tggagatcaa acgc
  
```

35 <210> 69  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 69

ES 2 564 752 T3

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

5 <210> 70  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 70

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

15 <210> 71  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 71

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

ES 2 564 752 T3

<210> 72  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 72

10

```

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

<210> 73  
 <211> 95  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 73

```

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 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20      25      30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35      40      45
Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65      70      75      80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro
 85      90      95
    
```

20

<210> 74  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 74

30

ES 2 564 752 T3

```

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

```

5 <210> 75  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 75

```

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

```

15 <210> 76  
 <211> 1429  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 76

```

atggccaccg actccagaac ctctggctg ctgacagtgt ccctgctgtg tctgctgtgg 60
ccacaggagg ccagcgctca ggtgcagctg caggagtctg gccaggact ggtgaagcct 120
tccgagacc tgtccctcac ctgcaactgt tctgggttct cacttatcgg ctatgatctt 180
aactggatcc gacagcctcc aggggaagga ctggagtgga ttgggattat ctgggggtgat 240
ggaaccacag actataattc agctgtcaaa tcccgcgtca ccatctcaa agacacctcc 300
aagaaccagt tctccctgaa gctgagctct gtgaccgccc cggacacggc cgtgtattac 360
tgtgagagag gaggttattg gtacgccact agctactact ttgactactg gggccagggc 420
accctggcca ccgtctctc agcctccacc aagggcccat ctgtcttccc actggcccca 480
tgctcccgca gcacctcga gagcacagcc gccctgggct gcctgggtaa ggactacttc 540
ccagaacctg tgaccgtgtc ctggaactct ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc 600
ccagctgtcc tgcagtcctc aggtctctac tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccatcc 660
agcaacttcg gcacccagac ctacacctgc aacgtagatc acaagccaag caacaccaag 720
gtcgacaaga ccgtggagag aaagtgttgt gtggagtgtc caccttgctc agcccctcca 780
gtggccggac catccgtgtt cctgttccc ccaaagccaa aggacaccct gatgatctcc 840
agaacccag aggtgacctg tgtggtgggtg gacgtgtccc acgaggacc agaggtgcag 900
tcaactgggt atgtggacgg agtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc aagagaggag 960
cagttcaact ccaccttcag agtggtgagc gtgctgaccg tgggtcacca ggactggctg 1020
aacggaaagg agtataagtg taaggtgtcc aacaagggac tgccatccag catcgagaag 1080
accatctcca agaccaaggg acagccaaga gagccaagg tgtataacct gccaccatcc 1140
agagaggaga tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tgggtgaaggg attctatcca 1200
tccgacatcg ccgtggagtg ggagtccaac ggacagccag agaacaacta taagaccacc 1260
cctccaatgc tggactccga cggatccttc ttcctgtatt ccaagctgac cgtggacaag 1320
tccagatggc agcagggaaa cgtgttctct tgttccgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1380
cactatacc agaagagcct gtcccctgtct ccaggaaagt aattctaga 1429

```

- <210> 77
- <211> 729
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> Construcción sintética
  
- 10 <220>
- <221 > misc\_feature
- <222> 646
- <223> m = A o C
  
- 15 <400> 77

```

atggccaccg actccagaac ctctggctg ctgacagtgt ccctgctgtg tctgctgtgg 60
ccacaggagg ccagcgctga tatccagatg acacagtccc catctctcct gtctgcctct 120
gtgggtgacc gcgtcaccat cacctgccgc gcatctcagt ccattagcaa taatctgaac 180
tggtatcagc agaagccagg caaagcccca aaactcctga tctactacac ctcacgcttc 240
cactcagggtg tcccatcacg ctteagtggc agtggctctg gtacagattt caccttcacc 300
attagcagcc tgcaaccaga agatattgcc acttattact gccaacagga gcataccctt 360
ccatatacct tcggtcaagg caccaagctg gagatcaaac gcactgtggc tgcaccatct 420
gtcttcatct ttcctccatc tgatgagcag ttgaaatccg gaactgcctc tgttgtgtgc 480
ctgctgaata acttctatcc acgagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc 540
caatccggta actcccagga gagtgtcaca gacgaggaca gcaaggacag cacctacagc 600
ctcagcagca ccctgaccct gagcaagca gactacgaga aacacmaagt ctacgcctgc 660
gaagtcaacc atcagggcct gaggttctcca gtcacaaaga gtttcaaccg cgggtgagtg 720
taattctag

```

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo antagonista anti factor de crecimiento nervioso (NGF) o fragmento de unión a antígeno del mismo para uso en el tratamiento del dolor osteoartrítico en un individuo.
- 5 2. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une con un epítipo de NGF que comprende uno o más de: restos K32, K34 y E35 de NGF humano; restos Y79 y T81 de NGF humano; restos H84 y K88 de NGF humano; resto R103 de NGF humano; resto E11 de NGF humano; resto Y52 de NGF humano; restos L112 y S113 de NGF humano; restos R59 y R69 de NGF humano; o restos V18, V20 y G23 de NGF humano.
- 10 3. Un anticuerpo anti NGF o fragmento de unión a antígeno del mismo para uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo:
- (a) se une a NGF con una  $K_D$  menor de 2 nM, determinado por resonancia de plasmón superficial BIAcore;
- (b) inhibe la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas del trigémino E13.5 de ratón con una CI50 de 100 pM o menor, en el que la CI50 se mide en presencia de NGF humano 15 pM; y
- 15 (c) inhibe la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas del trigémino E13.5 de ratón con una CI50 de 10 pM o menor, en el que la CI50 se mide en presencia de NGF humano 1,5 pM.
4. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para uso de la reivindicación 1, que comprende (a) tres CDR de una región variable de cadena pesada de SEC ID N°: 1; y (b) tres CDR de una región variable de cadena ligera de SEC ID N°: 2; en el que las CDR son CDR de Kabat, CDR de Chothia o una combinación de CDR de Kabat y Chothia.
- 20 5. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para uso de la reivindicación 4, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada que comprende:
- (a) una región CDR1 mostrada en SEC ID N°: 3;
- (b) una región CDR2 mostrada en SEC ID N°: 4; y
- (c) una región CDR3 mostrada en SEC ID N°: 5; y
- 25 una región variable de cadena ligera que comprende:
- (d) una región CDR1 mostrada en SEC ID N°: 6;
- (e) una región CDR2 mostrada en SEC ID N°: 7; y
- (f) una región CDR3 mostrada en SEC ID N°: 8.
- 30 6. Un anticuerpo para uso de la reivindicación 4 o 5, en el que el anticuerpo comprende adicionalmente una región constante de IgG2a de cadena pesada humana.
7. Un anticuerpo para uso de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo comprende adicionalmente una región constante kappa de cadena ligera humana.
8. Un anticuerpo para uso de la reivindicación 6 o 7, en el que la región constante de IgG2a de cadena pesada humana está modificada.
- 35 9. Un anticuerpo para uso de la reivindicación 8, en el que la región constante de IgG2a de cadena pesada humana comprende las mutaciones A330P331 a S330S331, numeración de aminoácidos con referencia a la secuencia de IgG2a de tipo silvestre.
10. Un anticuerpo o fragmento del mismo para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada que
- 40 comprende la secuencia mostrada en SEC ID N°: 1; y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia mostrada en SEC ID N°: 2.
11. Un anticuerpo para uso de la reivindicación 10, comprendiendo el anticuerpo una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 16 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 17.
- 45 12. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une con el mismo epítipo de NGF humano que un anticuerpo como se define en la reivindicación 10 u 11.
13. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el fragmento de unión a antígeno es un Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv o ScFv.

14. Uso de un anticuerpo antagonista anti NGF o fragmento de unión a antígeno del mismo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del dolor osteoartrítico en un individuo.



FIGURA 1A - 1B (CONT.)

	95	100	105	110	115	120	
		<u>GGYY</u>	<u>YGTS</u>	<u>YFFDY</u>			
1-	Y	C	A	R	G	T	V
2-Y	Y	C	A	R	G	T	V
3-Y	Y	C	A	R	G	T	V
4-Y	Y	C	A	R	G	T	V
5-Y	Y	C	A	R	G	T	V
6-Y	Y	C	A	R	G	T	V

	25	30	35	40	45
	<u>RASQ</u>	<u>DISNHL</u>	<u>LN</u>	<u>YQQ</u>	<u>KPKL</u>
1-	I	Q	M	T	Q
2-D	I	Q	M	T	Q
3-D	I	Q	M	T	Q
4-D	I	Q	M	T	Q
5-D	I	Q	M	T	Q

	50	55	60	65	70	75	80	85	90
	<u>YISRFHS</u>	<u>VDASNLE</u>	<u>ETGV</u>	<u>PPSR</u>	<u>FFSG</u>	<u>SGSG</u>	<u>ITD</u>	<u>FTF</u>	<u>TISS</u>
1-	I	Y	D	A	S	N	L	E	T
2-L	I	Y	D	A	S	N	L	E	T
3-L	I	Y	D	A	S	N	L	E	T
4-L	I	Y	D	A	S	N	L	E	T
5-L	I	Y	D	A	S	N	L	E	T

1B) REGIÓN VARIABLE DE CADENA LIGERA

- 1 = anticuerpo 911 de ratón (CDR)
- 2 = línea germinal aceptora humana 08
- 3 = CDR injertado
- 4 = 3 + maduración de afinidad L1, L2
- 5 = 4 + maduración de afinidad L3 (región variable de cadena ligera de anticuerpo 3E)

FIGURA 1A-1B (CONT.)

	95	100	105	109
1-T	<u>L</u>			
2-N	<u>L</u>			
3-T	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>Y</u>	<u>T</u>
4-T	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>Y</u>	<u>T</u>
5-T	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>Y</u>	<u>T</u>

1-T L P Y T  
2-N L P  
3-T L P Y T F G Q G T K L E I K R T  
4-T L P Y T F G Q G T K L E I K R T  
5-T L P Y T F G Q G T K L E I K R T

Figura 2

Patrón Db.911.3E; ADN circular; ; 1429 PB.

Este archivo se creó mediante Vector NTI

<http://www.informaxinc.com/>

VNTDATE|285871584|

VNTDBDATE|285873257|

VNTAUTHORNAME|Demo User|

Secuencia 1429 PB; 331 A; 440 C; 380 G; 278 t;

atggccaocg	actccagaac	ctcctggctg	ctgacagtgt	ccctgctgtg	totgetgtgg	60
coacaggagg	ccagcgctca	ggtgcagctg	caggagtctg	gcccaggact	ggtgaagcct	120
tccgagaoc	tgtccctoac	ctgcaotgtc	totgggttct	oaottatogg	ctatgatott	180
aactggatoc	gacagcctcc	agggaaggga	ctggagtgga	ttgggattat	ctggggtgat	240
ggaaccaag	actataatcc	agctgtcaaa	tcccgctca	ccatctcaaa	agacacctcc	300
aagaaccagt	tctccctgaa	gotgagctot	gtgaocgcog	cggacacggo	ogtgtattac	360
tgtgagagag	gaggttattg	gtacgocact	agctactact	ttgaotactg	gggcccaggc	420
accttggtca	ccgtctcctc	agcctccacc	aagggcccat	ctgtcttccc	actggcccca	480
tgctccogca	gcacotcoga	gagcacagcc	gccctgggct	gcctggtoaa	ggactacttc	540
ccagaacctg	tgacogtctc	ctggaactct	ggcgototga	ccagcggcgt	gcacaccttc	600
ccagctgtcc	tgcagtctcc	aggtctctac	tccctcagca	gcgtgggtgac	cgtgccatcc	660
agcaacttcg	gcacccagac	ctacacctgc	aacgtagatc	acaagccaag	caacaccaag	720
gtcgacaaga	ccgtggagag	aaagtgttgt	gtggagtgtc	cacottgtcc	agcccctcca	780
gtggccggac	catccgtgtt	cctgttccct	ccaaagccaa	aggacacctc	gatgatctcc	840
agaaccccag	aggtgacctg	tgtggtgggt	gacgtgtccc	acgaggaccc	agaggtgcag	900
ttcaactggt	atgtggacgg	agtggaggtg	cacaacgcca	agaccaagcc	aagagaggag	960
cagttcaact	ccaccttcag	agtggtgagc	gtgctgaccg	tggtgcacca	ggactggctg	1020
aacggaaaag	agtataagtg	taagggtgtc	aacaagggac	tgcoatccag	catcgagaag	1080
accatctoca	agaccaaggg	acagccaaga	gagccacagg	tgtataacct	gccacctatc	1140
agagaggaga	tgaccaagaa	ccaggtgtcc	ctgacctgtc	tggtgaaggg	attctatcca	1200
tccgacatcg	ccgtggagtg	ggagtcacaac	ggacagccag	agaacaacta	taagaccacc	1260
cctccaatgc	tggactccga	cggatccttc	ttcctgtatt	ccaagctgac	cgtggacaag	1320
tccagatggc	agcagggaaa	cgtgtttctc	tgttccgtga	tgcaogaggc	cctgcacaac	1380
cactataccc	agaagagcct	gtccctgtct	ccaggaaagt	aattctaga	1420	

Figura 3

Patrón Eb.911.3E; ADN circular; ; 729 PB.

Este archivo se creó mediante Vector NTI

<http://www.informaxinc.com/>

VNTDATE|285871514|

VNTDBDATE|285872959|

VNTAUTHORNAME|Demo User|

Secuencia 729 PB: 182 A; 231 C; 161 G; 154 t; 1 distinto;

atggcaccg	actccagaac	ctcctggctg	ctgacagtgt	ccctgotgtg	totgotgtgg	60
ccacaggagg	ccagcgotga	tatccagatg	acacagtccc	catcctccct	gtctgcctct	120
gtgggtgacc	gogtoaccat	cacctgccgc	gcctctcagt	ccattagcaa	taatctgaac	180
tggatcagc	agaagccagg	caaagcccca	aaactcctga	totactacac	ctcagcttc	240
caotcaggtg	toccatocag	cttcagtggc	agtggctctg	gtacagattt	caccttcacc	300
attagcagcc	tgaaccaga	agatattgcc	acttattact	gccaacagga	gcataccctt	360
ccatatacct	tcggtcaagg	caccaagctg	gagatcaaac	gcactgtggc	tgcaccatct	420
gtcttcatct	ttcctccatc	tgatgagcag	ttgaaatccg	gaactgootc	tgttgtgtgc	480
ctgctgaata	acttotatcc	acgcgaggcc	aaagtacagt	ggaaggtgga	taacgccttc	540
caatccggta	actccagga	gagtgtcaca	gagcaggaca	gcaaggacag	cacctacago	600
ctcagcagca	ccctgaccct	gagcaaagca	gactacgaga	aacacmaagt	ctacgcctgc	660
gaagtcaccc	atcagggcct	gagttotcca	gtcacaaaga	gottcaaccg	cgggtgagtgc	720
taattctag						729

Figura 4

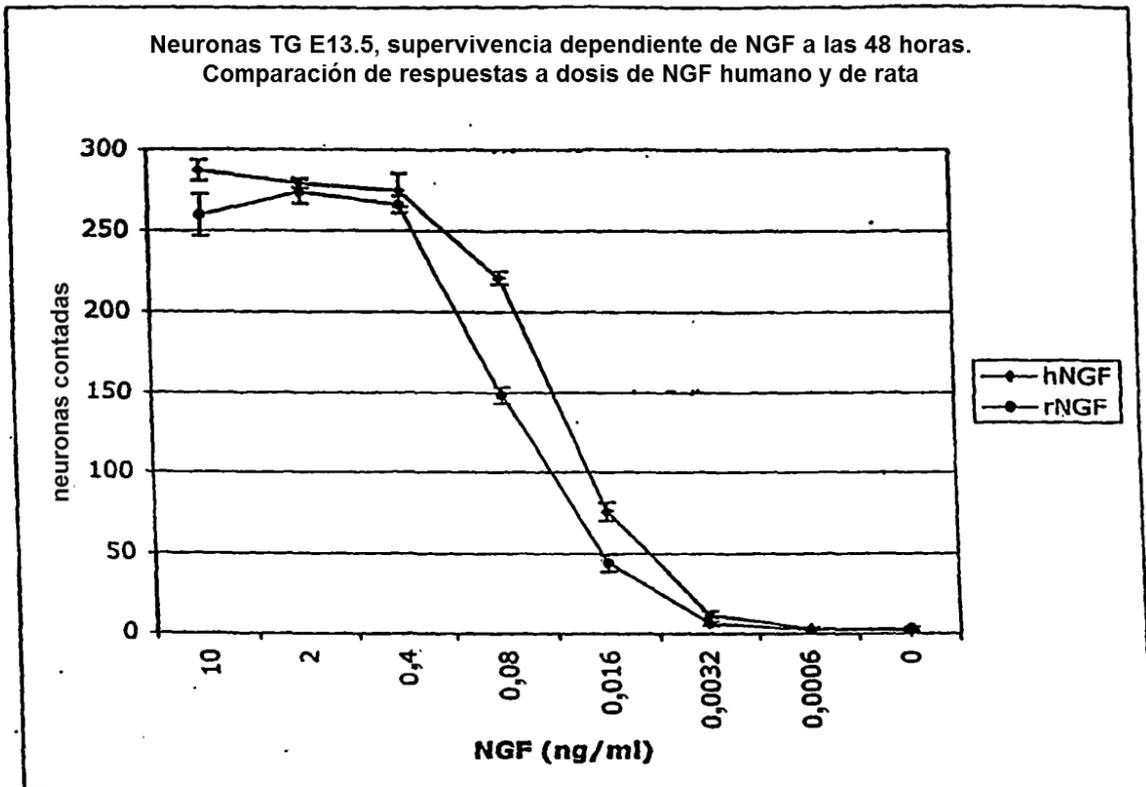


Figura 5

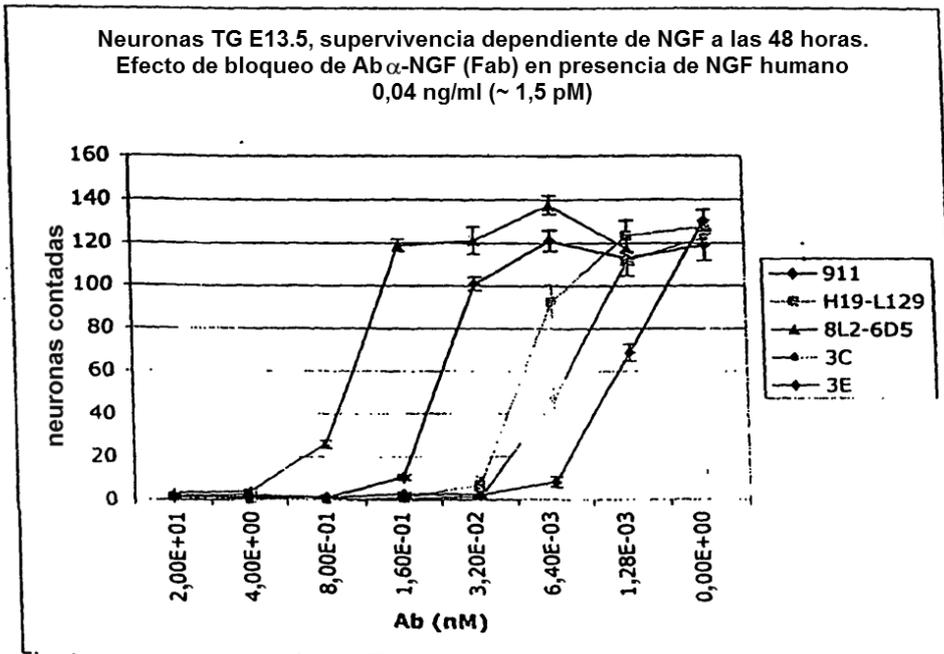
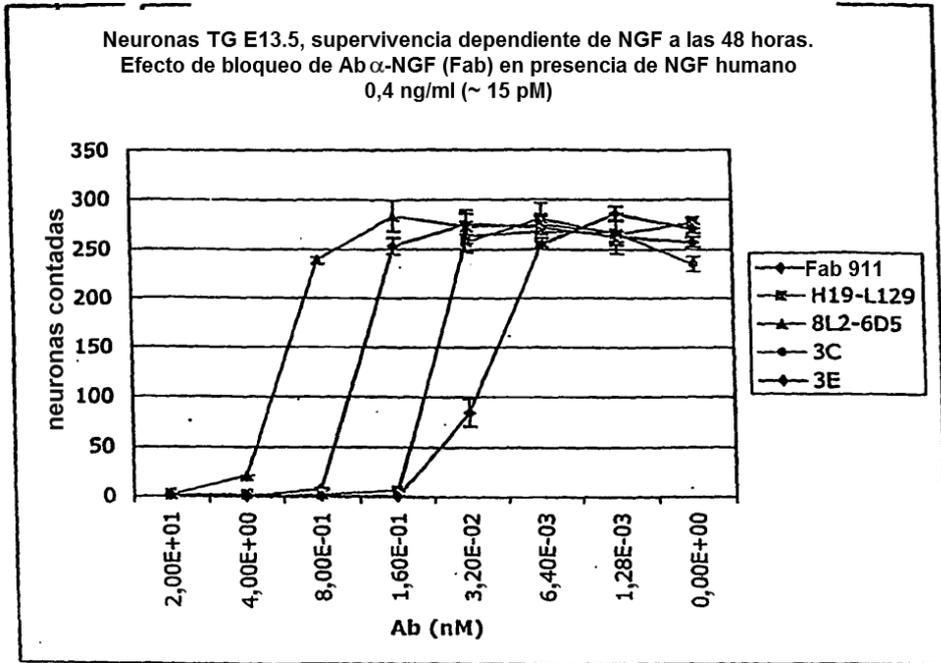
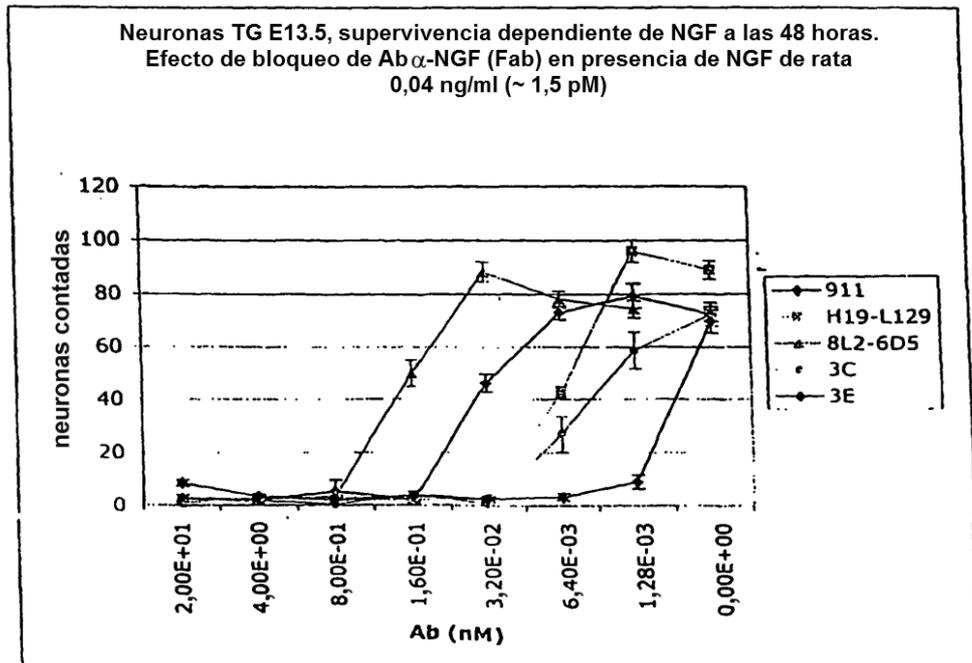
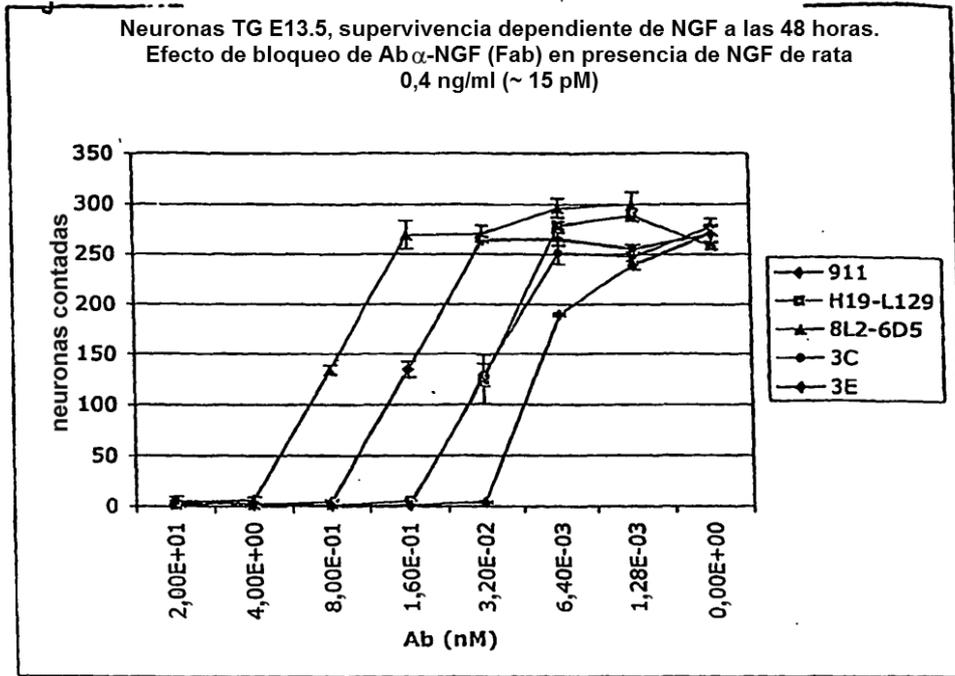
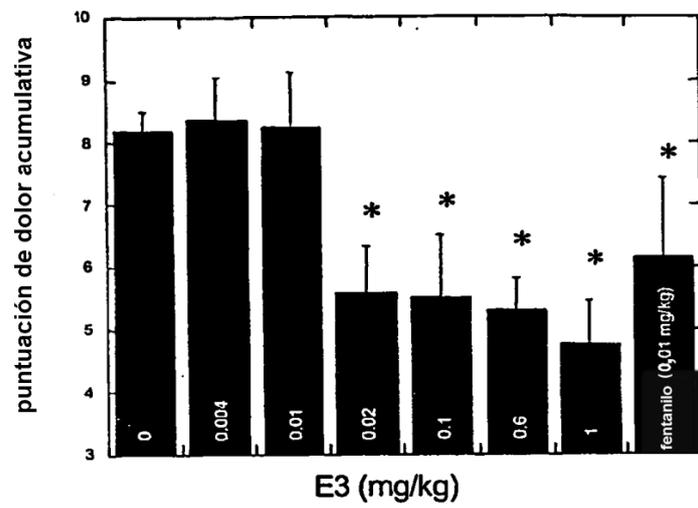


Figura 6

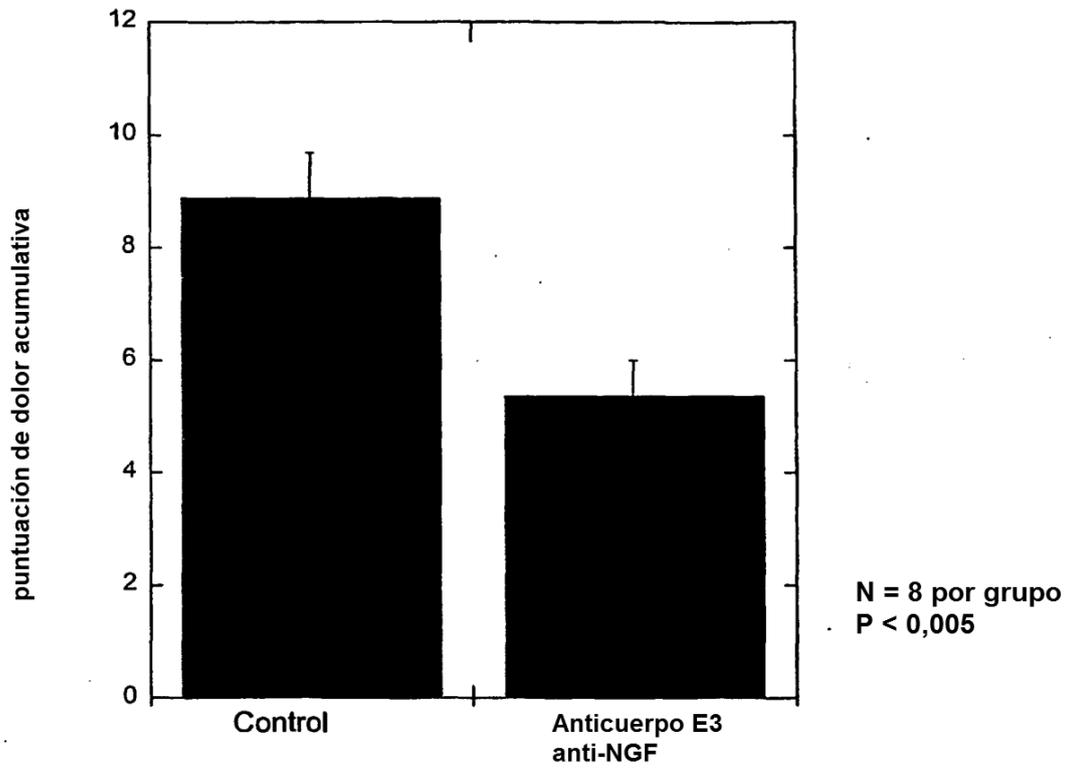


**El anticuerpo E3 anti-NGF humanizado alivia el dolor post-quirúrgico**



**FIGURA 7**

**El anticuerpo E3 anti-NGF alivia el dolor cuando se inyecta dos horas después de la cirugía**



**Figura 8**

FIGURA 9

Cinética de unión: Fab 911 en microplaca CM5 de NGF

$k_{on}$   $2,2 \cdot 10^4$  (1/Ms)  
 $k_{off}$   $8,4 \cdot 10^{-5}$  (1/s)  
 $K_D$  3,7 nM

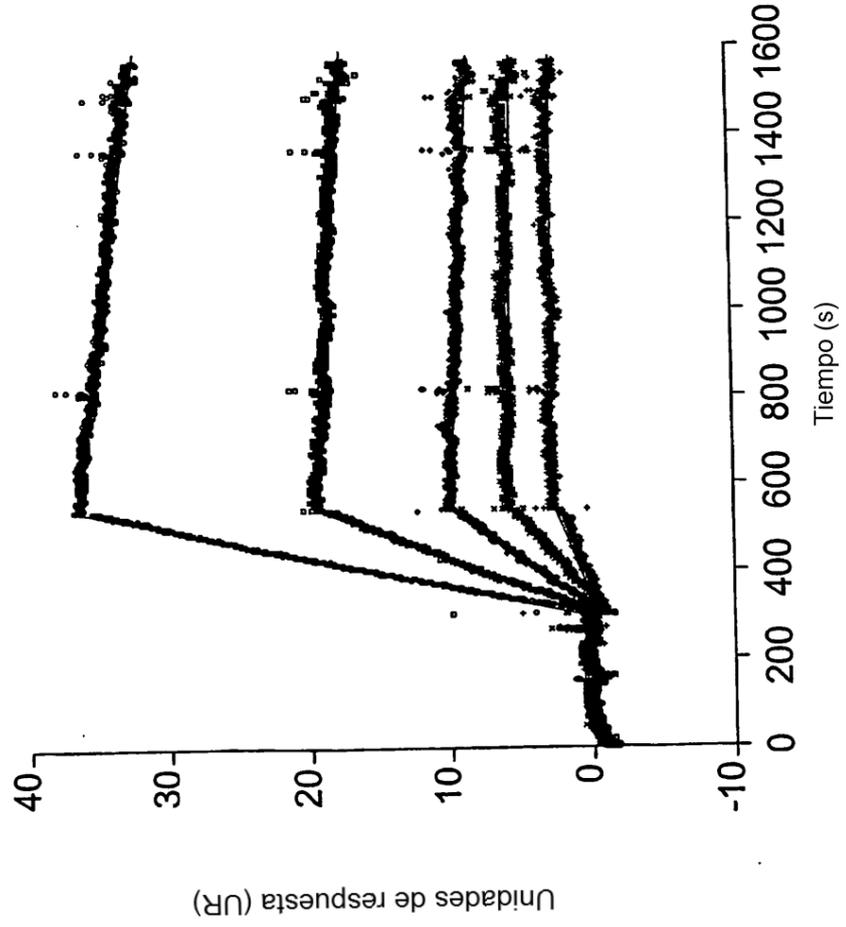


FIGURA 10

Cinética de unión: Fab 3E en microplaca CM5 de NGF

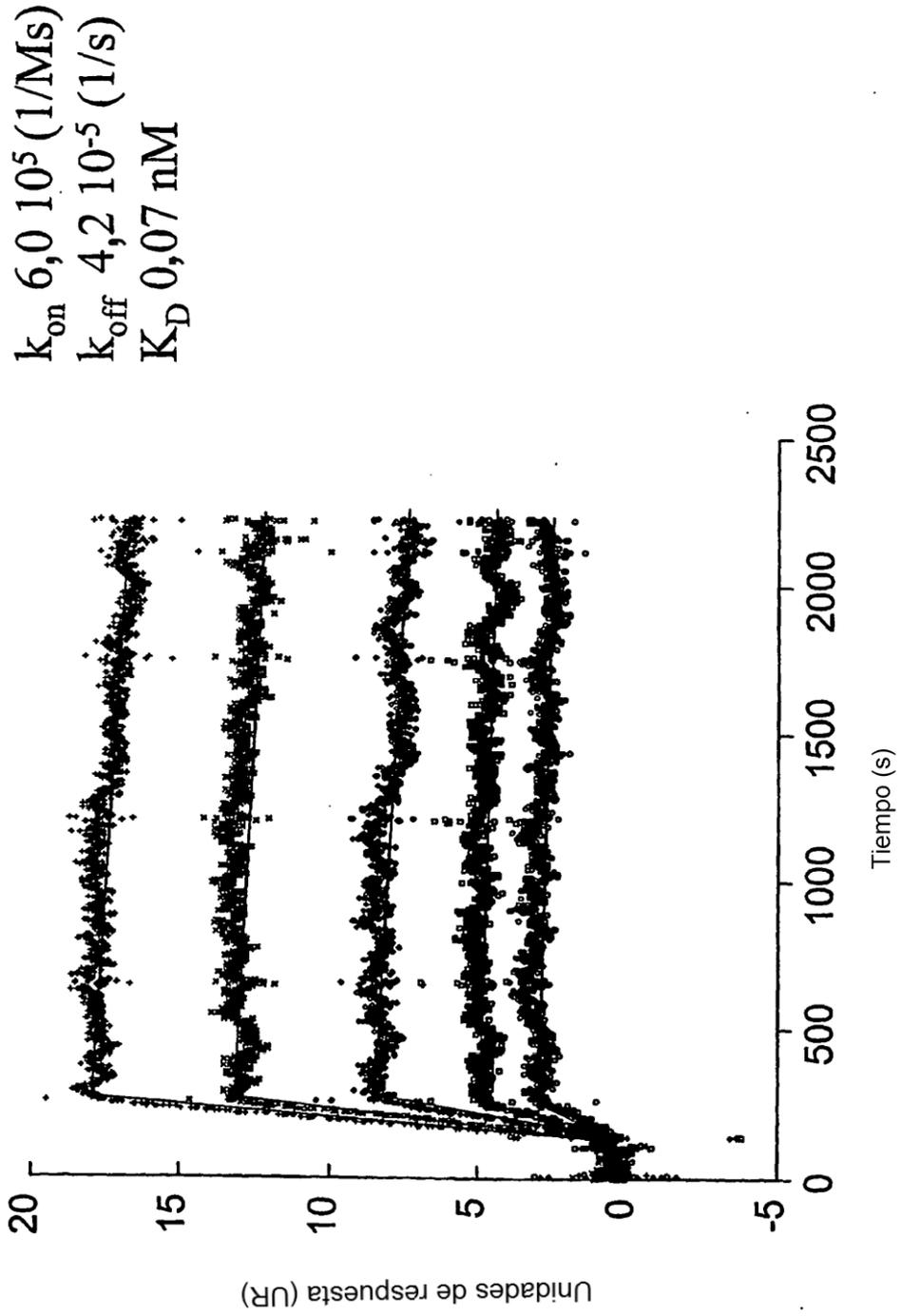
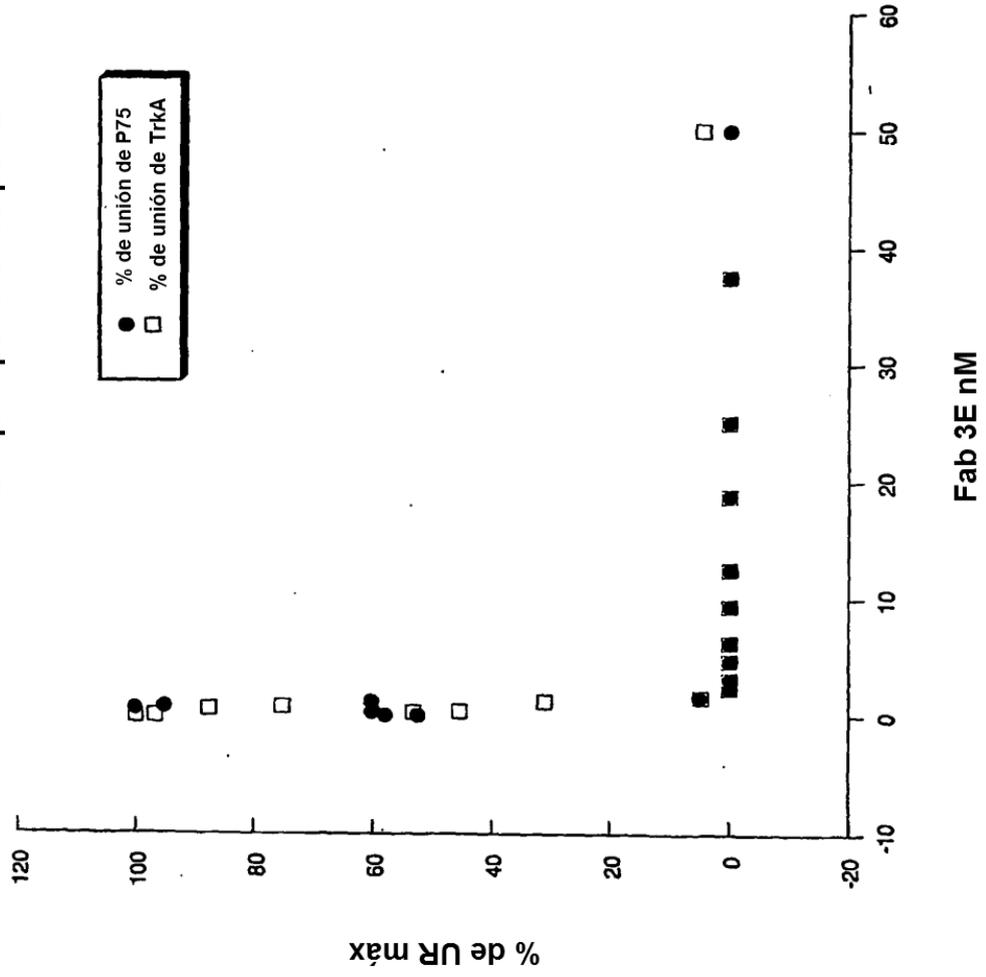


FIGURA 11

Interacción de NGF-TrkA y NGF-P75:  
Bloqueo por anticuerpo 3E



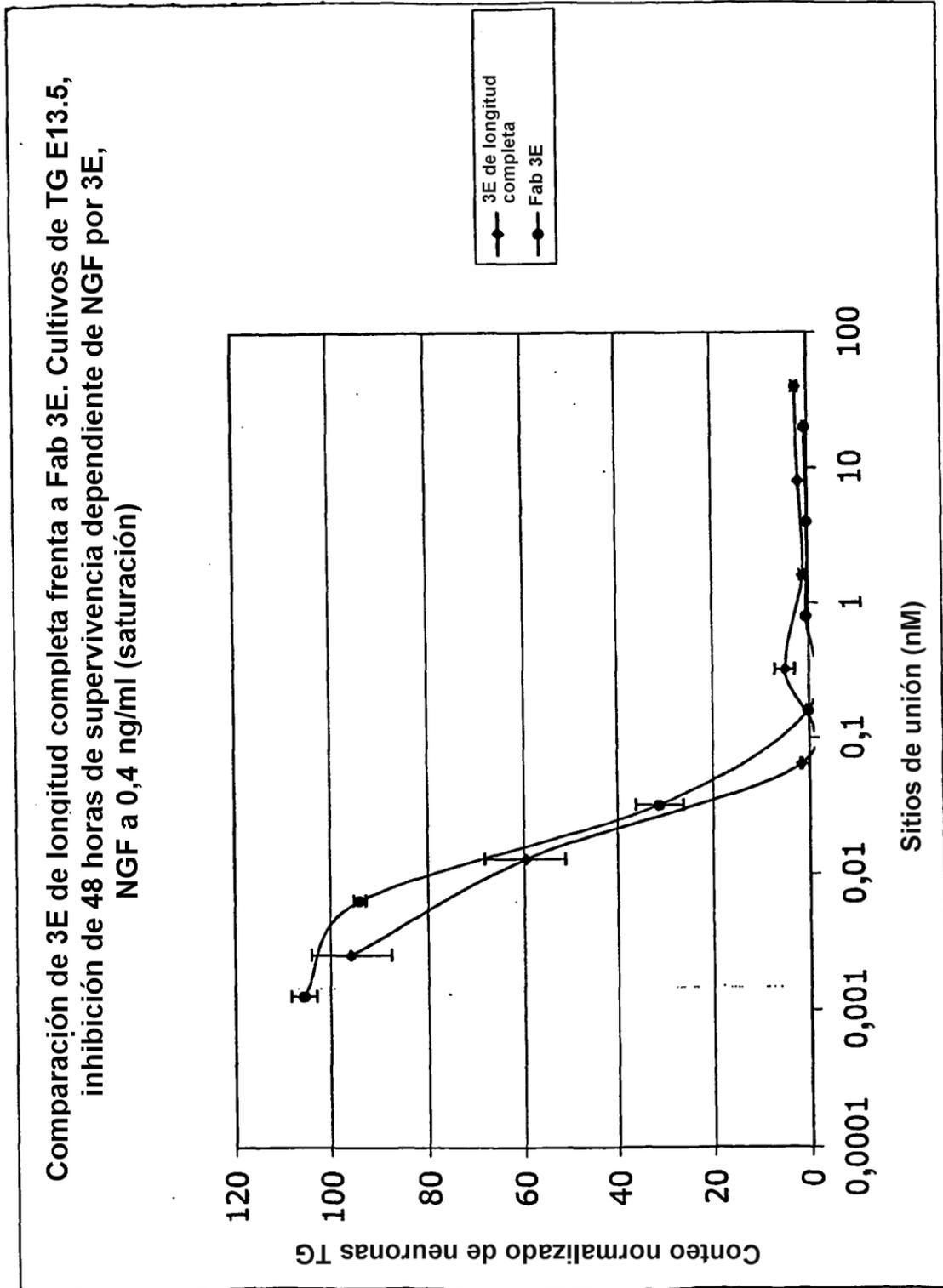


FIGURA 12

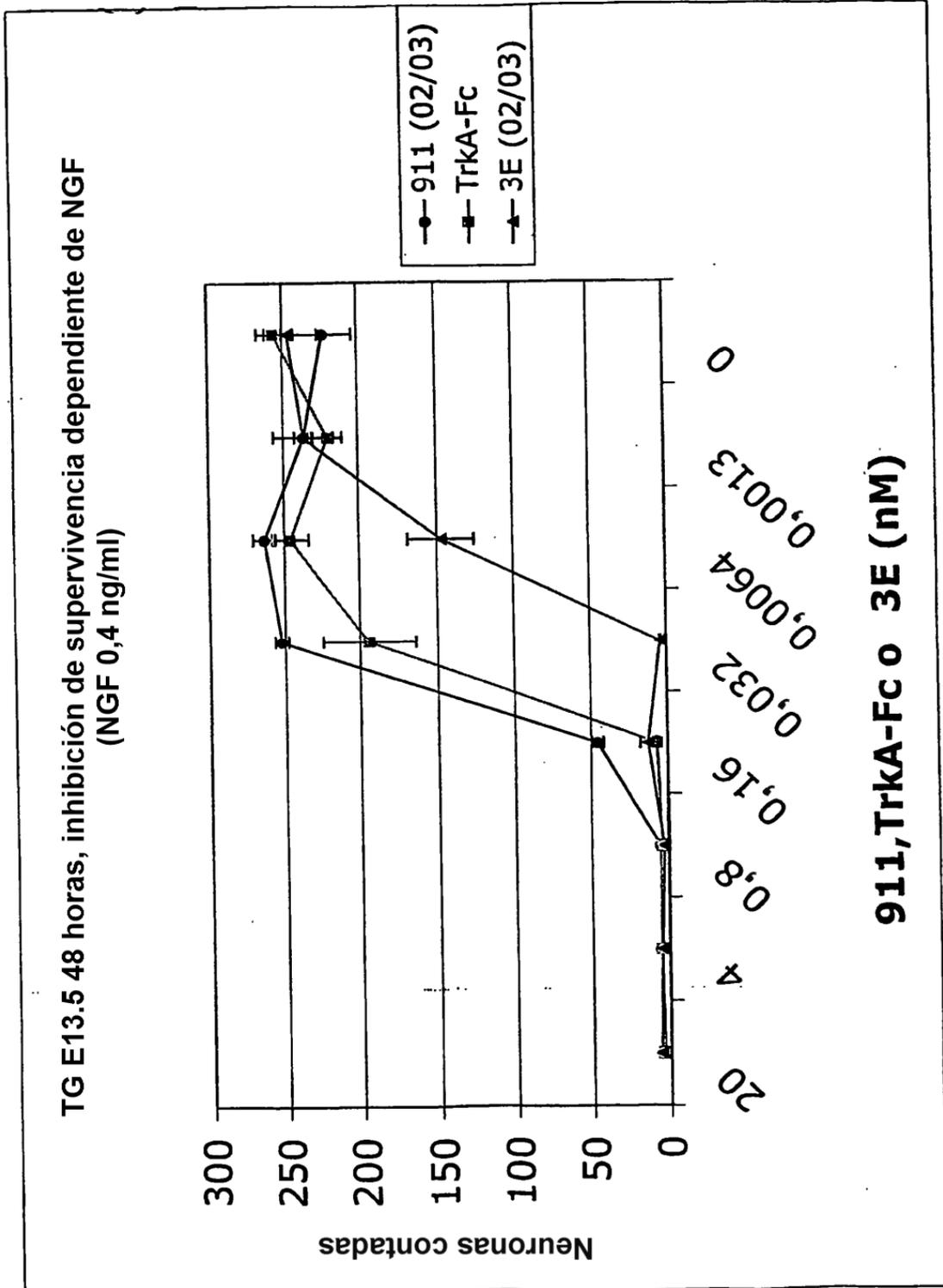


FIGURA 13

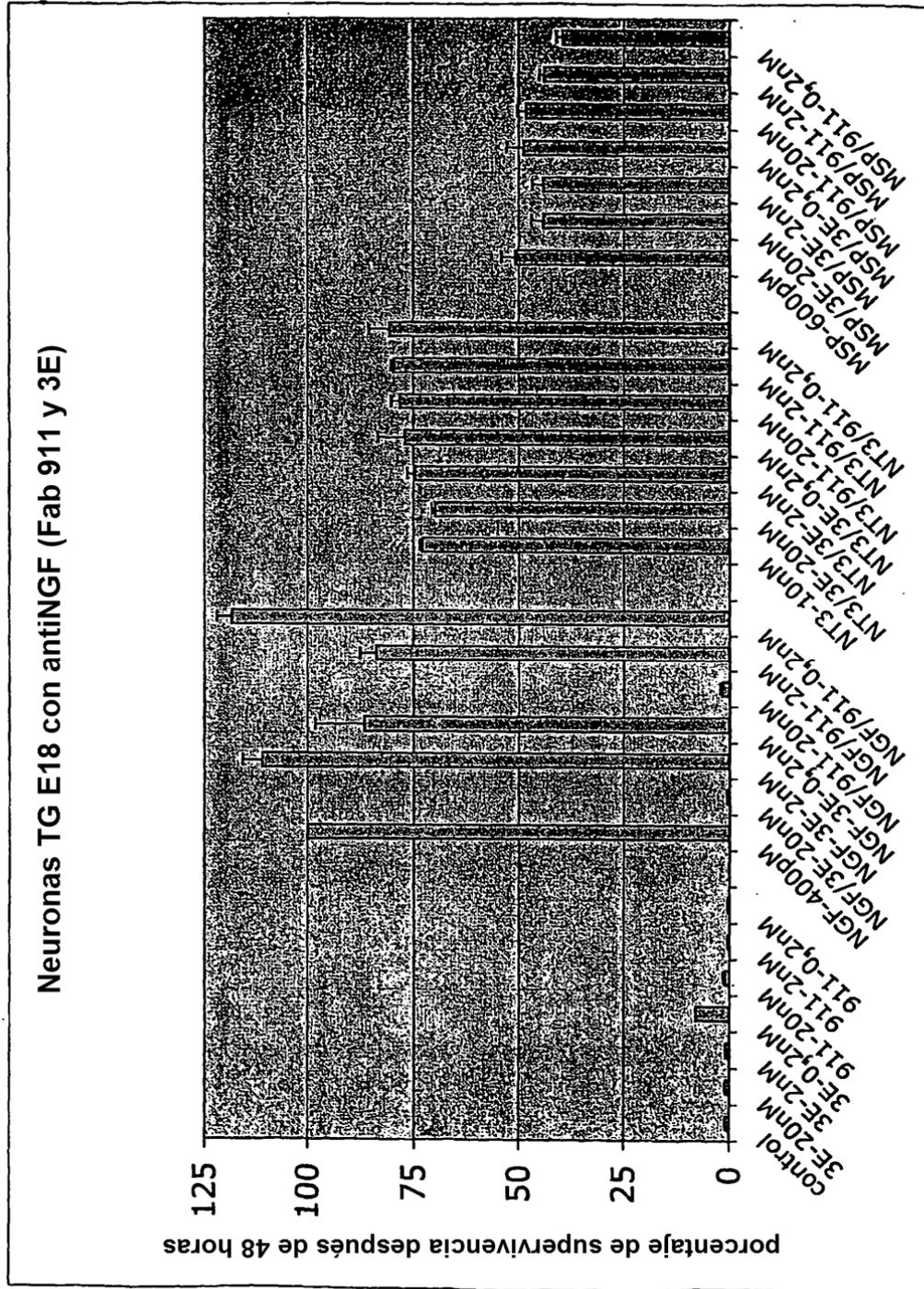


FIGURA 14

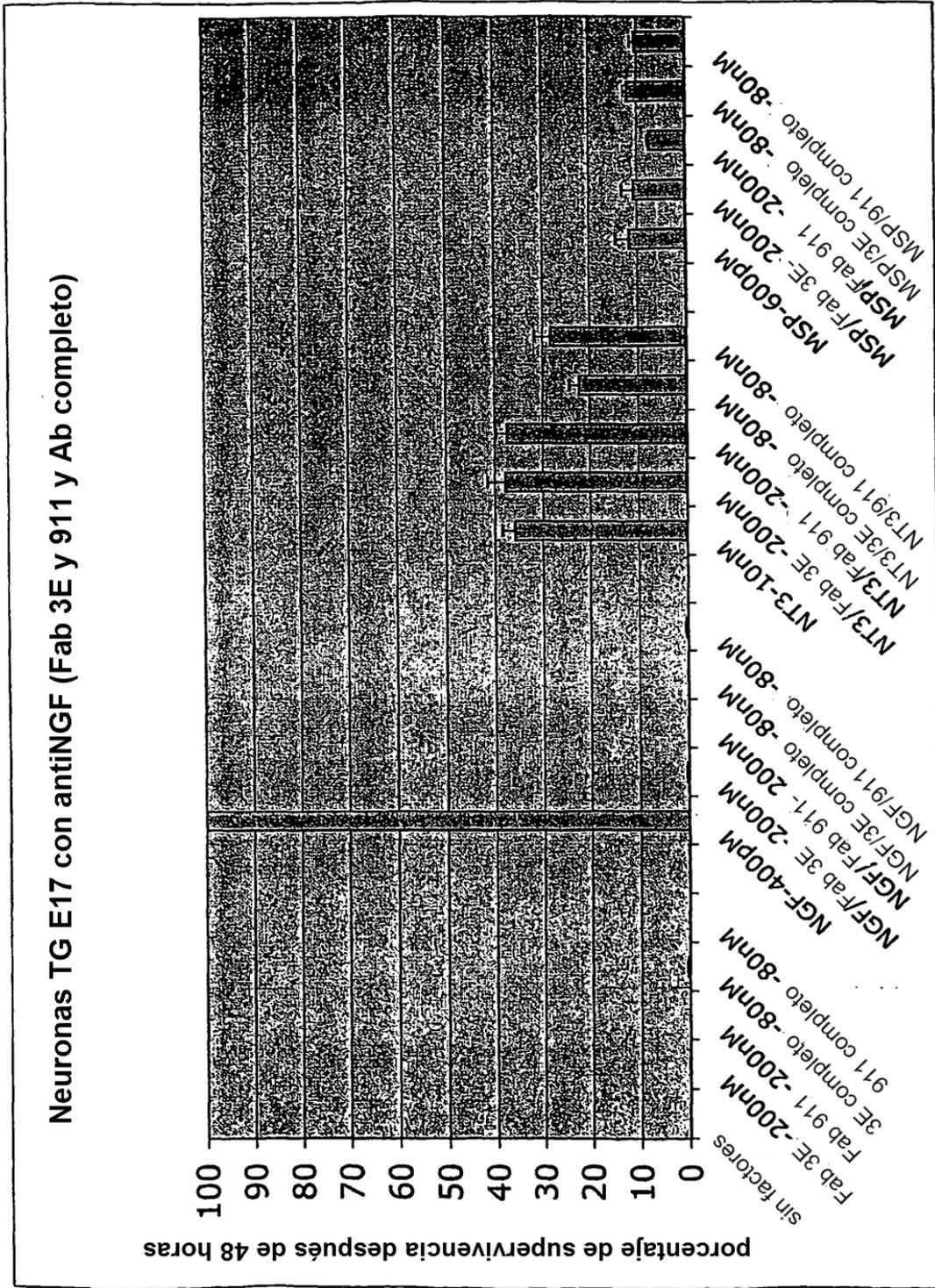


FIGURA 15

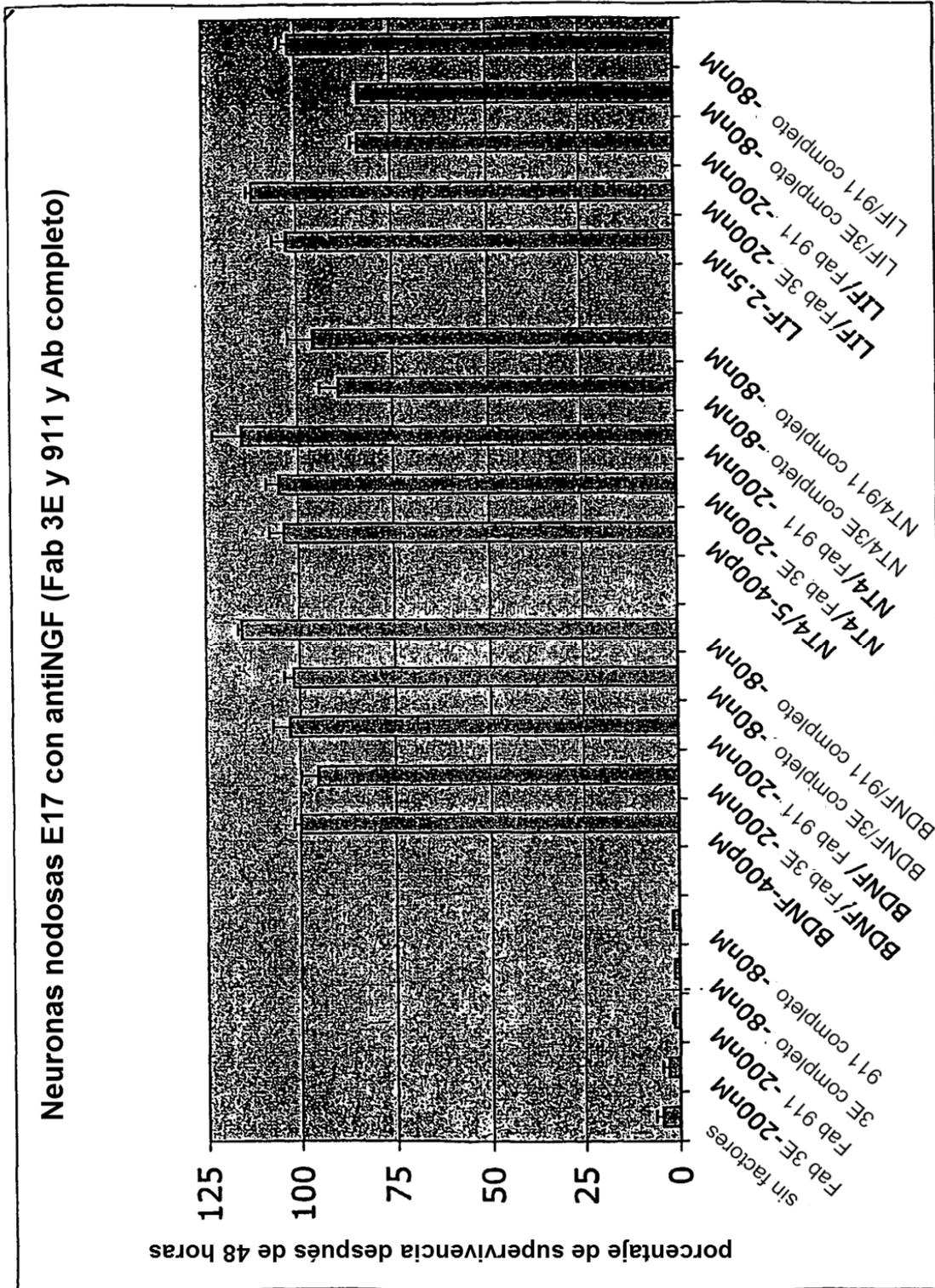


FIGURA 16

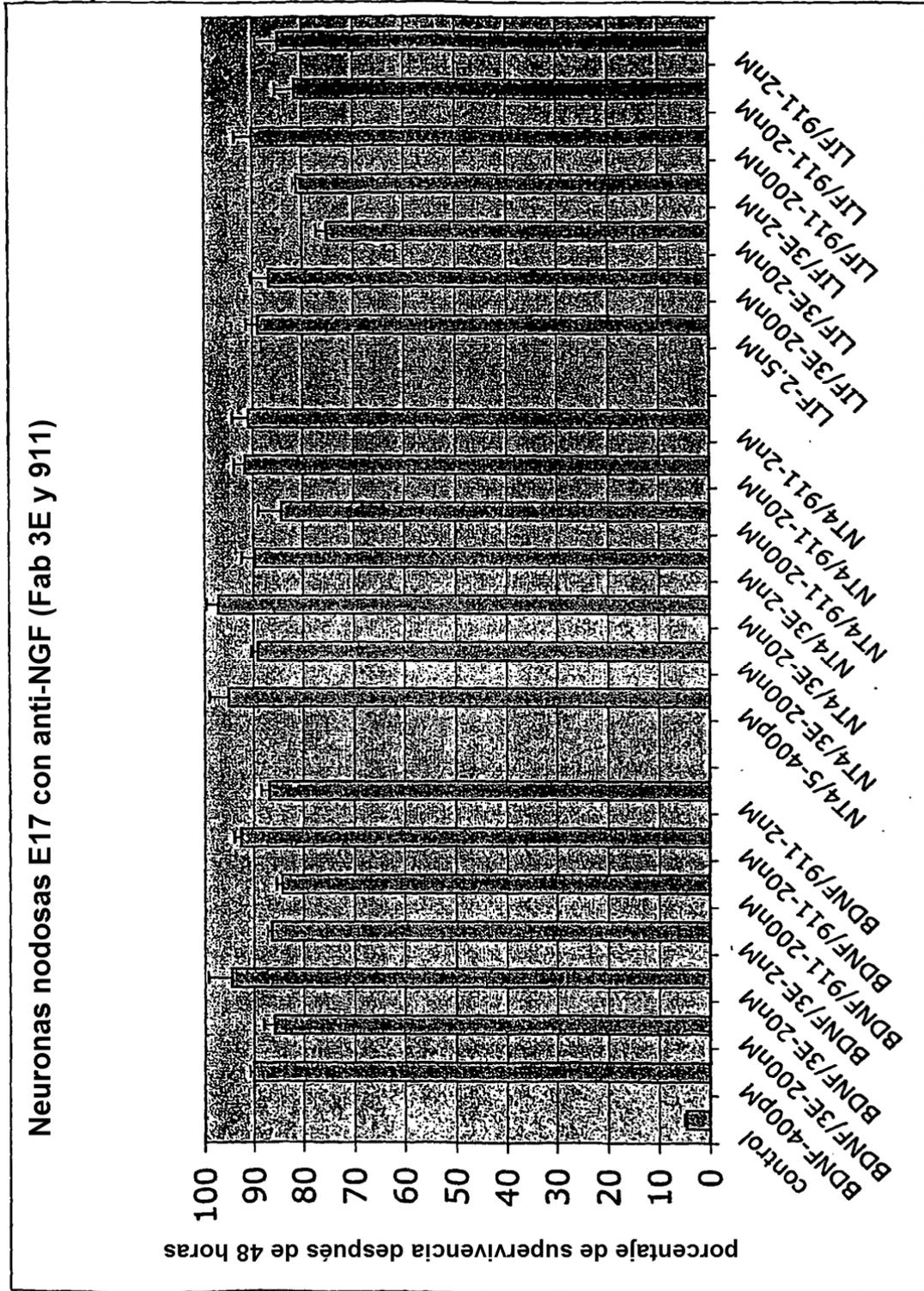
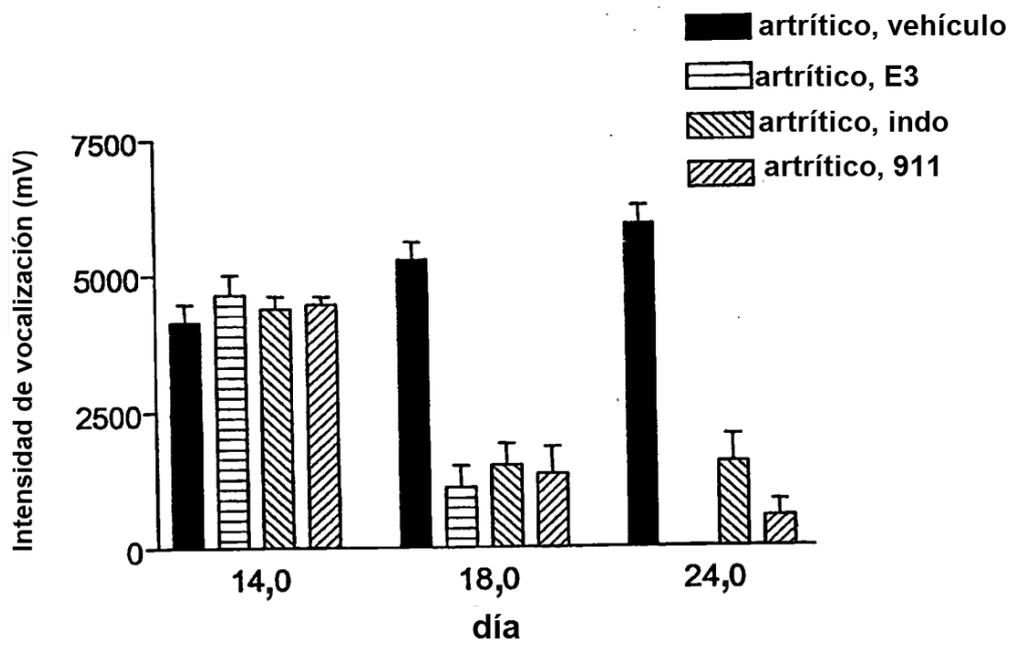
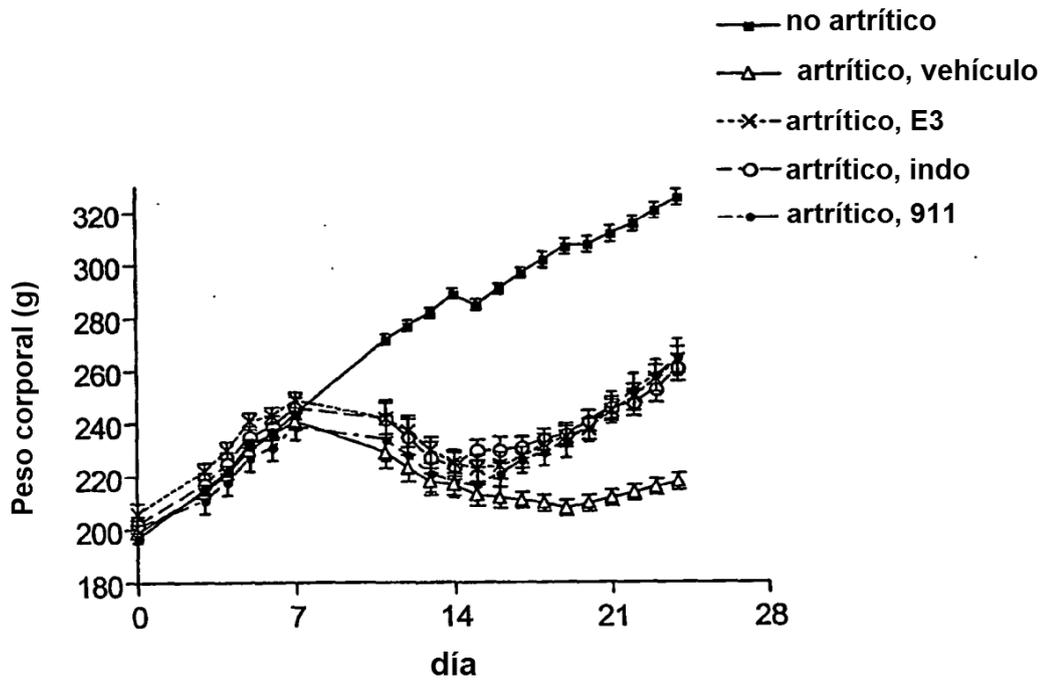


FIGURA 17

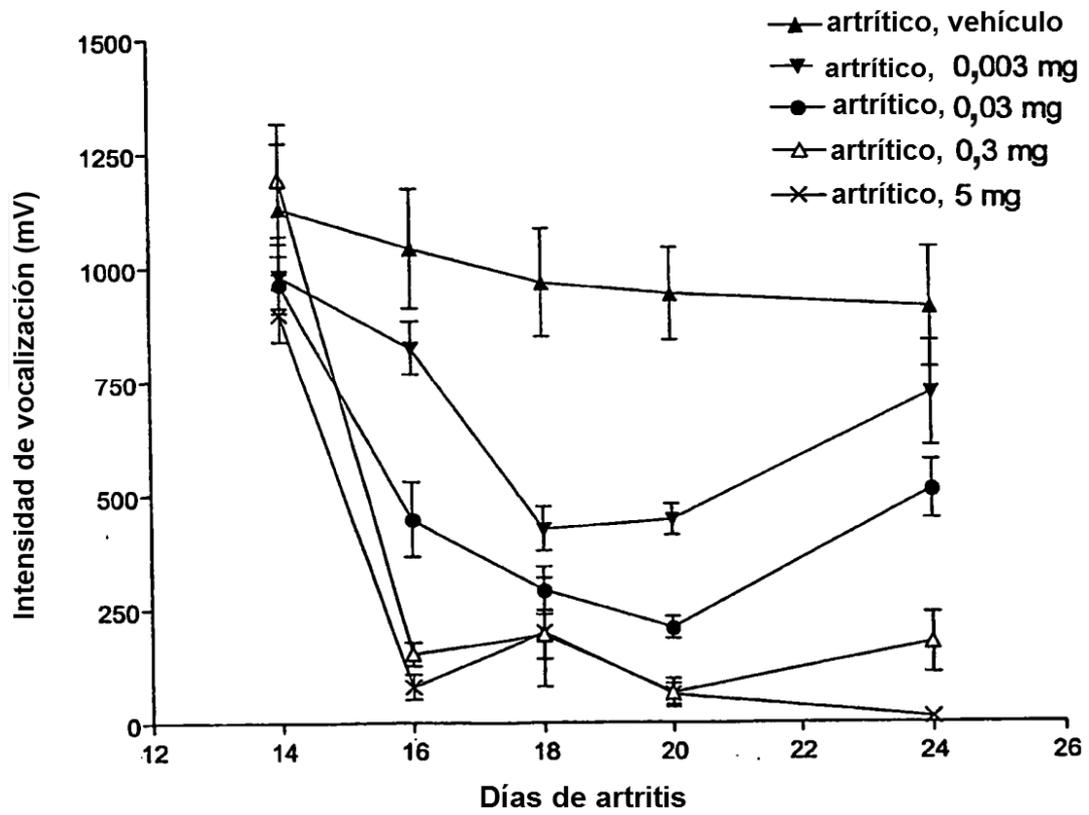
**FIG. 18**



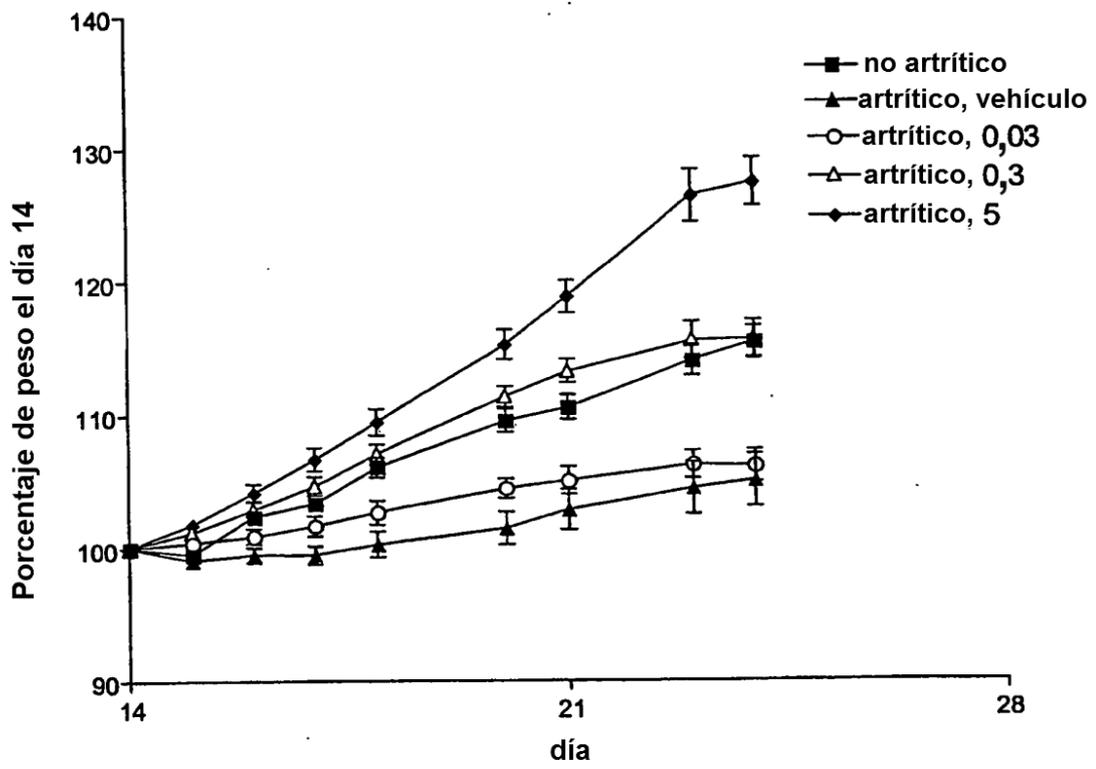
**FIG. 19**



**FIG. 20**



**FIG. 21**



**FIG. 22**

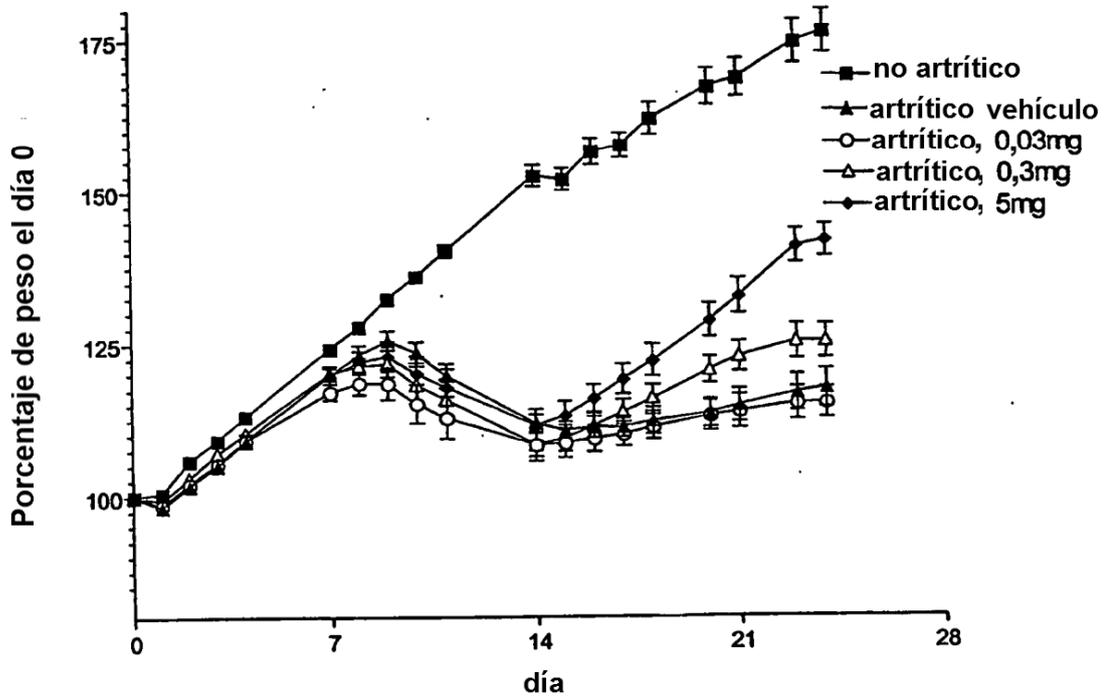


FIGURA 23A

NUMERACIÓN DE DOMINIO VARIABLE DE CADENA PESADA DE 3E

- A- NUMERACIÓN SECUENCIAL DE PROTEÍNAS
- B- NUMERACIÓN DE KABAT
- C- NUMERACIÓN DE CHOTHIA

CAJAS: CDR COMO KABAT , SUBRAYADO = CDR COMO CHOTHIA

A-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
B-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
C-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K

14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
P	S	E	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G

H1

27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
F	S	L	I	G	Y	D	L	N	W	I	R	Q

40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
P	P	G	K	G	L	E	W	I	G	I	I	W

H2

53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	V	K	S

66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
R	V	T	I	S	K	D	T	S	K	N	Q	F

79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91
79	80	81	82	82A	82B	82C	83	84	85	86	87	88
79	80	81	82	82A	82B	82C	83	84	85	86	87	88
S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A

FIGURA 23A (CONT.)

									H3			
92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104
89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A
89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A
V	Y	Y	C	A	R	G	G	Y	W	Y	A	T

105	106	107	108	109	109	110	111	112	113	114	115	116
100B	100C	100D	100E	101	102	103	104	105	106	107	108	109
100B	100C	100D	100E	101	102	103	104	105	106	107	108	109
S	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V

117 118 119  
 110 111 112  
 110 111 112  
 T V S

FIGURA 23B

NUMERACIÓN DE DOMINIO VARIABLE DE CADENA LIGERA DE 3E

- A- NUMERACIÓN SECUENCIAL DE PROTEÍNAS
- B- Numeración de Kabat
- C- Numeración de Chothia

CAJAS: CDR COMO KABAT					SUBRAYADO = CDR COMO CHOTHIA								
A-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
B-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
C-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A
													L1
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	27	
	Q	S	I	S	N	N	L	N	W	Y	Q	Q	K
													L2
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	Y	T	S
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
	R	F	H	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	
67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	66	
	G	S	G	T	D	F	T	F	T	I	S	S	L
													L3
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	
	Q	P	E	D	I	A	T	Y	Y	C	Q	Q	E
92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	
	H	T	L	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L

FIGURA 23B (CONT.)

105	106	107	108	109
105	106	106A	107	108
105	106	106A	107	108
E	I	K	R	T