

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 400**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/22** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2012 PCT/GB2012/051008**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2012 WO12153126**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2012 E 12723733 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2705057**

54 Título: **Inmunoglobulinas caninas terapéuticas y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

**06.05.2011 US 201161483481 P**

**29.08.2011 GB 201114858**

**06.09.2011 US 201161531439 P**

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

**15.02.2017**

73 Titular/es:

**NEXVET AUSTRALIA PTY LTD (100.0%)**

**Level 8, 31 Queen Street**

**Melbourne VIC 3000, AU**

72 Inventor/es:

**GEARING, DAVID**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 601 400 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

Inmunoglobulinas caninas terapéuticas y métodos de uso de las mismas

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos caninos o derivados de caninos, que tienen regiones constantes de cadena pesada específicas, para su uso como antagonistas de mediadores extracelulares solubles y/o receptores de superficie celular. La invención se refiere al uso terapéutico de los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, en métodos para el tratamiento selectivo de afecciones tales como inflamación, dolor, cáncer o infección en un sujeto canino.

## Antecedentes de la invención

15 Se usan inmunoglobulinas recombinantes y proteínas de fusión construidas usando fragmentos de dominio constante de inmunoglobulinas para tratar muchas enfermedades humanas incluyendo enfermedades inflamatorias (por ejemplo artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino), alergias (por ejemplo asma), cánceres (por ejemplo linfoma, cáncer de mama, cáncer del intestino), enfermedades infecciosas (por ejemplo infección por VSR), dolor (por ejemplo dolor osteoartítico, dolor de cáncer, dolor lumbar) y enfermedad ocular (por ejemplo degeneración macular relacionada con la edad).

Estas dianas moleculares para terapia incluyen citocinas y quimiocinas (por ejemplo interleucina-1 (IL-1) interleucina-5 (IL-5), factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos), factores de crecimiento (por ejemplo factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de necrosis tumoral (TNF)), receptores de superficie celular (por ejemplo, HER-2, VEGFR, EGFR, CD20), factores de crecimiento unidos a superficie celular (por ejemplo factor de necrosis tumoral no procesado), virus (por ejemplo VSR) y componentes de la cascada del complemento (por ejemplo C5). Se conocen muchas otras dianas de cuya implicación en procesos de enfermedad se tienen pruebas (por ejemplo, como se describe en la base de datos IMGT /MAb-DB Versión 1.3.1 14 dic 2011 (URL: [www.imgt.org/mAb-DB/query](http://www.imgt.org/mAb-DB/query))).

Se producen inmunoglobulinas nativas como diferentes subtipos importantes, incluyendo inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA), inmunoglobulina M (IgM) o inmunoglobulina E (IgE) y en respuesta a la infección estas inmunoglobulinas desempeñan diversos papeles en el reconocimiento de patógenos uniéndose con antígenos diana, neutralización, destrucción y retirada. La inmunoglobulina G se produce como varios isotipos diferentes (también conocidos como isoformas), tales como (en seres humanos) IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Estos isotipos de anticuerpo varían en su estructura, en particular con respecto a diferencias en las secuencias de aminoácidos de la región constante, particularmente alrededor de la región bisagra del dominio constante (Fc) entre los dominios C1 y C2.

Diferentes isotipos de anticuerpo también difieren con respecto a las funciones efectoras corriente abajo en las que media el anticuerpo. Por ejemplo, la secuencia de región constante de un anticuerpo puede mediar en una fuerte influencia en características tales como funciones efectoras (ADCC, fijación y activación del complemento), farmacocinética y propiedades físicas de un anticuerpo. Los anticuerpos que tienen diferentes isotipos también difieren con respecto a su capacidad para unirse con receptores de Fc IgG en células inmunitarias. En seres humanos, IgG1 e IgG3 están activos en el reclutamiento del complemento para ayudar a la destrucción de diana mediante la cascada de enzimas del complemento en la sangre (CDC: citotoxicidad dependiente de complemento) y de forma similar IgG1 e IgG3 se unen con receptores de Fc en células inmunitarias que se dirigen al antígeno unido para destrucción mediante citotoxicidad celular mediada por anticuerpo (ADCC). Por el contrario, IgG2 e IgG4 no reclutan complemento o activan ataque mediado por ADCC y simplemente se unen al antígeno diana con alta afinidad para inhibir o neutralizar su actividad.

Se diseñan inmunoglobulinas recombinantes y proteínas de fusión hechas de las mismas para tener en cuenta la actividad del isotipo Fc al considerar la diana para intervención de enfermedad. Por ejemplo, es preferible cuando se considera un enfoque terapéutico que se dirige al uso de anticuerpos para la destrucción dirigida de células cancerosas humanas construir la inmunoglobulina recombinante de dominios Fc de isotipos IgG1 e IgG3, ya que el uso de estos isotipos conducirá a mecanismos destructivos mediados por inmunidad tales como CDC y ADCC. Por el contrario, cuando se dirige a mediadores solubles en el contexto de tejidos humanos sensibles, el dominio Fc se omite (por ejemplo, en el tratamiento de degeneración macular relacionada con la edad humana se prefieren fragmentos Fab que se dirigen a VEGF), o se construye usando dominios Fc de IgG2 e IgG4 (por ejemplo, que se dirigen al factor de crecimiento nervioso en el contexto de dolor neuropático o inflamatorio, o complemento C5 en nefritis, psoriasis o artritis reumatoide). Estas consideraciones también se aplican a proteínas de fusión de inmunoglobulina, tales como proteínas de fusión de Fc de receptor de TNF soluble en el tratamiento de afecciones tales como artritis reumatoide, que se basan en terapias de Fc de IgG1 humano.

En caninos y otras especies tales como ratones y caballos, también existen isoformas de inmunoglobulina, pero tienen insuficiente inmunología entre sí para determinar a priori qué secuencia estará activa o inactiva en la

inducción de funciones efectoras corriente abajo tales como CDC o ADCC. Además, el número de inmunoglobulinas varía entre especies (por ejemplo, en el perro hay cuatro inmunoglobulinas IgG, definiéndose estas como calgG-A, calgG-B, calgG-C y calgG-D (Tang *et al.*, 2001). En caballos, hay siete isotipos de IgG (Wagner, 2006).

5 No es posible determinar a partir del análisis de secuencia o la homología de secuencia solamente si un isotipo de inmunoglobulina específico de una especie no humana estará activo o inactivo con respecto a mediar en la unión de receptor de Fc y función efectora corriente abajo. Sin embargo, si estas se conocieran, sería significativamente valioso ya que la elección de regiones constantes de isotipo para generación de anticuerpos puede ser crítica para proporcionar la eficacia terapéutica de un anticuerpo o terapia basada en anticuerpo, tal como un fragmento de unión a anticuerpo o proteína de fusión.

10 Los documentos WO 2010/117448 y WO0177332 desvelan anticuerpos recombinantes que comprenden una o más secuencias caninas, y métodos para su preparación y uso. En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos recombinantes que tienen unión a receptor de Fc mejorada y/o función efectora de ADCC mejorada.

15 Sumario de la invención

Después de experimentación exhaustiva, se ha identificado sorprendentemente por los presentes inventores que los isotipos de inmunoglobulina IgG canina comparten las características observadas en anticuerpos IgG humanos de que ciertos isotipos de anticuerpo IgG están activos con respecto a activación de funciones efectoras inmunitarias, mientras que otros isotipos de anticuerpos IgG no activan funciones efectoras inmunitarias y están en consecuencia inactivos. Además, de las cuatro inmunoglobulinas de cadena pesada caninas conocidas (conocidas como HCA (calgG-A), HCB (calgG-B), HCC (calgG-C) y HCD (calgG-D)), el inventor ha identificado sorprendentemente que los dominios constantes de cadena pesada de dos (calgG-B y calgG-C) de las cuatro inmunoglobulinas de cadena pesada caninas, cuando se construyen como diversas formas recombinantes que se dirigen a diferentes dianas terapéuticas, sorprendentemente se unen con el complemento, mientras que las otras dos (calgG-A y calgG-D) no.

En consecuencia, la presente invención define ciertas inmunoglobulinas caninas recombinantes, o proteínas de fusión hechas de las mismas, que se usan en la terapia de caninos cuando se desee la destrucción de diana (por ejemplo en cáncer o en el tratamiento de una enfermedad infecciosa); y ciertas otras isoformas que pueden preferirse para tratamientos terapéuticos en caninos en los que se desee neutralización de dianas solamente, en lugar de destrucción de diana (por ejemplo en el tratamiento del dolor).

La presente divulgación proporciona inmunoglobulinas caninas recombinantes que pueden distinguirse por su capacidad o de otro modo unirse con el primer componente de la cascada del complemento, basándose en el isotipo de su dominio constante de cadena pesada. Como resultado, y por primera vez, pueden seleccionarse inmunoglobulinas caninas recombinantes según su uso pretendido en el tratamiento de enfermedad en caninos, bien para fines en los que la diana pretendida se selecciona para destrucción mediada por inmunidad mediante citotoxicidad mediada por complemento (CDC; por ejemplo para uso en la destrucción de tumores caninos *in vivo*) o en el que la diana se selecciona simplemente para neutralización en ausencia de destrucción mediada por inmunidad indeseable (por ejemplo cerca de los nervios, o en el ojo).

De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un anticuerpo, una proteína de fusión o un fragmento de unión del mismo para uso en el tratamiento terapéutico de un canino en el que se desea neutralización de diana en ausencia de función efectora indeseable, en el que dicho anticuerpo, proteína de fusión o fragmento de unión tiene un dominio constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13, en el que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada minimiza la activación de funciones efectoras del sistema inmunitario corriente abajo cuando el anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión se unen con su antígeno diana.

En ciertas realizaciones, el tratamiento terapéutico del canino se refiere al tratamiento del dolor o inflamación o una afección asociada con los mismos, tal como artritis o una afección artrítica.

Se desvela en el presente documento el uso de un anticuerpo, proteína de fusión o un fragmento de unión del mismo que comprende un dominio constante de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13, en la que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada minimiza la activación de funciones efectoras del sistema inmunitario corriente abajo cuando el anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión se une con su antígeno diana, en la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento de dolor o inflamación en un sujeto canino o una afección asociada con el mismo, tal como artritis o una afección artrítica.

También se desvela un método para tratar, inhibir o aliviar el dolor o la inflamación o una afección asociada con el mismo, tal como artritis o una afección artrítica, en un sujeto canino que lo necesite, comprendiendo el método las etapas de:

- proporcionar un anticuerpo, proteína de fusión o un fragmento de unión del mismo que se une específicamente con un antígeno diana que tiene una función específica en el tratamiento o prevención del dolor o inflamación, en el que el anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión del mismo tiene un dominio constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13 y en el que el anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión del mismo no activa funciones efectoras del sistema inmunitario corriente abajo, y
- administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo, proteína de fusión o fragmento de unión del mismo con el sujeto canino.

10 También se desvela un anticuerpo derivado de canino, proteína de fusión o un fragmento de unión del mismo que tiene un dominio constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13, para uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento, la inhibición o el alivio del dolor o la inflamación en un sujeto canino.

15 En ciertas realizaciones del primer aspecto de la invención, el dolor es dolor neuropático. En particular, el dolor puede ser dolor perioperatorio, posoperatorio o posquirúrgico. El dolor posoperatorio puede resultar después de cualquier procedimiento operativo que en caninos puede incluir, pero sin limitación, cirugía ortopédica, cirugía de tejido blando, procedimientos de ovariectomía, procedimientos de castración y similares. En ciertas realizaciones adicionales, el dolor es dolor crónico asociado con cáncer o una afección cancerosa (dolor oncológico).

20 En ciertas realizaciones adicionales, el dolor se asocia con, o resulta de, artritis reumatoide, osteoartritis, inflamación o prurito.

También se desvela un método para el tratamiento de artritis o una afección artrítica en un sujeto canino, comprendiendo el método las etapas de:

- proporcionar un anticuerpo, una proteína de fusión o un fragmento de unión del mismo que se une específicamente con un antígeno diana que tiene una función específica en el tratamiento o la prevención del dolor o inflamación, en el que el anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión del mismo tiene un dominio constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13 y en el que el anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión del mismo no activa funciones efectoras del sistema inmunitario corriente abajo y
- administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión del mismo al sujeto canino que necesite dicho tratamiento.

35 Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además la etapa de co-administrar al menos un agente adicional que puede potenciar y/o complementar la eficacia del anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede co-administrarse junto con al menos un analgésico, AINE, opiode, corticosteroide o esteroide. Los ejemplos de analgésicos adecuados incluyen, pero sin limitación, butorfanol, 10 buprenorfina, fentanilo, flunixin meglumina, merpidina, morfina, nalbufina y derivados de los mismos. Los AINE adecuados, incluyen, pero sin limitación, paracetamol, ácido acetilsalicílico, carprofeno, etodolac, ketoprofeno, meloxicam, firocoxib, robenacoxib, deracoxib y similares.

Los métodos anteriores pueden acompañarse de la administración de al menos un agente adicional. Dicho agente puede ser un agente terapéuticamente activo que puede ser uno o más del grupo seleccionado de: un antibiótico, antifúngico, antiprotozoario, antiviral o agentes terapéuticos similares. Además, el al menos un agente adicional puede ser un inhibidor de mediador o mediadores de inflamación tales como antagonistas del receptor de PGE, un agente inmunosupresor, tal como ciclosporina, y glucocorticoides antiinflamatorios. El al menos un agente adicional puede ser un agente que se usa para el tratamiento de disfunción o deterioro cognitivo, tal como pérdida de memoria o afecciones relacionadas que pueden hacerse crecientemente prevalentes en caninos mayores. Además, el al menos un agente adicional puede ser un compuesto antihipertensivo u otro usado para el tratamiento de disfunción cardiovascular, por ejemplo, para tratar hipertensión, isquemia miocárdica, insuficiencia cardiaca congestiva y similares. Además, el al menos un agente adicional puede ser un diurético, vasodilatador, antagonista de receptor beta-adrenérgico, inhibidor de enzima convertidora de angiotensina-II, bloqueador de canal de calcio e inhibidor de HMG-CoA reductasa.

55 En ciertas realizaciones del aspecto anterior de la invención, las funciones efectoras del sistema inmunitario corriente abajo se seleccionan del grupo que comprende citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC) y patogénesis celular dependiente de anticuerpo (ADCP). En realizaciones específicas, la secuencia de aminoácidos del dominio constante de cadena pasada inhibe la unión de la cadena pesada con C1q, evitando esto la inducción de la cascada de complemento y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).

En ciertas realizaciones, el antígeno diana es un mediador soluble. En ciertas realizaciones, el antígeno diana es factor de crecimiento nervioso (NGF). En ciertas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente con y antagoniza un receptor que media en el dolor o la inflamación. En ciertas realizaciones adicionales, el antígeno diana puede seleccionarse el grupo que consiste en, pero sin limitación, citocinas o quimiocinas (por ejemplo

interleucina-1 e interleucinas IL-2 a IL-35 relacionadas, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, eritropoyetina, trombopoyetina, factor inhibidor de leucemia, factor neurotrófico ciliar, oncostatina M), factores de crecimiento (por ejemplo factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neutrofina-3, neutrofina-4, factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF), factor de necrosis tumoral (TNF), receptores de superficie celular (por ejemplo, HER-2, VEGFR, EGFR, CD20), factores de crecimiento unidos a superficie celular (por ejemplo factor de necrosis tumoral no procesado), virus (por ejemplo VSR) y componentes de la cascada del complemento (por ejemplo C5-C5a).

De acuerdo con otro aspecto más de la invención se proporciona un anticuerpo, una proteína de fusión o un fragmento de unión del mismo para uso en el tratamiento terapéutico de un canino en el que se desea destrucción de diana, en el que dicho anticuerpo, proteína de fusión o fragmento de unión tiene un dominio constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO: 14 en el que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada media en la activación de funciones efectoras del sistema inmunitario corriente abajo cuando el anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión se une con su antígeno diana.

En ciertas realizaciones, el tratamiento terapéutico del canino se refiere al tratamiento de una afección cancerosa, o maligna.

Se desvela en el presente documento el uso de un anticuerpo, una proteína de fusión o un fragmento de unión del mismo que comprende un dominio constante de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO: 14, en el que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada media en la activación de funciones efectoras del sistema inmunitario corriente abajo cuando el anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión se une con su antígeno diana, en la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento de una afección cancerosa o maligna en un sujeto canino.

También se desvela un método para el tratamiento o prevención de una afección cancerosa o maligna en un sujeto canino, comprendiendo el método las etapas de:

- proporcionar un anticuerpo, una proteína de fusión o un fragmento de unión del mismo que se une específicamente con un antígeno diana que tiene una función específica en el tratamiento de una afección cancerosa o maligna, en el que el anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión tiene un dominio constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 14 y en el que el anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión activa las funciones efectoras del sistema inmunitario corriente abajo y
- administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo, la proteína de fusión o un fragmento de unión al sujeto canino necesite dicho tratamiento.

El método anterior puede comprender además la etapa de co-administrar al menos un agente adicional que puede potenciar y/o complementar la eficacia del anticuerpo desvelado en el presente documento.

También se desvela el uso de un anticuerpo derivado de canino, proteína de fusión o un fragmento de unión del mismo, que tiene un dominio constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 14 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de afección cancerosa o maligna en un sujeto canino.

En ciertas realizaciones del aspecto anterior de la invención, las funciones efectoras del sistema inmunitario corriente abajo se seleccionan del grupo que comprende citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC) y patogénesis celular dependiente de anticuerpo (ADCP). En realizaciones específicas, la secuencia de aminoácidos del dominio constante de cadena pesada proporciona unión de la cadena pesada a C1q, evitando esto la inducción de la cascada del complemento y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). En ciertas realizaciones, el dominio constante de cadena pesada proporciona la unión a receptores de Fc, lo que puede a su vez mediar en respuestas inmunitarias ADCP y/o ADCC.

En ciertas realizaciones, el antígeno diana es un antígeno específico de cáncer. En ciertas realizaciones adicionales de la invención, el antígeno diana puede seleccionarse del grupo de proteínas unidas a membrana expresadas en células tumorales caninas. En realizaciones adicionales de la invención, las proteínas tumorales caninas unidas a membrana pueden seleccionarse del grupo de proteínas que incluye CD2, CD4, CD8, CD20, EGFR, VEGFR, HER2 y similares. En ciertas realizaciones adicionales, el antígeno diana puede seleccionarse del grupo que consiste en, pero sin limitación, citocinas y quimiocinas (por ejemplo, interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-3 e interleucinas numéricamente hasta IL-35, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, eritropoyetina, trombopoyetina, factor inhibidor de leucina, factor neurotrófico ciliar, oncostatina M), factores de crecimiento (por ejemplo, factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neutrofina-3, neutrofina-4, factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF), factor de necrosis tumoral (TNF)), receptores de superficie celular (por ejemplo HER-2, VEGFR, EGFR, CD20), factores de crecimiento unidos a superficie celular (por ejemplo factor de necrosis tumoral no procesado), virus (por

ejemplo VSR) y componentes de la cascada del complemento (por ejemplo C5, C5a).

También se desvela un anticuerpo, una proteína de fusión o un fragmento de unión del mismo para uso en el tratamiento de una afección en un canino, en el que el anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión tiene un dominio constante de cadena pesada que no se une con C1q cuando el anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión se une con su antígeno diana y en el que el anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión pueden purificarse usando cromatografía de Proteína A.

El anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión pueden tener un dominio constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. Como alternativa, dicho anticuerpo, proteína de fusión o fragmento de unión puede tener un dominio constante de cadena pesada seleccionado de SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 15 o puede tener una cadena pesada de SEQ ID NO: 6.

También se desvela el uso de un anticuerpo, una proteína de fusión o un fragmento de unión que comprende un dominio constante de cadena pesada que no se une con C1q cuando el anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión se une con su antígeno diana y en el que el anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión pueden purificarse usando cromatografía de Proteína A en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección asociada con dolor y/o inflamación en un canino.

Dicho anticuerpo, proteína de fusión o fragmento de unión puede tener un dominio constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. Como alternativa, dicho anticuerpo, proteína de fusión o fragmento de unión puede tener un dominio constante de cadena pesada seleccionado de SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 15 o puede tener una cadena pesada de SEQ ID NO: 6.

También se desvela un método para tratar, inhibir o aliviar dolor o inflamación o una afección asociada con los mismos, tal como artritis o una afección artrítica, en un sujeto canino que lo necesite, comprendiendo el método las etapas de:

- proporcionar un anticuerpo, una proteína de fusión o un fragmento de unión que comprende un dominio constante de cadena pesada que no se une con C1q cuando el anticuerpo se une con su antígeno diana y en el que el anticuerpo puede purificarse usando cromatografía de Proteína A y
- administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión del mismo al sujeto canino.

Dicho anticuerpo, proteína de fusión o fragmento de unión puede tener un dominio constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. Como alternativa, dicho anticuerpo, proteína de fusión o fragmento de unión puede tener un dominio constante de cadena pesada seleccionado de SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 15 o puede tener una cadena pesada de SEQ ID NO: 6.

También se desvelan: (i) ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los anticuerpos, las proteínas de fusión o los fragmentos de anticuerpo anteriores, (ii) vectores que portan dichos ácidos nucleicos, (iii) células hospedadoras que portan dichos vectores. También se desvelan métodos para producir anticuerpos y proteínas de fusión como se desvelan en el presente documento. Se desvelan además composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos o las proteínas de fusión desvelados en el presente documento junto con al menos un vehículo, diluyente o excipiente.

Se desvelan en el presente documento un anticuerpo recombinante, una proteína de fusión o un fragmento de unión del mismo que puede administrarse terapéuticamente a un canino para unirse específicamente con un antígeno diana y que media además en una respuesta inmunitaria que se caracteriza por unión de complemento C1q con dicho anticuerpo, proteína de fusión o fragmento de unión del mismo y citotoxicidad dependiente de complemento asociada, en el que la cadena pesada del anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión del mismo comprende dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina canina de isotipo B (HCB, calgG-B) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina canina de isotipo C (HCC, calgGC) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o cadena pesada de inmunoglobulina canina aglucosilada de isotipo C (HCC, calgG-C) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

También se desvela el uso de un anticuerpo, una proteína de fusión o un fragmento de unión del mismo que comprende dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina canina de isotipo B (HCB, calgG-B) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina canina de isotipo C (HCC, calgGC) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o cadena pesada de inmunoglobulina canina aglucosilada de isotipo C (HCC, calgG-C) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 en la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento de una afección en la que se requiere unión específica a un antígeno diana y en la que es deseable una respuesta inmunitaria que se caracteriza por unión de complemento C1q a dicho anticuerpo, proteína de fusión o fragmento de unión del mismo y citotoxicidad dependiente del complemento asociada.

También se desvela un método para el tratamiento de una afección cancerosa en un sujeto canino, comprendiendo el método las etapas de:

- 5 - proporcionar una inmunoglobulina, una proteína de fusión o un fragmento de unión del mismo que tiene especificidad de unión por un antígeno específico de tumor y que comprende además dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina canina de isotipo B (HCB, calgG-B) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina canina de isotipo C (HCC, calgGC) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o cadena pesada de inmunoglobulina canina aglucosilada de isotipo C (HCC, calgG-C) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y
- 10 - administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la inmunoglobulina, la proteína de fusión o el fragmento de unión al sujeto canino que lo necesite.

También se describen en el presente documento anticuerpos o proteínas de fusión que se unen con un antígeno diana deseado y que comprenden dominios constantes de cadena pesada que no se unen con C1q y que en consecuencia no median en una respuesta inmunitaria que implica citotoxicidad dependiente de complemento.

Se describe en el presente documento un anticuerpo recombinante, una proteína de fusión o un fragmento de unión del mismo que puede administrarse terapéuticamente a un canino para unirse específicamente con un antígeno diana, en el que el dominio constante del anticuerpo o la proteína de fusión no se une con complemento C1q y en el que la cadena pesada del dominio constante comprende dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina canina de isotipo A (HCA, calgG-A) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina canina de isotipo D (HCD calgG-D) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina canina aglucosilada de isotipo B que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (HCB\*, calgG-B).

También se describe el uso de un anticuerpo, una proteína de fusión o un fragmento de unión del mismo que comprende dominio constante cadena pesada de inmunoglobulina canina de isotipo A (HCA, calgG-A) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina canina de isotipo D (HCD calgG-D) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina canina aglucosilada de isotipo B que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (HCB\*, calgG-B) en la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento de una afección en la que se requiere unión específica a un antígeno diana y en la que no es deseable una respuesta inmunitaria que se caracteriza por unión de complemento C1q a dicho anticuerpo, proteína de fusión o fragmento de unión del mismo y citotoxicidad dependiente de complemento asociada.

Se describe además un método para el tratamiento de una afección en un sujeto canino, comprendiendo el método la etapa de:

- 40 - proporcionar una inmunoglobulina, una proteína de fusión o un fragmento de unión de la misma que tiene especificidad de unión por un antígeno específico de tumor y que comprende además dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina canina de isotipo A (HCA, calgG-A) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina canina de isotipo D (HCD, calgG-D) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina canina aglucosilada de isotipo B que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (HCB\*, calgG-B), y
- 45 - administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la inmunoglobulina, la proteína de fusión o el fragmento de unión al sujeto canino que lo necesite.

El dominio constante aglucosilado que puede diseñarse para construcción de anticuerpo en ausencia de actividad CDC es cadena pesada aglucosilada con alanina sustituida HCB que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (indicado HCB\*). Los anticuerpos que incorporan formas aglucosiladas inactivas de cadenas pesadas HCA, HCD o CDC de HCA, HCB o HCD (HCA\*, HCB\* o HCD\*: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 15) pueden dirigirse a factores de crecimiento caninos, hormonas, citocinas, quimiocinas u otros mediadores solubles tales como componentes de la cascada del complemento. Los anticuerpos que incorporan cadenas pesadas HCA, HCD o HCB\* pueden dirigirse a factor de crecimiento nervioso canino (NGF) para los fines de neutralizar la actividad biológica de NGF canino en un canino, sin inducir CDC.

En ciertas realizaciones de los aspectos anteriores de la invención del anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En ciertas realizaciones adicionales, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo caninizado, es decir, un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que se ha desinmunizado de modo que no se produzcan anticuerpos neutralizantes contra la misma cuando se administran a un sujeto canino. Típicamente los dominios constantes de cadena pesada del anticuerpo se seleccionan o modifican por medio de sustitución o supresión de aminoácidos de modo que los dominios constantes no median en las funciones efectoras corriente abajo. En ciertas realizaciones, el anticuerpo puede conjugarse con al menos una molécula indicadora.

En ciertas realizaciones adicionales, al menos un resto en el dominio constante de los anticuerpos o proteínas de fusión para uso en los aspectos anteriores de la invención puede sustituirse o suprimirse para prevenir la glucosilación de ese resto. En un aspecto adicional de la invención, el dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina canina puede fusionarse completamente o en parte con el dominio extracelular de un receptor de citocina o quimiocina u otra proteína transmembrana (por ejemplo, el receptor de TNF), por lo que la totalidad o el fragmento del dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina canina se selecciona del grupo HCA, HCD o HCB\* en el que se desea que la proteína de fusión de cadena pesada de inmunoglobulina-dominio extracelular canino no active CDC (por ejemplo cuando se diseñan proteínas de fusión de Fc con el receptor de TNF para la neutralización de TNF soluble) o por el contrario, el dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina canina se selecciona del grupo HCB, HCC o HCC\* en el que se desea que la proteína de fusión de cadena pesada de inmunoglobulina-dominio extracelular canino (por ejemplo en el que se diseñan proteína de fusión de Fc del receptor de TNF para destruir células inflamatorias que portan TNF asociadas a membrana).

En aspectos adicionales de la invención, las proteínas de fusión de Fc receptor canino pueden seleccionarse del grupo de dominios extracelulares de receptores unidos a membrana hallados en células caninas fusionadas con regiones Fc de cadena pesada de dominio de inmunoglobulina canina. En un aspecto adicional de la invención, los anticuerpos que incorporan cadenas pesadas HCB, HCC o HCC\* se dirigen a CD20 para los fines de inducir CDC de células que expresan CD20 caninas, tales como células de linfoma canino mediante la unión de estos anticuerpos con CD20 en su superficie.

Además, se prefiere que los anticuerpos caninizados no tengan reacción cruzada con ningún otro epítipo presente en caninos y además que no se generen anticuerpos neutralizantes contra los anticuerpos desvelados en el presente documento cuando se administran a un canino.

En ciertas realizaciones adicionales, pueden realizarse modificaciones a la secuencia de aminoácidos de las regiones constantes de la cadena pesada en los anticuerpos o las proteínas de fusión descritos en el presente documento. Dicha modificación puede implicar la adición, sustitución o supresión de uno o más restos de aminoácidos. Dichos cambios de aminoácidos se realizan típicamente para modificar las características funcionales del anticuerpo. Por ejemplo, puede realizarse modificación de aminoácidos para evitar las funciones efectoras corriente abajo mediadas por los dominios constantes de anticuerpo, por ejemplo, evitando la capacidad del anticuerpo para unirse con receptor de Fc, activar el complemento o inducir ADCC. Además, pueden realizarse modificaciones a los restos de aminoácidos de la región bisagra del dominio constante de cadena pesada para modificar la semivida en circulación de un anticuerpo cuando se administra a un canino.

Se describen en el presente documento anticuerpos multi-específicos o multivalentes que comprenden un anticuerpo o fragmento de unión como se desvela en el presente documento acoplado o unido a otros anticuerpos con diferentes especificidades de unión para su uso en terapia de combinación. Un anticuerpo multi-específico comprende al menos un anticuerpo o fragmento de unión específico de un primer epítipo, y al menos un sitio de unión específico de otro epítipo presente en el antígeno, o de un antígeno diferente. Un anticuerpo multivalente comprende anticuerpos o fragmentos de unión a anticuerpo que tienen especificidad de unión por el mismo epítipo. En consecuencia, se describe en el presente documento una proteína de fusión de anticuerpo que comprende cuatro o más regiones Fv o regiones Fab de los anticuerpos desvelados en el presente documento. También se describe un anticuerpo biespecífico, en el que un anticuerpo o fragmento de unión del mismo como se desvela en el presente documento se une a un segundo anticuerpo o fragmento de unión del mismo que tiene especificidad de unión por una segunda diana, no siendo dicha diana el primer antígeno. Dichos anticuerpos multivalentes, biespecíficos o multi-específicos pueden prepararse por una diversidad de métodos recombinantes que se conocerían bien por los expertos en la materia.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión a antígeno se administran al canino a una dosis que varía de aproximadamente 0,01 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, en particular de 0,03 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal.

También se desvela una composición que comprende un anticuerpo, una proteína de fusión o un fragmento de unión del mismo como se desvela en el presente documento. La composición puede comprender además al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender además al menos un analgésico, AINE, opioide, corticosteroide o esteroide.

También se desvela un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo, la proteína de fusión o fragmentos de unión a anticuerpo descritos en el presente documento. En consecuencia, se describe en el presente documento un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo, una proteína de fusión o un fragmento de unión a antígeno como se desvela en el presente documento. El ácido nucleico aislado puede codificar además una o más secuencias reguladoras unidas operativamente al mismo.

También se desvela un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o ligera o un dominio constante de cadena pesada y/o ligera como se describe en el presente documento. El vector de expresión puede comprender además una o más secuencias reguladoras. El vector puede



ser un plásmido o un vector retroviral. También se describe una célula hospedadora que incorpora el vector de expresión desvelado en el presente documento. Se describe además una célula hospedadora que produce el anticuerpo descrito el presente documento.

5 También se describe un método para producir un anticuerpo o una proteína de fusión como se describe en el presente documento, comprendiendo el método la etapa de cultivar la célula hospedadora descrita en el presente documento para permitir que la célula exprese el anticuerpo. También se describe un método para producir el anticuerpo o la proteína de fusión descrita en el presente documento que comprende las etapas de expresar uno o más de los polinucleótidos/ácidos nucleicos o vectores descritos en el presente documento que expresan las cadenas ligeras y/o pesadas de los anticuerpos desvelados en el presente documento en una célula hospedadora adecuada, recuperar los polipéptidos expresados, que pueden expresarse juntos en una célula hospedadora, o por separado en diferentes células hospedadoras y aislar anticuerpos. También se describe un método para tratar, aliviar o inhibir el dolor en un canino, comprendiendo el método la etapa de administrar al canino una cantidad eficaz de un polinucleótido que codifica un anticuerpo o una proteína de fusión que tiene un dominio constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de copias. SEQ ID NO: 8-SEQ ID NO: 11.

#### Purificación de anticuerpos caninos

20 En el caso de los anticuerpos caninos en los que se desee neutralización de diana en ausencia de actividad efectora inmunitaria no deseada, el presente inventor ha descubierto sorprendentemente que las isoformas nativas de cadenas pesadas caninas que carecen de actividad CDC también se unen con la Proteína A de *Staphylococcus* muy escasamente, si lo hacen, y en consecuencia este método común para purificación de anticuerpos no puede usarse en la fabricación. El inventor describe tres modos de superar esta restricción, mediante el uso de estrategias de purificación alternativas y mediante mutación de la cadena pesada para evitar la glucosilación durante la producción.

25 Se produjeron anticuerpos purificados preparados por estos métodos por el inventor y se ha mostrado que tienen las propiedades deseables de seguridad y eficacia *in vivo* en perros sin inmunogenicidad no deseada.

30 Se desvela en el presente documento un método para la purificación de una inmunoglobulina derivada de canino o una inmunoglobulina o proteína de fusión que comprende un dominio constante de cadena pesada canino de isotipo A (HCA, calgG-A) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o un dominio constante de cadena de pesada de inmunoglobulina canina de isotipo D (HCD, calgG-D) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 de una mezcla fuente, comprendiendo el método las etapas de:

- 35 (i) proporcionar una mezcla fuente que comprende inmunoglobulinas o proteínas de fusión diana,
- (ii) someter la mezcla fuente a cromatografía de intercambio aniónico;
- (iii) someter la mezcla fuente a cromatografía de interacción hidrófoba; y
- (iv) someter la mezcla fuente a cromatografía de exclusión por tamaño.

40 El método puede comprender la etapa de intercambio de tampón en solución salina tamponada con fosfato. Típicamente el método produce un anticuerpo purificado que se fracciona hasta alta pureza y bioactividad.

Se desvela en el presente documento un método para la producción de un anticuerpo canino aglucosilado que puede purificarse mediante cromatografía de Proteína A.

45 También se describe un anticuerpo o proteína de fusión canino o derivado de canino producido de acuerdo con cualquiera de los métodos definidos en el presente documento, para uso en el tratamiento terapéutico de un canino. También se describe el uso de un anticuerpo anti-NGF canino en la preparación de un medicamento para el uso en el tratamiento de una afección mediada por inmunidad, o una afección asociada con dolor, en un canino.

50 También se describe un método para la purificación de una inmunoglobulina derivada de canino o una inmunoglobulina o proteína de fusión que comprende un dominio constante de cadena pesada canino de isotipo D (HCA, calgG-A) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina canina de isotipo D (HCD, calgG-D) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 de una mezcla fuente, comprendiendo el método las etapas de:

- 55 (i) proporcionar una mezcla fuente que comprende inmunoglobulinas diana,
- (ii) someter la mezcla fuente a cromatografía de afinidad de captoadherencia; y
- (iii) someter la mezcla fuente a cromatografía de intercambio aniónico.

60 También se describe un anticuerpo o una proteína de fusión producido a partir del método de purificación descrito en el presente documento para uso en el tratamiento de un canino.

#### Breve descripción de las figuras

65 Las Figuras 1A y 1B muestran unión equivalente de anticuerpos anti-NGF (expresados en el sobrenadante de células CHO transfectadas) construidos usando cuatro isotipos diferentes de cadenas pesadas caninas (HCA,

HCB, HCC, HCD) con NGF murino mediante ELISA (Figura 1A) e inhibición equivalente de proliferación de NGF de células TF-1 (Figura 1B).

5 La Figura 2 muestra unión diferencial de complemento con isotipos de anticuerpo anti-NGF canino unidos a NGF como se mide mediante ELISA anti-C1q.

Las Figuras 3a y 3b muestran la unión de anticuerpos monoclonales anti-NGF caninizados glucosilados y aglucosilados con NGF capturado con el complemento como se mide por ELISA anti-C1q.

10 La Figura 4 muestra la unión de anticuerpos monoclonales anti-NGF caninizados con NGF capturado (MAb), MAb anti-VEGF canino y MAb quimérico anti-CD20 humano/HCB canino con el complemento medida por ELISA anti-C1q. En particular, las Figuras 4A, 4B y 4C muestran la unión de complemento con anticuerpos construidos usando diversos isotipos de cadena pesada caninos. Se expresaron anticuerpos monoclonales caninizados (MAb) en células CHO y se ensayaron con respecto a su capacidad para unirse con el complemento C1q. Panel 15 A- anticuerpos anti-NGF caninizados (caN-HCB, caN-HCC) en comparación con isotipos de anticuerpo humanizado (huN-G1, huN-G4); Panel B- anticuerpos anti-VEGF construidos con isotipos HCA (caV-HCA) y HCB (caV-HCB) caninos; Panel C- anticuerpo anti-CD20 construido usando isotipo HCB (mub-HCA) en comparación con isotipo IgG2a de ratón (muB-2a).

20 La Figura 5 muestra recuperación relativa de isotipos de anticuerpo anti-NGF purificados por Proteína A y detectados usando inmunoglobulina policlonal anti-canina mediante transferencia de Western. Los sobrenadantes de la Figura 1 se pasaron sobre columnas de Proteína A y se unieron específicamente con material eluido. Los volúmenes iguales de eluato se sometieron a SDS-PAGE. Los isotipos caninos HCA, HCC y HCD se unieron débilmente a Proteína A como se indica por material significativo en las fracciones de lavado y flujo continuo. Las Figuras A-D muestran recuperación relativa de isotipos de anticuerpo canino HCA, HCB, HCC 25 y HCD por Proteína A: L, carga; W, lavado; P, purificado; F, flujo continuo. Se usaron sobrenadantes de anticuerpo anti-NGF de la Figura 1 en este experimento.

30 Las Figuras 6A y 6B muestran la purificación cuantitativa de anticuerpo anti-NGF canino (isotipo HCA) usando un método de tres etapas (Método I) que comprende (1) cromatografía de intercambio aniónico, (2) cromatografía de interacción hidrófoba y (3) cromatografía de exclusión por tamaño. La Figura 6A muestra los resultados de fraccionamiento por HPLC de exclusión por tamaño. La Figura 6B muestra un gel de SDS-PAGE reductor de fracciones después de cada etapa. La Figura 6C y 6D muestran la purificación cuantitativa de los anticuerpos anti-NGF canino descritos en el presente documento usando un método de dos etapas (Método II) que 35 comprende cromatografía de Captoadherencia y cromatografía de intercambio aniónico. La Figura 6C muestra análisis de SDS-PAGE en condiciones no reductoras y reductoras. En la Figura 6c, el carril 1 es PPM, el carril 2 es anticuerpo anti-NGF canino 2 µg/ml y 0 µl de agente reductor, el carril 3 es anticuerpo anti-NGF canino 4 µg/ml y 0 µl de agente reductor, el carril 4 es anticuerpo anti-NGF canino 6 µg/ml y 0 µl de agente reductor, el carril 5 es PPM, el carril 6 es anticuerpo anti-NGF canino 2 µg/ml y 3 µl de agente reductor, el carril 7 es anticuerpo anti-NGF canino 4 µg/ml y 3 µl de agente reductor, el carril 8 es anticuerpo anti-NGF canino 6 µg/ml y 3 µl de agente reductor y el carril 9 es PPM. Figura 6D: cromatografía de exclusión por tamaño del anticuerpo anti-NGF canino purificado.

45 La Figura 7 muestra una comparación de anticuerpo anti-NGF canino (isotipo HCA) purificado por los Métodos I y II. Figura 7A: comparación mediante SDS-PAGE no reductor y reductor. Figura 7B: comparación mediante ELISA anti-NGF.

50 La Figura 8 muestra que el peso corporal (panel superior) y la temperatura (panel inferior) son estables después de administración intravenosa de anticuerpos anti-NGF canino (isotipo HCA, purificado mediante el Método I) en perros.

55 La Figura 9 muestra análisis cinético de concentración de anticuerpo monoclonal anti-NGF canino en plasma después de inyección intravenosa a un perro. Se inyectó a un perro beagle por vía intravenosa anticuerpo anti-NGF a 2 mg/kg, se tomaron muestras de plasma en los momentos indicados y se detectó anticuerpo monoclonal anti-NGF mediante ELISA NGF. El anticuerpo monoclonal anti-NGF canino tuvo una semivida de fase de eliminación (beta) sorprendentemente larga de aproximadamente 9 días.

60 La Figura 10 muestra que los anticuerpos monoclonales anti-NGF canino (isotipo HCA, purificado por el Método I) reducen el dolor inflamatorio en perros. Se inyectó caolín en la almohadilla plantar de los perros beagle el Día - 1, se midió el anticuerpo o control de vehículo el Día 0 y la cojera mediante una escala de puntuación visual.

#### Descripción detallada de la invención

65 Después de experimentación extensiva, el inventor ha diseñado y construido varios anticuerpos monoclonales caninos usando diferentes isotipos de dominio constante de cadena pesada y ha mostrado sorprendentemente que

pueden deducirse propiedades útiles de su capacidad (o de otro modo) para mediar en funciones efectoras corriente abajo y en particular de su capacidad para unirse con complemento. En consecuencia, el inventor ha identificado diferentes efectos biológicos mediados por diferentes subtipos de inmunoglobulina canina. Para los isotipos de anticuerpo canino de unión a complemento, esta propiedad útil está en la dirección de células unidas por los mismos anticuerpos para citotoxicidad dirigida por complemento (CDC) *in vivo*. Un ejemplo en el que es deseable esta propiedad funcional está en la terapia de cáncer canino en la que los anticuerpos dirigidos a antígenos tumorales dirigirían entonces el sistema de complemento para apuntar a las células que se han unido con el anticuerpo para destrucción.

Por el contrario, se prefieren isotipos de anticuerpos que no se unan con el complemento y de este modo no provoquen CDC cuando no sea deseable la actividad de complemento, por ejemplo, cerca de nervios, en el ojo o en tejidos ya inflamados, o simplemente debido al deseo de reducir el riesgo de un efecto secundario imprevisto del anticuerpo. Claramente, por lo tanto, la capacidad de predecir qué isotipos caninos son adecuados para diseño y uso de terapias de anticuerpo en caninos es altamente deseable y útil.

Se han descrito cuatro isotipos de inmunoglobulina G canina diferentes (calgG-A (inmunoglobulina G canina de isotipo A), calgG-B, calgG-C, y calgG-D - Tang *et al.*, 2001). Para mayor simplicidad (y para permitir la distinción de diferentes construcciones de anticuerpo y de componentes de cadena ligera) los dominios constantes de cadena pesada se denominan HCA (calgG-A), HCB (calgG-B), HCC (calgG-C) y HCD (calgG-D) en el presente documento.

#### Purificación de anticuerpos

El inventor realizó un descubrimiento sorprendente adicional en el proceso de purificación de las isoformas de HCA y HCD deseables de anticuerpos anti-NGF porque ninguna se unió a Proteína A, el ligando usado a escala de fabricación en la industria en forma de la cromatografía de columna de afinidad de Proteína A para producir purificación a gran escala de proteínas terapéuticas. La Figura 5 muestra la recuperación relativa de isoformas HCA, HCB, HCC y HCD de los anticuerpos anti-NGF mediante cromatografía de afinidad de Proteína A a pequeña escala. En consecuencia, fueron necesarios otros métodos para purificar las isoformas HCA o HCD, ya que estas no pudieron purificarse usando cromatografía de afinidad de Proteína A. Después de experimentación extensiva, el inventor ha identificado sorprendentemente dos métodos alternativos (denominados en el presente documento Método I y Método II) que podrían usarse para purificar una construcción de anticuerpo caN-HCA-kLC, u otros anticuerpos caninos que tienen el isotipo de cadena pesada HCA o HCD.

El primer método comprende una combinación de cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de exclusión por tamaño. El segundo método comprende una combinación de cromatografía de afinidad de captación y cromatografía de intercambio aniónico. La Figura 6 ilustra la purificación del anticuerpo anti-NGF que contiene HCA por cada uno de los dos métodos. Se obtuvo material altamente purificado por cada método y los dos métodos produjeron material con bioactividad similar mediante ELISA de NGF (Figura 7). Ya que los isotipos HCA y HCD están relacionados de forma más similar entre sí que con los isotipos HCB y HCC, los métodos se usan para ambos isotipos.

En una exploración adicional de la purificación de anticuerpos, el inventor descubrió sorprendentemente que el anticuerpo anti-NGF de isotipo HCB\* aglucosilado, como el isotipo HCB aún era capaz de unirse con Proteína A y por lo tanto tiene la propiedad deseable de carecer de actividad CDC y purificación por cromatografía de Proteína A.

#### Ensayos de seguridad canina

Para demostrar que los anticuerpos descritos en el presente documento, que se diseñan para no tener ninguna actividad CDC no deseada, son seguros para proporcionar a perros, el anticuerpo de isotipo HCA anti-NGF altamente purificado se inyectó en tres perros mediante inyección intravenosa (después de la aprobación previa por el Comité de Ética Animal Institucional - CRL, Irlanda). La Figura 8 muestra que además de una falta de cambios conductuales observados por los veterinarios, ninguno de los tres perros mostró cambio de peso o pirexia después de la inyección del anticuerpo de isotipo HCA (dosis individual de 2 mg/kg).

La cinética en plasma del anticuerpo de isotipo HCA en los tres perros fue coherente con un mecanismo de distribución y eliminación de dos fases, incluyendo una semivida beta larga de aproximadamente 9 días (Figura 9). La falta de eliminación rápida durante el periodo de seguimiento de 14 días fue coherente con la ausencia de respuesta anti-anticuerpo al anticuerpo canino. Por el contrario, los dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina humana son inmunogénicos en perros y se eliminan rápidamente del plasma a aproximadamente 8 o 9 días después de la infusión (Richter 1999, Drug Met. Disp. 27, 21-25).

#### Modelo canino de inflamación

Todos los experimentos se llevaron a cabo con la aprobación previa del Comité de Ética Institucional (CRL, Irlanda). Se inyectó a perros beagle (= día -1) caolín en la almohadilla plantar de una pata trasera para generar una inflamación auto-resolutiva que comenzó aproximadamente 24 horas después y que provoca que los perros cojeen

temporalmente. En este modelo, una vez que la respuesta de inflamación inicial a caolín retrocede, los perros cojean progresivamente cada vez menos durante un periodo de aproximadamente 1-2 semanas y después se recuperan completamente.

5 Se inyectaron a grupos de 3 perros por vía intravenosa anticuerpos monoclonales anti-NGF canino (isotipo HCA) a 200 µg/kg de peso corporal o solución salina tamponada con fosfato como control de vehículo (= día 0). Los perros se evaluaron con respecto a cojera durante 7 días mediante un método de puntuación visual (puntuación 0, sin cojera (carga de peso completa); puntuación 1, cojera ligera (sin carga de peso completa, pero con buena deambulaci3n); puntuaci3n 2, cojera moderada (ligera carga de peso y sin buena deambulaci3n), puntuaci3n 3, cojera grave (sin carga de peso)). Los observadores no sabían qu3 perros recibieron cada inyecci3n.

15 Los resultados se muestran en la Figura 10. Las puntuaciones de cojera se redujeron en los perros que recibieron anticuerpos monoclonales anti-NGF el día 3 despu3s de la inyecci3n en comparaci3n con el control del veh3culo, lo que indica que los anticuerpos monoclonales anti-NGF tuvieron un efecto en la reducci3n del dolor en los perros frente a la vista solamente con veh3culo. La actividad retardada es coherente con la farmacocin3tica en plasma de anticuerpos monoclonales anti-NGF canino lo que demostr3 una fase de distribuci3n tisular (alfa) lenta de aproximadamente 30 horas y la vascularizaci3n relativamente escasa del 3rea de la almohadilla plantar. Los resultados mostrados en la Figura 10 muestran que los anticuerpos anti-NGF canino descritos en el presente documento reducen el dolor inflamatorio en perros con una reducci3n consecuente de la cojera.

20 Juntos, los resultados descritos por el presente inventor demuestran que los anticuerpos caninos purificados contruidos usando el isotipo HCA inactivo para CDC son seguros y eficaces en caninos y tienen una semivida larga deseable.

#### 25 Definiciones

A no ser que se defina de otro modo, todos los t3rminos t3cnicos y cient3ficos usados en el presente documento tienen el significado habitualmente entendido por una persona que es experta en la materia de la presente invenci3n. El significado y alcance de los t3rminos deber3a ser evidente, sin embargo, en el caso de cualquier ambigüedad, las definiciones proporcionadas en el presente documento toman precedencia frente a cualquier definici3n de diccionario o extr3nseca.

35 A lo largo de la memoria descriptiva, a no ser que el contexto requiera otra cosa, se entender3 que los t3rminos "comprender" o "incluir" o variaciones tales como "comprende" o "comprendiendo", "incluye" o "incluyendo" implican la inclusi3n de un n3mero entero o grupo de n3meros enteros indicado, pero no la exclusi3n de cualquier otro en n3mero entero o grupo de n3meros enteros.

40 Como se usa en el presente documento, los t3rminos tales como "un", "una" y "el", "la" incluyen referentes singulares y plurales a no ser que el contexto claramente requiera otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un agente activo" o "un agente farmacol3gicamente activo" incluye un 3nico agente activo, as3 como dos o m3s agentes activos diferentes en combinaci3n, mientras que las referencias a "un veh3culo" incluyen mezclas de dos o m3s veh3culos, as3 como un veh3culo individual, y similares. Adem3s, a no ser que se requiera de otro modo por el contexto, los t3rminos singulares incluir3n pluralidades y los t3rminos plurales incluir3n el singular.

45 Como se define en el presente documento, el t3rmino "dolor" significa una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño tisular real o potencial, o descrita con respecto a dicho daño.

50 En relaci3n con dolor operatorio o posoperatorio, la Ley de Bienestar Animal de los Estados Unidos (Ley de Bienestar Animal 2002. Regulaciones de AWA, CFR, T3tulo 9 (Animales y Productos Animales), Cap3tulo 1 (Servicio de Inspecci3n de Salud Animal y Vegetal, Departamento de Agricultura). Subcap3tulo A (Bienestar Animal), Partes 1-4) define un procedimiento doloroso como cualquier procedimiento que se esperaría razonablemente que provoque dolor o tensi3n m3s que ligero o moment3neo en un ser humano al que se aplicara el procedimiento, es decir, dolor superior al provocado por inyecciones u otros procedimientos menores. Por lo tanto, si un canino experimenta un procedimiento quir3rgico doloroso, el animal deber3a recibir analg3sicos posoperatorios.

55 En casos adicionales, un canino puede experimentar dolor significativo o cr3nico como resultado de una afecci3n m3dica asociada tal como artritis reumatoide, osteoartritis, inflamaci3n o una afecci3n cancerosa o maligna.

60 El t3rmino "nocicepci3n" se refiere a la percepci3n de est3mulos perjudiciales. Como se define en el presente documento "dolor neurop3tico" (tambi3n conocido como 'neuralgia') es un dolor que viene de problemas con las señales desde los nervios. Puede surgir como consecuencia de una lesi3n o enfermedad que afecta al sistema somatosensorial. Existen causas del dolor neurop3tico y pueden asociarse con sensaciones an3malas denominadas disestesia, que aparecen espont3neamente. Como alternativa, puede estar asociado con alodinia que resulta cuando el dolor aparece, o empeora, con un toque o est3mulo que normalmente no provocaría dolor. Por ejemplo, un toque ligero en la cara puede desencadenar dolor si se tiene neuralgia del trig3mino, o la presi3n de la ropa de cama puede desencadenar dolor si se tiene neuropat3a diab3tica. El dolor neurop3tico tambi3n puede resultar de alodinia,

en la que el dolor aparece o, empeora, con un toque o estímulo que normalmente no provocaría dolor. Por ejemplo, un toque ligero de la cara puede desencadenar dolor si un sujeto tiene neuralgia del trigémino. El dolor neuropático relacionado con hiperalgesia significa que resulta dolor grave de un estímulo o toque que normalmente provocaría solamente una incomodidad ligera, mientras que parestesia significa que aparecen sensaciones incómodas o dolorosas incluso cuando no hay ningún contacto con el área que provoca el dolor, por ejemplo, pinchazos. Otras formas de dolor neuropático implican prurito o picor, que pueden asociarse con respuestas alérgicas o inflamatorias en la piel y dolor inflamatorio resultante de daño tisular y procesos de reparación.

Como se define en el presente documento, la expresión "anticuerpo neutralizante de NGF" o similar describe un anticuerpo que es capaz de neutralizar la activación y señalización biológicas de NGF. El anticuerpo neutralizante, que también puede denominarse anticuerpo antagonista, o anticuerpo de bloqueo, específicamente, y preferentemente de forma selectiva, se une con NGF e inhibe una o más actividades biológicas de NGF. Por ejemplo, el anticuerpo neutralizante puede inhibir la unión de un NGF con su ligando diana, tal como los receptores TrkA o p75 unidos a membrana celular.

Como se usa en el presente documento, la expresión "actividad biológica" se refiere a una cualquiera o más propiedades biológicas inherentes de una molécula (bien presente de forma natural como se encuentra *in vivo*, o proporcionada o activada por medios recombinantes). Las propiedades biológicas incluyen, pero sin limitación unión y/o activación del receptor; inducción de señalización celular o proliferación celular, inhibición del crecimiento celular, inducción de producción de citocinas o quimiocinas, inducción de apoptosis y actividad enzimática.

La expresión "región determinante de complementariedad (CDR)", como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias de aminoácidos que definen juntas la afinidad y especificidad de unión de la región Fv natural de un sitio de unión a inmunoglobulina nativo como se describe en Kabat *et al.* (Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H., Gottesman, K. y Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición. Publicación de NIH n.º 91-3242). La expresión "región marco conservada (FR)", como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias de aminoácidos interpuestas entre CDR. Estas partes del anticuerpo sirven para mantener las CDR en la orientación apropiada (lo que permite que las CDR se unan al antígeno).

La expresión "región constante (CR)" como se usa en el presente documento, se refiere a la parte de la molécula de anticuerpo que confiere funciones efectoras. En la presente invención, las regiones constantes significan típicamente regiones constantes caninas, es decir que las regiones constantes de los anticuerpos caninizados objeto derivan de inmunoglobulinas caninas.

La expresión "anticuerpo quimérico" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo que contiene secuencias derivadas de dos anticuerpos diferentes, que típicamente son de especies diferentes. Más típicamente los anticuerpos quiméricos comprenden dominios variables derivados de un donante específico que se unen específicamente con un epítipo diana y dominios constantes derivados de anticuerpos obtenidos de la especie diana a la que se va a administrar el anticuerpo.

El término "inmunogenicidad" como se usa en el presente documento se refiere a una medida de la capacidad de una proteína de dirección o resto terapéutico para inducir una respuesta inmunitaria (humoral o celular) cuando se administra a un receptor. La presente invención se refiere a la inmunogenicidad de los anticuerpos caninizados objeto. Preferentemente los anticuerpos descritos en el presente documento no tienen inmunogenicidad, es decir que no se inducirán anticuerpos neutralizantes contra ellos cuando se administren a un canino y, además, no están mediadas funciones efectoras por las regiones Fc del anticuerpo.

La expresión "identidad" o "identidad de secuencia" como se usa en el presente documento significa que, en cualquier posición de resto de aminoácido particular en una secuencia alineada, el resto de aminoácido es idéntico entre las secuencias alineadas. La expresión "similitud" o "similitud de secuencia" como se usa en el presente documento, indica que, en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el resto de aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, puede sustituirse un resto de isoleucina o valina por leucina. Esto puede denominarse sustitución conservativa. Preferentemente cuando las secuencias de aminoácidos desveladas en el presente documento se modifican por medio de sustitución conservativa de cualquiera de los restos de aminoácidos contenidos en las mismas, estos cambios no tienen ningún efecto en la especificidad de unión o actividad funcional del anticuerpo resultante en comparación con el anticuerpo no modificado.

La identidad de secuencia con respecto a un polipéptido (nativo) como se describe en el presente documento y su derivado funcional se refiere al porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los restos del polipéptido nativo correspondiente, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el porcentaje de homología máximo, y sin tener en cuenta ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Ni las extensiones N o C terminales, ni inserciones deberían interpretarse como reductoras de identidad u homología de secuencia. Los expertos en la materia conocen bien métodos y programas informáticos para realizar un alineamiento de dos o más secuencias de aminoácidos y determinar su secuencia su identidad u homología de secuencia. Por ejemplo, el porcentaje de identidad o similitud

de 2 secuencias de aminoácidos puede calcularse fácilmente usando algoritmos por ejemplo BLAST (Altschul *et al.* 1990), FASTA (Pearson y Lipman 1988), o el algoritmo de Smith-Waterman (Smith y Waterman 1981).

5 Como se usa en el presente documento, la referencia a un resto de aminoácido que tiene la “mayor homología” con un segundo resto de aminoácido se refiere al resto del aminoácido que tiene la mayor cantidad de características o propiedades en común con el segundo resto de aminoácido. Al determinar si un resto de aminoácido tiene la mayor homología con un segundo resto de aminoácido, puede realizarse típicamente una evaluación de factores tales como, pero sin limitación, carga, polaridad, hidrofobicidad, masa de ramas laterales y dimensión de ramas laterales.

10 Se pretende que la expresión “posición correspondiente” como se usa en el presente documento para hacer referencia a un resto de aminoácido que está presente en una segunda secuencia en una posición correspondiente a un resto de aminoácido específico en una primera secuencia haga referencia a la posición en la segunda secuencia que es la misma posición que la posición en la primera secuencia cuando las dos secuencias se alinean para permitir identidad de secuencia máximo entre las dos secuencias. Los restos de aminoácidos en posiciones correspondientes tienen la misma numeración de Kabat.

15 La expresión “consiste esencialmente en” o “que consiste esencialmente en” como se usa en el presente documento significa que un polipéptido puede tener características o elementos adicionales más allá de los descritos siempre que dichas características o elementos adicionales no afecten materialmente a la capacidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo para tener especificidad de unión por NGF canino. Es decir, el anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo que comprenden los polipéptidos pueden tener características o elementos adicionales que no interfieren con la capacidad del anticuerpo o fragmentos de anticuerpo para unirse con el NGF canino y antagonizar la actividad funcional de NGF canino. Dichas modificaciones pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un polipéptido que consiste esencialmente en una  
20 secuencia específica puede contener uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos adicionales, suprimidos o sustituidos, en uno de los extremos o en ambos extremos de la secuencia siempre que estos aminoácidos no interfieran con, inhiban, bloqueen o interrumpen el papel del anticuerpo o fragmento en la unión con NGF canino y secuestren su función biológica. De forma similar, una molécula polipeptídica que contribuye a los anticuerpos antagonistas de NGF caninos descritos en el presente documento pueden modificarse químicamente con uno o más  
25 grupos funcionales siempre que dichos grupos funcionales no interfieran con la capacidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo para unirse con NGF canino y antagonizar su función.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión “cantidad eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” significa la cantidad de un agente, compuesto de unión, molécula pequeña, proteína de fusión o peptidomimético descrito en el presente documento que se requiere para suministrar el efecto terapéutico requerido.

35 Los términos “polipéptido”, “péptido” o “proteína” se usan indistintamente en el presente documento para designar una serie lineal de restos de aminoácidos conectados entre sí por enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carboxilo de restos adyacentes. Los restos de aminoácidos están habitualmente en la forma isométrica “L” natural. Sin embargo, cualquier resto de aminoácido de L puede sustituirse por restos en la forma isométrica “D” siempre que el polipéptido conserve la propiedad funcional deseada.

40 Como se define en el presente documento un “anticuerpo” abarca proteínas de unión a antígeno que se unen específicamente con un antígeno diana de interés, en este caso factor de crecimiento nervioso canino, que tienen uno o más polipéptidos que pueden prepararse de forma recombinante o que pueden codificarse genéticamente por genes de inmunoglobulina, o fragmentos de genes de inmunoglobulina. El término “anticuerpo” abarca anticuerpos monoclonales y quiméricos, en particular anticuerpos caninizados, y abarca además anticuerpos policlonales o anticuerpos de cualquier clase o subtipo. Un “anticuerpo” se extiende además a anticuerpos híbridos, anticuerpos  
45 biespecíficos, heteroanticuerpos y fragmentos funcionales de los mismos que conservan la unión a antígeno.

50 La expresión “se une específicamente con” se refiere a la unión de un anticuerpo con una proteína o una diana específica que está presente entre una población heterogénea de proteínas. Por lo tanto, cuando están presentes en condiciones de inmunoensayo específicas, los anticuerpos se unen con una proteína particular, en este caso NGF canino, y no se unen en una cantidad significativa con otras proteínas presentes en la muestra.

55 Como se define en el presente documento, un “canino” también puede denominarse un “perro”. Los caninos pueden categorizarse como pertenecientes a la subespecie con el nombre trinómico *Canis lupus familiaris* (*Canis familiaris domesticus*) o *Canis lupus dingo*. Los caninos incluyen cualquier especie de perro e incluyen variedades tanto salvajes como domésticas, también denominadas estas últimas animales de compañía.

60 La presente invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan para el fin de ilustrar y no se pretende que se interpreten de forma limitante en la presente invención. Los métodos y técnicas de la presente invención se realizan generalmente acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y analizan a lo largo de  
65 la presente memoria descriptiva a no ser que se indique de otro modo.

**Ejemplos**

Ejemplo 1 - Diseño y producción de anticuerpos anti-NGF canino que tienen diferentes isotipos caninos.

5 Los anticuerpos dirigidos a NGF canino (denominados anticuerpos caN) se diseñaron y construyeron usando dominios pesados variables (VH) idénticos unidos con dominios constantes de cadena pesada (CH2 y CH3) seleccionados de HCA (SEQ ID NO: 1), HCB (SEQ ID NO: 2), HCC (SEQ ID NO: 3) o HCD (SEQ ID NO: 4). Se unió una cadena ligera variable (VL) con el dominio constante kappa canino (SEQ ID NO: 5). Las secuencias de aminoácidos combinadas se convirtieron a forma expresable en células de mamífero mediante la selección óptima de codones y síntesis génica química completa y clonación en un vector de expresión de células de mamífero pcDNA3.1+. Específicamente, las secuencias de aminoácido diseñadas se construyeron en forma expresable por ADNc sintético y se clonaron en un vector de expresión celular de mamífero cDNA3.1(+). Se produjeron secuencias de anticuerpo completas combinando secuencias de dominio variable caninizadas con secuencias de cadena ligera constante o pesada constante caninas C terminales. El dominio VH de aD11 caninizado se combinó con cada uno de los cuatro isotipos de cadena pesada HCA, HCB, HCC y HCD (SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 4) y el dominio VL de aD11 caninizado con el dominio constante de cadena ligera kappa canino (SEQ ID NO: 5). Las secuencias de aminoácidos combinadas se convirtieron a forma expresable en células de mamíferos mediante la selección óptima de codones y síntesis génica química completa y clonación en un vector de expresión de células de mamífero referencia. pcDNA3.1+.

20 Se transfectaron en células CHO combinaciones de plásmidos de ADNc de cadena ligera y pesada caninizados (caN-HCA-kLC usando SEQ ID NO: 5 más SEQ ID NO: 1 (HCA); caN-HCB-kLC usando SEQ ID NO: 5 más SEQ ID NO: 2 (HCB); caN-HCC-kLC usando SEQ ID NO: 5 más SEQ ID NO: 3 (HCC) y caN-HCD-kLC usando SEQ ID NO: 5 más SEQ ID NO: 4 (HCD)), los sobrenadantes se recogieron y se hicieron reaccionar en formato de ELISA con NGF. Después de las etapas de incubación y lavado, el anticuerpo canino unido se detectó mediante reactividad con un anticuerpo policlonal de cabra específico anti-NGF canino unido a peroxidasa de rábano rústico (HRP) y desarrollado usando TMB. La densidad óptica del producto resultante se midió a 450 nm y se comparó con la del sobrenadante transfectado con vector vacío de simulación. Los resultados de la unión con NGF para los 4 isotipos de anticuerpo caninizados se muestran en la Figura 1. Cada uno de estos anticuerpos tiene la misma cadena ligera (caN-kLC), siendo esta una cadena ligera que comprende un dominio constante kappa canino. Cada anticuerpo tiene un dominio constante de cadena pesada diferente. En consecuencia, un dominio variable de cadena pesada específico se combina con uno de 4 dominios constantes diferentes (caN-HCA, caN-HCB, caN-HCC o caN-HCD). Se observó unión equivalente con NGF para cada uno de los isotipos de cadena pesada caninos.

35 Se ensayaron sobrenadantes de anticuerpo con respecto a unión de NGF por ensayo de ELISA (Figura 1A) y neutralización de NGF por ensayo de inhibición de la proliferación celular TF-1 (Figura 1B). Como puede verse en la Figura 1, los cuatro isotipos tuvieron actividad equivalente entre sí en estos ensayos, es decir, todos se unieron específicamente con NGF canino.

40 Ejemplo 2: Deposición de complemento inducida por anticuerpos caninizados capturados por NGF.

Los cuatro sobrenadantes que contienen anticuerpos se evaluaron después con respecto a su capacidad para unirse con el complemento cuando se unieron con NGF usando un ELISA de complemento C11. Las placas se recubrieron con 100 µl/pocillo de NGF de ratón 5 µg/ml y se bloquearon con de BSA/PBS 5 %. Los pocillos recubiertos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con sobrenadantes de cultivo celular, que contenían isotipos de IgG anti-NGF caninizados recombinantes, diluidos en PBS/BSA 1 % (100 µl/pocillo). Las placas se lavaron y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con 100 µl/pocillo de suero humano diluido 1/100 en solución salina tampón tamponada con veronal que contenía MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, Tween-20 0,05 %, gelatina 0,1 % y BSA 0,5 %. Después de lavar, las placas se incubaron con 100 µl de una dilución 1/800 de anti-C1q-HRP de oveja (Serotec) en PBS/BSA 1 %. Después de lavar, las placas se desarrollaron mediante la adición de 100 µl de sustrato de TMB. Toda la unión de complemento C1q se expresó como A450 menos fondo de complemento inactivado por calor. El desarrollo se detuvo mediante la adición de 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N y la absorbancia se leyó a 450 nm.

Los resultados se muestran en la Figura 2. Estos resultados muestran la unión de C1q con anticuerpos de tipo HCB y HCC caninizados inmovilizados y ausencia de unión de C1q con anticuerpos de tipo HCA y HCD caninizados. Por lo tanto, los resultados indican sorprendentemente que diferentes cadenas pesadas derivadas de caninos muestran diferentes características de unión a complemento y por tanto de activación y que los anticuerpos caninizados con cadenas pesadas de tipo HCA y HCD inesperadamente son preferibles para su uso en antagonismo de NGF canino. En consecuencia, la capacidad de producir un anticuerpo que se une específicamente con NGF canino, pero que no media en CDC es altamente ventajosa, ya que un anticuerpo que se une específicamente con NGF, pero que media en una respuesta inmunitaria cercana a las células que expresan NGF, sería altamente indeseable.

Ejemplo 3: Unión con complemento de variantes N-glicosiladas y aglucosiladas con NGF capturado de anticuerpos monoclonales anti-NGF canino con isotipos de cadena pesada HCB y HCC.

Se llevó a cabo una comparación de la unión de variantes N-glicosiladas y aglucosiladas de anticuerpos monoclonales anti-NGF canino con NGF con isotipos de cadena pesada HCB y HCC. Se co-transfectaron en células CHO vectores de expresión que codificaban los pares de cadena pesada y ligera descritos por SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 2 (HCB), SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 (HCB\*), SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 3 (HCC), o SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7 (HCC\*) y los sobrenadantes se compararon mediante ELISA de unión con NGF de ratón. Los resultados se muestran en la Figura 3. El panel izquierdo muestra detección mediante ELISA de expresión de MAb anti-NGF construidos con cadena pesada HCB (HCB), cadena pesada HCB aglucosilada (HCB\*), cadena pesada HCC (HCC) o cadena pesada HCC aglucosilada (HCC\*) - las barras abiertas muestran sobrenadante no diluido, las barras sombreadas sobrenadante diluido 1/10 y C muestra un sobrenadante de control negativo no diluido. Se observó unión equivalente a NGF.

De forma similar, se co-expresaron anticuerpos diseñados para retirar el sitio de glucosilación ligado a N de dominio constante de HCB y HCC (denominado HCB\* (SEQ ID NO: 6) y HCC\* (SEQ ID NO: 7)) con cadena ligera y se evaluaron con respecto a actividad de complemento (Figura 3) en un intento de anular su unión a complemento. Sorprendentemente, el HCB\* aglucosilado no fue capaz de unirse con el complemento, sin embargo, el HCC\* aglucosilado permaneció capaz de unirse a complemento. La identificación de cadenas pesadas glucosiladas y aglucosiladas derivadas de caninos que no median en la fijación del complemento es un hallazgo particularmente ventajoso ya que NGF es un mediador soluble implicado en la nocicepción.

Los sobrenadantes de transfectantes de células CHO se ensayaron con respecto a su capacidad para reclutar complemento usando el ensayo de ELISA de Cq1 descrito en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Figura 3-panel derecho. Juntos los resultados en la Figura 3 demuestran que la capacidad de reclutar complemento C1q se anuló mediante la retirada del sitio de glucosilación ligado a N en la cadena pesada de tipo B (HCB\*) y se disminuyó por una mutación similar en la cadena pesada de tipo C (HCC\*).

En consecuencia, se muestra en el presente documento, bastante sorprendentemente, que cuando un anticuerpo tiene una cadena pesada derivada de canino del subtipo HCA, HCD o isotipo HCB\* aglucosilado, la unión del anticuerpo con NGF canino no da como resultado activación de complemento (y potencialmente otras funciones efectoras corriente abajo, tales como ADCC y ADCP). Por lo tanto, dichos anticuerpos, en el antagonismo de la actividad funcional biológica de una diana, tal como NGF canino, evitando la unión de NGF canino con receptores TrkA o p75 unidos a membrana celular, inhiben la cascada de señalización intracelular corriente abajo asociada. Además, ya que se produce frecuentemente expresión de NGF cerca de los nervios, dichos anticuerpos neutralizantes o antagonistas de NGF, que tienen cadena pesada derivada de canino del subtipo HCA, HCD o HCB\*, secuestran actividad biológica de NGF canino sin reclutar una respuesta inmunitaria más amplia. Por lo tanto, los resultados indican sorprendentemente que diferentes cadenas pesadas derivadas de canino muestran diferentes características de unión y activación de complemento y que se ha mostrado inesperadamente que los anticuerpos caninizados con cadenas pesadas de tipo HCA y HCD son preferibles para su uso en el antagonismo de NGF canino. La identificación de cadenas pesadas derivadas de caninos que no median en la fijación de complemento es un hallazgo particularmente ventajoso ya que NGF es un mediador soluble. Dichas propiedades funcionales son tanto inesperadas como altamente deseables.

Ejemplo 4: Producción de anticuerpos con dominios constantes de cadena pesada caninos para otros antígenos: VEGF y CD20 y su unión a complemento

Dado el sorprendente resultado de que diferentes isotipos de cadena pesada caninos tienen unión diferencial a complemento, se construyeron de forma similar anticuerpos anti-VEGF y anti-CD20 usando dominios constantes de cadena pesada caninos expresados en células CHO usando la misma metodología que se ha descrito en el Ejemplo 1. Se muestran resultados de ensayo de estos sobrenadantes de anticuerpo en el ELISA de complemento en la Figura 4. Los resultados se compararon con los anticuerpos anti-NGF descritos anteriormente con respecto a su capacidad para reclutar complemento después de unión con su antígeno afín.

Se muestran los resultados en la Figura 4. El Panel A muestra que MAb anti-NGF caninizado construido usando isotipos B y C de cadena pesada canina y anticuerpos humanizados construidos usando isotipos de cadena pesada humana IgG1 e IgG4 se capturaron en placas recubiertas con NGF, se incubaron con suero humano y se detectó C1q unido mediante ELISA usando anticuerpos policlonales anti-C1q conjugados con HRP. El Panel B muestra los resultados de la unión de complemento C1q con MAb anti-VEGF caninizados con VEGF capturado construidos usando isotipos A y B de cadena pesada canina (SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9). El Panel C muestra los resultados de la unión de complemento C1q con MAb anti-CD20 capturado en péptido de dominio extracelular huCD20 (muB-2a: MAb murino anti-CD20 humano y muB-HCB: MAb murino anti-CD20 humano expresado como una proteína de fusión quimérica con isotipo B de cadena pesada canina (SEQ ID NO: 9). Toda la unión de complemento C1q se expresó como A450 menos fondo de complemento inactivado por calor.



Juntos estos datos muestran que los anticuerpos anti-VEGF contruidos usando HCB pero no dominios constantes de cadena pesada caninos HCA podrían reclutar complemento y un anticuerpo anti-CD20 construido usando HCB canino podría unirse con el complemento y de este modo ser comparable a la unión diferencial de isotipos de anticuerpo anti-NGF con complemento descrito anteriormente. En resumen, estos datos apoyan la observación sorprendente de que los anticuerpos con antígeno capturado contruidos con isotipos HCB y HCC se unen con el complemento mientras que HCA y HCD no. La identificación de que los isotipos HCB y HCC se unen con el complemento, es particularmente ventajosa para destrucción de células tumorales por ejemplo de células tumorales que expresan VEGF o que expresan CD20.

Los resultados de estos experimentos apoyan el hallazgo inesperado del Ejemplo 1 de que los anticuerpos que comprenden dominio constante de cadena pesada canina de isotipos HCA, HCD y HCB aglucosilada (HCB\*) da como resultado inmunoglobulinas que no median en la actividad CDC. En consecuencia, el inventor ha identificado por primera vez que dichas cadenas pesadas derivadas de caninos tienen utilidad en inmunoglobulinas para uso en métodos terapéuticos en los que no se desea una respuesta inmunitaria mediada por CDC. Pueden encontrarse ejemplos de dichos usos en la inhibición mediante inmunoglobulinas caninas de citocinas o quimiocinas, factores de crecimiento, hormonas y otros mediadores extracelulares incluyendo complemento en sí mismo *in vivo* o en enfermedades tales como dolor, degeneración macular o inflamación.

Aunque los isotipos HCA, HCD y HCB\* son más útiles para el diseño de anticuerpos inactivos para CDC, el inventor también ha identificado sorprendentemente que los anticuerpos caninos de isotipos HCB (caIgG-B) y HCC (caIgG-C) son útiles en el diseño de anticuerpos activos para CDC. Dichos anticuerpos son útiles cuando se dirigen a células para destrucción, por ejemplo, en terapia de cáncer. Existen muchos antígenos tumorales humanos que se dirigen usando anticuerpos activos para CDC, incluyendo CD20, HER2 y el EGFR de modo que los anticuerpos caninos contruidos usando isotipos HCB y HCC tendrán usos paralelos en caninos.

Ejemplo 5: Purificación de anticuerpos monoclonales anti-NGF después de expresión en células CHO

Ya que los anticuerpos monoclonales anti-NGF caninos de los isotipos HCA y HCD tienen una falta de unión a complemento deseable (Figura 2), pero se unen débilmente con Proteína A de *Staphylococcus* (Figura 5), se desarrollaron métodos alternativos de purificación (Figura 6). Se expresaron anticuerpos monoclonales anti-NGF canino (construidos usando HCA de isotipo de cadena pesada) en células CHO y después de experimentación extensiva se descubrió sorprendentemente que el anticuerpo anti-NGF canino podría fraccionarse hasta alta pureza (>89 % de pico IgG monomérico, como se muestra en la Fig. 6A, 6D) mediante dos métodos de purificación alternativos.

En el primer método, el anticuerpo monoclonal anti-NGF canino se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de exclusión por tamaño (Método I – Figura 6A y B). En el segundo método, el anticuerpo anti-NGF podría purificarse mediante cromatografía de afinidad de Captoadherencia seguida de cromatografía de intercambio aniónico (Método II – Figura 6C y D).

El pico principal de anticuerpo monoclonal anti-NGF purificado por uno de los métodos corresponde a un peso molecular de aproximadamente 150 kDa. La comparación mediante SDS-PAGE y ELISA (Figura 7) ilustra que los Métodos I y II producen preparaciones de anticuerpo con pureza y bioactividad similares. Los anticuerpos monoclonales anti-NGF purificados producidos por estos métodos se ensayaron en el ensayo de neutralización de NGF TF-1 (descrito en la Figura 1) y se ha mostrado que tienen alta potencia (CI50 13 pM anti-NGF neutralizó NGF 37 pM; no mostrado).

Ejemplo 6: Los anticuerpos monoclonales anti-NGF canino pueden administrarse de forma segura por vía intravenosa a caninos y no provocan pirexia

Se expresaron anticuerpos monoclonales anti-NGF canino derivados de vectores de expresión que contenían cadena pesada de tipo HCA canina en células CHO y se purificaron mediante una combinación de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de exclusión por tamaño (Método I, Figura 6A y B) y se intercambió el tampón a solución salina tamponada con fosfato. Los anticuerpos se inyectaron por vía intravenosa en perros beagle a 2 mg/kg de peso corporal y se evaluaron con respecto a señales de toxicidad mediante inspección visual por un veterinario, cambio de peso corporal, temperatura corporal y bioquímica de plasma. La Figura 8 ilustra el peso corporal y mediciones de temperatura. No se observaron cambios en estos o ningún analito de bioquímica de plasma medidos (incluyendo sodio, potasio, cloruro, calcio, fosfato, urea, creatinina, glucosa, colesterol, bilirrubina, alanina transaminasa, fosfatasa alcalina, amilasa, lipasa, proteína total o albúmina: no mostrado).

Ejemplo 7: La farmacocinética en plasma de anticuerpos monoclonales anti-NGF canino (isotipo HCA) *in vivo* demuestra la semivida en suero larga y falta de inmunogenicidad

Se expresaron anticuerpos monoclonales anti-NGF canino derivados de vectores de expresión que expresaban cadena pesada de tipo HCA canina en células CHO y se purificaron por una combinación de cromatografía de

intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de exclusión por tamaño y se intercambiaron el tampón a solución salina tamponada con fosfato (Método 1, Figura 6A y B). Los anticuerpos se inyectaron por vía intravenosa en perros beagle a 2 mg/kg de peso corporal y se tomaron muestras de plasma en diversos tiempos durante las siguientes 2 semanas. Se evaluaron muestras de plasma diluidas con respecto a concentración de anticuerpo anti-NGF canino mediante ELISA usando NGF como diana y reactivo secundario anti-anticuerpo policlonal canino-peroxidasa de rábano rústico y se desarrolló según la Figura 1. Los resultados se muestran en la Figura 9. Las concentraciones en plasma medidas fueron coherentes con la cinética de dos fases, con una semivida de fase de distribución tisular (alfa) de aproximadamente 33 horas y fase de eliminación (beta) sorprendentemente larga de aproximadamente 9 días.

La ausencia de una reducción aguda en la concentración en plasma de la concentración de anticuerpo anti-NGF canino entre 100 y 300 horas demuestra que no hay anticuerpos neutralizantes pre-existentes para anticuerpos monoclonales recombinantes anti-NGF en sangre de perro, ni se generó ninguno de dichos anticuerpos neutralizantes después de la infusión. En comparación, se neutralizan proteínas basadas en inmunoglobulina humana recombinante mediante anticuerpos en sangre de perro a aproximadamente 200 horas después de la infusión (Richter *et al*, Drug Metabolism and Disposition 27: 21, 1998). Estos resultados muestran por lo tanto que los anticuerpos anti-NGF canino descritos en el presente documento tienen una semivida en suero larga (aproximadamente 9 días) *in vivo* después de la inyección intravenosa y que no hay anticuerpos pre-existentes ni anticuerpos de nueva generación que neutralicen los anticuerpos anti-NGF inyectados a lo largo del tiempo.

Ejemplo 8: Efecto de anticuerpos monoclonales anti-NGF canino en la reducción del dolor inflamatorio *in vivo*

Terapia de anticuerpos:

Se expresaron anticuerpos monoclonales anti-NGF canino derivados de vectores de expresión incluyendo cadena pesada de tipo HCA canina en células CHO y se purificaron por una combinación de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de exclusión por tamaño (Método I) e intercambio de tampón en solución salina tamponada con fosfato.

Modelo canino de inflamación:

Todos los experimentos se llevaron a cabo con la aprobación previa del Comité de Ética Institucional (CRL, Irlanda). Se inyectó a perros beagle (= día -1) caolín en la almohadilla plantar de una pata trasera para generar una inflamación auto-resolutiva que comenzó aproximadamente 24 horas después y que provoca que los perros tengan una cojera temporal. En este modelo, una vez que la respuesta de inflamación inicial a caolín disminuye, los perros cojean cada vez menos durante el periodo de aproximadamente 1-2 semanas y después se recuperan completamente.

Se inyectaron a grupos de 3 perros por vía intravenosa anticuerpos monoclonales anti-NGF canino a 200 µg/kg de peso corporal o solución salina tamponada con fosfato como control de vehículo (= día 0). Los perros se evaluaron con respecto a cojera durante 7 días mediante un método de puntuación visual (puntuación 0, sin cojera (carga de peso completa); puntuación 1, cojera ligera (sin carga de peso completa pero con buena deambulacion); puntuación 2, cojera moderada (carga de peso ligera y sin buena deambulacion), puntuación 3, cojera grave (sin carga de peso)). Los observadores no sabían qué perros recibieron qué inyección.

Los resultados se muestran en la Figura 10. Las puntuaciones de cojera se redujeron en los perros que recibían anticuerpos monoclonales anti-NGF el día 3 después de la inyección en comparación con control de vehículo, lo que indica que los anticuerpos monoclonales anti-NGF tuvieron un efecto en la reducción del dolor en los perros por encima de la vista solamente con vehículo. La actividad retardada es coherente con la farmacocinética en plasma de anticuerpos monoclonales anti-NGF canino lo que demostró una fase de distribución tisular (alfa) lenta de aproximadamente 30 horas y la vascularización relativamente escasa del área de la almohadilla plantar. Los resultados mostrados en la Figura 10 muestran que los anticuerpos anti-NGF canino descritos en el presente documento reducen el dolor inflamatorio en perros con una reducción consecuente de la cojera.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NVIP Pty Ltd

<120> Inmunoglobulinas Caninas Terapéuticas y Métodos de Uso de las mismas

<130> P122572.WO.01

<150> GB1114858.2

<151> 29-08-2011

<150> US61/483481

ES 2 601 400 T3

<151> 06-05-2011

<150> US61/531439

<151> 06-09-2011

5

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

10

<210> 1

<211> 453

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Cadena pesada de IgG-A de VH canino anti NGF caninizado (caN-HCA)

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro  
115 120 125

20

ES 2 601 400 T3

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr  
130 135 140

Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
165 170 175

Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu His Ser Leu Ser Ser Met Val Thr  
180 185 190

Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Val  
195 200 205

His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Phe Asn Glu Cys  
210 215 220

Arg Cys Thr Asp Thr Pro Pro Cys Pro Val Pro Glu Pro Leu Gly Gly  
225 230 235 240

Pro Ser Val Leu Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Arg Ile  
245 250 255

Thr Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Leu Asp Leu Gly Arg Glu  
260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Glu Val His  
275 280 285

Thr Ala Lys Thr Gln Ser Arg Glu Gln Gln Phe Asn Gly Thr Tyr Arg  
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln Asp Trp Leu Thr Gly Lys  
305 310 315 320

Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu  
325 330 335

Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Arg Ala His Lys Pro Ser Val Tyr  
340 345 350

Val Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser Ser Ser Asp Thr Val Ser  
355 360 365

Ile Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu  
370 375 380

ES 2 601 400 T3

Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Arg Lys His Arg Met Thr  
385 390 395 400

Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
405 410 415

Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asp Pro Phe Thr Cys Ala  
420 425 430

Val Met His Glu Thr Leu Gln Asn His Tyr Thr Asp Leu Ser Leu Ser  
435 440 445

His Ser Pro Gly Lys  
450

<210> 2

<211> 457

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de IgG-B de VH canino anti NGF caninizado (caN-HCB)

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro  
115 120 125

5

10

ES 2 601 400 T3

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr  
 130 135 140

Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 165 170 175

Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr  
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala  
 195 200 205

His Pro Ala Ser Lys Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Pro Lys Arg Glu  
 210 215 220

Asn Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro  
 225 230 235 240

Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 245 250 255

Asp Thr Leu Leu Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 260 265 270

Asp Leu Asp Pro Glu Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp  
 275 280 285

Gly Lys Gln Met Gln Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
 290 295 300

Asn Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gly His Gln Asp  
 305 310 315 320

Trp Leu Lys Gly Lys Gln Phe Thr Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu  
 325 330 335

Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala His  
 340 345 350

Gln Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Leu Ser Lys  
 355 360 365

Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp  
 370 375 380

ES 2 601 400 T3

Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys  
385 390 395 400

Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu  
405 410 415

Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr  
420 425 430

Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
435 440 445

Glu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
450 455

<210> 3

<211> 455

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de IgG-C de VH canino anti NGF caninizado (caN-HCC)

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro  
115 120 125

5

10

ES 2 601 400 T3

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Gln Ser Gly Ser Thr  
130 135 140

Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Pro Val Thr  
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Val Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
165 170 175

Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr  
180 185 190

Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala  
195 200 205

His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Ala Lys Glu Cys  
210 215 220

Glu Cys Lys Cys Asn Cys Asn Asn Cys Pro Cys Pro Gly Cys Gly Leu  
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile  
245 250 255

Leu Val Thr Ala Arg Thr Pro Thr Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu  
260 265 270

Asp Pro Glu Asn Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Ser Lys  
275 280 285

Gln Val Gln Thr Ala Asn Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Ser Asn Gly  
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu  
305 310 315 320

Ser Gly Lys Gln Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser  
325 330 335

Pro Ile Glu Glu Ile Ile Ser Lys Thr Pro Gly Gln Ala His Gln Pro  
340 345 350

Asn Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Met Ser Lys Asn Thr  
355 360 365

Val Thr Leu Thr Cys Leu Val Lys Asp Phe Phe Pro Pro Glu Ile Asp  
370 375 380



ES 2 601 400 T3

Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg  
385 390 395 400

Met Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser  
405 410 415

Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile  
420 425 430

Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Ile Ser  
435 440 445

Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
450 455

<210> 4

<211> 453

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de IgG-D de VH canino anti NGF caninizado (caN-HCD)

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro  
115 120 125

5

10

ES 2 601 400 T3

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr  
130 135 140

Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
165 170 175

Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Val Thr  
180 185 190

Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Val  
195 200 205

His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Pro Lys Glu Ser  
210 215 220

Thr Cys Lys Cys Ile Ser Pro Cys Pro Val Pro Glu Ser Leu Gly Gly  
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Arg Ile  
245 250 255

Thr Arg Thr Pro Glu Ile Thr Cys Val Val Leu Asp Leu Gly Arg Glu  
260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Glu Val His  
275 280 285

Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg  
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln Asp Trp Leu Thr Gly Lys  
305 310 315 320

Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Gly Leu Pro Ser Pro Ile Glu  
325 330 335

Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala His Gln Pro Ser Val Tyr  
340 345 350

Val Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser Ser Ser Asp Thr Val Thr  
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Glu Ile Asp Val Glu  
370 375 380

ES 2 601 400 T3

Trp Gln Ser Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Ser Lys Tyr His Thr Thr  
385 390 395 400

Ala Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
405 410 415

Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asp Thr Phe Thr Cys Ala  
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu Gln Asn His Tyr Thr Asp Leu Ser Leu Ser  
435 440 445

His Ser Pro Gly Lys  
450

<210> 5

<211> 217

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cadena ligera kappa de VL canino anti NGF caninizado (caN-kLC)

<400> 5

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ser  
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys Arg Asn Asp Ala Gln  
100 105 110

Pro Ala Val Tyr Leu Phe Gln Pro Ser Pro Asp Gln Leu His Thr Gly  
115 120 125

ES 2 601 400 T3

Ser Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Ser Phe Tyr Pro Lys Asp Ile  
 130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Val Asp Gly Val Ile Gln Asp Thr Gly Ile Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
 165 170 175

Thr Leu Thr Met Ser Ser Thr Glu Tyr Leu Ser His Glu Leu Tyr Ser  
 180 185 190

Cys Glu Ile Thr His Lys Ser Leu Pro Ser Thr Leu Ile Lys Ser Phe  
 195 200 205

Gln Arg Ser Glu Cys Gln Arg Val Asp  
 210 215

<210> 6

<211> 457

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de inmunoglobulina canina aglucosilada de VH anti NGF caninizado de tipo B (caN-HCB\*)

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

5

10

ES 2 601 400 T3

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro  
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr  
130 135 140

Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
165 170 175

Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr  
180 185 190

Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala  
195 200 205

His Pro Ala Ser Lys Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Pro Lys Arg Glu  
210 215 220

Asn Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro  
225 230 235 240

Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
245 250 255

Asp Thr Leu Leu Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
260 265 270

Asp Leu Asp Pro Glu Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp  
275 280 285

Gly Lys Gln Met Gln Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
290 295 300

Ala Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gly His Gln Asp  
305 310 315 320

Trp Leu Lys Gly Lys Gln Phe Thr Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu  
325 330 335

Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala His  
340 345 350

Gln Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Leu Ser Lys  
355 360 365

ES 2 601 400 T3

Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp  
 370 375 380

Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys  
 385 390 395 400

Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu  
 405 410 415

Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr  
 420 425 430

Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 435 440 445

Glu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
 450 455

<210> 7  
 <211> 455  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Cadena pesada de inmunoglobulina canina aglucosilada de VH anti NGF caninizado de tipo C (caN-HCC\*)

10

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 601 400 T3

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro  
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Gln Ser Gly Ser Thr  
130 135 140

Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Pro Val Thr  
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Val Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
165 170 175

Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr  
180 185 190

Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala  
195 200 205

His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Ala Lys Glu Cys  
210 215 220

Glu Cys Lys Cys Asn Cys Asn Asn Cys Pro Cys Pro Gly Cys Gly Leu  
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile  
245 250 255

Leu Val Thr Ala Arg Thr Pro Thr Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu  
260 265 270

Asp Pro Glu Asn Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Ser Lys  
275 280 285

Gln Val Gln Thr Ala Asn Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Ser Ala Gly  
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu  
305 310 315 320

Ser Gly Lys Gln Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser  
325 330 335

Pro Ile Glu Glu Ile Ile Ser Lys Thr Pro Gly Gln Ala His Gln Pro  
340 345 350

Asn Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Met Ser Lys Asn Thr  
355 360 365

ES 2 601 400 T3

Val Thr Leu Thr Cys Leu Val Lys Asp Phe Phe Pro Pro Glu Ile Asp  
 370 375 380

Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg  
 385 390 395 400

Met Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser  
 405 410 415

Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile  
 420 425 430

Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Ile Ser  
 435 440 445

Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
 450 455

<210> 8  
 <211> 331  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Dominio Fc de cadena pesada de inmunoglobulina canina de tipo A (HCA)

10

<400> 8

Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu His Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr  
 65 70 75 80

Phe Thr Cys Asn Val Val His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Pro Val Phe Asn Glu Cys Arg Cys Thr Asp Thr Pro Pro Cys Pro Val  
 100 105 110



ES 2 601 400 T3

Pro Glu Pro Leu Gly Gly Pro Ser Val Leu Ile Phe Pro Pro Lys Pro  
 115 120 125

Lys Asp Ile Leu Arg Ile Thr Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 130 135 140

Leu Asp Leu Gly Arg Glu Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val  
 145 150 155 160

Asp Gly Lys Glu Val His Thr Ala Lys Thr Gln Ser Arg Glu Gln Gln  
 165 170 175

Phe Asn Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln  
 180 185 190

Asp Trp Leu Thr Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Asp  
 195 200 205

Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Arg Ala  
 210 215 220

His Lys Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser  
 225 230 235 240

Ser Ser Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro  
 245 250 255

Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu  
 260 265 270

Arg Lys His Arg Met Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr  
 275 280 285

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 290 295 300

Asp Pro Phe Thr Cys Ala Val Met His Glu Thr Leu Gln Asn His Tyr  
 305 310 315 320

Thr Asp Leu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 9  
 <211> 335  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Dominio Fc de cadena pesada de inmunoglobulina canina de tipo B (HCB)

ES 2 601 400 T3

<400> 9

Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr  
65 70 75 80

Phe Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Lys Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Pro Val Pro Lys Arg Glu Asn Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp Cys  
100 105 110

Pro Lys Cys Pro Ala Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile  
115 120 125

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Leu Ile Ala Arg Thr Pro Glu  
130 135 140

Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu Asp Pro Glu Asp Pro Glu Val Gln  
145 150 155 160

Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Gln Met Gln Thr Ala Lys Thr Gln  
165 170 175

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
180 185 190

Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Gln Phe Thr Cys Lys  
195 200 205

Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys  
210 215 220

Ala Arg Gly Gln Ala His Gln Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser  
225 230 235 240

ES 2 601 400 T3

Arg Glu Glu Leu Ser Lys Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Ile Lys  
 245 250 255

Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln  
 260 265 270

Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu  
 275 280 285

Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg  
 290 295 300

Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu  
 305 310 315 320

His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
 325 330 335

<210> 10  
 <211> 333  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Dominio Fc de cadena pesada de inmunoglobulina canina de tipo C (HCC)

<400> 10

Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly  
 1 5 10 15

Ser Gln Ser Gly Ser Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr  
 20 25 30

Ile Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Val Ser Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr  
 65 70 75 80

Phe Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Pro Val Ala Lys Glu Cys Glu Cys Lys Cys Asn Cys Asn Asn Cys Pro  
 100 105 110

ES 2 601 400 T3

Cys Pro Gly Cys Gly Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro  
 115 120 125

Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Val Thr Ala Arg Thr Pro Thr Val Thr  
 130 135 140

Cys Val Val Val Asp Leu Asp Pro Glu Asn Pro Glu Val Gln Ile Ser  
 145 150 155 160

Trp Phe Val Asp Ser Lys Gln Val Gln Thr Ala Asn Thr Gln Pro Arg  
 165 170 175

Glu Glu Gln Ser Asn Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile  
 180 185 190

Gly His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Gln Phe Lys Cys Lys Val Asn  
 195 200 205

Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Glu Ile Ile Ser Lys Thr Pro  
 210 215 220

Gly Gln Ala His Gln Pro Asn Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp  
 225 230 235 240

Glu Met Ser Lys Asn Thr Val Thr Leu Thr Cys Leu Val Lys Asp Phe  
 245 250 255

Phe Pro Pro Glu Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu  
 260 265 270

Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Met Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly  
 275 280 285

Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 290 295 300

Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 305 310 315 320

His Tyr Thr Gln Ile Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 11  
 <211> 331  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Dominio Fc de cadena pesada de inmunoglobulina canina de tipo D (HCD)

ES 2 601 400 T3

<400> 11

Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Thr Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr  
 65 70 75 80

Phe Thr Cys Asn Val Val His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Pro Val Pro Lys Glu Ser Thr Cys Lys Cys Ile Ser Pro Cys Pro Val  
 100 105 110

Pro Glu Ser Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro  
 115 120 125

Lys Asp Ile Leu Arg Ile Thr Arg Thr Pro Glu Ile Thr Cys Val Val  
 130 135 140

Leu Asp Leu Gly Arg Glu Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val  
 145 150 155 160

Asp Gly Lys Glu Val His Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Gln Gln  
 165 170 175

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln  
 180 185 190

Asp Trp Leu Thr Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Gly  
 195 200 205

Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala  
 210 215 220

His Gln Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser  
 225 230 235 240

ES 2 601 400 T3

Ser Ser Asp Thr Val Thr Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro  
 245 250 255

Pro Glu Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu  
 260 265 270

Ser Lys Tyr His Thr Thr Ala Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr  
 275 280 285

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 290 295 300

Asp Thr Phe Thr Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu Gln Asn His Tyr  
 305 310 315 320

Thr Asp Leu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 12  
 <211> 331  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Dominio Fc de cadena pesada de inmunoglobulina canina aglucosilada de tipo A (HCA\*)

<400> 12

Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu His Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr  
 65 70 75 80

Phe Thr Cys Asn Val Val His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Pro Val Phe Asn Glu Cys Arg Cys Thr Asp Thr Pro Pro Cys Pro Val  
 100 105 110

ES 2 601 400 T3

Pro Glu Pro Leu Gly Gly Pro Ser Val Leu Ile Phe Pro Pro Lys Pro  
 115 120 125

Lys Asp Ile Leu Arg Ile Thr Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 130 135 140

Leu Asp Leu Gly Arg Glu Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val  
 145 150 155 160

Asp Gly Lys Glu Val His Thr Ala Lys Thr Gln Ser Arg Glu Gln Gln  
 165 170 175

Phe Ala Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln  
 180 185 190

Asp Trp Leu Thr Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Asp  
 195 200 205

Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Arg Ala  
 210 215 220

His Lys Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser  
 225 230 235 240

Ser Ser Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro  
 245 250 255

Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu  
 260 265 270

Arg Lys His Arg Met Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr  
 275 280 285

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 290 295 300

Asp Pro Phe Thr Cys Ala Val Met His Glu Thr Leu Gln Asn His Tyr  
 305 310 315 320

Thr Asp Leu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 13  
 <211> 335  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Dominio Fc de cadena pesada de inmunoglobulina canina aglucosilada de tipo B (HCB\*)

ES 2 601 400 T3

<400> 13

Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr  
65 70 75 80

Phe Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Lys Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Pro Val Pro Lys Arg Glu Asn Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp Cys  
100 105 110

Pro Lys Cys Pro Ala Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile  
115 120 125

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Leu Ile Ala Arg Thr Pro Glu  
130 135 140

Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu Asp Pro Glu Asp Pro Glu Val Gln  
145 150 155 160

Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Gln Met Gln Thr Ala Lys Thr Gln  
165 170 175

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Ala Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
180 185 190

Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Gln Phe Thr Cys Lys  
195 200 205

Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys  
210 215 220

Ala Arg Gly Gln Ala His Gln Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser  
225 230 235 240



ES 2 601 400 T3

Arg Glu Glu Leu Ser Lys Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Ile Lys  
 245 250 255

Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln  
 260 265 270

Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu  
 275 280 285

Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg  
 290 295 300

Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu  
 305 310 315 320

His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
 325 330 335

<210> 14  
 <211> 333  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Dominio Fc de cadena pesada de inmunoglobulina canina aglucosilada de tipo C (HCC\*)

<400> 14

Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly  
 1 5 10 15

Ser Gln Ser Gly Ser Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr  
 20 25 30

Ile Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Val Ser Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr  
 65 70 75 80

Phe Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Pro Val Ala Lys Glu Cys Glu Cys Lys Cys Asn Cys Asn Asn Cys Pro  
 100 105 110

ES 2 601 400 T3

Cys Pro Gly Cys Gly Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro  
 115 120 125

Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Val Thr Ala Arg Thr Pro Thr Val Thr  
 130 135 140

Cys Val Val Val Asp Leu Asp Pro Glu Asn Pro Glu Val Gln Ile Ser  
 145 150 155 160

Trp Phe Val Asp Ser Lys Gln Val Gln Thr Ala Asn Thr Gln Pro Arg  
 165 170 175

Glu Glu Gln Ser Ala Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile  
 180 185 190

Gly His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Gln Phe Lys Cys Lys Val Asn  
 195 200 205

Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Glu Ile Ile Ser Lys Thr Pro  
 210 215 220

Gly Gln Ala His Gln Pro Asn Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp  
 225 230 235 240

Glu Met Ser Lys Asn Thr Val Thr Leu Thr Cys Leu Val Lys Asp Phe  
 245 250 255

Phe Pro Pro Glu Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu  
 260 265 270

Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Met Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly  
 275 280 285

Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 290 295 300

Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 305 310 315 320

His Tyr Thr Gln Ile Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 15  
 <211> 331  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Dominio Fc de cadena pesada de inmunoglobulina canina de tipo D (HCD\*)

ES 2 601 400 T3

<400> 15

Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Thr Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr  
 65 70 75 80

Phe Thr Cys Asn Val Val His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Pro Val Pro Lys Glu Ser Thr Cys Lys Cys Ile Ser Pro Cys Pro Val  
 100 105 110

Pro Glu Ser Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro  
 115 120 125

Lys Asp Ile Leu Arg Ile Thr Arg Thr Pro Glu Ile Thr Cys Val Val  
 130 135 140

Leu Asp Leu Gly Arg Glu Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val  
 145 150 155 160

Asp Gly Lys Glu Val His Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Gln Gln  
 165 170 175

Phe Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln  
 180 185 190

Asp Trp Leu Thr Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Gly  
 195 200 205

Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala  
 210 215 220

His Gln Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser  
 225 230 235 240

ES 2 601 400 T3

Ser Ser Asp Thr Val Thr Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro  
245 250 255

Pro Glu Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu  
260 265 270

Ser Lys Tyr His Thr Thr Ala Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr  
275 280 285

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
290 295 300

Asp Thr Phe Thr Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu Gln Asn His Tyr  
305 310 315 320

Thr Asp Leu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
325 330

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo, una proteína de fusión o un fragmento de unión del mismo para su uso en el tratamiento terapéutico de un canino en el que se desea neutralización de diana en ausencia de función efectora indeseable, en el que dicho anticuerpo, proteína de fusión o fragmento de unión tiene un dominio constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13, en el que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada minimiza la activación de funciones efectoras del sistema inmunitario corriente abajo cuando el anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión se unen con su antígeno diana.
- 10 2. El anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tratamiento terapéutico del canino se refiere al tratamiento, la inhibición o el alivio del dolor o la inflamación en el canino.
- 15 3. El anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el tratamiento terapéutico del canino se refiere al tratamiento de la artritis o una afección artrítica.
- 20 4. El anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el dolor se selecciona del grupo que consiste en dolor neuropático, dolor oncológico, dolor asociado con, o resultante de, artritis reumatoide, dolor asociado con, o resultante de, osteoartritis, dolor asociado con, o resultante de, inflamación y dolor asociado con, o resultante de, prurito.
- 25 5. El anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión para su uso de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las funciones efectoras del sistema inmunitario corriente abajo se seleccionan del grupo que consiste en citotoxicidad dependiente de complemento, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo y patogénesis celular dependiente de anticuerpo.
- 30 6. El anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el anticuerpo tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.
- 35 7. El anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el antígeno diana se selecciona del grupo que consiste en una citocina, una quimiocina, un factor de crecimiento, un receptor de la superficie celular, un virus y un componente de la cascada del complemento.
- 40 8. Un anticuerpo o una proteína de fusión o un fragmento de unión del mismo para su uso en el tratamiento terapéutico de un canino en el que se desea destrucción de diana, en el que dicho anticuerpo, proteína de fusión o fragmento de unión tiene un dominio constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 14 en el que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada media en la activación de funciones efectoras del sistema inmunitario corriente abajo cuando el anticuerpo, la proteína fusión o el fragmento de unión se une con su antígeno diana.
- 45 9. El anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el tratamiento terapéutico se refiere al tratamiento de cáncer o enfermedad infecciosa en el canino.
- 50 10. El anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que las funciones efectoras del sistema inmunitario corriente abajo se seleccionan del grupo que consiste en citotoxicidad dependiente de complemento, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo y patogénesis celular dependiente de anticuerpo.
- 55 11. El anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión para su uso de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que el antígeno diana es un antígeno específico de cáncer.
- 60 12. El anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el antígeno específico de cáncer se selecciona del grupo que consiste en una citocina, una quimiocina, un factor de crecimiento, un receptor de la superficie celular, un virus y un componente de la cascada del complemento.
13. El anticuerpo, la proteína de fusión o el fragmento de unión para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el antígeno específico de cáncer se selecciona del grupo que consiste en las proteínas CD2, CD4, CD8, CD20, EGFR, VEGFR y HER2.

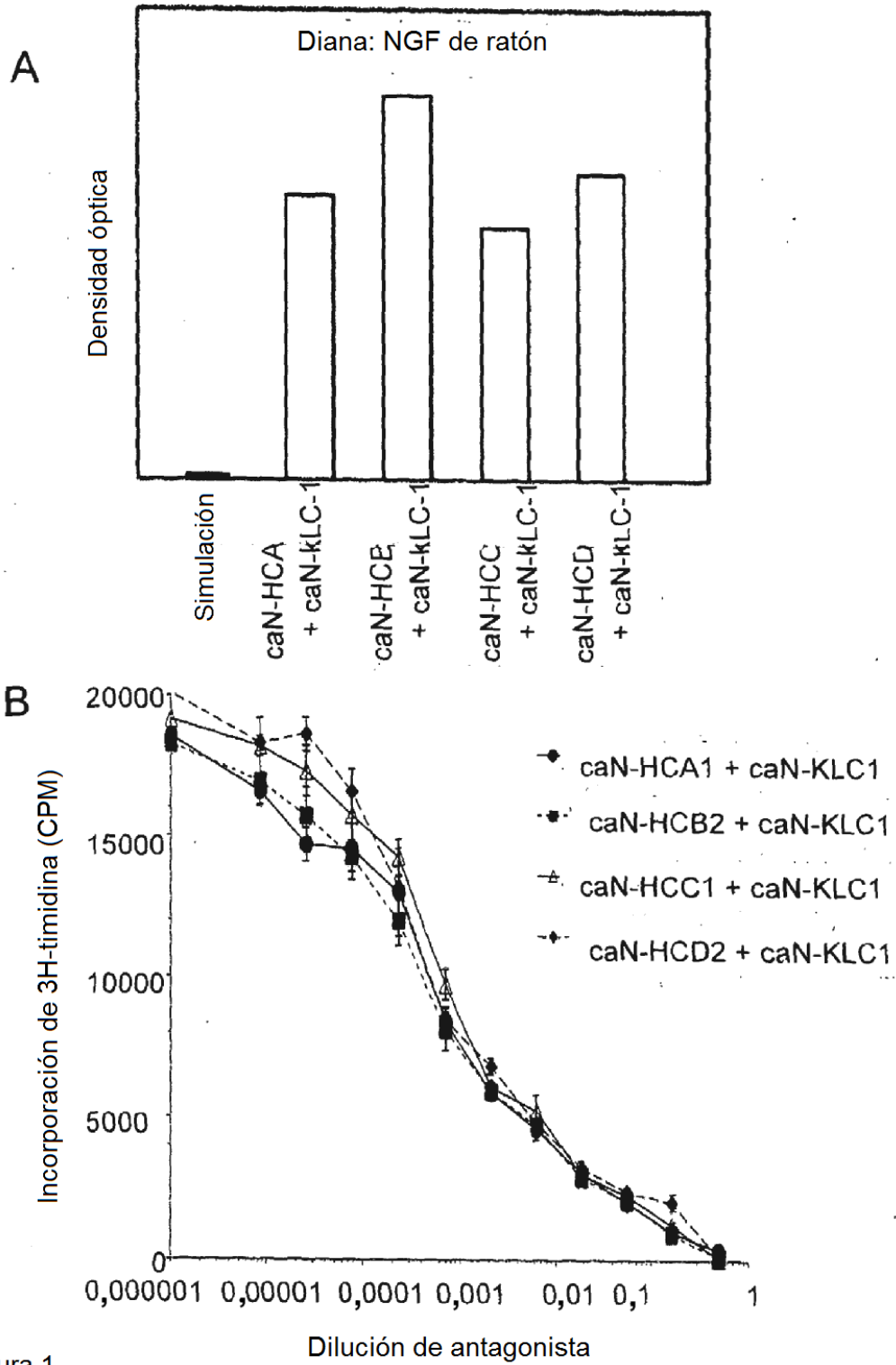


Figura 1

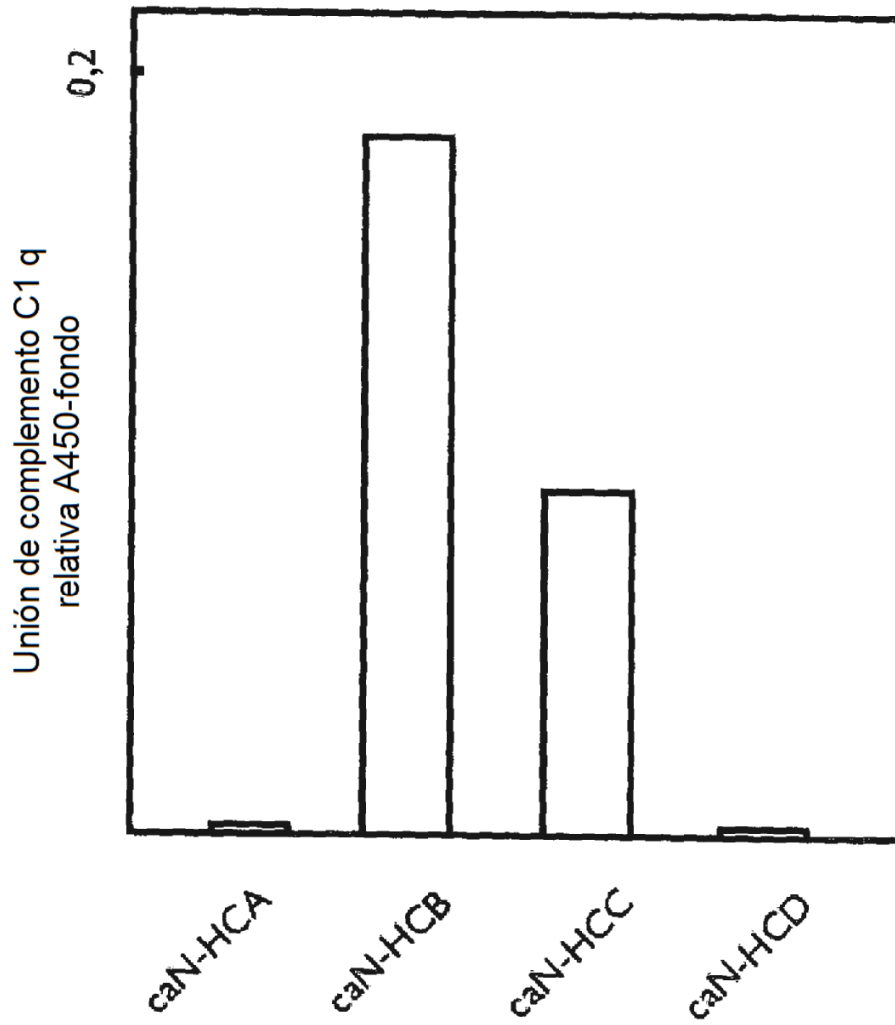


Figura 2

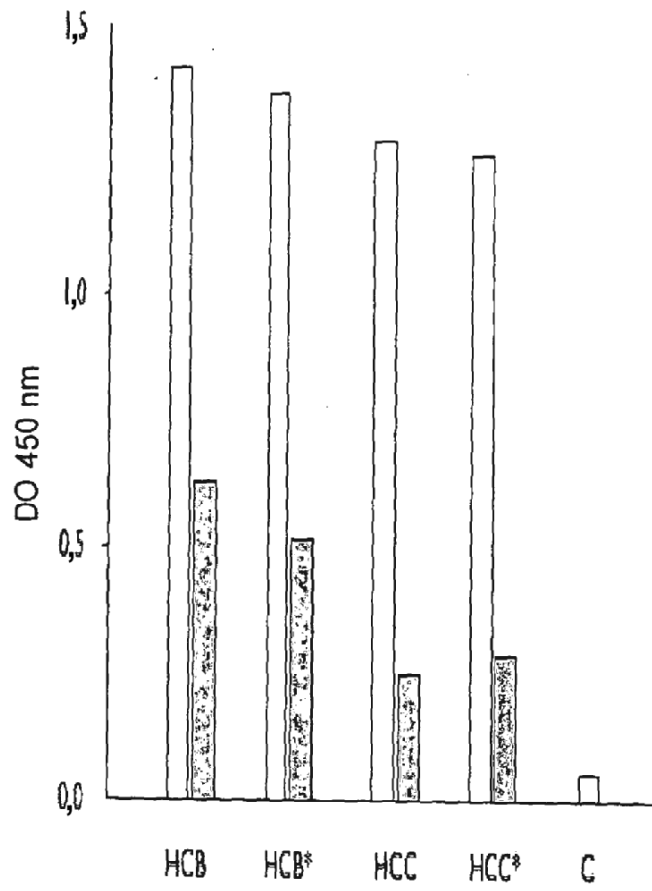


Figura 3a

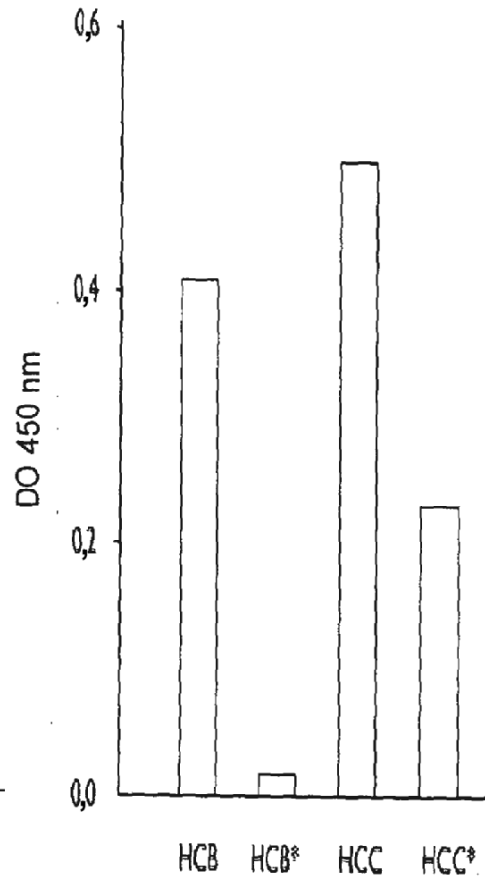


Figura 3b



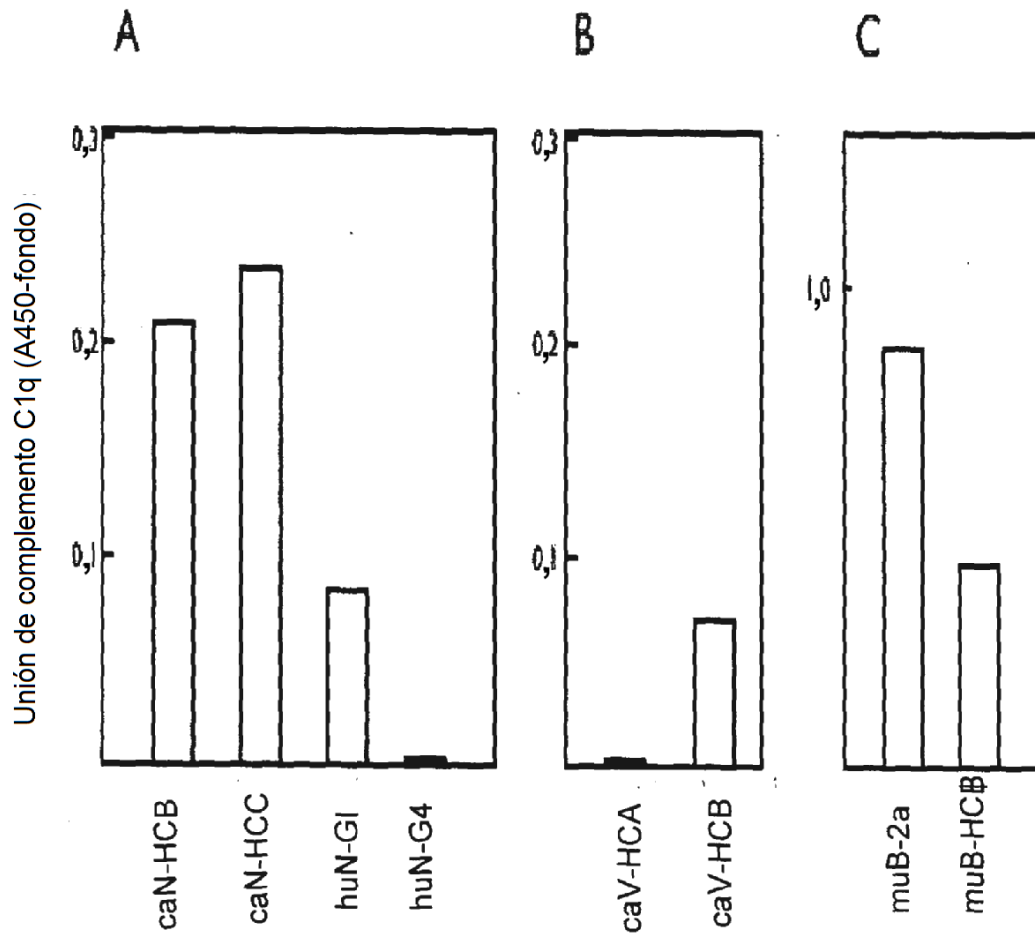


Figura 4

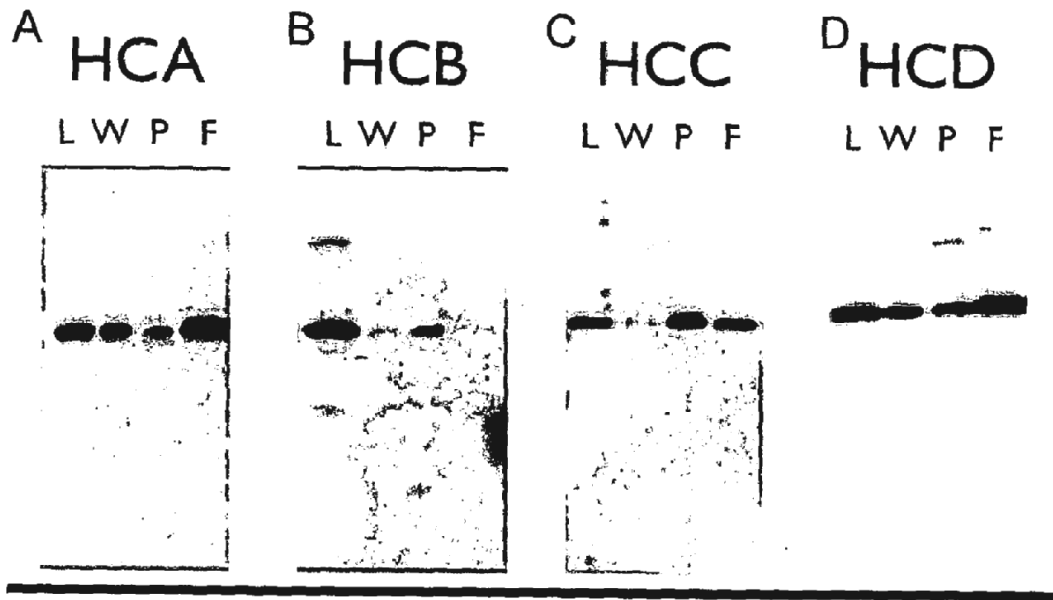


Figura 5.

Análisis post cromatografía de intercambio aniónico

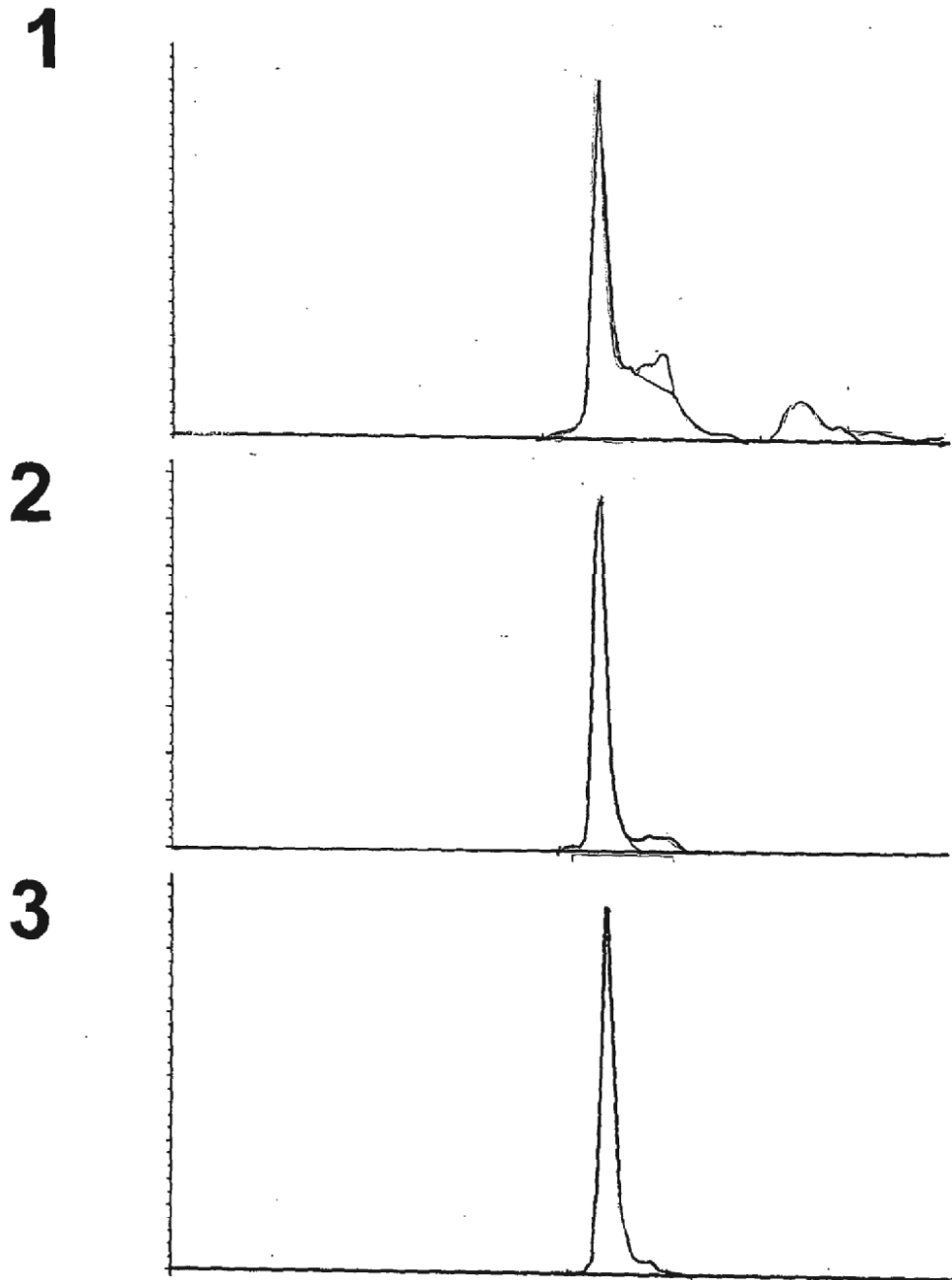


Figura 6A

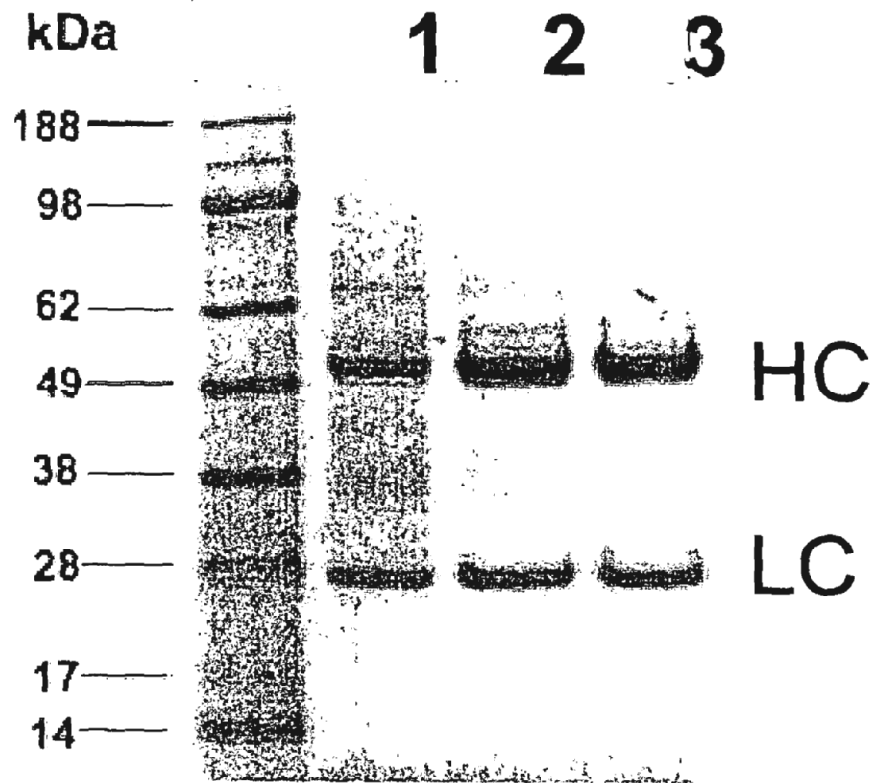


Figura 6B

### SDS-PAGE

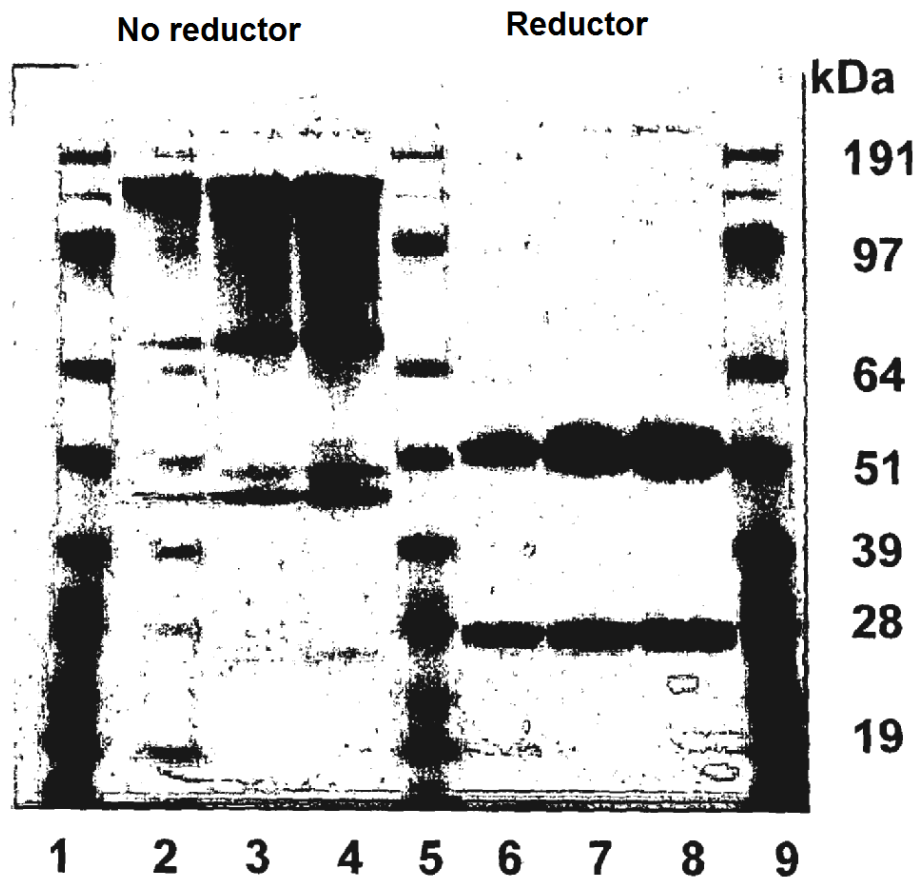
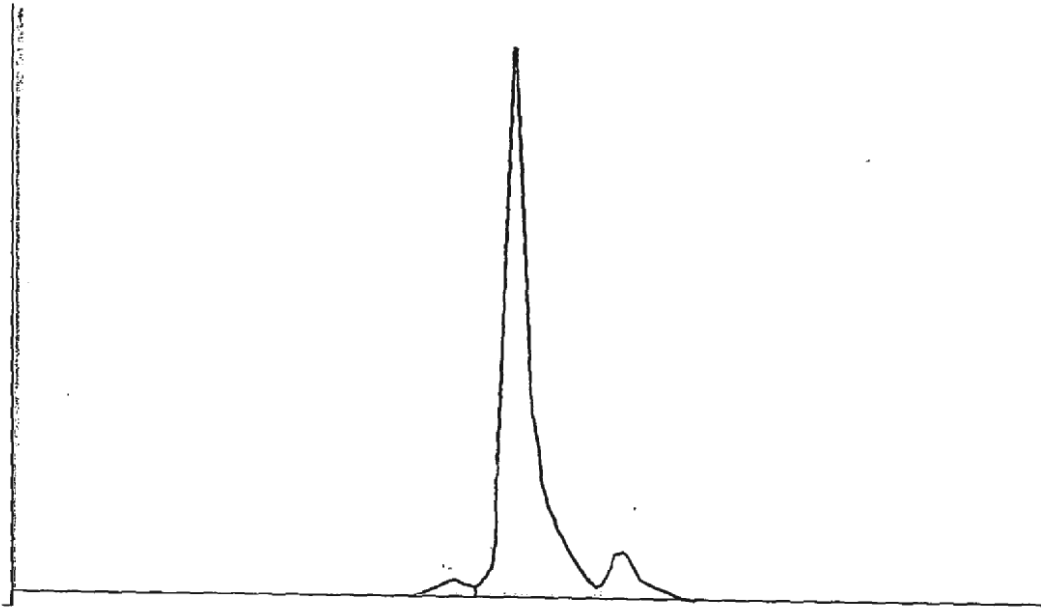


Figura 6C



Tiempo de retención pico (minutos)	PM aproximado (KDa)	% de área de pico total
8,05	353	2,6
9,17	156	89,7
11,18	36	7,7

Figura 6D

# SDS-PAGE

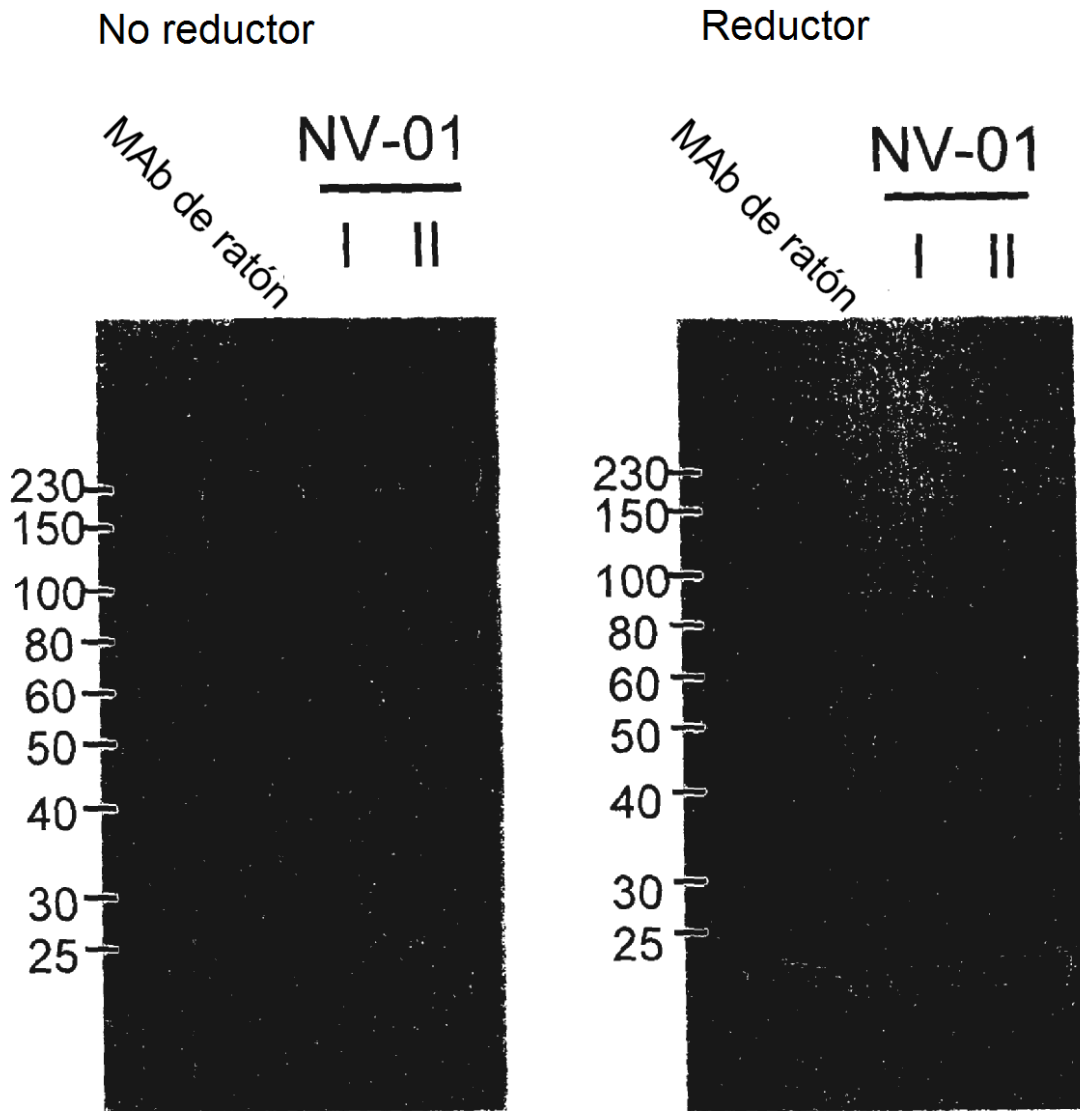


Figura 7A

## ELISA NGF

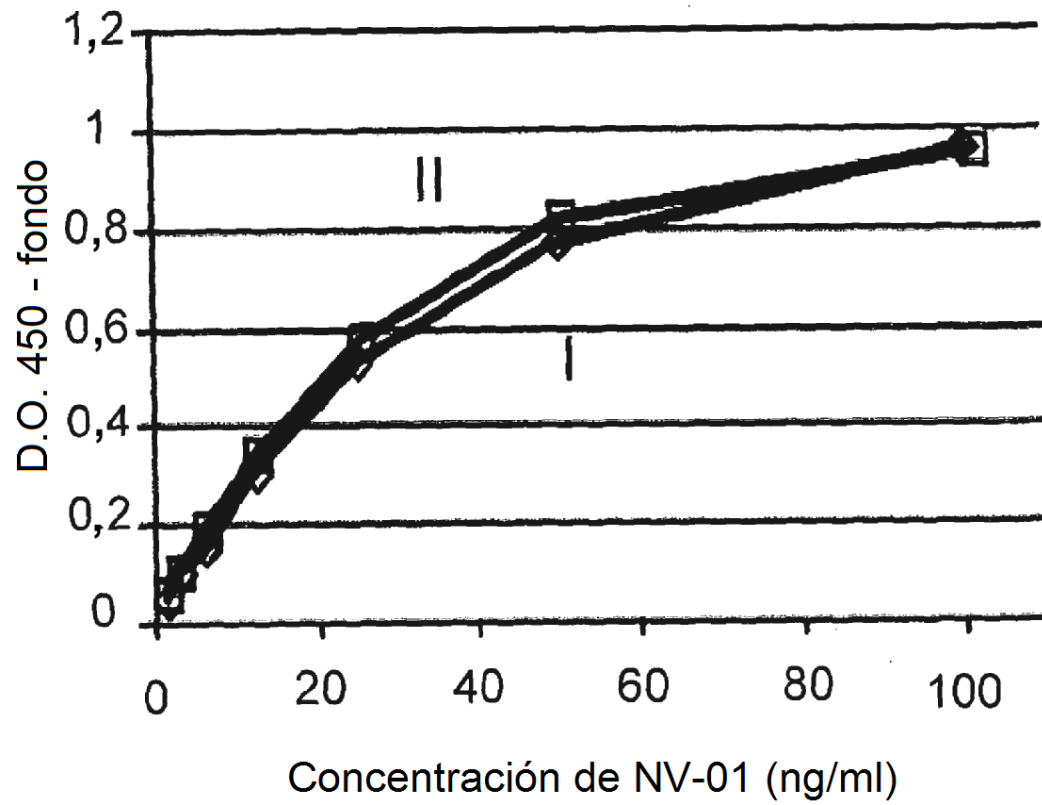


Figura 7B



Día del estudio			-1	1	3	7
ID animal	Sexo	Edad el día del estudio 0 (meses)				
68305	M	11	9,6	10,0	9,9	10,0
26885	F	19	9,2	9,9	9,5	9,8
32886	F	11	9,4	9,9	9,7	10,0

Día del estudio	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
ID animal															
68305	38,2	38,6	38,6	38,5	38,4	38,5	38,4	38,3	38,7	38,2	38,3	38,9	38,4	38,6	38,5
26886	37,8	38,2	38,0	38,2	38,4	37,7	38,1	38,2	38,4	38,2	38,4	38,6	38,5	38,4	38,6
32886	36,8	38,7	38,9	38,8	38,7	38,8	38,7	38,5	38,8	38,7	38,3	39,2	38,7	38,7	38,8

Figura 8

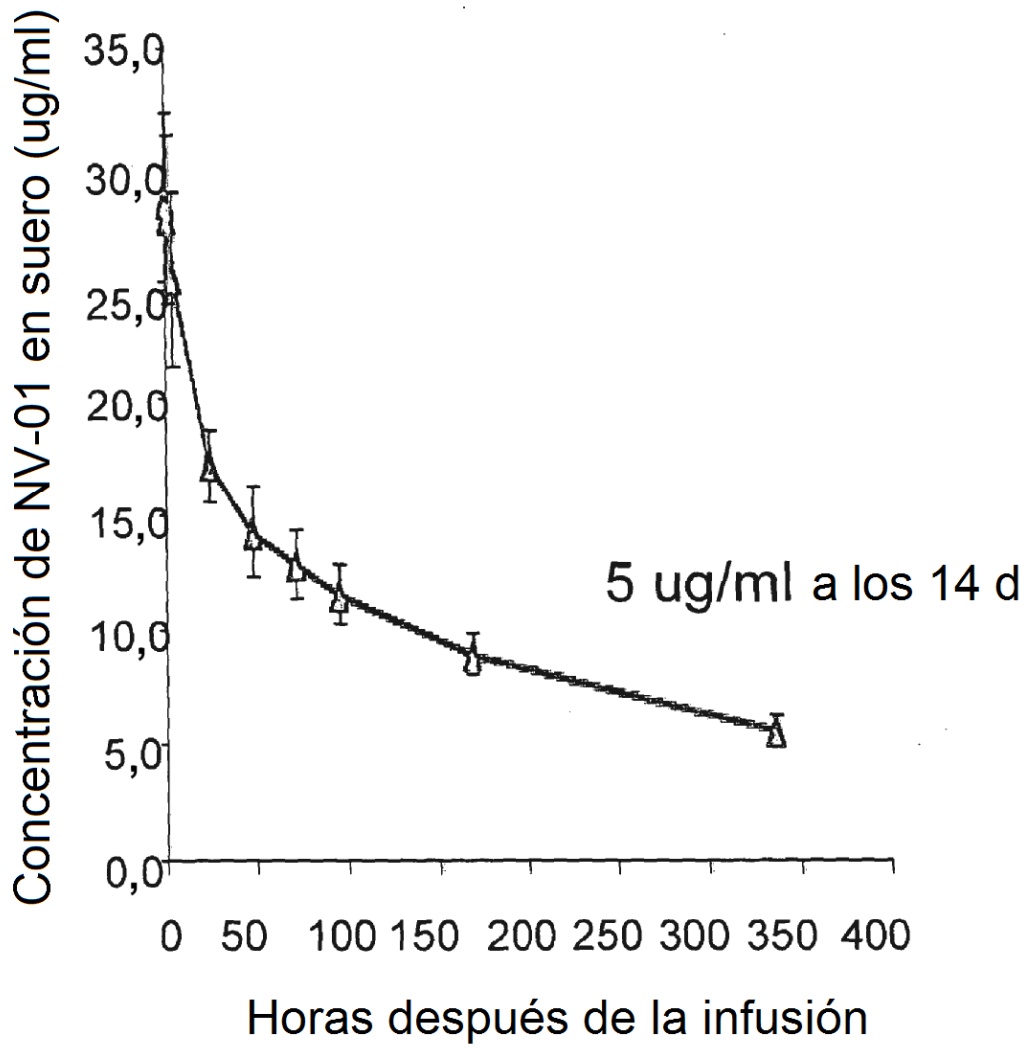


Figura 9

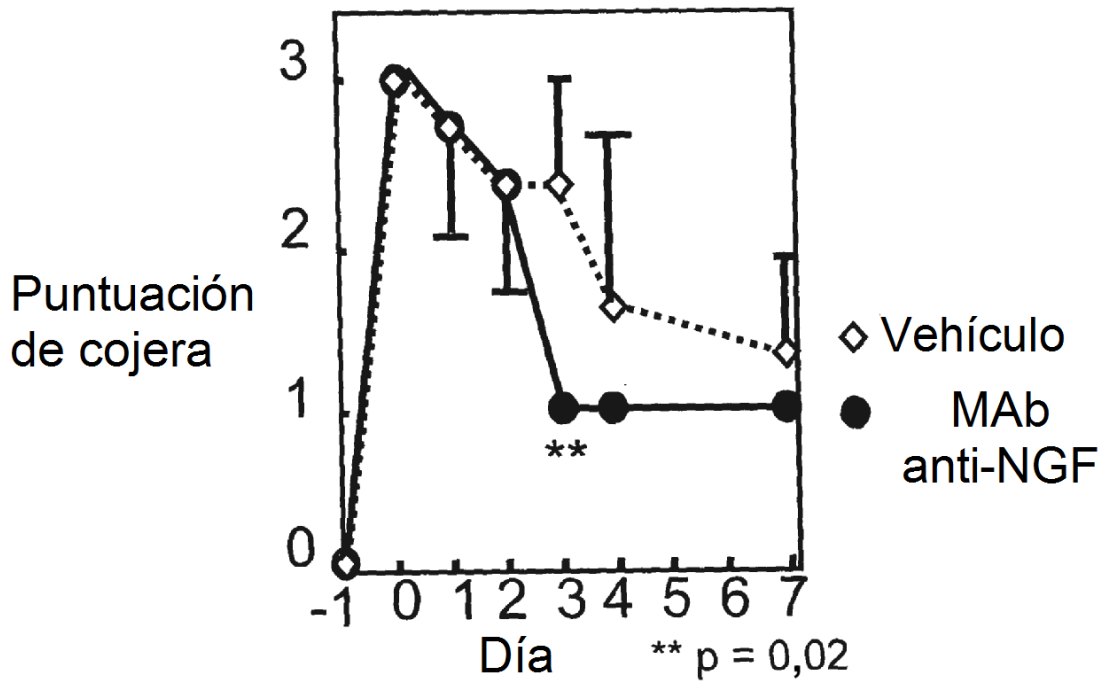


Figura 10