(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 654 299**

(51) Int. CI.:

A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 13/08 (2006.01)
A61P 13/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2009 PCT/IB2009/052535**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2009 WO09150635**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2009 E 09762162 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2291403**

(54) Título: **Tratamiento de prostatitis crónica**

(30) Prioridad:

13.06.2008 US 61141 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.02.2018

(73) Titular/es:

PFIZER INC. (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017, US

(72) Inventor/es:

SHELTON, DAVID, LOUIS

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

Tratamiento de prostatitis crónica

Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de un anticuerpo anti-NGF en el tratamiento o en la prevención del dolor y/o un síntoma en el tracto urinario inferior (LUTS) asociado con la prostatitis crónica y/o con el síndrome de dolor pélvico crónico.

Antecedentes de la invención

La Prostatitis Crónica (PC) y el síndrome de dolor pélvico crónico (CPPS) se definen como "la presencia de dolor genitourinario en ausencia de bacterias uropatógenas detectadas mediante la metodología microbiológica convencional" (*National Institutes of Health Summary Statement. National Institute of Health*/*National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Disease workshop on Chronic Prostatitis. Executive Summary, Bethesda, MD.* Diciembre de 1995). Es una enfermedad crónica, de origen desconocido, que se caracteriza por síntomas de dolor pélvico y síntomas en el tracto urinario inferior (LUTS) que incluyen síntomas tanto obstructivos como irritativos. Se caracteriza por la falta de cultivo en la orina y la secreción prostática expresada. La terminología que define la PC fue establecida por la Red de Investigación Colaborativa sobre la Prostatitis Crónica (CPCRN) [Krieger, J. N., L. Nyberg, Jr. y J. C. Nickel, definición por consenso y clasificación de la prostatitis del NIH. JAMA, 1999, 282(3): pág. 236-7]. La PC se clasifica como prostatitis de tipo III, dividida en inflamatoria (IIIa) y no inflamatoria (IIIb o dolor pélvico crónico - DPC). Por lo tanto, el término PC/DPC se usa colectivamente para describir esta categoría de tipo III, ya que sintomáticamente estos pacientes son similares.

Las tasas de prevalencia de la PC varían del 10 al 14 %en los varones (Nickel, J. C., y col., “Prevalence of prostatitis-like symptoms in a population based study using the National Institutes of Health chronic prostatitis symptom index”. *J Urol,* 2001. 165(3): pág. 842-5)) que tienen una enfermedad clínicamente confirmada, aunque es probable que la cifra sea más alta debido a un diagnóstico insuficiente o erróneo, comúnmente como infección recurrente del tracto urinario, vejiga hiperactiva o LUTS secundario a BPH. La PC tiene un impacto significativo en la calidad de vida, afecta a los desplazamientos, a las relaciones familiares y al empleo, y se asocia con síntomas depresivos. También tiene un importante impacto económico.

Existen pocos ensayos bien realizados, controlados con placebo y asignados al azar de terapias dirigidas a la PC, y el tratamiento suele consistir en un enfoque de prueba y error multimodal. Se ha informado de catorce importantes ensayos multicéntricos en los últimos 5 años, patrocinados por el NIDDK. Estos han incluido estudios sobre antibióticos, bloqueadores alfa, un antiinflamatorio (rofecoxib), finasterida y terapias alternativas tales como la quercetina. Estos estudios se resumen en la revisión de Dimitrakov y col (Dimitrakov, J. D., y col., “Management of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: an evidence based approach”. *Urology*, 2006. 67(5): pág. 881-8). Fue de particular interés un ensayo de 4 grupos controlado con placebo de ciprofloxacina, tamsulosina o una combinación de las mismas que no mostró evidencia de eficacia (Alexander, R. B., y col., “Ciprofloxacin or tamsulosin in men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: a randomized, double-blind trial”. *Ann Intern Med*, 2004. 141(8): pág. 581-9), y un ensayo controlado con placebo de rofecoxib (Nickel, J. C., y col., “A randomized, placebo controlled, multicenter study to evaluate the safety and efficacy of rofecoxib in the treatment of chronic nonbacterial prostatitis”. *J Urol*, 2003. 169(4): pág. 1401-5) que mostró tasas positivas de respuesta.

No se ha identificado una sola etiología, y probablemente sea un procedimiento multifactorial con varias lesiones urológicas causantes de un procedimiento que se autoperpetúa. Se postula que una combinación de disfunción inflamatoria, inmune, endocrina, neurológica y epitelial, y factores psicológicos desempeñan un papel en su patogénesis.

El factor de crecimiento nervioso (NGF) es uno de los pocos factores neurológicos que muestra una correlación con el dolor de la PC (Miller, L. J., y col., *Urology*, 2002. 59(4): pág. 603-8). El NGF tiene un papel en la regulación de los nervios nociceptivos, incluyendo las fibras C. Estas participan en la transmisión del dolor y también inervan los mastocitos, para lo que el NGF también es un potente estimulante que causa la desgranulación de los mastocitos. Durante el desarrollo de los mamíferos, el NGF se requiere para la supervivencia y el crecimiento de varias poblaciones de neuronas.

Se sabe que el NGF intravesical sensibiliza las fibras aferentes de la vejiga (Dmitrieva, N. y S. B. McMahon, *Pain*, 1996. 66(1): pág. 87-97). En los varones con CP, el NGF seminal es el único marcador inflamatorio que se correlaciona positivamente con los niveles de dolor (Miller, L. J., y col. *Urology*, 2002. 59(4): pág. 603-8). En opinión de Steers y col, las terapias basadas en niveles alterados de NGF representan una prometedora vía de investigación (Steers, W. D. y J. B. Tuttle, *Nat Clin Pract Urol*, 2006. 3(2): pág. 101-10). Sin embargo, los autores no enseñan qué terapias particulares representarían una investigación adicional y ciertamente no informan ni sugieren el uso de un anticuerpo anti-NGF en el tratamiento del dolor y/o los síntomas del tracto urinario inferior asociados con la afección.

Es necesario proporcionar un tratamiento novedoso y eficaz para el dolor y/o los síntomas del tracto urinario inferior asociados con la prostatitis crónica y/o el síndrome de dolor pélvico crónico sin los efectos adversos o la eficacia

limitada de las terapias disponibles en la actualidad.

Se ha informado previamente que el anticuerpo E3 anti-NGF es útil en el tratamiento del dolor nociceptivo crónico e inflamatorio, incluyendo el dolor por artritis reumatoide, dolor por osteoartritis y dolor posquirúrgico (véase, por ejemplo, el documento WO2004/058184). Sin embargo, dada la compleja etiología de la prostatitis crónica, un ejemplo del dolor visceral crónico, no se puede predecir que un anticuerpo anti-NGF, tal como el anticuerpo E3, pueda usarse para tratar el dolor y/o los síntomas del tracto urinario inferior (LUTS) asociados con la prostatitis crónica y/o el síndrome de dolor pélvico crónico.

Breve sumario de la invención

En un aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo antagonista anti-NGF para su uso en el tratamiento del dolor asociado con la prostatitis crónica/el síndrome del dolor pélvico crónico en un sujeto. El anticuerpo puede:

(a) unirse a NGF con una K_D inferior a aproximadamente 2 nM;
(b) inhibir la supervivencia dependiente del NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI_{50} de aproximadamente 100 pM o inferior, siendo la CI_{50} medida en presencia de aproximadamente 15 pM de NGF humano; y/o
(c) inhibir la supervivencia dependiente del NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI_{50} de aproximadamente 10 pM o inferior, siendo la CI_{50} medida en presencia de aproximadamente 1,5 pM de NGF.

El dolor asociado con la prostatitis crónica/el síndrome de dolor pélvico crónico se puede seleccionar del grupo que comprende dolor abdominal inferior (pélvico); dolor de parte inferior del estómago; dolor de vejiga; dolor suprapúbico; dolor de pene, testículos, escroto y perineo; dolor uretral; dispareunia; dolor, presión o incomodidad que pueden aumentar a medida que la vejiga se llena; disuria; y dolor eyaculatorio.

Los síntomas del tracto urinario inferior comprenden tres grupos de síntomas urinarios, que pueden definirse como síntomas de almacenamiento (irritativos), miccional (obstructivos) y posteriores a la micción. Los síntomas de almacenamiento comprenden urgencia, frecuencia, nocturia e incontinencia de urgencia. Los síntomas miccionales comprenden vacilación, flujo deficiente, intermitencia, esfuerzo y disuria. Los síntomas posteriores a la micción comprenden goteo terminal, goteo post-vacío y una sensación de vaciado incompleto.

La invención proporciona un anticuerpo antagonista anti-NGF capaz de inhibir o bloquear el dolor y/o los síntomas del tracto urinario inferior (LUTS) asociados con la prostatitis crónica y/o el síndrome de dolor pélvico crónico. En algunas realizaciones, el dolor y/o el síntoma del tracto urinario inferior se alivia/n en el transcurso de aproximadamente 24 horas después de administrar el anticuerpo antagonista anti-NGF. En algunas realizaciones, el dolor y/o el síntoma del tracto urinario inferior se alivia/n en el transcurso de aproximadamente 4 días después de administrar el anticuerpo antagonista anti-NGF. En algunas realizaciones, el dolor y/o el síntoma del tracto urinario inferior se alivia/n antes de la observación o en ausencia de una indicación de mejora del la afección en el individuo.

El anticuerpo antagonista anti-NGF puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende:

(a) una región CDR1 que se muestra en SEQ ID NO: 3;
(b) una región CDR2 que se muestra en SEQ ID NO: 4; y
(c) una región CDR3 que se muestra en SEQ ID NO: 5; y

una región variable de cadena ligera que comprende:

(a) una región CDR1 que se muestra en SEQ ID NO: 6;
(b) una región CDR2 que se muestra en SEQ ID NO: 7; y
(c) una región CDR3 que se muestra en SEQ ID NO: 8;

uniéndose el anticuerpo específicamente a NGF.

El anticuerpo antagonista anti-NGF puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos UN 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %o 99 %idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %o 99 %idénticos a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, uniéndose el anticuerpo específicamente a NGF.

El anticuerpo antagonista anti-NGF puede comprender una región variable de cadena pesada que comprenda la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y/o puede comprender una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

El anticuerpo antagonista anti-NGF puede ser un anticuerpo que comprenda las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 1 y 2. El anticuerpo antagonista anti-NGF puede ser un anticuerpo que comprenda las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 16 y 17.

El anticuerpo antagonista anti-NGF puede comprender una cadena pesada que comprenda una secuencia de

aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %o 99 %idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, y una cadena ligera que comprenda una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %o 99 %idénticos a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, uniéndose el anticuerpo específicamente a NGF.

El anticuerpo antagonista anti-NGF puede competir y/o competir de forma cruzada por la unión de NGF con y/o el anticuerpo puede unirse al mismo epítopo que un anticuerpo antagonista anti-NGF de referencia, que puede ser un anticuerpo antagonista anti-NGF como se define en el presente documento. El anticuerpo antagonista anti-NGF puede competir por la unión a NGF y/o el anticuerpo puede unirse al mismo epítopo que un anticuerpo que comprenda una región variable de cadena pesada que comprenda la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprenda la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

El anticuerpo antagonista anti-NGF puede ser un anticuerpo humanizado. El anticuerpo puede ser el anticuerpo E3, que se une específicamente al NGF humano y de roedor. El anticuerpo E3 se describe en el documento WO2004/058184, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de E3 se muestran en SEQ ID NO: 1 y 2 (Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184), respectivamente. Las partes de CDR del anticuerpo E3 (que incluyen las CDR de Chothia y Kabat) se representan esquemáticamente en las Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184. Las secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras de E3, y de las CDR extendidas individuales también se muestran a continuación (véase "secuencias de anticuerpos" a continuación). El anticuerpo E3 es altamente potente en el secuestro del NGF y la prevención de la interacción con su receptor. Se ha demostrado que E3 y su anticuerpo precursor murino 911 son un analgésico eficaz en modelos animales no clínicos de dolor patológico que incluyen artritis, dolor por cáncer y dolor posquirúrgico.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende un fragmento o una región del anticuerpo E3 (indistintamente denominado "E3" en el presente documento). En una realización, el fragmento es una cadena ligera del anticuerpo E3 como se muestra en la Figura 1B del documento WO2004/058184 y SEQ ID NO: 17 en el presente documento. En otra realización, el fragmento es una cadena pesada del anticuerpo E3 como se muestra en la Figura 1A del documento WO2004/058184 y SEQ ID NO: 16 en el presente documento. En otra realización más, el fragmento contiene una o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo E3. En otra realización más, el fragmento contiene una o más CDR de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo E3 como se muestra en la Figura 1A y 1B del documento WO2004/058184 y SEQ ID NO: 17 y 16, respectivamente, en el presente documento.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una cadena ligera que está codificada por un polinucleótido que es producido por una célula huésped con un número de depósito de ATCC n.º PTA-4893 o ATCC n.º PTA-4894. En otro aspecto, el anticuerpo comprende una cadena pesada que está codificada por un polinucleótido que es producido por una célula huésped con un número de depósito de ATCC n.º PTA-4895. En otro aspecto, el anticuerpo comprende (a) una cadena ligera que está codificada por un polinucleótido que es producido por una célula huésped con un número de depósito de ATCC n.º PTA-4894 o ATCC n.º PTA-4893; y (b) una cadena pesada que está codificada por un polinucleótido que es producido por una célula huésped con un número de depósito de ATCC n.º PTA-4895 (por conveniencia en el presente documento, el/los polinucleótido/s producido/s por una célula huésped depositada se denominan como aquellos que tienen un número de depósito de ATCC n.º PTA-4894, PTA-4893 y PTA-4895). En otro aspecto, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera de una cadena ligera que está codificada por un polinucleótido que es producido por una célula huésped con un número de depósito de ATCC n.º PTA-4894 o ATCC n.º PTA-4893. En otro aspecto, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada de una cadena pesada que está codificada por un polinucleótido que es producido por una célula huésped con un número de depósito de ATCC n.º PTA-4895. En otro aspecto, el anticuerpo comprende (a) una región variable de cadena ligera de una cadena ligera que está codificada por un polinucleótido que es producido por una célula huésped con un número de depósito de ATCC n.º PTA-4894 o ATCC n.º PTA-4893; y (b) una región variable de cadena pesada de una cadena pesada que está codificada por un polinucleótido que es producido por una célula huésped con un número de depósito de ATCC n.º PTA-4895. En otro aspecto más, el anticuerpo comprende una o más CDR codificadas por (a) un polinucleótido que es producido por una célula huésped con un número de depósito de ATCC n.º PTA-4894; y/o (b) una cadena pesada que está codificada por un polinucleótido que es producido por una célula huésped con un número de depósito de ATCC n.º PTA-4895.

En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser un anticuerpo de longitud completa, que puede ser de la subclase IgG2. El anticuerpo puede comprender la región constante de IgG2a de cadena pesada humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende la región constante kappa de la cadena ligera humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte, por ejemplo, que no desencadena la lisis mediada por complemento o no estimula la citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC). En otras realizaciones, la región constante se modifica como se describe en *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624; PCT WO9958572. El anticuerpo puede comprender una región constante de IgG2a de cadena pesada humana que comprende las siguientes mutaciones: A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos con referencia a la secuencia de IgG2a de tipo natural). *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624.

La región variable de la cadena pesada y/o la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-NGF puede comprender una o más mutaciones de la región marco conservada respectivas. En un aspecto, la mutación de la región marco conservada puede reemplazar a un resto de la región marco conservada humana por un resto de la región marco conservada murina complementario. La mutación puede comprender la sustitución V71K en la región variable de la cadena pesada.

En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como fragmentos Fab o Fab'2, o un anticuerpo monocatenario.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una cualquiera o más de las siguientes: a) una o más CDR del anticuerpo E3 que se muestra en las SEQ ID NO: 1-8 (Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184); b) CDR H3 de la cadena pesada del anticuerpo E3 que se muestra en SEQ ID NO: 1 y 5 (Figura 1A del documento WO2004/058184); c) CDR L3 de la cadena ligera del anticuerpo E3 que se muestra en SEQ ID NO: 2 y 8 (Figura 1B del documento WO2004/058184); d) tres CDR de la cadena ligera del anticuerpo E3 que se muestra en SEQ ID NO: 2, 6-8 (Figura 1B del documento WO2004/058184); e) tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo E3 que se muestra en SEQ ID NO: 1, 3-5 (Figura 1A del documento WO2004/058184); y f) tres CDR de la cadena ligera y tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo E3 que se muestra en SEQ ID NO: 1-8 (Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184). En otro aspecto, el anticuerpo puede comprender una cualquiera o más de las siguientes: a) a) una o más (una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) CDR (derivadas del anticuerpo E3 que se muestra en SEQ ID NO: 1-8 (Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184); b) una CDR derivada de CDR H3 de la cadena pesada del anticuerpo E3 que se muestra en SEQ ID NO: 1 y 5 (Figura 1A del documento WO2004/058184); y/o c) una CDR derivada de CDR L3 de la cadena ligera del anticuerpo E3 que se muestra en SEQ ID NO: 2 y 8 (Figura 1B del documento WO2004/058184). En algunas realizaciones, las CDR pueden ser CDR de Kabat, CDR de Chothia, o una combinación de CDR de Kabat y Chothia (denominadas CDR "extendidas" o "combinadas" en el presente documento). En algunas realizaciones, los polipéptidos comprenden cualquiera de las configuraciones de CDR (incluyendo combinaciones, variantes, etc.) descritas en el presente documento.

En un aspecto, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 9, en la que I34 es S, L, V A o I; y N35 está sustituido con N, T o S. Por conveniencia en el presente documento, "sustituido" o "es" en el presente contexto o en referencia a un aminoácido se refiere a elecciones de aminoácido/s para una posición dada. Como es evidente, la sustitución o elección puede ser el aminoácido representado en una SEQ ID del presente documento.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 10, en la que M50 es M, I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; y en la que Y110 es Y, K, S, R o T.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 11, en la que G98 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que G99 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 12, en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 13, en la que I51 es I, T, V o A; y S56 es S o T.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 14, en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 14, en la que S91 es S o E; K92 es cualquier aminoácido; T93 es cualquier aminoácido; y en la que Y96 es Y o R.

En un aspecto, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 9, en la que I34 es S, L, V A o I; y N35 es N, T o S.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10, en la que

M50 es M, I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; y en la que Y110 es Y, K, S, R o T.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; y en la que Y110 es Y, K, S, R o T.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11, en la que G98 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que G99 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12, en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13, en la que 151 es I, T, V o A; y S56 es S o T.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14, en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14, en la que S91 es S o E; K92 es cualquier aminoácido; T93 es cualquier aminoácido; y en la que Y96 es Y o R.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la región CDR1 de SEQ ID NO:9, en la que I34 es S, L, V A o I; y N35 es N, T o S; la región CDR2 de SEQ ID NO: 10, en la que M50 es M, I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V; y la región CDR3 de SEQ ID NO: 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; en la que Y110 es Y, K, S, R o T. En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la región CDR3 de SEQ ID NO: 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; en la que Y110 es cualquier aminoácido. En otras realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la región CDR3 de SEQ ID NO:11, en la que G98 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que G99 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende además una región variable de cadena ligera de anticuerpo.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende la región CDR1 de SEQ ID NO:12, en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q; la región CDR2 de SEQ ID NO:13, en la que 151 es I, T, V o A; y S56 es S o T; y la región CDR3 de SEQ ID NO:14, en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, la región variable de cadena ligera comprende la región CDR3 de SEQ ID NO: 14, en la que S91 es S o E; K92 es cualquier aminoácido; T93 es cualquier aminoácido; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende además una cadena pesada de anticuerpo.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende (a) una región variable de cadena pesada que comprende la región CDR1 de SEQ ID NO:9, en la que I34 es S, L, V A o I; y N35 es N, T o S; la región CDR2 de SEQ ID NO:10, en la que M50 es M, I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V; y la región CDR3 de SEQ ID NO:11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; en la que Y110 es Y, K, S, R o T; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la región CDR1 de SEQ ID NO:12, en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q; la región CDR2 de SEQ ID NO:13, en la que 151 es I, T, V o A; y S56 es S o T; y la región CDR3 de SEQ ID NO:14, en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, la región variable de cadena ligera comprende la región CDR3 de SEQ ID NO: 14, en la que S91 es S o E; K92 es cualquier aminoácido; T93 es cualquier aminoácido; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la región CDR3 de SEQ ID NO:11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; en la que Y110 es cualquier aminoácido. En otras realizaciones, la región variable

de cadena pesada comprende la región CDR3 de SEQ ID NO:11, en la que G98 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que G99 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende además una cadena ligera de anticuerpo.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 9, en la que I34 es S, L, V A o I; y N35 es N, T o S; una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10, en la que M50 es M, I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V; y una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; en la que Y110 es Y, K, S, R o T. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11, en la que Y100 es Y, L o R; y en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido. En otras realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11, en la que G98 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que G99 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende además una región variable de cadena ligera de anticuerpo.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12, en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q; una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13, en la que 151 es I, T, V o A; y S56 es S o T; y una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14, en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14, en la que S91 es S o E; K92 es cualquier aminoácido; T93 es cualquier aminoácido; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende además una región variable de cadena pesada de anticuerpo.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende (a) una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 9, en la que I34 es S, L, V A o I; y N35 es N, T o S; una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10, en la que M50 es M, I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V; y una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; y en la que Y110 es Y, K, S, R o T; y (b) una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12, en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q; una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13, en la que 151 es I, T, V o A; y S56 es S o T; y una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ I D NO:14, en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14, en la que S91 es S o E; K92 es cualquier aminoácido; T93 es cualquier aminoácido; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; en la que Y110 es cualquier aminoácido. En otras realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11, en la que G98 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que G99 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende además una región variable de cadena ligera de anticuerpo.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende: (a) una región CDR1 de SEQ ID NO: 9, en la que I34 es S, L, V A o I; y N35 está sustituido con N, T o S; (b) una región CDR2 de SEQ ID NO: 10, en la que M50 es I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V; y (c) una región CDR3 de SEQ ID NO: 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; y en la que Y110 es Y, K, S, R o T; en la que el anticuerpo se une a NGF.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende: (a) una región CDR1 de SEQ ID NO: 12, en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q; (b) una región CDR2 de SEQ ID NO: 13, en la que 151 es I, T, V o A; y S56 es S o T; y (c) una región CDR3 de SEQ ID NO: 14, en la que K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R; en la que el anticuerpo se une a NGF.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende (a) una región variable de cadena pesada que comprende: (i) una región CDR1 de SEQ ID NO: 9, en la que I34 está sustituido con S, L, V A o I; y N35 está sustituido con N, T o S; (ii) una región CDR2 de SEQ ID NO: 10, en la que M50 es I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V; y (iii) una región CDR3 de SEQ ID NO: 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la

que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; en la que Y110 es Y, K, S, R o T; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende: (i) una región CDR1 de SEQ ID NO: 12, en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q; (ii) una región CDR2 de SEQ ID NO: 13, en la que I51 es I, T, V o A; y S56 es S o T; y (iii) una región CDR3 de SEQ ID NO: 14, en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R; en la que el anticuerpo se une a NGF.

A menos que se indique lo contrario, la elección (por ejemplo, la sustitución) de un aminoácido en una ubicación se selecciona independientemente de la selección de un aminoácido en cualquier otra ubicación.

En algunas realizaciones, los anticuerpos comprenden cualquiera de las configuraciones de CDR (incluyendo combinaciones, variaciones, etc.) descritas en el presente documento.

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

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una secuencia de CDR3) seleccionada de SEQ ID NO: 46 o 50. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende además una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 y 8. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende además una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDR, tal como una región CDRH1 y/o CDRH2) seleccionada de (a) SEQ ID NO: 28 y/o 29; (b) SEQ ID NO: 30 y/o 31; (c) SEQ ID NO: 32 y/o 33; (d) SEQ ID NO: 34 y/o 35; (e) SEQ ID NO: 36 y/o 37; (f) SEQ ID NO: 38 y/o 39; y (g) SEQ ID NO: 40 y 41. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDRH1) seleccionada de SEQ ID NO: 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDRH2) seleccionada de SEQ ID NO: 29, 31, 33, 35, 37, 39 y 41. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende además una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 y 8. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende además una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDR, tal como una región CDRL1 y/o CDRL2) seleccionada de (a) SEQ ID NO: 18 y/o 19; (b) SEQ ID NO: 20 y/o 21; y (c) SEQ ID NO: 22 y/o 23. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDRL1) seleccionada de SEQ ID NO: 18, 20 y 22. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDRL2) seleccionada de SEQ ID NO: 19, 21 y 23. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende además una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende además una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDR, tal como una región CDRL3 y/o CDRH3) seleccionada de (a) SEQ ID NO: 51 y/o 52; (b) SEQ ID NO: 55 y/o 56; (c) SEQ ID NO: 57 y/o 58; (c) SEQ ID NO: 59 y/o 60; (d) SEQ ID NO: 61 y/o 62; (e) SEQ ID NO: 63 y/o 64. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDRL3) seleccionada de SEQ ID NO: 51, 55, 57, 59, 61 y 63. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDRH3) seleccionada de SEQ ID NO: 52, 56, 58, 60, 62 y 64. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende además una secuencia de aminoácidos que se muestra en una o más de SEQ ID NO: 18, 19, 30 y 31. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende además una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 y 8. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende además una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.

En otro aspecto, el anticuerpo puede comprender:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende:

(i) una región CDR1 de SEQ ID NO: 30;
(ii) una región CDR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 31;
(iii) una región CDR3 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, 56, 58, 60, 62 y 64; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende:

(i) una región CDR1 de SEQ ID NO: 18;
(ii) una región CDR2 de SEQ ID NO: 19;
(iii) una región CDR3 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, 55, 57, 59, 61 y 63.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una o más de una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDR) que se muestra en SEQ ID NO: 61, 63, 18, 19, 30 y 31.

En otro aspecto, el anticuerpo se puede seleccionar de un anticuerpo anti-NGF conocido en la técnica, tal como anticuerpos descritos en el documento WO2005019266 (que incluyen anticuerpos 4D4, 14D10, 6G9, 7H2, 14F11 y 4G6), el documento WO2006131951 (que incluye el anticuerpo Hu-αD11) o el documento WO09023540 o el documento US20090041717. El anticuerpo puede competir y/o competir de forma cruzada por la unión al NGF, y/o la unión al mismo epítopo en NGF, en particular, en el NGF humano, como un anticuerpo anti-NGF conocido en la técnica, tal como los anticuerpos descritos en el documento WO2005019266 (que incluye los anticuerpos 4D4, 14D10, 6G9, 7H2, 14F11 y 4G6), el documento WO2006131951 (que incluye el anticuerpo Hu-αD1 1) o el documento WO09023540 o el documento US20090041717, o un anticuerpo definido en el presente documento.

En algunas realizaciones, la lisina C-terminal de la cadena pesada de cualquiera de los anticuerpos anti-NGF descritos en el presente documento se escinde. En diversos casos, las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos anti-NGF pueden incluir opcionalmente una secuencia señal.

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

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

En algunas realizaciones, los anticuerpos anteriores se aíslan. En algunas realizaciones, el anticuerpo está esencialmente purificado. En otras realizaciones más, el anticuerpo es madurado por afinidad. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende secuencias de la región marco conservada humana. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende uno o más restos de región marco conservada no humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a NGF (tal como a NGF humano) con una K_D de 2 nM o inferior. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una o más (tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) sustituciones de aminoácidos humanos en relación con una secuencia de aminoácidos no humana (tal como una secuencia de región variable), tal como una secuencia de CDR, tal como una secuencia de región marco conservada). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende al menos 1, al menos 2 o más, tal como al menos 3, 4, 5, 6 o más sustituciones de aminoácidos en relación con una secuencia de aminoácidos del polipéptido precursor (tal como una secuencia de aminoácidos de anticuerpo 911, tal como una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 9-14). En algunas realizaciones, la afinidad de unión del anticuerpo ha sido modificada (en algunas realizaciones, aumentada) con respecto a una afinidad del anticuerpo precursor (tal como el anticuerpo monoclonal 911). En otras realizaciones más, la afinidad de unión del anticuerpo es inferior a la afinidad de unión del receptor trkA por NGF (tal como NGF humano). En algunas

realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos humanos. En otras realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos humanizados. En otras realizaciones más, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de afinidad madurada.

La invención utiliza polinucleótidos (incluyendo polinucleótidos aislados) que comprenden polinucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos de las realizaciones anteriores.

En otro aspecto, la invención utiliza un polinucleótido aislado que comprende un polinucleótido que codifica un fragmento o una región del anticuerpo E3 (denominado indistintamente "E3" en el presente documento). En una realización, el fragmento es una cadena ligera del anticuerpo E3 como se muestra en la Figura 1B del documento WO2004/058184. En otra realización, el fragmento es una cadena pesada del anticuerpo E3 como se muestra en la Figura 1A del documento WO2004/058184. En otra realización más, el fragmento contiene una o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo E3. En otra realización más, el fragmento contiene una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo E3 como se muestra en las Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184.

En otro aspecto, la invención utiliza un polinucleótido aislado que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo E3. En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende cualquiera o ambos de los polinucleótidos mostrados en las Figuras 2 y 3 del documento WO2004/058184.

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

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

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

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

Otro aspecto de la invención proporciona el uso de un anticuerpo antagonista anti-NGF en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del dolor asociado con la prostatitis crónica/el síndrome de dolor pélvico crónico en un sujeto. El anticuerpo antagonista anti-NGF puede ser como el descrito en el presente documento.

En otro aspecto, la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista anti-NGF y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento del dolor asociado con la prostatitis crónica/el síndrome de dolor pélvico crónico.

En otro aspecto, la invención proporciona kits y composiciones que comprenden una cualquiera o más de las composiciones descritas en el presente documento. Estos kits, en general, en un embalaje adecuado y provisto de las instrucciones apropiadas, son útiles para cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

La invención también proporciona cualquiera de las composiciones y de los kits descritos para cualquier uso descrito en el presente documento, ya sea en el contexto del uso como medicamento y/o del uso para la fabricación de un medicamento.

Las características preferidas de cada aspecto de la invención se aplican igualmente a cada uno del resto de aspectos cambiando lo que corresponda.

Descripción detallada de la invención

La invención desvelada en el presente documento proporciona usos médicos para el tratamiento del dolor asociado con la prostatitis crónica/el síndrome de dolor pélvico crónico en un individuo mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antagonista anti-NGF.

La invención desvelada en el presente documento también proporciona un anticuerpo antagonista anti-NGF para su uso en el tratamiento del dolor asociado con la prostatitis crónica/el síndrome del dolor pélvico crónico. Se proporciona además el uso de un anticuerpo antagonista anti-NGF en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del dolor asociado con la prostatitis crónica/el síndrome del dolor pélvico crónico.

La invención desvelada en el presente documento proporciona el uso de anticuerpos antagonistas anti-NGF que se unen a NGF (tales como NGF humano) con alta afinidad. En algunas realizaciones, la invención utiliza un anticuerpo humanizado, E3, que se une a NGF. La invención también utiliza polipéptidos E3 (incluyendo anticuerpos) que se unen a NGF, y polinucleótidos que codifican el anticuerpo y/o polipéptido E3. La invención proporciona además el uso de anticuerpos y polipéptidos derivados de E3 que se unen a NGF.

Técnicas generales

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro del alcance de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook y col., 1989) Cold Spring Harbor Press; "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Methods in Molecular Biology", Humana Press; "Cell Biology: A Laboratory Notebook" (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987); "Introduction to Cell and Tissue Culture" (J. P. Mather y P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; "Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures" (A. Doyle, J. B. Griffiths, y D. G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Handbook of Experimental Immunology" (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds.); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J. M. Miller y M. P. Calos, eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel y col., eds., 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis y col., eds., 1994); "Current Protocols in Immunology" (J. E. Coligan y col., eds., 1991); "Short Protocols in Molecular Biology" (Wiley and Sons, 1999); "Immunobiology" (C. A. Janeway y P. Travers, 1997); "Antibodies" (P. Finch, 1997); "Antibodies: a practical approach" (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); "Monoclonal antibodies: a practical approach" (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); "Using antibodies: a laboratory manual" (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); "The Antibodies" (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y "Cancer: Principles and Practice of Oncology" (V. T. DeVita y col., eds., J. B. Lippincott Company, 1993).

Definiciones

Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse de forma específica a una diana, tal como un hidrato de carbono, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento del antígeno, ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, el término engloba anticuerpos no solo policlonales o monoclonales intactos, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, dAb), anticuerpos monocatenarios (ScFv), los mutantes de los mismos, anticuerpos quiméricos, diacuerpos, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM (o subclase de los mismos), y el anticuerpo no necesita ser de una clase en particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de anticuerpo del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Se conocen bien las estructuras de las subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas.

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

Una "región constante" de un anticuerpo se refiere a la región constante de la cadena ligera del anticuerpo o a la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, ya sea solo o en combinación.

"Fv" es un fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y unión al antígeno completo. En una especie Fv de dos cadenas, esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena ligera y uno de cadena pesada estrechamente asociados, no covalentemente. En una especie Fv monocatenario, un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera puede unirse covalentemente por un engarce peptídico flexible de modo que las cadenas ligera y pesada pueden asociarse en una estructura dimérica análoga a la de una especie Fv bicatenaria. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir una especificidad de unión al antígeno en la superficie del dímero de VH-VL. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente 3 CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque, en general, a una afinidad inferior que el sitio de unión.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos cuantos restos en el extremo carboxi del dominio CH1 de cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de las regiones bisagra del anticuerpo. Un fragmento F(ab)2 es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente de disulfuro en la región bisagra.

Un anticuerpo monocatenario (scFc) es un anticuerpo en el que las regiones VL y VH se emparejan para formar una molécula monovalente mediante un engarce sintético que les permite fabricarse como una sola cadena de proteína (Bird y col *Science*, 242: 423-426 (1988) y Huston y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU., 85:5879-5883 (1988)).

Los diacuerpos son bivalentes, anticuerpos biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero usando un engarce que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de este modo los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión al antígeno.

Un anticuerpo puede tener uno o más sitios de unión. Si hay más de un sitio de unión, los sitios de unión pueden ser idénticos entre sí o pueden ser diferentes. Por ejemplo, una inmunoglobulina de origen natural tiene dos sitios de unión idénticos, un anticuerpo monocatenario o fragmento Fab tiene un sitio de unión, mientras que un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" (diacuerpo) tiene dos sitios de unión diferentes.

Un "anticuerpo aislado" es un anticuerpo que (1) no está asociado con componentes asociados de forma natural, incluyendo otros anticuerpos asociados de forma natural, que lo acompañan en su estado nativo; (2) está libre de otras proteínas de la misma especie; (3) es expresado por una célula de una especie diferente; o (4) no ocurre en la naturaleza.

Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de anticuerpos homogénea en la que el anticuerpo monoclonal se compone de aminoácidos (de origen natural y no de origen natural) que participan en la unión selectiva de un antígeno. Una población de anticuerpos monoclonales es altamente específica, estando dirigida contra un solo sitio antigénico. El término "anticuerpo monoclonal" engloba no solo anticuerpos monoclonales intactos y anticuerpos monoclonales de longitud completa, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')2, Fv), fragmentos monocatenarios (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno de la especificidad requerida y la capacidad de unión a un antígeno. No se pretende establecer ninguna limitación en cuanto a la fuente del anticuerpo o la manera en la que se genera (por ejemplo, por hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, animales transgénicos, etc.).

Como se usa en el presente documento, "anticuerpo humano" significa un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha generado usando cualquiera de las técnicas de generación de anticuerpos humanos conocida en la técnica o desvelada en el presente documento. La presente definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido humano de cadena pesada o al menos un polipéptido humano de cadena ligera. Un ejemplo es un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena ligera murina y de cadena pesada humana. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona de una genoteca de fagos, donde esa genoteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan y col., 1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets y col., 1998, PNAS, (EE.UU.) 95:6157-6162; Hoogenboom y Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381; Marks y col., 1991*, J. Mol. Biol.*, 222:581). Los anticuerpos humanos también se pueden generar mediante la introducción de locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. Este enfoque se describe en las patentes de EE.UU. n.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016. Como alternativa, el anticuerpo humano se puede preparar inmortalizando linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (dichos linfocitos B pueden recuperarse de un individuo o pueden haber sido inmunizados *in vitro*). Véase, por ejemplo, Cole y col., “Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy”, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner y col., 1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95; y la patente de EE.UU. n.º 5.750.373.

En el presente documento, anticuerpo "humanizado" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')2 u otras subsecuencias de unión al antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. Preferentemente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como de ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y actividad biológica deseadas. En algunos casos, se reemplazan restos de la región marco conservada (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana por los correspondientes restos no humanos. Además, el anticuerpo humanizado puede comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o secuencias marco conservadas, sino que se incluyen para perfeccionar y optimizar el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá esencialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o esencialmente todas las regiones CDR corresponden a una inmunoglobulina no humana y la totalidad o esencialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina o dominio (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Se prefieren los anticuerpos que tienen regiones Fc modificadas como se describe en el documento WO 99/58572. Otras formas de anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2 o CDR H3) que están modificadas con respecto al anticuerpo original, que también se denominan una o más CDR "derivadas de" una o más CDR de anticuerpo original.

Hay cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estas son: (1) determinar la secuencia de nucleótidos y la secuencia predicha de aminoácidos de los dominios variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo de partida; (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región marco conservada del anticuerpo usar durante el procedimiento de humanización; (3) metodologías/técnicas de humanización reales; y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; 6.331.415; 5.530.101; 5.693.761; 5.693.762; 5.585.089; y 6.180.370.

Se han descrito varias moléculas de anticuerpo "humanizadas" que comprenden un sitio de unión al antígeno derivado de una inmunoglobulina no humana, que incluyen anticuerpos quiméricos que tienen regiones V de roedor o modificadas y sus CDR asociadas fusionadas a dominios constantes humanos. Véase, por ejemplo, Winter y col. *Nature* 349:293-299 (1991), Lobuglio y col. *Proc. Nat. Acad. Sci.* EE.UU. 86:4220-4224 (1989), Shaw y col. *J Immunol*. 138:4534-4538 (1987), y Brown y col. *Cancer Res*. 47:3577-3583 (1987). Otras referencias describen CDR de roedor injertadas en una región marco conservada (FR) de soporte humano antes de la fusión con un dominio constante de anticuerpo humano apropiado. Véase, por ejemplo, Riechmann y col. *Nature* 332:323-327 (1988), Verhoeyen y col. *Science* 239:1534-1536 (1988), y Jones y col. *Nature* 321:522-525 (1986). Otra referencia describe CDR de roedor soportadas por regiones marco conservadas de roedor modificadas de manera recombinante. Véase, por ejemplo, la publicación de patente Europea n.º 0519596. Estas moléculas "humanizadas" están diseñadas para minimizar la respuesta inmunológica no deseada hacia moléculas de anticuerpo antihumano de roedor, lo que limita la duración y la efectividad de las aplicaciones terapéuticas de esas fracciones en receptores humanos. Por ejemplo, la región constante del anticuerpo puede diseñarse de manera que sea inmunológicamente inerte (por ejemplo, no provoca la lisis del complemento). Véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º: WO99/58572. Otros procedimientos de humanización de anticuerpos que también se pueden utilizar son los desvelados por Daugherty y col., *Nucl. Acids Res*. 19:2471-2476 (1991) y en las patentes de EE.UU. n.º 6.180.377; 6.054.297; 5.997.867; 5.866.692; 6.210.671; y 6.350.861; y en la publicación PCT n.º WO 01/27160.

"Anticuerpos quiméricos" se refiere a aquellos anticuerpos en los que una parte de cada una de las secuencias de aminoácidos de cadenas pesada y ligera es homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie en particular o que pertenecen a una clase en particular correspondiente, mientras que el segmento restante de las cadenas es homólogo a las correspondientes secuencias en otro. Por lo general, en estos anticuerpos quiméricos, la región variable de cadenas ligera y pesada imita las regiones variables de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos, mientras que las partes constantes son homólogas a las secuencias de anticuerpos derivados de otra. Una ventaja clara de dichas formas quiméricas es que, por ejemplo, las regiones variables pueden ser derivadas convenientemente de fuentes conocidas en la actualidad, usando hibridomas disponibles o linfocitos B de organismos huésped no humanos en combinación con regiones constantes derivadas de, por ejemplo, preparados de células humanas. Aunque la región variable tiene la ventaja de la facilidad de preparación, y la especificidad no se ve afectada por su fuente, siendo la región constante humana, es menos probable que genere una respuesta inmunitaria de un sujeto humano, cuando los anticuerpos se inyectan, en comparación con la región constante de una fuente no humana. Sin embargo, la definición no se limita a este ejemplo en particular.

Una "región Fc funcional" posee al menos una función efectora de una región de secuencia nativa Fc. Los ejemplos de "funciones efectoras" incluyen unión C1q: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR), etc. En general, dichas funciones efectoras requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y pueden evaluarse usando diversos ensayos conocidos en la técnica para la evaluación de dichas

funciones efectoras de anticuerpos.

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

Como se usa en el presente documento, "citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo" y "ADCC" se refiere a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, células linfocíticas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y, posteriormente, causan la lisis de la célula diana. La actividad ADCC de una molécula de interés se puede evaluar usando un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la patente de EE.UU. n.º 5.500.362 o 5.521.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos NK. Como alternativa o además, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes y col., 1998, PNAS (EE.UU.), 95:652-656.

Como se usa en el presente documento, "receptor Fc" y "FcR" describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es una secuencia nativa de FcR humano. Por otra parte, un FcR preferido es aquel que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma), e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y, como alternativa, formas de corte y empalme de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de las mismas. Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, 1991, *Ann. Rev. Immunol.*, 9:457-92; Capel y col., 1994, *Immunomethods*, 4:25-34; y de Haas y col., 1995, *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41. "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas hacia el feto (Guyer y col., 1976, *J. Immunol.*, 117:587; y Kim y col., 1994, *J. Immunol.*, 24:249).

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

Como se usa en el presente documento, los términos "E3", “3E” y "anticuerpo E3" se usan indistintamente para referirse a un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera mostradas en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 (Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184), respectivamente. Las partes de CDR del anticuerpo E3 (que incluyen las CDR de Chothia y Kabat) se representan esquemáticamente en las Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184. Las Figuras 2 y 3 del documento WO2004/058184 muestran polinucleótidos que codifican cadenas pesadas y ligeras, respectivamente, que comprenden las regiones variables de cadena pesada y ligera mostradas en las Figuras 1A y 1B, respectivamente. La generación y caracterización de E3 se describe en los ejemplos del documento WO2004/058184, cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento por referencia. Las diferentes funciones biológicas están asociadas con E3, incluyendo, pero sin limitación, la capacidad de unirse a NGF e inhibir la actividad biológica de NGF y/o la/s vía/s de cadena abajo mediadas por la señalización de NGF; y la capacidad para inhibir la supervivencia dependiente de NGF de las neuronas trigeminales E13.5 de ratón. Como se trata en el presente documento, los anticuerpos para su uso en la invención pueden tener una cualquiera o más de estas características. En algunas realizaciones, el término "E3" se refiere a inmunoglobulina codificada por (a) un polinucleótido que codifica la cadena ligera de E3 que tiene un número de depósito de ATCC n.º PTA-4893 o ATCC n.º PTA-4894; y (b) un polinucleótido que codifica la cadena pesada de E3 que tiene un número de depósito de ATCC n.º: PTA-4895.

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

El término "competir", como se usa en el presente documento con respecto a un anticuerpo, significa que un primer anticuerpo, o una parte de unión al antígeno del mismo, se une a un epítopo de una manera suficientemente similar a la unión de un segundo anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, de modo que el resultado de la

unión del primer anticuerpo con su epítopo afín disminuye de forma detectable en presencia del segundo anticuerpo en comparación con la unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. La alternativa, donde la unión del segundo anticuerpo a su epítopo también se puede disminuir de forma detectable en presencia del primer anticuerpo, puede ser, pero no es necesario que sea el caso. Es decir, un primer anticuerpo puede inhibir la unión de un segundo anticuerpo a su epítopo sin que ese segundo anticuerpo inhiba la unión del primer anticuerpo a su respectivo epítopo. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe de forma detectable la unión del otro anticuerpo con su epítopo o ligando afín, ya sea al mismo, mayor o menor grado, se dice que los anticuerpos "compiten de forma cruzada" entre sí por la unión de su/s respectivo/s epítopo/s. Tanto los anticuerpos competidores como los que compiten de forma cruzada están englobados por la presente invención. Independientemente del mecanismo mediante el que se produce dicha competencia o competencia cruzada (por ejemplo, impedimento estérico, cambio conformacional o unión a un epítopo común, o una porción del mismo), el experto en la materia apreciaría, basándose en las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, que tales competidores y/o se engloban anticuerpos de competencia cruzada y pueden ser útiles para los procedimientos desvelados en el presente documento.

Un epítopo que "se une específicamente" o "se une preferentemente" (usado indistintamente en el presente documento) a un anticuerpo o un polipéptido es una expresión muy conocida en la técnica, y los procedimientos para determinar dicha unión específica o preferencial también se conocen bien en la técnica. Una molécula se dice que presenta "unión específica" o "unión preferencial" si reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una determinada célula o sustancia de lo que lo hace con células o sustancias alternativas. Un anticuerpo "se une específicamente" o "se une preferentemente" a una diana si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con mayor duración de lo que se une a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específica o preferentemente a un epítopo de NGF es un anticuerpo que se une a su epítopo con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración de lo que se une con otros epítopos de NGF o epítopos no de NGF. También se entiende por la lectura de dicha definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o una fracción o un epítopo) que se une específica o preferentemente a una primera diana puede unirse o puede no unirse específica o preferentemente a una segunda diana. Como tal, "unión específica" o "unión preferencial" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) la unión exclusiva. En general, pero no necesariamente, la referencia a unión significa unión preferencial.

Hay muchos procedimientos conocidos en la técnica para cartografiar y caracterizar la ubicación de epítopos en proteínas, que incluyen resolver la estructura cristalina de un complejo de anticuerpo-antígeno, ensayos de competencia, ensayos de expresión de fragmentos de genes y ensayos basados en péptidos sintéticos, como se describe, para ejemplo, en el Capítulo 11 de of Harlow y Lane, “Using Antibodies, a Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1999. En un ejemplo adicional, se puede usar la cartografía de epítopos para determinar la secuencia a la que se une un anticuerpo. La cartografía de epítopos se encuentra disponible en el mercado de diversas fuentes, por ejemplo, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, Países Bajos). El epítopo puede ser un epítopo lineal, es decir, contenido en un único tramo de aminoácidos, o un epítopo conformacional formado por una interacción tridimensional de aminoácidos que puede no estar necesariamente contenido en un único tramo. Los péptidos de longitudes variables (por ejemplo, al menos 4-6 aminoácidos de longitud) pueden aislarse o sintetizarse (por ejemplo, de forma recombinante) y usarse para ensayos de unión con un anticuerpo. En otro ejemplo, el epítopo al que se une un anticuerpo se puede determinar en una detección sistémica usando péptidos solapantes derivados de la secuencia de antígeno del anticuerpo y determinando la unión por el anticuerpo. De acuerdo con los ensayos de expresión de fragmentos génicos, el marco de lectura abierto que codifica el antígeno se fragmenta de forma aleatoria o mediante construcciones genéticas específicas, y se determina la reactividad de los fragmentos expresados del antígeno con el anticuerpo que se va a ensayar. Los fragmentos de genes pueden, por ejemplo, producirse por PCR, y luego transcribirse y traducirse en proteína *in vitro*, en presencia de aminoácidos radiactivos. La unión del anticuerpo a los fragmentos marcados radiactivamente se determina luego por inmunoprecipitación y electroforesis en gel. Ciertos epítopos también se pueden identificar usando grandes genotecas de secuencias de péptidos aleatorias que se presentan en la superficie de partículas de fagos (genotecas de fagos). Como alternativa, se puede analizar una genoteca definida de fragmentos peptídicos solapantes para determinar la unión al anticuerpo de ensayo en ensayos de unión simple. En un ejemplo adicional, se pueden realizar la mutagénesis de un dominio de unión al antígeno, los experimentos de intercambio de dominio y la mutagénesis de barrido de alanina para identificar los restos requeridos, suficientes y/o necesarios para la unión del epítopo. Por ejemplo, los experimentos de intercambio de dominio pueden realizarse usando un antígeno mutante en el que se han reemplazado (intercambiado) varios fragmentos del polipéptido antigénico con secuencias de una diana de otra especie, o una proteína estrechamente relacionada, pero antigénicamente distinta. Evaluando la unión del anticuerpo al antígeno mutante, se puede evaluar la importancia del fragmento en particular para la unión del anticuerpo. Otro procedimiento más que se puede usar para caracterizar la unión de anticuerpos es usar ensayos de competición con otros anticuerpos que se sepa que se unen al mismo antígeno, para determinar si el anticuerpo se une al mismo epítopo que otros anticuerpos. Los ensayos de competencia son bien conocidos por los expertos en la materia.

Los términos "polipéptido", "oligopéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede ser interrumpido por no aminoácidos. Los términos también

engloban un polímero de aminoácidos que ha sido modificado de forma natural o mediante intervención; por ejemplo, formación de enlaces de disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que, debido a que los polipéptidos de la presente invención se basan en un anticuerpo, los polipéptidos pueden darse como cadenas sencillas o cadenas asociadas.

"Polinucleótido", o "ácido nucleico", como se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda incorporar en un polímero mediante ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación en la estructura de nucleótidos se puede conferir antes o después del montaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse además después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente de marcaje. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "caperuzas", sustitución de uno o más nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, cabamates, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellas que contienen fracciones colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, ply-L-lisina, etc.),aquellas con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellas que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellas que contienen alquilantes, aquellas con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos anoméricos alfa, etc.), así como formas no modificadas del/de los polinucleótido/s. Además, se puede reemplazar cualquiera de los grupos de hidroxilo normalmente presentes en los azúcares, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos protectores convencionales o activados para preparar enlaces adicionales para nucleótidos adicionales, o se pueden conjugar a soportes sólidos. El OH del extremo 5' y 3' puede ser fosforilado o sustituido con aminas o fracciones de grupos de caperuza orgánicos de entre 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también se pueden derivatizar a grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que se conocen en general en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'—O-metil-, 2'-O-alilo, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclicos, azúcares α-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como metil ribósido. Se pueden reemplazar uno o más enlaces de fosfodiéster por grupos de engarce alternativos. Estos grupos de engarce alternativos incluyen, pero sin limitación, realizaciones en las que el fosfato se reemplazado por P(O)S ("tioato"), P(S)S ('ditioato")," (O)NR_2 ("amidato") , P(O)R, P(O)OR', CO o CH_2 ("formacetal"), en los que cada R o R' es independientemente H, o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No es necesario que todos los enlaces de un polinucleótido sean idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos mencionados en el presente documento, incluyendo ARN y ADN.

Como se usa en el presente documento, la expresión "factor de crecimiento nervioso" y "NGF" se refieren al factor de crecimiento nervioso y a sus variantes que conservan al menos parte de la actividad biológica del NGF. Como se usa en el presente documento, NGF incluye todas las especies de mamíferos de NGF de secuencia nativa, incluyendo humana, canina, felina, equina o bovina.

"Receptor de NGF" se refiere a un polipéptido que está unido o activado por NGF. Los receptores de NGF incluyen el receptor TrkA y el receptor p75 de cualquier especie de mamífero, que incluye, pero sin limitación, humana, canina, felina, equina, de primate o bovina. Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo antagonista anti-NGF" (denominado indistintamente "anticuerpo anti-NGF") se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a NGF e inhibir la actividad biológica de NGF y/o vía/s cadena abajo mediadas por la señalización de NGF. Un anticuerpo antagonista anti-NGF engloba anticuerpos que bloquean, antagonizan, suprimen o reducen (incluyendo significativamente) la actividad biológica de NGF, incluyendo las vías cadena abajo mediadas por la señalización de NGF, tales como unión al receptor y/o la generación de una respuesta celular hacia el NGF. Para el fin de la presente invención, se entenderá explícitamente que la expresión "anticuerpo antagonista anti-NGF" engloba todos los términos, títulos y estados funcionales y características previamente identificados mediante los que el propio NGF, una actividad biológica de NGF o las consecuencias de la actividad biológica, se anulan, reducen o neutralizan esencialmente en cualquier grado significativo. En algunas realizaciones, un anticuerpo antagonista anti-NGF se une a NGF y previene la dimerización de NGF y/o la unión a un receptor de NGF (tal como p75 y/o trkA). En otras realizaciones, un anticuerpo anti-NGF se une a NGF y previene la dimerización del receptor trkA y/o la autofosforilación de trkA. En el presente documento, se proporcionan ejemplos de anticuerpos antagonistas anti-NGF.

La "actividad biológica" del NGF se refiere, en general, a la capacidad de unirse a los receptores de NGF y/o de activar las vías de señalización del receptor de NGF. Sin limitación, una actividad biológica incluye una cualquiera o más de las siguientes: la capacidad de unirse a un receptor de NGF (tal como p75 y/o trkA); la capacidad de potenciar la dimerización y/o autofosforilación del receptor trkA; la capacidad de activar una vía de señalización del receptor de NGF; la capacidad de potenciar la diferenciación, la proliferación, la supervivencia, el crecimiento

celulares y otros cambios en la fisiología celular, incluyendo (en el caso de las neuronas, incluidas las neuronas periféricas y centrales) el cambio en la morfología neuronal, sinaptogénesis, función sináptica, neurotransmisores y/o liberación de neuropéptidos, y regeneración después del daño; la capacidad de potenciar la supervivencia de las neuronas trigeminales E13.5 de ratón; y la capacidad de mediar el dolor y/o los síntomas del tracto urinario inferior asociados con la prostatitis crónica y/o el síndrome de dolor pélvico crónico.

Como se usa en el presente documento, "esencialmente puro" se refiere a material que es al menos un 50 %puro (es decir, libre de contaminantes), más preferentemente al menos un 90 %puro, más preferentemente al menos un 95 %puro, más preferentemente al menos un 98 %puro, más preferentemente al menos un 99 %puro.

Una "célula huésped" incluye una célula individual o un cultivo celular que puede ser o ha sido un receptor para el/los vector/es para la incorporación de inserciones de polinucleótidos. Las células huésped incluyen la progenie de una sola célula huésped, y la progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN genómico) a la célula precursora original debido a la mutación natural, accidental o deliberada. Una célula huésped incluye células transfectadas *in vivo* con uno o varios polinucleótidos de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los fines de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: mejora o alivio de cualquier aspecto de dolor inflamatorio y/o un síntoma del tracto urinario inferior asociado con la prostatitis crónica y/o el síndrome de dolor pélvico crónico. Para los fines de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: incluyendo la disminución de la gravedad, alivio del dolor y/o un síntoma del tracto urinario inferior asociado con la prostatitis crónica y/o el síndrome de dolor pélvico crónico, incluyendo cualquier aspecto del dolor (tal como el acortamiento de la duración del dolor, la reducción de la sensibilidad o sensación de dolor).

Una "cantidad eficaz" de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos tales como el alivio o la reducción de la sensación de dolor. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones. Para los fines de la presente invención, una cantidad eficaz de fármaco, de un compuesto o de una composición farmacéutica es una cantidad suficiente para tratar, mejorar, reducir la intensidad de y/o prevenir el dolor o un síntoma del tracto urinario inferior asociado con la prostatitis crónica y/o el síndrome de dolor pélvico crónico. En algunas realizaciones, la "cantidad eficaz" puede reducir el dolor en reposo (dolor en reposo) o el dolor inducido mecánicamente (incluyendo el dolor después del movimiento), o ambos, y puede administrarse antes, durante o después del estímulo doloroso. Como se entiende en el contexto clínico, una cantidad eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede o no lograrse junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por lo tanto, se puede considerar una "cantidad eficaz" en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos, y se puede considerar la administración de un solo agente en una cantidad eficaz si, junto con uno o más agentes adicionales, se puede lograr o se logra un resultado deseable.

"Reducir la incidencia" del dolor y/o de un síntoma del tracto urinario inferior asociado con la prostatitis crónica y/o el síndrome de dolor pélvico crónico significa reducir la gravedad (lo que puede incluir la reducción de la necesidad y/o la cantidad de (por ejemplo, la exposición a) otros fármacos y/o terapias usadas en general para estas afecciones, incluyendo, por ejemplo, opiáceos), duración y/o frecuencia (incluyendo, por ejemplo, retrasar o aumentar el dolor en el tiempo en un individuo). Como entenderán los expertos en la materia, los individuos pueden variar en términos de su respuesta al tratamiento y, como tales, por ejemplo, un "procedimiento de reducción de la incidencia del dolor y/o de un síntoma del tracto urinario inferior asociado con la prostatitis crónica y/o el síndrome de dolor pélvico crónico en un individuo" refleja la administración del anticuerpo antagonista anti-NGF basado en una expectativa razonable de que dicha administración puede causar dicha reducción en la incidencia en ese individuo en particular.

"Aliviar" un dolor y/o un síntoma del tracto urinario inferior asociado con la prostatitis crónica y/o el síndrome del dolor pélvico crónico significa una disminución o mejoría de uno o más síntomas de dolor y/o un síntoma del tracto urinario inferior asociado con la prostatitis crónica y/o el síndrome del dolor pélvico crónico en comparación con la no administración de un anticuerpo antagonista anti-NGF. "Aliviar" también incluye el acortamiento o la reducción de la duración de un síntoma.

“Paliar” el dolor y/o un síntoma del tracto urinario inferior asociado con la prostatitis crónica y/o el síndrome del dolor pélvico crónico significa disminuir la extensión de una o más manifestaciones clínicas no deseadas de dolor y/o síntomas del tracto urinario inferior en un individuo o en una población de individuos.

Como se usa en el presente documento, "retrasar" el desarrollo del dolor significa diferir, entorpecer, retardar, estabilizar y/o posponer la progresión del dolor y/o de un síntoma del tracto urinario inferior asociado con la prostatitis crónica y/o el síndrome del dolor pélvico crónico. Este retraso puede ser de diferentes períodos de tiempo, dependiendo de la historia de la enfermedad y/o de los individuos que se estén tratando. Como es evidente para un experto en la materia, un retraso suficiente o significativo puede, en efecto, englobar la prevención, en el sentido de que el individuo no desarrolle dolor. Un procedimiento que "retrasa" el desarrollo del síntoma es un procedimiento que reduzca la probabilidad de desarrollar el síntoma en un marco de tiempo determinado y/o reduce la extensión de

los síntomas en un marco de tiempo dado, en comparación con no usar el procedimiento. Dichas comparaciones normalmente se basan en estudios clínicos, usando un número estadísticamente significativo de sujetos.

"Dolor", como se usa en el presente documento, se refiere a dolor de cualquier etiología, incluyendo dolor agudo y crónico, y cualquier dolor con un componente inflamatorio. Como se usa en el presente documento, "dolor" incluye nocicepción y la sensación de dolor, y el dolor puede evaluarse objetiva y subjetivamente, usando puntuaciones de dolor y otros procedimientos bien conocidos en la materia. El dolor puede ser dolor primario o secundario, como es bien conocido en la técnica.

El “dolor asociado con la prostatitis crónica y/o el síndrome de dolor pélvico crónico”, como se usa en el presente documento, se refiere a dolor abdominal inferior (pélvico); dolor de parte inferior del estómago; dolor de vejiga; dolor suprapúbico; dolor de pene, testículos, escroto y perineo; dolor uretral; dispareunia; dolor, presión o incomodidad que pueden aumentar a medida que la vejiga se llena; disuria; y dolor eyaculatorio.

"Síntomas del tracto urinario inferior asociados con la prostatitis crónica y/o el síndrome de dolor pélvico crónico", como se usa en el presente documento, se refiere a tres grupos de síntomas urinarios, que pueden definirse como síntomas de almacenamiento (irritativos), miccional (obstructivos) y posteriores a la micción. Los síntomas de almacenamiento comprenden urgencia, frecuencia, nocturia e incontinencia de urgencia. Los síntomas miccionales comprenden vacilación, flujo deficiente, intermitencia, esfuerzo y disuria. Los síntomas posteriores a la micción comprenden goteo terminal, goteo post-vacío y una sensación de vaciado incompleto.

Una "muestra biológica" engloba una variedad de tipos de muestra obtenidos de un individuo y puede usarse en un ensayo de diagnóstico o de control. La definición engloba sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido tales como una muestra de biopsia, o cultivos de tejido o células derivadas de la misma, y la progenie de la misma. La definición también incluye muestras que han sido manipuladas de alguna manera después de su obtención, tal como mediante el tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento para ciertos componentes, tal como proteínas o polinucleótidos, o la incrustación en una matriz semisólida o sólida con el fin de seccionar. La expresión "muestra biológica" engloba una muestra clínica y también incluye células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, fluido biológico y muestras de tejidos.

Un "individuo" o "sujeto" es un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales de granja (tales como vacas), animales de deporte, animales domésticos (tales como gatos, perros y caballos), primates, ratones y ratas.

Como se usa en el presente documento, "vector" significa una construcción que es capaz de administrar y preferentemente de expresar uno o más gen/es o secuencia/s de interés en una célula huésped. Los ejemplos de vectores incluyen, pero sin limitación, vectores víricos, vectores de expresión de ADN desnudo o ARN, vectores de plásmido, cósmido o fago, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con los agentes catiónicos de condensación, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas y determinadas células eucariotas, tales como células productoras.

Como se usa en el presente documento, "secuencia de control de la expresión" significa una secuencia de ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Una secuencia de control de la expresión puede ser un promotor, tal como un promotor constitutivo o un promotor inducible, o un potenciador. La secuencia de control de la expresión está unida operativamente a la secuencia de ácido nucleico que se transcribe.

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier material que, cuando se combine con un principio activo, permite que el ingrediente conserve la actividad biológica y no sea reactivo con el sistema inmune del sujeto. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales tales como solución salina tamponada de fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión de aceite/agua, y diversos tipos de agentes humectantes. Los diluyentes preferidos para aerosol o administración parenteral son solución salina tamponada con fosfato o solución salina (0,9 %) normal. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se formulan mediante procedimientos convencionales bien conocidos (véase, por ejemplo, “Remington's Pharmaceutical Sciences”, 18ª edición, A. Gennaro, ed Remington, Mack Publishing Co. 20, Easton, PA, 1990; y Remington, “The Science and Practice of Pharmacy”, 20ª Ed. Mack Publishing, 2000).

El término "K_{off}", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación de un anticuerpo de la interacción entre anticuerpo y antígeno. El término "K_{on}", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la velocidad de asociación de una determinada interacción entre anticuerpo y antígeno. El término "K_D", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación de una interacción entre anticuerpo y antígeno, que se obtiene a partir de la proporción de K_{off} con respecto a K_{on}, y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K_D para anticuerpos se pueden determinar usando procedimientos bien establecidos en la técnica. Un procedimiento para determinar la K_D de un anticuerpo es mediante el uso de resonancia de plasmón superficial, normalmente usando un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®.

Procedimientos de uso de anticuerpo antagonista anti-NGF para tratar o prevenir el dolor y/o un síntoma del tracto urinario inferior asociado con la prostatitis crónica y/o el síndrome del dolor pélvico crónico

La invención proporciona procedimientos para el tratamiento o la prevención del dolor y/o de un síntoma del tracto urinario inferior asociado con la prostatitis crónica y/o el síndrome de dolor pélvico crónico en individuos que incluyen mamíferos, tanto humanos como no humanos. Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona procedimientos de tratamiento o de prevención del dolor y/o un síntoma del tracto urinario inferior asociado con la prostatitis crónica y/o el síndrome del dolor pélvico crónico en un individuo que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-NGF. Los anticuerpos antagonistas anti-NGF adecuados se describen en el presente documento.

En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos de reducción de la incidencia, de mejora, de supresión, de paliación y/o o de retraso del inicio, del desarrollo o de la progresión del dolor y/o de un síntoma del tracto urinario inferior asociado con la prostatitis crónica y/o síndrome del dolor pélvico crónico en un individuo. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF se administra antes del desarrollo del dolor y/o de un síntoma del tracto urinario inferior asociado con la prostatitis crónica y/o el síndrome del dolor pélvico crónico en un individuo que tiene prostatitis crónica y/o síndrome del dolor pélvico crónico.

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

En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF se administra una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada siete semanas, una vez cada ocho semanas, una vez cada nueve semanas, una vez cada diez semanas, una vez cada quince semanas, una vez cada veinte semanas, una vez cada veinticinco semanas o una vez cada veintiséis semanas. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF se administra una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada cuatro meses, una vez cada cinco meses o una vez cada seis meses.

El alivio del dolor o el alivio de los síntomas del tracto urinario inferior se puede caracterizar por el curso del tiempo del alivio. Por consiguiente, en algunas realizaciones, se observa un alivio en el transcurso de aproximadamente 24 horas después de la administración de un anticuerpo antagonista anti-NGF. En otras realizaciones, el alivio se observa en el transcurso de aproximadamente 36, 48, 60, 72 horas o 4 días después de la administración del anticuerpo antagonista anti-NGF. En algunas realizaciones, se disminuye la frecuencia y/o intensidad del dolor y/o el síntoma del tracto urinario inferior, y/o se aumenta la calidad de vida de los que padecen la enfermedad. En algunas realizaciones, se proporciona alivio del dolor durante al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 28 días, al menos aproximadamente 35 días, al menos aproximadamente 42 días, al menos aproximadamente 49 días, al menos aproximadamente 56 días, al menos aproximadamente 63 días, al menos aproximadamente 70 días, al menos aproximadamente 77 días, al menos aproximadamente 84 días, al menos aproximadamente 180 días o más tras una sola dosis del anticuerpo antagonista anti-NGF.

El alivio del dolor o el alivio de los síntomas del tracto urinario inferior se pueden caracterizar por un cambio en una Escala Numérica de Evaluación del Dolor (NRS) tal como un NRS de 11 puntos; un cambio en la puntuación del Índice de Síntomas de la Prostatitis Crónica (CPSI); cambios en las variables del diario sintomático incluyendo la frecuencia miccional, frecuencia nocturna, frecuencia del episodio de incontinencia, volumen medio vaciado por micción, gravedad media del dolor por prostatitis crónica, episodios de urgencia urinaria, puntuación media de alteración del sueño, puntuación del dolor medio asociado con la eyaculación; cambio en la evaluación de la respuesta global (GRA), cambio en el impacto del tratamiento informado por el paciente (PRTI), fallos en el tratamiento, biomarcadores, criterios de valoración de seguridad y/o medidas farmacocinéticas. Los criterios de valoración de la seguridad pueden incluir eventos adversos, exploración física (incluyendo los signos vitales y el examen neurológico), medición del volumen residual posterior al vaciado (PVR), análisis de laboratorio clínico (incluyendo el análisis de orina) y electrocardiogramas. Los biomarcadores pueden incluir NGF, interleucinas, TNF-alfa, ENA-78 (CXCL5), antígeno prostático específico (PSA), proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1) y proteína-1-alfa inflamatoria de macrófagos (MIP-1 α), hormonas adrenocorticales que incluyen, pero sin limitación, testosterona, androstenediona, 11-desoxicortisol y progesterona.

Los anticuerpos anti-NGF ilustrativos para su uso en los procedimientos de la invención (relacionados con el dolor y/o los síntomas del tracto urinario inferior asociados con la prostatitis crónica y/o el síndrome del dolor pélvico crónico) son anticuerpos antagonistas anti-NGF, que se refieren a cualquier anticuerpo que bloquee, suprima o reduzca (incluyendo significativamente) la actividad biológica de NGF, incluyendo las vías cadena abajo mediadas por la señalización de NGF, tales como la unión al receptor y/o la generación de una respuesta celular al NGF. El término "antagonista" no implica ningún mecanismo específico de acción biológica, y se considera que incluye expresamente y engloba todas las posibles interacciones farmacológicas, fisiológicas y bioquímicas con el NGF y sus consecuencias que pueden lograrse mediante una variedad de composiciones diferentes y químicamente divergentes. Para el fin de la presente invención, se entenderá explícitamente que el término "antagonista" engloba todos los términos, títulos, y estados funcionales y características previamente identificados mediante los que el

propio NGF, una actividad biológica de NGF (incluyendo, pero sin limitación, su capacidad para mediar en cualquier aspecto del dolor), o las consecuencias de la actividad biológica, son esencialmente anuladas, disminuidas o neutralizadas en cualquier grado significativo. En algunas realizaciones, un anticuerpo antagonista anti-NGF se une a (interactúa físicamente con) NGF, se una a un receptor de NGF (tal como el receptor p75 y/o el receptor trkA) y/o reduce (impide y/o bloquea) la señalización del receptor NGF cadena abajo. En alguna realización, el anticuerpo antagonista anti-NGF se une a NGF (tal como hNGF) y no se une significativamente a neurotrofinas relacionadas, tales como NT-3, NT4/5 y/o BDNF. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF no está asociado con una respuesta inmune adversa. En otras realizaciones más, el anticuerpo anti-NGF está humanizado (tal como el anticuerpo E3 descrito en el presente documento). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF es el anticuerpo E3 (como se describe en el presente documento). En otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF comprende una o más CDR de anticuerpo E3 (tal como uno, dos, tres, cuatro, cinco o, en algunas realizaciones, las seis CDR de E3). En otras realizaciones, el anticuerpo es humano. En otras realizaciones más, el anticuerpo anti-NGF comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada que se muestra en SEQ ID NO: 1 (Figura 1A del documento WO2004/058184) y/o la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera que se muestra en SEQ ID NO: 2 (Figura 1B del documento WO2004/058184). En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte, por ejemplo, que no desencadena la lisis mediada por complemento, o no estimula la citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC). En otras realizaciones, la región constante se modifica como se describe en *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624; PCT WO9958572. En otras realizaciones, el anticuerpo puede seleccionarse de un anticuerpo anti-NGF conocido en la técnica, tal como anticuerpos descritos en el documento WO2005019266 (incluyendo anticuerpos 4D4, 14D10, 6G9, 7H2, 14F11 y 4G6), el documento WO2006131951 (incluyendo el anticuerpo Hu-αD11), o los documentos WO09023540 o US20090041717.

Los anticuerpos para su uso en los procedimientos de la invención se caracterizan por cualquiera (una o más) de las siguientes características: (a) capacidad para unirse a NGF; (b) capacidad para reducir y/o inhibir la actividad biológica de NGF y/o la/s vía/s cadena abajo mediadas por la señalización de NGF; (c) capacidad para reducir y/o inhibir la supervivencia dependiente de NGF de las neuronas trigeminales E13.5 de ratón; (d) ausencia de reactividad cruzada significativa con NT3, NT4/5 y/o BDNF; (e) capacidad para tratar y/o prevenir el dolor y/o síntomas del tracto urinario inferior asociados con la prostatitis crónica y/o el síndrome del dolor pélvico crónico; (f) capacidad para aumentar la eliminación de NGF; (g) capacidad para reducir o inhibir la activación del receptor trkA, como se detecta, por ejemplo, usando el ensayo de activación del receptor de quinasa (KIRA) (véase la patente de EE.UU. n.º 6.027.927).

Para los fines de la presente invención, el anticuerpo puede reaccionar con NGF de una manera que inhiba NGF y/o las vías cadena abajo mediadas por la función de señalización de NGF. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF reconoce al NGF humano. En otras realización más, el anticuerpo antagonista anti-NGF se une específicamente a NGF humano. En alguna realización, el anticuerpo antagonista anti-NGF no se une significativamente a neurotrofinas relacionadas, tales como NT-3, NT4/5 y/o BDNF. En otras realizaciones más, el anticuerpo anti-NGF es capaz de unirse a NGF e inhibir eficazmente la unión de NGF a su receptor TrkA y/o p75 *in vivo* y/o inhibir eficazmente la activación por parte de NGF de su receptor TrkA y/o p75. En otras realizaciones más, el anticuerpo antagonista anti-NGF es un anticuerpo monoclonal. En otras realizaciones más, el anticuerpo anti-NGF está humanizado (tal como el anticuerpo E3 descrito en el presente documento). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF es humano. Véase, por ejemplo, el documento WO 2005/019266 que describe los anticuerpos 4D4, 14D10, 6G9, 7H2, 14F11 y 4G6. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano que reconoce uno o más epítopos en NGF humano. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de ratón o rata que reconoce uno o más epítopos en NGF humano. En otra realización, el anticuerpo reconoce uno o más epítopos en un NGF seleccionado del grupo que consiste en: primate, canino, felino, equino y bovino. En otras realizaciones más, el anticuerpo antagonista anti-NGF se une esencialmente al mismo epítopo de NGF que un anticuerpo seleccionado de uno o más de los siguientes: MAb 911, MAb 912 y MAb 938 (véase Hongo, y col., “Hybridoma” 19:215-227 (2000)); un anticuerpo como se define en el presente documento (tal como anticuerpo E3); y/o un anticuerpo descrito en el documento WO20050019266 (incluyendo los anticuerpos 4D4, 14D10, 6G9, 7H2, 14F11 y 4G6), el documento WO2006131951 (incluyendo el anticuerpo Hu-αD11), o los documentos WO09023540 o US20090041717. En otras realizaciones, el anticuerpo se une al mismo epítopo que Mab 911. En otra realización, el anticuerpo comprende una región constante que es inmunológicamente inerte (por ejemplo, que no activa la lisis mediada por complemento o la citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC)). La actividad de ADCC puede evaluarse usando los procedimientos descritos en la patente de EE.UU. n.º 5.500.362. En algunas realizaciones, la región constante se modifica según lo descrito en *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624; PCT WO9958572.

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

A continuación, se resumen las propiedades de unión del anticuerpo E3, que se une al NGF humano con alta afinidad y cinética de disociación lenta, en comparación con el anticuerpo monoclonal anti-NGF murino original 911. E3 se une al NGF humano con una afinidad de unión aproximadamente 50 veces superior a la del anticuerpo de ratón precursor 911.

anticuerpo	k_D	K_{off}	K_{on}
911 (Fab)	3,7 nM	9×10^{-5} s^{-1}	$2,2 \times 10^{4}$ $M^{-1}s^{-1}$
E3 (Fab)	0,07 nM	$< 4 \times 10^{-5}$ s^{-1}	6×10^{5} $M^{-1}s^{-1}$

El anticuerpo E3 y los anticuerpos relacionados también muestran una fuerte capacidad para antagonizar el NGF humano, según se evalúa mediante ensayos *in vitro* descritos en los Ejemplos 2 y 3 del documento WO2004/058184, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia. Por ejemplo, el anticuerpo E3 antagoniza la supervivencia dependiente de NGF de las neuronas trigeminales E13 de ratón a una CI_{50} de aproximadamente 21 pM en presencia de 15 pM de NGF humano, y aproximadamente 1,2 pM en presencia de 1,5 pM de NGF humano.

Por consiguiente, en otro aspecto, los anticuerpos y polipéptidos de la invención pueden identificarse y caracterizarse además por: (h) unión de alta afinidad al NGF humano con baja cinética de disociación (en algunas realizaciones, con una K_D inferior a aproximadamente 2 nM, y/o una k_{off} más lenta que aproximadamente 6×10^{-5} s^{-1}) y/o (i) capacidad de inhibir (bloquear) la supervivencia dependiente de NGF de las neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI_{50} de aproximadamente 100 pM o inferior a aproximadamente 15 pM de NGF (en algunas realizaciones, NGF humano) y/o una CI_{50} de aproximadamente 20 pM o inferior a aproximadamente 1,5 pM de NGF.

Los anticuerpos útiles en la presente invención pueden englobar anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos heteroconjugados, fragmentos monocatenarios (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno de la especificidad requerida, incluyendo variantes de glicosilación de anticuerpos, variantes de secuencia de aminoácidos de anticuerpos y anticuerpos modificados covalentemente. Los anticuerpos pueden ser de origen murino, de rata, humanos o de cualquier otro tipo (incluyendo los anticuerpos quiméricos o humanizados).

En algunas realizaciones, la invención utiliza un anticuerpo que comprende una cadena ligera que está codificada por un polinucleótido que es producido por una célula huésped con un número de depósito de ATCC n.º PTA-4893 o ATCC n.º PTA-4894. En otro aspecto, el anticuerpo comprende una cadena pesada que está codificada por un polinucleótido que es producido por una célula huésped con un número de depósito de ATCC n.º PTA-4895. La presente invención también utiliza diversas formulaciones de E3 y fragmentos de anticuerpos equivalentes (por ejemplo, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, Fc, etc.), monocatenarios (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo, y cualquier otra configuración modificada de E3 que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno (NGF) de la especificidad requerida. Los anticuerpos equivalentes de E3, que incluyen fragmentos de anticuerpos y polipeptídicos (que pueden ser o no anticuerpos) de E3, y polipéptidos que comprenden fragmentos polipeptídicos de E3 se identifican y caracterizan por cualquiera (uno o más) de los criterios descritos anteriormente.

Por consiguiente, la invención utiliza cualquiera de los siguientes o composiciones (incluyendo composiciones farmacéuticas) que comprenden cualquiera de los siguientes: (a) anticuerpo E3; (b) un fragmento o una región del anticuerpo E3; (c) una cadena ligera del anticuerpo E3 como se muestra en SEQ ID NO: 17 (Figuras 1B del documento WO2004/058184); (c) una cadena pesada del anticuerpo E3 como se muestra en SEQ ID NO: 16 (Figura 1A del documento WO2004/058184); (d) una o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo E3; (e) una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR) del anticuerpo E3 que se muestra en SEQ ID NO: 3-8 (Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184); (f) CDR H3 de la cadena pesada del anticuerpo E3 que se muestra en SEQ ID NO: 5 (Figura 1A del documento WO2004/058184); (g) CDR L3 de la cadena ligera del anticuerpo E3 que se muestra en SEQ ID NO: 8 (Figura 1B del documento WO2004/058184); (h) tres CDR de la cadena ligera del anticuerpo E3 que se muestra en SEQ ID NO: 6-8 (Figura 1B del documento WO2004/058184); (i) tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo E3 que se muestra en SEQ ID NO: 3-5 (Figura 1A del documento WO2004/058184); (j) tres CDR de la cadena ligera y tres CDR de la cadena pesada, del anticuerpo E3 que se muestra en SEQ ID NO: 3-8 (Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184); y (k) un anticuerpo que comprende uno cualquiera de (b) a (j).

Las partes de CDR del anticuerpo E3 (incluyendo las CDR de Chothia y Kabat) se representan esquemáticamente en las Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184), y consisten en las siguientes secuencias de aminoácidos:

(a) CDR de cadena pesada 1 ("CDR H1") GFSLIGYDLN (SEQ ID NO: 3);
(b) CDR de cadena pesada 2 ("CDR H2") IIWGDGTTDYNSAVKS (SEQ ID NO: 4);
(c) CDR de cadena pesada 3 ("CDR H3") GGYWYATSYYFDY (SEQ ID NO: 5);
(d) CDR de cadena ligera 1 ("CDR L1") RASQSISNNLN (SEQ ID NO: 6);
(e) CDR de cadena ligera 2 ("CDR L2") YTSRFHS (SEQ ID NO: 7); y
(f) CDR de cadena ligera 3 ("CDR L3") QQEHTLPYT (SEQ ID NO: 8).

La determinación de las regiones CDR está dentro del conocimiento de la técnica. Se entiende que, en algunas realizaciones, las CDR pueden ser una combinación de CDR de Kabat y Chothia (también denominadas "CDR combinadas" o "CDR extendidas"). En algunas realizaciones, las CDR comprenden la CDR de Kabat. En otras realizaciones, las CDR son la CDR de Chothia.

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

En algunas realizaciones, el anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos de E3 que tenga cualquiera de los siguientes: al menos 5 aminoácidos contiguos, al menos 8 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 10 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 15 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 20 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 25 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de una secuencia de E3, en la que al menos 3 de los aminoácidos son de una región variable de E3. Las secuencias de CDR extendidas de Mab 911 se muestran en las Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184, y en las SEQ ID NO: 9-14 del presente documento. En una realización, la región variable es de una cadena ligera de E3. En otra realización, la región variable es de una cadena pesada de E3. En otra realización, los 5 (o más) aminoácidos contiguos son de una región determinante de la complementariedad (CDR) de E3 que se muestra en SEQ ID NO: 3-8 (Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184).

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

Como es evidente, a lo largo de la presente divulgación, se usa un esquema de numeración de aminoácidos secuencial para referirse a restos de aminoácidos de las regiones variables (es decir, los restos de aminoácidos en cada región variable se numeran en secuencia). Como es bien conocido en la técnica, los sistemas de numeración de Kabat y/o Chothia son útiles cuando se comparan dos anticuerpos o polipéptidos, tales como un anticuerpo E3 y una variante E3 (o polipéptido sospechoso de ser una variante E3). Se conoce bien en la técnica cómo convertir la numeración secuencial en numeración de Chothia y/o Kabat, si se desea, por ejemplo, para su uso en la realización de comparaciones entre E3 y otro polipéptido. La Figura 23 del documento WO2004/058184 representa las regiones variables de E3 numeradas usando la numeración secuencial de Chothia y Kabat. Además, para facilitar la comparación, en general, se entiende que los restos de la región marco conservada, en general, pero no siempre, tienen aproximadamente el mismo número de restos. Sin embargo, las CDR pueden variar en tamaño (es decir, es posible que tengan inserciones y/o eliminaciones de uno o más restos de aminoácidos). Cuando se compara un anticuerpo E3 y una variante E3 candidata (por ejemplo, en el caso de una región CDR de una secuencia candidata que es más larga en la secuencia en el anticuerpo E3 con el que se alinea), se pueden seguir las siguientes etapas (aunque, en la técnica, se conocen otros procedimientos). La secuencia del anticuerpo candidato se alinea con las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpo E3. La alineación se puede realizar a mano o por ordenador usando programas informáticos comúnmente aceptados. La alineación se puede facilitar usando algunos restos de aminoácidos que son comunes a la mayoría de las secuencias de Fab. Por ejemplo, las cadenas ligera y pesada tienen cada una normalmente dos cisteínas, que a menudo se encuentran en una posición conservada. Se entiende que la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo variante candidato puede ser más larga (es decir, tener restos de aminoácidos insertados) o más corta (tener restos de aminoácidos eliminados). Se pueden añadir sufijos al número de resto para indicar la inserción de restos adicionales, por ejemplo, resto 34 abc. Para secuencias candidatas que, por ejemplo, se alinean con una secuencia E3 para, por ejemplo, restos 33 y 35, pero que no tienen restos entre ellas para alinearse con el resto 35, el resto 35 simplemente no se asigna a un resto. En otro enfoque, en general, es bien conocido que puede realizarse una comparación entre aminoácidos estructurales equivalentes (por ejemplo, la misma posición en el complejo de antígeno-anticuerpo) cuando se comparan CDR de diferentes longitudes. Por ejemplo, la numeración de Chothia (Al-Lazikani y col, *supra*), en general, (pero no en todos los casos), coloca inserciones y eliminaciones en las posiciones estructuralmente correspondientes. La equivalencia estructural también puede deducirse o demostrarse usando cristalografía de rayos X o análisis de ciclo de doble mutación (véase Pons y col. (1999) *Prot. Sci.* 8:958-968).

La afinidad de unión de un anticuerpo anti-NGF hacia NGF (tal como hNGF) puede ser, en términos de K_D, de aproximadamente 0,10 a aproximadamente 0,80 nM, de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,75 nM y de aproximadamente 0,18 a aproximadamente 0,72 nM. En algunas realizaciones, la K_D es de aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM,

aproximadamente 40 pM o superior a aproximadamente 40 pM. En una realización, la K_D es de entre aproximadamente 2 pM y 22 pM. En otras realizaciones, la K_D es inferior a aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 4 nM, aproximadamente 3,5 nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 2,5 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 1,5 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 900 pM, aproximadamente 800 pM, aproximadamente 700 pM, aproximadamente 600 pM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 400 pM, aproximadamente 300 pM, aproximadamente 200 pM, aproximadamente 150 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 90 pM, aproximadamente 80 pM, aproximadamente 70 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 40 pM, aproximadamente 30 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 5 pM. En algunas realizaciones, la K_D es de aproximadamente 10 nM. En otras realizaciones, la K_D es inferior a aproximadamente 10 nM. En otras realizaciones, la K_D es de aproximadamente 0,1 nM o aproximadamente 0,07 nM. En otras realizaciones, la K_D es inferior a aproximadamente 0,1 nM o inferior a aproximadamente 0,07 nM. En otras realizaciones, la K_D es cualquiera de aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 4 nM, aproximadamente 3,5 nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 2,5 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 1,5 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 900 pM, aproximadamente 800 pM, aproximadamente 700 pM, aproximadamente 600 pM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 400 pM, aproximadamente 300 pM, aproximadamente 200 pM, aproximadamente 150 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 90 pM, aproximadamente 80 pM, aproximadamente 70 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 40 pM, aproximadamente 30 pM, aproximadamente 10 pM a cualquiera de aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM o aproximadamente 40 pM. En algunas realizaciones, la K_D es cualquiera de aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 4 nM, aproximadamente 3.5 nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 2.5 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 1.5 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 900 pM, aproximadamente 800 pM, aproximadamente 700 pM, aproximadamente 600 pM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 400 pM, aproximadamente 300 pM, aproximadamente 200 pM, aproximadamente 150 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 90 pM, aproximadamente 80 pM, aproximadamente 70 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 40 pM, aproximadamente 30 pM, aproximadamente 10 pM. En otras realizaciones más, la K_D es de aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 40 pM o superior a aproximadamente 40 pM.

La afinidad de unión del anticuerpo a NGF puede determinarse usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Una forma de determinar la afinidad de unión de los anticuerpos hacia NGF es midiendo la afinidad de unión de los fragmentos Fab monofuncionales del anticuerpo. Para obtener fragmentos Fab monofuncionales, se puede escindir un anticuerpo (por ejemplo, IgG) con papaína o expresarse de forma recombinante. La afinidad de un fragmento Fab anti-NGF de un anticuerpo puede determinarse por resonancia de plasmón superficial (sistema de resonancia de plasmón superficial BIAcore3000™, BIAcore, INC, Piscaway NJ). Los chips CM5 se pueden activar con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiinida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El NGF humano (o cualquier otro NGF) se puede diluir en acetato de sodio 10 mM, pH 4,0, e inyectarse sobre el chip activado a una concentración de 0,005 mg/ml. Usando un tiempo de flujo variable a través de los canales de chip individuales, se pueden alcanzar dos intervalos de densidad de antígeno: 100-200 unidades de respuesta (UR) para estudios cinéticos detallados y de 500 a 600 UR para los ensayos de detección. El chip se puede bloquear con etanolamina. Los estudios de regeneración han demostrado que una mezcla de tampón de elución Pierce (Producto n.º 21004, Pierce Biotechnology, Rockford IL) y NaCl 4 M (2:1) elimina eficazmente el Fab unido mientras mantiene la actividad de hNGF en el chip durante más de 200 inyecciones. Se usa tampón HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15, EDTA 3 mM, Tensioactivo P29 al 0,005 %) como tampón de ejecución para los ensayos BIAcore. Se inyectan diluciones en serie (K_D estimadas de 0,1-x 10) de muestras de Fab purificadas durante 1 minuto a 100 µl/min y se permiten tiempos de disociación de hasta 2 h. Las concentraciones de las proteínas Fab se determinan mediante ELISA y/o electroforesis SDS-PAGE usando un Fab de concentración conocida (determinada por análisis de aminoácidos) como patrón. Las velocidades de asociación cinética (k_{on}) y las velocidades de disociación (k_{off}) se obtienen simultáneamente ajustando los datos a un modelo de unión Langmuir 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6. 99-110) usando el programa BIAevaluation. Los valores de la constante de disociación de equilibrio (K_D) se calculan como k_{off}/k_{on}. Este protocolo es adecuado para su uso en la determinación de la afinidad de unión de un anticuerpo a cualquier NGF, incluyendo NGF humano, NGF de otro vertebrado (en algunas realizaciones, mamífero) (como NGF de ratón, NGF de rata, NGF de primate), así como para su uso con otras neurotrofinas, como las neurotrofinas relacionadas NT3, NT4/5 y/o BDNF.

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

El/los epítopo/s pueden ser continuos o discontinuos. En una realización, el anticuerpo se une esencialmente a los mismos epítopos de NGF humano que un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en MAb 911, MAb 912 y MAb 938 como se describe en Hongo y col., *Hybridoma*, 19:215-227 (2000); un anticuerpo definido en el presente documento (tal como anticuerpo E3); y/o un anticuerpo descrito en el documento WO2005019266 (incluyendo los anticuerpos 4D4, 14D10, 6G9, 7H2, 14F11 y 4G6), el documento WO2006131951 (incluyendo el anticuerpo Hu-αD11), o los documentos WO09023540 o US20090041717, cuyos contenidos completos se incorporan en el presente documento por referencia. En otra realización, el anticuerpo se une esencialmente al mismo epítopo de hNGF que MAb 911. En otra realización más, el anticuerpo se une esencialmente al mismo epítopo que MAb 909. Hongo y col., *supra*. Por ejemplo, el epítopo puede comprender uno o más de los restos K32, K34 y E35 dentro de la región variable 1 (aminoácidos 23-35) de hNGF; los restos Y79 y T81 dentro de la región variable 4 (aminoácidos 81-88) de hNGF; los restos H84 y K88 dentro de la región variable 4; el resto R103 entre la región variable 5 (aminoácidos 94-98) de hNGF y el extremo C (aminoácidos 111-118) de hNGF; el resto E11 dentro de la región prevariable 1 (aminoácidos 10-23) de hNGF; Y52 entre la región variable 2 (aminoácidos 40-49) de hNGF y la región variable 3 (aminoácidos 59-66) de hNGF; los restos L112 y S113 dentro del extremo C de hNGF; los restos R59 y R69 dentro de la región variable 3 de hNGF; o los restos V18, V20 y G23 dentro de la región prevariable 1 de hNGF. Además, un epítopo puede comprender una o más de la región variable 1, la región variable 3, la región variable 4, la región variable 5, la región N-terminal y/o el extremo C de hNGF. En otra realización más, el anticuerpo reduce significativamente la accesibilidad del disolvente del resto R103 de hNGF. Se entiende que aunque los epítopos descritos anteriormente se relacionan con el NGF humano, un experto en la materia puede alinear las estructuras del NGF humano con el NGF de otras especies e identificar homólogos probables a estos epítopos.

En algunas realizaciones, los anticuerpos para su uso en la invención pueden inhibir (reducir y/o bloquear) la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI_{50} (en presencia de aproximadamente 15 pM de NGF) de aproximadamente cualquiera de 200 pM, 150 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 20 pM, 10 pM, o menos. En algunas realizaciones, los anticuerpos o péptidos de la invención pueden inhibir (reducir y/o bloquear) la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI_{50} (en presencia de aproximadamente 1,5 pM de NGF) de aproximadamente cualquiera de 50 pM, 40 pM, 30 pM, 10 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, 2 pM, 1 pM o menos. En algunas realizaciones, los anticuerpos o péptidos de la invención pueden inhibir (reducir y/o bloquear) la supervivencia dependiente de NGF de rata de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI_{50} (en presencia de aproximadamente 15 pM de NGF) de aproximadamente cualquiera de 150 pM, 125 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 30 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM o menos. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden inhibir (reducir y/o bloquear) la supervivencia dependiente de NGF de rata de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI_{50} (en presencia de aproximadamente 1,5 pM de NGF) de aproximadamente cualquiera de 30 pM, 25 pM, 20 pM, 15 pM, 10 pM, 5 pM, 4 pM, 3 pM, 2 pM, 1 pM o menos. Los procedimientos de medición de la supervivencia dependiente de NGF de neuronas trigeminales E13 de ratón son conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en el Ejemplo 2 del documento WO2004/058184.

Identificación de anticuerpos antagonistas anti-NGF

Los anticuerpos antagonistas anti-NGF para su uso en la invención pueden identificarse o caracterizarse usando procedimientos conocidos en la técnica, mediante los que se detecta y/o se mide la reducción, mejora o neutralización de una actividad biológica de NGF. Se pueden usar los procedimientos descritos en el documento PCT WO 04/065560. Se puede usar otro procedimiento, por ejemplo, un ensayo de activación del receptor de quinasa (KIRA) descrito en las patentes de EE.UU. n.º 5.766.863 y 5.891, 650, para identificar agentes anti-NGF. Este ensayo de tipo ELISA es adecuado para la medición cualitativa o cuantitativa de la activación de quinasa midiendo la autofosforilación del dominio quinasa de una proteína tirosina quinasa receptora (de aquí en adelante "rPTK"), por ejemplo, receptor TrkA, así como para la identificación y caracterización de antagonistas potenciales de un rPTK seleccionado, por ejemplo, TrkA. La primera etapa del ensayo implica la fosforilación del dominio quinasa de un receptor de quinasa, por ejemplo, un receptor TrkA, en la que el receptor está presente en la membrana celular de una célula eucariota. El receptor puede ser un receptor endógeno o un ácido nucleico que codifique al receptor, o una construcción de receptor, puede transformarse en la célula. Por lo general, se reviste una primera fase sólida (por ejemplo, un pocillo de una primera placa de ensayo) con una población esencialmente homogénea de dichas células (habitualmente una línea celular de mamífero) de modo que las células se adhieran a la fase sólida. A menudo, las células son adherentes y, por lo tanto, se adhieren de forma natural a la primera fase sólida. Si se usa una "construcción de receptor", habitualmente comprende una fusión de una quinasa receptora y un polipéptido indicador. El polipéptido indicador es reconocido por el agente de captura, a menudo un anticuerpo de captura, en la parte de ELISA del ensayo. Luego se agrega un analito, tal como un anticuerpo antagonista anti-NGF candidato junto con NGF a los pocillos que tienen las células adherentes, de modo que el receptor de tirosina quinasa (por ejemplo, el receptor TrkA) se expone a (o se pone en contacto con) NGF y el analito. Este ensayo permite la identificación de antagonistas (incluidos anticuerpos) que inhiben la activación de TrkA por su ligando NGF. Después de la exposición al NGF y al analito, las células adherentes se solubilizan usando un tampón de lisis (que tiene un detergente solubilizante) y agitación suave, liberando así el lisado celular que puede someterse a la parte de ELISA del ensayo directamente, sin la necesidad de concentración o clarificación del lisado celular.

El lisado celular así preparado está entonces listo para someterse a la etapa de ELISA del ensayo. Como primera etapa de la fase de ELISA, se reviste una segunda fase sólida (normalmente, un pocillo de una placa de microtitulación de ELISA) con un agente de captura (a menudo, un anticuerpo de captura) que se une

específicamente al receptor de tirosina quinasa o, en el caso de una construcción receptora, al polipéptido indicador. El revestimiento de la segunda fase sólida se lleva a cabo de modo que el agente de captura se adhiera a la segunda fase sólida. En general, el agente de captura es un anticuerpo monoclonal, pero, como se describe en los ejemplos en el presente documento, también se pueden usar anticuerpos policlonales. El lisado celular obtenido se expone entonces al o se pone en contacto con al agente de captura adherente, de modo que el receptor o la construcción del receptor se adhiere a (o se captura en) la segunda fase sólida. A continuación, se lleva a cabo una etapa de lavado, para eliminar el lisado celular no unido, dejando el receptor o la construcción del receptor capturado. El receptor o la construcción de receptor adherente o capturado se expone entonces a, o se pone en contacto con, un anticuerpo anti-fosfotirosina que identifica restos de tirosina fosforilados en el receptor de tirosina quinasa. En una realización, el anticuerpo anti-fosfotirosina se conjuga (directa o indirectamente) a una enzima que cataliza un cambio de color de un reactivo de color no radiactivo. Por consiguiente, la fosforilación del receptor se puede medir mediante un cambio de color posterior del reactivo. La enzima se puede unir al anticuerpo anti-fosfotirosina directamente, o una molécula de conjugación (por ejemplo, biotina) se puede conjugar al anticuerpo anti-fosfotirosina y la enzima se puede unir posteriormente al anticuerpo anti-fosfotirosina a través de la molécula de conjugación. Finalmente, se mide la unión del anticuerpo anti-fosfotirosina al receptor capturado o a la construcción de receptor capturado, por ejemplo, mediante un cambio de color en el reactivo de color.

Los anticuerpos antagonistas anti-NGF también pueden identificarse incubando un agente candidato con NGF y controlando una o más de las siguientes características: (a) unión a NGF e inhibición de la actividad biológica de NGF o vías cadena abajo mediadas por la función de señalización de NGF; (b) inhibición, bloqueo o disminución de la activación del receptor de NGF (incluyendo la dimerización y/o la autofosforilación de TrkA); (c) aumento del aclaramiento de NGF; (d) tratamiento o prevención de cualquier aspecto del dolor y/o síntomas del tracto urinario inferior asociados con la prostatitis crónica y/o el síndrome de dolor pélvico crónico; (e) inhibición (reducción) de la síntesis, producción o liberación de NGF. En algunas realizaciones, un antagonista de NGF (por ejemplo, un anticuerpo antagonista anti-NGF) se identifica incubando un agente candidato con NGF y controlando la unión y/o la reducción o neutralización consiguiente de una actividad biológica de NGF. El ensayo de unión se puede realizar con uno o varios polipéptidos de NGF purificados, o con células que expresan de forma natural, o se transfectan para expresar uno o varios polipéptidos NGF. En una realización, el ensayo de unión es un ensayo de unión competitiva, donde se evalúa la capacidad de un agente candidato (tal como un anticuerpo) para competir con un anticuerpo antagonista anti-NGF conocido para la unión a NGF. El ensayo puede realizarse en diversos formatos, incluyendo el formato de ELISA. En otras realizaciones, se identifica un antagonista de NGF (tal como anticuerpo antagonista anti-NGF) incubando un agente candidato con NGF, y controlando la unión y la inhibición consiguiente de la dimerización y/o autofosforilación del receptor trkA.

Tras la identificación inicial, se puede confirmar la actividad de un anticuerpo antagonista anti-NGF candidato y afinarse más mediante bioensayos, conocidos para ensayar las actividades biológicas dirigidas. Como alternativa, los bioensayos pueden usarse para seleccionar candidatos directamente. Por ejemplo, NGF potencia una serie de cambios morfológicamente reconocibles en las células sensibles. Estos incluyen, pero sin limitación, potenciar la diferenciación de células PC12 y potenciar el crecimiento de neuritas a partir de estas células (Greene y col., *Proc Natl Acad Sci* EE.UU. 73(7):2424-8, 1976), potenciando el crecimiento neurítico de explantes de ganglios sensoriales y simpáticos receptivos (Levi-Montalcini, R. y Angeletti, P. “Nerve growth factor”. *Physiol. Rev*. 48:534-569, 1968) y potenciando la supervivencia de neuronas dependientes de NGF tales como las neuronas del ganglio de la raíz dorsal embrionaria, del ganglio trigeminal o del ganglio simpático (por ejemplo, Chun y Patterson, *Dev. Biol.* 75:705-711, (1977); Buchman y Davies, *Development* 118:989-1001 (1993). Por lo tanto, el ensayo para la inhibición de la actividad biológica de NGF implica cultivar células que responden a NGF con NGF más un analito, tal como un anticuerpo antagonista anti-NGF candidato. Después de un tiempo apropiado, se analizará la respuesta celular (diferenciación celular, crecimiento de neuritas o supervivencia celular).

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

Los anticuerpos para su uso en la presente invención se pueden preparar mediante procedimientos conocidos en la técnica, algunos de los cuales se ilustran en los ejemplos del documento WO2004/058184. Los anticuerpos pueden producirse por degradación proteolítica u otra degradación de los anticuerpos, mediante procedimientos recombinantes (es decir, polipéptidos individuales o de fusión) como se describe en el documento WO2004/058184 o por síntesis química. Los polipéptidos de los anticuerpos, en especial, los polipéptidos más cortos de hasta aproximadamente 50 aminoácidos, se preparan convenientemente mediante síntesis química. Los procedimientos de síntesis química son conocidos en la técnica y están disponibles en el mercado. Por ejemplo, se podría producir un anticuerpo E3 mediante un sintetizador polipeptídico automático que emplea el procedimiento de fase sólida. Véanse también las patentes de EE.UU. n.º 5.807.715; 4.816.567; y 6.331.415. Los anticuerpos quiméricos o híbridos también se pueden preparar *in vitro* usando procedimientos conocidos de química de proteínas sintéticas, que incluyen aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace de tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

En otra alternativa, los anticuerpos pueden prepararse de forma recombinante usando procedimientos que son bien conocidos en la técnica. En una realización, un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica las regiones de cadena ligera y variable del anticuerpo E3 se clona en un vector para expresión o propagación en una célula huésped (por ejemplo, células CHO). En otra realización, las secuencias de polinucleótidos mostradas en las Figuras 2 y 3 del documento WO2004/058184 se clonan en uno o más vectores para la expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse en un vector en una célula huésped y la célula huésped puede expandirse y congelarse para un uso futuro. En el presente documento, se describen además vectores (que incluyen vectores de expresión) las células huésped. Se han descrito procedimientos para expresar anticuerpos recombinantemente en plantas o leche. Véase, por ejemplo, Peeters y col. (2001) "Vaccine" 19:2756; Lonberg, N. y D. Huszar (1995) *Int. Rev. Immunol* 13:65; y Pollock y col. (1999) *J Immunol Methods* 231:147. Los procedimientos de fabricación de derivados de anticuerpos, por ejemplo, humanizados, monocatenarios, etc. son conocidos en la técnica.

La invención también engloba fragmentos de la región variable monocatenarios ("scFv") de anticuerpos de la presente invención, tales como E3. Los fragmentos de región variable monocatenarios se preparan uniendo regiones variables de cadena ligera y/o pesada usando un péptido de engarce corto. Bird y col. (1988) *Science* 242:423-426. Un ejemplo de un péptido de engarce es (GGGGS)3 (SEQ ID NO: 15), que une aproximadamente 3,5 nm entre el extremo carboxi de una región variable y el extremo amino de la otra región variable. Se han diseñado y usado engarces de otras secuencias (Bird y col. (1988)). Los engarces pueden, a su vez, modificarse para funciones adicionales, tales como la unión de fármacos o la unión a soportes sólidos. Las variantes monocatenarias pueden producirse de forma recombinante o sintética. Para la producción sintética de scFv, se puede usar un sintetizador automático. Para la producción recombinante de scFv, puede introducirse un plásmido adecuado que contenga un polinucleótido que codifique el scFv en una célula huésped adecuada, bien eucariota, tal como células de levadura, vegetales, de insecto o de mamífero, o procariota, tal como *E. coli*. Los polinucleótidos que codifican el scFv de interés pueden prepararse mediante manipulaciones rutinarias tales como ligación de polinucleótidos. El scFv resultante se puede aislar usando técnicas convencionales de purificación de proteínas conocidas en la materia.

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

El anticuerpo puede ser un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo monoclonal que tenga especificidades de unión hacia al menos dos antígenos diferentes. Se puede preparar un anticuerpo biespecífico usando los anticuerpos desvelados en el presente documento. Los procedimientos de fabricación de anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Suresh y col., 1986, *Methods in Enzymology* 121:210). Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basaba en la coexpresión de dos pares de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina, teniendo las dos cadenas pesadas especificidades diferentes (Millstein y Cuello, 1983, *Nature* 305, 537-539).

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

En un enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Esta estructura asimétrica, con una cadena ligera de inmunoglobulina en solo la mitad de la molécula biespecífica, facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulinas no deseadas. Este enfoque se describe en la publicación PCT n.º WO 94/04690, publicada el 3 de marzo de 1994.

Los anticuerpos heteroconjugados, que comprenden dos anticuerpos unidos covalentemente, también pertenecen al alcance de la invención. Dichos anticuerpos se han usado para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (patente de EE.UU. n.º 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (publicaciones de solicitud PCT n.º WO 91/00360 y WO 92/200373; EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando

cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes y las técnicas de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica, y se describen en la patente de EE.UU. n.º 4.676.980.

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

Los anticuerpos pueden modificarse como se describe en la Publicación PCT n.º WO 99/58572, publicada el 18 de noviembre de 1999. Estos anticuerpos comprenden, además de un dominio de unión dirigido a la molécula diana, un dominio efector que tiene una secuencia de aminoácidos esencialmente homóloga a todo o parte de un dominio constante de una cadena pesada de inmunoglobulina humana. Estos anticuerpos son capaces de unirse a la molécula diana sin generar una lisis significativa dependiente del complemento, o la destrucción de la diana mediada por células. Preferentemente, el dominio efector es capaz de unirse específicamente a FcRn y/o FcγRIIb. Estos se basan normalmente en dominios quiméricos derivados de dos o más dominios CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos modificados de esta manera son los preferidos para su uso en la terapia crónica con anticuerpos, para evitar reacciones inflamatorias y otras reacciones adversas a la terapia convencional con anticuerpos. La invención engloba modificaciones del anticuerpo E3, que incluyen anticuerpos funcionalmente equivalentes que no afectan significativamente a sus propiedades y variantes que tienen actividad potenciada o reducida. La modificación de polipéptidos es una práctica habitual en la técnica y se ilustra además en los ejemplos. Los ejemplos de polipéptidos modificados incluyen polipéptidos con sustituciones (que incluyen sustituciones conservativas) de restos de aminoácidos, una o más eliminaciones o adiciones de aminoácidos que no cambian significativamente de forma perjudicial la actividad funcional, o el uso de análogos químicos.

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

Las variantes de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN del anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, eliminaciones y/o inserciones y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2 descritas en el presente documento. Cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución se realiza para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden modificar los procedimientos posteriores a la traducción del anticuerpo, tales como cambiar el número o la posición de los sitios de glicosilación.

Un procedimiento útil para la identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo que son ubicaciones preferidas para la mutagénesis o modificación se denomina "mutagénesis de barrido de alanina", y es descrito por Cunningham y Wells, 1989, *Science*, 244:1081-1085. Se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplaza por un aminoácido neutro o cargado negativamente (más preferentemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con antígeno. Aquellas ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se perfeccionan luego introduciendo variantes adicionales u otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario predeterminar la naturaleza de la mutación en sí. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se realiza la mutagénesis aleatoria o la exploración de ala en el codón o en la región diana, y las variantes de anticuerpo expresadas se exploran para determinar la actividad deseada. La mutagénesis de exploración de la genoteca, como se describe en el presente documento, también puede usarse para identificar ubicaciones en un anticuerpo que sean adecuadas para mutagénesis o modificación.

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

Las variantes de sustitución tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo eliminada y un resto diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1 con el título de "sustituciones conservativas". Si dichas sustituciones producen un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ilustrativas" en la Tabla 1 o, como se describe además a continuación, en referencia a las clases de aminoácidos y explorarse los productos.

Tabla 1: Sustituciones de aminoácidos

Resto original	Sustituciones conservativas	Sustituciones ilustrativas
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina
Leu (L)	Ile	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

Se logran modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una configuración de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Los restos naturales se dividen en grupos en función de las propiedades comunes de la cadena lateral:

(1) Hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
(2) Hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr;
(3) Ácidos: Asp, Glu;
(4) Básicos: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
(5) Restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
(6) Aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

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

Cualquier resto de cisteína que no participe en el mantenimiento de la configuración apropiada del anticuerpo también puede estar sustituido, en general, con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir el entrecruzamiento aberrante. Por el contrario, se pueden añadir enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad, en particular, cuando el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv.

Las modificaciones de aminoácidos pueden variar desde cambiar o modificar uno o más aminoácidos hasta completar el rediseño de una región, tal como la región variable. Los cambios en la región variable pueden alterar la afinidad y/o la especificidad de unión. En alguna realización, no se realizan más de una a cinco sustituciones de aminoácidos conservativas dentro de un dominio de CDR. En otras realizaciones, no se realizan más de una a tres sustituciones conservativas de aminoácidos dentro de un dominio CDR3. En otras realizaciones más, el dominio CDR es CDRH3 y/o CDRL3.

Las modificaciones también incluyen polipéptidos glicosilados y no glicosilados, así como polipéptidos con otras modificaciones posteriores a la traducción, tales como, por ejemplo, la glicosilación con diferentes azúcares, acetilación y fosforilación. Los anticuerpos están glucosilados en posiciones conservadas en sus regiones constantes (Jefferis y Lund, 1997, *Chem. Immunol.* 65:111-128; Wright y Morrison, 1997, *TibTECH* 15:26-32). Las cadenas laterales de oligosacáridos de las inmunoglobulinas afectan a la función de la proteína (Boyd y col., 1996, *Mol. Immunol.* 32:1311-1318; Wittwe y Howard, 1990, *Biochem*. 29:4175-4180) y la interacción intramolecular entre partes de la glicoproteína, que puede afectar a la configuración y presentar una superficie tridimensional de la glicoproteína (Hefferis y Lund, *supra*; Wyss y Wagner, 1996, *Current Opin. Biotech*. 7:409-416). Los oligosacáridos también pueden servir para dirigir una glicoproteína dada a ciertas moléculas basándose en estructuras de

reconocimiento específicas. También se ha informado que la glicosilación de anticuerpos afecta a la citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos (ADCC). En particular, se informó que las células CHO con expresión regulada por tetraciclina de β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una formación catalizadora de glicosiltransferasa de GIcNAc bisectante, tenían actividad de ADCC mejorada (Umana y col., 1999, *Mature Biotech*. 17:176-180). La glicosilación de anticuerpos normalmente está bien enlazada a N o enlazada a O. Enlazada a N se refiere a la unión de la fracción de hidrato de carbono a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la fracción de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación enlazada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glucosilación unidos a N). La alteración también se puede realizar mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación enlazados a O). El patrón de glicosilación de los anticuerpos también puede alterarse sin alterar la secuencia de nucleótidos subyacente. La glicosilación depende en gran medida de la célula huésped usada para expresar el anticuerpo. Dado que el tipo de célula usada para la expresión de glicoproteínas recombinantes, por ejemplo, de anticuerpos, como posibles agentes terapéuticos raramente son células nativas, se pueden esperar variaciones en el patrón de glicosilación de los anticuerpos (véase, por ejemplo, Hse y col., 1997, *J. Biol. Chem*. 272:9062-9070).

Además de la elección de las células huésped, los factores que afectan a la glicosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen el modo de crecimiento, la formulación de los medios, la densidad del cultivo, la oxigenación, el pH, los esquemas de purificación y similares. Se han propuesto diversos procedimientos para modificar el patrón de glicosilación logrado en un determinado organismo huésped, incluyendo la introducción o sobreexpresión de ciertas enzimas implicadas en la producción de oligosacáridos (patentes de EE.UU. n.º 5.047.335, 5.510.261 y 5.278.299). La glicosilación, o ciertos tipos de glicosilación, pueden eliminarse enzimáticamente de la glicoproteína, por ejemplo, usando endoglicosidasa H (Endo H). Además, la célula huésped recombinante puede modificarse genéticamente para que sea defectuosa en el procesamiento de ciertos tipos de polisacáridos. Estas y técnicas similares son bien conocidas en la materia.

Otros procedimientos de modificación incluyen el uso de técnicas de acoplamiento conocidas en la materia, que incluyen, pero sin limitación, medios enzimáticos, sustitución oxidativa y quelación. Se pueden usar modificaciones, por ejemplo, para la fijación de marcadores para inmunoanálisis. Los polipéptidos E3 modificados se preparan usando procedimientos establecidos en la técnica, y se pueden explorar usando ensayos convencionales conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen a continuación y en los ejemplos.

La invención también usa proteínas de fusión que comprenden uno o más fragmentos o regiones de los anticuerpos o polipéptidos de la presente invención. En una realización, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de la región de cadena ligera variable que se muestra en SEQ ID NO: 2 (Figura 1B del documento WO2004/058184) y/o al menos 10 aminoácidos de la región variable de cadena pesada que se muestra en SEQ ID NO: 1 (Figura 1A del documento WO2004/058184). En otra realización, el polipéptido de fusión comprende una región variable de cadena ligera y/o una región variable de cadena pesada de E3, como se muestra en SEQ ID NO: 1 y 2 (Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184). En otra realización, el polipéptido de fusión comprende una o más CDR de E3. En otras realizaciones más, el polipéptido de fusión comprende CDR H3 y/o CDR L3 del anticuerpo E3. En otra realización, el polipéptido de fusión comprende uno cualquiera o más de: resto de aminoácido L29 de CDRH1, I50 de CDRH2, W101 de CDRH3 y/o A103 de CDRH3; y/o el resto de aminoácido S28 de CDRL1, N32 de CDRL1, T51 de CDRL2, 91E de CDRL3 y/o H92 de CDRL3. Para los fines de la presente invención, una proteína de fusión E3 contiene uno o más anticuerpos E3 y otra secuencia de aminoácidos a la que no está unida en la molécula nativa, por ejemplo, una secuencia heteróloga o una secuencia homóloga de otra región. Los ejemplos de secuencias heterólogas incluyen, pero sin limitación, un "marcador" tal como un marcador FLAG o un marcador 6His. Los marcadores son bien conocidos en la técnica.

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

La capacidad de los anticuerpos y polipéptidos de la presente invención, tales como la unión a NGF; la reducción o inhibición de una actividad biológica de NGF; la reducción y/o bloqueo de la supervivencia inducida por NGF de neuronas trigeminales de ratón E13.5, se puede analizar usando procedimientos conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en los ejemplos del documento WO2004/058184 y, en particular, en los Ejemplos 2 y 3 del documento WO2004/058184.

La invención también utiliza composiciones (incluyendo composiciones farmacéuticas) y kits que comprenden el

anticuerpo E3 y, como la presente divulgación deja en claro, cualquiera o todos los anticuerpos y/o polipéptidos descritos en el presente documento. Dichas composiciones y kits pueden usarse para tratar y/o prevenir uno o más dolores y/o síntomas del tracto urinario inferior asociados con la prostatitis crónica y/o el síndrome de dolor pélvico crónico en un individuo.

Polinucleótidos, vectores y células huésped

La invención también proporciona polinucleótidos aislados que codifican los anticuerpos y polipéptidos de la invención (incluyendo un anticuerpo que comprende las secuencias polipeptídicas de las regiones variables de cadena ligera y pesada mostradas en las Figuras 1A y 1B del documento WO2004058184), y vectores y células huésped que comprenden el polinucleótido para su uso en los procedimientos de la invención.

Por consiguiente, los polinucleótidos (o las composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas) pueden comprender polinucleótidos que codifican cualquiera de los siguientes: (a) anticuerpo E3; (b) un fragmento o una región del anticuerpo E3; (c) una cadena ligera del anticuerpo E3 como se muestra en SEQ ID NO: 17 (Figuras 1B del documento WO2004/058184); (c) una cadena pesada del anticuerpo E3 como se muestra en SEQ ID NO: 16 (Figura 1A del documento WO2004/058184); (e) una o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo E3; (f) una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR) del anticuerpo E3 que se muestra en SEQ ID NO: 3-8 (Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184); (f) CDR H3 de la cadena pesada del anticuerpo E3 que se muestra en SEQ ID NO: 5 (Figura 1A del documento WO2004/058184); (h) CDR L3 de la cadena ligera del anticuerpo E3 que se muestra en SEQ ID NO: 8 (Figura 1B del documento WO2004/058184); (i) tres CDR de la cadena ligera del anticuerpo E3 que se muestra en SEQ ID NO: 6-8 (Figura 1B del documento WO2004/058184); (j) tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo E3 que se muestra en SEQ ID NO: 3-5 (Figura 1A del documento WO2004/058184); (k) tres CDR de la cadena ligera y tres CDR de la cadena pesada, del anticuerpo E3 que se muestra en SEQ ID NO: 3-8 (Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184); y (l) un anticuerpo que comprende uno cualquiera de (b) a (k). En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende uno o ambos polinucleótidos mostrados en SEQ ID NO: 76 y 77 (Figuras 2 y 3 del documento WO2004/058184).

En otro aspecto, la invención utiliza un polinucleótido aislado que codifica una cadena ligera de E3 con un número de depósito de ATCC n.º PTA-4893 o ATCC n.º PTA-4894. En otro aspecto, la invención utiliza un polinucleótido aislado que codifica una cadena pesada de E3 con un número de depósito de ATCC n.º PTA-4895. En otro aspecto más, la invención utiliza un polinucleótido aislado que comprende (a) una región variable codificada en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC n.º PTA-4894 y (b) una región variable codificada en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC n.º PTA-4895. En otro aspecto, la invención utiliza un polinucleótido aislado que comprende (a) una o más CDR codificadas en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC n.º PTA-4894; y/o (b) una o más CDR codificadas en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC n.º PTA-4895. Los depósitos en virtud de los n.º de acceso de la ATCC PTA-4893, PTA-4894 y PTA-4895 se describen en el documento WO2004/058184, cuyo contenido se incorpora en el presente documento en su totalidad.

Los polinucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpos) y polipéptidos descritos en el presente documento se pueden preparar mediante procedimientos conocidos en la técnica.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) que comprenden cualquiera de los polinucleótidos de la invención para su uso en el tratamiento o en la prevención del dolor y/o un síntoma del tracto urinario inferior asociado con la prostatitis crónica y/o el síndrome de dolor pélvico crónico. En algunas realizaciones, la composición comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo E3 como se describe en el presente documento. En otra realización, la composición comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos descritos en el presente documento. En otras realizaciones más, la composición comprende uno o ambos de los polinucleótidos mostrados en las Figuras 2 y 3 del documento WO2004/058184. Los vectores de expresión y la administración de composiciones de polinucleótidos se describen además en el presente documento.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de fabricación de cualquiera de los polinucleótidos descritos en el presente documento para su uso en procedimientos para el tratamiento o la prevención del dolor y/o un síntoma del tracto urinario inferior asociado con la prostatitis crónica y/o el síndrome de dolor pélvico crónico.

Los polinucleótidos complementarios a cualquiera de dichas secuencias también están englobados por la presente invención. Los polinucleótidos pueden ser monocatenarios (codificantes o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser moléculas de ADN (genómicas, de ADNc o sintéticas) o de ARN. Las moléculas de ARN incluyen moléculas de ARNHn, que contienen intrones y corresponden a una molécula de ADN de una forma biunívoca, y moléculas de ARNm, que no contienen intrones. Pueden estar presentes, aunque no necesariamente, secuencias codificantes o no codificantes adicionales dentro de un polinucleótido de la presente invención, y un polinucleótido puede estar unido, aunque no necesariamente, a otras moléculas y/o materiales de soporte. Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifique un anticuerpo o una parte del

mismo) o pueden comprender una variante de dicha secuencia. Las variantes de polinucleótidos contienen una o más sustituciones, adiciones, eliminaciones y/o inserciones de manera que la inmunorreactividad del polipéptido codificado no disminuye, con respecto a una molécula inmunorreactiva nativa. En general, se puede evaluar el efecto sobre la inmunorreactividad del polipéptido codificado como se describe en el presente documento. Las variantes presentan preferentemente al menos aproximadamente el 70 %de identidad, más preferentemente al menos aproximadamente el 80 %de identidad y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 90 %de identidad con una secuencia de polinucleótidos que codifica un anticuerpo nativo o una parte del mismo.

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

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

Preferentemente, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas en una franja de comparación de al menos 20 posiciones, en la que la parte de la secuencia polinucleotídica o polipeptídica en la franja de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, espacios) del 20 %o menos, habitualmente del 5 al 15 %, o del 10 al 12 %, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se encuentran bases de ácido nucleico idénticas o restos de aminoácidos idénticos en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones de la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de la franja) y multiplicando los resultados por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias también puede realizarse usando un algoritmo matemático conocido por los expertos en la materia para comparar dos secuencias tales como el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 90:5873-5877. Los programas NBLAST y XBLAST de Altschul y col. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 han incorporado dicho algoritmo. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteínas con BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de la invención. Para obtener alineaciones vacías con fines comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul y col. (1997) *Nucleic Acids Res*. 25:3389-3402. Como alternativa, se puede usar PSI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecte relaciones distantes entre moléculas (Id.) Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, se pueden usar los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase http://www.ncbi.nlm.nih.gov. Otro ejemplo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). El programa ALIGN (versión 2.0), que es parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG ha incorporado dicho algoritmo. Otros algoritmos para el análisis de secuencias conocidos en la técnica incluyen ADVANCE y ADAM como se describe en Torellis y Robotti (1994) *Comput. Appl. Biosci.*, 10 :3-5; y FASTA, descrito en Pearson y Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444-8. Dentro de FASTA, ktup es una opción de control que establece la sensibilidad y la velocidad de la búsqueda.

Las variantes también pueden ser o, como alternativa, ser esencialmente homólogas a un gen nativo, o una parte o complemento del mismo. Dichas variantes de polinucleótidos son capaces de hibridarse en condiciones moderadamente rigurosas con una secuencia de ADN que se produzca de manera natural que codifique un anticuerpo nativo (o una secuencia complementaria).

Las "condiciones moderadamente rigurosas" adecuadas incluyen prelavado en una solución de 5 x SSC, SDS al 0,5 %, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); la hibridación a 50 ºC-65 ºC, 5 x SSC, durante la noche; seguido del lavado dos

veces a 65 ºC durante 20 minutos con cada uno de x 2, x 0,5 y x 0,2 SSC que contiene SDS al 0,1 %.

Como se usa en el presente documento, "condiciones muy rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad" son aquellas que: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo, cloruro de sodio 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/dodecilsulfato de sodio al 0,1 %a 50 ºC; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50 %(v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1 %/Ficoll al 0,1 %/tampón de polivinilpirrolidona al 0,1 %/fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42 ºC; o (3) emplean formamida al 50 %, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1 %, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1 %y sulfato de dextrano al 10 %a 42 ºC, con lavados a 42 ºC en 0,2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y formamida al 50 %a 55 ºC, seguido de un lavado de alta rigurosidad que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55 ºC. El experto en la materia reconocerá cómo ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc. según sea necesario para acomodar factores tales como la longitud de la sonda y similares.

Los expertos en la materia apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido como se describe en el presente documento. Algunos de estos polinucleótidos tienen una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. No obstante, los polinucleótidos que varían debido a las diferencias en el uso de codones están contemplados específicamente por la presente invención. Además, los alelos de los genes que comprenden las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en el presente documento están dentro del alcance de la presente invención. Los alelos son genes endógenos que se alteran como resultado de una o más mutaciones, tales como eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El ARNm y la proteína resultantes pueden, pero no necesariamente, tener una estructura o función alterada. Los alelos se pueden identificar usando técnicas convencionales (tales como hibridación, amplificación y/o comparación de secuencias de base de datos).

Los polinucleótidos para su uso en la invención se pueden obtener usando síntesis química, procedimientos recombinantes o PCR. Los procedimientos de síntesis químicas de polinucleótidos son bien conocidos en la técnica, y no necesitan describirse en detalle en el presente documento. Un experto en la materia puede usar las secuencias proporcionadas en el presente documento y un sintetizador de ADN comercial para producir una secuencia de ADN deseada.

Para preparar polinucleótidos usando procedimientos recombinantes, se puede insertar un polinucleótido que comprenda una secuencia deseada en un vector adecuado, y el vector, a su vez, se puede introducir en una célula huésped adecuada para la replicación y amplificación, como se analiza en mayor profundidad en el presente documento. Los polinucleótidos se pueden insertar en células huésped mediante cualquier medio conocido en la técnica. Las células se transforman introduciendo un polinucleótido exógeno por captación directa, endocitosis, transfección, apareamiento F o electroporación. Una vez introducido, el polinucleótido exógeno se puede mantener dentro de la célula como un vector no integrado (tal como un plásmido) o integrado en el genoma de la célula huésped. El polinucleótido así amplificado se puede aislar de la célula huésped mediante procedimientos bien conocidos dentro de la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col. (1989).

Como alternativa, la PCR permite la reproducción de secuencias de ADN. La tecnología de PCR es bien conocida en la técnica y se describe en las patentes de EE.UU. n.º 4.683.195, 4.800.159, 4.754.065 y 4.683.202, así como en “PCR: The Polymerase Chain Reaction”, Mullis y col. eds., Birkauswer Press, Boston (1994).

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

Los vectores de clonación adecuados se pueden construir de acuerdo con técnicas convencionales, o se pueden seleccionar a partir de un gran número de vectores de clonación disponibles en la técnica. Aunque el vector de clonación seleccionado puede variar de acuerdo con la célula huésped que se pretende usar, en general, los vectores de clonación útiles tendrán la capacidad de autorreplicarse, pueden poseer una sola diana para una determinada endonucleasa de restricción y/o pueden portar genes para un marcador que se puede usar para seleccionar clones que contengan el vector. Los ejemplos adecuados incluyen plásmidos y virus bacterianos, por ejemplo, pUC18, pUC19, Bluescript (por ejemplo, pBS SK+) y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ADN de fagos y vectores lanzadera tales como pSA3 y pAT28. Estos y muchos otros vectores de clonación están disponibles en proveedores comerciales tales como BioRad, Strategene e Invitrogen.

En general, los vectores de expresión son construcciones de polinucleótidos replicables que contienen un polinucleótido de acuerdo con la invención. Se implica que un vector de expresión debe ser replicable en las células huésped como episomas o como parte integral del ADN cromosómico. Los vectores de expresión adecuados incluyen, pero sin limitación, plásmidos, vectores víricos, incluyendo adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, cósmidos y vector/es de expresión desvelados en la Publicación PCT n.º WO 87/04462. Los componentes del vector pueden incluir en general, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal; un origen de replicación; uno o más genes marcadores; elementos de control de la transcripción adecuados (tales como

promotores, potenciadores y terminadores). Para la expresión (es decir, traducción), normalmente se requieren uno o más elementos de control de la traducción, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de inicio de la traducción y codones de parada.

Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés se pueden introducir en la célula huésped mediante cualquiera de una serie de medios apropiados, incluyendo la electroporación, transfección empleando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano u otras sustancias; bombardeo de microproyectiles; lipofección; e infección (por ejemplo, cuando el vector es un agente infeccioso tal como el virus vaccinia). La elección de introducir vectores o polinucleótidos a menudo dependerá de las características de la célula huésped.

La invención también utiliza células huésped que comprenden cualquiera de los polinucleótidos descritos en el presente documento. Se puede usar cualquier célula huésped capaz de sobreexpresar ADN heterólogos con el fin de aislar los genes que codifican el anticuerpo, el polipéptido o la proteína de interés. Los ejemplos no limitantes de células huésped de mamífero incluyen, pero sin limitación, células COS, HeLa y CHO. Véase también la Publicación PCT n.º WO 87/04462. Las células huésped de no mamífero adecuadas incluyen procariotas (tales como *E. coli* o *B. subtillis*) y levaduras (tales como *S. cerevisae*, *S. pombe* o *K. lactis*). Preferentemente, las células huésped expresan los ADNc a un nivel de aproximadamente 5 veces superior, más preferentemente 10 veces superior, incluso más preferentemente 20 veces superior al del anticuerpo o la proteína endógena correspondiente de interés, si está presente, en las células huésped. La exploración de las células huésped en busca de una unión específica al NGF se efectúa mediante un inmunoensayo o FACS. Se puede identificar una célula que sobreexprese el anticuerpo o la proteína de interés.

Composiciones para su uso en los procedimientos de la invención

Las composiciones para su uso en los procedimientos de la invención (pertenecientes al dolor y/o a los síntomas del tracto urinario inferior asociados con la prostatitis crónica y/o el síndrome de dolor pélvico crónico) comprenden una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-NGF y, en algunas realizaciones, comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de dichas composiciones, así como también cómo formularlas, también se describen en el presente documento. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF se une a NGF y no tiene una reacción cruzada significativa con las neurotrofinas relacionadas (tales como NT3, NT4/5 y/o BDNF). En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF no está asociado con una respuesta inmune adversa. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF reconoce el NGF humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF es humano. En otras realizaciones más, el anticuerpo anti-NGF está humanizado (tal como el anticuerpo E3 descrito en el presente documento). En otra realización más, el anticuerpo anti-NGF comprende una región constante que no genera una respuesta inmune no deseada o indeseable, tal como la lisis mediada por anticuerpos o ADCC. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF comprende una o más CDR de anticuerpo E3 (tal como uno, dos, tres, cuatro, cinco o, en algunas realizaciones, las seis CDR de E3).

Se entiende que las composiciones pueden comprender más de un antagonista de NGF. Por ejemplo, una composición puede comprender más de un miembro de una clase de antagonista de NGF (por ejemplo, una mezcla de anticuerpos anti-NGF que reconocen diferentes epítopos de NGF), así como miembros de diferentes clases de antagonistas de NGF (por ejemplo, un anticuerpo anti-NGF y un compuesto inhibidor de NGF). Otras composiciones ilustrativas comprenden más de un anticuerpo anti-NGF que compite por la unión a NGF, que reconoce el/los mismo/s epítopo/s, diferentes especies de anticuerpos anti-NGF que se unen a diferentes epítopos de NGF o diferentes compuestos inhibidores de NGF.

La composición usada en la presente invención puede comprender además vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (“Remington: The Science and Practice of Pharmacy” 20ª Ed. (2000) Lippincott Williams y Wilkins, Ed. K. E. Hoover), en forma de formulaciones o soluciones acuosas liofilizadas. Los excipientes farmacéuticamente aceptables se describen además en el presente documento.

El anticuerpo antagonista anti-NGF y sus composiciones también pueden usarse junto con otros agentes que sirven para potenciar y/o complementar la eficacia de los agentes, por ejemplo, con agentes usados en el tratamiento o en la prevención del dolor y/o de los síntomas en el tracto urinario inferior. El anticuerpo antagonista anti-NGF puede administrarse simultáneamente, secuencialmente o por separado en combinación con uno o más de dichos agentes.

El anticuerpo anti-NGF se puede administrar en combinación con uno o más fármacos diferentes (o como cualquier combinación de los mismos). El anticuerpo anti-NGF se puede combinar de forma útil con otro compuesto farmacológicamente activo, o con dos o más compuestos farmacológicamente activos, para el tratamiento del dolor y/o un síntoma del tracto urinario inferior (LUTS) asociado con la prostatitis crónica y/o el síndrome del dolor pélvico crónico. Por ejemplo, un anticuerpo anti-NGF, como se ha definido anteriormente, puede administrarse simultáneamente, secuencialmente o por separado, en combinación con uno o más agentes seleccionados de:

- un analgésico opiáceo, por ejemplo morfina, heroína, hidromorfona, oximorfona, levorfanol, levalorfano, metadona, meperidina, fentanilo, cocaína, codeína, dihidrocodeína, oxicodona, hidrocodona, propoxifeno, nalniefene, nalorfina, naloxona, naltrexona, buprenorfina, butorfanol, nalbufina o pentazocina;
- un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), por ejemplo, aspirina, diclofenaco, diflusinal, etodolac,

fenbufeno, fenoprofeno, flufenisal, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, quetoprofeno, quetorolaco, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, meloxicam, nabumetona, naproxeno, nimesulida, nitroflurbiprofeno, olsalazina, oxaprozina, fenilbutazona, piroxicam, sulfasalazina, sulindac, tolmetina o zomepirac;

- un sedante de barbiturato, por ejemplo, amobarbital, aprobarbital, butabarbital, butabital, mefobarbital, metarbital, metohexital, pentobarbital, phenobartital, secobarbital, talbutal, teamilal o tiopental;
- una berizodiazepina que tiene una acción sedante, por ejemplo, clordiazepóxido, clorazepato, diazepam, flurazepam, lorazepam, oxazepam, temazepam o triazolam;
- un antagonista de H1 que tiene una acción sedante, por ejemplo, difenhidramina, pirilamina, prometazina, clorfeniramina o clorciclizina;
- un sedante tal como glutetimida, meprobamato, metacualona o dicloralfenazona;
- un relajante de músculo esquelético, por ejemplo, baclofeno, carisoprodol, clorzoxazona, ciclobenzaprina, metocarbamol u orfrenadina;
- un antagonista del receptor NMDA, por ejemplo, dextrometorfano ((+)-3-hidroxi-*N*-metilmorfinano) o su metabolito dextrorfano ((+)-3-hidroxi-*N*-metilmorfinano), quetamina, memantina, quinona de pirroloquinolina o ácido *cis*-4-(fosfonometil)-2-piperidinacarboxílico, budipina, EN-3231 (MorphiDex®, una formulación de combinación de morfina y dextrometorfano), topiramato, neramexano o perzinfotel, incluyendo un antagonista de NR2B, por ejemplo, ifenprodil, traxoprodil o (-)-(*R*)-6-{2-[4-(3-fluorofenil)-4-hidroxi-1-piperidinil]-1-hidroxietil-3,4-dihidro-2(1*H*)-quinolinona;
- un alfa-adrenérgico, por ejemplo, doxazosina, tamsulosina, clonidina, guanfacina, dexmetatomidina, modafinil, terazosina, indoramina, alfuzosina, silodosina o 4-amino-6,7-dimetoxi-2-(5-metanosulfonamido-1,2,3,4-tetrahidroisoquinol-2-il)-5-(2-piridil)quinazolina; prazosina;
- un antidepresivo tricíclico, por ejemplo, desipramina, imipramina, amitriptilina o nortriptilina;
- un anticonvulsivo, por ejemplo, carbamazepina, lamotrigina, topiratmato o valproato;
- un antagonista de taquiquinina (NK), en particular, un antagonista NK-3, NK-2 o NK-1, por ejemplo, (α*R*, 9*R*)-7-[3,5-bis(trifluorometil)bencil]-8,9,10,11-tetrahidro-9-metil-5-(4-metilfenil)-7*H*-[1,4]diazocino[2,1-g][1,7]naftridina-6-13-diona (TAK-637), 5-[[(2*R*,3*S*)-2-[(1*R*)-1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etoxi-3-(4-fluorofenil)-4-morfolinilometil]-1,2-dihidro-3*H*-1,2,4-triazol-3-ona (MK-869), aprepitant, lanepitant, dapitant o 3-[[2-metoxi-5-(trifluorometoxi)-fenil]metiloamino]-2-fenil-piperidina (2*S*, 3*S*);
- un antagonista muscarínico, por ejemplo, oxibutinina, tolterodina, fesoterodina, 5-hidroximetiltolterodina, propiverina, cloruro de tropsio, darifenacina, solifenacina, temiverina e ipratropio;
- un inhibidor selectivo de la COX-2, por ejemplo, celecoxib, rofecoxib, parecoxib, valdecoxib, deracoxib, etoricoxib o lumiracoxib;
- un analgésico de alquitrán de hulla, en particular, acetaminofeno/paracetamol;
- un neuroléptico tal como droperidol, clorpromazina, haloperidol, perfenazina, tioridazina, mesoridazina, trifluoperazina, flufenazina, clozapina, olanzapina, risperidona, ziprasidona, quetiapina, sertindol, aripiprazol, sonepiprazol, blonanserina, iloperidona, perospirona, racloprida, zotepina, bifeprunox, asenapina, lurasidona, amisulprida, balaperidona, palindora, eplivanserina, osanetant, rimonabant, meclinertant, Miraxion® o sarizotan;
- un agonista (por ejemplo, resiniferatoxina) o antagonista (por ejemplo capsazepina) del receptor vainiloide;
- un beta-adrenérgico tal como propranolol;
- un anestésico local, tal como mexiletina;
- un corticosteroide tal como dexametasona;
- un agonista o antagonista del receptor de 5-HT (por ejemplo, pizotifeno) y, en particular, un agonista de 5-HT1B/1D tal como eletriptán, sumatriptán, naratriptán, zolmitriptán o rizatriptán.
- un antagonista del receptor de 5-HT_{2A} tal como *R*(+)-alfa-(2,3-dimetoxi-fenil)-1-[2-(4-fluorofeniletil)]-4-piperidinemetanol (MDL-100907);
- un analgésico colinérgico (nicotínico), tal como ispronicline (TC-1734), (E)-*N*-metil-4-(3-piridinil)-3-buten-1-amina (RJR-2403), (*R*)-5-(2-azetidinilmethoxy)-2-cloropiridina (ABT-594) o nicotina;
- Tramadol (marca comercial);
- un inhibidor de PDE-5 tal como 5-[2-etoxi-5-(4-metil-1-piperazinil-sulfonil)fenil]-1-metil-3-n-propil-1,6-dihidro-7*H*-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona (sildenafil), (6*R*,12a*R*)-2,3,6,7,12,12a-hexahidro-2-metil-6-(3,4-metilendioxifenil)-pirazin[2',1':6,1]-pirido[3,4-b]indol-1,4-diona (IC-351 o tadalafil), 2-[2-etoxi-5-(4-etil-piperazin-1-il-1-sulfonil)-fenil]-5-metil-7-propil-3*H*-imidazo[5,1-f][1,2,4]triazin-4-ona (vardenafil), 5-(5-acetil-2-butoxi-3-piridinil)-3-etil-2-(1-etil-3-azetidinil)-2,6-dihidro-7*H*-pirazolo[4,3-*d*]pirimidin-7-ona, 5-(5-acetil-2-propoxi-3-piridinil)-3-etil-2-(1-isopropil-3-azetidinil)-2,6-dihidro-7*H*-pirazolo[4,3-*d*]pirimidin-7-ona, 5-[2-etoxi-5-(4-etilpiperazin-1-ilsulfonil)piridin-3-il]-3-etil-2-[2-metoxietil]-2,6-dihidro-7*H*-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona, 4-[(3-cloro-4-metoxibencil)amino]-2-[(2*S*)-2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il]-*N*-(pirimidin-2-ilmetil)pirimidin-5-carboxamida, 3-(1-metil-7-oxo-3-propil-6,7-dihidro-1*H*-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)-*N*-[2-(1-metilpirrolidin-2-il)etil]-4-propoxibencenosulfonamida;
- un ligando alfa-2-delta tal como gabapentina, pregabalina, 3-metilgabapentina, ácido (1α,3α,5α)(3-amino-metil-biciclo[3.2.0]hept-3-il)-acético, ácido (3*S*,5*R*)-3-aminometil-5-metil-heptanoico, ácido (3*S*,5*R*)-3-amino-5-metil-heptanoico, ácido (3*S*,5*R*)-3-amino-5-metil-octanoico, (2*S*,4*S*)-4-(3-clorofenoxi)prolina, (2*S*,4*S*)-4-(3-fluorobencil)-prolina, ácido [(1,5*R*,6*S*)-6-(aminometil)biciclo[3.2.0]hept-6-il]acético, 3-(1-aminometil-ciclohexilmetil)-4*H*-[1,2,4]oxadiazol-5-ona, C-[1-(1*H*-tetrazol-5-ilmetil)-cicloheptil]-metilamina, ácido (3*S*,4*S*)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético, ácido (3*S*,5*R*)-3-amino-5-metil-nonanoico, ácido (3*R*,4*R*,5*R*)-3-amino-4,5-dimetil-heptanoico y ácido (3*R*,4*R*,5*R*)-3-amino-4,5-dimetil-octanoico; ácido (3*S*,5*R*)-3-aminometil-5-metiloctanoico;
- un cannabinoide;
- antagonista metabotrópico del receptor del subtipo 1 de glutamato (mGluR1);

- un inhibidor de la recaptación de la serotonina tal como sertralina, metabolito de sertralina desmetilsertralina, fluoxetina, norfluoxetina (metabolito desmetilo de fluoxetina), fluvoxamina, paroxetina, citalopram, metabolito de citalopram desmetilcitalopram, escitalopram, d,l-fenfluramina, femoxetina, ifoxetina, cianodotiepina, litoxetina, dapoxetina, nefazodona, cericilamina y trazodona;
- un inhibidor de la recaptación de la noradrenalina (norepinefrina), tal como maprotilina, lofepramina, mirtazepina, oxaprotilina, fezolamina, tomoxetina, mianserina, buproprión, metabolito de buproprión hidroxibuproprión, nomifensina y viloxazina (Vivalan®), en especial, un inhibidor selectivo de la recaptación de la noradrenalina tal como la reboxetina, en particular, (S,S)-reboxetina;
- un inhibidor dual de la recaptación de la serotonina-noradrenalina tal como venlafaxina, metabolito de venlafaxina O-desmetilvenlafaxina, clomipramina, metabolito de clomipramina desmetilclomipramina, duloxetina, milnacipran e imipramina;
- un inhibidor inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS) tal como *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-L-homocisteína, *S*-[2-[(1-iminoetil)-amino]etil]-4,4-dioxo-L-cisteína, *S*-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, ácido (2S,5Z)-2-amino-2-metil-7-[(1-iminoetil)amino]-5-heptenoico, 2-[[(1*R*,3*S*)-3-amino-4-hidroxi-1-(5-tiazolil)-butil]tio]-5-cloro-3-piridincarbonitrilo; 2-[[(1*R*,3*S*)-3-amino-4-hidroxi-1-(5-tiazolil)butil]tio]-4-clorobenzonitrilo, (2*S*,4*R*)-2-amino-4-[[2-cloro-5-(trifluorometil)fenil]tio]-5-tiazolbutanol, 2-[[(1*R*,3*S*)-3-amino-4-hidroxi-1-(5-tiazolil)butil]tio]-6-(trifluorometil)-3 piridincarbonitrilo, 2-[[(1*R*,3*S*)-3-amino-4-hidroxi-1-(5-tiazolil)butil]tio]-5-clorobenzonitrilo, *N*-[4-[2-(3-clorobencilamino)etil]fenil]tiofeno-2-carboxamidina o guanidinoetildisulfuro;
- un inhibidor de la acetilcolinesterasa tal como comodonepezil;
- un antagonista de la prostaglandina E2 de subtipo 4 (EP4) tal como ácido *N*-[({2-[4-(2-etil-4,6-dimetil-1*H*-imidazo[4,5-c]piridin-1-il)fenil]etil}amino)-carbonil]-4-metilbencenosulfonamida o 4-[(1*S*)-1-({[5-cloro-2-(3-fluorofenoxi)piridin-3-il]carbonil}amino)etil]benzoico;
- un antagonista de leukotrieno B4, tal como ácido 1-(3-bifenil-4-ilmetil-4-hidroxi-croman-7-il)-ciclopentanocarboxílico (PC-105696), ácido 5-[2-(2-carboxietil)-3-[6-(4-metoxifenil)-5E-hexenil]oxifenoxi]-valérico (ONO-4057) o DPC-11870,
- un inhibidor de 5-lipoxigenasa tal como zileuton, 6-[(3-fluoro-5-[4-metoxi-3,4,5,6-tetrahidro-2*H*-piran-4-il])fenoximetil]-1-metil-2-quinolona (ZD-2138) o 2,3,5-trimetil-6-(3-piridilmetil),1,4-benzoquinona (CV-6504);
- un bloqueador de los canales de sodio tal como lidocaína; o bupivicaína;
- un antagonista de 5-HT3 tal como ondansetrón;
- sustitutivo de la capa de glicosaminoglicanos y antiinflamatorio, tal como el polisulfato de pentosano (Elmiron - marca registrada);
- un agonista beta-3, tal como YM-178 (mirabegron o 2-amino-*N*-[4-[2-[[(2*R*)-2-hidroxi-2-feniletil]amino]etil]fenil]-4-tiazolacetamida), solabegron, KUC-7483 (ritobegron o ácido 2-[4-[2-[[(1S,2*R*)-2-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-1-metiletil]amino]etil]-2,5-dimetilfenoxi]-acético) o AK-134;
- un antihistamínico tal como hidroxicina;
- un antagonista de H_2 tal como la cimetidina; o ranitidina;
- nitrato de plata;
- un esteroide;
- doxorrubicina;
- sulfato de condroitina;
- cromoglicato disódico;
- oxicloroseno (Clorpactin - marca registrada);
- un inmunosupresor tal como la ciclosporina; y
- antiandrógenos, por ejemplo, bicalutamida, flutamida y acetato de ciproterona;
- inhibidores de la 5-alfa-reductasa, por ejemplo, finasterida y dutasterida;
- antibióticos, por ejemplo, ciprofloxacina, norfloxacina, trimetoprima, claritromicina.
- quercertina

y las sales y los solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Administración de un anticuerpo antagonista anti-NGF

El anticuerpo antagonista anti-NGF puede administrarse a un individuo (para el dolor y/o los síntomas del tracto urinario inferior asociados con la prostatitis crónica y/o el síndrome de dolor pélvico crónico) a través de cualquier vía adecuada. Debería ser evidente para un experto en la materia que los ejemplos descritos en el presente documento no pretenden ser limitantes, sino que son ilustrativos de las técnicas disponibles. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF se administra a un individuo de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como la administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o por infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, sublingual, intrasinovial, mediante insuflación, intratecal, transdérmica, oral, por inhalación o tópica. La administración puede ser sistémica, por ejemplo, administración intravenosa o localizada. Los nebulizadores disponibles en el mercado para formulaciones líquidas, que incluyen nebulizadores de chorro y nebulizadores ultrasónicos, son útiles para la administración. Las formulaciones líquidas se pueden nebulizar directamente y el polvo liofilizado se puede nebulizar después de la reconstitución. Como alternativa, el anticuerpo antagonista anti-NGF puede aerosolizarse usando una formulación de fluorocarbono y un inhalador de dosis medida, o inhalarse como un polvo liofilizado y molido.

En una realización, un anticuerpo antagonista anti-NGF se administra a través de técnicas de administración local

dirigidas o específicas del sitio. Los ejemplos de técnicas de administración local específicas del sitio o dirigidas incluyen diversas fuentes de depósito implantables del anticuerpo antagonista anti-NGF o catéteres de administración local, tales como catéteres de infusión, un catéter permanente o un catéter con aguja, injertos sintéticos, envolturas adventiciales, derivaciones y stents u otros dispositivos implantables, vehículos específicos del sitio, inyección directa o aplicación directa. Véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 00/53211 y la patente de EE.UU. n.º 5.981.568.

También se pueden usar para la administración diversas formulaciones de anticuerpos tales como E3 o fragmentos de los mismos (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')2, Fv, Fc, etc.), tales como monocatenarios (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo, y cualquier otra configuración modificada que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno NGF de la especificidad requerida. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF puede administrarse puro. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF y un excipiente farmacéuticamente aceptable pueden estar en diversas formulaciones. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son conocidos en la técnica, y son sustancias relativamente inertes que facilitan la administración de una sustancia farmacológicamente eficaz. Por ejemplo, un excipiente puede dar forma o consistencia, o actuar como diluyente. Los excipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, agentes estabilizantes, agentes humectantes y emulsionantes, sales para variar la osmolaridad, agentes encapsulantes, tampones y potenciadores de la penetración en la piel. Los excipientes así como las formulaciones para el suministro de fármacos parenteral y no parenteral se exponen en "Remington, The Science y Practice of Pharmacy" 20ª Ed. Mack Publishing (2000).

En algunas realizaciones, estos agentes se formulan para la administración por inyección (por ejemplo, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscular, etc.). Por consiguiente, estos agentes se pueden combinar con vehículos farmacéuticamente aceptables tales como solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y similares. La pauta posológica particular, es decir, le dosis, el momento y la repetición, dependerán del individuo en particular y de la historia médica de ese individuo.

Se puede administrar un anticuerpo anti-NGF usando cualquier procedimiento adecuado, incluyendo por inyección (por ejemplo, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscularmente, etc.). Los anticuerpos anti-NGF también pueden administrarse mediante inhalación u otras formas de administración (por ejemplo, oral, mucosal, sublingual), como se describe en el presente documento. En general, para la administración de anticuerpos anti-NGF, una dosis candidata inicial puede ser de aproximadamente 2 mg/kg.

En una realización preferida, la concentración del anticuerpo que se va a administrar puede variar de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 mg/ml. Preferentemente, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 0,5 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 4 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 7 mg/ml, aproximadamente 8 mg/ml, aproximadamente 9 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 11 mg/ml, aproximadamente 12 mg/ml, aproximadamente 13 mg/ml, aproximadamente 14 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 16 mg/ml, aproximadamente 17 mg/ml, aproximadamente 18 mg/ml, aproximadamente 19 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 21 mg/ml, aproximadamente 22 mg/ml, aproximadamente 23 mg/ml, aproximadamente 24 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 26 mg/ml, aproximadamente 27 mg/ml, aproximadamente 28 mg/ml, aproximadamente 29 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 31 mg/ml, aproximadamente 32 mg/ml, aproximadamente 33 mg/ml, aproximadamente 34 mg/ml, aproximadamente 35 mg/ml, aproximadamente 36 mg/ml, aproximadamente 37 mg/ml, aproximadamente 38 mg/ml, aproximadamente 39 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 41 mg/ml, aproximadamente 42 mg/ml, aproximadamente 43 mg/ml, aproximadamente 44 mg/ml, aproximadamente 45 mg/ml, aproximadamente 46 mg/ml, aproximadamente 47 mg/ml, aproximadamente 48 mg/ml, aproximadamente 49 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 51 mg/ml, aproximadamente 52 mg/ml, aproximadamente 53 mg/ml, aproximadamente 54 mg/ml, aproximadamente 55 mg/ml, aproximadamente 56 mg/ml, aproximadamente 57 mg/ml, aproximadamente 58 mg/ml, aproximadamente 59 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml o aproximadamente 110 mg/ml. Lo más preferentemente, la concentración de anticuerpo se selecciona del grupo que comprende aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 2,5 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 15mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 22 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml.

En algunas realizaciones, el patrón de administración del anticuerpo anti-NGF comprende la administración de una dosis una vez a la semana, una vez cada 2 semanas, cada 3 semanas, cada 4 semanas, cada 5 semanas, cada 6 semanas, cada 7 semanas, cada 8 semanas, cada 9 semanas, cada 10 semanas, cada 15 semanas, cada 20 semanas, cada 25 semanas o más. En algunas realizaciones, el anticuerpo se administra una vez cada 1 mes, cada 2 meses, cada 3 meses, cada 4 meses, cada 5 meses, cada 6 meses o más. Lo más preferentemente, el anticuerpo anti-NGF se administra una vez cada 8 semanas. El progreso de esta terapia puede controlarse mediante técnicas y ensayos convencionales. La pauta posológica (incluyendo el/los antagonista/s de NGF usado/s) puede variar con el tiempo.

En algunas realizaciones, el volumen de una dosis es inferior o igual a aproximadamente 20 ml, aproximadamente 15 ml, aproximadamente 10 ml, aproximadamente 5 ml, aproximadamente 2,5 ml, aproximadamente 1,5 ml,

aproximadamente 1,0 ml, aproximadamente 0,75 ml, aproximadamente 0,5 ml, aproximadamente 0,25 ml o aproximadamente 0,01 ml. En algunas realizaciones el volumen de una dosis es de aproximadamente 20 ml, aproximadamente 19 ml, aproximadamente 18 ml, aproximadamente 17 ml, aproximadamente 16 ml, aproximadamente 15 ml, aproximadamente 14 ml, aproximadamente 13 ml, aproximadamente 12 ml, aproximadamente 11 ml, aproximadamente 10 ml, aproximadamente 9 ml, aproximadamente 8 ml, aproximadamente 7 ml, aproximadamente 6 ml, aproximadamente 5 ml, aproximadamente 4 ml, aproximadamente 3 ml, aproximadamente 2 ml o aproximadamente 1 ml. Como alternativa, de aproximadamente 20,5 ml, aproximadamente 19,5 ml, aproximadamente 18,5 ml, aproximadamente 17,5 ml, aproximadamente 16,5 ml, aproximadamente 15,5 ml, aproximadamente 14,5 ml, aproximadamente 13,5 ml, aproximadamente 12,5 ml, aproximadamente 11,5 ml, aproximadamente 10,5 ml, aproximadamente 9,5 ml, aproximadamente 8,5 ml, aproximadamente 7,5 ml, aproximadamente 6,5 ml, aproximadamente 5,5 ml, aproximadamente 4,5 ml, aproximadamente 3,5 ml, aproximadamente 2,5 ml, aproximadamente 1,5 ml o aproximadamente 0,5. Como alternativa, de aproximadamente 900 µl, aproximadamente 800 µl, aproximadamente 700 µl, aproximadamente 600 µl, aproximadamente 500 µl, aproximadamente 400 µl, aproximadamente 300 µl, aproximadamente 200 µl o aproximadamente 100 µl, como alternativa, de aproximadamente 950 µl, aproximadamente 850 µl, aproximadamente 750 µl, aproximadamente 650 µl, aproximadamente 550 µl, aproximadamente 450 µl, aproximadamente 350 µl, aproximadamente 250 µl, aproximadamente 150 µl o aproximadamente 50 µl. Lo más preferentemente, el volumen de la dosis es inferior o igual a aproximadamente 2,5 ml.

De acuerdo con una realización preferida, la dosis contiene menos de o igual a aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 4 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 6 mg, aproximadamente 7 mg, aproximadamente 8 mg, aproximadamente 9 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 11 mg, aproximadamente 12 mg, aproximadamente 13 mg, aproximadamente 14 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 16 mg, aproximadamente 17 mg, aproximadamente 18 mg, aproximadamente 19 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 21 mg, aproximadamente 22 mg, aproximadamente 23 mg, aproximadamente 24 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 26 mg, aproximadamente 27 mg, aproximadamente 28 mg, aproximadamente 29 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 31 mg, aproximadamente 32 mg, aproximadamente 33 mg, aproximadamente 34 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 36 mg, aproximadamente 37 mg, aproximadamente 38 mg, aproximadamente 39 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 41 mg, aproximadamente 42 mg, aproximadamente 43 mg, aproximadamente 44 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 46 mg, aproximadamente 47 mg, aproximadamente 48 mg, aproximadamente 49 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 51 mg, aproximadamente 52 mg, aproximadamente 53 mg, aproximadamente 54 mg, aproximadamente 55 mg, aproximadamente 56 mg, aproximadamente 57 mg, aproximadamente 58 mg, aproximadamente 59 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 100 mg o aproximadamente 110 mg de anticuerpo. Lo más preferentemente, la dosis contiene menos de o igual a aproximadamente 50 mg of anticuerpo.

De acuerdo con una realización preferida, la dosis contiene una cantidad de anticuerpo que es de aproximadamente 1 µg/kg, aproximadamente 10 µg/kg, aproximadamente 20 µg/kg, aproximadamente 50 µg/kg, aproximadamente 100 µg/kg, aproximadamente 200 µg/kg, aproximadamente 500 µg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg o aproximadamente 11 mg/kg (de masa del mamífero a la que se administra la dosis).

Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas o hasta que se alcancen niveles terapéuticos suficientes para reducir el dolor. En una realización, una pauta posológica puede comprender administrar una dosis inicial de aproximadamente 2 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 1 mg/kg del anticuerpo anti-NGF, o seguida de una dosis de mantenimiento de aproximadamente 1 mg/kg cada dos semanas. Sin embargo, otras pautas posológicas pueden ser útiles, dependiendo del patrón de deterioro farmacocinético que el médico desee lograr. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se contempla la dosificación de una a cuatro veces por semana. Incluso se puede usar una dosificación menos frecuente.

Para el fin de la presente invención, la dosificación apropiada de un anticuerpo antagonista anti-NGF dependerá del anticuerpo (o de las composiciones de los mismos) que se empleen, del tipo y de la gravedad del dolor o del síntoma del tracto urinario inferior que se vaya a tratar, si el agente se administra con fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, historial clínico del paciente y respuesta al agente, y la discreción del médico tratante. Por lo general, el clínico administrará un anticuerpo antagonista anti-NGF, hasta que se alcance una dosis que logre el resultado deseado. La dosis y/o frecuencia pueden variar en el transcurso del tratamiento.

Las consideraciones empíricas, tales como la semivida, en general, contribuirán a la determinación de la dosis. Por ejemplo, los anticuerpos que son compatibles con el sistema inmune humano, tales como los anticuerpos humanizados o anticuerpos completamente humanos, pueden usarse para prolongar la semivida del anticuerpo y para evitar que el anticuerpo sea atacado por el sistema inmune del huésped. La frecuencia de administración puede determinarse y ajustarse en el transcurso de la terapia, y en general, pero no necesariamente, se basa en el

tratamiento y/o la supresión y/o la mejora y/o la demora del dolor. Como alternativa, las formulaciones de liberación continua sostenida de anticuerpos antagonistas anti-NGF pueden ser apropiadas. En la técnica, se conocen diversas formulaciones y dispositivos para lograr la liberación sostenida.

En algunos individuos, se puede requerir más de una dosis. La frecuencia de administración puede determinarse y ajustarse en el transcurso de la terapia. Por ejemplo, la frecuencia de administración se puede determinar o ajustar según el tipo y la gravedad del dolor y/o el síntoma del tracto urinario inferior que se vaya a tratar, ya sea que el agente se administre con fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, historia clínica del paciente y respuesta al agente, y la opinión del médico tratante. Por lo general, el clínico administrará un anticuerpo antagonista anti-NGF (tal como E3), hasta que se alcance una dosis que logre el resultado deseado. En algunos casos, pueden ser apropiadas formulaciones de liberación continua sostenida de anticuerpos E3. En la técnica, se conocen diversas formulaciones y dispositivos para lograr la liberación sostenida.

En una realización, las dosis para un anticuerpo antagonista anti-NGF pueden determinarse empíricamente en individuos a quienes se les haya administrado una o más administraciones de un antagonista de NGF. Los individuos reciben dosis en incrementos de un anticuerpo antagonista anti-NGF. Para evaluar la eficacia de un anticuerpo antagonista anti-NGF, se puede hacer un seguimiento de un indicador del dolor o de los síntomas del tracto urinario inferior tal como cambio en una Escala Numérica de Evaluación del Dolor (NRS) tal como un NRS de puntos; un cambio en la puntuación del Índice de Síntomas de la Prostatitis Crónica (CPSI); cambios en las variables del diario sintomático incluyendo la frecuencia miccional, frecuencia nocturna, frecuencia del episodio de incontinencia, volumen medio vaciado por micción, gravedad media del dolor por prostatitis crónica, episodios de urgencia urinaria, puntuación media de alteración del sueño, puntuación del dolor medio asociado con la eyaculación; cambio en la evaluación de la respuesta global (GRA), cambio en el impacto del tratamiento informado por el paciente (PRTI), fallos en el tratamiento, biomarcadores, criterios de valoración de seguridad y/o medidas farmacocinéticas. Los criterios de valoración de la seguridad pueden incluir eventos adversos, exploración física (incluyendo los signos vitales y el examen neurológico), medición del volumen residual posterior al vaciado (PVR), análisis de laboratorio clínico (incluyendo el análisis de orina) y electrocardiogramas. Los biomarcadores pueden incluir NGF, interleucinas, TNF-alfa, ENA-78 (CXCL5), antígeno prostático específico (PSA), proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1) y proteína-1-alfa inflamatoria de macrófagos (MIP-1 a), hormonas adrenocorticales que incluyen, pero sin limitación, testosterona, androstenediona, 11-desoxicortisol y progesterona.

La administración de un anticuerpo antagonista anti-NGF de acuerdo con el procedimiento en la presente invención puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, de la condición fisiológica del receptor, si el fin de la administración es terapéutico o profiláctico, y otros factores conocidos por los expertos. La administración de un anticuerpo antagonista anti-NGF puede ser esencialmente continua durante un período de tiempo preseleccionado o puede estar en una serie de dosis espaciadas, por ejemplo, antes, durante o después de desarrollar dolor y/o síntomas del tracto urinario inferior asociados con la prostatitis y/o el síndrome de dolor pélvico crónico; antes de; durante; antes y después de; durante y después; antes y durante; o antes, durante y después de desarrollar dolor y/o síntomas del tracto urinario inferior asociados con la prostatitis crónica y/o el síndrome de dolor pélvico crónico.

En algunas realizaciones, puede estar presente más de un anticuerpo antagonista anti-NGF. Puede haber al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco anticuerpos antagonistas anti-NGF diferentes o más. En general, esos anticuerpos antagonistas anti-NGF tienen actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Los antagonistas de NGF también pueden usarse junto con otros agentes que sirvan para mejorar y/o complementar la efectividad de los agentes.

Las formulaciones terapéuticas del anticuerpo antagonista anti-NGF usado de acuerdo con la presente invención se preparan para el almacenamiento mezclando un anticuerpo que tenga el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (“Remington, The Science y Practice of Pharmacy” 20ª Ed. Mack Publishing (2000)), en forma de formulaciones o soluciones acuosas liofilizadas.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares que son fisiológicamente compatibles. Por lo general, el vehículo es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo, parte de unión al antígeno del mismo, inmunoconjugamiento o molécula biespecífica, puede revestirse en un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar el compuesto.

Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, y pueden comprender tampones tales como fosfato, citrato, acetato y otros ácidos orgánicos que incluyen tampones de aminoácidos; sales tales como cloruro de sodio; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol butílico o bencílico, alquilparabenos tales como metil- o propil-parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina,

asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polisorbato, Tween TM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación pueden estar presentes en una forma neutra (que incluye formas zwitteriónicas) o como una especie cargada positiva o negativamente. En algunos casos, los anticuerpos pueden complejarse con un contraión para formar una sal farmacéuticamente aceptable. Por lo tanto, los compuestos farmacéuticos de la divulgación pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto precursor (por ejemplo, anticuerpo) y no confiere efectos toxicológicos no deseados (véase, por ejemplo, Berge, S.M. y col. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Por ejemplo, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" incluye un complejo que comprende uno o más anticuerpos y uno o más contraiones, donde los contraiones se derivan de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos farmacéuticamente aceptables.

Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono- y dicarboxílicos, ácidos alcanoicos fenil-sustituidos, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de base incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como *N,N'*-dibenciletilendiamina, *N*-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Además, las bases inorgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen iones metálicos. Los iones metálicos incluyen, pero sin limitación, sales apropiadas de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos y otros iones metálicos fisiológicamente aceptables. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen de aluminio, amonio, calcio, cobalto, níquel, molibdeno, vanadio, manganeso, cromo, selenio, estaño, cobre, férricas, ferrosas, litio, magnesio, sales mangánicas, manganosas, de potasio, rubidio, sodio y cinc, y en sus valencias habituales.

Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los anticuerpos de la presente divulgación se pueden preparar a partir de los siguientes ácidos, que incluyen, sin limitación, ácido fórmico, acético, acetamidobenzoico, adípico, ascórbico, bórico, propiónico, benzoico, canfórico, carbónico, ciclámico, deshidrocólico, malónico, edético, etilsulfúrico, fendizoico, metafosfórico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, málico, tartárico, tánico, cítrico, nítrico, ascórbico, glucurónico, maleico, fólico, fumárico, propiónico, pirúvico, aspártico, glutámico, benzoico, clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, lisina, isocítrico, trifluoroacético, pamoico, propiónico, antranílico, mesílico, orótico, oxálico, oxalacético, oleico, esteárico, salicílico, aminosalicílico, silicato, *p*-hidroxibenzoico, nicotínico, fenilacético, mandélico, embónico, sulfónico, metanosulfónico, fosfórico, fosfónico, etanosulfónico, etanodisulfónico, amonio, bencenosulfónico, pantoténico, naftalenosulfónico, toluenosulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, sulfanílico, sulfúrico, nítrico, nitroso, éster monometílico del ácido sulfúrico, ciclohexilaminosulfónico, β-hidroxibutírico, glicina, glicilglicina, glutámico, cacodilato, diaminohexanoico, canforsulfónico, glucónico, tiociánico, oxoglutárico, piridoxal 5-fosfato, clorofenoxiacético, undecanoico, *N*-acetil-L-aspártico, galactérico y ácidos galacturónicos.

Las bases orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen trimetilamina, dietilamina, *N,N'*-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dibencilamina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (*N*-metilglucamina), procaína, aminas cíclicas, cationes de amonio cuaternario, arginina, betaína, cafeína, clemizol, 2-etilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanodiamina, butilamina, etanolamina, etilendiamina, *N*-etilmorfolina, *N*-etilpiperidina, etilglucamina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, imidazol, isopropilamina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piridina, piridoxina, neodimio, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, tripropilamina, trietanolamina, trometamina, metilamina, taurina, colato, 6-amino-2-metil-2-heptanol, 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol, 2-amino-2-metil-1-propanol, ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanoicos fenilsustituidos, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, estroncio, tricina, hidrazina, fenilciclohexilamina, ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico, bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano, ácido *N*-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico, ácido 1,4-piperazindietanesulfónico, ácido 3-morfolin-2-hidroxipropanosulfónico, 1,3-bis[tris(hidroximetil)metilamino]propano, ácido 4-morfolinpropanosulfónico, ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etanosulfónico, ácido 2-[(2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil)amino]etanosulfónico, ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico, ácido 4-(*N*-morfolino)butanosulfónico, ácido 3-(*N,N*-bis[2-hidroxietil]amino)-2-hidroxipropanosulfónico, ácido 2-hidroxi-3-[tris(hidroximetil)metilamino]-1-propanosulfónico, ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-(2-hidroxipropanosulfónico), dihidrato de ácido piperazin-1,4-bis(2-hidroxi-propanosulfónico), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinapropanosulfónico, *N,N*-bis(2-hidroxietil)glicina, ácido *N*-(2-hidroxietil) piperazin-*N'*-(4-butanosulfónico), ácido *N*-[tris(hidroximetil)metil]-3-aminopropanosulfónico, ácido *N*-tris(hidroximetil)metil-4-aminobutanosulfónico, ácido *N*-(1,1-dimetil-2-hidroxietil)-3-amino-2-hidroxipropanosulfónico, ácido 2-(ciclohexilamino)etanosulfónico, ácido 3-(ciclohexilamino)-2-hidroxi-1-propanosulfónico, ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico, ácido *N*-(2-acetamido)iminodiacético, ácido 4-(ciclohexilamino)-1-butanesulfónico, *N*-[tris(hidroximetil)metil]glicina, 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol y trometamol.

Otras formulaciones incluyen formas de administración adecuadas conocidas en la técnica que incluyen, pero sin limitación, vehículos tales como liposomas. Véase, por ejemplo, Mahato y col. (1997) *Pharm. Res*. 14:853-859. Los preparados liposomales incluyen, pero sin limitación, citofectinas, vesículas multilamelares y vesículas unilaminares.

Los liposomas que contienen el anticuerpo antagonista anti-NGF se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 82:3688 (1985); Hwang y col., *Proc. Natl Acad. Sci.* EE.UU., 77:4030 (1980); las patentes de EE.UU. n.º 4.485.045 y 4.544.545. En la patente de EE.UU. n.º 5.013.556, se describen liposomas con un tiempo de circulación mejorado. Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el procedimiento de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprenda fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado.

Los principios activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en “Remington, The Science and Practice of Pharmacy” 20ª Ed. Mack Publishing (2000).

Se pueden preparar preparados de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparados de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el antagonista (tal como el anticuerpo), cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y 7-etil-L-glutamato, etilenvinilacetato no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT TM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), isobutirato de acetato de sacarosa y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones que se usarán para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante, por ejemplo, filtración a través de membranas de filtración estériles.

En general, las composiciones terapéuticas de anticuerpos antagonistas anti-NGF se colocan en un recipiente que tenga un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o un vial de solución intravenosa que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Las composiciones terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una composición terapéutica de la divulgación puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos desvelados en las patentes de EE.UU. n.º 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente divulgación incluyen: la patente de EE.UU. n.º 4.487.603, que desvela una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicamentos a una velocidad controlada; la patente de EE.UU. n.º 4.486.194, que desvela un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la patente de EE.UU. n.º 4.447.233, que desvela una bomba de infusión de medicamentos para administrar medicamentos a una velocidad de infusión exacta; la patente de EE.UU. n.º 4.447.224, que desvela un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármacos; la patente de EE.UU. n.º 4.439.196, que desvela un sistema de administración de fármacos osmótico que tiene compartimentos de múltiples cámaras; y la patente de EE.UU. n.º 4.475.196, que desvela un sistema de administración de fármacos osmótico. Muchos otros implantes, sistemas de administración y módulos de este tipo son conocidos por los expertos en la técnica.

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

Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, se mezcla el principio activo principal con un vehículo farmacéutico, por ejemplo, ingredientes de formación de comprimidos convencionales tales como almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato de dicalcio o gomas, y otros diluyentes farmacéuticos, por ejemplo, agua, para formar una composición de preformulación sólida que contenga una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable no tóxica del mismo. Cuando se hace referencia a estas composiciones de preformulación como homogéneas, se entiende que el principio activo se dispersa uniformemente en toda la composición de modo que la composición se puede subdividir fácilmente en formas de dosificación unitarias igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta composición de preformulación sólida se subdivide entonces en formas de dosificación unitaria del tipo descrito anteriormente que contienen de 0,1 a aproximadamente 500 mg del principio activo de la presente invención. Los comprimidos o píldoras de la nueva composición se pueden revestir o componer de otro modo para proporcionar una forma de dosificación que proporcione la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o la píldora pueden comprender un componente de dosis interna y un componente de dosificación

externo, estando el último en forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes se pueden separar mediante una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permite que el componente interno pase intacto al duodeno o se retrase su liberación. Se puede usar una variedad de materiales para dichas capas o revestimientos entéricos, incluyendo dichos materiales una serie de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

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

Las emulsiones adecuadas se pueden preparar usando emulsiones de grasas disponibles en el mercado, tales como Intralipid™, Liposyn™, Infonutrol™, Lipofundin™ y Lipiphysan™. El principio activo puede disolverse en una composición de emulsión premezclada o, como alternativa, puede disolverse en un aceite (por ejemplo, aceite de soja, aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de maíz o almendra) y formarse una emulsión al mezclarse con un fosfolípido (por ejemplo, fosfolípidos de huevo, fosfolípidos de soja o lecitina de soja) y agua. Se apreciará que pueden añadirse otros ingredientes, por ejemplo, glicerol o glucosa, para ajustar la tonicidad de la emulsión. Las emulsiones adecuadas normalmente contendrán hasta un 20 %de aceite, por ejemplo, entre el 5 y 20 %. La emulsión de grasa puede comprender gotitas de grasa entre de 0,1 y 1,0. Im, en particular de entre 0,1 y 0,5. Im y tener un pH en el intervalo de 5,5 a 8,0.

Las composiciones en emulsión pueden ser aquellas preparadas mezclando un anticuerpo anti-NGF con Intralipid™ o sus componentes (aceite de soja, fosfolípidos de huevo, glicerol y agua).

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

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

Un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos de la invención (tal como el anticuerpo E3) también puede usarse para la administración y expresión de cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos de la invención (tal como el anticuerpo E3) en una célula deseada. Es evidente que se puede usar un vector de expresión para dirigir la expresión de un anticuerpo o polipéptido E3. El vector de expresión puede administrarse por cualquier medio conocido en la materia, tal como por vía intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal, dérmica, sublingual o por inhalación. Por ejemplo, la administración de vectores de expresión incluye la administración local o sistémica, que incluye inyección, administración oral, pistola de partículas o administración por cateterización y administración tópica. Un experto en la materia está familiarizado con la administración de vectores de expresión para obtener la expresión de una proteína exógena *in vivo*. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 6.436.908; 6.413.942; y 6.376.471.

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

Los vectores basados en virus para la administración de un polinucleótido deseado y la expresión en una célula deseada son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de vehículos basados en virus incluyen, pero sin limitación, retrovirus recombinantes (véanse, por ejemplo, Publicaciones PCT n.º WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; patentes de EE.UU. n.º 5.219.740; 4.777.127; Patente de GB n.º 2.200.651; y patente EP n.º 0 345 242), vectores basados en alfavirus (por ejemplo, vectores del virus Sindbis, virus del bosque Semliki (ATCC VR-67, ATCC VR-1247), virus del río Ross (ATCC VR-373; ATCC VR-1246). y el virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)) y los vectores del virus adenoasociado (AAV) (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT n.º WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 y WO 95/00655). También se puede emplear la administración de ADN unido a adenovirus muerto como se describe en Curiel, *Hum. Gene Ther.* (1992) 3:147.

También se pueden emplear vehículos y procedimientos de administración no víricos, que incluyen, pero sin limitación, ADN condensado policatiónico unido o no unido a adenovirus muerto solo (véase, por ejemplo, Curiel, *Hum. Gene Ther.* (1992) 3:147); ADN unido a ligando (véase, por ejemplo, Wu, *J. Biol. Chem.* (1989) 264:16985); células de vehículos de administración de células eucariotas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.814.482; publicaciones de PCT n.º WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; y WO 97/42338) y neutralización de la carga nucleica o fusión con membranas celulares. También se puede emplear ADN desnudo. Los ejemplos de procedimientos de introducción de ADN desnudo se describen en la Publicación PCT n.º WO 90/11092 y en la patente de EE.UU. n.º 5.580.859. Los liposomas que pueden actuar como vehículos de administración de genes se describen en la patente de EE.UU. n.º 5.422.120; Publicaciones PCT n.º WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; y patente EP n.º 0 524 968.En Philip, *Mol. Cell Biol.* (1994) 14:2411 y en Woffendin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1994) 91:1581, se describen otros enfoques adicionales.

Procedimientos de y usos de diagnóstico

Los anticuerpos descritos en el presente documento también pueden usarse en la detección, el diagnóstico y el control del dolor y/o un síntoma del tracto urinario inferior asociado con la prostatitis crónica y/o el síndrome del dolor pélvico crónico asociado con la expresión alterada o aberrante de NGF (en algunos realizaciones, expresión de NGF aumentada o disminuida (con respecto a una muestra normal), y/o expresión inapropiada, tal como presencia de expresión en tejido/s y/o célula/s que normalmente carecen de expresión de NGF, o ausencia de expresión de NGF en tejido/s o célula/s que normalmente poseen expresión de NGF). En algunas realizaciones, la expresión de NGF se detecta en una muestra de un individuo sospechoso de tener dolor y/o síntomas del tracto urinario inferior asociados con la prostatitis crónica y/o el síndrome del dolor pélvico crónico.

Así pues, en algunas realizaciones, la invención proporciona procedimientos que comprenden poner en contacto una muestra de un individuo sospechoso de tener expresión de NGF alterada o aberrante con un anticuerpo o polipéptido de la invención y determinar si el nivel de NGF difiere del de un control o muestra de comparación.

En otras realizaciones, la invención proporciona procedimientos que comprenden poner en contacto una muestra de un individuo y determinar el nivel de expresión de NGF. En algunas realizaciones, se sospecha que el individuo tiene dolor y/o un síntoma del tracto urinario inferior asociado con la prostatitis crónica y/o el síndrome de dolor pélvico crónico.

Para aplicaciones de diagnóstico, normalmente se marcará el anticuerpo con un resto detectable que incluye, pero sin limitación, radioisótopos, marcadores fluorescentes y diversos marcadores de sustrato enzimático. Los procedimientos para conjugar marcadores a un anticuerpo son conocidos en la técnica. En otras realizaciones de la invención, los anticuerpos de la invención no necesitan marcarse, y la presencia de los mismos puede detectarse usando un anticuerpo marcado que se una a los anticuerpos de la invención.

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

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

El anticuerpo también puede usarse como reactivo de tinción en patología, siguiendo técnicas bien conocidas en la materia.

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

Kits que comprenden anticuerpos antagonistas anti-NGF para su uso en detección y/o terapia

La invención también proporciona kits que comprenden anticuerpos para su uso en detección y/o terapia. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los kits comprenden un anticuerpo E3. En algunas realizaciones, el kit comprende cualquier anticuerpo o polipéptido descrito en el presente documento. En otros aspectos, los kits se pueden usar para cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, tratar a un individuo con dolor y/o un síntoma del tracto urinario inferior asociado con la prostatitis crónica y/o el síndrome de dolor pélvico crónico. Los kits de la presente invención están en un envase adecuado, y pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales tales como tampones e instrucciones para el uso del anticuerpo en cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, los kits incluyen instrucciones para tratar el dolor o los síntomas del tracto urinario inferior. En algunas realizaciones, el kit comprende un anticuerpo antagonista anti-NGF descrito en el presente documento e instrucciones para tratar y/o prevenir el dolor y/o los síntomas del tracto urinario inferior asociados con la prostatitis crónica y/o el síndrome de dolor pélvico crónico en un individuo. En algunas de las realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF es el anticuerpo E3.

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

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar, pero no limitar, la invención. Los ejemplos del documento WO2004/058184 se mencionan para ilustrar los anticuerpos para su uso en la presente invención. El contenido completo del documento WO2004/058184 se incorpora en el presente documento por referencia.

Ejemplos

Ejemplo 1: Humanización y maduración por afinidad del anticuerpo anti-NGF antagonista de ratón 911

A. Procedimientos generales

En el presente ejemplo, se usaron los siguientes procedimientos generales.

Generación de genotecas

Las genotecas se generaron mediante mutagénesis en casete de PCR con oligonucleótidos degenerados como se describe en Kay y col. (1996), “Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual”, San Diego, Academic Press (véanse las páginas 277-291). Se usó el codón de dopaje NNK para aleatorizar una posición de aminoácido para incluir 20 posibles aminoácidos. Para aleatorizar una posición de aminoácido para que incluya solo un subconjunto de aminoácidos con propiedades específicas, se usaron codones de dopaje como se describe en Balint y col, (1993) *Gene* 137(1):109-18). La mutagénesis dirigida al sitio se realizó usando PCR recombinante como se describe Innis y col (1990) “PCR protocols: A guide to methods and applications” (véanse, pág. 177-183).

Preparación de Fab a pequeña escala

Se optimizó la expresión a pequeña escala en placas de 96 pocillos para explorar las genotecas de Fab. Partiendo de *E. coli* transformada con una genoteca de Fab, se recogieron colonias para inocular tanto una placa maestra (agar LB + ampicilina (50 µg/ml) + glucosa al 2 %) como una placa de trabajo (2 ml/pocillo, 96 pocillos/placa que contiene 1,5 ml de LB + ampicilina (50 µg/ml) + glucosa al 2 %). Se cultivaron ambas placas a 30 ºC durante 8-12 horas. La placa maestra se almacenó a 4 ºC y las células de la placa de trabajo se sedimentaron a 5.000 rpm y se volvieron a suspender con 1 ml de LB + ampicilina (50 µg/ml) + IPTG 1 mM para inducir la expresión de los Fab. Se recogieron las células por centrifugación después de 5 h de tiempo de expresión a 30 ºC, luego se volvieron a suspender en 500 µl de tampón HBS-EP (tampón HEPES 100 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, P20 al 0,005 %, EDTA 3 mM). La lisis de células resuspendidas con HBS-EP se logró mediante un ciclo de congelación (-80 ºC) y luego se descongeló a 37 ºC. Los lisados celulares se centrifugaron a 5.000 rpm durante 30 minutos para separar los restos celulares de los sobrenadantes que contenían Fab. A continuación, se inyectaron los sobrenadantes en el aparato de resonancia de plasmones BIAcore para obtener información de afinidad para cada Fab. Los clones que expresan fragmentos Fab se rescataron de la placa maestra para secuenciar el ADN y para la producción de Fab a gran escala y la caracterización detallada como se describe a continuación.

Preparación de Fab a gran escala

Para obtener parámetros cinéticos detallados, se expresaron los Fab y se purificaron a partir de cultivos de gran tamaño. Se inocularon matraces Erlenmeyer que contenían 200 ml. de LB + ampicilina (50 µg/ml) + glucosa al 2 %con 5 ml. de cultivo durante la noche de un clon de *E. coli* que expresaba Fab seleccionado. Los clones se incubaron a 30 ºC hasta que se alcanzó una DO_{550nm} de 1,0 y luego se indujo reemplazando el medio por 200 ml de LB + ampicilina (50 µg/ml) + IPTG 1 mM. Tras 5 h de tiempo de expresión a 30 ºC, se sedimentaron las células por centrifugación, luego se volvieron a suspender en 10 ml de PBS (pH 8). La lisis de las células se obtuvo mediante dos ciclos de congelación/descongelación (a -80 ºC y 37 ºC, respectivamente). Se cargó el sobrenadante de los

lisados celulares en columnas equilibradas Ni-NTA superflow sepharose (Qiagen, Valencia. CA) con PBS, pH 8, luego se lavaron con 5 volúmenes de columna de PBS, pH 8. Los Fab individuales se eluyeron en diferentes fracciones con PBS (pH 8) + imidazol 300 mM. Se combinaron las fracciones que contenían Fab y se dializaron en PBS, luego se cuantificaron mediante ELISA antes de la caracterización de afinidad.

Preparación de anticuerpos completos

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

Ensayo Biacor

Se determinaron las afinidades de los Fab anti-NGF y los anticuerpos monoclonales usando el sistema BIAcore3000™ de resonancia de plasmón superficial (SPR) (BIAcore, INC, Piscaway NJ). Se activaron chips CM5 con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiinida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diluyó NGF humano en acetato de sodio 10 mM, pH 4,0, y se inyectó sobre el chip activado a una concentración de 0,005 mg/ml. Usando un tiempo de flujo variable a través de los canales de chip individuales, se alcanzaron dos intervalos de densidad de antígeno: 100-200 unidades de respuesta (UR) para estudios cinéticos detallados y de 500 a 600 UR para los ensayos de detección. El chip se bloqueó con etanolamina. Los estudios de regeneración mostraron que una mezcla de tampón de elución Pierce (Producto n.º 21004, Pierce Biotechnology, Rockford IL) y NaCl 4 M (2:1) eliminaron eficazmente el Fab unido mientras mantenían la actividad de hNGF en el chip durante más de 200 inyecciones. Se usó tampón HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15, EDTA 3 mM, Tensioactivo P29 al 0,005 %) como tampón de ejecución para los ensayos BIAcore.

Ensayo de detección

Se optimizó un ensayo BIAcore de detección para determinar la afinidad de los clones Fab de las genotecas. Se inyectaron sobrenadantes de lisados de cultivo de pequeño tamaño a 50 µl/min durante 2 min. Se usaron tiempos de disociación de 10 a 15 minutos para la determinación de una velocidad de disociación exponencial única (k_{off}) usando el software BIAevaluation. Se inyectaron muestras que presentaban velocidades de k_{off} en el mismo intervalo que el molde usado para crear la genoteca (clon 8L2-6D5, k_{off} 1 x 10^{-3} s^{-1}) para confirmación y se permitió que los tiempos de disociación de hasta 45 minutos obtuvieran mejores valores de k_{off}. Los clones que presentaban valores de k_{off} mejorados (más lentos) se expresaron a gran escala y los parámetros cinéticos completos, k_{on} y k_{off}, se determinaron en la proteína purificada. El ensayo fue capaz de detectar diferencias en la afinidad que eran de aproximadamente el doble o superiores.

Ensayo de determinación de la afinidad

Se inyectaron diluciones en serie (K_D estimadas de 10 x 0,1) de muestras de Fab purificadas durante 1 minuto a 1 µl/min y se permitieron tiempos de disociación de hasta 2 h. Se determinaron las concentraciones de las proteínas Fab mediante ELISA y/o electroforesis SDS-PAGE usando como patrón un Fab de concentración conocida (determinada por análisis de aminoácidos). Se obtuvieron simultáneamente las velocidades de asociación cinética (k_{on}) y las velocidades de disociación (k_{off}) ajustando los datos a un modelo de unión Langmuir 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6. 99-110) usando el programa BIAevaluation. Los valores de la constante de disociación en equilibrio (K_D) se calcularon como k_{off}/k_{on}. B.

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

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

La humanización y la maduración por afinidad se realizaron en varias etapas, de la siguiente manera:

1) Preparación del molde injertado con CDR Se injertaron las CDR extendidas de cadena ligera del anticuerpo 911 (es decir, que incluyen ambas regiones CDR de Kabat y Chothia) en las secuencias aceptoras de línea germinal humana 08 con JK2, y las CDR extendidas de cadena pesada del anticuerpo 911 se injertaron en la secuencia aceptora de línea germinal humana VH4-59 con JH4. Las secuencias de aminoácidos de las secuencias aceptoras de la línea germinal humana se muestran en las Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184. La numeración de aminoácidos es secuencial. Usando las regiones marco conservadas de proteínas indicadas anteriormente, se diseñaron las secuencias de ADN para genes sintéticos codificantes de las regiones marco conservadas humanas con las CDR murinas. Estos dominios variables de cadena pesada y ligera humanizados se denominaron HVH y hVL, respectivamente. Los codones se optimizaron para el uso en *E.*

coli y hámsteres. Se usaron varios oligonucleótidos solapantes (69-90 bases de longitud) que extendían la longitud total del hVL y hVH con dos cebadores flanqueantes cortos por cada cadena para sintetizar por separado los dos genes mediante PCR recursiva esencialmente como se describe en Prodromou y col, (1992) *Protein Eng* 5(8): 827-9. Los fragmentos de ADN resultantes de la longitud correcta se purificaron en gel y luego se clonaron en un plásmido de expresión bicistrónico de *E. coli* (resistente a la ampicilina). La expresión de los anticuerpos estaba bajo control de un promotor lacZ inducible por IPTG similar al descrito en Barbas (2001) "Phage display: a laboratory manual", Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press (véase el Vector pComb3X, en la página 2.10); sin embargo, las modificaciones incluían la adición y expresión de los siguientes dominios adicionales: el dominio constante de la cadena ligera Kappa humana (véase el número de acceso del GenBank CAA09181) y el dominio constante CHI de la inmunoglobulina humana IgG2a (número de acceso del GenBank P01859). Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo injertado con CDR (también denominado el "molde"), denominado 8L2-4D5, también se muestran en las Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184. La afinidad de 8L2-4D5 se determinó usando análisis BIAcore como se ha descrito anteriormente. 8L2-4D5 se unió al NGF humano con una K_D de aproximadamente 38 nM.

(2) Introducción de una mutación puntual en la secuencia marco conservada. Se introdujo la sustitución V71K en la cadena pesada injertada con CDR usando mutagénesis dirigida por PCR recombinante como se describe en Innis y col, (1995) "PCR strategies", San Diego, Academic Press. Esta sustitución reemplazó el resto de la región marco conservada de ser humano con el resto de la región marco conservada de ratón correspondiente. El anticuerpo resultante se denominó 8L2-6D5, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 8L2-6D5 se muestra en la Figura 1A del documento WO2004/058184. La afinidad de 8L2-6D5 se determinó usando análisis BIAcore como se ha descrito anteriormente. El fragmento Fab de 8L2-6D5 se unió al NGF humano con una K_D de aproximadamente 15 nM. Se escogió 8L2-6D5 como molde para la maduración por afinidad.

(3) Humanización y maduración por afinidad de las CDR L1, L2, H1 y H2. Se sometieron las CDR L1, L2, H1 y H2 a humanización y maduración por afinidad. Se identificaron las posiciones de aminoácidos de las CDR L1, L2, H1 y H2 que no son esenciales para la estructura de las CDR basadas en la estructura canónica de Chothia (véase Al-Lazikani y col (1997) *J. Mol. Biol.* 273(4):927-48); y se sometieron a la aleatorización de la siguiente manera. Se prepararon dos genotecas que contenían las mutaciones de cadena ligera o de cadena pesada mostradas en la Tabla 2, y la CDR L3 o CDR H3 injertada (de ratón), respectivamente, usando mutagénesis de casete de PCR con oligonucleótidos degenerados como se describe en Kay y col. (1996), "Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual", San Diego, Academic Press, usando codones de dopaje como se describe en Balint y col, (1993) *Gene* 137(1):109-18). En general, los restos de aminoácidos se modificaron a restos que son más comunes en anticuerpos humanos, basándose en alineaciones de secuencias de aminoácidos de cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo 911con secuencias de anticuerpo de línea germinal humana. El resto de aminoácido de tipo natural (no sustituido) también se representó en la genoteca a excepción del resto 50 de CDR H2, una metionina, en la que la metionina de tipo natural no se representó en la genoteca. Los restos de metionina están sujetos a la oxidación; por lo tanto, se esperaba que la sustitución de ese resto mejorara la estabilidad del anticuerpo resultante. Las genotecas de Fab se clonaron en el vector pComb3X más las regiones CH1 y Cκ humanas, como se ha descrito anteriormente.

Tabla 2:

1. Genoteca de H1/H2 de cadena pesada:
CDR H1
Se cambió I34 por F, L, V, S, P, T, A o I
Se cambió N35 por N, T, S o Y
CDR H2
Se cambió M50 por los 20 aminoácidos naturales
Se cambió A62 por A o S
Se cambió L63 por L o V
2. Genoteca de L1/L2 de cadena ligera:
CDR L1
Se cambió S26 por S, A, V o F
Se cambió D28 por D, A, S o Y
Se cambió H32 por H, N, K, D, E, Q o Y
CDR L2
Se cambió Y50 por Y, D, A o S
Se cambió I51 por I, T, A o V
Se cambió F54 por F o L
Se cambió S56 por S y T

Para los experimentos de exploración de la afinidad, se emparejó cada genoteca además con la correspondiente cadena ligera o pesada injertada con CDR (por ejemplo, la genoteca de H1/H2 se emparejó con la cadena ligera injertada con CDR), se expresó el anticuerpo y se exploró la afinidad por el NGF humano de los clones individuales usando el sistema de resonancia de plasmón superficial (SPR) BIACORE (BIAcore, Inc. Piscataway, NJ) de acuerdo

con las instrucciones del fabricante y según lo descrito anteriormente. Se determinaron k_{off}, k_{on} y K_D. Los clones de anticuerpos se clasificaron según las velocidades de k_{off}, ya que, en general, la mayoría de las variaciones en la afinidad se observan en las velocidades de k_{off} y, además, porque las velocidades de k_{off} son independientes de la concentración de anticuerpos.

Se determinó la secuencia de clones que se unió y la secuencia de clones que se unió se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3: Secuencias de aminoácidos de L1 y L2, secuencias de aminoácidos de H1 y H2, y datos cinéticos para clones que se unieron tras la exploración de la afinidad de los clones de genotecas de H1/H2 o L1/L2

Datos cinéticos de mutantes de CDR 1-2				
Clones de genoteca de cadena ligera emparejados con cadena pesada 8L2	Secuencia de aa de CDRL1	Secuencia de aa de CDRL2	k_{off} (s^{-1})	*K_D (nM)
8L2-6D5 (control)	RA**S**Q**D**ISN**H**LN (SEQ ID NO: 12)	**YI**SR**F**H**S** (SEQ ID NO:13)	**1 x 10^{-3}	25
L129	RASQSISNNLN (SEQ ID NO: 18)	YTSRFHS (SEQ ID NO: 19)	4,5 x 10^{-4}	11
L208	RASQYISNHLN (SEQ ID NO: 20)	YTSRFHS (SEQ ID NO: 21)	4,6 x 10^{-4}	11
L97	RASQSISNQLN (SEQ ID NO: 22)	YVSRFHS (SEQ ID NO: 23)	5,6 x 10^{-4}	14
L81	RAFQAISNQLN (SEQ ID NO: 24)	YISRFHT (SEQ ID NO: 25)	7,4 x 10^{-4}	18
L6	RAFQSISNQLN (SEQ ID NO: 26)	YASRFHS (SEQ ID NO: 27)	8,2 x 10^{-4}	20
8L2-6D5 (control)	GFSLIGYD**IN** (SEQ ID NO: 9)	**M**IWGDGTTDYNS**AL** (SEQ ID NO: 10)	1 x 10^{-3}	25
H109	GFSLIGYDSN (SEQ ID NO: 28)	IIWGDGTTDYNSAL (SEQ ID NO: 29)	1,6 x 10^{-4}	4
H19	GFSLIGYDLN (SEQ ID NO: 30)	IIWGDGTTDYNSAV(SEQ ID NO: 31)	2,4 x 10^{-4}	6
H222	GFSLIGYDVT (SEQ ID NO: 32)	GIWGDGTTDYNSA V (SEQ ID NO: 33)	3.8e-4	9,5
H225	GFSLIGYDVT (SEQ ID NO: 34)	GIWGDGTTDYNSS V (SEQ ID NO: 35)	3,8 x 10^{-4}	9,5
H18	GFSLIGYDAT (SEQ ID NO: 36)	GIWGDGTTDYNSA V (SEQ ID NO: 37)	4,2 x 10^{-4}	10,5
H9	GFSLIGYDVS (SEQ ID NO: 38)	IIWGDGTTDYNSSV(SEQ ID NO: 39)	4,1 x 10^{-4}	10,2
H227	GFSLIGYDIS (SEQ ID NO: 40)	QIWGDGTTDYNSS V (SEQ ID NO: 41)	5,4 x 10^{-4}	13,5
H17	GFSLIGYDAS (SEQ ID NO: 42)	GIWGDGTTDYNSS V (SEQ ID NO: 43)	6,1 x 10^{-4}	15,2

(Continuación)

Datos cinéticos de mutantes de CDR 1-2				
Clones de genoteca de cadena ligera emparejados con cadena pesada 8L2	Secuencia de aa de CDRL1	Secuencia de aa de CDRL2	k_{off} (s^{-1})	*K_D (nM)
H28	GFSLIGYDST (SEQ ID NO: 44)	SIWGDGTTDYNSA L (SEQ ID NO: 45)	7,5 x 10^{-4}	18,7
Los aa en negrita se asignaron al azar como se ha indicado anteriormente. *K_D calculada usando k_{on} de 4 x 10^4 $M^{-1}s^{-1}$ **Por comodidad, "e" como se usa en el presente documento indica "x 10." Por lo tanto, 4e4 significa indistintamente 4 x 10^4.				

Las CDR que contenían las siguientes sustituciones conservaron la unión:

CDR H1

I34: S, L, V, I y A unidos.
N35: N, T y S unidos.

CDR H2

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

CDR L1

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

CDR L2

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

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

CDR H1: I34L; N35N (ningún cambio)
CDR H2: M50I; A62A (ningún cambio); L63V
CDR L1: S26S (ningún cambio); D28S; H32N
CDR L2: Y50Y (ningún cambio); I51T; F54F (ningún cambio); S56S (ningún cambio).

Estas mutaciones se combinaron (amplificando las cadenas H y L por PCR, cortando los productos de PCR y el vector (pRN8) con enzima de restricción y realizando una ligación de 3 fragmentos) en un solo clon, denominado H19-L129, que también incluía las CDR de H3 y L3 injertadas. La secuencia de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de H19-L129 se muestra en las Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184, y la Tabla 4 muestra la secuencia de aminoácidos de las CDR L1, L2, H1 y H2. H19-L129 se unió a NGF con una K_D de aproximadamente 1 nM, determinada usando el análisis BIAcore como se describe en el presente documento.

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

Clon de la combinación: mutaciones en las CDR H1, H2, L1, L2	CDRL1 CDRH1 Secuencia de aa	CDRL2 CDRH2 Secuencia de aa	K_{off} (s^{-1})	*K_D (nM)
H19-L129	CDR-L1: RASQSISNNLN	CDRL2: YTSRFHS	1,1 x 10^{-4}	3,5
	(SEQ ID NO: 18) CDRH1: GFSLIGYDLN (SEQ ID NO: 30)	(SEQ ID NO: 19) CDR-H2: IIWGDGTTDYNSAV (SEQ ID NO:31)		
*K_D calculada usando k_{on} de 4 x 10^4 $M^{-1}s^{-1}$				

(4) Maduración por afinidad de las CDR H3 y L3. La maduración de afinidad de H3 y L3 CDR se llevó a cabo en dos etapas. En primer lugar, en un procedimiento denominado "mutagénesis de barrido de genotecas", se exploró previamente cada resto de aminoácido de H3 y L3 individualmente para identificar las posiciones de aminoácidos en las que una mutación daba como resultado un aumento de la afinidad de unión al NGF humano. Basándose en los resultados de la mutagénesis de exploración de la genoteca (también denominada "análisis de aleatorización de genoteca de pequeño tamaño"), se seleccionó un subconjunto de posiciones de aminoácidos en H3 y L3 para la preparación de la genoteca de maduración por afinidad, y se examinó la genoteca de maduración por afinidad para determinar la afinidad hacia el NGF humano usando análisis BIAcore como se describe en el presente documento. Se aprecia que estas técnicas se pueden aplicar en general.

(a) Mutagénesis de exploración de genoteca

Se exploró previamente cada posición de aminoácido de las CDR H3 y L3 individualmente para determinar las sustituciones que daban como resultado un aumento de la afinidad de unión hacia el NGF humano. La frecuencia de las sustituciones de aminoácidos en cualquier posición dada que produjeron una mejor unión, la misma unión, una unión peor o ninguna unión proporcionó información relacionada con las posiciones en las CDR que pueden cambiarse a muchos aminoácidos diferentes (incluyendo los 20 aminoácidos), y posiciones en las CDR que no se pueden cambiar o que solo se pueden cambiar a unos cuantos aminoácidos. También se identificaron sustituciones de aminoácidos que produjeron una mayor afinidad de unión. Basándose en los resultados de esta detección, se seleccionó un subconjunto de posiciones de aminoácidos en las CDR H3 y L3 para la preparación de una genoteca de maduración por afinidad.

Se prepararon genotecas de Fab individuales en las que cada aminoácido de las CDR L3 y H3 se asignó aleatoriamente a los 20 aminoácidos, uno cada vez, lo que produjo varias genotecas pequeñas (5 genotecas para la cadena ligera y 13 genotecas para la cadena pesada) con una complejidad cada una de 20 posibilidades de aminoácidos en cada posición de aminoácido. En todos los casos, se representó el aminoácido nativo (es decir, no modificado) en la genoteca. Las genotecas se prepararon mediante mutagénesis en casete de PCR con oligonucleótidos degenerados como se describe en Kay y col. (1996), “Phage display of Peptides abd Proteins: a laboratory manual”, San Diego, Academic Press, usando el codón de dopaje NNK para asignar al azar una posición de aminoácido que incluya 20 aminoácidos posibles. El 8L2-6D5 (el anticuerpo injertado con CDR, que tiene la mutación estructural V71K) sirvió como molde para la construcción de la genoteca, porque la menor afinidad del anticuerpo injertado con CDR permitió una detección más fácil de las diferencias en afinidad en los mutantes H3 y L3 durante la exploración. Por lo tanto, cada miembro de una genoteca contenía una CDR3 (H3 o L3) con una sustitución de aminoácidos y 5 CDR injertadas.

Se rastrearon de 20 a 80 clones de cada genoteca pequeña usando el análisis BIAcore como se describe en el presente documento. Las muestras se analizaron simultáneamente mediante BIAcore para la afinidad de unión a NGF en un canal del chip BIAcore y para la presencia de Fab uniéndose a un anticuerpo marcado con penta-his en otro canal del chip sensor, para detectar el marcador de his en el extremo C de la cadena pesada. Los clones que expresaban proteína se clasificaron como con la misma afinidad, peor afinidad, mejor afinidad o sin unión, usando la k_{off} para la clasificación: Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Los clones que expresaron la proteína se clasificaron como aquellos que tenían la misma afinidad, peor afinidad, mejor afinidad o ninguna unión, basándose en la k_{off}

	mutación	Mejor 1×10^{-3}<	Igual ≥ 1×10^{-3}, 2 x 10^{-3}<	Peor ≥ 2 x 10^{-3},	Sin unión	Porcentaje de aa que conservan la capacidad de unión
Cadena ligera						
	L_S91X	13 %	40 %	20 %	26 %	50 %
	L_K92X		100 %			~100 %
	L_T93X		93 %	7 %		93 %
	L_L94X		40 %	60 %		40 %
	L_Y96X		13 %	80 %	7 %	13 %
Cadena pesada						
	H_G98X		50 %	37 %	13 %	50 %
	H_G99X		46 %	54 %		46 %
	H_Y100X		26 %		73 %	26 %
	H_Y101X	6 %		12 %	82 %	6 %
	H_Y102X		7 %	25	68 %	7 %
	H_G103X	4 %	21 %	16 %	58 %	25 %
	H_T104X		20 %	30 %	50 %	20 %
	H_S105X	10 %	25 %	26 %	39 %	35 %
	H_Y106X		75 %	25 %		75 %
	H_Y107X		8 %	46 %	46 %	8 %
	H_F108X		23 %	27 %	50 %	23 %
	H_D109X		29 %	46 %	25 %	29 %
	H_Y110X		90 %	5 %	5 %	90 %

Se determinó la secuencia de todos los clones con una mejor afinidad, revelando la frecuencia y la identidad de las sustituciones de aminoácidos que dieron lugar a una mayor afinidad. Además, se seleccionaron unos cuantos clones que conservaban una afinidad similar al clon 8I2-6D5 de cada genoteca, con el fin de determinar las sustituciones de la secuencia de aminoácidos que se permitían en una posición dada, aunque la sustitución no aumentaba necesariamente la afinidad de unión. Los resultados de este análisis se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6

<u>Mutaciones de CDR H3</u> (Molde 8L2-6D5, incluyendo la secuencia de aminoácidos de CDR-H3 del anticuerpo 911: GGYYYGTSYYFDY (SEQ ID NO: 11)	k_{off} (s^{-1}) 1×10^{-3}	K_D* (nM) 25
Y100L	$1{,}2 \times 10^{-3}$	30
Y100R	$1{,}1 \times 10^{-3}$	27
Y101W	$5{,}6 \times 10^{-4}$	14
G103A	$1{,}6 \times 10^{-4}$	4
T104S	$2{,}2 \times 10^{-3}$	55
S105A	$5{,}1 \times 10^{-4}$	13
S105T	$6{,}4 \times 10^{-4}$	16
Y106R	$1{,}6 \times 10^{-3}$	40

(Continuación)

Mutaciones de CDR H3 (Molde 8L2-6D5, incluyendo la secuencia de aminoácidos de CDR-H3 del anticuerpo 911: GGYYYGTSYYFDY (SEQ ID NO: 11)	k_{off} (s^{-1}) 1×10^{-3}	K_D* (nM) 25
Y106T	$2,0 \times 10^{-3}$	50
Y106M	$2,7 \times 10^{-3}$	67
Y107F	$1,4 \times 10^{-3}$	35
F108W	$1,22 \times 10^{-3}$	30
D109N	$1,5 \times 10^{-3}$	37
D109G	1×10^{-3}	25
Y110K	$1,4 \times 10^{-3}$	35
Y110S	$1,5 \times 10^{-3}$	37
Y110R	$1,6 \times 10^{-3}$	40
Y110T	$1,7 \times 10^{-3}$	42
Mutaciones de CDR L3 (Molde 8L2-6D5, incluyendo la secuencia de aminoácidos de CDR-L3 de tipo natural (sin sustituir): QQSKTLPYT (SEQ ID NO:_14)	k_{off} (s^{-1}) 1×10^{-3}	K_D* (nM) 25
S91E	$2,5 \times 10^{-4}$	6
Y96R	$1,7 \times 10^{-3}$	42
*K_D calculada usando k_{on} 4×10^4 $M^{-1}s^{-1}$		

Varias mutaciones produjeron un aumento de la afinidad de unión. Al menos las siguientes mutaciones produjeron una afinidad de unión significativamente mayor en comparación con el molde 8L2-6D5: (H_Y101W (secuencia de CDR GGYWYGTSYYFDY (SEQ ID NO: 46)); H_S105A (secuencia de CDR GGYYYGTAYYFDY (SEQ ID NO: 47)); H_S105T (secuencia de CDR GGYYYGTTYYFDY (SEQ ID NO: 48)); H_G103A (secuencia de CDR GGYYYATSYYFDY (SEQ ID NO: 49); y L_S91E (secuencia de CDR QQEKTLPYT (SEQ ID NO 50)).

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

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

(b) Maduración por afinidad

A continuación, los resultados del análisis de aleatorización de genoteca de pequeño tamaño (anteriores) se usaron para seleccionar restos para la producción de las genotecas H3 y L3 para la maduración por afinidad de las CDR H3 y L3. Los restos Y101 y G103 de CDR H3, y los restos S91 y K92 de CDR L3 se seleccionaron para la producción de las genotecas H3 y L3 para la maduración por afinidad de las CDR H3 y L3.

Esta genoteca combinó mutaciones en H3 y L3 al mismo tiempo en el clon 8L2-6D5 injertado con CDR, y por separado en el fondo de H19-L129, y resultó tener una diversidad de 80 clones diferentes. La Tabla 7 muestra los restos de aminoácidos seleccionados para la sustitución y los aminoácidos que se sustituyeron en cada posición.

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

CDR-H3:

Y101 se cambió a Y y W, C. (Cabe señalar que C se incluyó porque el uso del codón TRS en un oligonucleótido degenerado también generó el codón C).
G103 se cambió a A ,P, S.

CDR-L3:

S91 se cambió a E.
K92 se cambió a los veinte aminoácidos. A, R, K, y H se unieron.

Cada polipéptido se expresó como un Fab, y se detectó la afinidad hacia NGF humano de 96 clones individuales para cada genoteca usando el análisis BIACORE de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se describió anteriormente. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8

Mutaciones de la COMBINACIÓN CDR L3 H3 (molde 8L2-6D5)	k_{off} (s^{-1}) 1×10^{-3}	K_D* (nM) 25
L_S91E; L_K92A (secuencia de CDR QQEATLPYT (SEQ ID NO: 51)) H_Y101W; H_G103A (secuencia de CDR GGYWYATSYYFDY (SEQ ID NO: 52))	$5,5 \times 10^{-4}$	13
L_S91E; L_K92R (secuencia de CDR QQERTLPYT (SEQ ID NO:53)) H_Y101W; H_G103A (secuencia de CDR GGYWYATSYYFDY (SEQ ID NO: 54))	$1,0 \times 10^{-4}$	25
Mutaciones de la COMBINACIÓN CDR L3 H3 (molde H19-L129, H1H2L1L2 madurado)	k_{off} (s^{-1}) $1,1 \times 10^{-4}$	K_D* (nM)
L_S91E; L_K92H (secuencia de CDR QQEHTLPYT (SEQ ID NO: 55)) H_Y101W; H_G103A (secuencia de CDR GGYWYATSYYFDY (SEQ ID NO: 56)) (CLON E3)	$1,2 \times 10^{-5}$	0,3
Mutaciones de la COMBINACIÓN CDR L3 H3 (molde H19-L129, H1H2L1L2 madurado) L_S91E; L_K92S (secuencia de CDR QQESTLPYT (SEQ ID NO: 57)) H_Y101W; H_G103S (secuencia de CDR GGYWYSTSYYFDY (SEQ ID NO: 58))	k_{off} (s^{-1}) $4,7 \times 10^{-5}$	K_D* (nM) 1,1
L_S91E; L_K92K (secuencia de CDR QQEKTLPYT (SEQ ID NO: 59)) H_Y101Y; H_G103A (secuencia de CDR GGYYYATSYYFDY (SEQ ID NO: 60))	2×10^{-5}	0,5
Mutaciones de la COMBINACIÓN CDR L3 H3 (molde 8L2-6D5)	k_{off} (s^{-1}) 1×10^{-3}	K_D* (nM) 25
L_S91E; L_K92R (secuencia de CDR QQERTLPYT (SEQ ID NO: 61)) H_Y101W; H_G103A (secuencia de CDR GGYWYATSYYFDY (SEQ ID NO: 62)) (CLON 3C)	$1,4 \times 10^{-5}$	0,35
L_S91E; L_K92R (secuencia de CDR QQERTLPYT (SEQ ID NO: 63)) H_Y101Y;H_G103A (secuencia de CDR GGYYYATSYYFDY (SEQ ID NO: 64))	$1,5 \times 10^{-5}$	0,37
*K_D calculada usando k_{on} 4×10^4 $M^{-1}s^{-1}$		

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

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

La secuencia de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de E3 se muestra en SEQ ID NO: 1 y 2 (véanse también las Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184). 3C comprendía las siguientes sustituciones de CDR: CDR-L3: S91E; K92R; CDRH3: Y101W; G103A, que se combinaron en un solo clon que también incluía las mutaciones L1, L2, H1 y H2 descritas para el clon 3E.

Se clonaron las secuencias de 3E y 3C en vectores de expresión de mamífero para la producción de Fab y anticuerpo completo, y se expresaron en células HEK293 y se purificaron usando cromatografía de Ni-NTA o proteína A. La proteína pura se cuantificó con exactitud mediante el análisis de aminoácidos.

Se midieron las afinidades de unión hacia el NGF humano de los Fab E3 y 3C usando el análisis BIAcore de acuerdo con las instrucciones del fabricante y como se ha descrito anteriormente, a excepción de que se usaron 100 UR de NGF en el chip para evitar un efecto de repetición de la unión. En resumen, se inyectaron varias concentraciones de anticuerpos (Fab) durante 2 minutos en un chip CM5 con 100 UR de NGF humano inmovilizado encima, y se les permitió disociarse durante 1.800 segundos. El anticuerpo de ratón 911 (Fab) se analizó como control. Los datos se analizaron usando el software BIAevaluation siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados del análisis del anticuerpo E3 y 911 se muestran en las Figuras 9 y 10 del documento WO2004/058184. E3 se unió a NGF humano con una K_D de aproximadamente 0,07 nM (y con una k_{on} de aproximadamente 6,0 x 10^5 M^{-1} s^{-1}, y una k_{off} de aproximadamente 4,2 x 10^{-5} s^{-1}). 3C se unió a NGF humano con una K_D de aproximadamente 0,35 nM (con una k_{off} de aproximadamente 1,4 x 10^{-5}). Por el contrario, el anticuerpo 911 de ratón se unió a NGF con una K_D de 3,7 nM, k_{off} de 8,4 x 10^{-5} s^{-1} y $_{kon}$ de 2,2 x 10^4 Ms^{-1}.

El anticuerpo E3 (denominado indistintamente 3E) se seleccionó para un análisis adicional basado en la alta afinidad de unión. Para ensayar la capacidad de E3 para evitar la interacción de NGF con los receptores de NGF trkA y p75, se mezclaron previamente 2,5 nM de NGF humano y se incubaron durante una hora con 0 a 50 nM de anticuerpo E3 (Fab). Tras la incubación, se inyectaron las muestras a 10 ul/minuto en un chip BIAcore CM5 que contenía 260 UR de p75 (canal 2) y 600 UR de trkA (canal 3), y se determinó el porcentaje de unión. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 11 del documento WO2004/058184. El aumento de las concentraciones de Fab E3 bloqueó la interacción de NGF tanto con p75 como con trkA, como se muestra por la disminución de la señal (medida en UR), lo que indica que Fab E3 bloquea la interacción del NGF humano con trkA y p75. Cuando la concentración de anticuerpo E3 (Fab) era igual a la concentración de NGF (a una concentración de NGF de aproximadamente 2,5 nM), no se observó unión de NGF (como se muestra mediante una señal de cero). El hecho de que el cero por ciento de la unión del receptor de NGF se diera cuando la concentración de NGF era igual a la concentración de anticuerpo 3E sugirió que el NGF 2,5 nM era al menos diez veces superior a la k_D de E3 para NGF y en equilibrio.

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

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

El ensayo de supervivencia se realizó de la siguiente manera: se sometieron a eutanasia ratones hembras Swiss Webster gestantes apareadas a la vez mediante inhalación de CO_2. Se retiraron los cuernos uterinos, y se extrajeron y decapitaron los embriones en la etapa embrionaria E13.5. Se diseccionaron los ganglios trigeminales usando agujas de tungsteno electrolíticamente afiladas. A continuación, se trataron los ganglios con tripsina, se disociaron mecánicamente y se sembraron en placas a una densidad de 200-300 células por pocillo en un medio definido sin suero en placas de 96 pocillos recubiertas con poli-L-ornitina y laminina.

Se evaluó la actividad de bloqueo de los Fab o anticuerpos anti-NGF añadiendo a las neuronas trigeminales dosis variables de anticuerpos anti-NGF Mab 911 (Fab), 8L2-6D5; H19- L129; E3 y 3C; y NGF humano o de rata a las siguientes concentraciones: 0,4 ng/ml (~15 pM, esta concentración representa una concentración de saturación de

NGF para la supervivencia) y 0,04 ng/ml (~1,5 pM, esta concentración es aproximadamente la CI_{50}). Tras 48 horas en cultivo, se sometieron las células a un protocolo de inmunocitoquímica automatizado realizado en una estación de trabajo de tratamiento de líquidos Biomek FX (Beckman Coulter) de la siguiente manera: fijación usando formaldehído al 4 %, sacarosa al 5 % y PBS; permeabilización usando Triton X-100 al 0,3 % en PBS); bloqueo de sitios de unión inespecíficos usando suero de cabra normal al 5 %, BSA al 0,11 % en PBS; e incubación secuencial con anticuerpos primarios y secundarios para detectar neuronas. El anticuerpo primario era anticuerpo policlonal de conejo contra el producto génico de la proteína 89.5 (PGP9.5, Chemicon), un marcador fenotípico neuronal establecido. El anticuerpo secundario fue anticuerpo anti-conejo de cabra Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), junto con el colorante nuclear Hoechst 33342 (Molecular Probes) para marcar los núcleos de todas las células presentes en el cultivo. La adquisición de imágenes y el análisis de imágenes se realizaron en un dispositivo de generación de imágenes Discovery-l/GenII (Universal Imaging Corporation). Las imágenes se adquirieron automáticamente en dos longitudes de onda para Alexa Fluor 488 y Hoechst 33342, y se usó la tinción nuclear como punto de referencia para el sistema de autoenfoque basado en imágenes del Imager, ya que la tinción nuclear está presente en todos los pocillos.

Se seleccionaron los objetivos apropiados y el número de sitios con imágenes por pocillo para cubrir toda la superficie de cada pocillo. El análisis de imagen automatizado se configuró para contar el número de neuronas presentes en cada pocillo después de 48 horas en cultivo en función de su tinción específica con el anticuerpo anti-PGP9.5. El umbral cuidadoso de la imagen, y la aplicación de la morfología y el filtro de selectividad basado en la intensidad de fluorescencia produjeron un recuento exacto de las neuronas por pocillo.

Los resultados de este experimento demostraron que Fab E3 bloqueó la actividad de NGF con una alta afinidad. Los resultados se muestran en las Figuras 4-6 del documento WO2004/058184 y la Tabla 9.

La Figura 4 del documento WO2004/058184 es un gráfico que muestra la supervivencia dependiente de NGF de neuronas E13.5 en presencia de una concentración variable de NGF humano y de rata.

La Figura 5 del documento WO2004/058184 es un gráfico que compara el efecto de bloqueo de NGF de diversos Fab en presencia de 0,04 ng/ml de NGF humano (aproximadamente 1,5 pM, que se muestra en el panel inferior) o 0,4 ng/ml de NGF humano (aproximadamente 15 pM; se muestra en el panel superior). 1,5 pM de NGF estaba alrededor de la CE_{50} de NGF que potencia la supervivencia, mientras que 15 pM representaba una concentración de saturación de NGF. Se evaluó la supervivencia de neuronas trigeminales de ratón E13.5 a diversas concentraciones de Fab E3; Fab 911 murino; y Fab H19-L129 y Fab 8L2-6D5 como se ha descrito anteriormente. Se calculó la CI_{50} (en pM) para cada Fab a cada concentración de NGF, y se muestra en la Tabla 9. Fab E3 bloqueó fuertemente la supervivencia de las neuronas trigeminales dependiente de NGF humano, con una CI_{50} de aproximadamente 21 pM en presencia de NGF humano 15 pM, y una CI_{50} de aproximadamente 1,2 pM en presencia de NGF humano 1,5 pM. Los Fab 3C y H19-L129 también bloquearon fuertemente la supervivencia de las neuronas trigeminales dependientes de NGF humano. La Figura 6 es un gráfico que compara el efecto de bloqueo de NGF de diversos Fab en presencia de bien 0,04 ng/ml de NGF de rata (aproximadamente 1,5 pM, que se muestra en el panel inferior) o 0,4 ng/ml de NGF de rata (aproximadamente 15 pM; se muestra en el panel superior). 1,5 pM de NGF estaba alrededor de la CE_{50}, mientras que 15 pM representaba una concentración de saturación de NGF. Se evaluó la supervivencia de neuronas trigeminales de ratón E13.5 a diversas concentraciones de Fab E3; Fab 911 murino; y Fab H19-L129 y Fab 8L2-6D5 como se ha descrito anteriormente. Se calculó la CE_{50} (en pM) para cada Fab a cada concentración de NGF, y se muestra en la Tabla 9. Fab E3 bloqueó fuertemente la supervivencia de las neuronas trigeminales dependiente de NGF humano, con una CI_{50} de aproximadamente 31,6 pM en presencia de NGF de rata 15 pM, y una CI_{50} de aproximadamente 1,3 pM en presencia de NGF de rata 1,5 pM. Los Fab 3C y H19-L129 también bloquearon fuertemente la supervivencia de neuronas trigeminales dependientes de NGF de rata.

Tabla 9:

NGF humano	CI_{50} (en presencia de NGF 15 pM)	CI_{50} (en presencia de NGF 1,5 pM)
	pM	pM
Fab 8L2-6D5	1580,5	461,8
Fab H19-L129	60,1	9,6
Fab 3E	< 21,0	< 1,2
Fab 3C	80,9	5,6
Fab 911	322,3	63,5
NGF de rata	CI_{50} (NGF 15 pM)	CI_{50} (NGF 1,5 pM)

(Continuación)

NGF humano	CI_{50} (en presencia de NGF 15 pM)	CI_{50} (en presencia de NGF 1,5 pM)
	pM	pM
Fab 8L2-6D5	730,3	169,4
Fab H19-L129	31,0	6,0
Fab 3E	< 8,3	< 1,3
Fab 3C	31,6	6,0
Fab 911	161,0	34,6

En un experimento diferente, se comparó la capacidad del anticuerpo E3 completo y Fab 3E para inhibir la supervivencia dependiente de NGF de neuronas E13.5 en presencia de 0,4 ng/ml de concentración de saturación) de NGF humano. Los resultados del análisis se muestran en la Figura 10 del documento WO2004/058184. El anticuerpo E3 completo y Fab 3E mostraron niveles similares de inhibición de la supervivencia dependiente de NGF cuando la concentración de anticuerpo completo y de Fab se normalizaron al número de sitios de unión a NGF (Fab tiene un sitio de unión y el anticuerpo completo tiene dos sitios de unión). Estos resultados demostraron que no hubo efecto de avidez debido a la unión de un anticuerpo completo contra el dímero de NGF.

En otros experimentos, se comparó la capacidad de varias concentraciones (20, 4, 0,8, 0,16, 0,032, 0,0064, 0,00128 y 0,0 nM) del anticuerpo E3, anticuerpo 911 y una inmunadhesina del receptor trkA (que consiste en el dominio extracelular del receptor de NGF trkA fusionado con el dominio Fc de inmunoglobulina, CH2-CH3) para inhibir la supervivencia dependiente de NGF de neuronas E13.5 en presencia de 0,4 ng/ml (condiciones de saturación). Estos resultados se muestran en la Figura 11 del documento WO2004/058184. Estos resultados demostraron que el anticuerpo E3 bloqueó el NGF mejor que el anticuerpo 911 o la inmunoadhesina trkA.

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

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

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

El ensayo de supervivencia se realizó de la siguiente manera: se sometieron a eutanasia ratones hembras Swiss Webster gestantes apareadas a la vez mediante inhalación de CO_2. Se retiraron los cuernos uterinos, y se extrajeron y decapitaron los embriones (el día embrionario 17 o 18). Se diseccionaron los ganglios trigeminales y nodosos, y se limpiaron. A continuación, se trataron los ganglios con tripsina, se disociaron mecánicamente y se sembraron en placas a una densidad de 100-300 células por pocillo en un medio definido sin suero en placas de 4 pocillos (Greiner) recubiertas con poli-L-ornitina y laminina.

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

Se cultivaron neuronas nodosas E17 en ausencia de factores neurotróficos añadidos (control negativo) o con concentraciones de saturación de BDNF (400 pM) (control positivo) o NT4/5 (400 pM) o factor de crecimiento no relacionado con NGF ILF (factor inhibidor de la interleucina). Se usaron altas concentraciones de neurotrofinas, ya que el objetivo de este experimento era ensayar la especificidad de los anticuerpos. Se establecieron cultivos por duplicado que incluyeron variar de nuevo con y sin la adición de anticuerpos E3 y 911. Tras 48 horas de cultivo, se

determinó el número total de neuronas que sobrevivieron en cada pocillo en cada condición mediante recuento manual usando un microscopio de contraste de fase.

Los resultados de estos experimentos demostraron que los anticuerpos E3 y 911 bloqueaban por completo los efectos promotores de la supervivencia del NGF sobre las neuronas trigeminales E18. Por el contrario, los anticuerpos E3 y 911 no tuvieron efecto sobre la supervivencia de las neuronas trigeminales potenciadas por NT3 o MSP, o la supervivencia de neuronas nodosas potenciadas por BDNF o NT4/5 o LIF. Estos resultados demostraron que el anticuerpo E3 poseía especificidad selectiva hacia NGF, ya que no se detectó interacción entre estos anticuerpos y otras neurotrofinas relacionadas con NGF (NT3, NT4/5, BDNF) a concentraciones de 1.000 a 10.000 veces superiores a la concentración eficaz para el bloqueo de NGF. Además, estos resultados demostraron que la muerte neuronal observada en cultivos de neuronas dependientes de NGF suplementados con NGF en la adición de anticuerpo E3 o Fab E3 se debió a una interacción específica entre estos anticuerpos y el NGF, y no se debió a un efecto tóxico generalizado. También se ensayó el anticuerpo antagonista anti-NGF de ratón 911, y se observaron resultados similares. Cabe señalar que debido a las altas concentraciones de neurotrofinas usadas, tanto el anticuerpo E3 como el 911 están muy cerca de sus condiciones de titulación, y se esperaba que se unieran al NGF a niveles similares, porque las diferencias en la afinidad de unión de estos anticuerpos al NGF serían menos evidentes en estos condiciones

Los resultados de estos experimentos se muestran en las Figuras 12, 13, 14 y 15 del documento WO2004/058184. Los datos mostraron un porcentaje medio de supervivencia después de 48 horas en cultivo (± error típico de la media, n = 3 para cada punto de datos) en relación con la supervivencia observada en el control positivo para cada experimento (por ejemplo, 100 % de supervivencia de neuronas trigeminales cultivadas en presencia de concentración de NGF de saturación y 100 % de supervivencia de neuronas nodosas cultivadas en presencia de concentración de BDNF de saturación, respectivamente). Las Figuras 12-13 del documento WO2004/058184 son gráficos que muestran que el anticuerpo antagonista anti-NGF E3 o Fab E3 no inhibieron la supervivencia potenciada por NT3 y MSP, incluso a concentraciones de anticuerpo tan altas como de 200 nM. Por el contrario, 20 nM de anticuerpo E3 o Fab 3E y Fab 911 bloquearon totalmente la supervivencia inducida por NGF. También se ensayó el anticuerpo antagonista de ratón anti-NGF 911, y se observaron resultados similares. En concreto, la Figura 12 del documento WO2004/058184 es un gráfico que muestra la comparación del efecto de diversas concentraciones (20 nM, 2 nM o 0,2 nM) de Fab E3 (denominado "3E" en la figura) y el anticuerpo de ratón Fab 911 sobre la supervivencia de neuronas trigeminales E18 en presencia de neurotrofina no añadida (denominada "control"), NGF 400 pM (denominado "NGF-400 pM), NT3 10 nM (denominado" NT3-10 nM) o MSP 600 pM (denominado "MSP-600 pM). La Figura 13 del documento WO2004/058184 es un gráfico que representa la comparación del efecto de diversas concentraciones (200 nM y 80 nM) de Fab E3, y anticuerpo completo y anticuerpo 911 de ratón, anticuerpo completo y Fab de supervivencia de neuronas trigeminales E17 en presencia de neurotrofinas no añadidas (denominado "sin factor"), NGF 400 pM (denominado "NGF-400 pM), NT3 10 nM (denominado" NT3-10 nM) o MSP 600 pM (denominado "MSP-600 pM).

Las Figura 14-15 del documento WO2004/058184 son gráficos que muestran que el anticuerpo antagonista anti-NGF E3 o el Fab E3 no inhibieron la supervivencia de las neuronas nodasas E17 potenciadas por BDNF, NT4/5 o LIF. También se ensayó el anticuerpo antagonista de ratón anti-NGF 911, y se observaron resultados similares. En concreto, la Figura 14 del documento WO2004/058184 es un gráfico que muestra la comparación del efecto de diversas concentraciones (200 nM u 80 nM) del anticuerpo E3 completo (denominado "3E en la figura"), Fab E3, anticuerpo completo 911 o Fab 911 sobre la supervivencia de neuronas nodasas E17 en presencia de neurotrofinas no añadidas (denominado "sin factores"), BDNF 400 pM (denominado "BDNF-400 pM), NT4/5 400 pM (denominado "NT4/5-400 pM") o LIF 2,5 nM (denominado "LIP-2,5 nM"). La Figura 15 del documento WO2004/058184 es un gráfico que muestra la comparación del efecto de diversas concentraciones (200 nM, 20 nM, 2 nM) de Fab E3 (denominado "3E en la figura") o Fab 911 sobre la supervivencia de neuronas nodasas E17 en presencia de neurotrofinas no añadidas (denominado "control"), BDNF 400 pM (denominado "BDNF-400 pM), NT4/5 400 pM (denominado" NT4/5-400 pM) o LIF 2,5 nM (denominado "LIP-2,5 nM).

Ejemplo 4: Preparación de vectores de expresión de mamífero y expresión de anticuerpo E3 en células de mamífero

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

El vector Db.911.3E es un vector de expresión que comprende la región variable de la cadena pesada del anticuerpo E3 y la región constante de lgG2a humana, y es adecuado para la expresión transitoria o estable de la cadena pesada. Db.911.3E consiste en secuencias de nucleótidos que corresponden a las siguientes regiones: la región promotora del citomegalovirus murino (nucleótidos 1-612); un intrón sintético (nucleótidos 619-1.507); la región codificante de DHFR (nucleótidos 707-1.267); péptido señal de la hormona del crecimiento humana (nucleótidos 1.525-1.602); región variable de la cadena pesada del anticuerpo 3E (nucleótidos 1.603-1.965); región constante de lgG2a de cadena pesada humana que contiene las siguientes mutaciones: A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos con referencia a la secuencia de lgG2a de tipo natural; véase *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624); señal de poliadenilación tardía de SV40 (nucleótidos 2.974-3.217); región potenciadora de SV40 (nucleótidos 3.218-3.463); región del fago f1 (nucleótidos 3.551-4.006) y región codificante de la beta lactamasa (AmpR) (nucleótidos

4.443-5.300). Db.911.3E se depositó en la ATCC el 8 de enero de 2003, y recibió el n.º de acceso de ATCC: PTA-4895.

El vector Eb.911.3E es un vector de expresión que comprende la región variable de la cadena ligera del anticuerpo E3 y la región constante de la cadena kappa humana, y es adecuado para la expresión transitoria de la cadena ligera. Eb.911.3E consiste en secuencias de nucleótidos que corresponden a las siguientes regiones: la región promotora del citomegalovirus murino (nucleótidos 1-612); intrón EF-1 humano (nucleótidos 619-1.142); péptido señal de la hormona del crecimiento humana (nucleótidos 1.173-1.150); región variable de la cadena ligera del anticuerpo E3 (nucleótidos 1.251-1.571); región constante de cadena kappa humana (nucleótidos 1.572-1.892); señal de poliadenilación tardía de SV40 (nucleótidos 1.910-2.153); región potenciadora de SV40 (nucleótidos 2.154-2.399); región del fago f1 (nucleótidos 2.487-2.942) y región codificante de la beta lactamasa (AmpR) (nucleótidos 3379-4236). Eb.911.3E se depositó en la ATCC el 8 de enero de 2003, y recibió el n.º de acceso de ATCC: PTA-4893.

El vector Eb.pur.911.3E es un vector de expresión que comprende la región variable de la cadena ligera del anticuerpo E3 y la región constante de la cadena kappa humana, y es adecuado para la expresión estable de la cadena ligera. Eb.pur.911.3E consiste en las secuencias de nucleótidos correspondientes a las siguientes regiones: la región promotora del citomegalovirus murino (nucleótidos 1-612); intrón EF-1 humano (nucleótidos 619-1.758); región codificante del gen pac (puromicina R) (nucleótidos 739-1.235); región 5'UTR de hsp70 humana (nucleótidos 1.771-1.973); péptido señal de la hormona del crecimiento humana (nucleótidos 1.985-2.062); región variable de la cadena ligera del anticuerpo E3 (nucleótidos 2.063-2.383); región constante de cadena kappa humana (nucleótidos 2.384-2.704); señal de poliadenilación tardía de SV40 (nucleótidos 2.722-2.965); región potenciadora de SV40 (nucleótidos 2.966-3.211); región de fago f1 (nucleótidos 3.299-3.654) y región de codificación de la beta lactamasa (AmpR) (nucleótidos 4.191-5.048). Eb.pur.911.E3 se depositó en la ATCC el 8 de enero de 2003, y recibió el n.º de acceso ATCC PTA-4894.

La expresión celular transitoria se realizó de la siguiente manera: se cotransfectaron transitoriamente las células CHO y HEK293T en placas de 150 mm con 25 ug de cada plásmido (es decir, un plásmido que contenía la cadena pesada y un plásmido que contenía la cadena ligera). Se mezcló el ADN con 100 ul de lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se dejaron los complejos de ADN-lípidos en contacto con las células en medio DMEM/F12 sin suero o antibióticos durante 5 horas. Tras esta incubación, se cambiaron los medios para la expresión a Opti-MEM (Invitrogen) sin ningún aditivo durante dos días. Se recogieron los sobrenadantes celulares que contenían anticuerpo secuencialmente hasta cuatro veces con reemplazo posterior del medio. Se purificaron los sobrenadantes por cromatografía de afinidad usando resina de proteína A MapSelect (Amersham biosciences 17-5199-02). El anticuerpo se unió a la resina de proteína A en glicina 0,3 M, tampón de NaCl 0,6 M a pH 8, luego se eluyó con tampón de citrato 0,1 M a pH 3. Las fracciones que contenían anticuerpo se neutralizaron inmediatamente con tampón Tris 1 M a pH 8,0. A continuación, las fracciones de anticuerpo se sometieron a diálisis y se concentraron en PBS.

Ejemplo 5 – Estudio clínico

Se tratan pacientes con diagnóstico clínico de prostatitis crónica/síndrome de dolor pélvico crónico con anticuerpo antagonista anti-NGF E3 para confirmar la seguridad y eficacia del anticuerpo anti-NGF E3 en el tratamiento de uno o más dolores y síntomas del tracto urinario inferior asociados con la prostatitis crónica y/o el síndrome de dolor pélvico crónico.

Los pacientes que se van a tratar tendrán prostatitis crónica de moderada a grave en la exploración según lo definido por una puntuación del índice de síntomas de la prostatitis crónica (CPSI) de al menos 15 y una prueba de 4 cristales en cultivos de orina o EPS que no muestren evidencia de infección bacteriana. Se deben cumplir otros criterios de inclusión. Los pacientes que no cumplan con todos los criterios de inclusión se considerarán no aptos para su inclusión y no serán distribuidos aleatoriamente en el estudio.

Se evalúa la eficacia de una sola dosis del anticuerpo anti-NGF E3 mediante infusión en comparación con un placebo en el tratamiento del dolor y/o síntomas del tracto urinario inferior asociados con la prostatitis crónica y/o el síndrome de dolor pélvico crónico. Se administra el anticuerpo E3 por vía intravenosa a los pacientes A una dosis de 20 mg. Además de la eficacia, se evalúan la magnitud del efecto del tratamiento en comparación con el placebo; la respuesta a biomarcadores a la prostatitis crónica para el tratamiento con el anticuerpo; y la tasa de respuesta al tratamiento, entre otras mediciones. Los biomarcadores pueden incluir NGF, interleucinas, TNF-alfa, ENA-78 (CXCL5), antígeno específico prostático (PSA), proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1) y proteína 1-alfa inflamatoria de macrófagos (MIP-1α), hormonas adrenocorticales incluyendo, pero sin limitación, testosterona, androstenediona, 11-desoxicortisol y progesterona, entre otros.

El criterio de valoración primario se analiza 6 semanas después de la infusión intravenosa de la dosis única de anticuerpo. El criterio de valoración primario es un cambio en una escala numérica de calificación de 11 puntos (NRS).

Los criterios de valoración secundarios incluyen un cambio en la puntuación del índice de síntomas de la prostatitis

crónica (CPSI) (a las 2, 4, 6, 10 y 16 semanas); cambios en las variables diarias de los síntomas (a las 2, 4, 6, 10 y 16 semanas) incluyendo la frecuencia miccional, frecuencia nocturna, frecuencia de episodios de incontinencia, volumen medio vaciado por micción, gravedad media del dolor por prostatitis crónica, episodios de urgencia urinaria, puntuación media de la alteración del sueño, dolor medio asociado con la puntuación de la eyaculación; cambio en la evaluación de la respuesta global (GRA) (a las 6 y 16 semanas), cambio en el impacto del tratamiento informado por el paciente (PRTI) (a las 6 y 16 semanas), fallos en el tratamiento, biomarcadores, criterios de valoración de seguridad y/o medidas farmacocinéticas. Los criterios de valoración de seguridad pueden incluir episodios adversos, exploración física (incluyendo las constantes vitales y el examen neurológico), medición del volumen residual tras el vaciado (PVR), análisis de laboratorio clínico (incluyendo el análisis de orina) y electrocardiogramas. Los biomarcadores pueden incluir NGF, interleucinas, TNF-alfa, ENA-78 (CXCL5), antígeno prostático específico (PSA), proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) y proteína 1-alfa inflamatoria de macrófagos (MIP-1 α), hormonas adrenocorticales incluyendo, pero sin limitación, testosterona, androstenediona, 11-desoxicortisol y progesterona, entre otros.

El CPSI contiene 3 módulos que miden el dolor, los síntomas urinarios y la calidad de vida global. Las puntuaciones totales varían entre 0 y 21 en el módulo de dolor, de 0 a 10 en los síntomas urinarios y de 0 a 12 en el módulo de calidad de vida, y las puntuaciones más altas indican una mayor gravedad y molestia de los síntomas.

El cuestionario de GRA es una escala simétrica de 7 puntos que mide la respuesta global informada por el paciente al tratamiento en comparación con la línea basal con las siguientes respuestas posibles: notablemente peor, moderadamente peor, levemente peor, sin cambios, levemente mejor, moderadamente mejor y notablemente mejor. Los pacientes que informan de cualquiera de las dos últimas categorías se definen como respondedores al tratamiento.

El PRTI es un cuestionario autoadministrado que contiene cuatro cuestiones para evaluar la satisfacción del paciente, el tratamiento previo, la preferencia y la voluntad de continuar usando la medicación del estudio. Las puntuaciones más altas indican una mayor satisfacción, preferencia o voluntad para usar la medicación del estudio.

La administración del anticuerpo anti-NGF E3 tiene como fin aliviar el dolor y/o un síntoma del tracto urinario inferior asociado con la prostatitis crónica y/o el síndrome de dolor pélvico crónico en los pacientes tratados como se ha descrito anteriormente.

Depósito del material biológico

Los siguientes materiales han sido depositados en la Colección Americana de Cultivos tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia, EE. UU. (ATCC):

Material		n.º de acceso de la ATCC	Fecha del depósito
Eb.911.3E	Cadena ligera de E3	PTA-4893	8 de enero de 2003
Eb.pur.911.3E	Cadena ligera de E3	PTA-4894	8 de enero de 2003
Db.911.3E	Cadena pesada deE3	PTA-4895	8 de enero de 2003

Los detalles concernientes a estos depósitos se pueden encontrar en el documento WO2004058184, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Secuencias de anticuerpos

Región variable de cadena pesada de E3 (las CDR de Kabat están subrayadas; las CDR de Chothia están en ***NEGRITA Y CURSIVA***)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLI***GYDLN***WIRQPPGKGLEWIG***IIWGDGTTDY***

NSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR***GGYWYATSYYFDY***WGQGTLV

TVS (SEQ ID NO:1)

Región variable de cadena ligera de E3 (las CDR de Kabat están subrayadas; las CDR de Chothia están en ***NEGRITA Y CURSIVA***).

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC***RASQSISNNLN***WYQQKPGKAPKLLIY***YTSRFHS***GVP

SRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC***QQEHTLPYT***FGQGTKLEIKRT (SEQ ID

NO:2)

CDR extendidas de cadena pesada de E3

CDRH1: GFSLIGYDLN (SEQ ID NO: 3)

CDRH2: IIWGDGTTDYNSAVKS (SEQ ID NO: 4)

CDRH3: GGYWYATSYYFDY (SEQ ID NO: 5)

CDR extendidas de cadena ligera de E3

CDRL1: RASQSISNNLN (SEQ ID NO: 6)

CDRL2: YTSRFHS (SEQ ID NO: 7)

CDRL3: QQEHTLPYT (SEQ ID NO: 8)

CDR extendidas del anticuerpo monoclonal de ratón 911

CDR extendidas de cadena pesada de 911

CDRH1: GFSLIGYDIN (SEQ ID NO: 9)

CDRH2 : MIWGDGTTDYNSALKS (SEQ ID NO: 10)

CDRH3: GGYYYGTSYYFDY (SEQ ID NO: 11)

CDR extendidas de cadena ligera de 911

CDRL1: RASQDISNHLN (SEQ ID NO: 12)

CDRL2: YISRFHS (SEQ ID NO: 13)

CDRL3: QQSKTLPYT (SEQ ID NO: 14)

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de E3 (completa)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDY
NSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDYWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCP
APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:16)

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de E3 (anticuerpo completo)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVP
SRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:17)

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada de E3 (anticuerpo completo)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCCGAGACCCTG
TCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGGTTCTCACTTATCGGCTATGATCTTAACTGGAT
CCGACAGCCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGATTATCTGGGGTGATGG
AACCACAGACTATAATTCAGCTGTCAAATCCCGCGTCACCATCTCAAAAGACACCT
CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGT
GTATTACTGTGCGAGAGGAGGTTATTGGTACGCCACTAGCTACTACTTTGACTACT
GGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCTG
TCTTCCCACTGGCCCCATGCTCCCGCAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGG
GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCAGAACCTGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGG
CGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGTCTC
TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCATCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCT
ACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAAGCAACACCAAGGTCGACAAGACCGTGGA
GAGAAAGTGTTGTGTGGAGTGTCCACCTTGTCCAGCCCCTCCAGTGGCCGGACCA
TCCGTGTTCCTGTTCCCTCCAAAGCCAAAGGACACCCTGATGATCTCCAGAACCCC
AGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGCAGTT
CAACTGGTATGTGGACGGAGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAAGAGA
GGAGCAGTTCAACTCCACCTTCAGAGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGGTGCACCAG
GACTGGCTGAACGGAAAGGAGTATAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGACTGCCAT
CCAGCATCGAGAAGACCATCTCCAAGACCAAGGGACAGCCAAGAGAGCCACAGGT
GTATACCCTGCCACCATCCAGAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACC
TGTCTGGTGAAGGGATTCTATCCATCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACG
GACAGCCAGAGAACAACTATAAGACCACCCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGATC
CTTCTTCCTGTATTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGAAAC
GTGTTCTCTTGTTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTATACCCAGAAGA
GCCTGTCCCTGTCTCCAGGAAAGTAA(SEQ ID NO: 65)

Secuencia de nucleótidos de dominio variable de cadena pesada de E3

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCCGAGACCCTG
TCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGGTTCTCACTTATCGGCTATGATCTTAACTGGAT
CCGACAGCCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGATTATCTGGGGTGATGG

AACCACAGACTATAATTCAGCTGTCAAATCCCGCGTCACCATCTCAAAAGACACCT
CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGT
GTATTACTGTGCGAGAGGAGGTTATTGGTACGCCACTAGCTACTACTTTGACTACT
GGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA(SEQ ID NO:66)

Secuencia de nucleótidos de cadena ligera de E3 (anticuerpo completo)

GATATCCAGATGACACAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCCTCTGTGGGTGACCGCG
TCACCATCACCTGCCGCGCATCTCAGTCCATTAGCAATAATCTGAACTGGTATCAG
CAGAAGCCAGGCAAAGCCCCAAAACTCCTGATCTACTACACCTCACGCTTCCACTC
AGGTGTCCCATCACGCTTCAGTGGCAGTGGCTCTGGTACAGATTTCACCTTCACCA
TTAGCAGCCTGCAACCAGAAGATATTGCCACTTATTACTGCCAACAGGAGCATACC
CTTCCATATACCTTCGGTCAAGGCACCAAGCTGGAGATCAAACGCACTGTGGCTG
CACCATCTGTCTTCATCTTTCCTCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCCGGAACTGCC
TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCACGCGAGGCCAAAGTACAGTGGAA
GGTGGATAACGCCCTCCAATCCGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGAC
AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCAGACT
ACGAGAAACACMAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGTTCTCC
AGTCACAAAGAGCTTCAACCGCGGTGAGTGCTAA(SEQ ID NO:67)

Secuencia de nucleótidos de dominio variable de cadena ligera de E3

GATATCCAGATGACACAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCCTCTGTGGGTGACCGCG
TCACCATCACCTGCCGCGCATCTCAGTCCATTAGCAATAATCTGAACTGGTATCAG
CAGAAGCCAGGCAAAGCCCCAAAACTCCTGATCTACTACACCTCACGCTTCCACTC
AGGTGTCCCATCACGCTTCAGTGGCAGTGGCTCTGGTACAGATTTCACCTTCACCA
TTAGCAGCCTGCAACCAGAAGATATTGCCACTTATTACTGCCAACAGGAGCATACC
CTTCCATATACCTTCGGTCAAGGCACCAAGCTGGAGATCAAACGC(SEQ ID NO:68)

Las secuencias anteriores y otras secuencias descritas en el presente documento se proporcionan en la lista de secuencias adjunta.

Se entiende que los ejemplos y las realizaciones que se describen en el presente documento son solo para fines ilustrativos y que se sugerirán diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos a los expertos en la materia, y se incluirán dentro del espíritu y del alcance de la presente solicitud.

Listado de secuencias

<110> Pfizer, Inc.

<120> TRATAMIENTO DE LA PROSTATITIS CRÓNICA

<130> PC33751

<160> 77

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 1

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 2

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

                    85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
                100                 105
```

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 3

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 4

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 5

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 6

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 7

Tyr Thr Ser Arg Phe His Ser
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 8

Gln Gln Glu His Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 9

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

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 10

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

<210> 11
<211> 13
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 11

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

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 12

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

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 13

Tyr Ile Ser Arg Phe His Ser
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 14

```
Gln Gln Ser Lys Thr Leu Pro Tyr Thr
 1               5
```

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 15

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1               5                  10                  15
```

<210> 16
<211> 447
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 16

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

```
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95
Arg Gly Gly Tyr Trp Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
        115                 120                 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
    130                 135                 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
                165                 170                 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            180                 185                 190
Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
        195                 200                 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys
    210                 215                 220
Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
225                 230                 235                 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                245                 250                 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
            260                 265                 270
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        275                 280                 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
    290                 295                 300
Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305                 310                 315                 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
                325                 330                 335
Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
            340                 345                 350
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
        355                 360                 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    370                 375                 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
385                 390                 395                 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
                405                 410                 415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
            420                 425                 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440                 445
```

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 17

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
            20                  25                  30

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 18

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 19

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

<210> 20

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 20

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 21

Tyr Thr Ser Arg Phe His Ser
1 5

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 22

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 23

Tyr Val Ser Arg Phe His Ser
1 5

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 24

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

<210> 25
<211> 7

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 25

Tyr Ile Ser Arg Phe His Thr
1 5

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 26

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 27

Tyr Ala Ser Arg Phe His Ser
1 5

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 28

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 29

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 30

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 31

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 32

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 33

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 34

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 35

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 36

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 37

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 38

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 39

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 40

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

<210> 41
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 41

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 42

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 43

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 44

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 45

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

<210> 46

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 46

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 47

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 48

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

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

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 49

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

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 50

Gln Gln Glu Lys Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 51

Gln Gln Glu Ala Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 52
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 52

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

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 53

Gln Gln Glu Arg Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 54

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

<210> 55

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 55

Gln Gln Glu His Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 56
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 56

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

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 57

Gln Gln Glu Ser Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 58
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 58

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

<210> 59

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 59

Gln Gln Glu Lys Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 60
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 60

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

<210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 61

Gln Gln Glu Arg Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 62
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 62

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 63

Gln Gln Glu Arg Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 64

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 65

caggtgcagc tgcaggagtc tggcccagga ctggtgaagc cttccgagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggtt ctcacttatc ggctatgatc ttaactggat ccgacagcct 120
ccagggaagg gactggagtg gattgggatt atctggggtg atggaaccac agactataat 180
tcagctgtca aatcccgcgt caccatctca aaagacacct ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag aggaggttat 300
tggtacgcca ctagctacta ctttgactac tggggccagg gcaccctggt caccgtctcc 360
tcagcctcca ccaagggccc atctgtcttc ccactggccc catgctcccg cagcacctcc 420
gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tcccagaacc tgtgaccgtg 480
tcctggaact ctggcgctct gaccagcggc gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtcc 540
tcaggtctct actccctcag cagcgtggtg accgtgccat ccagcaactt cggcacccag 600
acctacacct gcaacgtaga tcacaagcca agcaacacca aggtcgacaa gaccgtggag 660
agaaagtgtt gtgtggagtg tccaccttgt ccagcccctc cagtggccgg accatccgtg 720
ttcctgttcc ctccaaagcc aaaggacacc ctgatgatct ccagaacccc agaggtgacc 780
tgtgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac ccagaggtgc agttcaactg gtatgtggac 840
ggagtggagg tgcacaacgc caagaccaag ccaagagagg agcagttcaa ctccaccttc 900
agagtggtga gcgtgctgac cgtggtgcac caggactggc tgaacggaaa ggagtataag 960
tgtaaggtgt ccaacaaggg actgccatcc agcatcgaga agaccatctc caagaccaag 1020
ggacagccaa gagagccaca ggtgtatacc ctgccaccat ccagagagga gatgaccaag 1080
aaccaggtgt ccctgacctg tctggtgaag ggattctatc catccgacat cgccgtggag 1140
tgggagtcca acggacagcc agagaacaac tataagacca cccctccaat gctggactcc 1200

gacggatcct tcttcctgta ttccaagctg accgtggaca agtccagatg gcagcaggga 1260
aacgtgttct cttgttccgt gatgcacgag gccctgcaca accactatac ccagaagagc 1320
ctgtccctgt ctccaggaaa gtaa 1344

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 66

caggtgcagc tgcaggagtc tggcccagga ctggtgaagc cttccgagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggtt ctcacttatc ggctatgatc ttaactggat ccgacagcct 120
ccagggaagg gactggagtg gattgggatt atctggggtg atggaaccac agactataat 180
tcagctgtca aatcccgcgt caccatctca aaagacacct ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag aggaggttat 300
tggtacgcca ctagctacta ctttgactac tggggccagg gcaccctggt caccgtctcc 360
tca 363

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 67

gatatccaga tgacacagtc cccatcctcc ctgtctgcct ctgtgggtga ccgcgtcacc 60
atcacctgcc gcgcatctca gtccattagc aataatctga actggtatca gcagaagcca 120
ggcaaagccc caaaactcct gatctactac acctcacgct tccactcagg tgtcccatca 180
cgcttcagtg gcagtggctc tggtacagat ttcaccttca ccattagcag cctgcaacca 240
gaagatattg ccacttatta ctgccaacag gagcataccc ttccatatac cttcggtcaa 300
ggcaccaagc tggagatcaa acgcactgtg gctgcaccat ctgtcttcat ctttcctcca 360
tctgatgagc agttgaaatc cggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
ccacgcgagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatccgg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacc 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacmaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagttctc cagtcacaaa gagcttcaac cgcggtgagt gctaa 645

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 68

gatatccaga tgacacagtc cccatcctcc ctgtctgcct ctgtgggtga ccgcgtcacc 60
atcacctgcc gcgcatctca gtccattagc aataatctga actggtatca gcagaagcca 120
ggcaaagccc caaaactcct gatctactac acctcacgct tccactcagg tgtcccatca 180
cgcttcagtg gcagtggctc tggtacagat ttcaccttca ccattagcag cctgcaacca 240
gaagatattg ccacttatta ctgccaacag gagcataccc ttccatatac cttcggtcaa 300
ggcaccaagc tggagatcaa acgc 324

<210> 69

<211> 98

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 70

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 71

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1               5                  10                  15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr
            20                  25                  30
Asp Ile Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
```

```
            35                  40                  45
Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
    50                  55                  60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65                  70                  75                  80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95
Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
        115                 120
```

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 72

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

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

<400> 73

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

<210> 74
<211> 109

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 74

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 75

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

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

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 76

atggccaccg actccagaac ctcctggctg ctgacagtgt ccctgctgtg tctgctgtgg 60
ccacaggagg ccagcgctca ggtgcagctg caggagtctg gcccaggact ggtgaagcct 120
tccgagaccc tgtccctcac ctgcactgtc tctgggttct cacttatcgg ctatgatctt 180
aactggatcc gacagcctcc agggaaggga ctggagtgga ttgggattat ctggggtgat 240
ggaaccacag actataattc agctgtcaaa tcccgcgtca ccatctcaaa agacacctcc 300
aagaaccagt tctccctgaa gctgagctct gtgaccgccg cggacacggc cgtgtattac 360
tgtgcgagag gaggttattg gtacgccact agctactact ttgactactg gggccagggc 420
accctggtca ccgtctcctc agcctccacc aagggcccat ctgtcttccc actggcccca 480
tgctcccgca gcacctccga gagcacagcc gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc 540
ccagaacctg tgaccgtgtc ctggaactct ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc 600
ccagctgtcc tgcagtcctc aggtctctac tccctcagca gcgtggtgac cgtgccatcc 660
agcaacttcg gcacccagac ctacacctgc aacgtagatc acaagccaag caacaccaag 720
gtcgacaaga ccgtggagag aaagtgttgt gtggagtgtc caccttgtcc agcccctcca 780
gtggccggac catccgtgtt cctgttccct ccaaagccaa aggacaccct gatgatctcc 840
agaaccccag aggtgacctg tgtggtggtg gacgtgtccc acgaggaccc agaggtgcag 900
ttcaactggt atgtggacgg agtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc aagagaggag 960
cagttcaact ccaccttcag agtggtgagc gtgctgaccg tggtgcacca ggactggctg 1020
aacggaaagg agtataagtg taaggtgtcc aacaagggac tgccatccag catcgagaag 1080
accatctcca agaccaaggg acagccaaga gagccacagg tgtataccct gccaccatcc 1140
agagaggaga tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tggtgaaggg attctatcca 1200
tccgacatcg ccgtggagtg ggagtccaac ggacagccag agaacaacta taagaccacc 1260
cctccaatgc tggactccga cggatccttc ttcctgtatt ccaagctgac cgtggacaag 1320
tccagatggc agcagggaaa cgtgttctct tgttccgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1380
cactataccc agaagagcct gtccctgtct ccaggaaagt aattctaga 1429

<210> 77
<211> 729
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<220>
<221> misc_feature
<222> 646
<223> m = A o C

<400> 77

atggccaccg actccagaac ctcctggctg ctgacagtgt ccctgctgtg tctgctgtgg 60
ccacaggagg ccagcgctga tatccagatg acacagtccc catcctccct gtctgcctct 120
gtgggtgacc gcgtcaccat cacctgccgc gcatctcagt ccattagcaa taatctgaac 180
tggtatcagc agaagccagg caaagcccca aaactcctga tctactacac ctcacgcttc 240
cactcaggtg tcccatcacg cttcagtggc agtggctctg gtacagattt caccttcacc 300
attagcagcc tgcaaccaga agatattgcc acttattact gccaacagga gcataccctt 360
ccatatacct tcggtcaagg caccaagctg gagatcaaac gcactgtggc tgcaccatct 420
gtcttcatct ttcctccatc tgatgagcag ttgaaatccg gaactgcctc tgttgtgtgc 480
ctgctgaata acttctatcc acgcgaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc 540
caatccggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 600
ctcagcagca ccctgaccct gagcaaagca gactacgaga aacacmaagt ctacgcctgc 660
gaagtcaccc atcagggcct gagttctcca gtcacaaaga gcttcaaccg cggtgagtgc 720
taattctag 729

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo antagonista anti-NGF para su uso en el tratamiento del dolor asociado con prostatitis crónica/ síndrome de dolor pélvico crónico en un sujeto.

2. Un anticuerpo antagonista anti-NGF para el uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-NGF:

(a) se une a NGF con una K_D inferior a aproximadamente 2 nM;
(b) inhibe la supervivencia dependiente del NGF humano de las neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI_{50} de aproximadamente 100 pM o inferior, en el que la CI_{50} se mide en presencia de NGF humano de aproximadamente 15 pM; y
(c) inhibe la supervivencia dependiente del NGF humano de las neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI_{50} de aproximadamente 10 pM o inferior, en el que la CI_{50} se mide en presencia de aproximadamente 1,5 pM de NGF.

3. Un anticuerpo antagonista anti-NGF para el uso de la reivindicación 1 o 2, en el que el sujeto es un ser humano.

4. Un anticuerpo antagonista anti-NGF para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

5. Un anticuerpo antagonista anti-NGF para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

6. Un anticuerpo antagonista anti-NGF para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo se une a NGF humano.

7. Un anticuerpo antagonista anti-NGF para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dolor asociado con prostatitis crónica/ síndrome de dolor pélvico crónico se selecciona del grupo que comprende dolor abdominal inferior (pélvico); dolor de parte inferior del estómago; dolor de vejiga; dolor suprapúbico; dolor en el pene, testículos, escroto y perineo; dolor uretral; dispareunia; dolor, presión o incomodidad que pueden aumentar a medida que la vejiga se llena; disuria; y dolor eyaculatorio.

8. Un anticuerpo antagonista anti-NGF para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende:

(a) una región CDR1 mostrada en SEQ ID NO: 3;
(b) una región CDR2 mostrada en SEQ ID NO: 4; y
(c) una región CDR3 mostrada en SEQ ID NO: 5; y

una región variable de cadena ligera que comprende:

(a) una región CDR1 mostrada en SEQ ID NO: 6;
(b) una región CDR2 mostrada en SEQ ID NO: 7; y
(c) una región CDR3 mostrada en SEQ ID NO: 8,

en el que el anticuerpo se une específicamente a NGF.

9. Un anticuerpo antagonista anti-NGF para el uso de la reivindicación 8, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

10. Un anticuerpo antagonista anti-NGF para el uso de la reivindicación 9, en el que el anticuerpo antagonista anti-NGF comprende las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 16 y 17.

11. Un anticuerpo antagonista anti-NGF para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo antagonista anti-NGF compite por la unión a NGF con y/o el anticuerpo se une al mismo epítopo que un anticuerpo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10.

12. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista anti-NGF y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento del dolor asociado con prostatitis crónica/ síndrome de dolor pélvico crónico, en la que el anticuerpo antagonista anti-NGF:

(a) se une a NGF con una K_D inferior a aproximadamente 2 nM;
(b) inhibe la supervivencia dependiente del NGF humano de las neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI_{50} de aproximadamente 100 pM o inferior, en la que la CI_{50} se mide en presencia de NGF humano de aproximadamente 15 pM;
(c) inhibe la supervivencia dependiente del NGF humano de las neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI_{50} de aproximadamente 10 pM o inferior, en la que la CI_{50} se mide en presencia de aproximadamente 1,5 pM de NGF.

13. Uso de un anticuerpo antagonista anti-NGF en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del dolor asociado con prostatitis crónica/ síndrome de dolor pélvico crónico en un sujeto.