

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 968**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09	(2006.01)
C07K 16/22	(2006.01)
C12N 1/15	(2006.01)
C12N 1/19	(2006.01)
C12N 1/21	(2006.01)
C12N 5/10	(2006.01)
C12P 21/08	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.08.2012 PCT/JP2012/070433**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.02.2013 WO13022083**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2012 E 12821758 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2743348**

54 Título: **Anticuerpo anti-NGF humano nuevo**

30 Prioridad:

11.08.2011 JP 2011176209
08.12.2011 JP 2011269215

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.04.2018

73 Titular/es:

ASTELLAS PHARMA INC. (100.0%)
3-11, Nihonbashi-Honcho 2-chome, Chuo-ku
Tokyo 103-8411, JP

72 Inventor/es:

KAMOHARA, MASAZUMI;
TANAKA, HIROTSUGU;
KOYA, YUKARI;
TAKASAKI, JUN;
YONEZAWA, ATSUO y
YOSHIMI, EIJI

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 663 968 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo anti-NGF humano nuevo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-NGF humano nuevo. Más específicamente, la presente invención se refiere a un fragmento Fab' de un anticuerpo anti-NGF humano.

10 **Técnica anterior**

Un factor de crecimiento nervioso (NGF) es uno de los factores humorales denominados generalmente "factores neurotróficos", y desempeña un papel importante en la generación y diferenciación de neuronas y en el mantenimiento de las funciones de las neuronas en el organismo. Como receptores de NGF, se conocen un receptor trkA de alta afinidad (tirosina quinasa de tipo receptor) y un receptor p75NTR de baja afinidad. Existe un informe que notifica que entre estos, el p75NTR se une a todos los factores neurotróficos y está implicado en la apoptosis en el proceso de generación neuronal. Sin embargo, el papel del p75NTR no se ha explicado aún lo suficiente. Sin embargo, se sabe que algunos ratones con genes inactivados del NGF y el receptor trkA expresan el mismo fenotipo (documento no de patente 1), y se considera que la acción fisiológica de NGF se expresa principalmente por medio del receptor trkA.

En 1993, hubo un informe que notificaba que la administración de NGF a ratas inducía dolor (documento no de patente 2), y desde entonces, ha habido un informe que notifica que la administración intravenosa de NGF a seres humanos induce mialgia sistémica y que la administración tópica de NGF ejerce un efecto sistémico e induce hiperpatía y alodinia en el sitio de inyección (documento no de patente 3). Además, hay un informe que notifica que un ratón con genes inactivados del receptor trkA muestra analgesia (documento no de patente 4), así que se considera que NGF es una molécula sumamente implicada en la expresión de dolor. Respecto a la correlación entre NGF y el estado patológico de dolor humano, se ha demostrado que la expresión de NGF/trkA se acelera en cartílagos articulares con artrosis (A) (documento no de patente 6) y que el nivel de NGF aumenta en pacientes con artritis reumatoide (documento no de patente 7) o cistitis intersticial (documento no de patente 8).

A partir de los datos anteriores, se espera que si puede desarrollarse un anticuerpo monoclonal que se una específicamente a NGF y tenga una actividad inhibitora contra la acción de NGF, esto será útil para tratar, prevenir y diagnosticar diversas enfermedades incluyendo dolor relacionado con NGF.

Como anticuerpos anti-NGF humano que se han desarrollado clínicamente hasta ahora, se han notificado tanezumab (documento de patente 1) y PG110 (documento de patente 2) como anticuerpos anti-NGF humano humanizados, y REGN475 (documento de patente 3), fulranumab (documento de patente 4) y MEDI-578 (documento de patente 5) como anticuerpos anti-NGF humano totalmente humanos. Entre estos, tanezumab está desarrollándose más activamente por prioridad, y existe un informe que notifica que según resultados de pruebas clínicas, este anticuerpo ejerce un efecto analgésico potente y extenso sobre el dolor, tal como artralgia acompañada por artrosis, lumbalgia crónica y cistalgia acompañada por cistitis intersticial (documentos no de patente 9 a 11).

Generalmente, como factores principales que determinan una dosis eficaz de un fármaco de anticuerpo, se ejemplifican la actividad neutralizante de un anticuerpo contra un antígeno y la cantidad de antígenos presentes en el organismo. Mejorar la actividad neutralizante conduce a la disminución de la dosis y, por consiguiente, esto puede mencionarse como una mejora muy útil que conduce a la disminución de la carga financiera de los pacientes y los costes médicos. Si puede realizarse la disminución de la dosis, también puede llevarse a cabo la administración subcutánea. La administración subcutánea tiene una ventaja principal, que el paciente puede inyectarse por sí mismo en casa si se cumplen determinadas condiciones. Además, aunque el fármaco de anticuerpo se administra generalmente por medio de goteros durante un tiempo determinado en muchos casos en la administración intravenosa, el fármaco puede administrarse como un bolo en la administración subcutánea, lo que es otra ventaja. Tanto el médico como el paciente pueden seleccionar una preparación para administración intravenosa y una preparación para administración subcutánea, y esto es un factor deseable. Sin embargo, en la administración subcutánea, la dosis que puede proporcionarse por administración es tan pequeña como aproximadamente 1 ml en general, por lo que una cantidad suficiente de anticuerpos ha de incluirse en la dosis para expresar la eficacia del fármaco. Además, a diferencia de la administración intravenosa, ha de considerarse la biodisponibilidad para la administración subcutánea. Es decir, con el fin de realizar una preparación para administración subcutánea, se requiere preparar un anticuerpo que presente excelente solubilidad y exprese una eficacia de fármaco suficiente incluso a una dosis pequeña. Por consiguiente, si se obtiene un anticuerpo que tiene una actividad neutralizante mayor contra NGF en comparación con los anticuerpos en la técnica relacionada, esto será útil para tratar enfermedades relacionadas con NGF y para mejorar la comodidad del tratamiento.

Tal como se describió anteriormente, aunque NGF es un factor importante para el crecimiento de neuronas, es necesario realizar un examen suficiente en cuanto a la seguridad de desarrollo de fármacos que inhiben la función

de NGF. Particularmente, como uno de los aspectos que deben examinarse en cuanto a la seguridad, se ejemplifican los efectos en un feto. Hasta ahora, con respecto a la inhibición funcional de NGF, ha habido informes que notificaban que la mutación de NGF es la causa de analgesia congénita (documento no de patente 5), y que en un experimento con animales, cuando se hace que una cobaya embarazada produzca un autoanticuerpo anti-NGF para inhibir NGF en el organismo, la cobaya recién nacida muestra síntomas de analgesia (documento no de patente 12). Además, en una prueba que usa ratones deficientes en NGF o *trkA*, se ha demostrado que la deficiencia de la acción de NGF inhibe el crecimiento de neuronas de nervios sensoriales y nervios simpáticos en un embrión (documentos no de patente 4 y 13). A partir de estos resultados, se entiende que NGF es un factor esencial del neurodesarrollo en la etapa temprana del desarrollo. Las enfermedades relacionadas con NGF también incluyen enfermedades que padecen mujeres en edad de procrear con una alta frecuencia, tales como cistitis intersticial (la mitad o más de los pacientes tienen 44 años de edad o son más jóvenes, y el 90 % de los pacientes son mujeres (documento no de patente 14)), lumbalgia crónica (una edad promedio de 40 a 50, y más del 50 % de los pacientes son mujeres (documentos no de patente 15 a 17)), y migraña (la edad pico de inicio oscila entre los 15 y los 40 años de edad, y el 80 % de los pacientes son mujeres (documento no de patente 18)). En esta situación, al desarrollar el anticuerpo anti-NGF como un fármaco, es muy importante evitar el riesgo de efectos secundarios en un feto en mujeres embarazadas.

Como otro factor de riesgo en el caso de desarrollar el anticuerpo anti-NGF como fármaco, se ejemplifica la formación de inmunocomplejos (IC). El inmunocomplejo que es una combinación de un antígeno y un anticuerpo se trata generalmente en un sistema reticuloendotelial tal como el bazo o el hígado. Sin embargo, se ha notificado que cuando se produce un estado patológico tal como anomalía inmunitaria o cuando el tamaño del IC formado es grande, el IC pierde solubilidad, que se refiere al aumento del riesgo de formación de trombos y al inicio de nefritis causada por la acumulación glomerular del IC. Aunque IgG es un anticuerpo bivalente, cuando un antígeno es polivalente, el IC puede tener diversos tamaños debido a la formación de estructura reticular. El tamaño del IC depende de la cantidad de un anticuerpo y un antígeno y la razón entre los mismos, afinidad de un anticuerpo, y similares. Por ejemplo, el anticuerpo anti-VEGF bevacizumab (marca comercial: Avastin) es un anticuerpo IgG1, y hay un informe que notifica que este anticuerpo forma un IC uniéndose a un dímero VEGF e induce formación de trombos. Específicamente, cuando Avastin y VEGF se administran a un ratón Tg con receptores FcγRIIα humanos, se observa formación de un trombo en la arteria pulmonar (documento no de patente 19). Además, existe un informe que notifica que se forma un trombo arterial con mayor frecuencia en pacientes con cáncer metastásico que recibieron quimioterapia con tratamiento con Avastin, en comparación con un grupo de placebo que sólo recibió quimioterapia (documento no de patente 20). Puesto que NGF también forma un dímero en el organismo para ejercer actividad fisiológica, es deseable mejorar adicionalmente la seguridad evitando el riesgo de formación de IC al desarrollar un fármaco del anticuerpo anti-NGF.

Por los motivos anteriores, para tratar o prevenir diversas enfermedades relacionadas con NGF, es muy importante obtener un anticuerpo anti-NGF que tenga excelente seguridad reduciendo el riesgo de efectos secundarios tales como los efectos en un feto y la formación de trombos mientras mantiene una alta actividad neutralizante.

40 **Técnica relacionada**

Documento de patente

45 [Documento de patente 1] WO2004/058184

[Documento de patente 2] WO2005/061540

[Documento de patente 3] WO2009/023540

50 [Documento de patente 4] WO2005/019266

[Documento de patente 5] WO2006/077441

Documento no de patente

55 [Documento no de patente 1] Conover JC, *et al*, Rev Neurosci. 1997, 8:13-27.

[Documento no de patente 2] Lewin GR, *et al*, J Neurosci. 1993, 13:2136-48.

60 [Documento no de patente 3] Petty BG, *et al*, Ann Neurol. 1994, 36:244-6.

[Documento no de patente 4] Smeyne RJ, *et al*, Nature. 1994,368:246-9.

[Documento no de patente 5] Indo Y, *et al*, Nat Genet. 1996, 13:485-8.

65 [Documento no de patente 6] Iannone F, *et al*, Rheumatology 2002, 41:1413-8.

[Documento no de patente 7] Aloe L, *et al*, Clin Exp Rheumatol. 1997,15:433-8.

[Documento no de patente 8] Lowe EM, *et al*, Br J Urol. 1997, 79:572-7.

[Documento no de patente 9] Lane NE, *et al*, N Engl J Med. 2010, 363:1521-31.

[Documento no de patente 10] Evans RJ, *et al*, J Urol. 2011, 185:1716-21.

[Documento no de patente 11] Katz N, *et al*, Pain. 2011, pendiente de publicación

[Documento no de patente 12] Johnson EM Jr, *et al*, Science. 1980, 210:916-8.

[Documento no de patente 13] Crowley C, *et al*, Cell. 1994, 76:1001-11.

[Documento no de patente 14] Payne CK, *et al*, J Urol. 2007, 177:2042-9.

[Documento no de patente 15] Manchikanti L, *et al*, Pain Physician. 2010, 13:E279-92.

[Documento no de patente 16] Wilkens P, *et al*, JAMA. 2010, 304:45-52.

[Documento no de patente 17] Buynak R, *et al*, Expert Opin Pharmacother. 2010, 11:1787-804.

[Documento no de patente 18] Sakai F, *et al*, Cephalalgia. 1997, 17:15-22.

[Documento no de patente 19] Meyer T, *et al*, J Thromb Haemost. 2009,7:171-81.

[Documento no de patente 20] Scappaticci FA, *et al*, J Natl Cancer Inst. 2007, 99:1232-9.

Sumario de la invención

Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo anti-NGF humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo que tenga excelente seguridad reduciendo el riesgo de efectos secundarios tales como efectos en un feto y formación de trombos mientras mantiene una alta actividad neutralizante. La invención se define por las reivindicaciones.

Solución al problema

La presente divulgación incluye los siguientes aspectos como sustancias y métodos médica o industrialmente útiles.

[1] Un fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano que comprende:

una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 6; y

una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 4.

[2] El fragmento Fab' según [1], en el que una región constante de cadena pesada del fragmento Fab' es una región constante de Ig γ 1 humana.

[3] El fragmento Fab' según [1], en el que una región constante de cadena ligera del fragmento Fab' es una región constante de Ig κ humana.

[4] El fragmento Fab' según [1], en el que la región constante de cadena pesada del fragmento Fab' es la región constante de Ig γ 1 humana, y la región constante de cadena ligera del fragmento Fab' es la región constante de Ig κ humana.

[5] El fragmento Fab' según [1], que comprende:

un fragmento de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16; y

una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 12.

[6] El fragmento Fab' según uno cualquiera de [1] a [5], en el que el fragmento Fab' está conjugado con polietilenglicol.

5 [7] Un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el fragmento de cadena pesada del fragmento Fab' según uno cualquiera de [1] a [6].

[8] Un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la cadena ligera del fragmento Fab' según uno cualquiera de [1] a [6].

10 [9] Un vector de expresión que comprende el polinucleótido según [7] y/o [8].

[10] Una célula huésped transformada con el vector de expresión según [9].

15 [11] La célula huésped según [10], que se selecciona de un grupo que consiste en los (a) y (b) siguientes,

(a) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el fragmento de cadena pesada del fragmento Fab' según uno cualquiera de [1] a [6] y un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la cadena ligera del fragmento Fab'; y

20 (b) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el fragmento de cadena pesada del fragmento Fab' según uno cualquiera de [1] a [6] y con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la cadena ligera del fragmento Fab'.

25 [12] Un método de producción del fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano según uno cualquiera de [1] a [6], que comprende expresar un fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano cultivando la célula huésped según [10] o [11].

[13] Un agente para tratar el dolor, que comprende el fragmento Fab' según uno cualquiera de [1] a [6].

30 [14] El agente para tratar el dolor según [13], en el que el dolor es dolor de artrosis.

[15] Un método para prevenir o tratar el dolor, que comprende administrar el fragmento Fab' según uno cualquiera de [1] a [6].

35 [16] El método según [15], en el que el dolor es dolor de artrosis.

[17] El fragmento Fab' según uno cualquiera de [1] a [6] para su uso en la prevención o tratamiento de dolor.

40 [18] El fragmento Fab' según [17], en el que el dolor es dolor de artrosis.

Efectos ventajosos de la invención

45 El fragmento Fab' pegilado de anticuerpo anti-NGF humano de la presente invención es útil para prevenir o tratar diversas enfermedades en las que el NGF humano está implicado en la formación de estados patológicos. Debido a su alta actividad neutralizante, el fragmento Fab' pegilado de anticuerpo anti-NGF humano de la presente invención proporciona una mejora excelente en aplicaciones clínicas, tales como disminuciones de la dosis, ampliación de los intervalos de administración y mejora del método de administración (por ejemplo, una inyección subcutánea). Además, al reducir el riesgo de efectos secundarios tales como los efectos en un feto y la formación de trombos, el fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano de la presente invención es significativamente excelente en cuanto a la seguridad y contribuye en gran medida a la prevención o tratamiento de diversas enfermedades en las que el NGF humano está implicado en la formación de estados patológicos.

Breve descripción de los dibujos

55 [Fig. 1] La figura 1 muestra un cambio temporal en la cantidad de un anticuerpo retenido en la planta de un modelo de ratón con artritis inducida con colágeno.

Descripción de las realizaciones

60 Los presentes inventores repitieron exámenes creativos para preparar un anticuerpo anti-NGF humano o un fragmento unión a antígeno del mismo. Como resultado, tuvieron éxito en la preparación de un fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano que tiene excelente seguridad reduciendo el riesgo de efectos secundarios tales como los efectos en un feto y la formación de trombos mientras mantiene una alta actividad neutralizante.

65 La estructura básica de una molécula de anticuerpo es común entre las respectivas clases de anticuerpo y está

constituida por una cadena pesada que tiene un peso molecular de 50.000 a 70.000 y una cadena ligera que tiene un peso molecular de 20.000 a 30.000. La cadena pesada consiste generalmente en una cadena de polipéptidos que incluye aproximadamente 440 aminoácidos, y cada clase tiene su estructura característica. Las cadenas pesadas se denominan cadenas γ , μ , α , δ y ϵ correspondientes a IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Además, IgG tiene subclases tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y estas cadenas se denominan γ_1 , γ_2 , γ_3 y γ_4 , respectivamente. Una cadena ligera consiste generalmente en una cadena de polipéptidos que incluye aproximadamente 220 aminoácidos, y se conocen dos tipos de la cadena ligera incluyendo cadenas ligeras de tipo L y de tipo K, que se denominan cadenas λ y κ respectivamente. Respecto a la constitución del péptido de la estructura básica de una molécula de anticuerpo, se unen dos cadenas pesadas homólogas y dos cadenas ligeras homólogas por medio de enlaces disulfuro (enlaces S-S) y enlaces no covalentes, y el peso molecular del mismo es de 150.000 a 190.000. Los dos tipos de cadenas ligeras pueden combinarse con cualquier cadena pesada. Cada molécula de anticuerpo siempre consiste en dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas.

Hay cuatro enlaces S-S intracatenarios en una cadena pesada (cinco enlaces para las cadenas μ y ϵ) y dos en una cadena ligera. Se forma un bucle por de 100 a 110 residuos de aminoácido, y esta estructura estérica es similar entre los respectivos bucles y se denomina unidad o dominio estructural. Tanto para las cadenas pesadas como las cadenas ligeras, la secuencia de aminoácidos del dominio situado en el extremo N-terminal del mismo no es constante, incluso en un patrón de referencia de la misma clase (subclase) de la misma especie animal, y este dominio se denomina la región variable. Cada uno de los dominios se denomina región variable de cadena pesada (V_H) y región variable de cadena ligera (V_L) respectivamente. Puesto que la secuencia de aminoácidos del lado C-terminal del dominio es prácticamente constante en cada clase o subclase, esta región se denomina región constante, y cada uno de los dominios se describe como C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} y C_L respectivamente.

El sitio determinante antigénico de un anticuerpo está constituido por V_H y V_L , y la especificidad de unión depende de la secuencia de aminoácidos de este sitio. Por otro lado, actividades biológicas tales como unión a complementos o diversas células reflejan las diferencias en la estructura de región constante entre las diversas clases de Ig. Se sabe que la variabilidad en las regiones variables de la cadena pesada y cadena ligera está limitada principalmente a tres regiones hipervariables pequeñas presentes en ambas cadenas, y estas regiones se denominan regiones determinantes de complementariedad (CDR; CDR1, CDR2 y CDR3 empezando desde el lado N-terminal). La parte restante de la región variable se denomina región estructural (FR) y es relativamente constante.

Una región entre el dominio C_{H1} y el dominio C_{H2} de la región constante de cadena pesada de un anticuerpo se denomina región bisagra. Esta región incluye muchos residuos de prolina y tiene una pluralidad de enlaces S-S entre cadenas que conectan dos cadenas pesadas. Por ejemplo, cada región bisagra de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas incluye 2, 4, 11 y 2 residuos de cisteína respectivamente que constituyen los enlaces S-S entre cadenas pesadas. La región bisagra es una región altamente sensible a una enzima proteolítica tal como papaína o pepsina. Cuando se digiere un anticuerpo con papaína, su cadena pesada se escinde en una posición más próxima al lado N-terminal que al enlace S-S de cadena pesada entre cadenas de la región bisagra, mediante lo cual el anticuerpo se descompone en dos fragmentos Fab y un fragmento Fc. El fragmento Fab está constituido por un fragmento de cadena ligera y uno de cadena pesada que incluye una región variable de cadena pesada (V_H), un dominio C_{H1} y una parte de la región bisagra. Cuando se digiere un anticuerpo con pepsina, su cadena pesada se escinde en una posición más próxima al lado C-terminal que al enlace S-S de cadena pesada entre cadenas de la región bisagra, mediante lo cual se generan fragmentos $F(ab')_2$. El fragmento $F(ab')_2$ es un fragmento que tiene una estructura dimérica en la que dos fragmentos Fab' se unen entre sí por medio del enlace S-S entre cadenas pesadas en la región bisagra. El fragmento Fab' está constituido por un fragmento de cadena ligera y uno de cadena pesada que incluye una región variable de cadena pesada (V_H), un dominio C_{H1} , y una parte de la región bisagra. Se incluyen residuos de cisteína que constituyen el enlace S-S entre cadenas pesadas en la parte de la región bisagra. Todos los fragmentos Fab, fragmentos $F(ab')_2$ y fragmentos Fab' incluyen la región variable y tienen actividad de unión a antígeno.

El fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano que los presentes inventores prepararon satisfactoriamente es un fragmento Fab' que tiene las siguientes características.

El fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 6 y una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 4.

Específicamente, los presentes inventores construyeron anticuerpos usando una tecnología de desarrollo de anticuerpo monoclonal humano, ratón "VelocImmune" [tecnología de anticuerpo VelocImmune; Regeneron Inc. (patente estadounidense n.º 6596541)], y seleccionaron los anticuerpos usando pruebas para diversas actividades biológicas y propiedades físicas, teniendo así éxito en la identificación del fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano de la presente invención. En la tecnología VelocImmune, se exponen ratones transgénicos en los que las regiones variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina endógenas se reemplazan con las regiones variables humanas correspondientes al antígeno de interés (por ejemplo, β NGF humano), y se recuperan células linfáticas de los ratones que expresan anticuerpos. Las células linfáticas se fusionan con células de mieloma de

ratón para preparar hibridomas. Se seleccionan las células de hibridoma para identificar células de hibridoma que producen esos anticuerpos que se unen específicamente al antígeno de interés. Los anticuerpos que se producen en el presente documento son anticuerpos que tienen las regiones variables de anticuerpos humanos y las regiones constantes de anticuerpos de ratón (también denominados anticuerpos quiméricos). Después, si se identifica el anticuerpo que se une específicamente al antígeno de interés y tiene una actividad neutralizante deseada, se aíslan ADN que codifican las regiones variables de la cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo de las células de hibridoma y se unen a ADN que codifican las regiones constantes de la cadena pesada y cadena ligera de una clase deseada de anticuerpo humano. El gen resultante que codifica la cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo se expresa en células (por ejemplo, células CHO) para producir una molécula de anticuerpo. La cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo producido por el método anterior son la cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo "totalmente humano" derivado de un gen de inmunoglobulina humana.

El fragmento Fab' pegilado de anticuerpo anti-NGF humano de la presente invención puede prepararse fácilmente por los expertos en la técnica basándose en la información de secuencia en la región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera del mismo divulgada en el presente documento, usando un método comúnmente conocido en la técnica. Preferiblemente, el fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano puede prepararse como un fragmento Fab' de anticuerpo totalmente humano uniendo la región variable de cadena pesada y regiones variables de cadena ligera del mismo a una parte de la región constante de cadena pesada (que incluye el dominio C_H1 y una parte de región bisagra que incluye cisteína de región bisagra) y región constante de cadena ligera de un anticuerpo humano, respectivamente. Específicamente, se preparan un fragmento de gen de región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de bases que codifica el aminoácido de región variable de cadena pesada del fragmento Fab' de la presente invención (SEQ ID NO: 6), y un fragmento de gen de región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de bases que codifica el aminoácido de región variable de cadena ligera del fragmento Fab' de la presente invención (SEQ ID NO: 4). Después, los genes de región variable de la cadena pesada y cadena ligera se unen a cada gen de una parte de región constante de cadena pesada y una región constante de cadena ligera en una clase apropiada de anticuerpo humano para preparar un gen de fragmento Fab' de anticuerpo totalmente humano. A continuación, este gen se une a un vector de expresión apropiado y se introduce en una célula cultivada. Finalmente, esta célula cultivada se cultiva, mediante lo cual un fragmento Fab' monoclonal puede obtenerse del sobrenadante del cultivo.

Los fragmentos génicos que codifican los aminoácidos de la región variable de cadena pesada y cadena ligera del fragmento Fab' pueden sintetizarse usando un método de síntesis génica conocido en la técnica, partiendo de una base de, por ejemplo, secuencias de bases diseñadas basándose en las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera. Los ejemplos de este método de síntesis génica incluyen diversos métodos conocidos para los expertos en la técnica, tales como el método de síntesis génica de anticuerpos descrito en el documento WO90/07861.

Después, se unen los fragmentos génicos de la región variable descritos anteriormente al gen de región constante de un anticuerpo humano para preparar un gen de fragmento Fab' totalmente humano. Aunque puede elegirse cualquier subclase de la región constante (por ejemplo, la región constante de una cadena pesada tal como la cadena γ 1, γ 2, γ 3 o γ 4, o la región constante de una cadena ligera tal como la cadena λ o κ) como la región constante del anticuerpo humano, preferiblemente pueden usarse Ig γ 1 humana como la región constante de cadena pesada e Ig κ humana como la región constante de cadena ligera.

Tras la preparación de este gen de fragmento Fab' de anticuerpo totalmente humano, pueden realizarse la introducción del gen en un vector de expresión, introducción del vector de expresión en células en cultivo, cultivo de las células en cultivo, purificación del fragmento Fab' y similares usando diversos métodos conocidos en la técnica.

Los ejemplos del vector de expresión que se une al gen así obtenido incluyen vector de GS pEE6.4 o pEE12.4 (Lonza Biologies), pero no están específicamente limitados, siempre que puedan expresar tal gen de anticuerpo. Además, puede usarse un vector de expresión que ya tiene un gen de región constante de Ig humana tal como AG- γ 1 o AG- κ (por ejemplo, véase el documento WO94/20632).

El vector de expresión anteriormente descrito se introduce en células en cultivo, por ejemplo, mediante un método de fosfato de calcio o un método de electroporación y similares.

Los ejemplos de las células en cultivo en las que se introduce el vector de expresión incluyen células en cultivo tales como células CHO-K1SV, células CHO-DG44 y células 293, y estas células pueden cultivarse mediante un método convencional.

El fragmento Fab' acumulado en un sobrenadante de cultivo tras el cultivo descrito anteriormente puede purificarse mediante diversos tipos de cromatografía en columna. Por ejemplo, es posible usar cromatografía en columna usando KappaSelect o similares.

El fragmento Fab' puede prepararse usando un método de expresión recombinante tal como se describió anteriormente. Sin embargo, el fragmento Fab' puede prepararse realizando digestión con pepsina tras preparar

primero un anticuerpo de longitud completa, y tratando el fragmento F(ab')₂ obtenido con un agente reductor tal como 2-mercaptoetanol.

Preferiblemente, el fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano puede obtenerse fácilmente sintetizando ADN que comprende una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada mostrada por SEQ ID NO: 6 y ADN que comprende una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera mostrada por SEQ ID NO: 4, y uniendo los ADN a una clase adecuada de genes de región constante de anticuerpo humano, preferiblemente un gen de región constante de Igγ1 humana para la cadena pesada y un gen de región constante de Igk humana para la cadena ligera, para construir un gen de fragmento Fab' de anticuerpo totalmente humano usando un método conocido en la técnica, e introduciendo el gen en un vector de expresión, introduciendo el vector de expresión en una célula cultivada, cultivando la célula en cultivo, y purificando un fragmento Fab' recogido de la célula en cultivo usando diversos métodos conocidos en la técnica. Preferiblemente, el ADN que comprende una secuencia de bases que codifica para las secuencias de aminoácidos de región variable de cadena pesada mostradas por SEQ ID NO: 6 comprende las secuencias de bases mostradas por SEQ ID NO: 5. Preferiblemente, el ADN que comprende una secuencia de bases que codifica las secuencias de aminoácidos de región variable de cadena ligera mostradas por SEQ ID NO: 4 comprende las secuencias de bases mostradas por SEQ ID NO: 3.

En la presente memoria descriptiva, el "fragmento Fab'" se refiere a un fragmento de anticuerpo monovalente constituido con un fragmento de cadena ligera y uno de cadena pesada que incluye una región variable de cadena pesada (V_H), un dominio C_H1, y una parte de una región bisagra. En la parte de la región bisagra, se incluye al menos un residuo de cisteína (también denominado "cisteína de región bisagra" en la presente memoria descriptiva) distinto de los residuos de cisteína que constituyen el enlace S-S entre la cadena pesada y la cadena ligera. La cisteína de región bisagra puede usarse como sitio de modificación de polietilenglicol descrito a continuación. El número de las cisteínas de región bisagra en el fragmento Fab' es variable dentro de un intervalo de desde 1 hasta varios residuos de cisteína dependiendo de la clase de un anticuerpo usado, y puede ajustarse fácilmente por un experto en la técnica. Por ejemplo, cuando se prepara un fragmento Fab' de una clase de IgG1 humana (que tiene generalmente dos cisteínas de región bisagra en una región bisagra), se inserta un codón de terminación entre un sitio de codificación de la primera cisteína de región bisagra y un sitio de codificación de la segunda cisteína de región bisagra en la región bisagra de la cadena pesada, mediante lo cual puede prepararse un fragmento Fab' que tiene una cisteína de región bisagra en la región bisagra. Además, si se inserta un codón de terminación tras el sitio de codificación de la segunda cisteína de región bisagra, puede prepararse un fragmento Fab' que tiene dos cisteínas de región bisagra en la región bisagra.

El fragmento de cadena pesada preferible del fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano que comprende la región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 6 y una parte de una región constante de Igγ1 humana, es un fragmento de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. Preferiblemente, ADN que comprende una secuencia de bases que codifica el fragmento de cadena pesada del fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16 comprende la secuencia de bases mostrada por SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 15. La cadena ligera preferible del fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano que comprende la región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 4 y una región constante de Igk humana, es una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 12. Preferiblemente, ADN que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 12 comprende la secuencia de bases mostrada por SEQ ID NO: 11.

Como fragmento Fab' pegilado de anticuerpo anti-NGF humano preferible de la presente invención que comprende el fragmento de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 10 y la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 12, se muestra a modo de ejemplo un fragmento Fab' de anticuerpo 1-15(N52D) totalmente humano descrito a continuación en los ejemplos. Como fragmento Fab' pegilado de anticuerpo anti-NGF humano preferible de la presente invención que comprende el fragmento de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 14 y la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 12, se muestra a modo de ejemplo un fragmento Fab' de anticuerpo 1-15(N52D-A) totalmente humano descrito a continuación en los ejemplos. Como fragmento Fab' pegilado de anticuerpo anti-NGF humano preferible de la presente invención que comprende el fragmento de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 16 y la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 12, se muestra a modo de ejemplo un fragmento Fab' de anticuerpo 1-15(N52D-P) totalmente humano descrito a continuación en los ejemplos.

También se divulga un fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano que comprende la región variable de cadena pesada que comprende CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos en la posición desde 31 hasta 35 de SEQ ID NO: 6, CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en la posición desde 50 hasta 65 de SEQ ID NO: 6 y CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en la posición desde 98 hasta 110 de SEQ ID NO: 6, y la región variable de cadena ligera que comprende CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos en la

posición desde 24 hasta 39 de SEQ ID NO: 4, CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en la posición desde 55 hasta 61 de SEQ ID NO: 4 y CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en la posición desde 94 hasta 102 de SEQ ID NO: 4. El fragmento Fab' también puede prepararse por los expertos en la técnica según procedimientos tales como los descritos anteriormente.

5 El fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano de la presente invención está modificado al conjugarse a polietilenglicol (PEG) a través de la cisteína de región bisagra del mismo. Puede conjugarse PEG al fragmento Fab' usando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, documento EP0948544). En la presente invención, puede usarse PEG lineal o ramificado que tiene un peso molecular promedio arbitrario o un derivado del mismo, que puede seleccionarse fácilmente por un experto en la técnica según el uso previsto. Por ejemplo, en un tejido tumoral o en el momento de la respuesta inflamatoria, la permeabilidad vascular está notablemente potenciada en comparación con un tejido normal, por lo que sustancias que alcanzan el tejido tienden a filtrarse fuera del vaso sanguíneo y acumularse en el tumor o el tejido inflamatorio (efecto EPR). También se sabe que una sustancia de bajo peso molecular puede reabsorberse fácilmente en vasos sanguíneos y que una sustancia de alto peso molecular no se reabsorbe fácilmente. Por tanto, con el fin de mejorar la capacidad de retención del fragmento Fab' en un tejido lesional, puede conjugarse PEG que tiene un alto peso molecular promedio (por ejemplo, aproximadamente 40.000 Da) a este fragmento. Cuando se desea que el fragmento Fab' se excrete rápidamente fuera del organismo, puede conjugarse PEG que tiene un bajo peso molecular promedio (por ejemplo, aproximadamente 10.000 Da) a este fragmento. Además, con el fin de facilitar la unión de PEG a la cisteína de región bisagra, puede usarse un derivado de PEG. Por ejemplo, tal como se describe a continuación en los ejemplos, es posible usar un derivado de PEG al que se ha unido un grupo reactivo con tiol tal como maleimida y unir un grupo tiol de la cisteína de región bisagra al grupo maleimida mediante un enlace covalente. Generalmente, el peso molecular promedio de PEG oscila entre aproximadamente 500 Da y aproximadamente 50.000 Da, preferiblemente oscila entre aproximadamente 5000 Da y aproximadamente 40.000 Da y más preferiblemente oscila entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da.

Como método de medición de la actividad de unión del fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano obtenido al NGF humano, existe un método tal como ELISA o FACS. Por ejemplo, cuando se usa ELISA, se inmoviliza β NGF humano en una placa de ELISA, se añade el fragmento Fab' a la misma para provocar una reacción y después se deja que un anticuerpo secundario tal como un anticuerpo anti-kappa marcado con una enzima tal como peroxidasa del rábano (HRP) reaccione con la mezcla de reacción. Tras lavar la placa, se mide la actividad usando un reactivo (por ejemplo, un reactivo cromogénico de TMB en un caso de marcaje con HRP) que detecta la actividad, identificando así la unión del anticuerpo secundario. Además, el fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano también incluye un fragmento Fab' que se une a NGF derivado de otro animal (por ejemplo, NGF de ratón) así como NGF humano, por lo que puede medirse actividad de unión con respecto a una proteína de este tipo.

El fragmento Fab' pegilado de anticuerpo anti-NGF humano de la presente invención tiene actividad neutralizante con respecto a NGF humano. Cuando se usa en la presente memoria descriptiva, el término "actividad neutralizante" del fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano se refiere a una actividad que inhibe cualquier actividad biológica resultante de NGF mediante unión a NGF y la actividad neutralizante puede evaluarse usando una o una pluralidad de actividades biológicas de NGF como referencia. Los ejemplos de tal actividad neutralizante incluyen la actividad inhibitoria frente a la unión de NGF a trkA que es el receptor de NGF, la actividad inhibitoria frente al influjo de calcio intracelular mediado por una señal de NGF-trkA y la actividad inhibitoria frente a la señalización de supervivencia celular dependiente de NGF. La actividad neutralizante puede evaluarse usando métodos descritos a continuación en los ejemplos.

Con el fin de evaluar más específicamente el efecto del fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano de la presente invención, puede realizarse una prueba *in vivo*. Por ejemplo, tal como se describe a continuación en los ejemplos, puede evaluarse la eficacia farmacológica *in vivo* del fragmento Fab' mediante una prueba de efecto analgésico o similar que usa un modelo de artritis de ratón. También es posible evaluar el efecto de retención en un tejido lesional usando una prueba para determinar la propiedad de distribución en una lesión.

Además, el fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano de la presente invención también puede evaluarse en cuanto al riesgo de efectos secundarios. Por ejemplo, tal como se describe a continuación en los ejemplos, usando una prueba de transferencia placentaria realizada tras la administración del fragmento Fab' a animales gestantes, es posible evaluar la posibilidad de que el fragmento Fab' pegilado de anticuerpo anti-NGF humano pueda ejercer efectos en un feto. Además, tal como se describe a continuación en los ejemplos, el tamaño de un inmunocomplejo (IC) formado entre el fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano de la presente invención y NGF se mide usando una prueba para determinar la formación de IC con NGF, mediante lo cual puede evaluarse la posibilidad de la inducción de formación de trombos.

Además, como método de evaluación de diversos tipos de estabilidad (por ejemplo, estabilidad térmica, estabilidad en almacenamiento a largo plazo y estabilidad en alta concentración) del fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano de la presente invención, se muestra a modo de ejemplo un método de uso de calorimetría diferencial de barrido y un método de medición de la formación de agregados durante almacenamiento.

Opcionalmente se purifica el fragmento Fab' pegilado de anticuerpo anti-NGF humano de la presente invención y después se formula según métodos comunes y puede usarse para tratar dolor tal como dolor de artrosis (dolor de A), dolor reumático, dolor por cáncer, dolor neuropático, lumbalgia crónica, dolor posoperatorio, dolor posherpético, neuropatía diabética dolorosa, dolor por fractura y síndrome de vejiga dolorosa y enfermedades en las que está implicado el NGF en la formación de estados patológicos, tales como cistitis intersticial, pancreatitis aguda, pancreatitis crónica y endometriosis.

El fragmento Fab' pegilado de anticuerpo anti-NGF humano de la presente invención puede usarse preferiblemente como agente para tratar el dolor y más preferiblemente como agente para tratar dolor de artrosis. Los ejemplos de la formulación de este agente de tratamiento y similares incluyen formulaciones parenterales tales como agentes inyectables y agentes de infusión, que se administran preferiblemente mediante administración intravenosa, administración subcutánea y similares. En el procedimiento de formulación, pueden usarse portadores o aditivos que coinciden con estas formulaciones dentro de un intervalo farmacéuticamente aceptable.

La cantidad de fragmento Fab' pegilado anti-NGF humano de la invención añadida a la formulación anteriormente descrita varía dependiendo de la edad o intensidad de síntomas del paciente, la forma farmacéutica de la formulación usada o el título de unión del anticuerpo y similares; por ejemplo, pueden usarse de aproximadamente 0,001 mg/kg a 100 mg/kg del anticuerpo.

La presente divulgación también proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano de la presente invención, y un vector de expresión que comprende el mismo. La presente invención también proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena pesada del fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano de la presente invención, y un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena ligera del fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano de la presente invención, y un vector de expresión que comprende uno cualquiera o ambos de los mismos. El vector de expresión de la presente divulgación no está específicamente limitado, siempre que pueda expresar un gen que codifica el fragmento Fab' de la presente invención o su región variable de cadena pesada y/o región variable de cadena ligera en diversas células huésped de células procariontas y/o células eucariotas y producir estos polipéptidos. Los ejemplos del mismo incluyen vectores de plásmido, vectores virales (por ejemplo, adenovirus, retrovirus) y similares. Preferiblemente, el vector de expresión comprende un polinucleótido que comprende o bien una secuencia que codifica el fragmento de cadena pesada o fragmento de cadena ligera del fragmento Fab' anteriormente descrito de la presente invención o tanto un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el fragmento de cadena pesada del fragmento Fab' de la presente invención como un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la cadena ligera del fragmento Fab' de la presente invención.

El vector de expresión puede comprender un gen que codifica el fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano de la presente invención o un gen que codifica la región variable de cadena pesada y/o la región variable de cadena ligera del fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano de la presente invención, y un promotor operativamente unido al gen. Los ejemplos de un promotor para expresar un gen que codifica el fragmento Fab' de la presente invención o su región variable de cadena pesada y/o región variable de cadena ligera en una bacteria incluyen promotor Trp, promotor lac, promotor recA, promotor λ PL, promotor lpp, promotor tac y similares, cuando el huésped es una bacteria del género *Escherichia*. Los ejemplos de un promotor para la expresión en levadura incluyen promotor PH05, promotor PGK, promotor GAP y promotor ADH, y algunos ejemplos de un promotor para la expresión en el género *Bacillus* incluyen promotor SL01, promotor SP02, promotor penP y similares. Cuando el huésped es una célula eucariota tal como una célula de mamífero, los ejemplos del promotor incluyen promotor derivado de SV40, promotor de retrovirus, promotor de choque térmico y similares.

Cuando se usa una bacteria, particularmente *Escherichia coli*, como célula huésped, el vector de expresión de la presente invención puede comprender además un codón de iniciación, un codón de terminación, una región de terminación y una unidad replicable. Cuando se usa levadura, una célula de animal o célula de insecto como huésped, el vector de expresión de la presente invención puede comprender un codón de iniciación y un codón de terminación. En este caso, puede comprender una secuencia potenciadora, regiones no codificantes en el lado de 5' y el lado de 3' de un gen que codifica el fragmento Fab' de la presente invención o la región variable de cadena pesada o región variable de cadena ligera del mismo, una secuencia de señal de secreción, una unión de corte y empalme, una región de poliadenilación, una unidad replicable o similares. Además, puede comprender un marcador de selección que es de uso común (por ejemplo, gen de resistencia a tetraciclina, gen de resistencia a ampicilina, gen de resistencia a canamicina, gen de resistencia a neomicina, gen de ácido dihidrofólico reductasa) según el uso previsto.

La presente divulgación también proporciona un transformante en el que se introduce un gen que codifica el fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano de la presente invención o un gen que codifica la región variable de cadena pesada y/o la región variable de cadena ligera del fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano de la presente invención. Un transformante de este tipo puede prepararse, por ejemplo, transformando una célula huésped con el vector de expresión de la presente invención. Una célula huésped que se usa para preparar el transformante no está específicamente limitada, siempre que sea adecuada para el vector de expresión

anteriormente mencionado y pueda transformarse; los ejemplos de la misma incluyen diversas células tales como células naturales o líneas establecidas de manera artificial de células que se usan comúnmente en el campo técnico de la presente invención (por ejemplo, bacterias (bacterias del género *Escherichia*, bacterias del género *Bacillus*), levaduras (el género *Saccharomyces*, el género *Pichia* y similares), células de animales o células de insectos (por ejemplo, Sf9) y similares. La transformación puede realizarse mediante cualquier método conocido en sí mismo.

Preferiblemente, el transformante es o bien una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena pesada del fragmento Fab' de la presente invención y un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena ligera del fragmento Fab', o una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena pesada del fragmento Fab' de la presente invención y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena ligera del fragmento Fab'. Más preferiblemente, el transformante es o bien una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el fragmento de cadena pesada del fragmento Fab' anteriormente descrito de la presente invención y un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la cadena ligera del fragmento Fab', o bien una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el fragmento de cadena pesada del Fab' anteriormente mencionado de la presente invención y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la cadena ligera del fragmento Fab'.

La presente divulgación también proporciona un método para producir el fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano de la presente invención, que comprende expresar en una célula huésped un gen que codifica el fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano de la presente invención o un gen que codifica la región variable de cadena pesada y/o la región variable de cadena ligera del fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano de la presente invención, es decir, usando un transformante de este tipo. Preferiblemente, la célula huésped que se usa en el método anterior es una célula huésped transformada con el vector de expresión anteriormente descrito de la presente invención y puede comprender por separado o de manera simultánea un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena pesada del fragmento Fab' de la presente invención y un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena ligera del fragmento Fab'.

Cuando se produce el fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano de la presente invención, el transformante puede cultivarse en un medio de nutriente. El medio de nutriente contiene preferiblemente una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno inorgánico o fuente de nitrógeno orgánico, que se requieren para el crecimiento del transformante. Los ejemplos de la fuente de carbono incluyen glucosa, dextrano, almidón soluble, sacarosa y similares; los ejemplos de la fuente de nitrógeno inorgánico o fuente de nitrógeno orgánico incluyen sales de amonio, nitratos, aminoácidos, licor de maceración de maíz, peptona, caseína, extracto de carne, torta de semilla de soja, extracto de patata y similares. Si se desea, pueden contenerse otros nutrientes (por ejemplo, sales inorgánicas (por ejemplo, cloruro de calcio, dihidrogenofosfato de sodio, cloruro de magnesio), vitaminas, antibióticos (por ejemplo, tetraciclina, neomicina, ampicilina, canamicina y similares) y similares).

El cultivo del transformante se realiza mediante un método conocido en sí mismo. Las condiciones de cultivo, por ejemplo, temperatura, pH del medio y tiempo de cultivo se seleccionan de manera adecuada. Por ejemplo, cuando el huésped es una célula de animal, puede usarse un medio MEM que contiene aproximadamente del 5 % al 20 % de suero bovino fetal (Science, vol. 122, pág. 501, 1952), medio DMEM (Virology, vol. 8, pág. 396, 1959), medio RPMI1640 (J. Am. Med. Assoc., vol. 199, pág. 519, 1967), medio 199 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., vol. 73, pág. 1, 1950) y similares como medio. El pH del medio es preferiblemente de aproximadamente 6 a 8, el cultivo se realiza normalmente a de aproximadamente 30 °C a 40 °C durante de aproximadamente 15 a 72 horas y puede realizarse aireación o agitación según sea necesario. Cuando el huésped es una célula de insecto puede mencionarse, por ejemplo, medio de Grace que comprende suero bovino fetal (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 82, pág. 8404, 1985) y similares y el pH del mismo es preferiblemente de aproximadamente 5 a 8. El cultivo se realiza normalmente a de aproximadamente de 20 °C a 40 °C durante de 15 a 100 horas y puede realizarse aireación o agitación según sea necesario. Cuando el huésped es una bacteria, un actinomiceto, levadura o un hongo filamentoso, por ejemplo, un medio líquido que comprende las fuentes de nutrientes descritas anteriormente resulta apropiado. Un medio que tiene un pH de 5 a 8 es preferible. Cuando el huésped es *E. coli*, los ejemplos preferidos del medio incluyen medio LB, medio M9 (Miller *et al.*, Exp. Mol. Genet, Cold Spring Harbor Laboratory, pág. 431, 1972) y similares. En este caso, el cultivo puede realizarse normalmente a de 14 °C a 43 °C durante aproximadamente 3 a 24 horas, mientras se realiza aireación o agitación según sea necesario. Cuando el huésped es una bacteria del género *Bacillus*, el cultivo puede realizarse normalmente a de 30 °C a 40 °C durante de aproximadamente 16 a 96 horas, mientras se realiza aireación o agitación según sea necesario. Cuando el huésped es levadura, los ejemplos del medio incluyen medio mínimo de Burkholder (Bostian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 77, pág. 4505, 1980) y el pH del medio es de manera deseable de 5 a 8. El cultivo se realiza normalmente a de aproximadamente 20 °C a 35 °C durante de aproximadamente 14 a 144 horas y se realiza aireación o agitación según sea necesario.

El fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano puede recuperarse, preferiblemente aislarse y purificarse, a partir de un transformante en cultivo tal como se describió anteriormente. Los ejemplos del método de aislamiento y

purificación incluyen métodos basados en diferencias de solubilidad, tales como precipitación por adición de sal y por disolvente; métodos basados en diferencias de peso molecular, tales como diálisis, ultrafiltración, filtración en gel y electroforesis en gel de poliacrilamida – dodecilsulfato de sodio; métodos basados en diferencias de carga eléctrica, tales como cromatografía por intercambio iónico y cromatografía con hidroxapatita; métodos basados en afinidad específica, tales como cromatografía por afinidad; métodos basados en diferencias de hidrofobia, tales como cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa; métodos basados en diferencias de punto isoelectrónico, tal como isoelectroenfoque; y similares.

Aunque anteriormente se ha descrito de manera general la presente invención, en el presente documento se proporcionan ejemplos específicos sólo para entender mejor la presente invención. Estos ejemplos son únicamente con fines ilustrativos y no limitan el alcance de la presente invención.

Ejemplos

En etapas que usan un reactivo o kit comercialmente disponible, se realizaron experimentos según los protocolos adjuntos a menos que se especifique lo contrario.

(Ejemplo 1: Inmunización de ratón VelocImmune)

Se obtuvo un anticuerpo anti-NGF humano inmunizando ratones VelocImmune. Con el fin de aumentar la diversidad del anticuerpo obtenido, los presentes inventores examinaron una pluralidad de métodos de inmunización, vías de administración, adyuvantes, periodos de inmunización, y similares. Usando un β NGF humano (R&D Systems, Inc.) como inmunógeno, los presentes inventores examinaron un método de inmunización en el que se usa el β NGF humano para la inmunización mezclándolo con un adyuvante tras su disolución y un método de inmunización en el que se usa el β NGF humano mezclándolo con un adyuvante tras la desnaturalización térmica (tratando a 80 °C durante 10 minutos en una disolución de SDS al 0,5 %). Como vía de administración, se examinaron la administración en la almohadilla plantar y administración intraperitoneal. Como adyuvante, se examinaron TiterMax Gold (CytRx Corporation), adyuvante completo de Freund (Sigma), adyuvante incompleto de Freund (Sigma) y adyuvante RIBI (Corixa Corporation). Como inmunoadyuvante que va a añadirse, se examinaron oligonucleótido de CpG y gel de fosfato de aluminio (BRENNTAG). Como periodo de inmunización, se examinaron de 3 a 14 semanas. Tras inmunizar los animales varias veces, se extrajo sangre de la vena caudal de los ratones y se monitorizó el título. De esta manera, se seleccionaron ratones VelocImmune que producían un anticuerpo que se unía al NGF humano.

Se midió el título usando el siguiente método de ELISA convencional. Se añadió el β NGF humano a una placa Maxisorp 384 (Nunc) a 10 ng/pocillo y se inmovilizó incubándolo durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, se lavó la placa una vez con una disolución de lavado (TBST: un tampón tris (TBS) que contenía Tween-20 al 0,05 %), después se añadió un agente de bloqueo (TBST que contenía Blocking One al 20 % (Nacalai Tesque, Inc.)) a la misma y se dejó reposar la placa a temperatura ambiente durante una hora. Tras lavar la placa una vez con la disolución de lavado de TBST, se diluyó la sangre extraída en serie y se añadió a la placa. Tras una hora de incubación a temperatura ambiente, se lavó la placa tres veces con la disolución de lavado de TBST y se añadió a la misma un HRP-anticuerpo de cabra anti-Ig de ratón (Zymed) que se diluyó 2000 veces con la disolución de lavado de TBST que contenía Blocking One al 5 %. Tras una hora de incubación a temperatura ambiente, se lavó la placa tres veces con la disolución de lavado de TBST. Se suplementó la placa con un reactivo cromogénico de TMB (SUMITOMO BAKELITE CO., LTD) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, después se añadió una disolución de detención (ácido sulfúrico 2 mol/l) a la misma para detener la reacción y se midió una absorbancia a 450 nm.

(Ejemplo 2: Preparación de hibridoma que produce anticuerpo anti-NGF humano)

Finalmente se inmunizaron (administración intravenosa o intraperitoneal de un antígeno) los ratones seleccionados confirmando el aumento en el título de anticuerpo. Se extirparon el bazo, ganglio linfático o similares de los ratones inmunizados según un método normal para extraer linfocitos y se fusionaron los linfocitos con células de mieloma de ratón SP2/0, preparando así un hibridoma. Se sometió el hibridoma a dilución limitante y monoclonación y se purificó el anticuerpo a partir del sobrenadante usando una columna de proteína A o proteína G (GE Healthcare Japan).

(Ejemplo 3: Evaluación de la inhibición de unión de NGF-trkA)

Se dejó reaccionar el β NGF humano (R&D Systems, Inc.) con EZ-LINK 5-(biotinamido) pentilamina (Pierce) a temperatura ambiente durante 30 minutos en un lugar oscuro para realizar el marcaje con biotina y se eliminó el exceso de biotina usando una columna de desalación, obteniendo así β NGF humano marcado con biotina. En los siguientes ejemplos 6 y 7, se confirmó que el β NGF humano marcado con biotina preparado tenía la misma actividad biológica que el β NGF humano original.

Se midió la actividad inhibidora mediante el siguiente método. Se añadió el trkA humano (R&D Systems, Inc.) a una

placa Maxisorp 384 blanca (Nunc) a 60 ng/pocillo y se inmovilizó incubándolo durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, se lavó la placa una vez con la disolución de lavado de TBST, después se añadió a la misma un agente de bloqueo (TBST que contenía Blocking One al 20 % (Nacalai Tesque, Inc.)) y se dejó reposar la placa a temperatura ambiente durante una hora. Posteriormente, se añadió una mezcla obtenida mezclando el β NGF humano marcado con biotina (0,2 μ g/ml) preparado como anteriormente con el anticuerpo preparado en el ejemplo 2 a la placa con trkA inmovilizado que se había sometido a bloqueo. Tras una hora de incubación a temperatura ambiente, se lavó la placa tres veces con la disolución de lavado de TBST y se añadió estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina (Pierce) a la misma. Tras una hora de incubación a temperatura ambiente, se lavó la placa tres veces con la disolución de lavado de TBST y después se suplementó con APU4 (BioFfx) que es un reactivo que detecta la quimioluminiscencia y se midió la cantidad de quimioluminiscencia mediante un contador EnVision (PerkinElmer Co., Ltd.).

(Ejemplo 4: Evaluación de reactividad cruzada entre especies)

15 Cuando un anticuerpo tiene reactividad cruzada con respecto a un β NGF de ratón, es posible realizar una evaluación de eficacia farmacológica en un modelo patológico de ratón usando el anticuerpo. Por consiguiente, se preparó un β NGF de ratón marcado con biotina en el método del ejemplo 3 usando un β NGF de ratón (R&D Systems, Inc.), mediante lo cual se evaluó la reactividad cruzada del anticuerpo frente al β NGF de ratón.

20 (Ejemplo 5: Evaluación de la especificidad de unión)

Se evaluó la especificidad de unión del anticuerpo a NGF usando el método de ELISA descrito en el ejemplo 1. Específicamente, se usó NT-3 como molécula de la familia que muestra la mayor homología con NGF. Se añadió NT-3 humana (PeproTech) a la placa en el método del ejemplo 1 a 20 ng/pocillo y se inmovilizó en la placa, permitiendo así la realización de la evaluación.

(Ejemplo 6: Evaluación de la inhibición de señalización de NGF-trkA)

30 Se evaluó la actividad inhibidora del anticuerpo frente a la señalización de NGF-trkA. NGF aumenta la concentración de calcio intracelular (Ca^{2+}) a través de trkA como receptor de NGF. Generalmente, el cambio en la concentración de Ca^{2+} puede evaluarse en presencia de un indicador de calcio usando un sistema de medición de la concentración de calcio intracelular (Ca^{2+}) (FLIPR; Molecular Devices, LLC).

35 Se midió la actividad inhibidora mediante el siguiente método. Se dispensaron células HEK293 (documento WO2009/054468) que se hizo que expresaran de manera estable trkA humano en una placa de 96 pocillos recubierta con poli-D-lisina (Becton, Dickinson and Company, Japón) a 2×10^4 células/pocillo el día antes del experimento y se cultivaron durante la noche. Al día siguiente, se substituyó el medio de cultivo por un medio de cultivo DMEM (que contenía hidróxido de sodio (NaOH) 3,6 mM y probenecid 2,5 mM (Sigma)) que contenía un indicador de calcio (Fluo4-AM; Dojindo) y se dejó reposar a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se lavaron las células dos veces con una disolución de lavado (solución salina equilibrada de Hank) (HBSS) (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]etanosulfónico (HEPES) 20 mM, hidróxido de sodio 3,6 mM, probenecid 2,5 mM (Sigma) y albúmina de suero bovino al 0,1 %) y se substituyó el medio de cultivo por esta disolución de lavado a 150 μ l/pocillo. Se colocó la placa de células en el dispositivo FLIPR. Haciendo funcionar el dispositivo FLIPR, se añadió una disolución mezclada del anticuerpo obtenido en el ejemplo 2 y NGF a la placa a 50 μ l/pocillo (concentración de NGF final de 100 ng/ml) y se midió el cambio en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Se calculó la diferencia entre valores máximo y mínimo del cambio en la concentración de Ca^{2+} intracelular y se almacenó como datos de medición.

50 (Ejemplo 7: Evaluación de la inhibición de la señalización de supervivencia celular dependiente de NGF)

55 Cuando se cultivan células PC12 que expresan de manera natural los receptores trkA y p75 en una condición libre de suero, NGF permite que las células sobrevivan durante varios días. Mediante el siguiente método, se evaluó la actividad inhibidora del anticuerpo frente a la señalización de supervivencia celular dependiente de NGF.

60 Se sembraron células PC12 en una placa de 96 pocillos recubierta con colágeno (ASAHI TECHNO CO., LTD.) a 1×10^4 células/pocillo y se incubaron durante la noche en un medio de cultivo F12K (Invitrogen) que contenía suero de bovino fetal al 2,5 % y suero de caballo inactivado al 15 % (Invitrogen) a 37 °C bajo CO_2 al 5 %. Al día siguiente, se substituyó el medio de cultivo por únicamente F12K en una condición libre de suero. Tras una hora, se añadieron el anticuerpo y el β NGF humano (concentración final de 50 ng/ml) al mismo, seguido por cultivo durante 72 horas. Posteriormente, se retiró la disolución de cultivo mediante un aspirador y se midió la viabilidad celular usando un reactivo (CellTiter Glo; Promega Corporation) que cuantifica el ATP endógeno de células.

(Ejemplo 8: Preparación de fragmento Fab)

65 Se añadió un gel unido a papaína, enzima digestiva, a 1 mg/ml del anticuerpo usando un kit de preparación de Fab

(Pierce), seguido por tratamiento a 37 °C durante 3 horas. Se añadió la disolución de reacción tratada a una columna de proteína G (GE Healthcare Japan), se retiraron Fc escindido e IgG sin reaccionar adsorbiéndose sobre la columna y se recogió la fracción eluida, obteniendo así fragmentos Fab. Se evaluaron los fragmentos Fab obtenidos mediante las pruebas descritas en los ejemplos 3, 6 y 7.

Como resultado de la evaluación de los ejemplos 3 a 8, se confirmó que el anticuerpo denominado 1-15 (anticuerpo quimérico) tenía una alta actividad neutralizante, reactividad cruzada entre especies y especificidad de unión y mantenía una alta actividad neutralizante aunque este anticuerpo está en forma de un fragmento de anticuerpo monovalente.

(Ejemplo 9: Determinación de la secuencia génica de anticuerpo)

Para el anticuerpo 1-15 identificado, los presentes inventores clonaron genes que codificaban para las cadenas pesadas y cadenas ligeras del anticuerpo a partir de hibridomas. Específicamente, se preparó un clon de hibridoma en una cantidad de 1×10^5 o más y se suspendió en tampón de RLT que se incluye en el kit RNeasy Mini (QIAGEN), y después se trituraron las células con QIAshredder (QIAGEN). Posteriormente, se extrajo el ARN según el protocolo y, usando el ARN extraído como molde, se sintetizó ADNc usando un kit de amplificación de ADN (kit de amplificación de ADNc SMARTer RACE; Clontech). Se llevó a cabo PCR usando el ADNc obtenido, alargando y amplificando de ese modo la región variable de las cadenas pesadas y cadenas ligeras. Se realizó un análisis de secuencia directamente con los productos de PCR usando un secuenciador (ABI PRISM 3100; Applied Biosystems). Además, se recombinaron los productos de PCR con un vector de subclonación de producto de PCR tal como pCR3.1-TOPO (Invitrogen), seguido por análisis de secuencia génica, determinando así la secuencia.

La secuencia de bases determinada de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 1-15 se muestra por SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de la misma se muestra por SEQ ID NO: 2. Además, la secuencia de bases de la región variable de cadena ligera del anticuerpo se muestra por SEQ ID NO: 3 y la secuencia de aminoácidos de la misma se muestra por SEQ ID NO: 4. La CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 1-15 es una región de posición desde 31 hasta 35, de 50 a 65 y de 95 a 102 de la región variable de cadena pesada basándose en la numeración de Kabat, respectivamente, que consiste en la secuencia de aminoácidos en la posición desde 31 hasta 35, de 50 a 65 y de 98 a 110 de SEQ ID NO: 2, respectivamente. La CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 1-15 es una región de posición desde 24 hasta 34, de 50 a 56 y de 89 a 97 de la región variable de cadena ligera basándose en la numeración de Kabat, respectivamente, que consiste en la secuencia de aminoácidos en la posición desde 24 hasta 39, de 55 a 61 y de 94 a 102 de SEQ ID NO: 4, respectivamente.

(Ejemplo 10: Preparación de mutante de sitio de glicosilación de región variable)

El aminoácido (SEQ ID NO: 2) de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 1-15 descrito anteriormente incluye una secuencia de motivo de glicosilación de tipo N como N-X-(T/S). Específicamente, en la región variable de cadena pesada mostrada por SEQ ID NO: 2, Asn (N52) en la posición 52 basándose en la numeración de Kabat corresponde al sitio de glicosilación. Se sabe que aunque se produce glicosilación de un anticuerpo durante el cultivo celular si el anticuerpo tiene sitio de glicosilación, la glicosilación depende de las condiciones de cultivo o del huésped que expresa el anticuerpo. Dicho de otro modo, incluso entre las mismas células productoras de anticuerpo establecidas, es probable que el grado de glicosilación varíe con las condiciones de cultivo (tales como el medio de cultivo y la densidad celular), lo que conduce a una posibilidad de que puede ser difícil obtener fármacos de anticuerpos que tengan una calidad uniforme. Por tanto, los presentes inventores prepararon 1-15(N52D) que se obtuvo introduciendo una mutación en N52 en la región variable de cadena pesada del anticuerpo 1-15.

La secuencia de bases de la región variable de cadena pesada del 1-15(N52D) preparado se muestra por SEQ ID NO: 5 y la secuencia de aminoácidos de la misma se muestra por SEQ ID NO: 6. La CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 1-15(N52D) es una región de posición desde 31 hasta 35, de 50 a 65 y de 95 a 102 de la región variable de cadena pesada basándose en la numeración de Kabat, respectivamente, que consiste en la secuencia de aminoácidos en la posición desde 31 hasta 35, de 50 a 65 y de 98 a 110 de SEQ ID NO: 6, respectivamente.

(Ejemplo 11: Preparación de fragmento Fab' de anticuerpo totalmente humano)

Usando las regiones variables de cadena pesada de 1-15 y 1-15(N52D) descritas anteriormente y la región variable de cadena ligera de 1-15, se prepararon los fragmentos Fab' de anticuerpo totalmente humano respectivos.

Se unió una secuencia de señal al lado de 5' de los genes de región variable de cadena pesada respectivos de 1-15 y 1-15(N52D) y se unió el gen de la región constante de Ig γ 1 humana (Man Sung Co. *et al.*, (1992) J Immunol. vol. 148(4):1149-1154) al lado de 3' de la misma respectivamente. Se insertó este gen de fragmento de cadena pesada en vector de GS pEE6.4 (Lonza Biologies). En este momento, con el fin de expresar los genes como fragmento Fab', se insertó un codón de terminación tras el codón de Cys en la posición 226 (correspondiente a Cys en la posición 230 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 10 descritas a continuación) basándose en el

índice de EU en el gen de región constante de cadena pesada. Además, se unió una secuencia de señal al lado de 5' del gel de región variable de cadena ligera de 1-15 y se unió el gen de región constante de cadena κ humana (Man Sung Co. *et al.*, descrito anteriormente) al lado de 3' de la misma respectivamente. Se insertó este gen de cadena ligera en el vector de GS pEE12.4 (Lonza Biologics).

Se expresó el fragmento Fab' de dos maneras incluyendo expresión transitoria y expresión constante. En la expresión transitoria, se transfectaron células FreeStyle 293 (Invitrogen) cultivadas en medio de expresión FreeStyle 293 (Invitrogen) a aproximadamente 1.000.000 células/ml con los vectores de GS anteriormente descritos del fragmento de cadena pesada y la cadena ligera usando 293fectin (Invitrogen), seguido por cultivo durante siete días. En la expresión constante, se escindieron ambos vectores de GS descritos anteriormente con enzimas de restricción NotI y PvuI, seguido por ligación usando un kit de ligación de ADN (TAKARA BIO INC), construyendo así un vector de GS en el que se insertaron genes tanto del fragmento de cadena pesada como de la cadena ligera. Este vector de expresión codifica el fragmento de cadena pesada, la cadena ligera y glutamina sintetasa y se expresó transfecándose en células CHO-K1-SV. Tras expresarse los vectores de las maneras respectivas, se purificó el sobrenadante de cultivo usando KappaSelect (GE Healthcare Japan), obteniendo así los fragmentos Fab' respectivos.

La secuencia de bases del fragmento de cadena pesada del fragmento Fab' de anticuerpo 1-15 totalmente humano preparado (también denominado 1-15-Fab') se muestra por SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra por SEQ ID NO: 8 respectivamente.

La secuencia de bases del fragmento de cadena pesada del fragmento Fab' de anticuerpo 1-15(N52D) totalmente humano preparado (también denominado 1-15(N52D)-Fab') se muestra por SEQ ID NO: 9 y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra por SEQ ID NO: 10 respectivamente.

La cadena ligera de los fragmentos Fab' respectivos son iguales y la secuencia de bases de la misma se muestra por SEQ ID NO: 11 y la secuencia de aminoácidos de la misma se muestra por SEQ ID NO: 12 respectivamente.

(Ejemplo 12: Evaluación de la actividad neutralizante y del nivel de expresión de fragmento Fab' de anticuerpo totalmente humano)

Se evaluaron el 1-15-Fab' y el 1-15(N52D)-Fab' obtenidos en el ejemplo 11 mediante las pruebas descritas en los ejemplos 3 y 6. En la prueba del ejemplo 3, la CI50 del 1-15-Fab' y del 1-15(N52D)-Fab' era de 0,17 μ g/ml y 0,18 μ g/ml respectivamente. En la prueba del ejemplo 6, la CI50 del 1-15-Fab' y del 1-15(N52D)-Fab' fue de 0,021 μ g/ml y 0,018 μ g/ml respectivamente. A partir de estos resultados, se confirmó que la actividad neutralizante del 1-15(N52D)-Fab' se mantenía casi al mismo grado que la del 1-15-Fab' sin modificar y que la actividad neutralizante no se veía influida aunque se introdujera una mutación.

Además, se expresaron los fragmentos Fab' respectivos mediante la expresión constante y se midió la cantidad de anticuerpo producido en el sobrenadante de cultivo de una combinación de células de expresión estable. Como resultado, las concentraciones de los sobrenadantes de cultivo respectivos del 1-15-Fab' y del 1-15(N52D)-Fab' fueron de 86 mg/l y 106 mg/l respectivamente, lo que mostró que el 1-15(N52D)-Fab' es un anticuerpo producido en una mayor cantidad que el 1-15-Fab' sin modificar.

(Ejemplo 13: Preparación de fragmento Fab' pegilado y evaluación de la actividad neutralizante)

A continuación, los presentes inventores introdujeron PEG en el 1-15(N52D)-Fab'. Tras purificarse mediante KappaSelect, se sometió el fragmento Fab' a una reacción de reducción usando clorhidrato de TCEP (Tris(2-carboxietil)fosfina HCl), mediante lo cual se convirtió el fragmento Fab' en una estructura pegilable.

Específicamente, se añadió TCEP a una disolución de fragmento Fab' cuya concentración se ajustó hasta 1,2 mg/ml mediante 20 mM de tampón de fosfato de sodio (pH 6,8), de manera que el TCEP paso a estar a 1 mM, seguido por una reacción a 37 °C durante 2 horas y después se diluyó lo resultante con un tampón de acetato de sodio 20 mM (pH 5,0) para ajustar el pH. Se adsorbió esta disolución sobre una resina de intercambio catiónico (SP-5PW; TOSOH CORPORATION) y se sometió a elución en gradiente de NaCl y se recogieron los picos principales. Se diluyó el fragmento Fab' obtenido con un tampón de fosfato de sodio 20 mM (pH 6,8) para producir 1 mg/ml, se ajustó el pH a 6,8 y después se dejó reposar la disolución a 4 °C durante una noche o más para oxidarse de manera natural. Se añadió PEG de 40 kDa (SUNBRIGHT GL2-400MA; NOF CORPORATION) a la disolución para producir una concentración final de 0,1 mM y se dejó reposar la disolución a temperatura ambiente durante 2 horas y después a 4 °C durante la noche. Al tener un grupo maleimida en el extremo terminal del mismo, este PEG reacciona rápidamente con Cys (C226 basándose en el índice de EU; Cys en la posición 230 de SEQ ID NO: 10) del extremo carboxi-terminal del fragmento de cadena pesada. Se diluyó la disolución con un tampón de acetato de sodio 20 mM (pH 4,5) para ajustar el pH y después se adsorbió de nuevo sobre una resina de intercambio catiónico (SP-5PW; TOSOH CORPORATION), se sometió lo resultante a elución en gradiente de NaCl y se recogió el pico principal. Se purificó el fragmento Fab' pegilado resultante. Este 1-15(N52D)-Fab' pegilado también se denomina 1-15(N52D)-Fab'-PEG.

Se evaluó la actividad neutralizante de los 1-15(N52D)-Fab' no pegilado y pegilado mediante el método mostrado en el ejemplo 3. Como resultado, mientras que la CI50 del 1-15(N52D)-Fab' era de 0,15 µg/ml, la CI50 del 1-15(N52D)-Fab'-PEG era de 0,12 µg/ml (en cuanto a concentración de fragmento Fab'), mediante lo cual se confirmó que la actividad neutralizante del 1-15(N52D)-Fab' no se veía influida aunque se añadiera PEG.

Además, usando el método del ejemplo 6, se comparó el 1-15(N52D)-Fab'-PEG con el anticuerpo anti-NGF humano tanezumab de la técnica anterior, en cuanto a la actividad neutralizante con respecto a NGF humano y de ratón. Como resultado, mientras que la CI50 del 1-15(N52D)-Fab'-PEG era de 0,051 µg/ml para el NGF humano y de 0,069 µg/ml para el NGF de ratón, la CI50 de tanezumab era de 0,17 µg/ml para el NGF humano y de 0,23 µg/ml para el NGF de ratón. Por tanto, se confirmó que la actividad neutralizante del 1-15(N52D)-Fab'-PEG era aproximadamente 3,3 veces más fuerte que la de tanezumab, con respecto a cualquiera de los NGF humano y de ratón.

(Ejemplo 14: Prueba de efecto analgésico usando modelo de ratón de artritis inducida por adyuvante)

Los presentes inventores evaluaron un efecto analgésico del 1-15(N52D)-Fab'-PEG anterior en un modelo de ratón de artritis inducida por adyuvante.

Se administró por vía intravenosa el 1-15(N52D)-Fab'-PEG (0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg y 0,3 mg/kg; la dosis era de 10 ml/kg) a ratones y se administró adyuvante completo de Freund 1 mg/ml (Sigma) en una cantidad de 25 µl a la almohadilla plantar de la pata trasera para inducir dolor. 24 horas tras la inducción de dolor, se midió un comportamiento de erguirse sobre las patas traseras durante 20 minutos. Específicamente, usando el sistema de monitorización de la actividad espontánea SUPERMEX (Muromachi Kikai Co., Ltd.), se midió automáticamente el número de veces de comportamiento espontáneo de erguirse sobre las patas traseras de los ratones durante 20 minutos usando un sensor por haz de infrarrojos (Matson *et al.*, JPET 320:194-201, 2007). Como control comparativo se usó un anticuerpo de la técnica anterior, tanezumab. Como resultado, aunque la administración intravenosa de tanezumab produjo un efecto analgésico de DE50=0,27 mg/kg, el 1-15(N52D)-Fab'-PEG produjo un efecto analgésico de DE50=0,11 mg/kg, lo que mostró una eficacia aproximadamente 3 veces mayor.

(Ejemplo 15: Prueba de transferencia placentaria en ratas)

El 1-15(N52D)-Fab'-PEG o tanezumab se administraron por vía intravenosa (100 mg/kg, la dosis era de 10 ml/kg) a ratas hembra en el 17º día de gestación. Tres días después se midió la concentración de anticuerpo en la sangre de la madre y del feto.

Se midió la concentración de anticuerpo de la siguiente manera. Se añadió el βNGF humano (R&D Systems, Inc.) a una placa de 96 MULTI-ARRAY plate (convencional) (Meso Scale Discovery) a 25 ng/pocillo y se inmovilizó dejándolo reposar a temperatura ambiente durante una hora. Se lavó la placa tres veces con la disolución de lavado de TBST y se añadió un agente de bloqueo (TBS con caseína al 1 %; Thermo Fisher) a la misma y se dejó reposar a temperatura ambiente durante una hora. Posteriormente, se añadió una muestra de sangre obtenida diluyendo sangre extraída a lo largo del tiempo a la placa con βNGF humano inmovilizado que se había sometido a bloqueo. Tras hacer reaccionar la mezcla a temperatura ambiente durante 60 minutos con agitación, se lavó la placa tres veces con la disolución de lavado de TBST y después se añadió un anticuerpo anti-Kappa humana marcado con biotina (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.) a la misma. Tras hacerse reaccionar la mezcla durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación, se lavó la placa tres veces con la disolución de lavado de TBST y se añadió estreptavidina marcada con SULFO-TAG (Meso Scale Discovery) a la misma. Tras hacerse reaccionar la mezcla durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación, se lavó la placa tres veces con la disolución de lavado de TBST, se añadió tampón de lectura T (Meso Scale Discovery) a la misma y se midió la cantidad de luminiscencia electroquímica con un dispositivo SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Discovery).

Se realizó esta prueba con tres ratas madre. Tres días después, la concentración de anticuerpo del 1-15(N52D)-Fab'-PEG y tanezumab en la sangre de las ratas madre era de 12,1 µg/ml y 7,1 µg/ml en promedio respectivamente. Mientras tanto, con respecto a la concentración de anticuerpo en la sangre de 3 fetos extraídos de cada rata madre (9 fetos en total), mientras que la concentración de 1-15(N52D)-Fab'-PEG en la sangre era de 0,01 µg/ml (límite de cuantificación) o menos en todos los fetos, la concentración de tanezumab en la sangre era de 5,39 µg/ml en promedio. Es decir, mientras que tanezumab se transfirió al feto a una tasa del 75,9 %, el 1-15(N52D)-Fab'-PEG se transfirió al feto a una tasa del 0,08 % (límite de detección) o menos. Estos resultados sugirieron que el 1-15(N52D)-Fab'-PEG es un agente médico que tiene excelente seguridad evitando el riesgo de efectos secundarios provocados en un feto debido a inhibición de NGF.

(Ejemplo 16: Formación de inmunocomplejo (IC))

Se evaluó si el 1-15(N52D)-Fab'-PEG formaba un IC o no o lo grande que era el tamaño del IC formado. Específicamente, se mezcló 1 mg/ml del 1-15(N52D)-Fab'-PEG con el βNGF humano (R&D Systems, Inc.) a una

razón molar de 1:1, seguido por incubación a temperatura ambiente durante 3 horas, formando así un IC. Se midieron el tamaño de partícula y la distribución del IC en esta disolución de reacción usando un dispositivo Zetasizer Nano (Malvern) como instrumento que mide la dispersión de luz dinámica. Para el análisis, se usó un dispositivo Zetasizer v6.01 (Malvern) y se indicó el tamaño de partícula mediante un valor (d. nm) analizado en cuanto a intensidad (%).

Los tamaños de partícula medidos se muestran en la siguiente tabla 1. En este experimento, el tamaño de partícula de sólo el NGF era de 6,2 nm en promedio. En el caso de sólo tanezumab, se mostró un tamaño máximo a 11,7 nm. Cuando se midió el IC formado incubando tanezumab y el NGF, el tamaño máximo se desplazó hasta 91,3 nm. Por otro lado, cuando se usó un anticuerpo que no se unía al NGF como anticuerpo de control, el tamaño máximo todavía era de 11,7 nm. Teniendo en cuenta el alcance de desplazamiento, se supuso que cada uno de tanezumab y NGF se convirtieron en una macromolécula como combinación de una pluralidad de moléculas, mediante lo cual se formó un IC de gran tamaño. A diferencia de esto, cuando se midió la formación de IC del 1-15(N52D)-Fab'-PEG y el NGF, el tamaño máximo se desplazó desde 18,1 nm hasta 24,4 nm. Teniendo en cuenta el alcance de desplazamiento, este resultado sólo reflejó unión de uno a uno y sugirió que no se produjo la formación de estructura reticular en el 1-15(N52D)-Fab'-PEG.

[Tabla 1]

Muestra		Tamaño de partícula	
		Máximo (d. nm)	Promedio (d. nm)
IgG de control	IgG	11,7	12,8
	IgG+rhNGF	11,7	12,6
Tanezumab	IgG	11,7	13,0
	IgG+rhNGF	91,3	99,2
1-15(N52D)-Fab'-PEG	IgG	18,1	19,8
	IgG+rhNGF	24,4	26,0

(Ejemplo 17: Propiedad de distribución en tejido lesional)

Se administró por vía subcutánea una emulsión que incluía colágeno (colágeno tipo 2 derivado de articulación de bovino, 10 mg/ml; Collagen Technique Workshop) y un adyuvante completo de Freund (0,5 mg/ml; DIFCO) a una razón de 1:1 a la articulación del tobillo de ratones DBA/1 machos, preparando así modelos de artritis inducida por colágeno. Cuatro semanas tras la inducción de artritis, se administró de nuevo la emulsión para provocar artritis. Se observó el grado de desarrollo (puntuación y tamaño de inflamación) de la artritis en las patas traseras para agrupar a los ratones. Se realizó marcaje fluorescente con disoluciones de PBS 1 mg/ml del 1-15(N52D)-Fab'-PEG y tanezumab usando el kit de marcaje de anticuerpos rápido SAIVI™, Alexa Fluor (marca registrada) 680 (Life Technologies Corporation). Se administró cada disolución a la vena caudal a 2 mg/kg (N=4). Se analizó la fluorescencia acumulada en la almohadilla plantar inflamada durante 50 horas desde una hora tras la administración usando un IVIS Spectrum (Caliper/Xenogen) y se indicó la intensidad de fluorescencia como valores numéricos.

La figura 1 muestra el cambio temporal de la cantidad de anticuerpo retenida en la planta. El 1-15(N52D)-Fab'-PEG mostró más claramente el efecto de retención en un tejido lesional en comparación con tanezumab, y este efecto duró 48 horas. A partir de este resultado, se considera que el 1-15(N52D)-Fab'-PEG ejerce eficazmente un efecto analgésico y se espera que este anticuerpo pueda ejercer un efecto analgésico igual o superior a la intensidad de la eficacia del fármaco con una dosis baja. También se espera que el 1-15(N52D)-Fab'-PEG pueda ser un agente médico excelente en cuanto a la seguridad ya que este anticuerpo se acumula selectivamente en un sitio lesional.

(Ejemplo 18: Preparación de aducto de aminoácidos de fragmento Fab')

Con el fin de mejorar la eficacia de la introducción de PEG en el 1-15(N52D)-Fab', los presentes inventores prepararon fragmentos Fab' que se obtuvieron añadiendo dos alaninas (A) o prolinas (P) tras el residuo de Cys en el extremo carboxilo-terminal del fragmento de cadena pesada y realizaron la expresión y purificación. Se usó el mismo método que en el ejemplo 11 para preparar estos fragmentos Fab'. En este método, se insertó el codón de las dos alaninas o prolinas tras el codón del residuo de Cys del extremo carboxilo-terminal del fragmento de cadena pesada del 1-15(N52D)-Fab' y se insertó un codón de terminación tras este codón.

La secuencia de bases del fragmento de cadena pesada de 1-15(N52D)-Fab' con alanina añadida (un fragmento Fab' de anticuerpo 1-15(N52DA) totalmente humano; también denominado 1-15(N52D-A)-Fab') se muestra por SEQ ID NO: 13 y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra por SEQ ID NO: 14 respectivamente. La secuencia de bases del fragmento de cadena pesada de 1-15(N52D)-Fab' con prolina añadida (un fragmento Fab' de anticuerpo 1-15(N52D-P) totalmente humano; también denominado 1-15(N52D-P)-Fab') se muestra por SEQ ID NO: 15 y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra por SEQ ID NO: 16 respectivamente. La cadena ligera de los fragmentos Fab' respectivos es la misma que la cadena ligera del 1-15(N52D)-Fab' y la secuencia de bases y la secuencia de aminoácidos de la misma se muestran por SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 respectivamente.

(Ejemplo 19: Preparación de 1-15(N52D-A)-Fab' pegilado y evaluación de actividad neutralizante y evaluación farmacológica)

5 Se conjugó PEG de 40 kDa con el 1-15(N52D-A)-Fab' de la misma manera que en el ejemplo 13, obteniendo así 1-15(N52D-A)-Fab' pegilado (también denominado a continuación en el presente documento 1-15(N52D-A)-Fab'-PEG).

10 Se evaluó la actividad neutralizante del 1-15(N52D-A)-Fab'-PEG en el método descrito en el ejemplo 3. Como resultado, mientras que la CI50 del 1-15(N52D)-Fab'-PEG era de $0,081 \pm 0,034$ $\mu\text{g/ml}$, la CI50 del 1-15(N52D-A)-Fab'-PEG era de $0,074 \pm 0,021$ $\mu\text{g/ml}$. Además, la CI50 de tanezumab en este momento era de $0,410 \pm 0,099$ $\mu\text{g/ml}$.

15 A continuación, se comparó la actividad neutralizante usando el método descrito en el ejemplo 6. Como resultado, mientras que la CI50 del 1-15(N52D)-Fab'-PEG era de $0,061 \pm 0,011$ $\mu\text{g/ml}$ para NGF humano, la CI50 del 1-15(N52D-A)-Fab'-PEG era de $0,064 \pm 0,028$ $\mu\text{g/ml}$.

20 Además, se evaluó el efecto analgésico en el modelo de artritis inducida por adyuvante usando el método descrito en el ejemplo 14. Como resultado, el 1-15(N52D-A)-Fab'-PEG mostró el efecto analgésico con respecto al modelo de artritis.

A partir de los resultados anteriores, se confirmó que aunque se añadan dos alaninas tras el residuo de Cys del extremo carboxilo-terminal, la actividad neutralizante y la actividad farmacológica no se ven influidas.

(Ejemplo 20: Evaluación de la afinidad de unión de 1-15(N52D-A)-Fab'-PEG)

25 Se examinó la termodinámica en la unión de 1-15(N52D-A)-Fab'-PEG y tanezumab a un antígeno de NGF mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC) (Scappaticci FA, J Natl Cancer Inst. 2007, 99:1232-9. Velazquez-Compoy, A., *et al*, Curr Protoc Cell Biol. 2004, capítulo 17, unidad 17-18). Toda la medición se realizó usando un dispositivo Auto-iTC 200 fabricado por GE healthcare. Durante el experimento, se realizó una prueba a la siguiente concentración para evaluar la unión de un fragmento Fab' monovalente a una molécula de antígeno y se realizó toda la prueba en una disolución de PBS. Específicamente, se titularon 44 μM de βNGF humano (R&D Systems, Inc.) contenidos en una jeringa de titulación a cubetas de calorímetro rellenas con una muestra de anticuerpo (3 μM de 1-15(N52D-A)-Fab'-PEG o 1,5 μM de tanezumab) a 1,4 μl durante 30 veces y se detectó la cantidad de calor producida de ese modo. Se analizaron los datos obtenidos mediante un modelo de unión a un único sitio usando software vinculado al instrumento, mediante lo cual se estimaron la afinidad de unión (Kd), una razón de unión (n), energía libre de unión (ΔG), entalpía de unión (ΔH) y entropía de unión ($-\text{T}\Delta\text{S}$) asociadas a la unión antígeno-anticuerpo. Los resultados se muestran en la tabla 2.

40 Como resultado, mientras que el valor de Kd de tanezumab era de 20,41 nM, el valor de Kd de 1-15(N52D-A)-Fab'-PEG era de 1,49 nM, lo que mostró que la afinidad de unión de 1-15(N52D-A)-Fab'-PEG era 10 veces más fuerte o más que la de tanezumab (tabla 2).

[Tabla 2]

	Kd (nM)	ΔG (cal/mol)	ΔH (cal/mol)	$-\text{T}\Delta\text{S}$ (cal/mol)
Tanezumab	20,41	-10490	-4759	-5731
1-15(N52D-A)-Fab'-PEG	1,49	-12041	-20806	8765

45 (Ejemplo 21: Preparación de 1-15(N52D-A)-Fab' pegilado que tiene diversos tamaños de PEG y evaluación de la actividad neutralizante)

50 Se conjugó el 1-15(N52D-A)-Fab' preparado en el ejemplo 18 con PEG de 5 kDa o PEG de 10 kDa usando el procedimiento similar al del ejemplo 13. Específicamente, se sometió a disolución de fragmento Fab' preparada usando tampón de Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) a tratamiento de reducción usando TCEP. Después, se recogió fragmento Fab' usando una columna de desalación. Se añadió PEG (SUNBRIGHT GL2-50MA o SUNBRIGHT GL2-100MA; NOF CORPORATION) al fragmento Fab' obtenido y se dejó reposar la disolución a 4 °C durante una noche. Los fragmentos 1-15(N52D-A)-Fab' conjugados con PEG de 5 kDa o con PEG de 10 kDa que se obtuvieron de esta manera se denominan 1-15(N52D-A)-Fab'-5kPEG y 1-15(N52D-A)-Fab'-10kPEG, respectivamente.

60 Posteriormente, usando el método mostrado en el ejemplo 6, se compararon los fragmentos Fab' pegilados respectivos entre sí en cuanto a la actividad neutralizante. Como control comparativo, se usó el 1-15(N52D-A)-Fab'-PEG (conjugado con PEG de 40 kDa; también denominado a continuación en el presente documento 1-15(N52D-A)-Fab'-PEG de 40 k) preparado en el ejemplo 19. En este momento, se realizó la prueba a una concentración de NGF final de 50 ng/ml. Como resultado, la CI50 del 1-15(N52D-A)-Fab'-5kPEG, 1-15(N52D-A)-Fab'-10kPEG y 1-15(N52D-A)-Fab'-PEG de 40 k fueron de 0,030 $\mu\text{g/ml}$, 0,028 $\mu\text{g/ml}$ y 0,023 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. A partir de estos

resultados, se entendió que un tamaño de PEG que oscilaba entre 5 kDa y 40 kDa no influía en la actividad neutralizante de fragmentos Fab'.

5 (Ejemplo 22: Evaluación de la farmacocinética en ratones de 1-15(N52D-A)-Fab' pegilado que tenía diversos tamaños de PEG)

10 Se realizó la evaluación de la farmacocinética en ratones para diversos tipos de 1-15(N52D-A)-Fab' pegilado. Específicamente, se administraron por vía intravenosa 0,3 mg/kg de diversos tipos de 1-15(N52D-A)-Fab' pegilado y se extrajo sangre 1, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 y 168 horas tras la administración. Se midió la cantidad de anticuerpo analito en la sangre obtenida usando el ELISA de tipo sándwich. Específicamente, se añadió el anticuerpo analito a una placa de MSD (Meso Scale Discovery) que tenía NGF inmovilizado. Se reconoció el anticuerpo unido a la placa mediante un anticuerpo anti-kappa humana marcado con biotina, que después se detectó mediante estreptavidina marcada con SULFO-TAG. Se calculó la concentración del anticuerpo en la sangre creando una curva de calibración usando los patrones respectivos. A partir de la concentración calculada del anticuerpo en la sangre, se calculó la semivida del anticuerpo en la sangre (T1/2: hora). Como resultado, la T1/2 del 1-15(N52DA)-Fab'-5kPEG, 1-15(N52D-A)-Fab'-10kPEG y 1-15(N52D-A)-Fab'-PEG de 40 k era de 13,8±2,2 horas, 17,7±0,4 horas y 39,2±3,7 horas, respectivamente.

20 (Ejemplo 23: Prueba de efecto analgésico usando modelo de incisión plantar de rata)

Usando un modelo de dolor posplantar de rata (Brennan *et al*, Current Protocols in Pharmacology 2004; 5.34.1-5.34.8) que se considera que refleja el dolor posoperatorio en la práctica clínica, se evaluó el efecto analgésico del 1-15(N52DA)-Fab'-5kPEG y el 1-15(N52D-A)-Fab'-10kPEG sobre el dolor posoperatorio.

25 Específicamente, se asignaron 8 ratas a cada grupo y se administró por vía intravenosa el 1-15(N52D-A)-Fab'-5kPEG o -10kPEG a las ratas (0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg y 1 mg/kg, la dosis era de 1 ml/kg). Posteriormente, se realizó una incisión recta en la planta de la pata trasera derecha que se extendía 10 mm hacia el dedo desde el punto de partida en una posición distante 5 mm desde el extremo del talón y después se realizaron inmediatamente suturas de colchonero con un hilo de nailon en dos sitios, induciendo de ese modo dolor. Se midieron umbrales de dolor alrededor del sitio de operación tras 5 horas y los días primero, segundo, tercero, cuarto y quinto tras la inducción de dolor. Para la medición, se usó un anestesiómetro plantar dinámico fabricado por Ugo Basile para medir una presión a la que las ratas mostraban comportamiento de evitación cuando se aplicaba presión a la planta. Como control comparativo, se usó el anticuerpo tanezumab en la técnica anterior.

35 Como resultado, mientras que la administración intravenosa de tanezumab dio como resultado un efecto analgésico de DE50 = 0,26 mg/kg en el día posoperatorio 1, tanto el 1-15(N52D-A)-Fab'-5kPEG como el -10kPEG ejercieron un efecto analgésico de DE50 = 0,15 mg/kg, lo que era aproximadamente el doble de eficaz. Además, todavía se observaba un efecto analgésico significativo del 1-15(N52D-A)-Fab'-5kPEG y -10kPEG en el día posoperatorio 3 y 4, respectivamente.

40 (Ejemplo 24: Evaluación de la estabilidad frente a la agregación)

45 Se disolvió el 1-15(N52D-A)-Fab'-PEG de 40 k a 1 mg/ml y 10 mg/ml en condiciones de pH 5, pH 6, pH 7,4 y pH 9. Se colocó cada una de estas disoluciones en una condición de 50 °C para evaluar la estabilidad frente a la agregación observada tras 2 semanas. Para evaluar la propiedad de agregación, se realizó cromatografía de exclusión molecular usando un dispositivo Agilent 1100 fabricado por Agilent. Como condiciones de medición, se usó fosfato de sodio 0,1 M que contenía arginina 0,2 M (pH 6,8) como tampón de fase móvil y se usó TSK gel Super Sw3000 (TOSOH, 2,0 mm de DI x 300 mm) como columna. La longitud de onda de detección era de 280 nm. En la prueba a 1 mg/ml, se usó tanezumab como anticuerpo comparativo y los resultados se muestran en la tabla 3. En la prueba a 10 mg/ml, se usaron tanezumab y REGN 475 como anticuerpos comparativos y los resultados se muestran en la tabla 4.

55 Como resultado, para tanezumab y REGN 475, se observó un marcado aumento en la cantidad de agregados producidos tras dos semanas. A diferencia de esto, para el 1-15(N52D-A)-Fab'-PEG de 40 k, casi no se detectaron agregados. Este resultado sugiere que es altamente probable que el 1-15(N52D-A)-Fab' pegilado sea un fármaco que tenga una excelente estabilidad en almacenamiento.

[Tabla 3]

pH	Tiempo (día)	1-15(N52D-A)-Fab'-PEG de 40 k		Tanezumab	
		Agregación (%)		Agregación (%)	
		Polímero	Dímero	Polímero	Dímero
pH 5	0	0,0	0,7	0,2	2,5
	14	0,0	0,7	11,7	5,6
pH 6	0	0,0	0,7	0,3	2,7

	14	0,0	0,6	1,3	3,8
pH 7,4	0	0,0	0,7	0,3	2,8
	14	0,0	0,6	3,1	3,8
pH 9	0	0,0	0,6	0,3	2,8
	14	0,4	1,1	5,7	4,7

[Tabla 4]

pH	Tiempo (día)	1-15(N52D-A)-Fab'-PEG de 40 k		Tanezumab		REGN 475	
		Agregación (%)		Agregación (%)		Agregación (%)	
		Polímero	Dímero	Polímero	Dímero	Polímero	Dímero
pH 5	0	0,0	0,4	0,9	4,8	0,3	1,7
	14	0,1	0,5	23,5	8,4	8,7	3,9
pH 6	0	0,0	0,4	-	-	1,2	3,0
	14	0,0	0,7	-	-	2,1	3,6
pH 7,4	0	0,0	0,5	1,7	6,1	0,3	2,0
	14	0,0	0,8	5,6	7,8	4,0	2,6
pH 9	0	0,0	0,6	1,8	6,4	0,3	1,8
	14	0,0	1,5	7,1	7,5	12,9	2,9

5 - no analizado

Aplicabilidad industrial

10 El anticuerpo anti-NGF humano, más específicamente, el fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano, es útil para prevenir o tratar diversas enfermedades en las que NGF humano está implicado en la formación de estados patológicos.

Lista de secuencias

- 15 <110> Astellas Pharma Inc.
- <120> Anticuerpo anti-NGF humano nuevo
- <130> A12022A00
- 20 <150> Documento JP2011-176209
- <151> 11-08-2011
- 25 <150> Documento JP2011-269215
- <151> 08-12-2011
- <160> 16
- 30 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 35 <211> 363
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
- <223> Gen de V_H de anticuerpo anti-NGF humano
- 45 <400> 1

ES 2 663 968 T3

cagggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctgggt ccgccagccc 120
 ccaggggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaagcac caacaacaac 180
 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtaggcacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgttcgag agatgggggc 300
 cccgaatcgg ggatgggggc ttttgatatc tggggccaag ggacaatggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 2

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> V_H de anticuerpo anti-NGF humano

15 <400> 2

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

20 <210> 3

<211> 339

<212> ADN

25

ES 2 663 968 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Gen de V_L de anticuerpo anti-NGF humano

<400> 3

```

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta ccctggaga gccggcctcc      60
atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg catagtaatg gattcaacta tttgggttgg      120
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atttgggttc taatcggggcc      180
tccgggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac tctgaaaatc      240
agcagagtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgca tgcaagctct acaaactccg      300
tacacttttg gccaggggac caagctggag atcaaacgg      339

```

10

<210> 4

<211> 113

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> V_L de anticuerpo anti-NGF humano

<400> 4

```

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
          20           25           30

Asn Gly Phe Asn Tyr Leu Gly Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35           40           45
25 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
          50           55           60

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

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

Leu Gln Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110

```

Arg

<210> 5

ES 2 663 968 T3

<211> 363

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Gen de V_H de anticuerpo anti-NGF humano

<400> 5

caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctgggt ccgccagccc 120

ccaggaagg ggctggagtg gattggggaa atcgaccata gtggaagcac caacaacaac 180

ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtaggcacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgttcgag agatgggggc 300

cccgaatcgg ggatgggggc tttgatatc tggggccaag ggacaatggt caccgtctcc 360

tca 363

15 <210> 6

<211> 121

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> V_H de anticuerpo anti-NGF humano

<400> 6

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

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

30

ES 2 663 968 T3

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

Gly Glu Ile Asp His Ser Gly Ser Thr Asn Asn Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Gly 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 Ser
 85 90 95

Arg Asp Gly Gly Pro Glu Ser Gly Met Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 7

5 <211> 693

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Gen de fragmento de cadena H de anticuerpo anti-NGF humano

15

<400> 7

caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt gggtactact ggagctgggt ccgccagccc 120
 ccaggggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaagcac caacaacaac 180
 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtaggcacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgttcgag agatgggggc 300
 cccgaatcgg ggatgggggc ttttgatata tggggccaag ggacaatggt caccgtctcc 360
 tcagcctcca ccaagggccc atcggctctc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct 420
 gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480
 tcgtggaact caggcgcct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540
 tcaggactct actcccttag tagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag 600
 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660
 cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc tga 693

<210> 8

20

<211> 230

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Fragmento de cadena H de anticuerpo anti-NGF humano

<400> 8

ES 2 663 968 T3

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

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

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

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Asn Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Gly 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 Ser
 85 90 95

Arg Asp Gly Gly Pro Glu Ser Gly Met Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

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

Asp Lys Thr His Thr Cys
 225 230

<210> 9

5

<211> 693

ES 2 663 968 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Gen de fragmento de cadena H de anticuerpo anti-NGF humano

10

<400> 9

```

caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc      60
acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctgggt ccgccagccc      120
ccaggggaagg ggctggagtg gattggggaa atcgaccata gtggaagcac caacaacaac      180
ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtaggcacgt ccaagaacca gttctccctg      240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgttcgag agatgggggc      300
cccgaatcgg ggatgggggc ttttgatata tggggccaag ggacaatggt caccgtctcc      360
tcagcctcca ccaagggccc atcggctctc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct      420
gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg      480
tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc      540
tcaggactct actcccttag tagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag      600
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag      660
cccaaatttt gtgacaaaac tcacacatgc tga                                     693

```

<210> 10

15

<211> 230

<212> PRT

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de cadena H de anticuerpo anti-NGF humano

25

<400> 10

```

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

```

ES 2 663 968 T3

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Gly 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 Ser
85 90 95

Arg Asp Gly Gly Pro Glu Ser Gly Met Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

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

Asp Lys Thr His Thr Cys
225 230

<210> 11

5 <211> 660

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Gen de cadena L de anticuerpo anti-NGF humano

15 <400> 11

ES 2 663 968 T3

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgctca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg catagtaatg gattcaacta tttgggttgg 120
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atttgggttc taatcgggcc 180
tccgggggtcc ctgacagggtt cagtggcagt ggatcaggca cagatTTTtac tctgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgca tgcaagctct acaaactccg 300
tacacttttg gccaggggac caagctggag atcaaacgga ctgtggctgc accatctgtc 360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
agcagcacc c tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
gtcaccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 660

<210> 12

5

<211> 219

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena L de anticuerpo anti-NGF humano

15

<400> 12

ES 2 663 968 T3

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asn Gly Phe Asn Tyr Leu Gly Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

Leu Gln Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 13

5

<211> 699

<212> ADN

10

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 663 968 T3

<223> Gen de fragmento de cadena H de anticuerpo anti-NGF humano

<400> 13

```
caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc      60
acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctgggt ccgccagccc      120
ccaggaaggg ggctggagtg gattggggaa atcgaccata gtggaagcac caacaacaac      180
ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtaggcacgt ccaagaacca gttctccctg      240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgttcgag agatgggggc      300
cccgaatcgg ggatgggggc ttttgatata tggggccaag ggacaatggt caccgtctcc      360
tcagcctcca ccaagggccc atcggctctc ccctggcac cctcctcaa gagcacctct      420
gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg      480
tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc      540
tcaggactct actcccttag tagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag      600
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag      660
5  cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc gcagcctga      699
```

<210> 14

<211> 232

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Fragmento de cadena H de anticuerpo anti-NGF humano

<400> 14

20

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

ES 2 663 968 T3

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

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

Gly Glu Ile Asp His Ser Gly Ser Thr Asn Asn Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Gly 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 Ser
 85 90 95

Arg Asp Gly Gly Pro Glu Ser Gly Met Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

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

Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala
 225 230

<210> 15

5 <211> 699

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

ES 2 663 968 T3

<220>

<223> Gen de fragmento de cadena H de anticuerpo anti-NGF humano

5 <400> 15

```
caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc      60
acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctgggt ccgccagccc      120
ccaggggaagg ggctggagtg gattggggaa atcgaccata gtggaagcac caacaacaac      180
ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtaggcacgt ccaagaacca gttctccctg      240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgttcgag agatgggggc      300
cccgaatcgg ggatgggggc ttttgatata tggggccaag ggacaatggt caccgtctcc      360
tcagcctcca ccaagggccc atcggctctc ccctggcac cctcctcaa gagcacctct      420
gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg      480
tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc      540
tcaggactct actcccttag tagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcaccag      600
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag      660
cccaaattctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtga      699
```

10

<210> 16

<211> 232

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> Fragmento de cadena H de anticuerpo anti-NGF humano

<400> 16

ES 2 663 968 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asp His Ser Gly Ser Thr Asn Asn Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Gly 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 Ser
 85 90 95
 Arg Asp Gly Gly Pro Glu Ser Gly Met Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230

REIVINDICACIONES

1. Fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano, que comprende:
5 un fragmento de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16; y
una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 12,
10 en el que el fragmento Fab' está conjugado con polietilenglicol.
2. Fragmento Fab' según la reivindicación 1, que comprende:
15 un fragmento de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 14; y
una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 12,
20 en el que el fragmento Fab' está conjugado con polietilenglicol.
3. Método de producción del fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano, que comprende
25 expresar un fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano cultivando una célula huésped seleccionada de un grupo que consiste en los siguientes (a) y (b),
30 (a) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el fragmento de cadena pesada del fragmento Fab' según la reivindicación 1 y un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la cadena ligera del fragmento Fab' según la reivindicación 1; y
35 (b) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el fragmento de cadena pesada del fragmento Fab' según la reivindicación 1 y con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la cadena ligera del fragmento Fab' según la reivindicación 1, y
40 conjugar el fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano con polietilenglicol.
4. Método de producción del fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano, que comprende
45 expresar un fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano cultivando una célula huésped seleccionada de un grupo que consiste en los siguientes (a) y (b),
50 (a) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el fragmento de cadena pesada del fragmento Fab' según la reivindicación 2 y un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la cadena ligera del fragmento Fab' según la reivindicación 2; y
55 (b) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el fragmento de cadena pesada del fragmento Fab' según la reivindicación 2 y con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la cadena ligera del fragmento Fab' según la reivindicación 2, y
60 conjugar el fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano con polietilenglicol.
5. Fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano producido mediante el método según la reivindicación 3.
6. Fragmento Fab' de anticuerpo anti-NGF humano producido mediante el método según la reivindicación 4.

Fig. 1

