

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 016**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2012** **PCT/GB2012/052174**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013** **WO13034900**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2012** **E 12761785 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018** **EP 2753645**

54 Título: **Anticuerpos modificados y procedimiento de producción de los mismos**

30 Prioridad:

06.09.2011 US 201161531439 P

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

24.04.2018

73 Titular/es:

NEXVET AUSTRALIA PTY LTD (100.0%)
Level 8 31 Queen Street
Melbourne VIC 3000, AU

72 Inventor/es:

GEARING, DAVID

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 665 016 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos modificados y procedimiento de producción de los mismos

Campo de la divulgación

La presente divulgación se refiere a procedimientos para producir agentes de unión no inmunogénicos, en particular inmunoglobulinas y fragmentos de las mismas, que se pueden usar en procedimientos terapéuticos. En particular, los procedimientos permiten la modificación de una inmunoglobulina donante de modo que se pueda administrar a una especie diana con un riesgo mínimo de que se generen anticuerpos neutralizantes frente a la misma. La divulgación se extiende adicionalmente a inmunoglobulinas producidas con dichos procedimientos y a su uso en terapia.

Antecedentes de la divulgación

Los avances en tecnología de ADN recombinante han dado como resultado una diversidad de proteínas que se están desarrollando para aplicaciones farmacéuticas. Esto ha dado como resultado un número de fármacos basados en proteína, que se pueden denominar más generalmente agentes biológicos, que son el objeto de ensayos clínicos o aprobación por el mercado. Debido a sus propiedades y estructuras inherentes, los fármacos basados en proteínas son significativamente más grandes y más complejos que las moléculas basadas en moléculas orgánicas e inorgánicas pequeñas más tradicionales. En particular, la estructura terciaria plegada de la proteína es esencial para su función biológica.

Los anticuerpos son una familia de proteínas que se están desarrollando y usando ampliamente en aplicaciones en el ser humano. La popularidad de los anticuerpos en aplicaciones terapéuticas se ha debido a su versatilidad para ser capaces de unirse de forma específica prácticamente a cualquier molécula diana deseada. La mayoría de los productos terapéuticos basados en proteínas son anticuerpos monoclonales. Sin embargo un inconveniente significativo asociado con el uso de terapias basadas en anticuerpos monoclonales es la producción de anticuerpos neutralizantes frente al anticuerpo monoclonal terapéutico cuando se administra a un sujeto. Estos anticuerpos neutralizantes surgen del sistema inmunológico del sujeto reconociendo como secuencias extrañas de aminoácidos que están presentes en el anticuerpo monoclonal administrado. Como resultado, una respuesta inmunológica aumenta frente al anticuerpo terapéutico administrado. La producción de anticuerpos neutralizantes por el sujeto puede alterar de forma significativa la capacidad para continuar tratando al sujeto con el anticuerpo monoclonal terapéutico. Por lo general, una vez que los anticuerpos neutralizantes se han producido en el sujeto, es necesario aumentar el uso del anticuerpo terapéutico ya que los anticuerpos neutralizantes reducen o anulan de forma eficaz el efecto terapéutico del anticuerpo monoclonal administrado. Esto puede limitar el uso del anticuerpo terapéutico para un tratamiento inicial solamente, con el resultado de que la repetición o dosificación a largo plazo del anticuerpo terapéutico no es una opción. En resumen, la producción de anticuerpos neutralizantes frente a un anticuerpo terapéutico puede limitar de forma significativa el uso terapéutico de este anticuerpo y esto, a su vez limitar de forma significativa, o evitar completamente, el uso del anticuerpo en el tratamiento de una enfermedad crónica o recurrente.

Para intentar reducir la probabilidad de que se produzcan anticuerpos neutralizantes frente a un anticuerpo terapéutico, se ha desarrollado un número de enfoques que están diseñados para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo modificando su estructura. Un enfoque de este tipo es la producción de un anticuerpo quimérico mediante el cual los dominios constantes de cadena pesada y ligera del anticuerpo se obtienen a partir de un anticuerpo obtenido de la misma especie que el sujeto al que se va a administrar el anticuerpo. Como la mayoría de los anticuerpos terapéuticos se han desarrollado para su uso en seres humanos, los anticuerpos quiméricos de ese tipo por lo general comprenden dominios constantes de cadena pesada y ligera obtenidos a partir de ser humano unidos a regiones variables de cadena pesada y ligera obtenidas a partir de un anticuerpo no humano, lo más generalmente de origen de ratón o rata.

Los enfoques adicionales para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos terapéuticos usan técnicas denominadas humanización. El término humanización refleja el hecho de que los anticuerpos modificados se están haciendo más similares a los anticuerpos que podrían ser producidos por un ser humano, para limitar la posibilidad de un resultado de respuesta inmunológica. Las técnicas de organización se extienden a un número de diferentes enfoques para preparar un anticuerpo más similar al del ser humano.

Una técnica de humanización usada comúnmente es la del injerto de CDR mediante el cual las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) obtenidas a partir de un anticuerpo donante, tal como un anticuerpo obtenido a partir de murino, se combinan con regiones marco conservadas obtenidas a partir de un anticuerpo de origen humano para formar dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras que a continuación se combinan con dominios constantes de cadena pesada ligera obtenidos a partir de anticuerpo humano. Por lo tanto el anticuerpo resultante contiene solamente un número limitado de aminoácidos obtenidos a partir de ser no humano, sirviendo esto para limitar la presencia de epítomos que serán visualizados por el sistema inmunológico humano como extraños.

Un inconveniente significativo asociado con la humanización es que a menudo da como resultado una reducción significativa de la afinidad de unión del anticuerpo humanizado resultante con respecto a la presentada por el anticuerpo donante no humanizado. Tal como es el caso con la producción de anticuerpos neutralizantes frente a un anticuerpo monoclonal terapéutico, esto puede dar como resultado que el uso terapéutico de ese anticuerpo se vea comprometido de forma significativa. En particular, la reducción de la afinidad de unión da como resultado la necesidad de administrar una dosis más elevada del anticuerpo terapéutico y puede requerir adicionalmente que también se aumente la frecuencia de dosificación. Ambos factores dan como resultado un aumento del coste de la terapia y un aumento de las molestias al paciente. Además, la administración de cantidades más elevadas del anticuerpo a un sujeto da como resultado un aumento del riesgo de que los anticuerpos neutralizantes se generen frente al anticuerpo terapéutico.

En casos en los que los anticuerpos humanizados se unen al epítipo deseado con una afinidad menor que el anticuerpo donante inicial, esto se puede deber al alineamiento estructural incompatible de secuencias de región marco conservada con las secuencias de CDR de unión a epítipo. A través de un proceso repetitivo de retromutación de restos humanos con los aminoácidos en la misma posición en el anticuerpo donante, la afinidad del anticuerpo izado a menudo se puede restablecer. Aunque el proceso de retromutación puede dar como resultado la reintroducción adicional de restos de aminoácidos no humanos en el anticuerpo humanizado, el anticuerpo resultante todavía se denomina humanizado a pesar de la presencia de aminoácidos donantes significativos en la secuencia final.

Mediante analogía directa, la especiación de anticuerpos para su uso en especies distintas a las humanas se ve comprometida del mismo modo mediante el requisito de producir cambios en el marco conservado que mantienen la especificidad de unión del anticuerpo modificado, a la vez que se reduce la inmunogenicidad del anticuerpo resultante en la especie diana de elección. Desde una perspectiva comercial, uso de anticuerpos en especies distintas a las del ser humano es deseable debido al intervalo de procesos de una enfermedad comunes que se podrían tratar de manera útil, en particular, en especies de alto valor tales como animales de compañía (gatos y perros) y animales resistentes (caballos y camellos), o para mejorar la calidad de la carne en animales que producen alimento, tales como vacas, ovejas, cerdos y pollos. En consecuencia, podrían ser altamente deseables procedimientos que permitan una conversión de anticuerpos más sencilla para su uso en estas especies.

Por lo tanto existe una necesidad de mejores procedimientos para modificar un anticuerpo donante para que se pueda administrar a un sujeto diana sin que el anticuerpo resultante presente una pérdida de la afinidad de unión con respecto al antígeno diana, a la vez que se minimizan los cambios de esos de las secuencias de anticuerpo receptor para reducir la probabilidad de que se generen anticuerpos frente al mismo. A continuación podría ser altamente deseable un procedimiento que convierta una secuencia de anticuerpo donante en una secuencia de especie diana con un número mínimo de cambios para conseguir una estructura de marco conservado de especie diana con un impacto mínimo en la estructura de la CDR.

Pelat y Thullier (2009) mAbs 1 (4): 377-381 describen bibliotecas inmunológicas de primate no humano combinadas con humanización de línea germinal.

El documento WO2006/131951 describe moléculas que son capaces de inhibir la unión entre NGF y el receptor TrkA como agentes analgésicos con efecto prolongado.

El documento WO2005/061540 describe un procedimiento para la humanización de anticuerpos y anticuerpos humanizados obtenidos de ese modo.

El documento WO2010/027488 describe anticuerpos heteroquímicos.

Lazar y col. (2007) Molecular Immunology 44: 1986-1998 describe un enfoque de inmunología molecular para humanización de anticuerpo y optimización funcional. Williams y col. (2010) Capítulo 21 en Antibody Engineering Vol. 1 (Editado por Kontermann y Dübel) describen la humanización de anticuerpos mediante injertos de CDR.

Covaceuszach y col. (2012) PLoS ONE 7 (3): e32212:1-12 describen una humanización basada en estructura de un ciclo individual de un anticuerpo terapéutico de anti-factor de crecimiento nervioso.

Sumario de la invención

La invención se define con las reivindicaciones. Los aspectos / ejemplos de la presente divulgación que constituyen la invención se definen con las reivindicaciones.

Sumario de la divulgación

La presente divulgación describe procedimientos para modificar un del anticuerpo donante para uso en especies diana de modo que el anticuerpo resultante no contenga ningún aminoácido en ninguna posición dentro de las regiones marco conservadas que pudiera ser extraño en esa posición en esa especie. Por lo tanto el anticuerpo modificado mantendrá la especificidad y afinidad del anticuerpo donante, pero al mismo tiempo se modificará de modo que no se cree ningún epítipo potencialmente extraño. Por lo tanto el anticuerpo modificado no se observará como extraño en la especie diana y por lo tanto no inducirá una respuesta inmunológica que pudiera conducir a una neutralización de su eficacia, especialmente después de administración a largo plazo. El procedimiento mediante el cual se puede conseguir lo mencionado supera todas las desventajas inherentes en procedimientos anteriores y además se caracteriza por una simplicidad y elegancia notables.

Haciendo grandes esfuerzos, el presente inventor ha desarrollado de forma sorprendente un procedimiento para alterar un anticuerpo donante o un fragmento de unión a antígeno obtenido a partir del mismo de modo que es completa o significativamente no inmunogénico cuando se administra a una especie diana, siendo dicha especie diana una especie diferente a aquella a partir de la que se obtuvo el anticuerpo donante. Por lo general, no se generan anticuerpos neutralizantes frente al anticuerpo resultante después de su administración a un sujeto. Además, la alteración del anticuerpo para hacer que sea no inmunogénico podría dar como resultado una reducción de la especificidad o afinidad de unión a la diana pretendida.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente divulgación se proporciona un procedimiento para producir una inmunoglobulina no inmunogénica para su administración a una especie diana, procedimiento que comprende las etapas de:

- identificar una inmunoglobulina donante de una especie distinta a la especie diana, en el que la inmunoglobulina donante tiene especificidad de unión a un epítipo diana presente en la especie diana,
- determinar una secuencia de aminoácidos de regiones marco conservadas de dominios variables de cadena pesada y/o ligera de la inmunoglobulina donante,
- comparar cada resto de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de las regiones marco conservadas de los dominios variables de cadena pesada y/o ligera de la inmunoglobulina donante con un resto de aminoácido presente en una posición correspondiente en una secuencia de aminoácidos de regiones marco conservadas de una o más inmunoglobulinas obtenidas a partir de la especie diana para identificar uno o más restos de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos de las regiones marco conservadas de los dominios variables de cadena pesada y/o ligera de la inmunoglobulina donante que no está presente en la posición correspondiente en la secuencia de aminoácidos de las regiones marco conservadas de al menos una de la una o más inmunoglobulinas obtenidas a partir de la especie diana, y
- sustituir el uno o más restos de aminoácidos identificados presentes en la secuencia de aminoácidos de las regiones marco conservadas de los dominios variables de cadena pesada y/o ligera de la inmunoglobulina donante, pero no presentes en la posición correspondiente en la secuencia de aminoácidos de las regiones marco conservadas de al menos una de la una o más inmunoglobulinas obtenidas a partir de la especie diana, con un resto de aminoácido que está presente en la posición correspondiente en la secuencia de aminoácidos de las regiones marco conservadas de al menos una de la una o más inmunoglobulinas obtenidas a partir de la especie diana.

El procedimiento deja sin alterar (es decir, sin sustituir) cualquier aminoácido que esté presente en una región marco conservada (FW) específica en la inmunoglobulina donante que también esté presente en al menos una de las posiciones correspondientes de la región marco conservada en inmunoglobulinas obtenidas a partir de la especie diana. En ciertos ejemplos, las secuencias de aminoácidos de las regiones marco conservadas de las inmunoglobulinas de la especie diana comprenden una combinación de restos que se pueden comparar con el resto de aminoácidos presente en la posición correspondiente en la inmunoglobulina donante. Por lo general una combinación de este tipo comprende restos de aminoácidos específicos posicionales obtenidos a partir de una pluralidad de inmunoglobulinas de especies diana. Por lo general la combinación comprende datos de secuencia de región marco conservada a partir de tantas inmunoglobulinas de una especie diana como sea posible, y, si fuera viable, todas las secuencias de la región marco conservada de todas las inmunoglobulinas conocidas para una especie en particular que está presente en bases de datos publicadas.

La secuencia de aminoácidos de las regiones marco conservadas de inmunoglobulinas obtenidas a partir de diferentes especies se puede obtener a partir de un número de bases de datos disponibles al público que serán bien conocidas para la persona con experiencia en la materia. Por ejemplo, las bases de datos contenidas en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) contienen información de secuencias de inmunoglobulina para anticuerpos obtenidos a partir de una amplia variedad de especies. Las bases de datos adicionales pueden incluir cualquier base de datos que comprenda secuencias de ADNc de línea germinal y expresado disponibles al público y pueden incluir publicaciones en revistas o bases de datos tales como, pero no limitadas a, la base de datos de secuencias de inmunoglobulina de Kabat (URL: www.kabatdatabase.com) y V BASE, la base de datos de anticuerpos humanos (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>). Los procedimientos para preparar una tabla de posibles aminoácidos diana es algo rutinario para la persona con experiencia.

Aunque la comparación se puede realizar entre la secuencia donante y un solo miembro de la secuencia diana, Será evidente que la comparación con una combinación de secuencias diana es preferente porque esto ampliará el número de opciones naturales en cada posición de Kabat en la especie diana. Esto no solamente aumentará la posibilidad de un "emparejamiento" entre el donante y la diana, sino que también ampliará las opciones de sustitución cuando no exista un emparejamiento.

Como se define en el presente documento, una inmunoglobulina no inmunogénica es una inmunoglobulina que no tiene una respuesta inmunológica generada frente a la misma cuando se administra a una especie diana. En particular, una respuesta humoral (mediada por anticuerpos) no está mediada frente al anticuerpo, en particular frente a epítopos que comprenden restos de aminoácidos obtenidos a partir de las regiones marco conservadas (FW).

Cuando los aminoácidos donantes y diana se diferencian en cualquier número de Kabat, el aminoácido se debe elegir entre uno del que se sabe que es natural en esa posición en la diana. Esto conducirá a un número de posibles secuencias, cualquiera de las cuales puede conducir a una secuencia preferente o al menos adecuada de la divulgación. Cuando se requiere la sustitución de un resto de aminoácido presente en una región marco conservada

5 De una inmunoglobulina donante, por lo general esto se asume usando el principio de sustitución conservativa. Por lo general, la sustitución conservativa requiere la sustitución del aminoácido con un resto de aminoácido homólogo, que es un resto que comparte características o propiedades similares. una sustitución de este tipo se puede conocer como sustitución homóloga.

10 Para determinar si un aminoácido sustituido se puede sustituir con un aminoácido conservado, generalmente se puede realizar una evaluación de factores tales como, pero no limitados a, (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, una conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, y/o (c) el volumen de la cadena o cadenas laterales. Si un resto se puede sustituir con un resto que tiene características comunes, tales como una cadena lateral similar o carga o hidrofobia similares, entonces un resto de ese tipo es preferente como un sustituto.

15 Cuando se considera si un resto obtenido a partir de una inmunoglobulina donante que está presente en la combinación de restos de inmunoglobulina de especies diana presentes en una posición correspondiente puede estar sustituido de forma conservativa, puede ser preferente evaluar si un aminoácido homólogo está disponible en la combinación de restos correspondientes obtenidos a partir de la especie diana para esa posición específica basándose en los aminoácidos que se están agrupando puntos de acuerdo con similitudes en las propiedades de

20 sus cadenas laterales (A. L. Lehninger, en *Biochemistry*, 2ª Ed., 73-75, Worth Publishers, New York (1975)). Por ejemplo, se pueden determinar los siguientes grupos: (1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M); (2) polares sin carga: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q); (3) ácidos: Asp (D), Glu (E); y (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H). Por lo tanto la sustitución de un resto de aminoácido con otro presente en el mismo grupo es preferente.

25 Como alternativa, los aminoácidos se pueden agrupar como sigue a continuación: (1) aromáticos: Phe (F), Trp (W), Tyr (Y); (2) apolares: Leu (L), Val (V), Ile (I), Ala (A), Met (M); (3) alifáticos: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I); (4) Ácidos: Asp (D), Glu (E); (5) básicos: His (H), Lys (K), Arg (R); y (6) polares: Gln (Q), Asn (N), Ser (S), Thr (T), Tyr (Y). De nuevo, la sustitución de un resto de aminoácido con otro presente en el mismo grupo es preferente.

30 Como alternativa, los restos de aminoácidos se pueden dividir en grupos basándose en propiedades comunes de la cadena lateral: (1) hidrófobos: Met (M), Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I); (2) hidrófilos neutros: Cys (C), Ser (S), Thr (T), Asn (N), Gln (Q); (3) ácidos: Asp (D), Glu (E); (4) básicos: His (H), Lys (K), Arg (R); (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly (G), Pro (P); y (6) aromáticos: Trp (W), Tyr (Y), Phe (F). De nuevo, la sustitución de un resto de aminoácido con otro presente en el mismo grupo podría ser preferente.

35 En consecuencia, las sustituciones conservativas implicarán el intercambio (sustitución) de un miembro de una de estas clases por otro de esa misma clase. En ciertos ejemplos, el resto de aminoácido que se introduce en la secuencia de la región marco conservada de la inmunoglobulina donante es el aminoácido consenso definido en esa posición específica de la combinación de inmunoglobulinas obtenidas a partir de la especie diana. El aminoácido consenso es el aminoácido que se encuentra más comúnmente en esa posición en inmunoglobulinas que comprenden la colección de inmunoglobulinas de especies diana que contribuyen a la combinación.

40 Por lo general la sustitución de los restos de la región marco conservada no dan como resultado una reducción de la unión de la inmunoglobulina a su ligando pretendido. En particular, no existe reducción en la afinidad su especificidad de unión.

45 En ciertos ejemplos el procedimiento comprende adicionalmente la etapa de sustituir al menos uno y preferentemente todos los dominios constantes de cadena pesada y/o ligera de la inmunoglobulina donante con cadenas pesadas y/o ligeras equivalentes obtenidas a partir de una inmunoglobulina obtenida a partir de la especie diana. En ciertos ejemplos, los dominios constantes obtenidos a partir de la especie diana son del anticuerpo de subtipo Inmunoglobulina G (IgG).

50 En ciertos ejemplos, la combinación de secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina donante usada para evaluar los restos de aminoácidos de las regiones marco conservadas se puede limitar a subtipos de inmunoglobulinas obtenidas a partir de la especie diana, por ejemplo, de cadenas ligeras kappa o lambda.

55 Sin desear quedar ligado por la teoría, el procedimiento da como resultado solamente un número mínimo de cambios esenciales (soluciones de aminoácidos) que se realizan en las secuencias de la región marco conservada de la inmunoglobulina donante, a la vez que se asegura que todos los aminoácidos en la secuencia de la región marco conservada resultante se alinean con los de la especie diana. En consecuencia esto minimiza los cambios estructurales resultantes de la modificación del anticuerpo de una inmunoglobulina donante a un anticuerpo que será completa o sustancialmente no inmunogénico cuando se administre a un sujeto diana. Debido al procedimiento que implica la sustitución del menor número posible de restos, el procedimiento se puede denominar Traducción Esencial Escasa (PET). Por extensión, los cambios realizados en una inmunoglobulina donante para permitir que sea no

inmunogénica cuando se administra a una especie animal diana, se puede denominar PETización y se puede hacer referencia a que el anticuerpo resultante se ha PETizado. Este procedimiento puede, por ejemplo, dar como resultado la especiación de un anticuerpo humano, de ratón o de rata existente de modo que se pueda administrar a otra especie diana, en particular una especie animal, tal como ser humano, perro, gato, o caballo sin neutralizar anticuerpos que se generan frente al mismo.

En ciertos ejemplos, la especie diana es una especie diana de mamífero. En un ejemplo, la especie de mamífero diana es un animal, en particular un animal de compañía tal como, pero no limitado a, un perro, gato o caballo o un animal de ganadería. En ejemplos adicionales, la especie diana de mamífero es un ser humano.

En ciertos ejemplos, el epítipo diana es el factor del crecimiento nervioso (NGF) o factor de necrosis tumoral (TNF).

En diversos ejemplos adicionales se proporciona una composición que contiene una inmunoglobulina proporcionada por el procedimiento con un aspecto de la divulgación mencionado anteriormente, o un fragmento de unión a antígeno de la misma. La composición puede comprender adicionalmente al menos un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Además un aspecto adicional proporciona el uso de una inmunoglobulina producida por el procedimiento de un aspecto de la divulgación mencionado anteriormente, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad. En diversos aspectos adicionales, la presente divulgación se extiende al uso de las inmunoglobulinas mencionadas anteriormente, o un fragmento de unión a antígeno de las mismas, en procedimientos terapéuticos y de diagnóstico. La divulgación se extiende adicionalmente a una inmunoglobulina producida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad.

Además un aspecto adicional de la divulgación se refiere a la administración de una inmunoglobulina producida de acuerdo con cualquiera de los procedimientos que se definen en el presente documento, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, a un sujeto, en particular un sujeto mamífero, para el tratamiento o prevención de una enfermedad.

Desinmunización

En diversos aspectos adicionales, la divulgación se extiende a la modificación de una inmunoglobulina terapéutica para hacerla no inmunogénica cuando se administra a una especie específica. Dicha modificación se puede aplicar a un anticuerpo quimérico, un anticuerpo producido con una técnica de injerto de CDR o un anticuerpo humanizado.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona por lo tanto un procedimiento para modificar una inmunoglobulina terapéutica para hacerla no inmunogénica, procedimiento que comprende las etapas de:

- proporcionar una inmunoglobulina terapéutica donante,
- determinar una secuencia de aminoácidos de al menos una región marco conservada de dominios variables de cadenas ligeras y/o pesadas de la inmunoglobulina donante
- obtener una combinación de secuencias de aminoácidos con respecto a al menos una región marco conservada de dominios variables de cadenas ligeras y/o pesadas de inmunoglobulinas obtenidas a partir de una especie diana a la que se va a administrar la inmunoglobulina,
- comparar restos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la al menos una región marco conservada de las cadenas ligeras y/o pesadas de la inmunoglobulina donante con restos de aminoácidos que tienen la misma numeración de Kabat en la combinación de secuencias de aminoácidos, y
- sustituir cualquier resto de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de al menos una región marco conservada de las cadenas ligeras y/o pesadas de la inmunoglobulina donante con un resto de aminoácido que tiene la misma numeración de Kabat en la combinación de secuencias de aminoácidos en las que el resto de aminoácido presente en la secuencia de aminoácidos de la al menos una región marco conservada de las cadenas ligeras y/o pesadas de la inmunoglobulina donante se diferencia de los restos de aminoácidos que tienen la misma numeración de Kabat en la combinación de secuencias de aminoácidos.

Por lo general las inmunoglobulinas terapéuticas rehumanizadas que usan esta metodología dan como resultado una inmunoglobulina que es menos inmunogénica que el anticuerpo terapéutico donante no alterado. Además, el anticuerpo modificado retiene su afinidad y especificidad de unión. por lo tanto, el anticuerpo modificado resultante es más terapéuticamente útil.

En ciertos ejemplos, el anticuerpo PETizado resultante, o fragmento de unión del mismo, se une al epítipo diana deseado con una afinidad de unión K_D de 1×10^{-8} o inferior.

Además un aspecto adicional de la divulgación se extiende a la provisión de al menos una región marco conservada para su uso en un dominio variable de cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina. El procedimiento de este aspecto de la divulgación puede tener utilidad en particular en un procedimiento tal como humanización de un anticuerpo, o un procedimiento equivalente usado para modificar un anticuerpo para deshumanizarlo antes de su administración ha una especie distinta a un ser humano. Las regiones marco conservadas proporcionadas con este aspecto de la divulgación se pueden introducir en un anticuerpo que está a punto de experimentar humanización o

un proceso de especiación similar, o de modo retroactivo se puede introducir en un anticuerpo que previamente ha experimentado especiación. De forma específica, las regiones marco conservadas modificadas se pueden introducir en un anticuerpo que ha experimentado, o que está a punto de experimentar, modificación en virtud de un procedimiento tal como injerto de CDR, o que es un anticuerpo quimérico en el que la región Fab del anticuerpo se obtiene a partir de una primera especie y la región Fc el anticuerpo se obtiene a partir de una segunda especie.

En consecuencia, este aspecto adicional proporciona un procedimiento para modificar una secuencia de aminoácidos de al menos una región marco conservada de un dominio variable de cadena pesada y/o ligera de una inmunoglobulina donante, procedimiento que comprende las etapas de:

- determinar la secuencia de aminoácidos de la al menos una secuencia de la región marco conservada de la inmunoglobulina donante;
- en un resto de base de resto, comparar restos de aminoácidos específicos en cada posición de la al menos una región marco conservada de la inmunoglobulina donante con una base de datos que comprende una combinación de restos de aminoácidos encontrada en una posición del aminoácido correspondiente en secuencias de región marco conservada encontrada en anticuerpos obtenidos a partir de una especie a la que se va a administrar la inmunoglobulina fuente modificada;
- sustituir cualquier resto de aminoácido que este presente en una posición específica en la al menos una región marco conservada de la inmunoglobulina donante, pero no en la combinación de restos de aminoácidos encontrados en la correspondiente posición del aminoácido, con un resto de aminoácido que está presente en la combinación de restos de aminoácidos encontrados en la correspondiente posición del aminoácido; y
- dejar sin alterar cualquier resto de aminoácido que esté presente en una posición específica en la al menos una región marco conservada de la inmunoglobulina donante y también que esté presente en la combinación de restos de aminoácidos encontrados en la correspondiente posición del aminoácido.

Por lo general, cualquier resto de aminoácido reemplazado está sustituido con un resto de aminoácido que es el más homólogo para el resto de aminoácido que se está reemplazando. Como se ha definido anteriormente en el presente documento, se conocen grupos homólogos de restos de aminoácidos. Si un resto de aminoácido homólogo no está presente en la combinación, entonces el aminoácido se puede sustituir con el resto de aminoácido que se produce con más frecuencia en esa posición específica, el denominado resto de aminoácido consenso.

En ciertos ejemplos, el procedimiento se extiende a un procedimiento para producir un anticuerpo modificado que comprende las etapas de expresar la secuencia de la región marco conservada modificada junto con regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y dominios constantes de cadena pesada y/o ligera de modo que se produce un anticuerpo heterotetramérico que comprende dichas secuencias de región marco conservada modificadas.

Ciertos aspectos adicionales de la presente divulgación se extienden a la provisión de un oligonucleótido que expresa la secuencia de aminoácidos de la secuencia de región marco conservada modificada a la expresión de la misma en una célula huésped.

Además un aspecto adicional de la presente divulgación se refiere a un procedimiento para producir un anticuerpo terapéutico con secuencias de región marco conservada no inmunogénica, procedimiento que comprende las etapas de:

- identificar restos de aminoácidos de región marco conservada que se van a sustituir por comparación de secuencias de aminoácidos de regiones marco conservadas con combinaciones de los correspondientes restos de aminoácidos presentes en las correspondientes posiciones del aminoácido en una pluralidad de inmunoglobulinas obtenidas a partir de una especie a la que se va a administrar el anticuerpo terapéutico para identificar uno o más restos de aminoácidos que se diferencian en una posición específica; y
- sustituir el uno o más restos de aminoácidos identificados con un resto de aminoácido presentes en la combinación de los correspondientes puestos de aminoácido.

En ciertos ejemplos la identificación de si un resto de aminoácido de región marco conservada está presente en la correspondiente combinación posicional de restos de aminoácidos de la especie a la que se administrará el anticuerpo se consigue realizando un alineamiento de la secuencia y los restos de la combinación. Esencialmente, los restos que están sustituidos no reducen la actividad de unión del anticuerpo modificado resultante. Es decir, el aminoácido que está sustituido se puede sustituir por un aminoácido diferente sin influir de forma significativa en las características de unión del anticuerpo. Esto se consigue principalmente sustituyendo el aminoácido con un aminoácido homólogo, es decir, un aminoácido que tiene características similares o relacionadas, tales como tamaño, polaridad/carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o el volumen de la cadena lateral. Como alternativa, el resto se puede sustituir con el resto consenso que se produce en la especie diana en una posición correspondiente.

Los restos de aminoácidos que se sustituyen (o se pueden sustituir) están presentes en posiciones que se pueden conocer como posiciones tolerantes variables. Es decir, la sustitución de ese resto por otro resto no altera la especificidad de unión de las regiones determinantes de la complementariedad que se interponen entre las regiones

marco conservadas. Se puede considerar que una sustitución de este tipo es necesaria debido al hecho de que un resto presente en una posición específica de una región marco conservada en una especie puede estar ausente en una posición correspondiente en las secuencias de región marco conservada de una segunda especie. Por lo tanto, el aminoácido puede producir una respuesta inmunogénica generada frente al mismo debido a la formación de un epítipo que es visualizado como extraño por el sistema inmunológico de una especie en la que ese resto de aminoácido no está normalmente presente en esa posición de una secuencia de región marco conservada. Usando la metodología solución de ese resto atípico o un resto homólogo o un resto consenso que está presente en la especie diana, el epítipo potencialmente extraño se puede alterar para formar un epítipo que no se reconocerá como extraño. Por lo tanto la retirada de todos los epítipo de ese tipo de la región marco conservada de un anticuerpo puede prevenir una respuesta humoral que se está generando frente a esa porción del anticuerpo cuando se administra a un sujeto que es de una especie diferente a la especie a partir de la que se obtuvo inicialmente el anticuerpo.

Producción de región marco conservada específica de especie ubicua

El inventor ha definido adicionalmente una serie de regiones marco conservadas (FR) que se pueden combinar con reacciones determinantes de la complementariedad (CDR) para formar dominios de cadena pesada y ligera variable PETizados no inmunogénicos. Cada uno de los dominios de cadena pesada y ligera tiene 4 regiones marco conservadas, denominadas FR1, FR2, FR3 y FR4. Esta metodología se puede aplicar para desinmunizar cualquier anticuerpo (inmunoglobulina) con el fin de que se pueda administrar a una especie deseada. Sin embargo, para los fines de ejemplificación solamente, los ejemplos que se indican a continuación ilustran la producción y uso de regiones marco conservadas de ese tipo en anticuerpos basados en ser humano, canino, felino y equino.

Estructura del anticuerpo

Una molécula de anticuerpo puede comprender un dominio variable de cadena pesada que comprende regiones CDR1, CDR2 y CDR3 y regiones marco conservadas interpuestas asociadas. Las CDR de dominio variable de cadena pesada (VH) se conocen como las VHCDR, con estas CDR siendo encontradas en las siguientes posiciones de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat: VHCDR1 - restos de Kabat 31-35, VHCDR2 - restos de Kabat 50-65 y VHCDR3 - restos de Kabat 95-102 (Kabat EA y col. (1991) Sequences of proteins of immunological interest, 5ª edición de. Bethesda: US Department of Health and Human Services).

Además, un anticuerpo comprende adicionalmente un dominio variable de cadena ligera que comprende regiones CDR1, CDR2 y CDR3 y regiones marco conservadas interpuestas asociadas. Las CDR del dominio variable de cadena ligera (VL) se conocen como VLCDR, con estas CDR siendo encontradas en las siguientes posiciones de resto de aminoácido de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat: VLCDR1 - restos de Kabat 24-34, VLCDR2 - restos de Kabat 50-56 y VLCDR3 - restos de Kabat 89-97.

Un dominio variable de cadena ligera o pesada comprende cuatro regiones marco conservadas, FR1, FR2, FR3 y FR4, interpuestas con las CDR en la siguiente disposición: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

Además un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona una inmunoglobulina para su administración a una especie diana, que comprende:

- dominios constantes de cadena ligera y pesada obtenidos a partir de una inmunoglobulina de la especie diana,
- regiones determinantes de la complementariedad (CDR) obtenidas a partir de una inmunoglobulina donante en las que la inmunoglobulina donante se une de forma específica a un ligando que está presente la especie diana,
- y
- regiones marco conservadas obtenidas a partir de la inmunoglobulina donante en las que cualquier resto de aminoácido que tampoco está presente en una posición correspondiente en cualquier inmunoglobulina de la especie diana está sustituido por un aminoácido que se encuentra en la posición correspondiente en la especie diana.

Por lo general no se realizan sustituciones de aminoácidos para las regiones CDR del anticuerpo. Además, en ciertos ejemplos las regiones marco conservadas comprenden normas de 7 restos de aminoácidos consecutivos que se están sustituyendo con restos de la especie diana. Además, en ciertos ejemplos las regiones marco conservadas comprenden no más de 5 restos de aminoácidos consecutivos que se están sustituyendo con restos de la especie diana. Además, en ciertos ejemplos las regiones marco conservadas comprenden no más de 3 restos de aminoácidos consecutivos que se están sustituyendo con restos de la especie diana.

Además, en ciertos ejemplos no más de 10 restos de aminoácidos de la región marco conservada de la inmunoglobulina donante (FR1, FR2, FR3 y FR4 de cadena pesada y FR1, FR2, FR3 y FR4 de cadena ligera) están sustituidos con restos de la especie diana. Además, en ciertos ejemplos no más de 7 restos de aminoácidos de la región marco conservada de la inmunoglobulina donante (FR1, FR2, FR3 y FR4 de cadena pesada y FR1, FR2, FR3 y FR4 de cadena ligera) están sustituidos con restos de la especie diana. Además, en ciertos ejemplos no más de 5 restos de aminoácidos de la región marco conservada de la inmunoglobulina donante (FR1, FR2, FR3 y FR4 de cadena pesada y FR1, FR2, FR3 y FR4 de cadena ligera) están sustituidos con restos de la especie diana.

En ciertos ejemplos la especie diana es una especie de mamífero. En particular la especie diana puede ser un ser humano, canino, felino o equino.

En consecuencia, en ciertos ejemplos en los que la inmunoglobulina se va a administrar a un canino como la especie diana, la inmunoglobulina comprende regiones de dominio constante obtenidas a partir de un anticuerpo o anticuerpos obtenidos a partir de canino, y los restos sustituidos en las regiones marco conservadas de la inmunoglobulina donante se obtienen a partir de los correspondientes restos de aminoácido de las regiones marco conservadas de canino.

En los casos en los que la inmunoglobulina se va a administrar a un felino como la especie diana, la inmunoglobulina comprende regiones de dominio constante obtenidas a partir de un anticuerpo o anticuerpos obtenidos a partir de felino, y los restos sustituidos en las regiones marco conservadas de la inmunoglobulina donante se obtienen a partir de los correspondientes restos de aminoácidos de regiones marco conservadas de felino.

En los casos en los que la inmunoglobulina se va a administrar a un equino como la especie diana, la inmunoglobulina comprende regiones de dominio constante obtenidas a partir de un anticuerpo o anticuerpos obtenidos a partir de equino, y los restos sustituidos en las regiones marco conservadas de la inmunoglobulina donante se obtienen a partir de los correspondientes restos de aminoácidos de regiones marco conservadas de equino.

En los casos en los que la inmunoglobulina se va a administrar a un ser humano como la especie diana, la inmunoglobulina comprende regiones de dominio constante obtenidas a partir de un anticuerpo o anticuerpos obtenidos a partir de ser humano, y los restos sustituidos en las regiones marco conservadas de la inmunoglobulina donante se obtienen a partir de los correspondientes restos de aminoácidos de regiones marco conservadas de ser humano.

En diversos ejemplos adicionales se proporciona una composición que contiene una inmunoglobulina del aspecto de la divulgación mencionado anteriormente, o un fragmento de unión a antígeno de la misma. La composición puede comprender adicionalmente al menos un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Además un aspecto adicional proporciona el uso de una inmunoglobulina del aspecto de la divulgación mencionado anteriormente, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad. En diversos aspectos adicionales, la presente divulgación se extiende al uso de las inmunoglobulinas mencionadas anteriormente, o un fragmento de unión a antígeno de las mismas, en procedimientos terapéuticos y de diagnóstico. La divulgación se extiende adicionalmente a una inmunoglobulina del aspecto de la divulgación mencionado anteriormente, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad.

Además un aspecto adicional de la divulgación se refiere a la administración de una inmunoglobulina del aspecto de la divulgación mencionado anteriormente, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, a un sujeto, En particular un sujeto mamífero, para el tratamiento o prevención de una enfermedad.

Además un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir una inmunoglobulina que comprende las etapas de:

- introducir nucleótidos que codifican cadenas pesadas y ligeras en una célula, en las que los nucleótidos codifican dominios variables de cadena ligera y pesada que comprenden regiones marco conservadas producidas de acuerdo con los procedimientos que se definen en el presente documento, y
- expresar los nucleótidos en una célula para producir la inmunoglobulina.

Además un aspecto adicional de la divulgación proporciona un procedimiento para producir una inmunoglobulina que es sustancialmente no inmunogénica cuando se administra a una especie diana, procedimiento que comprende las etapas de:

- (1) comparar secuencias de regiones marco conservadas de cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina donante a una colección de secuencias de regiones marco conservadas de cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina de especie diana;
- (2) sustituir cualquier resto de aminoácido que esté presente en una posición específica en las secuencias de la región marco conservada de la inmunoglobulina donante, pero no presente en una posición correspondiente en la colección de secuencias de región marco conservada de inmunoglobulina de especie diana, con un resto de aminoácido que está presente en una posición correspondiente en la colección de secuencias de región marco conservada de inmunoglobulina de especie diana;
- (3) sintetizar un segmento de ADN que codifica regiones variables de cadena pesada y/o ligera, que comprende las CDR de las regiones variables de la inmunoglobulina donante y las regiones marco conservadas sustituidas, junto con dominios constantes de cadena pesada y/o ligera apropiados para la especie;
- (4) introducir el segmento de ADN en una célula; y
- (5) expresar el segmento de ADN en la célula para producir y la inmunoglobulina.

En ciertos ejemplos, el procedimiento comprende adicionalmente la etapa de secuenciación de la región variable de cadena ligera y cadena pesada de la inmunoglobulina donante. En ciertos ejemplos, el procedimiento comprende adicionalmente la etapa de purificar la inmunoglobulina.

5 En ciertos ejemplos, el procedimiento comprende adicionalmente la etapa de formular la inmunoglobulina en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona un anticuerpo neutralizante o un fragmento de unión a antígeno del mismo que es capaz de unirse de forma específica al factor de crecimiento nervioso humano (NGF) en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o una
10 secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 % con la misma y/o una región variable de cadena pesada que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 % con la misma. En ciertos ejemplos dicha identidad es con respecto a una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más
15 preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

El anticuerpo se puede preparar usando un procedimiento de la divulgación.

En ciertos ejemplos, la cadena ligera comprende, consiste en o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 % con la misma. En ciertos ejemplos dicha identidad es con respecto a una longitud de al
20 menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

En ciertos ejemplos, la cadena pesada comprende, consiste en o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 % con la misma. En ciertos ejemplos dicha identidad es con respecto a una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más
25 preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

El inventor ha definido adicionalmente una serie de regiones marco conservadas (FR) que se pueden combinar con regiones determinantes de la complementariedad (CDR) para formar dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras humanizados. Cada uno de los dominios de cadenas pesadas y ligeras humanas tiene 4 regiones marco conservadas, denominadas FR1, FR2, FR3 y FR4.
30

En consecuencia, también se proporciona un anticuerpo neutralizante o un fragmento de unión a antígeno Del mismo que es capaz de unirse de forma específica al factor de crecimiento nervioso humano (NGF) en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende al menos una de:

35 una región marco conservada FR1 que consiste en o que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60,
una región marco conservada FR2 que consiste en o que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61,
una región marco conservada FR3 que consiste en o que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID
40 NO: 62, y
una región marco conservada FR4 que consiste en o que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63,

y/o una región variable de cadena pesada que comprende al menos una de:

45 una región marco conservada FR1 que consiste en o que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64,
una región marco conservada FR2 que consiste en o que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65,
una región marco conservada FR3 que consiste en o que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66, y
50 una región marco conservada FR4 que consiste en o que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67.

En ciertos ejemplos, la cadena ligera comprende todas las cadenas ligeras de FR1, FR2, FR3 y FR4 y/o la cadena pesada comprende todas las cadenas pesadas de FR1, FR2, FR3 y FR4.

55 En ciertos ejemplos, el anticuerpo o fragmento de unión de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente se une de forma específica al NGF humano con una afinidad de unión que tiene una constante de disociación en equilibrio (K_D) de 1×10^{-8} o inferior.

En ciertos ejemplos, el anticuerpo o fragmento de unión de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente inhibe la capacidad del NGF humano para unirse al p75 o los receptores de NGF humano de TrkA.

De preferencia, el anticuerpo o fragmento de unión de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente es no inmunogénico en seres humanos.

- 5 Por lo general el anticuerpo de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente comprende dominios constantes de cadena ligera y/o pesada obtenidos a partir de una inmunoglobulina obtenida a partir de un ser humano.

10 En ciertos ejemplos, el fragmento de unión de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente se selecciona entre el grupo que consiste en un fragmento de anticuerpo de Fv de una sola cadena (scFv), un fragmento de anticuerpo Fab, un fragmento de anticuerpo Fab' y un fragmento de anticuerpo F(ab')₂.

En diversos aspectos adicionales, la presente divulgación se extiende a un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno de la divulgación.

15 En consecuencia, además un aspecto adicional de la divulgación proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente.

En ciertos ejemplos, el polinucleótido codifica el dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-NGF o fragmento de unión a antígeno que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 % con la misma.

20 También se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-NGF o fragmento de unión a antígeno que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 % con la misma.

En ciertos ejemplos, el polinucleótido codifica el dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-NGF o fragmento de unión a antígeno que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 % con la misma.

25 También se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica la cadena pesada de un anticuerpo anti-NGF o fragmento de unión a antígeno que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 % con la misma.

En ciertos ejemplos, el ácido nucleico aislado comprende adicionalmente un ácido nucleico que codifica una o más secuencias reguladoras unidas al mismo de forma operativa.

30 En un aspecto adicional se proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o ligera o una cadena pesada y/o ligera de la divulgación. En ciertos ejemplos el vector de expresión comprende adicionalmente una o más secuencias reguladoras. En ciertos ejemplos el vector es un plásmido o un vector retroviral.

35 Además un aspecto adicional proporciona una célula huésped que incorpora el vector de expresión del aspecto de la divulgación mencionado anteriormente. Un aspecto adicional de la divulgación proporciona una célula huésped que produce el anticuerpo de cualquiera de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente.

40 Además un aspecto adicional de la divulgación proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo neutralizante del NGF humanizado, procedimiento que comprende la etapa de cultivar la célula huésped del aspecto de la divulgación mencionado anteriormente para permitir que la célula exprese el anticuerpo neutralizante del NGF humanizado.

45 Además un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo neutralizante del NGF caninizado de acuerdo con la divulgación que comprende las etapas de expresar uno o más de los polinucleótidos / ácidos nucleicos o vectores de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente que expresan las cadenas ligeras y/o pesadas de los anticuerpos de la divulgación en una célula huésped adecuada, recuperar los polipéptidos expresados, que se pueden expresar juntos en una célula huésped, o por separado en diferentes células huésped, y aislar anticuerpos.

En ciertos ejemplos, se proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la divulgación y al menos un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 Además un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona el uso del anticuerpo o fragmento de unión, ácido nucleico, composición farmacéutica o vector de expresión de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad, tales como artritis, o para el tratamiento, prevención de la mejora del dolor, tal como dolor asociado con enfermedad (por ejemplo, dolor neuropático, dolor post-operatorio, dolor crónico, dolor oncológico, etc). En diversos aspectos

adicionales, la presente divulgación se extiende al uso del anticuerpo o fragmento de unión de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente en procedimientos terapéuticos y de diagnóstico.

Además un aspecto adicional de la divulgación se refiere a la administración del anticuerpo o fragmento de unión, ácido nucleico, composición farmacéutica o vector de expresión de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente a un sujeto, en particular un sujeto mamífero, para el tratamiento o prevención de una enfermedad (por ejemplo, artritis) o dolor.

En ciertos ejemplos, la enfermedad es una afección causada por, asociada con o que da como resultado un aumento de la sensibilidad con respecto al factor de crecimiento nervioso (NGF). En ciertos ejemplos, la enfermedad se refiere a un tumor inducido para proliferar por NGF (por ejemplo, un osteosarcoma).

En ciertos ejemplos, los procedimientos de la divulgación mencionados anteriormente comprenden adicionalmente la etapa de coadministrar al menos un agente adicional que puede aumentar y/o complementar la eficacia del anticuerpo anti-NGF de la divulgación. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede coadministrar junto con al menos un analgésico, AINE, opioide, corticosteroide, esteroide, hialuronano o ácido hialurónico.

Además en un aspecto adicional se proporciona una línea celular, o un derivado o célula de progenie de la misma, que produce anticuerpos monoclonales neutralizantes de anti-NGF humano, o fragmentos del mismo de acuerdo con la divulgación.

Además un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona un kit para el tratamiento del dolor en seres humanos, o para el tratamiento de una afección asociada con dolor, o para el tratamiento, mejora o inhibición del dolor asociado con osteoartritis, artritis reumatoide e inflamación, que comprende un anticuerpo anti-NGF de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente e instrucciones para uso del mismo.

Además un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona un kit de diagnóstico para la detección de un anticuerpo monoclonal anti-NGF humano en fluidos *in vitro*, *ex vivo* y *in vivo*, para uso en la determinación de la concentración de dicho anticuerpo. El kit puede comprender cualquiera de los anticuerpos de la divulgación o un fragmento de unión del mismo. El kit puede comprender instrucciones para uso del mismo.

Un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona un anticuerpo neutralizante o un fragmento de unión a antígeno del mismo que es capaz de unirse de forma específica al factor de necrosis tumoral canino (TNF) en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 % con la misma Y/o una región variable de cadena pesada que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 % con la misma. En ciertos ejemplos dicha identidad es con respecto a una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

El anticuerpo se puede preparar usando un procedimiento de la divulgación. Por lo general el anticuerpo de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente comprende dominios constantes de cadena ligera y/o cadena pesada obtenidos a partir de una inmunoglobulina obtenida a partir de un canino. En ciertos ejemplos, la cadena pesada comprende, consiste en o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 19, 20 o 21, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 % con la misma. En ciertos ejemplos dicha identidad es con respecto a una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

En ciertos ejemplos, el anticuerpo o fragmento de unión de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente se une de forma específica al TNF canino con una afinidad de unión que tiene una constante de disociación en equilibrio (K_D) de 1×10^{-8} o inferior. De preferencia, el anticuerpo o fragmento de unión de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente es no inmunogénico en caninos.

En ciertos ejemplos, el fragmento de unión de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente se selecciona entre el grupo que consiste en un fragmento de anticuerpo de Fv de una sola cadena (scFv), un fragmento de anticuerpo Fab, un fragmento de anticuerpo Fab' y un fragmento de anticuerpo F(ab')₂.

En diversos aspectos adicionales, la presente divulgación se amplía un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno de la divulgación.

En consecuencia, además un aspecto adicional de la divulgación proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente.

En ciertos ejemplos, el polinucleótido codifica el dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TNF o fragmento de unión a antígeno que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 % con la misma.

En ciertos ejemplos, el ácido nucleico aislado comprende adicionalmente un ácido nucleico que codifica una o más secuencias reguladoras unidas al mismo de forma operativa. En un aspecto adicional se proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o ligera o una cadena pesada y/o ligera de la divulgación. En ciertos ejemplos el vector de expresión comprende adicionalmente una o más secuencias reguladoras. En ciertos ejemplos el vector es un plásmido o un vector retroviral. Además un aspecto adicional proporciona una célula huésped que incorpora el vector de expresión del aspecto de la divulgación mencionado anteriormente. Un aspecto adicional de la divulgación proporciona una célula huésped que produce el anticuerpo de cualquiera de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente.

Además un aspecto adicional de la divulgación proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo neutralizante de TNF caninizado, procedimiento que comprende la etapa de cultivar la célula huésped del aspecto de la divulgación mencionado anteriormente para permitir que la célula exprese el anticuerpo neutralizante de TNF caninizado.

Además un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo neutralizante de TNF de acuerdo con la divulgación que comprende las etapas de expresar uno o más de los polinucleótidos / ácidos nucleicos o lectores de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente que expresan las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos de la divulgación en una célula huésped adecuada, recuperando los polipéptidos expresados, que se pueden expresar juntos en una célula huésped, o por separado en diferentes células huésped, y aislar anticuerpos.

En ciertos ejemplos, se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión de la divulgación y al menos un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Además un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona el uso del anticuerpo o fragmento de unión, ácido nucleico, composición farmacéutica o vector de expresión de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad, en particular cualquier afección causada por, asociada con o que da como resultado un aumento de la expresión del TNF canino o un aumento de la sensibilidad hacia TNF en un canino. En diversos aspectos adicionales, la presente divulgación se extiende al uso del anticuerpo o fragmento de unión de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente en procedimientos terapéuticos y de diagnóstico.

Además un aspecto adicional de la divulgación se refiere a la administración del anticuerpo o fragmento de unión, ácido nucleico, composición farmacéutica o vector de expresión de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente a un canino, para el tratamiento o prevención de una enfermedad.

Además en un aspecto adicional se proporciona una línea celular, o un derivado o célula de progenie de la misma, que produce anticuerpos monoclonales neutralizantes de anti-TNF canino, o fragmentos del mismo de acuerdo con la divulgación.

Un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona un anticuerpo neutralizante o un fragmento de unión a antígeno del mismo que es capaz de unirse de forma específica al factor de crecimiento nervioso (NGF) canino, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 % con la misma y/o una región variable de cadena pesada que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 % con la misma. En ciertos ejemplos dicha identidad es con respecto a una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

El anticuerpo se puede preparar usando un procedimiento de la divulgación.

En ciertos ejemplos, la cadena ligera comprende, consiste en o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 % con la misma. En ciertos ejemplos dicha identidad es con respecto a una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

En ciertos ejemplos, la cadena pesada comprende, consiste en o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 % con la misma. En ciertos ejemplos dicha identidad es con respecto a una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

- En ciertos ejemplos, el anticuerpo o fragmento de unión de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente se une de forma específica al NGF canino con una afinidad de unión que tiene una constante de disociación en equilibrio (K_D) de 1×10^{-8} o inferior. En ciertos ejemplos, el anticuerpo o fragmento de unión de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente inhibe la capacidad del NGF canino para unirse al p75 o a los receptores de NGF canino TrkA. De preferencia, el anticuerpo o fragmento de unión de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente es no inmunogénico en caninos.
- 5 Por lo general el anticuerpo de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente comprende dominios constantes de cadena ligera y/o cadena pesada obtenidos a partir de una inmunoglobulina obtenida a partir de un canino.
- 10 En ciertos ejemplos, el fragmento de unión de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente se selecciona entre el grupo que consiste en un fragmento de anticuerpo de Fv de una sola cadena (scFv), un fragmento de anticuerpo Fab, un fragmento de anticuerpo Fab' y un fragmento de anticuerpo F(ab')₂.
- En diversos aspectos adicionales, la presente divulgación se extiende a un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno de la divulgación.
- 15 En consecuencia, además un aspecto adicional de la divulgación proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente.
- En ciertos ejemplos, el polinucleótido codifica el dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-NGF o fragmento de unión a antígeno que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 % con la misma.
- 20 También se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-NGF o fragmento de unión a antígeno que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 % con la misma.
- En ciertos ejemplos, el polinucleótido codifica el dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-NGF o fragmento de unión a antígeno que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 % con la misma.
- 25 También se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica la cadena pesada de un anticuerpo anti-NGF o fragmento de unión a antígeno que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 % con la misma.
- 30 En ciertos ejemplos, el ácido nucleico aislado comprende adicionalmente un ácido nucleico que codifica una o más secuencias reguladoras unidas al mismo de forma operativa.
- En un aspecto adicional se proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o ligera o una cadena pesada y/o ligera de la divulgación. En ciertos ejemplos el vector de expresión comprende adicionalmente una o más secuencias reguladoras. En ciertos ejemplos el vector es un plásmido o un vector retroviral.
- 35 Además un aspecto adicional proporciona una célula huésped que incorpora el vector de expresión del aspecto de la divulgación mencionado anteriormente. Un aspecto adicional de la divulgación proporciona una célula huésped que produce el anticuerpo de cualquiera de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente.
- Además un aspecto adicional de la divulgación proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo neutralizante del NGF caninizado, procedimiento que comprende la etapa de cultivar la célula huésped del aspecto de la divulgación mencionado anteriormente para permitir que la célula exprese el anticuerpo neutralizante del NGF caninizado.
- 40 Además un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo neutralizante del NGF caninizado de acuerdo con la divulgación que comprende las etapas de expresar uno o más de los polinucleótidos / ácidos nucleicos o vectores de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente que expresan las cadenas ligeras y/o pesadas de los anticuerpos de la divulgación en una célula huésped adecuada, recuperar los polipéptidos expresados, se pueden expresar juntos en una célula huésped, o por separado en diferentes células huésped, y aislar los anticuerpos.
- 45 En ciertos ejemplos, se proporciona un anticuerpo un fragmento de unión de la divulgación y al menos un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 50 Además un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona el uso del anticuerpo o fragmento de unión, ácido nucleico, composición farmacéutica o vector de expresión de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad, tal como artritis, o para el tratamiento, prevención o mejora de dolor, tal como dolor asociado con una enfermedad (por

ejemplo, dolor neuropático, dolor post-operatorio, dolor crónico, dolor oncológico, etc) en un canino. En diversos aspectos adicionales, la presente divulgación se extiende al uso del anticuerpo o fragmento de unión de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente en procedimientos terapéuticos y de diagnóstico.

- 5 Además un aspecto adicional de la divulgación se refiere a la administración del anticuerpo o fragmento de unión, ácido nucleico, composición farmacéutica o vector de expresión de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente a un canino para el tratamiento o prevención de una enfermedad (por ejemplo artritis) o dolor.

En ciertos ejemplos, la enfermedad es una afección causada por, asociada con lo que da como resultado un aumento de la sensibilidad al factor del crecimiento nervioso (NGF). En ciertos ejemplos, la enfermedad se refiere a un tumor inducido para proliferar por NGF (por ejemplo, un osteosarcoma).

- 10 En ciertos ejemplos, los procedimientos de la divulgación mencionados anteriormente comprenden adicionalmente la etapa de coadministración de al menos un agente adicional que puede aumentar y/o complementar la eficacia del anticuerpo anti-NGF de la divulgación. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede coadministrar junto con al menos un analgésico, AINE, opioide, corticosteroide, esteroide, hialuronano o ácido hialurónico.

- 15 Además en un aspecto adicional se proporciona una línea celular, o un derivado o célula de progenie de la misma, que produce anticuerpos monoclonales neutralizantes de anti-NGF canino, o fragmentos del mismo de acuerdo con la divulgación.

- 20 Además un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona un kit para el tratamiento de dolor en caninos, o para el tratamiento de una afección asociada con dolor, o para el tratamiento, mejora o inhibición del dolor asociado con osteoartritis, artritis reumatoide e inflamación, que comprende un anticuerpo anti-NGF de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la divulgación mencionados anteriormente e instrucciones para el uso del mismo.

- 25 Además un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona un kit de diagnóstico para la detección de un anticuerpo monoclonal anti-NGF canino en fluidos *in vitro*, *ex vivo* y *in vivo*, para uso para determinar la concentración de dicho anticuerpo. El kit puede comprender cualquiera de los anticuerpos de la divulgación o un fragmento de unión de los mismos. El kit puede comprender instrucciones para uso del mismo.

Breve descripción de las figuras

- La Figura 1 muestra un alineamiento de las secuencias de región marco conservada FR1 a FR4 de la cadena ligera del anticuerpo α D11 de rata con versiones específicas de especies canina, felina y equina (SEQ ID NO: 28 a 43).

- 30 La Figura 2 muestra un alineamiento de las secuencias de región marco conservada FR1 a FR4 de la cadena pesada del anticuerpo α D11 de rata con versiones específicas de especies canina, felina y equina (SEQ ID NO: 44 a 59).

- La Figura 3 muestra secuencias de aminoácidos de los dominios variables de cadena pesada (SEQ ID NO: 2) y ligera (SEQ ID NO: 1) de una versión canina del MAb anti-NGF α D11 y de la cadena ligera (SEQ ID NO: 7) y cadena (SEQ ID NO: 8) completas.

- 35 La Figura 4 muestra secuencias de aminoácidos de los dominios variables de cadena pesada (SEQ ID NO: 4) y ligera (SEQ ID NO: 3) de una versión felina del MAb anti-NGF α D11 y de las cadenas ligera (SEQ ID NO: 9) y pesada (SEQ ID NO: 10) completas.

- 40 La Figura 5 muestra secuencias de aminoácidos de los dominios variables de cadena pesada (SEQ ID NO: 6) y ligera (SEQ ID NO: 5) de una versión equina del MAb anti-NGF α D11 y de las cadenas ligera (SEQ ID NO: 11) y pesada (SEQ ID NO: 12) completas.

La Figura 6 muestra un gel con la expresión de versiones de formación de especies de canino, felino y equino del MAb de α D11.

- 45 La Figura 7A es un gráfico que muestra que los MAb de canino expresados y purificados con respecto al NGF canino son biológicamente activos.

La Figura 7B es un gráfico que muestra que los MAb de felino expresados y purificados con respecto al NGF felino son biológicamente activos, mientras que la Figura 7C es un gráfico que muestra que los MAb de equino expresados y purificados con respecto al NGF equino son biológicamente activos. La Figura 7D es un gráfico que compara la capacidad de los MAb de canino, felino y equino para neutralizar la actividad biológica del NGF.

- 50 La Figura 8A es un alineamiento de aminoácidos que muestra una comparación de modificaciones de la región marco conservada de cadena ligera entre una versión humanizada conocida del anticuerpo alfa D11 de rata (Pavone y col., documento WO 06/131951) y una nueva variante humanizada de α D11 (Hu Nueva - SEQ ID NO: 60-63). La Figura 8B es una comparación de modificaciones de la región marcó conservada de cadena pesada entre la versión humanizada conocida del anticuerpo alfa D11 de rata (Pavone y col., documento WO

06/131951) y la nueva variante humanizada de α D11 (Hu Nueva - SEQ ID NO: 64-67).

La Figura 9A muestra las secuencias de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 13) y cadena pesada (SEQ ID NO: 14) del nuevo anticuerpo alfa D11 humanizado de la Figura 8 - las CDR están subrayadas. La Figura 9B muestra las cadenas pesada y ligera completas (SEQ ID NO: 24 y 25) diseñadas usando los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada que se muestran en la Figura 9A. La Figura 9C muestra un ensayo de ELISA que compara un anticuerpo preparado a partir de las secuencias en la Figura 9B con un anticuerpo diseñado mediante injerto de CDR, como fue descrita anteriormente por Pavone y colaboradores. La Figura 9D muestra la inhibición de la proliferación del NGF de células TF-1 con las dos variantes humanizadas de anticuerpos monoclonales alfa D11 usados en la Figura 9C.

La Figura 10 muestra secuencias de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 15) y cadena pesada (SEQ ID NO: 16) de un anticuerpo anti-TNF caninizado basado en el humano MAb D2E7 (Salfeld y col., documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.090.382).

La Figura 11 muestra la secuencia de aminoácidos de cadena ligera kappa (SEQ ID NO: 17) de un anticuerpo anti-TNF caninizado.

La Figura 12 muestra las secuencias de aminoácidos de cadena pesada de 4 subtipos (tipos A, B, C y D de cadena pesada) de un anticuerpo anti-TNF caninizado.

La Figura 13 muestran las secuencias de aminoácidos de cadena ligera (SEQ ID NO: 22) y cadena pesada (SEQ ID NO: 23) completas de un anticuerpo anti-TNF humano-canino quimérico.

La Figura 14A muestra los resultados de anticuerpos anti-TNF caninizados (Ca) y quiméricos (Qu) coexpresados purificados usando Proteína A y analizados con SDS-PAGE, mientras que la Figura 14B muestra los resultados de un ELISA que muestra la unión de proteínas recombinantes expresadas con respecto al TNF-alfa canino. Se muestran resultados con diversas diluciones es de anticuerpos de 5 μ g/ml a 0,05 μ g/ml.

La Figura 15 muestra la inhibición de la bioactividad del TNF canino usando células 293-HEK transfectadas con la construcción pTRH1 del indicador NF-kB-EGFP. Estas células responden al TNF canino mediante fluorescencia. Los MAb tanto caninizado (Figura 15A) como quimérico (Figura 15B) inhibían la fluorescencia inducida por el TNF igualmente bien, tal como se cuantifica en la Figura 15C.

La Figura 16 muestra una comparación para un MAb caninizado adicional basándose en el clon 148 del MAb anti-TNF expresado en células CHO y purificado usando cromatografía de Proteína A (Panel A, calle izquierda). El MAb se sometió a ensayo para unión al TNF humano (Panel B) y al TNF canino (Panel C) en comparación con los MAb basados en D2E7 caninizado (Ca) y quimérico (Qu) de la Figura 14 (la unión del negativo de fondo se muestra con las flechas).

La Figura 17 muestran la cadena pesada (SEQ ID NO: 26 - ca148-HCB) y la cadena ligera (SEQ ID NO: 27 - ca148-kLC) del clon 148 del Mab caninizado.

La Figura 18 muestra que los anticuerpos monoclonales del NGF anti-canino preparados con un procedimiento de la presente invención reducen el dolor inflamatorio en perros.

Descripción detallada de la divulgación

La presente divulgación se extiende a nuevos procedimientos para diseñar y preparar una variante de un anticuerpo donante que presenta una reducción de la inmunogenicidad cuando se administra a una especie que es diferente a aquella de la que se obtiene el anticuerpo, mientras que al mismo tiempo mantiene (es decir, no disminuye) la afinidad de unión, avidez o especificidad del anticuerpo para el ligando diana. En particular la secuencia de las regiones marco conservadas del anticuerpo o un fragmento de unión a anticuerpo se evalúan y se modifican para retirar restos que no se encuentran en una posición correspondiente en una combinación de anticuerpos obtenidos a partir de la especie a la que se va a administrar el anticuerpo.

En particular, los procedimientos de la divulgación modifican el marco conservado de un anticuerpo donante (precursor) de modo que es compatible de forma óptima con el receptor pretendido cuando el receptor pretendido es una especie distinta a la del donante.

Hasta el momento en la técnica, el enfoque más comúnmente usado para desinmunizar un anticuerpo ha sido seleccionar un marco conservado compatible de la secuencia de línea germinal de una especie receptora e injertar las regiones CDR en este marco conservado. El problema con este enfoque es que el marco conservado seleccionado casi nunca es un emparejamiento perfecto para las CDR y, como resultado, la afinidad de unión al epítipo diana pretendido se reduce. A continuación se requiere una maduración por afinidad que da como resultado la introducción de aminoácidos que en ocasiones son extraños para el receptor en las posiciones en las que se introducen. La solución es el procedimiento de la presente divulgación en el que la modificación del marco conservado donante solamente se inicia cuando un aminoácido es extraño para el receptor en una posición

específica. La sustitución se elige del listado de opciones ensamblará como parte de la presente divulgación. Como resultado, que es el punto decisivo de la divulgación, esencialmente no existe modificación estructural del marco conservado donante y por lo tanto esencialmente no hay distorsión de la conformación de las CDR, pero al mismo tiempo no hay "auto" aminoácidos dentro del marco conservado y la inmunoglobulina resultante carece de epítipo este marco conservado que son extraños en la especie diana. La metodología se puede usar para modificar una inmunoglobulina para administración a cualquier especie diana deseada.

En el estudio más amplio de variedad de secuencia de inmunoglobulina hasta la fecha, Glanville y colaboradores (2009) estudiaron la composición de aminoácido de casi 100.000 ADNc de cadena pesada y ligera amplificados a partir de la IgM no tratada previamente de 654 donantes humanos. Un 95 % de las secuencias se diferenciaban de la línea germinal en hasta 30 anulaciones cada una. Se demostró que las CDR 1 y 2 que mutan solamente a través de mutación somática permanecían inalteradas a partir del ADN de la línea germinal solamente un 17 % de las veces y un 78 % de las secuencias de CDR 1 y 2 tenían entre 1 y 6 diferencias de aminoácidos. Este estudio no describía a la mutación de restos de marco conservado de no CDR, descritos en las Tablas que se muestran en el presente documento. dado que la hipermutación somática se produce a través de un mecanismo de rectificación de ADN propenso a error, es improbable que la tasa de mutación *per se* sea diferente entre la observada para CDR 1 o 2 y el resto de las secuencias de marco conservadas y, además, una selección secundaria profunda después de la hipermutación somática en el repertorio experimentado por antígeno durante la maduración de la respuesta inmunológica podría permitir una diversidad de aminoácidos adicionales en regiones marco conservadas. Por estas razones, es probable que la diversidad observada en las colecciones de secuencias de IgG humanas, caninas, equinas y felinas que se describen en el presente documento sea representativa de secuencias de IgG circulante. De forma sorprendente, existe una superposición considerable entre los aminoácidos codificados en posiciones de marco conservadas de "Kabat" homólogos de inmunoglobulinas de cada hipermutación post-somática de la especie y, en consecuencia, esto reduce los cambios necesarios para convertir de una especie a otra de acuerdo con el procedimiento de la presente divulgación.

Como un ejemplo de la presente divulgación y siguiendo una amplia experimentación, el intento ha tomado el anticuerpo del TNF anti-humano D2E7 y el anticuerpo del NGF de rata anti-ratón α D11, que no se sabía que se unían al TNF alfa canino o NGF canino, y de forma sorprendente ha usado estos como una base para producir anticuerpos no inmunogénico es adecuados para su uso en caninos. Se muestra que los anticuerpos no inmunogénicos resultantes, que no se producen usando técnicas convencionales de injerto de CDR, presentan una unión por afinidad elevada al TNF y NGF caninos respectivamente. Además, los anticuerpos se han diseñado de modo que el marco y las regiones constantes incorporan solamente restos presentes en moléculas de IgG de canino de modo que cuando se administran a un canino, es improbable que se produzcan xenoanticuerpos frente a las mismas. En consecuencia, los anticuerpos caninizados de la divulgación son adecuados para administración a largo plazo para el tratamiento de enfermedades en caninos. Del mismo modo, los anticuerpos NGF felinizados, humanizados y equinizados de la divulgación son adecuados para administración a largo plazo para el tratamiento de enfermedades en felinos, seres humanos y equinos respectivamente.

El procedimiento para generar los dominios variables de cadena pesada y ligera para los anticuerpos de la divulgación que ha usado el inventor da como resultado el reemplazo de restos de aminoácidos donantes específicos conocidos por ser extraños para la diana (por ejemplo, caninos) en esa posición con un resto diana (por ejemplo, canino) que, basándose en el análisis del inventor, mantendrá la conformación de las regiones CDR y por lo tanto mantendrá la especificidad y la avidez de unión, a la vez que se reduce la presencia de epítipo se inmunogénico se pueden dar como resultado anticuerpos neutralizantes que se generan frente al anticuerpo si se fuera a administrar a la diana (por ejemplo, caninos) en una forma no alterada. De forma específica, el procedimiento para preparar anticuerpos de la divulgación

(conocido como PETización) comprende la evaluación de la secuencia de las regiones marco conservadas de un anticuerpo donante (por ejemplo, ser humano) para idoneidad para su administración a una diana (por ejemplo, canina) comparando la secuencia de las regiones marco conservadas del anticuerpo donante con la secuencia de un anticuerpo o una combinación de anticuerpos obtenidos a partir de la diana (por ejemplo, canina). Aunque la comparación se puede realizar entre la secuencia donante y un solo miembro de la secuencia diana, será evidente que la comparación con una combinación de secuencias diana es preferente porque esta ampliará el número de opciones naturales en cada posición de Kabat en la especie diana. Esto no solamente aumentará la posibilidad de un "emparejamiento" entre el donante y la diana, sino que también ampliará las opciones para reemplazo cuando no exista emparejamiento. Como resultado, se podrá elegir un reemplazo con características tan similares como sea posible a las del donante. Cuando la secuencia donante y la secuencia canina se diferencian en cualquier número de Kabat o posición correspondiente, la secuencia donante se modifica para sustituir el resto de aminoácido en cuestión con un resto de aminoácido que se sabe que es natural en esa posición en la diana (por ejemplo, caninos).

Cuando se requiere sustitución de un resto de aminoácido presente en una región marco conservada de la inmunoglobulina donante, por lo general esto se inicia usando el principio de sustitución conservativa en la que un resto de aminoácido se reemplaza con un resto de aminoácido que es natural en esa posición de Kabat en la diana (por ejemplo, un canino) y está tan relacionada como sea posible respecto al tamaño, carga e hidrofobia con el aminoácido que se está sustituyendo en la secuencia tonante. La intención es elegir un reemplazo que podría causar ninguna, o al menos solamente mínima, perturbación o alteración en la estructura tridimensional del anticuerpo

donante. En ciertas situaciones, no habrá una opción evidente y cada elección tendrá beneficios e inconvenientes. Una decisión final puede requerir un modelado tridimensional o incluso la expresión de diversas secuencias alternativas. Sin embargo, generalmente, a la disponibilidad de una preferencia evidente. Como resultado de este procedimiento, un cambio en la secuencia donante solamente se realiza cuando ese resto pudiera ser extraño en la diana y el reemplazo del aminoácido está tan estrechamente relacionado como sea posible con el que reemplaza. Por lo tanto, se evita la creación de epítomos extraños, pero la estructura tridimensional general se conserva y como resultado, también se conservan la afinidad y la especificidad. Los ejemplos usados a modo de ejemplo de este aspecto de la divulgación incluyen:

- secuencias de cadena ligera SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 25, 27 y 71.
- secuencias de cadena pesada SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 24, 26, 68, 69 y 70.

Producción de anticuerpo

Los anticuerpos y miembros de unión de la divulgación se pueden producir de forma completa o parcial mediante síntesis química. Por ejemplo, los anticuerpos y miembros de unión de la divulgación se pueden preparar mediante técnicas que son bien conocidas para la persona con experiencia en la materia, tales como procedimientos de síntesis peptídica en fase líquida convencional, o mediante síntesis peptídica en fase sólida. Como alternativa, los anticuerpos y miembros de unión se pueden preparar en solución usando técnicas de síntesis peptídica en fase líquida, o adicionalmente con una combinación de química de fase sólida, fase líquida y solución.

La presente divulgación se extiende adicionalmente a la producción de los anticuerpos o miembros de unión de la divulgación mediante expresión de un ácido nucleico que codifica al menos un aminoácido que comprende un anticuerpo de la divulgación en un sistema de expresión adecuado, de modo que se puede codificar un péptido o polipéptido deseado. Por ejemplo, se puede expresar un primer ácido nucleico que codifica la cadena ligera del aminoácido y un segundo ácido nucleico que codifica una cadena pesada del aminoácido para proporcionar un anticuerpo de la presente divulgación.

En consecuencia, en ciertos aspectos adicionales de la divulgación, se proporcionan ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos que forman los anticuerpos o miembros de unión de la presente divulgación.

Por lo general, los ácidos nucleicos que codifican las secuencias de aminoácidos que forman anticuerpos o miembros de unión de la presente divulgación se pueden proporcionar en una forma aislada o purificada, o se pueden proporcionar en una forma que está sustancialmente libre de material que puede estar asociado de forma natural con los mismos, con la excepción de una o más secuencias reguladoras. Los ácidos nucleicos expresan un anticuerpo o miembro de unión de la divulgación pueden ser total o parcialmente sintéticos y pueden incluir, pero no se limitan a, ADN, ADNc y ARN.

La persona con experiencia en la materia puede preparar fácilmente las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o miembros de unión de la divulgación usando técnicas que son bien conocidas para los expertos en la materia, tales como las que se describen en Sambrook y col. "Molecular Cloning", A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Volúmenes 1-3, 2001 (ISBN-0879695773), y en Ausubel y col. Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, 4ª Edición, 1999 (ISBN - 0471250929). Dichas técnicas incluyen (i) el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar muestras de ácido nucleico, (ii) síntesis química, o (iii) preparación de secuencias de ADNc. Los anticuerpos o miembros de unión que codifican ADN de la divulgación se pueden generar y usar de cualquier modo adecuado conocido por los expertos en la materia, incluyendo tomar ADN codificante, identificar sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de cualquier lado de la porción a expresar, y recortar dicha porción del ADN. A continuación la porción escindida se puede unir de forma operativa a un promotor adecuado y se puede expresar en un sistema de expresión adecuado, tal como un sistema de expresión disponible en el mercado. Como alternativa, las porciones relevantes de ADN se pueden amplificar usando cebadores de PCR adecuados. Las modificaciones a las secuencias de ADN se pueden realizar usando un mutagénesis dirigida al sitio.

Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o miembros de unión de la divulgación se pueden proporcionar como construcciones en forma de un plásmido, vector, casete de transcripción o expresión que comprende al menos un ácido nucleico como se ha descrito anteriormente. La construcción puede estar comprendida dentro de una célula huésped recombinante que comprende una o más construcciones como se ha mencionado anteriormente. La expresión se puede conseguir de forma conveniente mediante cultivo, en condiciones apropiadas, de células huésped recombinantes que contienen secuencias de ácidos nucleicos adecuadas. Después de la expresión, el anticuerpo o fragmentos de anticuerpo se pueden aislar y/o purificar usando cualquier técnica adecuada, y a continuación se pueden usar cuando sea apropiado.

Se conocen bien algunos sistemas para clonación y expresión de un polipéptido en una diversidad de células huésped diferentes. Las células huésped adecuadas incluyen sistemas de bacteria, células de mamífero, levadura, insecto y baculovirus. Las líneas de células de mamífero disponibles en la técnica para expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster y células de mieloma de ratón NS0. un huésped bacteriano común, preferente es *E. coli*. La expresión de anticuerpos

y fragmentos de anticuerpo en células procariotas tales como *E. coli* está bien establecida en la técnica. La expresión en células eucariotas en cultivo también está disponible para los expertos en la materia como una opción para producción de un miembro de unión.

Las técnicas generales para la producción de anticuerpos son bien conocidas para la persona con experiencia en la materia, con procedimientos de ese tipo siendo discutidos en, por ejemplo, Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495-497; documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.376.110; Harlow y Lane, Antibodies: a Laboratory Manual, (1988) Cold Spring Harbor. En las referencias mencionadas anteriormente y también en, por ejemplo, el documento de Patente Europea con Número 0.368.684 se describen técnicas para la preparación de anticuerpo recombinante.

En ciertos ejemplos de la divulgación, se usan ácidos nucleicos recombinantes que comprenden una inserción que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o un dominio variable de cadena ligera de anticuerpos o miembros de unión. Por definición, los ácidos nucleicos de ese tipo comprenden ácidos nucleicos monocatenarios, ácidos nucleicos bicatenarios que consisten en dichos ácidos nucleicos codificantes y ácidos nucleicos complementarios con los mismos, o estos propios ácidos nucleicos (monocatenarios).

Además, los ácidos nucleicos que codifican un dominio variable de cadena pesada y/o un dominio variable de cadena ligera de anticuerpos pueden ser ácidos nucleicos sintetizados por vía enzimática o por vía química que tienen la auténtica secuencia de codificación para un dominio variable de cadena pesada de origen natural y/o para el dominio variable de cadena ligera, o un mutante del mismo.

Un anticuerpo de la divulgación se puede producir con medios recombinantes, no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína madura o polipéptido. La secuencia señal heteróloga seleccionada es preferentemente una que es reconocida y procesada (Es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. para células huésped procariotas que no reconocen Ni procesan una secuencia señal de anticuerpo nativo, la secuencia señal se sustituye con una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, entre el grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp y líderes de enterotoxina II estables al calor.

El término "aislado", cuando se usa en referencia a los anticuerpos de la divulgación, o a miembros de unión obtenidos a partir de los mismos, o polipéptidos que codifican los mismos, se refiere al estado en el que dichos anticuerpos, miembros de unión o ácidos nucleicos (polinucleótidos) se proporcionan en una forma aislada y/o purificada, es decir, que se han separado, aislado o purificado a partir de su entorno natural, y se proporcionan en una forma sustancialmente pura u homogénea, o, en el caso del ácido nucleico, libre o sustancialmente libre de ácido nucleico o genes de un origen distinto al de la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida. En consecuencia, los anticuerpos aislados, miembros de unión y ácidos nucleicos aislados de este estarán libres o sustancialmente libres de material con el que se asocian de forma natural, tal como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su entorno natural, o el entorno en el que se preparan (por ejemplo, cultivo celular) cuando una preparación de ese tipo es mediante tecnología de ADN recombinante practicada *in vitro* o *in vivo*.

Los anticuerpos, miembros de unión y ácidos nucleicos se pueden formular con diluyentes o adyuvantes y además, con fines prácticos, se puede considerar que se proporcionan en una forma aislada. Por ejemplo los anticuerpos y miembros de unión se pueden mezclar con gelatina u otros vehículos si se usan para revestir placas de microtitulación para su uso en inmunoensayos, o se mezclaran con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se usan en diagnóstico o terapia. Los anticuerpos o miembros de unión pueden estar glicosilados, ya sea de forma natural o mediante sistemas de células eucariotas heterólogas (por ejemplo células CHO o NSO), o pueden estar (por ejemplo, si se producen mediante expresión en una célula procariota) sin glicosilar.

Las preparaciones heterogéneas que comprenden anticuerpos de la divulgación también forman parte de la divulgación. Por ejemplo, las preparaciones de ese tipo pueden ser mezclas de anticuerpos con cadenas pesadas de longitud completa y cadenas pesadas que carecen de la lisina C-terminal, con diversos grados de glucosilación y/o con aminoácidos derivatizados, tal como ciclado de un ácido glutámico N-terminal para formar un resto de ácido piroglutámico.

Definiciones

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tiene significado que normalmente entiende una persona que tiene experiencia en la materia en el campo de la presente divulgación. El significado y alcance de los términos debería ser evidente, sin embargo, en el caso de cualquier ambigüedad, las definiciones que se proporcionan en el presente documento prevalecen sobre cualquier definición de diccionario o extrínseca.

A través de la memoria descriptiva, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, se entenderá que los términos "comprender" o "incluir", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", "incluye" o "que incluye" implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicados, pero no la exclusión de cualquier

otro número entero o grupo de números enteros.

Como se usa en el presente documento, los términos tales como "un", "uno" y "el" incluyen referentes en singular y en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un agente activo" o "un agente farmacológicamente activo" incluye un solo agente así como dos o más agentes activos diferentes en combinación, mientras que las referencias a "un vehículo" incluyen mezclas de dos o más vehículos así como un solo vehículo, y similares. además, a menos que el contexto requiera de otro modo, los términos en singular incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular.

La expresión "aminoácido correspondiente" se refiere a un resto de aminoácido que se encuentra en una posición idéntica (es decir, se encuentran uno frente al otro) cuando dos o más secuencias de aminoácidos se alinean para permitir una identidad de secuencias máxima entre las secuencias. Los restos de aminoácido en posiciones correspondientes tienen la misma numeración de Kabat. En particular, las secuencias de aminoácidos de regiones marco conservadas de diferentes anticuerpos pueden estar alineadas o la secuencia de aminoácidos de una secuencia de región marco conservada de un anticuerpo se puede comparar con una combinación de restos de aminoácidos de región marco conservada específica posicional obtenida a partir de una pluralidad de inmunoglobulinas de una especie en parte una. La persona con experiencia en la materia conoce bien procedimientos para alinear y numerar secuencias de anticuerpos se desvelan en Kabat y col. (Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H., Gottesman, K. y Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición. Publicación del NIH N.º 91-3242).

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

La expresión "región constante (CR)" como se usa en el presente documento, se refiere a la porción de la molécula de anticuerpo que proporciona funciones efectoras. En la presente divulgación, las regiones constantes por lo general significan regiones constantes de la especie diana, es decir, de las regiones constantes de los anticuerpos objeto sometidos a especiación se obtienen a partir de inmunoglobulinas de la especie diana. Por ejemplo, en anticuerpos de canino la región constante de cadena pesada se puede seleccionar a partir de cualquiera de cuatro isotipos A, B, C o D.

La expresión "anticuerpo quimérico" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo que contiene secuencias obtenidas a partir de dos anticuerpos diferentes, que por lo general son de especies diferentes. Más generalmente, los anticuerpos quiméricos comprenden dominios variables obtenidos a partir de una especie donante que se une de forma específica a un epítipo diana y dominios constantes obtenidos a partir de anticuerpos obtenidos a partir de la especie diana a la que se va a administrar el anticuerpo.

El término "inmunogenicidad" como se usa en el presente documento se refiere a una medición de la capacidad de una proteína de dirección o resto terapéutico para provocar una respuesta inmune (humoral o celular) cuando se administra a un receptor. La presente divulgación está relacionada con la inmunogenicidad de los anticuerpos objeto sometidos a especiación. De preferencia los anticuerpos de la presente divulgación no tienen inmunogenicidad, es decir, que no se generarán anticuerpos neutralizantes frente a los mismos cuando se administran a una especie diana.

La expresión "consiste esencialmente en" o "que consiste esencialmente en" como se usa en el presente documento significa que un polipéptido puede tener características o elementos adicionales más allá de los descritos con la condición de que tales características por elementos adicionales no influyan de forma material en la capacidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo para tener especificidad de unión a la diana deseada. Es decir, el anticuerpo o fragmentos de anticuerpo que comprenden los polipéptidos pueden tener características o elementos adicionales que no interfieren con la capacidad del anticuerpo o fragmentos de anticuerpo para unirse a la diana deseada y antagonizar su actividad funcional. Las modificaciones de ese tipo se pueden introducir en la secuencia de aminoácidos para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un polipéptido que consiste esencialmente en una secuencia especificada puede contener uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos adicionales, con delección o sustituidos en cualquier extremo o en ambos extremos de la secuencia con la condición de que estos aminoácidos no interfieran con, inhiban, bloqueen o interrumpan el papel del anticuerpo o fragmento en la unión a la diana deseada y que secuestren su función biológica. Del mismo modo, una molécula de polipéptido que contribuye a los anticuerpos antagonistas de la divulgación se puede modificar por vía química con uno o más grupos funcionales con la condición de que tales grupos funcionales no interfieran con la capacidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo para unirse a la diana deseada y antagonicen su función.

La presente divulgación se describirá a continuación con referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan con el fin de ilustración y no se pretende su interpretación como limitantes de la presente divulgación.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Conversión de anticuerpos de murino para anticuerpos caninos, felinos, equinos y humanos

Las secuencias de proteínas de cadena pesada (VH) y ligera (VL) de dominio variable de inmunoglobulina gamma (IgG) de origen humano, felino, canino y equino, obtenidas a partir de bases de datos y publicaciones de secuencias de ADNc expresados disponibles al público, se alinearon en grupos de acuerdo con especies usando el programa ClustalW que usa la Matriz de Costo BLOSUM y el costo abierto de Hueco de 10 y el costo extendido de Hueco de 0,1. Las secuencias de mala calidad de baja homología se sometieron a delección a partir del alineamiento para evitar huecos engañosos en regiones marco conservadas. Las regiones marco conservadas y CDR se identificaron de acuerdo con la nomenclatura de Kabat y los restos de aminoácidos en cada posición de la región marco conservada de Kabat se identificaron y se tabularon de acuerdo con la cadena ligera y pesada (Tablas 1-8). Aunque la tabla de la cadena ligera se construye a partir de una colección de cadenas ligeras kappa, se pueden construir tablas similares a partir de cadenas ligeras lambda para uso en la conversión de cadenas ligeras lambda De una especie a otra de acuerdo con los procedimientos que se describen en la presente patente.

La conservación de la secuencia entre las secuencias de IgG de las cuatro especies en las posiciones Q6, C23, W35, P44, Y83, C85 y G98 de la región marco conservada de cadena ligera, y en las posiciones G8, C22, W36, R38, D86, Y90, C92 y G106 de la región marco conservada de cadena pesada sugieren que existe una contaminación mínima de los datos de los aminoácidos combinados establecidos mediante errores sencillos de secuencias de nucleótidos en el conjunto de datos de partida. La composición de la combinación de restos presentes En cada región marco conservada en las Tablas 1-8 se determina media de los datos disponibles para cada especie. La determinación de secuencias de aminoácidos adicionales para inmunoglobulinas obtenidas a partir de cualquiera de las especies analizadas podría diversificar adicionalmente la composición de elecciones en cualquiera de las elecciones en las Tablas. Esto es particularmente cierto para las cadenas ligeras variables obtenidas a partir de felino para las que en la actualidad solamente hay disponible un ejemplo en la bibliografía y para las que el inventor Ha generado un nuevo conjunto mediante amplificación con reacción en cadena de la polimerasa cebada con oligonucleótido degenerado de secuencias de cadena ligera de IgG de ARNm de tejido de bazo felino, como se muestra en las Tablas 1-8. Sin embargo, como se demostrará a continuación, las tablas actuales se pueden usar junto con la metodología que se desvela en el presente documento para producir anticuerpos que son adecuados para su administración a un número de diferentes especies.

El procedimiento de acuerdo con la divulgación usa la información que se proporciona en las Tablas 1 a 8 para comparar restos de aminoácidos que están presentes en cada posición de las regiones marco conservadas de las cadenas ligeras y/o pesadas de una inmunoglobulina donante con un resto presente en la combinación de Inmunoglobulinas obtenidas a partir de la especie diana. Si el resto de aminoácido presente en una posición específica de la región marco conservada donante no fuera un aminoácido que está presente en esa posición en la combinación de inmunoglobulinas obtenidas a partir de la especie diana, entonces el resto se sustituye con un aminoácido presente en la combinación como relevante para esa posición. Cuando se determina qué aminoácido debería reemplazar el resto sustituido en la secuencia donante, es preferente sustituir el resto donante con el resto de la combinación que es el resto homólogo más cercano. Es decir, preferentemente la sustitución es una sustitución conservativa. Si no hay disponible ningún resto homólogo, entonces el aminoácido de la combinación consenso (es decir con el aminoácido que se encuentra más comúnmente en esa posición) de la especie diana se puede elegir preferentemente a la sustitución.

Para determinar si un aminoácido sustituido se puede reemplazar con un aminoácido conservado, por lo general se puede realizar una evaluación de factores tales como, pero no limitados a, (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, y/o (c) el volumen de la cadena lateral.

Cuando se considera si un resto obtenido a partir de un aminoácido donante que no está presente en la combinación diana puede estar sustituido de forma conservativa, puede ser preferente evaluar si un aminoácido homólogo está presente basándose en los aminoácidos que se agrupan juntos de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (A. L. Lehninger, en Biochemistry, 2ª Ed., 73-75, Worth Publishers, New York (1975)). Por ejemplo, se pueden determinar los siguientes grupos: (1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M); (2) polares sin carga: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q); (3) ácidos: Asp (D), Glu (E); y (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His(H).

Como alternativa, los restos de aminoácidos se pueden dividir en grupos basándose en propiedades comunes de la cadena lateral: (1) hidrófobos: Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) ácidos: Asp, Glu; (4) básicos: His, Lys, Arg; (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones conservativas implicarán el intercambio (sustitución) de un miembro de una de estas clases por otro de esa misma clase.

A modo de ejemplo, las secuencias de dominio variable de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina donante determinadas a partir de un anticuerpo monoclonal NGF de rata anti-ratón (α D11) se alinearon con estas tablas y se diseñaron variantes caninas, equinas y felinas PETizadas y se construyeron para expresión. Los restos de la región marco conservada seleccionados para cada especie se muestran en la Figura 1 y las diferencias de la secuencia de rata donante se muestran en la Figura 2. Como se puede observar a partir de las Figuras 1 y 2, los cambios necesarios para preparar versiones caninas, felinas o equinas de α D11 son diferentes en número y tipo para cada especie.

Los dominios variables para las versiones caninas, felinas o equinas de α D11 se expresaron como anticuerpos completos mediante fusión C-terminal a dominios constantes de cada especie como se muestra en las Figuras 3, 4 y 5 (SEQ ID NO 1-6 de dominios variables, SEQ ID NO 7-12 de anticuerpos completos) y coexpresión de pares de cadena pesada y ligera en vectores de expresión transfectados en células CHO. Los sobrenadantes que contienen los padres de cadena pesada y ligera expresados como IgG completa se analizaron por SDS-PAGE y se sometieron a ensayo para su capacidad para inhibir la proliferación de células TF-1 con el factor de crecimiento nervioso en cultivo. Las cadenas pesadas y ligeras se observaron en geles de SDS-PAGE teñidos con Azul de Coomassie (Figura 6) y los sobrenadantes eran capaces de inhibir la proliferación de células TF-1 inducida por NGF (Figura 7). A modo de comparación, una muestra purificada de la variante caninizada de α D11 era eficaz para inhibir la actividad de NGF como una versión humanizada (Pavone y col., documento WO 2006/131951) de α D11 (Figura 5a) que ilustra que la técnica de PETización que se describe en el presente documento no conduce a una reducción de la eficacia de la estructura del anticuerpo *per se*, mediante comparación con el procedimiento convencional de injerto de CDR usado para humanizar el anticuerpo por Pavone y col. La bioactividad similar de las versiones caninas, felinas y equinas de α D11 se ilustra adicionalmente en la Figura 7D.

Tabla 1 - Restos de FR1 de dominio variable de cadena ligera

Posición de FR1 de cadena ligera	Numeración de la posición de cadena ligera de Kabat	VK Canino	VK Felino	VK Equino	VK Humano
1	1	DEA	DEN	DEGKV	DEAKY
2	2	ILV	VIPT	VIFNST	IVK
3	3	V	VEM	VMAGI	VQREAL
4	4	ML	MLI	MLVQ	MLC
5	5	MTI	T	TAI	TI
6	6	QE	Q	Q	Q
7	7	TSA	TS	STF	ST
8	8	P	P	P	PA
9	9	LAPRS	L	EDAPS	SGLADFPT
10	10	SP	SF	STFL	STFAL
11	11	L	L	LSV	LVSP
12	12	SA	SPA	ATESV	SAPH
13	13	VLA	V	VALQT	AVLR
14	14	STR	TIA	SAPT	ST
15	15	PQR	P	LPIR	VPLQR
16	16	EDGR	G	GR	GL
17	17	E	ED	QE	DEQGN
18	18	PTLKEAS	PSA	RSGKT	RPGTAS
19	19	AV	AV	VA	VASI
20	20	STF	S	ETDV	T

(continuación)

Posición de FR1 de cadena ligera	Numeración de la posición de cadena ligera de Kabat	VK Canino	VK Felino	VK Equino	VK Humano
21	21	I	IF	MIVLT	IL
22	22	STY	SF	KSRETNQL	TSN
23	23	CY	C	C	C

Tabla 2 - Restos de FR2 de dominio variable de cadena ligera

Posición de FR2 de la Cadena Ligera	Numeración de la posición de cadena ligera de Kabat	VK Canino	VK Felino	VK Equino	VK Humano
1	35	W	W	W	W
2	36	FYILS	YF	YFH	YFL
3	37	RQLIM	LFR	QRS	QHRL
4	38	QH	Q	QHKVCRSY	QHEVGR
5	39	KR	K	KRV	KRISQT
6	40	PSA	P	PSAIL	PALSQ
7	41	GD	G	G	GE
8	42	QH	QR	QE	KQNRHT
9	43	SATP	S	ARSTVP	APSTGV
10	44	P	P	PL	P
11	45	QKER	R	KERIL	KRNQES
12	46	RLPGASDTI	RL	RQLAHGWEEK	LFRSVM
13	47	LR	L	LVIFM	LV
14	48	ILT	IM	IFMVT	ILVMF
15	49	YFNSEVH	YHA	YSVFDEQRTWACGHL	YFSH

Tabla 3 - Restos de FR3 de dominio variable de cadena ligera

Posición de FR3 de cadena ligera	Numeración de la posición de cadena ligera de Kabat	VK Canino	VK Felino	VK Equino	VK Humano
1	57	GA	GR	GDF	G
2	58	VA	V	VFA	VI
3	59	PS	P	PLS	PST
4	60	DSE	D	DAESGL	SDALEPW
5	61	RG	R	R	RM
6	62	FLVI	FI	FLY	FI
7	63	SIA	ST	SCFGNRT	SGTV

(continuación)

Posición de FR3 de cadena ligera	Numeración de la posición de cadena ligera de Kabat	VK Canino	VK Felino	VK Equino	VK Humano
8	64	GA	G	GA	GAP
9	65	SR	S	SGRDEKTW	SGI
10	66	G	G	GRAV	GERV
11	67	S	S	SFYTA	SAP
12	68	GV	G	GET	GAS
13	69	TA	TAS	TASW	TAP
14	70	DE	D	DE	DEVS
15	71	FC	F	FY	FYH
16	72	TSR	TIA	TSAVY	TSIAN
17	73	LF	L	LFIP	LFHS
18	74	RTKE	RTK	TISAV	TKIAE
19	75	I	I	IV	IMSV
20	76	STG	SAGT	SNDTG	SNTAD
21	77	RGST	RG	SPTEDNR	SRGDNIPT
22	78	VLA	VM	LVFP	LVM
23	79	EVG	EQ	QER	QEKHLR
24	80	APD	AVPT	AEST	PAS
25	81	DEGINA	DE	ETAGD	ED
26	82	DG	D	DN	DN
27	82A	AVTGS	VIHL	VAEGLS	FVSI
28	82B	GA	G	AG	AG
29	82C	VIL	V	IVTDSMNLEFGY	TVSI
30	83	Y	Y	YC	Y
31	84	YHFC	YF	YFHSTVW	YF
32	85	C	C	C	C

Tabla 4 - Restos de FR4 de dominio variable de cadena ligera

Posición de FR4 de cadena ligera	Numeración de la posición de cadena ligera de Kabat	VK Canino	VK Felino	VK Equino	VK Humano
1	95	FLS	FS	FIL	FL
2	96	GS	G	G	GA
3	97	AQPTK	QP	QAL	QGP

(continuación)

Posición de FR4 de cadena ligera	Numeración de la posición de cadena ligera de Kabat	VK Canino	VK Felino	VK Equino	VK Humano
4	98	GE	G	G	G
5	99	TPA	T	TS	TA
6	100	KQSNH	KHQUEST	KNRM	KRT
7	101	VLW	L	LVM	VLI
8	102	DERVG	ED	EADK	EDP
9	103	LIM	IVML	ILVFM	ITVFM
10	104	KR	KRDT	KERTAGIQV	KRTEN

Tabla 5 - Restos de FR1 de dominio variable de cadena pesada

Posición de FR1 de cadena pesada	Numeración de la posición de cadena pesada de Kabat	VH Canino	VH Felino	VH Equino	VH Humano
1	1	EDG	QDEH	Q	QEHL
2	2	VGLEIM	VE	V	VLGIM
3	3	QHRAVEKLP	LQR	Q	QRHIKY
4	4	LVP	LV	L	LV
5	5	VALEM	VM	KQ	VQLEK
6	6	EQA	QED	E	EQDV
7	7	SFLT	S	S	SWP
8	8	GA	G	G	GAE
9	9	GEA	GAR	P	GAPT
10	10	DAGNETW	EDN	GD	GEDARV
11	11	LQRVW	LVR	LQ	LVFPSW
12	12	VAIMK	VRSK	VM	VKLIMRAGT
13	13	KRNQ	KTQENR	KMNR	KQERNT
14	14	PFT	PT	PIS	PALR
15	15	GAETS	GE	SAG	GSER
16	16	GEA	GATE	QE	GESRAQTV
17	17	STP	SA	TA	STA
18	18	LRV	LV	L	LVRE
19	19	RKTGV	RKES	ST	RKSTHI
20	20	LIV	ILP	L	LVIR
21	21	SY	FTS	TVIS	STFN

(continuación)

Posición de FR1 de cadena pesada	Numeración de la posición de cadena pesada de Kabat	VH Canino	VH Felino	VH Equino	VH Humano
22	22	C	C	C	C
23	23	VLAIEK	VKAMQ	TASF	AKTEVSIRQD
24	24	ATVGIS	ATDV	VI	AVGITS
25	25	SPGT	S	ST	SYCF
26	26	GDRT	GA	GA	GVAR
27	27	FLIDSTV	FYL	LFAGIMNQS	GDAVY

Tabla 6 - Restos de FR2 de dominio variable de cadena pesada

Posición de FR2 de cadena pesada	Numeración de la posición de cadena pesada de Kabat	VH Canino	VH Felino	VH Equino	VH Humano
1	36	WC	W	W	W
2	37	VIAFL	VLWFIA	VL	VILFA
3	38	RQ	RCH	R	RFP
4	39	QLHRE	Q	Q	QHRL
5	40	ASTGPVDC	APVTS	APSV	APSVMLHDGT
6	41	PL	P	P	PSAR
7	42	GERL	GAES	G	GSEQRW
8	43	KREGAMQ	KQTE	KRW	KQRNT
9	44	GERDTV	G	GR	GRK
10	45	LTPFM	LFP	LPW	LHIP
11	46	QEHDLPK	QE	E	EQVADK
12	47	WLCSYFM	WCL	FYWEHRVS	W
13	48	VLIFM	VMI	VI	VMIL
14	49	ATSGLV	AGTS	GASD	GSA

Tabla 7 - Restos de FR3 de dominio variable de cadena pesada

Posición de FR3 de cadena pesada	Numeración de la posición de cadena pesada de Kabat	VH Canino	VH Felino	VH Equino	VH Humano
1	66	RQ	RQK	R	RQHG
2	67	FVL	FL	AVGCIT	FVILMAT
3	68	TAIS	TIA	SRIDMNT	TISAVH
4	69	IVLMT	ILVM	IV	IMVFALT

(continuación)

Posición de FR3 de cadena pesada	Numeración de la posición de cadena pesada de Kabat	VH Canino	VH Felino	VH Equino	VH Humano
5	70	SAFT	ST	TSIL	STLNV
6	71	RKA	RAITKG V	KRES	RAVLTSPEKW
7	72	DEN	D	DEN	DN
8	73	NDTSIGL	TNDAS	TSAEIPY	NTDEKAMIS
9	74	AGVSDP T	ASDTG	SEGKT	SAVYGT
10	75	KRENQG MT	KTRGQ E	KELNQR	KTRIEQANS
11	76	NDSKHR	NDK	SNGKR	NSKTDAG
12	77	TMIAS	TIA	QERH	TQSIHEFR
13	78	LVMAIQ F	LAVG	VILSAF	LAFVMSIT
14	79	YFSHT	YFASV WD	YLSTVFR	YSFHDTVW
15	80	LIM	LM	LV	LM
16	81	QHEDRA	QELRDHV	TIQA	QEKNRHDST
17	82	ML	MLT	LMV	MLWIV
18	82A	NDSTHKPRE	NSDTGRH	NTDKRS	NSTRHD
19	82B	SGDRNT	SNIRT	STADEGKM	SRNDGTAIL
20	82C	LV	L	LVM	LV
21	83	RTGKSI	KRTGQ	TS	RTKQ
22	84	AVDTSGP	STPAIV	SGDER	ASITPVGDLN
23	85	EDAV	EATDGS	EDG	EADSGK
24	86	D	D	D	DN
25	87	TASM	T	TA	TSA
26	88	AGV	AGS	AS	AGS
27	89	VMILFTKQY	TVMIA	VD	VIMLT
28	90	YH	YH	Y	Y
29	91	YFHAGT	YHFC	YFWAI	YFH
30	92	C	CR	C	C
31	93	AVTGMRSCLPK	AITSVG M	ATVGEIS	AVTGSLM
32	94	KRSNGATPDQVEIM	RKSTIVPNG	GRAEHIKS	RKGTSNVAHIY

Tabla 8 - Restos de FR4 de dominio variable de cadena pesada

Posición de FR4 de cadena pesada	Numeración de la posición de cadena pesada de Kabat	VH Canino	VH Felino	VH Equino	VH Humano
1	103	WL	WRCL	W	WCISY
2	104	GAS	GRA	G	GLS
3	105	QPHRD	QPHVR	QP	QKRHLAEP
4	106	G	GD	G	GPR
5	107	TASIN	AT VIS	I	TISAEP
6	108	LSQPR	LIQMST	L	LTMVPQACN
7	109	VLIP	VI	V	VICFGLW
8	110	TFIASLPY	TAIR	T	TISADLV
9	111	VA	VIG	V	VGILP
10	112	SACPT	STP	S	SFTW
11	113	SLAP	SQPA	-	SPFGT

Ejemplo 2 - Producción de anticuerpo desinmunizado de NGF anti-humano

La técnica de PETización también se puede usar para convertir anticuerpos para uso humano (denominado "rehumanización" anteriormente en el presente documento) que tienen secuencias de de cadenas pesadas y ligeras de aminoácidos humanos alternativas a las de Pavone y col., usando el procedimiento que se ha descrito anteriormente y la combinación de restos de aminoácidos específicos de la posición de la región marco conservada obtenida a partir de ser humano que se muestran en las Tablas 1-8.

Además de las secuencias de VH y VL resultantes (Figura 9A) se muestra una comparación de las secuencias de la región marco conservada rehumanizadas de la cadena ligera (Figura 8A) y la cadena pesada (Figura 8B). Es evidente que para humanizar el MAb α D11 usando el procedimiento que se desvela en el presente documento (3 cambios de aminoácido para las regiones marco conservadas) es necesario realizar muy pocos cambios con respecto a los usados en el procedimiento convencional de injerto de CDR de Pavone y colaboradores (43 cambios de aminoácidos).

Las secuencias de proteínas de las variantes de cadena pesada (VH) y cadena ligera (VL) variables de anticuerpos α D11 rehumanizados (New-Hu α D11, Figura 9A) se diseñaron con secuencias señal N-terminales de α D11 de rata y dominios constantes de IgG humana C-terminal de cadena pesada de IgG4 y cadena ligera kappa humana respectivamente (Figura 9B). Los genes sintéticos que codifican las mismas se prepararon mediante síntesis genética basada en oligonucleótidos y cada uno se subclonó en el vector de expresión de mamífero pcDNA3.1+. La cotransfección en células CHO y la purificación a partir de sobrenadantes celulares usando cromatografía de Proteína A proporcionó anticuerpos purificados. Los anticuerpos se sometieron a ensayo para unión a NGF con ELISA y se compararon con la unión con la variante humanizada de α D11 descrita por Pavone y col., (documento WO 06/131951, diseñado mediante injerto de CDR). Como se puede observar a partir de los resultados de ELISA que se muestran en la Fig 9C, la variante New Hu α D11 de la presente patente se ha unido a NGF que es indistinguible de la descrita por Pavone y col. Los anticuerpos que se describen en la Figura 9C se sometieron a ensayo para inhibición de NGF con el procedimiento que se describe en la Figura 7C. Ambos anticuerpos humanizados presentaban una bioactividad equivalente.

Ejemplo 3 - Producción de anticuerpos caninos que tienen especificidad de unión con respecto al TNF canino

A modo de ejemplo adicional, el procedimiento de PETización de la presente patente se usó con un anticuerpo D2E7 humano que se une al factor de necrosis tumoral como el punto de partida para preparar una variante canina del mismo.

Las Tablas 9-16, que se muestran a continuación, ilustran el alineamiento de las regiones marco conservadas de los dominios de cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal humano D2E7 con la combinación de los restos de aminoácidos definidos para cada posición de las secuencias de la región marco conservada de inmunoglobulina canina (como se muestra en las Tablas 1-8). Determinados restos (marcados con * en la Tabla 9) de los que

5 previamente se pensó que eran extraños en la posición de la secuencia de Kabat en la actualidad se consideran naturales para los caninos, por lo tanto en la actualidad los cambios que se muestran en las posiciones marcadas con * ya no se podrían preparar, o se puede elegir un resto alternativo, más conservado (marcado con ** en la Tabla 10). Una base de esta información adicional, tres posiciones de la cadena ligera podrían estar sin cambiar, huyendo

10 Ser9, Ala13 y Gly16 (marcados con * en la Tabla 9). La His42 de la cadena ligera podría ser una elección alternativa del resto en esa posición (marcada con ** en la Tabla 10). Se pretende que las modificaciones de los restos de la región marco conservada de D2E7 caninizada en estas posiciones, y anticuerpos que comprenden modificaciones de ese tipo, estén dentro del alcance de la presente divulgación. Los anticuerpos de ese tipo podrían comprender Un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 15 con la excepción de

15 que un resto de serina se proporciona en la posición 9, un resto de alanina se proporciona en la posición 13 y un resto de glicina se proporciona en la posición 16 en lugar de los restos que se muestran en estas posiciones en la SEQ ID NO: 15. Opcionalmente se puede proporcionar un resto de histidina en la posición 42 de la SEQ ID NO: 15 en lugar de glutamina. Una secuencia modificada que muestra estos cambios se proporciona como SEQ ID NO: 71. La divulgación se extiende a anticuerpos que comprenden un dominio variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 71, y fragmentos de unión a antígeno obtenidos a partir de los mismos.

Tabla 9 - Secuencia de FR1 de cadena ligera caninizada de anticuerpo monoclonal D2E7 obtenido a partir de ser humano

Posición de FR1 de cadena ligera	Numeración de la posición de cadena ligera de Kabat	VL de MAb D2E7 Humano	Secuencias de combinación de aminoácidos de VK canino	VL de D2E7 PETizado Canino
1	1	D	DEA	D
2	2	I	ILV	I
3	3	Q	V	V
4	4	M	ML	M
5	5	T	MTI	T
6	6	Q	QE	Q
7	7	S	TSA	S
8	8	P	P	P
9	9	S	LAPRS	A*
10	10	S	SP	S
11	11	L	L	L
12	12	S	SA	S
13	13	A	VLA	L*
14	14	S	STR	S
15	15	V	PQR	Q
16	16	G	EDGR	E*
17	17	D	E	E
18	18	R	PTLKEAS	K
19	19	V	AV	V
20	20	T	STF	T
21	21	I	I	I
22	22	T	STY	T

(continuación)

Posición de FR1 de cadena ligera	Numeración de la posición de cadena ligera de Kabat	VL de MAb D2E7 Humano	Secuencias de combinación de aminoácidos de VK canino	VL de D2E7 PETizado Canino
23	23	C	CY	C

Tabla 10 - Secuencia de FR2 de cadena ligera caninizada de anticuerpo monoclonal D2E7 obtenido a partir de ser humano

Posición de FR2 de la Cadena Ligera	Sistema de numeración de cadena ligera de Kabat	VL de MAb D2E7 Humano	Secuencias de combinación de aminoácidos de VK canino	VL de D2E7 PETizado Canino
1	35	W	W	W
2	36	Y	FYILS	Y
3	37	Q	RQLIM	Q
4	38	Q	QH	Q
5	39	K	KR	K
6	40	P	PSA	P
7	41	G	GD	G
8	42	K	QH**	Q
9	43	A	SATP	A
10	44	P	P	P
11	45	K	QKER	K
12	46	L	RLPGASDTI	L
13	47	L	LR	L
14	48	I	ILT	I
15	49	Y	YFNSEVHW	Y

Tabla 11 - Secuencia de FR3 de cadena ligera caninizada de anticuerpo monoclonal D2E7 obtenido a partir de ser humano

Posición de FR3 de la Cadena Ligera	Numeración de la posición de cadena ligera de Kabat	VL de MAb D2E7 Humano	Secuencias de combinación de aminoácidos de VK canino	VL de D2E7 PETizado Canino
1	57	G	GA	G
2	58	V	VA	V
3	59	P	PS	P
4	60	S	DSE	S
5	61	R	RG	R
6	62	F	FLVI	F
7	63	S	SIA	S

(continuación)

Posición de FR3 de la Cadena Ligera	Numeración de la posición de cadena ligera de Kabat	VL de MAb D2E7 Humano	Secuencias de combinación de aminoácidos de VK canino	VL de D2E7 PETizado Canino
8	64	G	GA	G
9	65	S	SR	S
10	66	G	G	G
11	67	S	S	S
12	68	G	GV	G
13	69	T	TA	T
14	70	D	DE	D
15	71	F	FC	F
16	72	T	TSR	T
17	73	L	LF	L
18	74	T	RTKE	T
19	75	I	I	I
20	76	S	STG	S
21	77	S	RGST	S
22	78	L	VLA	L
23	79	Q	EVG	E
24	80	P	APD	P
25	81	E	DEGINA	E
26	82	D	DG	D
27	82A	V	AVTGS	V
28	82B	A	GA	A
29	82C	T	VIL	V
30	83	Y	Y	Y
31	84	Y	YHFC	Y
32	85	C	C	C

Tabla 12 - Secuencia de FR4 de cadena ligera caninizada de anticuerpo monoclonal D2E7 obtenido a partir de ser humano

Posición de FR4 de la Cadena Ligera	Posición de FR4 de cadena ligera de Kabat	VL de MAb D2E7 Humano	Secuencias de combinación de aminoácidos de VK canino	VL de D2E7 PETizado Canino
1	95	F	FLS	F
2	96	G	GS	G

(continuación)

Posición de FR4 de la Cadena Ligera	Posición de FR4 de cadena ligera de Kabat	VL de MAb D2E7 Humano	Secuencias de combinación de aminoácidos de VK canino	VL de D2E7 PETizado Canino
3	97	Q	AQPTK	Q
4	98	G	GE	G
5	99	T	TPA	T
6	100	K	KQSNH	K
7	101	V	VLW	V
8	102	E	DERVG	E
9	103	I	L1M	I
10	104	K	KR	K

Tabla 13 - Secuencia de FR1 de cadena pesada caninizada de anticuerpo monoclonal D2E7 obtenido a partir de ser humano

Posición de FR1 de cadena pesada	Numeración de la posición de cadena pesada de Kabat	VH de MAb D2E7 Humano	Secuencias de combinación de aminoácidos de VH canino	VH de D2E7 PETizado Canino
1	1	E	EDG	E
2	2	V	VGLEIM	V
3	3	Q	QHRAVEKLPS	Q
4	4	L	LVP	L
5	5	V	VALEM	V
6	6	E	EQA	E
7	7	S	SFLT	S
8	8	G	GA	G
9	9	G	GEA	G
10	10	G	DAGNETW	G
11	11	L	LQRWW	L
12	12	V	VAIMK	V
13	13	Q	KRNQ	Q
14	14	P	PFT	P
15	15	G	GAETS	G
16	16	R	GEA	G
17	17	S	STP	S
18	18	L	LRV	L
19	19	R	RKTGV	R

(continuación)

Posición de FR1 de cadena pesada	Numeración de la posición de cadena pesada de Kabat	VH de MAb D2E7 Humano	Secuencias de combinación de aminoácidos de VH canino	VH de D2E7 PETizado Canino
20	20	L	LIV	L
21	21	S	SY	S
22	22	C	C	C
23	23	A	VLAIEK	A
24	24	A	ATVGIS	A
25	25	S	SPGT	S
26	26	G	GDRT	G
27	27	F	FLIDSTV	F

Tabla 14 - Secuencia de FR2 de cadena pesada caninizada de anticuerpo monoclonal D2E7 obtenido a partir de ser humano

Posición de FR2 de cadena pesada	sistema de numeración de cadena pesada de Kabat	VH de MAb D2E7 Humano	Secuencias de combinación de aminoácidos de VH canino	VH de D2E7 PETizado Canino
1	36	W	WC	W
2	37	V	VIAFL	V
3	38	R	RQ	R
4	39	Q	QLHRE	Q
5	40	A	ASTGPVDC	A
6	41	P	PL	P
7	42	G	GERL	G
8	43	K	KREGAMQ	K
9	44	G	GERDTV	G
10	45	L	LTPFM	L
11	46	E	QEHDLPK	E
12	47	W	WLCSYFM	W
13	48	V	VLIFM	V
14	49	S	ATSGLV	S

Tabla 15 - Secuencia de FR3 de cadena pesada caninizada de anticuerpo monoclonal D2E7 obtenido a partir de ser humano

Posición de FR3 de cadena pesada	Sistema de numeración de cadena pesada de Kabat	Secuencia de VH de MAb D2E7 Humano	Secuencias de combinación de aminoácidos de VH canino	VH de D2E7 PETizado de Canino
1	66	R	RQ	R

(continuación)

Posición de FR3 de cadena pesada	Sistema de numeración de cadena pesada de Kabat	Secuencia de VH de MAb D2E7 Humano	Secuencias de combinación de aminoácidos de VH canino	VH de D2E7 PETizado de Canino
2	67	F	FVL	F
3	68	T	TAIS	T
4	69	I	IVLMT	I
5	70	S	SAFT	S
6	71	R	RKA	R
7	72	D	DEN	D
8	73	N	NDTSIGL	N
9	74	A	AGVSDPT	A
10	75	K	KRENQGMT	K
11	76	N	NDSKHR	N
12	77	S	TMIAS	S
13	78	L	LVMAIQF	L
14	79	Y	YFSHT	Y
15	80	L	LIM	L
16	81	Q	QHEDRA	Q
17	82	M	ML	M
18	82A	N	NDSTHKPRE	N
19	82B	S	SGDRNT	S
20	82C	L	LV	L
21	83	R	RTGKSI	R
22	84	A	AVDTSGP	A
23	85	E	EDAV	E
24	86	D	D	D
25	87	T	TASM	T
26	88	A	AGV	A
27	89	V	VMILFTKQY	V
28	90	Y	YH	Y
29	91	Y	YFHAGT	Y
30	92	C	C	C
31	93	A	AVTGMRSCLPK	A
32	94	K	KRSNGATPDQVEIM	K

Tabla 16 - Secuencia de FR4 de cadena pesada caninizada de anticuerpo monoclonal D2E7 obtenido a partir de ser humano

Posición de FR4 de cadena pesada	Sistema de numeración de cadena pesada de Kabat	VH de MAb D2E7 Humano	Secuencias de combinación de aminoácidos de VH canino	VH de D2E7 PETizado de Canino
1	103	W	WL	W
2	104	G	GAS	G
3	105	Q	QPHRD	Q
4	106	G	G	G
5	107	T	TASIN	T
6	108	L	LSQPR	L
7	109	V	VLIP	V
8	110	T	TFIASLPY	T
9	111	V	VA	V
10	112	S	SACPT	S
11	113	S	SLAP	S

Las Figuras 10, 11 y 12 ilustran secuencias de dominio variable (Figura 10) y anticuerpo completo (Figura 11 (cadena ligera) y Figura 12 (cadena pesada)) que codifican variantes de Mab PETizado canino de D2E7 en la SEQ ID NO: 15 a la SEQ ID NO: 21. Las secuencias se construyeron como ADN usando síntesis de oligonucleótidos y se subclonaron a vectores de expresión y se transfectaron a células CHO como se ha mencionado anteriormente. En particular, las secuencias de SEQ ID NO: 17 (cadena ligera) y las SEQ ID NO: 18-21 (isotipos A, B, C y D de cadena pesada) se diseñaron y construyeron como ADN usando síntesis de oligonucleótidos y se subclonaron a vectores de expresión pcDNA3.1+ y se transfectaron en diversas combinaciones en células CHO.

Los ADNc que codifican anticuerpos monoclonales anti-TNF de canino que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 (cadena ligera) y de SEQ ID NO: 19 (cadena pesada, isotipo B) y un anticuerpo monoclonal anti-TNF quimérico que tiene una cadena ligera con el aminoácido de SEQ ID NO: 22 y una cadena pesada de SEQ ID NO: 23 (Figura 13) se subclonaron en pcDNA3.1+ (Invitrogen / Life technologies) con secuencias señal secretoras amino-terminales (no se muestran). Las células CHO se co-transfectaron con combinaciones de cualquiera de secuencias de cadena pesada y ligera de canino (ca-HCB + ca-kLC) o cadenas pesadas y ligeras quiméricas (ch-HCB + ch-kLC). Los sobrenadantes resultantes se purificaron en Proteína A, se analizaron por SDS-PAGE (Figura 14A) y se sometieron a ensayo para unión a TNF alfa canino (revestido a 5 ug/ml; R&D systems) a las concentraciones de anticuerpo indicadas (ug/ml) con ELISA y se detectaron usando conjugado de peroxidasa de rábano picante-anticuerpo policlonal anti-canino (Sigma A9042) (Figura 14B). El control negativo fue el anticuerpo policlonal de detección sobre antígeno revestido solo.

Los anticuerpos purificados se sometieron a ensayo para su capacidad para inhibir la actividad del TNF canino usando células 293-HEK transfectadas con pTRH1 para producir una línea de células indicadoras de NF-kB-EGFP sensibles a TNF que responde al TNF humano con fluorescencia (Vince y col., Cell 131, 682, 2007). En primer lugar se demostró que el TNF canino activa la expresión de GFP en estas células (estimulación máxima de un 50 % a aproximadamente 1 ng/ml) y a continuación los anticuerpos caninos que se muestran en la Figura 14 se sometieron a ensayo para su capacidad para inhibir 1 ng/ml de TNF canino.

Como se muestra en la Figura 15 (A-C), en este ensayo los anticuerpos tanto de canino como los quiméricos eran potentes inhibidores del TNF canino.

En conjunto estos resultados mostraban que los anticuerpos de canino de la divulgación y el anticuerpo quimérico de ser humano-canino se unen al TNF canino y son equipotentes con el ensayo tanto de ELISA como de inhibición, lo que demuestra que el procedimiento de caninización ha producido una versión canina totalmente activa del anticuerpo D2E7 original.

La Figura 16 ilustra una comparación de los anticuerpos monoclonales (MAb) D2E7 caninizados y quiméricos con un anticuerpo caninizado adicional basándose en el clon 148 del MAb del TNF anti-humano. El clon 148 del MAb anti-

huTNF caninizado (SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27, Figura 17) se expresó en células CHO se purificó usando cromatografía de Proteína A (Panel A, calle izquierda). El clon 148 del MAb caninizado se sometió ensayo para unión a TNF humano (Panel B) y a TNF canino (Panel C) en comparación con los Mab basados en D2E7 caninizados (Ca) y quiméricos (Ch) de las Figuras 14 y 15 (la unión a control negativo de fondo se muestra con las flechas). A partir de los paneles B y C se puede observar que el 148 clon de MAb caninizado se une al TNF humano, pero no al TNF canino. En consecuencia, los MAb caninizados y quiméricos basados en D2E7 y el objeto de la presente divulgación muestran de forma inesperada una fuerte unión al TNF canino equivalente a la del TNF humano mientras que el clon 148 de MAb caninizado muestra solamente unión al TNF humano. Por lo tanto, los Mab basados en D2E7 caninizado son sorprendentemente útiles para el tratamiento de una enfermedad caninas mediadas por TNF canino.

Tomadas en conjunto, las versiones canina, equina, felina y nuevas versiones humanas del MAb α D11 anti-NGF de rata PETizado y las versiones PETizadas de canino del MAb anti-TNF humano demuestra que la conversión de PETización de regiones marco conservadas de dominio variable con el procedimiento que se describe en la presente es sólida, reproducible y aplicable a conversión de múltiples especies de múltiples MAb.

Ejemplo 4 - Efecto de anticuerpos monoclonales NGF anti-caninos para reducir el dolor inflamatorio *in vivo*

Terapia con anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales NGF anti-caninos obtenidos a partir de vectores de expresión que expresan SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 70 (cadena pesada de tipo HCA canino) se expresaron en células CHO y se purificaron mediante una combinación de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de exclusión por tamaño y el tampón se intercambió en solución salina tamponada con fosfato.

Modelo canino de inflamación

Todos los experimentos se realizaron con la aprobación previa del Institutional Ethics Committee (CRL, Irlanda). Los perros de raza Beagle fueron inyectados (= día -1) con caolín en la almohadilla de una pata trasera para generar una inflamación de autorresolución que comienza aproximadamente 24 horas más tarde y que hace que los perros comiencen a cojear temporalmente. En este modelo, una vez que la respuesta a la inflamación al caolín disminuye, los perros comienzan a cojear a un ritmo menos constante durante el periodo de tiempo de aproximadamente 1-2 semanas y a continuación presentan una recuperación completa.

Los grupos de 3 perros fueron inyectados por vía intravenosa con cualquiera de anticuerpos monoclonales NGF anti-caninos a 200 μ g/kg de peso corporal o solución salina tamponada con fosfato como control de vehículo (= día 0). Los perros se evaluaron para cojera durante aproximadamente 7 días mediante un procedimiento de puntuación visual (puntuación 0, sin cojera (aguante del peso completo); puntuación 1, cojera ligera (no aguantan el peso completo pero caminan bien); puntuación 2, cojera moderada (aguantan el peso ligeramente y no caminan bien), puntuación 3, cojera severa (no aguantan el peso)). A los observadores se les oculto qué inyección recibía cada perro.

Los resultados se muestran en la Figura 18. Las puntuaciones de cojera se redujeron en los perros que recibieron anticuerpos monoclonales anti-NGF el día 3 después de la inyección en comparación con el control de vehículo, lo que indica que los anticuerpos monoclonales anti-NGF presentaban un efecto en la reducción del dolor en los perros con respecto al observado solamente con vehículo. La actividad retardada es coherente con la farmacocinética en plasma de los anticuerpos monoclonales NGF anti-caninos que demostraban una fase de distribución del tejido (alfa) baja de aproximadamente 30 horas y la vascularización relativamente escasa del área de la almohadilla de la pata. Los resultados que se muestran en la Figura 18 muestran que los anticuerpos NGF anti-caninos producidos con el procedimiento de la presente divulgación reducen el dolor inflamatorio en perros con una reducción de la cojera consiguiente.

Diversas modificaciones y variaciones para los ejemplos de las divulgaciones descritos serán evidentes para las personas con experiencia en la materia sin apartarse del alcance de la divulgación. La divulgación se ha descrito en relación con ejemplos preferentes específicos. De hecho, diversas modificaciones de los modos de realización de la divulgación descritos que son evidentes para las personas con experiencia en la materia pretenden ser cubiertos con la presente divulgación.

Listado de secuencias

<110> NVIP Pty Ltd Gearing, David

<120> Anticuerpos modificados y procedimiento para la producción de los mismos

<130> P120110.WO.01

<150> US 61/531439

<151> 06-09-2011

<160> 71

5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio variable de cadena ligera de una versión canina de MAb anti-NGF alfa D11 - VK canino

15

<400> 1

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys
100 105

20 <210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> dominio variable de cadena pesada de una versión canina de MAb anti-NGF alfa D11 - VH canino

<400> 2

30

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

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio variable de cadena ligera de una versión felina de MAb anti-NGF alfa D11 - VK felino

<400> 3

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

ES 2 665 016 T3

65		70		75		80									
Asp	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	His	Tyr	Phe	His	Tyr	Pro	Arg
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
			100					105							

<210> 4
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> dominio variable de cadena pesada de una versión de MAb anti-NGF alfa D11 - VH felino
 <400> 4

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

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> dominio variable de cadena ligera de una versión equina de MAb anti-NGF alfa D11 - VK equino

ES 2 665 016 T3

<400> 5

```

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

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

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

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

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

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

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

```

- 5 <210> 6
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> dominio variable de cadena pesada de una versión equina de MAb anti-NGF alfa D11 - VH equino
- 15 <400> 6

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

<210> 7

<211> 217

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> cadena ligera completa de una versión caninizada de MAb anti-NGF alfa D11 - VK canino y constante de cadena ligera kappa de canino

<400> 7

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Leu Ser Gln Glu
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys Arg Asn Asp Ala Gln
 100 105 110
 Pro Ala Val Tyr Leu Phe Gln Pro Ser Pro Asp Gln Leu His Thr Gly
 115 120 125
 Ser Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Ser Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
 130 135 140
 Asn Val Lys Trp Lys Val Asp Gly Val Ile Gln Asp Thr Gly Ile Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Met Ser Ser Thr Glu Tyr Leu Ser His Glu Leu Tyr Ser
 180 185 190
 Cys Glu Ile Thr His Lys Ser Leu Pro Ser Thr Leu Ile Lys Ser Phe
 195 200 205
 Gln Arg Ser Glu Cys Gln Arg Val Asp
 210 215

<210> 8
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> cadena pesada completa de una versión canina de MAb anti-NGF alfa D11 - VH canino y constante de cadena pesada B de canino

<400> 8

5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala
 195 200 205
 His Pro Ala Ser Lys Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Pro Lys Arg Glu
 210 215 220
 Asn Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Leu Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 Asp Leu Asp Pro Glu Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp
 275 280 285
 Gly Lys Gln Met Gln Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 290 295 300
 Asn Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gly His Gln Asp
 305 310 315 320
 Trp Leu Lys Gly Lys Gln Phe Thr Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu
 325 330 335
 Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala His
 340 345 350
 Gln Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Leu Ser Lys
 355 360 365
 Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp
 370 375 380
 Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys
 385 390 395 400
 Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu

405

410

415

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

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

Glu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 9

<211> 217

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> cadena ligera completa de una versión de felino de MAb anti-NGF alfa D11 - VK felino y constante de cadena ligera kappa de felino

<400> 9

ES 2 665 016 T3

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly	1	5	10	15
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asp	Ile	Tyr	Asn	Ala	20	25	30	
Leu	Ala	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Arg	Arg	Leu	Ile	35	40	45	
Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Leu	His	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Arg	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	65	70	75	80
Asp	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	His	Tyr	Phe	His	Tyr	Pro	Arg	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ser	Asp	Ala	Gln	100	105	110	
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Gln	Pro	Ser	Leu	Asp	Glu	Leu	His	Thr	Gly	115	120	125	
Ser	Ala	Ser	Ile	Val	Cys	Ile	Leu	Asn	Asp	Phe	Tyr	Pro	Lys	Glu	Val	130	135	140	
Asn	Val	Lys	Trp	Lys	Val	Asp	Gly	Val	Val	Gln	Thr	Lys	Ala	Ser	Lys	145	150	155	160
Glu	Ser	Thr	Thr	Glu	Gln	Asn	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	165	170	175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Met	Ser	Arg	Thr	Glu	Tyr	Gln	Ser	His	Glu	Lys	Phe	180	185	190	
Ser	Cys	Glu	Val	Thr	His	Lys	Ser	Leu	Ala	Ser	Thr	Leu	Val	Lys	Ser	195	200	205	
Phe	Asn	Arg	Ser	Glu	Cys	Gln	Arg	Glu	210	215									

<210> 10

<211> 457

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada completa de una versión de felino de MAb anti-NGF alfa D11 - VH felino y constante de cadena pesada de felino

5

<400> 10

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

Ser Leu Arg Leu Thr Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
20 25 30

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

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

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

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

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

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

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Thr Thr Ser Gly Ala Thr

ES 2 665 016 T3

130		135		140											
Val	Ala	Leu	Ala	Cys	Leu	Val	Leu	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
145					150					155					160
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
			165						170					175	
Ala	Val	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Met	Val	Thr
			180					185					190		
Val	Pro	Ser	Ser	Arg	Trp	Leu	Ser	Asp	Thr	Phe	Thr	Cys	Asn	Val	Ala
		195				200						205			
His	Pro	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Arg	Lys	Thr	Asp
210						215					220				
His	Pro	Pro	Gly	Pro	Lys	Pro	Cys	Asp	Cys	Pro	Lys	Cys	Pro	Pro	Pro
225					230					235					240
Glu	Met	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Ile	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
				245					250					255	
Asp	Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Leu	Val	Val
			260					265					270		
Asp	Leu	Gly	Pro	Asp	Asp	Ser	Asp	Val	Gln	Ile	Thr	Trp	Phe	Val	Asp
		275					280					285			
Asn	Thr	Gln	Val	Tyr	Thr	Ala	Lys	Thr	Ser	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe
290						295					300				
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Pro	Ile	Leu	His	Gln	Asp
305					310					315					320
Trp	Leu	Lys	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Ser	Lys	Ser	Leu
				325					330					335	
Pro	Ser	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	His
			340					345					350		
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Ala	Gln	Glu	Glu	Leu	Ser	Arg
		355				360						365			
Asn	Lys	Val	Ser	Val	Thr	Cys	Leu	Ile	Lys	Ser	Phe	His	Pro	Pro	Asp
370						375					380				

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ile Thr Gly Gln Pro Glu Pro Glu Asn Asn
385 390 395 400

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

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

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

Lys Ser Leu Thr Gln Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 11

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> cadena ligera completa de una versión equina de MAb anti-NGF alfa D11 - VK equino y constante de cadena ligera kappa de equino

<400> 11

```

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Ala Phe Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Ser Ser Gly
          115          120          125

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

Thr Ile Asn Trp Lys Val Asp Gly Leu Ala Lys Thr Ser Ser Phe His
145          150          155          160

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

Ser Thr Leu Thr Leu Pro Lys Ala Asp Tyr Glu Ala His Asn Val Tyr
          180          185          190

Ala Cys Glu Val Ser His Lys Thr Leu Ser Ser Pro Leu Val Lys Ser
          195          200          205

Phe Lys Arg Gln Asp Cys
          210

```

<210> 12

<211> 464

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada completa de una versión equina de MAb anti-NGF alfa D11 - VH equino y constante de cadena pesada 2 de equino

<400> 12

5

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

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

Lys Tyr Phe Gln Leu Thr Pro Ser Cys Gly Ile Thr Ser Asp Ala Thr
 130 135 140

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

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

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

Val Pro Ala Ser Thr Trp Thr Ser Glu Thr Tyr Ile Cys Asn Val Ala
 195 200 205

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

Leu Ser Ala Glu Gly Val Ile Pro Ile Pro Ser Val Pro Lys Pro Gln
 225 230 235 240

Cys Pro Pro Tyr Thr His Ser Lys Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 245 250 255

Ile Phe Pro Pro Asn Pro Lys Asp Ala Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 260 265 270

Val Val Thr Cys Val Val Val Asn Leu Ser Asp Gln Tyr Pro Asp Val
 275 280 285

Gln Phe Ser Trp Tyr Val Asp Asn Thr Glu Val His Ser Ala Ile Thr
 290 295 300

Lys Gln Arg Glu Ala Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 305 310 315 320

Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys
 325 330 335

Ser Val Thr Asn Val Gly Val Pro Gln Pro Ile Ser Arg Ala Ile Ser
 340 345 350

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

His Pro Asp Glu Leu Ala Lys Ser Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Val
370 375 380

Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Ser Val Glu Trp Gln Ser Asn Arg
385 390 395 400

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

Gly Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Leu Glu Thr Ser
420 425 430

Arg Trp Gln Gln Val Glu Ser Phe Thr Cys Ala Val Met His Glu Ala
435 440 445

Leu His Asn His Phe Thr Lys Thr Asp Ile Ser Glu Ser Leu Gly Lys
450 455 460

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL de Hu alfa D11 nueva

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

<210> 14
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> VH de Hu alfa D11 nueva

10

<400> 14

```

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

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

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

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

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

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

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

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

```

<210> 15
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> dominio variable de cadena ligera de una versión canina de MAb anti-TNF de D2E7 humano -
 VK canino

20

<400> 15

ES 2 665 016 T3

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 16

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio variable de cadena pesada de una versión canina de MAb anti-TNF de D2E7 humano
- VH canino

<400> 16

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17

<211> 217

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> cadena ligera completa de una versión canina de MAb anti-TNF de D2E7 humano - VK canino y constante de cadena ligera kappa de canino

<400> 17

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Leu Ser Gln Glu
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Ala Gln
 100 105 110
 Pro Ala Val Tyr Leu Phe Gln Pro Ser Pro Asp Gln Leu His Thr Gly
 115 120 125
 Ser Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Ser Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
 130 135 140
 Asn Val Lys Trp Lys Val Asp Gly Val Ile Gln Asp Thr Gly Ile Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Met Ser Ser Thr Glu Tyr Leu Ser His Glu Leu Tyr Ser
 180 185 190
 Cys Glu Ile Thr His Lys Ser Leu Pro Ser Thr Leu Ile Lys Ser Phe
 195 200 205
 Gln Arg Ser Glu Cys Gln Arg Val Asp
 210 215

<210> 18

<211> 452

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada completa de una versión canina de MAb anti-TNF de D2E7 humano - VH canino y constante de cadena pesada A de canino

<400> 18

5

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20           25           30

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50           55           60

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

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

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100          105          110

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

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

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

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

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

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

```

Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Phe Asn Glu Cys Arg
 210 215 220
 Cys Thr Asp Thr Pro Pro Cys Pro Val Pro Glu Pro Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Leu Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Arg Ile Thr
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Leu Asp Leu Gly Arg Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Glu Val His Thr
 275 280 285
 Ala Lys Thr Gln Ser Arg Glu Gln Gln Phe Asn Gly Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln Asp Trp Leu Thr Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Arg Ala His Lys Pro Ser Val Tyr Val
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser Ser Ser Asp Thr Val Ser Ile
 355 360 365
 Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp
 370 375 380
 Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Arg Lys His Arg Met Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asp Pro Phe Thr Cys Ala Val
 420 425 430
 Met His Glu Thr Leu Gln Asn His Tyr Thr Asp Leu Ser Leu Ser His
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys

450

<210> 19

<211> 456

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada completa de una versión canina de MAb anti-TNF de D2E7 humano - VH canino y constante de cadena pesada B de canino

<400> 19

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala His

195					200					205					
Pro	Ala	Ser	Lys	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Pro	Val	Pro	Lys	Arg	Glu	Asn
210					215					220					
Gly	Arg	Val	Pro	Arg	Pro	Pro	Asp	Cys	Pro	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
225					230					235					240
Met	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
				245					250					255	
Thr	Leu	Leu	Ile	Ala	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
			260					265					270		
Leu	Asp	Pro	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Gly
	275						280					285			
Lys	Gln	Met	Gln	Thr	Ala	Lys	Thr	Gln	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
290					295					300					
Gly	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Pro	Ile	Gly	His	Gln	Asp	Trp
305				310						315					320
Leu	Lys	Gly	Lys	Gln	Phe	Thr	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
				325					330					335	
Ser	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Arg	Gly	Gln	Ala	His	Gln
			340					345					350		
Pro	Ser	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Leu	Ser	Lys	Asn
		355					360					365			
Thr	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Ile	Lys	Asp	Phe	Tyr	Pro	Pro	Asp	Ile
	370					375					380				
Asp	Val	Glu	Trp	Gln	Ser	Asn	Gly	Gln	Gln	Glu	Pro	Glu	Ser	Lys	Tyr
385				390						395					400
Arg	Thr	Thr	Pro	Pro	Gln	Leu	Asp	Glu	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Leu	Tyr
			405					410						415	
Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Arg	Gly	Asp	Thr	Phe
		420					425						430		
Ile	Cys	Ala	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Glu
		435					440					445			

Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 20

<211> 454

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada completa de una versión canina de MAb anti-TNF de D2E7 humano - VH canino y constante de cadena pesada C de canino

<400> 20

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala His
 195 200 205
 Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Ala Lys Glu Cys Glu
 210 215 220
 Cys Lys Cys Asn Cys Asn Asn Cys Pro Cys Pro Gly Cys Gly Leu Leu
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu
 245 250 255
 Val Thr Ala Arg Thr Pro Thr Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Asn Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Ser Lys Gln
 275 280 285
 Val Gln Thr Ala Asn Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Ser Asn Gly Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu Ser
 305 310 315 320
 Gly Lys Gln Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro
 325 330 335
 Ile Glu Glu Ile Ile Ser Lys Thr Pro Gly Gln Ala His Gln Pro Asn
 340 345 350
 Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Met Ser Lys Asn Thr Val
 355 360 365
 Thr Leu Thr Cys Leu Val Lys Asp Phe Phe Pro Pro Glu Ile Asp Val
 370 375 380
 Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Met
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys
 420 425 430
 Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Ile Ser Leu
 435 440 445

Ser His Ser Pro Gly Lys
450

<210> 21
<211> 452
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada completa de una versión canina de MAb anti-TNF de D2E7 humano - VH
canino y constante de cadena pesada D de canino

<400> 21

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 22

<211> 217

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera de MAb anti-TNF quimérico - VK humano y cadena ligera kappa de canino

<400> 22

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

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

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Gln Arg Ser Glu Cys Gln Arg Val Asp
210 215

<210> 23

<211> 456

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada de MAb anti-TNF quimérico - VH humano y dominio constante de cadena pesada de tipo B de canino

<400> 23

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe

420

425

430

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

Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 24

<211> 468

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HC-IgG4 completa de Hu alfa D11 completa

<400> 24

Met Ala Val Leu Val Leu Leu Leu Cys Leu Val Thr Phe Pro Thr Cys
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45

Thr Asn Asn Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Arg Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser
65 70 75 80

Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln
85 90 95

Val Phe Leu Lys Met His Ser Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met
115 120 125

Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
145 150 155 160

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
 210 215 220

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
 245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 275 280 285

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
 340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr

420

425

430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Ser Leu Gly Lys
465

<210> 25

<211> 234

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC kappa completa de Hu alfa D11 nueva

<400> 25

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

Asp Ala Ile Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Leu Gly Glu Thr Val Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Asp
35 40 45

Ile Tyr Asn Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro
50 55 60

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Ser Leu Lys Ile Asn
85 90 95

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe
100 105 110

His Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 26

<211> 480

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada de ca148-HCB

<400> 26

Met	Gly	Phe	Gly	Leu	Ser	Trp	Val	Phe	Leu	Val	Ala	Leu	Leu	Arg	Gly	1	5	10	15
Val	Gln	Cys	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	20	25	30	
Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ile	Phe	35	40	45	
Ser	Ser	Tyr	Ala	Met	Arg	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	50	55	60	
Glu	Trp	Val	Ala	Phe	Met	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Lys	Tyr	Ala	65	70	75	80
Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	85	90	95	
Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	100	105	110	
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Arg	Gly	Ile	Ala	Ala	Gly	Gly	Asn	Tyr	Tyr	115	120	125	

Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 130 135 140
 Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys
 145 150 155 160
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly
 165 170 175
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr
 180 185 190
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 195 200 205
 Ser Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu
 210 215 220
 Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Lys Thr Lys Val Asp
 225 230 235 240
 Lys Pro Val Pro Lys Arg Glu Asn Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp
 245 250 255
 Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 260 265 270
 Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Leu Ile Ala Arg Thr Pro
 275 280 285
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu Asp Pro Glu Asp Pro Glu Val
 290 295 300
 Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Gln Met Gln Thr Ala Lys Thr
 305 310 315 320
 Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 325 330 335
 Leu Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Gln Phe Thr Cys
 340 345 350
 Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser
 355 360 365
 Lys Ala Arg Gly Gln Ala His Gln Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro
 370 375 380

Ser Arg Glu Glu Leu Ser Lys Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Ile
385 390 395 400

Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly
405 410 415

Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp
420 425 430

Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser
435 440 445

Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala
450 455 460

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
465 470 475 480

<210> 27

<211> 238

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<400> 27

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Lys Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Pro Ser
100 105 110

ES 2 665 016 T3

Asn Trp Pro Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
115 120 125

Arg Asn Asp Ala Gln Pro Ala Val Tyr Leu Phe Gln Pro Ser Pro Asp
130 135 140

Gln Leu His Thr Gly Ser Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Ser Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Val Asp Gly Val Ile Gln
165 170 175

Asp Thr Gly Ile Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Met Ser Ser Thr Glu Tyr Leu Ser
195 200 205

His Glu Leu Tyr Ser Cys Glu Ile Thr His Lys Ser Leu Pro Ser Thr
210 215 220

Leu Ile Lys Ser Phe Gln Arg Ser Glu Cys Gln Arg Val Asp
225 230 235

<210> 28

<211> 23

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> región FR1 de alfa D11 de rata de cadena ligera de VK

<400> 28

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

Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys
20

15 <210> 29

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> región FR1 caninizada de cadena ligera de VK de anticuerpo alfa D11 de rata

<400> 29

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 30
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> región FR1 felinizada de cadena ligera de VK de anticuerpo alfa D11 de rata
<400> 30

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 31
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> región FR1 equinizada de cadena ligera de VK de anticuerpo alfa D11 de rata
<400> 31

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

Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys
20

<210> 32
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> región FR2 de alfa D11 de rata de cadena ligera de VK

<400> 32

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 33
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región FR2 caninizada de cadena ligera de VK de anticuerpo alfa D11 de rata

5 <400> 33

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 34

10 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> región FR2 felinizada de cadena ligera de VK de anticuerpo alfa D11 de rata

<400> 34

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr
1 5 10 15

20

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> región FR2 equinizada de cadena ligera de VK de anticuerpo alfa D11 de rata

<400> 35

30

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 36

<211> 32

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región FR3 de alfa D11 de rata de cadena ligera de VK

40

<400> 36

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser
1 5 10 15

Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys
20 25 30

45 <210> 37

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región FR3 caninizada de cadena ligera de VK de anticuerpo alfa D11 de rata

<400> 37

5

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Ser
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 38

<211> 32

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región FR3 felinizada de cadena ligera de VK de anticuerpo alfa D11 de rata

15

<400> 38

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys
20 25 30

20

<210> 39

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> región FR3 equinizada de cadena ligera de VK de anticuerpo alfa D11 de rata

<400> 39

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser
1 5 10 15

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Ser Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys
20 25 30

30

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región FR4 de alfa D11 de rata de cadena ligera de VK

40

<400> 40

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
1 5 10

5 <210> 41
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> región FR4 caninizada de cadena ligera de VK de anticuerpo alfa D11 de rata

 10 <400> 41

 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys
 1 5 10

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

 <220>
 20 <223> región FR4 felinizada de cadena ligera de VK de anticuerpo alfa D11 de rata

 <400> 42

 Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

 25 <210> 43
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> región FR4 equinizada de cadena ligera de VK de anticuerpo alfa D11 de rata

 <400> 43

 35 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 1 5 10

 <210> 44
 <211> 27
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> región FR1 de alfa D11 de rata de cadena pesada

 45 <400> 44

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

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

<210> 45
 <211> 27
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> región FR1 caninizada de cadena pesada de anticuerpo alfa D11 de rata

 10 <400> 45

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

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

 15 <210> 46
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> región FR1 felinizada de cadena pesada de anticuerpo alfa D11 de rata

 <400> 46

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

 Ser Leu Arg Leu Thr Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 20 25

 25 <210> 47
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> región FR1 equinizada de cadena pesada de anticuerpo alfa D11 de rata

 <400> 47

 35 <210> 48
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 40 <210> 48
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> región FR2 de alfa D11 de rata de cadena pesada

<400> 48

5

Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Arg Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 49

<211> 14

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región FR2 caninizada de cadena pesada de anticuerpo alfa D11 de rata

15

<400> 49

Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 5 10

20

<210> 50

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> región FR2 felinizada de cadena pesada de anticuerpo alfa D11 de rata

<400> 50

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

30

<210> 51

<211> 14

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región FR2 equinizada de cadena pesada de anticuerpo alfa D11 de rata

40

<400> 51

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

45

<210> 52

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> región FR3 de alfa D11 de rata de cadena pesada

<400> 52

Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
1 5 10 15

Met His Ser Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

5

<210> 53

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> región FR3 caninizada de cadena pesada de anticuerpo alfa D11 de rata

<400> 53

15

Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu Gln
1 5 10 15

Met His Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 54

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> región FR3 felinizada de cadena pesada de anticuerpo alfa D11 de rata

25

<400> 54

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

30

<210> 55

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> región FR3 equinizada de cadena pesada de anticuerpo alfa D11 de rata

40

<400> 55

Arg Ala Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región FR4 de alfa D11 de rata de cadena pesada

<400> 56

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 57

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región FR4 caninizada de cadena pesada de anticuerpo alfa D11 de rata

<400> 57

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región FR4 felinizada de cadena pesada de anticuerpo alfa D11 de rata

<400> 58

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región FR4 equinizada de cadena pesada de anticuerpo alfa D11 de rata

<400> 59

Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 60

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región FR1 de cadena ligera de una nueva variante humanizada de alfa D11 (Hu nueva)

<400> 60

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

Glu Thr Val Thr Ile Asn Cys
20

<210> 61

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región FR2 de cadena ligera de una nueva variante humanizada de alfa D11 (Hu nueva)

<400> 61

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 62

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región FR3 de cadena ligera de una nueva variante humanizada de alfa D11 (Hu nueva)

<400> 62

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Ser
1 5 10 15

Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región FR4 de cadena ligera de una nueva variante humanizada de alfa D11 (Hu nueva)

<400> 63

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

5 <210> 64
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> región FR1 de cadena pesada de una nueva variante humanizada de alfa D11 (Hu nueva)

<400> 64

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys
20

15 <210> 65
<211> 14
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> región FR2 de cadena pesada de una nueva variante humanizada de alfa D11 (Hu nueva)

25 <400> 65

Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Arg Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

30 <210> 66
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> región FR3 de cadena pesada de una nueva variante humanizada de alfa D11 (Hu nueva)

<400> 66

Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
1 5 10 15

Met His Ser Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

40 <210> 67
<211> 11
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> región FR4 de cadena pesada de una nueva variante humanizada de alfa D11 (Hu nueva)

<400> 67

5

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 68

<211> 453

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada completa de una versión caninizada de MAb anti-NGF alfa D11 - VH y HCA

15

<400> 68

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Asn Pro Gly Gly

1	5	10	15
Thr Leu Thr	Leu Ser Cys Val Val	Ser Gly Phe Ser Leu	Thr Asn Asn
	20	25	30
Asn Val Asn	Trp Val Arg Gln Ala Leu	Gly Arg Gly Leu	Glu Trp Val
	35	40	45
Gly Gly Val	Trp Ala Gly Gly Ala Thr	Asp Tyr Asn Ser	Ala Leu Lys
	50	55	60
Ser Arg Leu	Thr Ile Thr Arg Asp Thr	Ser Lys Ser Thr	Val Phe Leu
	65	70	75
Lys Met His	Ser Leu Gln Ser Glu Asp Thr	Ala Thr Tyr Tyr	Cys Ala
	85	90	95
Arg Asp Gly	Gly Tyr Ser Ser Ser Thr	Leu Tyr Ala Met	Asp Ala Trp
	100	105	110
Gly Gln Gly	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	Ala Ser Thr Thr	Ala Pro
	115	120	125
Ser Val Phe	Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly	Ser Thr Ser Gly	Ser Thr
	130	135	140
Val Ala Leu	Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr	Phe Pro Glu Pro	Val Thr
	145	150	155
Val Ser Trp	Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser	Gly Val His Thr	Phe Pro
	165	170	175
Ser Val Leu	Gln Ser Ser Gly Leu His Ser	Leu Ser Ser Met	Val Thr
	180	185	190
Val Pro Ser	Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr	Phe Thr Cys Asn	Val Val
	195	200	205
His Pro Ala	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	Pro Val Phe Asn	Glu Cys
	210	215	220
Arg Cys Thr	Asp Thr Pro Pro Cys Pro Val	Pro Glu Pro Leu	Gly Gly
	225	230	235
Pro Ser Val	Leu Ile Phe Pro Pro Lys Pro	Lys Asp Ile Leu	Arg Ile
	245	250	255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Ser Pro Gly Lys
450

<210> 69

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> dominio variable de cadena pesada de una versión canina alternativa de MAb anti-NGF alfa D11 - VH canino

<400> 69

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

- 5 <210> 70
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> cadena pesada completa de una versión caninizada alternativa de MAb anti-NGF alfa D11 - VH y HCA
- <400> 70

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Ser Pro Gly Lys
450

<210> 71

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio variable de cadena ligera actualizado de una versión canina de MAb anti-TNF de D2E7 humano - VK canino

<400> 71

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

ES 2 665 016 T3

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para modificar una inmunoglobulina donante para su uso en una especie diana, procedimiento que comprende las etapas de:

- identificar una inmunoglobulina donante de una especie distinta a la especie diana, en la que la inmunoglobulina donante tiene especificidad de unión a un epítipo diana presente en la especie diana,
- determinar una secuencia de aminoácidos de regiones marco conservadas de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina donante,
- comparar cada resto de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de las regiones marco conservadas de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina donante con un resto de aminoácido presente en una posición correspondiente en una secuencia de aminoácidos de regiones marco conservadas de una pluralidad de inmunoglobulinas obtenidas a partir de la especie diana para identificar uno o más restos de aminoácido dentro de la secuencia de aminoácidos de las regiones marco conservadas de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina donante que no está presente en la posición correspondiente en la secuencia de aminoácidos de las regiones marco conservadas de al menos una de la pluralidad de inmunoglobulinas obtenidas a partir de la especie diana, y
- sustituir el uno o más restos de aminoácidos identificados presentes en la secuencia de aminoácidos de las regiones marco conservadas de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina donante, pero no presentes en la posición correspondiente en la secuencia de aminoácidos de las regiones marco conservadas de al menos una de la pluralidad de inmunoglobulinas obtenidas a partir de la especie diana, con un resto de aminoácido que está presente en la posición correspondiente en la secuencia de aminoácidos de las regiones marco conservadas de al menos una de la pluralidad de inmunoglobulinas obtenidas a partir de la especie diana;
- en el que la inmunoglobulina donante modificada no contiene ningún aminoácido en ninguna posición dentro de las regiones marco conservadas que pudiera ser extraño en esa posición en la especie diana;

en el que la especie diana se selecciona entre el grupo que consiste en un perro, un gato, un caballo y un ser humano; y en el que la sustitución de un resto de aminoácido presente en la secuencia de aminoácidos de las regiones marco conservadas de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina donante se inicia usando el principio de sustitución conservativa.

2. El procedimiento como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la etapa de sustituir al menos un dominio constante de la cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina donante con un dominio constante de una cadena pesada y/o ligera obtenida a partir de una inmunoglobulina obtenida a partir de la especie diana.

3. Un anticuerpo neutralizante humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que es capaz de unirse de forma específica al factor de crecimiento nervioso humano (NGF) en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, en la que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo no contiene ningún aminoácido en ninguna posición dentro de las regiones marco conservadas que pudiera ser extraño en esa posición en una especie diana.

4. El anticuerpo neutralizante humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo como se reivindica en la reivindicación 3 en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 85 % con la misma.

5. El anticuerpo neutralizante humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo como se reivindica en la reivindicación 3 o en la reivindicación 4 en el que la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 85 % con la misma.

6. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo neutralizante humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 y al menos un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. El anticuerpo neutralizante humanizado o fragmento de unión a antígeno como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, o la composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 6, para su uso en el tratamiento o prevención de dolor en un ser humano.

8. El anticuerpo neutralizante humanizado o fragmento de unión a antígeno como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, o la composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 6, para su uso en el tratamiento de artritis en un ser humano.

Cadena Ligera**FR1**

aD11 de Rata	DIQMTQSPASLSASLGETVTIEC (SEQ ID NO:28)
VK Canino	DIVMTQSPASLSLSQEEKVTITC (SEQ ID NO:29)
VK Felino	DIVMTQTPLSLSVTPGEPASISC (SEQ ID NO:30)
VK Equino	DIVMTQSPASLSASLGETVTIEC (SEQ ID NO:31)

FR2

aD11 de Rata	WYQQKPGKSPQLLIY (SEQ ID NO:32)
VK Canino	WYQQKPGQAPKLLIY (SEQ ID NO:33)
VK Felino	WYLQKPGQSPRRLIY (SEQ ID NO:34)
VK Equino	WYQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:35)

FR3

aD11 de Rata	GVPSRFGSGSGTQYSLKINSLQSEDVASYFC (SEQ ID NO:36)
VK Canino	GVPSRFGSGSGTEFSLTISSLEPEDVAVYYC (SEQ ID NO:37)
VK Felino	GVPDRLFSGSGSGTDFTLRISRVEADDVGVIYFC (SEQ ID NO:38)
VK Equino	GVPSRFGSGSGTDYSLTINSLQSEDVASYFC (SEQ ID NO:39)

FR4

aD11 de Rata	FGGGTKLELK (SEQ ID NO:40)
VK Canino	FGAGTKVELK (SEQ ID NO:41)
VK Felino	FGPGTKLEIK (SEQ ID NO:42)
VK Equino	FGQGTKLELK (SEQ ID NO:43)

Figura 1

Cadena Pesada**FR1**

aD11 de Rata	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGF (SEQ ID NO:44)
VH Canino	EVQLVESGGDLVNPGGTLTLSCVVS GF (SEQ ID NO:45)
VH Felino	QVQLVESGGDLVQPGGSLRLTCAASGF (SEQ ID NO:46)
VH Equino	QVQLKESGPGLVNPSQTLSTCTVSGF (SEQ ID NO:47)

FR2

aD11 de Rata	WVRQATGRGLEWMG (SEQ ID NO:48)
VH Canino	WVRQALGRGLEWVG (SEQ ID NO:49)
VH Felino	WVRQAPGKGLEWMG (SEQ ID NO:50)
VH Equino	WVRQAPGKGLEWVG (SEQ ID NO:51)

FR3

aD11 de Rata	RLTITRDTSKSQVFLKMHSLSQSEDTATYYCAR (SEQ ID NO:52)
VH Canino	RLTITRDTSKSTVFLQMHSLSRSEDTATYYCAR (SEQ ID NO:53)
VH Felino	RFTISRDNAKNTLYLQMNLSKTEDTATYYCAR (SEQ ID NO:54)
VH Equino	RATITRDTSKSQVFLQMNSLTSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:55)

FR4

aD11 de Rata	WGQGT T TVTVSS (SEQ ID NO:56)
VH Canino	WGQGT L TVTVSS (SEQ ID NO:57)
VH Felino	WGQGT L TVTVSS (SEQ ID NO:58)
VH Equino	WGQGILTVTVSS (SEQ ID NO:59)

Figura 2

SEQ ID NO:1 – VK CANINO

DIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGQAPKLLIYNTDTLHTG
VPSRFSGSGSGTEFSLTISSLEPEDVAVYYCQHYFHYPRTFGAGTKVELK

SEQ ID NO:2 – VH CANINO

EVQLVESGGDLVNPGGTLTLSCVVSGFSLTNNNVNWVRQALGRGLEWVGGVWA
GGATDYNSALKSRLTITRDTSKSTVFLQMHSRSEDATYYCARDGGYSSSTLYA
MDAWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:7 – VK CANINO Y CONSTANTE DE CADENA LIGERA KAPPA DE CANINO

DIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGQAPKLLIYNTDTLHTG
VPSRFSGSGSGTEFSLTISSLEPEDVAVYYCQHYFHYPRTFGAGTKVELKRNDQ
PAVYLFQSPDQLHTGSASVVCLLSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDK
DSTYLSSTLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFRSECQRVD

SEQ ID NO:8 – VH CANINO Y CONSTANTE DE CADENA PESADA B DE CANINO

EVQLVESGGDLVNPGGTLTLSCVVSGFSLTNNNVNWVRQALGRGLEWVGGVWA
GGATDYNSALKSRLTITRDTSKSTVFLQMHSRSEDATYYCARDGGYSSSTLYA
MDAWGQGTLVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVS
WNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPASKTKV
DKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVV
DLDPEDPEVQISWFDGKQMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQ
FTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPSSREELSKNTVSLTCLIKDFYPP
DIDVEWQSNQQEPESKYRTTPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAV
MHEALHNHYTQESLSHSPGK

Figura 3

SEQ ID NO:3 – VK FELINO

DIVMTQTPLSLSVTPGEPASISCRASEDIYNALAWYLQKPGQSPRRLIYNTDTLHTGV
PDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDVGVYFCQHYFHYPRTFGPGTKLEIK

SEQ ID NO:4 – VH FELINO

QVQLVESGGDLVQPGGSLRLTCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGLEWMGGVWA
GGATDYNALKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKTEDTATYYCARDGGYSSSTLYAM
DAWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:9 – VK FELINO Y CONSTANTE DE CADENA LIGERA KAPPA
DE FELINO

DIVMTQTPLSLSVTPGEPASISCRASEDIYNALAWYLQKPGQSPRRLIYNTDTLHTGV
PDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDVGVYFCQHYFHYPRTFGPGTKLEIKRSDAQPS
VFLFQPSLDELHTGSASIVCILNDFYPKEVNVKWKVDGVVQTKASKESTTEQNSKDS
TYSLSSTLTMSRTEYQSHEKFSCEVTHKSLASTLVKSFNRSECQRE

SEQ ID NO:10 – VH FELINO Y CONSTANTE DE CADENA PESADA DE FELINO

QVQLVESGGDLVQPGGSLRLTCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGLEWMGGVWA
GGATDYNALKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKTEDTATYYCARDGGYSSSTLYAM
DAWGQGTLVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGTTSGATVALACLVLGYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQASGLYSLSMVTVPSSRWLSDTFTCNVAHPPSNTKVDKTVR
KTDHPPGPKPCDCPKCPPPEMLGGPSIFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLGPDD
SDVQITWFDNTQVYAKTSPREEQFNSTYRVVSVLPILHQQDWLKGKEFKCKVNSK
SLPSPIERTISKAKGPHEPQVYVLPAAQEELSRNKVSVTCLIKSFHPPDIAVEWEIT
GQPEPENNYRTTPQLDSDGTYFVYSKLSVDRSHWQRGNTYTCVSHALSHHT
QKSLTQSPGK

Figura 4

SEQ ID NO:5 – VK EQUINO

DIVMTQSPASLSASLGETVTIECRASEDIYNALAWYQQKPGQSPKLLIYNTDTLHTG
VPSRFSGSGSGTDYSLTINSLQSEDVASYFCQHYFHYPRFTFGQGTKLELK

SEQ ID NO:6 - VH EQUINO

QVQLKESGPGLVNPSQTLSTCTVSGFSLTNNNVNWVRQAPGKGLEWVGGVWA
GGATDYNALSKSRATITRDTSKQVFLQMNSLTSEDVAVYYCARDGGYSSSTLYA
MDAWGQGILVTSS

SEQ ID NO: 11 – VK EQUINO Y CONSTANTE DE CADENA LIGERA KAPPA DE FELINO

DIVMTQSPASLSASLGETVTIECRASEDIYNALAWYQQKPGQSPKLLIYNTDTLHTG
VPSRFSGSGSGTDYSLTINSLQSEDVASYFCQHYFHYPRFTFGQGTKLELKRDDAK
PSAIFPPSSEELSSGSASVVCLVYGFPYSGATINWKVDGLAKTSSFHSSLTEQDS
KDNTYLSSTLTLPKADYEAHNVYACEVSHKTLSSPLVKSFKRQDC

SEQ ID NO: 12 – VH EQUINO Y CONSTANTE DE CADENA PESADA 2 DE EQUINO

QVQLKESGPGLVNPSQTLSTCTVSGFSLTNNNVNWVRQAPGKGLEWVGGVWA
GGATDYNALSKSRATITRDTSKQVFLQMNSLTSEDVAVYYCARDGGYSSSTLYA
MDAWGQGILVTSSASTTAPKYFQLTPSCGITSATVALGCLVSDYYPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPSVLQSSGLYALSSMVTVPASTWTSETYICNVAHPASSTKVDK
RIPPCVLSAEGVPIPSVPPKQCPYPYTHSKFLGGPSVFIFPPNPKDALMISRTPVVTC
VVVNLSDQYPDVQFSWYVDNTEVHSAITKQREAFNSTYRVVSVLPVQHQQDWLS
GKEFKCSVTNVGVPQIPISRAISRGKGPSRVPPQVYVLPHPDELAKSKVSVTCLVKD
FYPPDISVEWQSNRWPELEGKYSTTPAQLDGGSYFLYSKLSLETSRWQQVESF
TCAVMHEALHNHFTKTDISESLGK

Figura 5

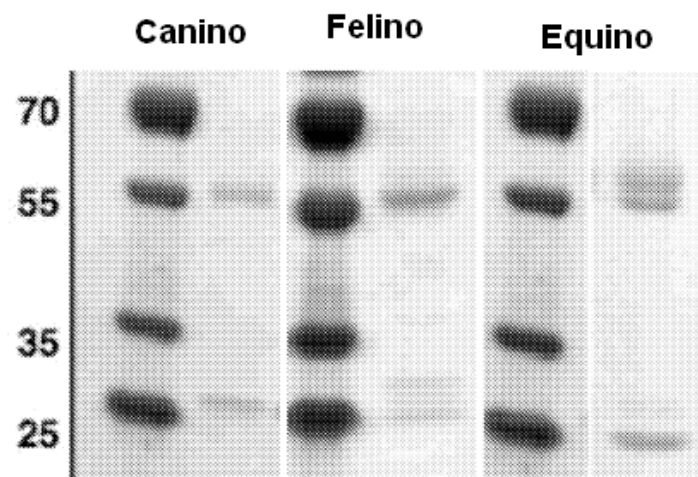


Figura 6

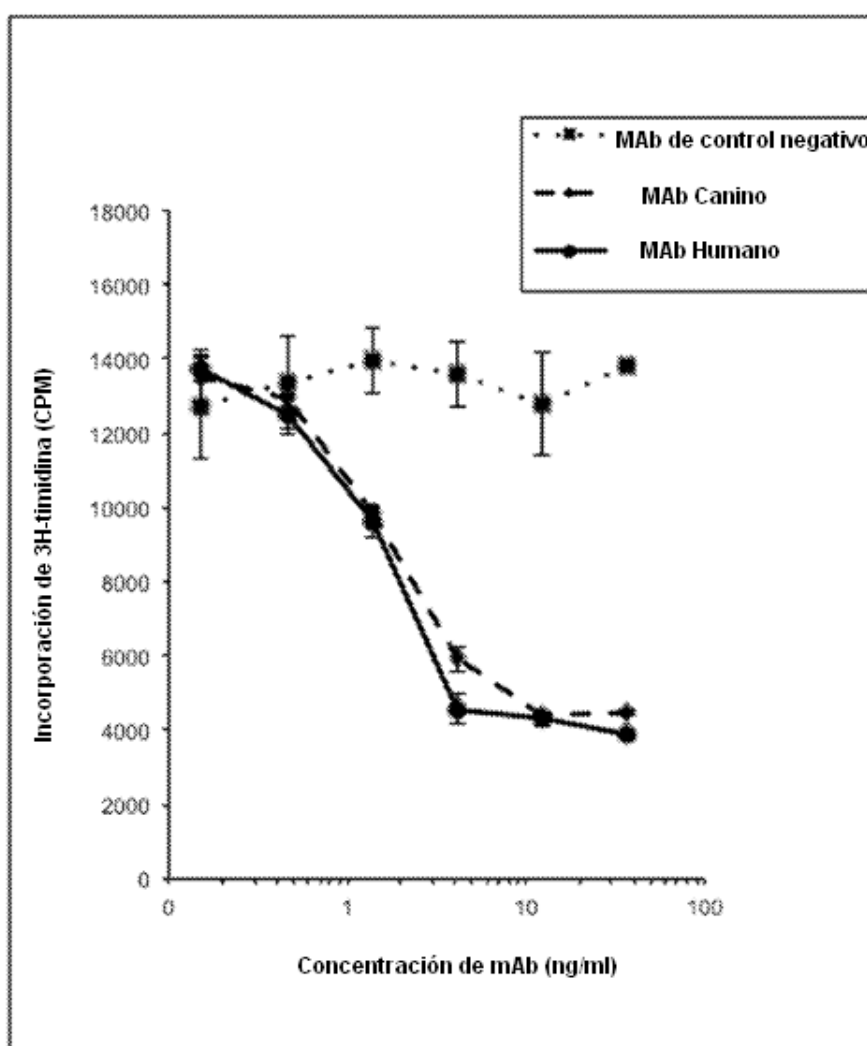


Figura 7A

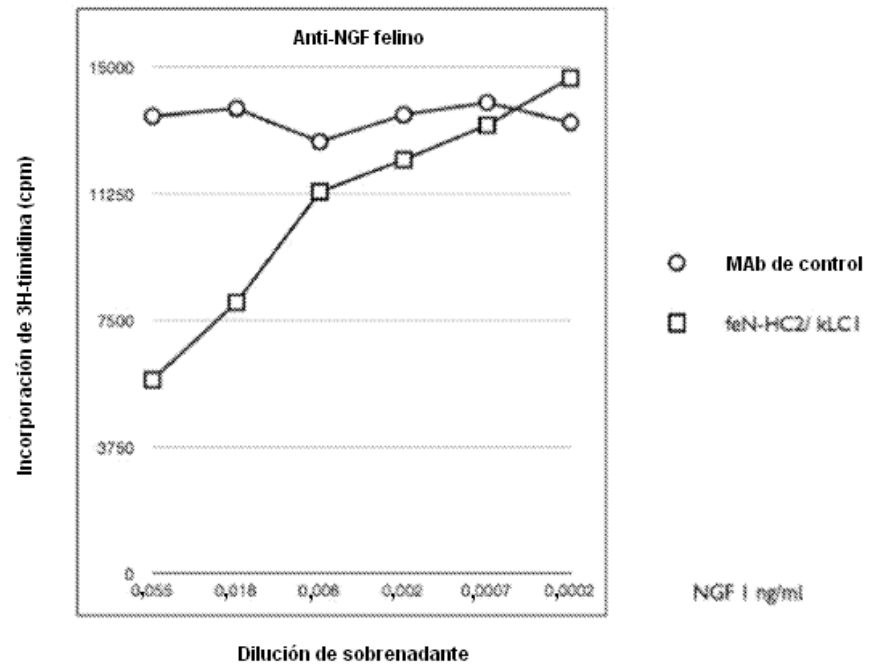


Figura 7B

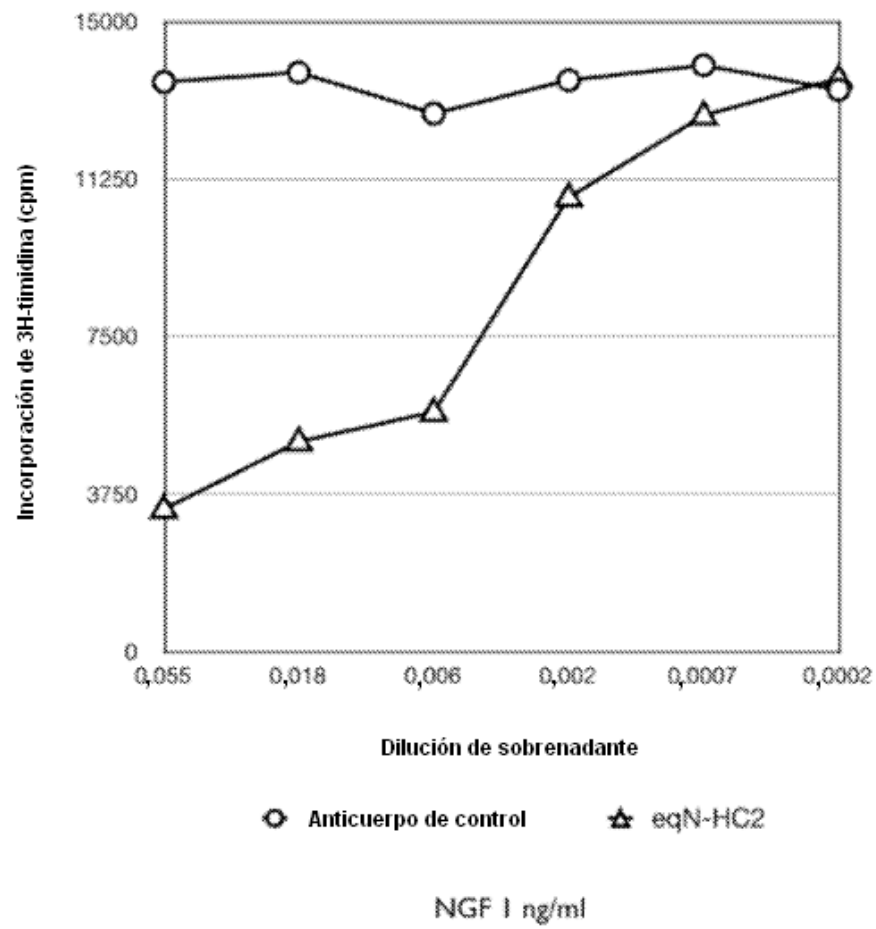
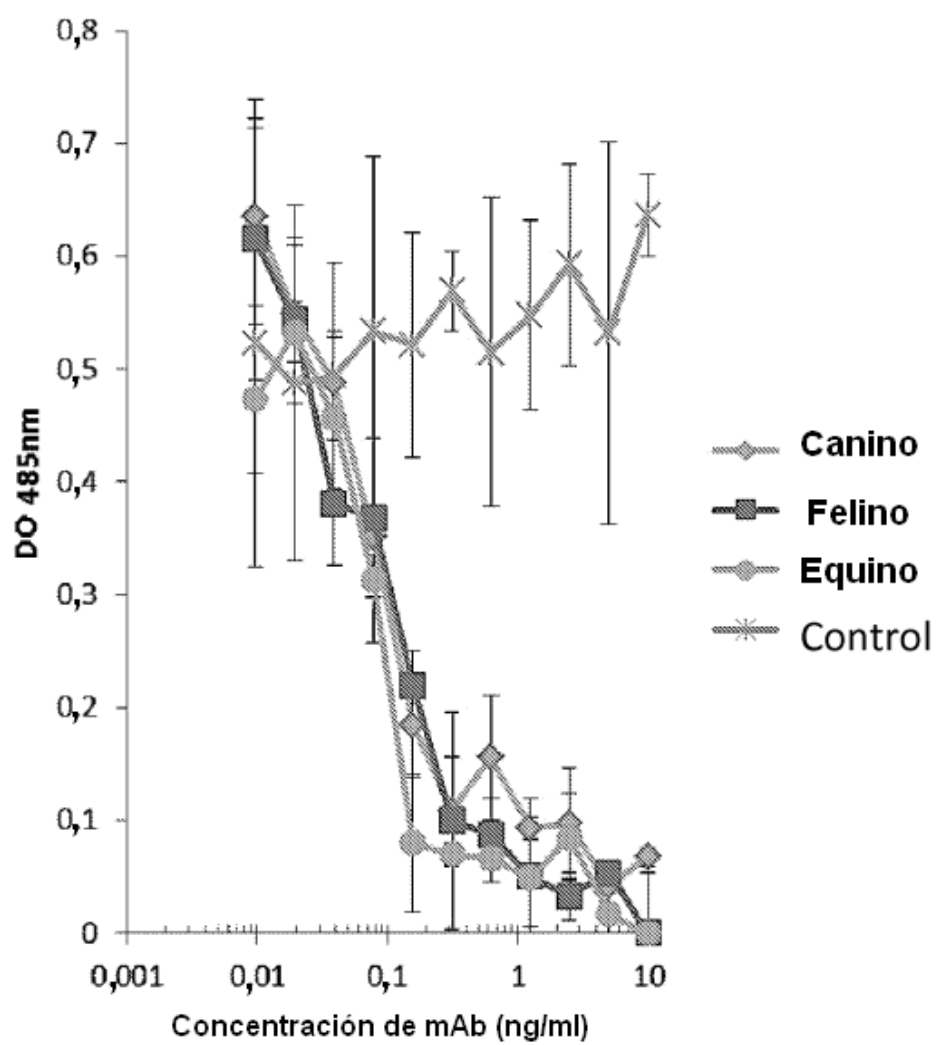


Figura 7C

**Figura 7D**

Cadena ligera

FR1 de LC de Hu Nueva	DIQMTQSPASLSASLG	SEQ ID NO:60
aD11 de Rata de Ruberti	TVTINC	
Hu-aD11 de Pavone	S V DR T	

FR2 de LC de Hu Nueva	WYQQKPGKSPQLLIY	SEQ ID NO:61
aD11 de Rata de Ruberti		
Hu-aD11 de Pavone	A K	

FR3 de LC de Hu Nueva	GVPSRFGSGSGTEYSLKINS	SEQ ID NO:62
aD11 de Rata de Ruberti	LQSEDVASYFC	
Hu-aD11 de Pavone	Q D T T S P F T	

FR4 de LC de Hu Nueva	FGGGTKLEIK	SEQ ID NO:63
aD11 de Rata de Ruberti	L	
Hu-aD11 de Pavone	Q V I	

Figura 8A

Cadena pesada

FR1 de HC de Hu Nueva	QVQLKESGFGGLVQPSQTLSTCTVSGF	SEQ ID NO:64
aDil de Rata de Ruberti		
Hu-aDil de Pavone	E V G GGS R S AA	
FR2 de HC de Hu Nueva	WVRQASGRGLEWNG	SEQ ID NO:65
aDil de Rata de Ruberti	T	
Hu-aDil de Pavone	P K V	
FR3 de HC de Hu Nueva	RLTITRDTSKRSQVFLKMHSIQSEDTATYYCAR	SEQ ID
aDil de Rata de Ruberti		NO:66
Hu-aDil de Pavone	F S N NTAY Q N RA V	
FR4 de HC de Hu Nueva	WGQGTITVTVSS	SEQ ID NO:67
aDil de Rata de Ruberti	S	
Hu-aDil de Pavone	L	

Figura 8B

SEQ ID NO:13 VL de Hu α D11 Nueva

DIQMTQSPASLSASLGETVTINCRASEDIYN
ALAWYQQKPGKSPQLLIYNTDTLHTGVPS
RFSGSGSGTEYSLKINSLSQSEDVASYFCQ
HYFHYPRTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:14 VH de Hu α D11 Nueva

QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSL
TNNNVNWVRQASGRGLEWMGGVWAGGA
TDYNSALKSRLTITRDTSKSQVFLKMHSLQ
SEDTATYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQ
GTTVTVSS

Figura 9A

SEQ ID NO:24 - HC-IgG4 completa de Hu

α D11 Nueva

MAVLVLLLCLVTFPTCVLSQVQLKESGPGLVQPSQTLS
LTCTVSGFSLTNNNVNWVRQASGRGLEWMGGVWAG
GATDYN SALKSRLTITRDTSKSQVFLKMHSLQSED TAT
YYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGTTVTVSSASTKGP
SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKY
TCNV DHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK**

SEQ ID NO:25 - LC kappa completa de Hu Nueva

MGVPTQLLGLLLLWITDAICDIQMTQSPASLSASLGE
TVTINCRASEDIYNALAWYQQKPGKSPQLLIYNTDTL
HTGVPSRFSGSGSGTEYSLKINSLSQSEDVASYFCQH
YFHYPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC**

Figura 9B

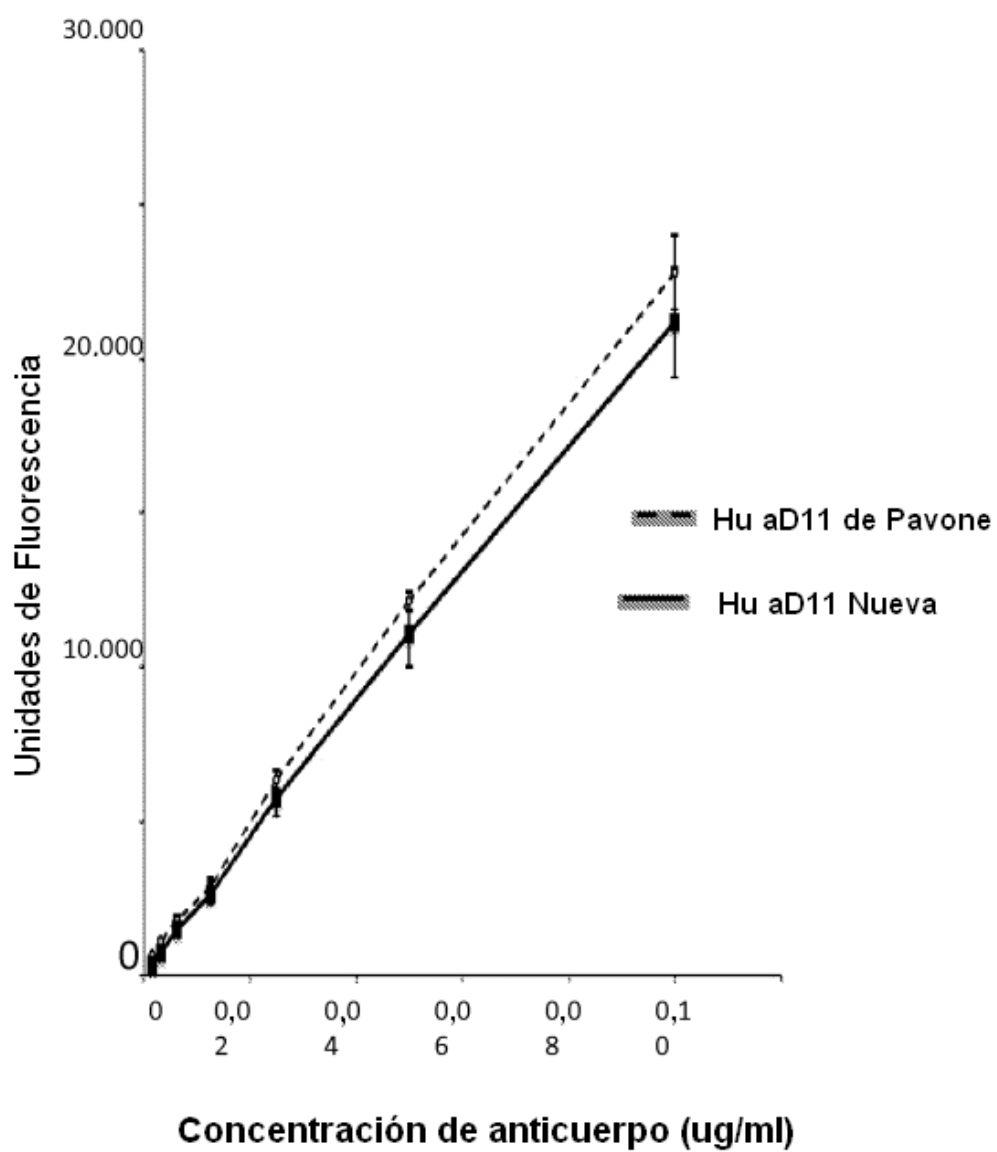


Figura 9C

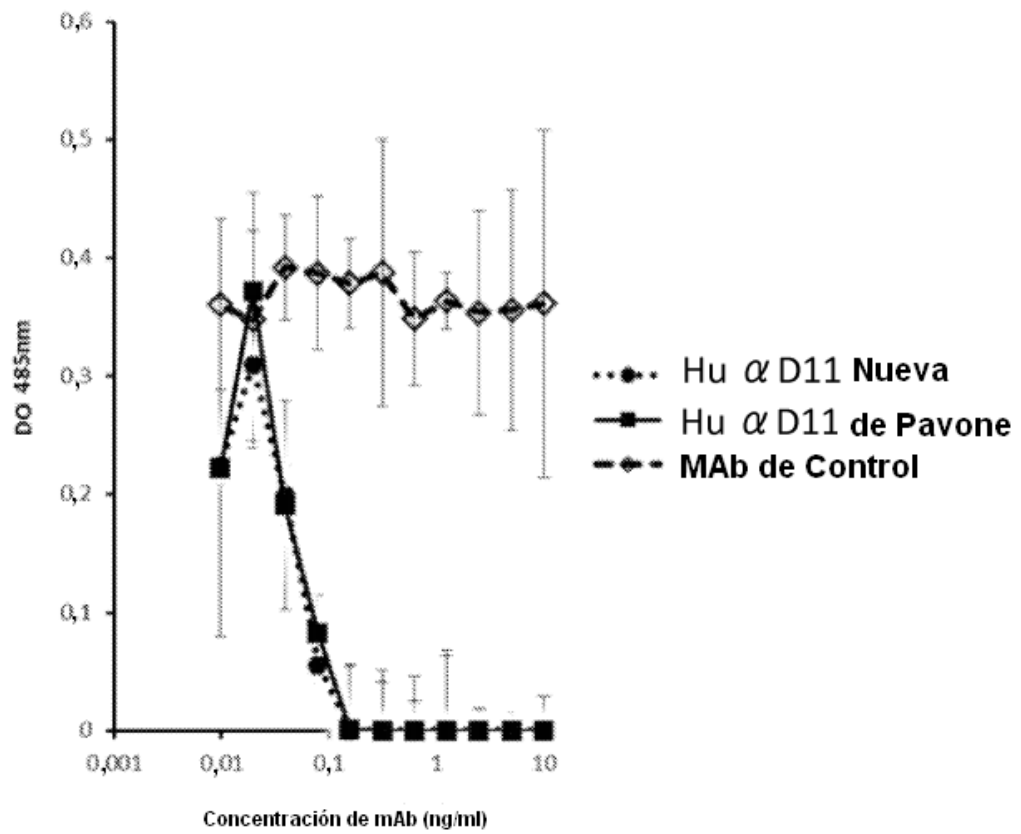


Figura 9D

**SEQ ID NO 15: Dominio de VK de Mab anti-TNF
Caninizado**

**DIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCRASQGIRNYLA
WYQQKPGQAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISSELPEDVAVYYCQRYNRAPYTFGQG
TKVEIK**

**SEQ ID NO 16: Dominio de VH de Mab anti-TNF
Caninizado**

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDY
AMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSV
EGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
KVSYLSTASSLDYWGQGTLVTVSS**

Figura 10

**SEQ ID NO 17: Cadena ligera kappa de MAb anti-TNF
Caninizado**

**DIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCRASQGIRNYLA
WYQQKPGQAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISSELPEDVAVYYCQRYNRAPYTFGQG
TKVEIKRNDAPAVYLFQPSPDQLHTGSASVVC
LLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDK
DSTYSLSSTLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPST
LIKSFQRSECQRVD***

Figura 11

SEQ ID NO 18: Dominio constante de tipo cadena pesada A de Mab anti-TNF caninizado

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDY
 ADSVEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLVTVS
 SASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFSPVLQS
 SGLHSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVHPASNTKVDKPVFNCRCTDTPPCPVPEPLGGP
 SVLIFPPKPKDILRITRTPEVTCVVDLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHTAKTQSQEQFNG
 TYRVVSVLPPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIDLPSPERTISKARGRAHKPSVYVLPSPKEL
 SSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNQQEPERKHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKS
 RWQQGDPFTCAVMHETLQNHYTDLSSLHSPGK*

SEQ ID NO 19: Dominio constante de tipo cadena pesada B de Mab anti-TNF caninizado

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDY
 ADSVEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLVTVS
 SASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFSPVLQS
 SGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPASKTKVDKPVKRENGRVPRPDCPKCPAPE
 MLGGPSVFIFFPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPRE
 EQFNGTYRVVSVLPPIGHQDWLGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLP
 SREELSKNTVSLTCLIKDFYPPDIDVEWQSNQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLS
 VDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLSHSPGK*

SEQ ID NO 20: Dominio constante de tipo cadena pesada C de Mab anti-TNF caninizado

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDY
 ADSVEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLVTVS
 SASTTAPSVFPLAPSCGSQSGSTVALACLVSGYIPEPVTVSWNSVSLTSGVHTFSPVLQS
 SGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPATNTKVDKPVAKCECKCNCNCPGCGLL
 GGPSVFIFFPKPKDILVTARTPTVTCTVVVDLDPENPEVQISWFVDSKQVQTANTQPREEQ
 SNGTYRVVSVLPPIGHQDWLSGKQFKCKVNNKALPSPIEEIISKTPGQAHQPNVYVLP
 DEMSKNTVTLTCLVKDFPPEIDVEWQSNQQEPESKYRMTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVD
 KSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQISLSHSPGK*

SEQ ID NO 21: Dominio constante de tipo cadena pesada D de Mab anti-TNF caninizado

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDY
 ADSVEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLVTVS
 SASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFSPVLQS
 SGLYSLSSSTVTPSSRWPSETFTCNVHPASNTKVDKPVPKESTCKCISPCFPVPESLGGP
 SVFIFFPKPKDILRITRTPEITCVVDLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHTAKTQPREQQFNS
 TYRVVSVLPPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIGLPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPSPKEL
 SSSDTVTLTCLIKDFYPPDIDVEWQSNQQEPESKYHTTAPQLDEDGSYFLYSKLSVDKS
 RWQQGDTFTCAVMHEALQNHYTDLSSLHSPGK*

Figura 12

SEQ ID NO 22: MAb anti-TNF quimérico. Cadena ligera kappa de
VK Humano – canino

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYA
ASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQ
GTKVEIKRNDAPAVYLFQSPDQLHTGSASVVCLLNSFYPKDINVWKV
DGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYSLSSSTLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSL
PSTLIKSFQRSECQRVD*

SEQ ID NO 23: MAb anti-TNF quimérico. Dominio constante de cadena
pesada de tipo B de VH Humano – canino

EVQLVESGGGLVQPGRSRLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSA
ITWNSGHIDYADSVETRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVS
YLSTASSLDYWGQGTILTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLV
SGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSE
TFTCNVAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIF
PPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFDGKQMOTAKTQPRE
EQFNQTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQA
HQPSVYVLPSSREELSKNTVSLTCLIKDFYPPDIDVEWQSNQQEPESKY
RTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESL
SHSPGK*

Figura 13

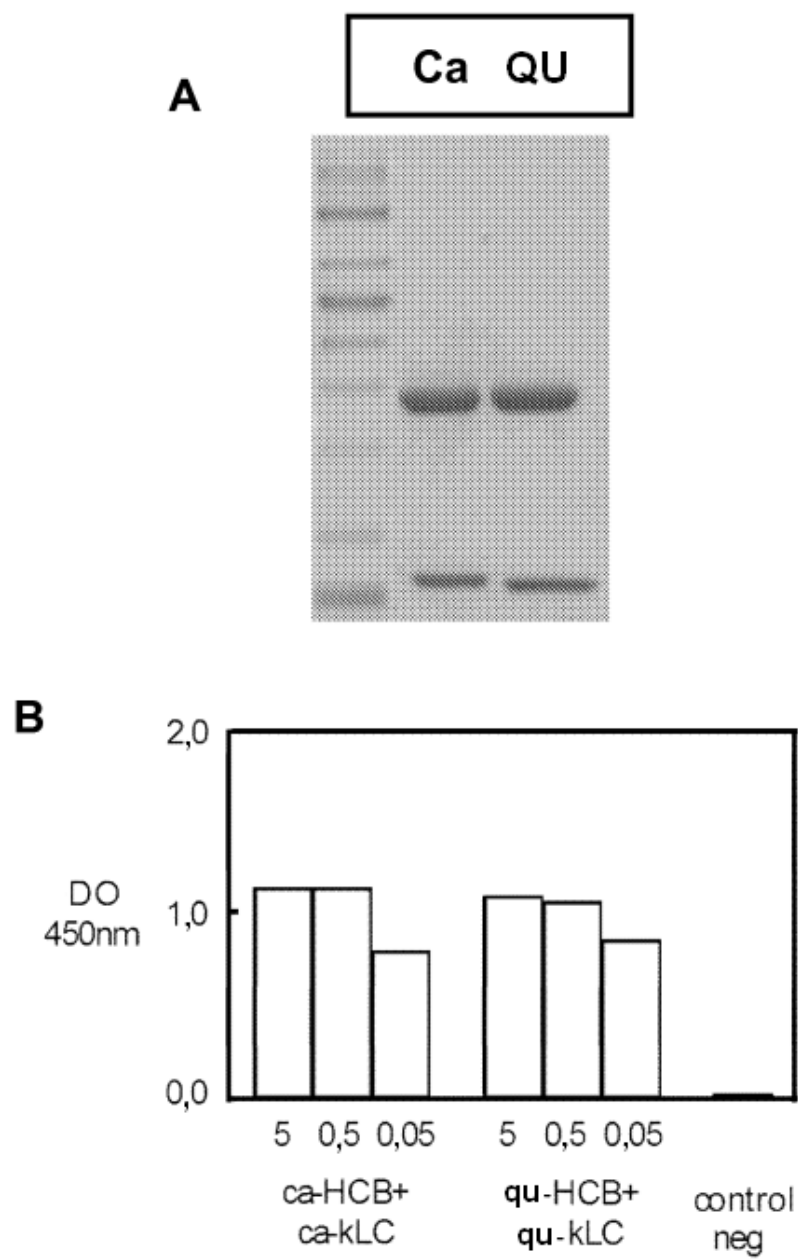


Figura 14

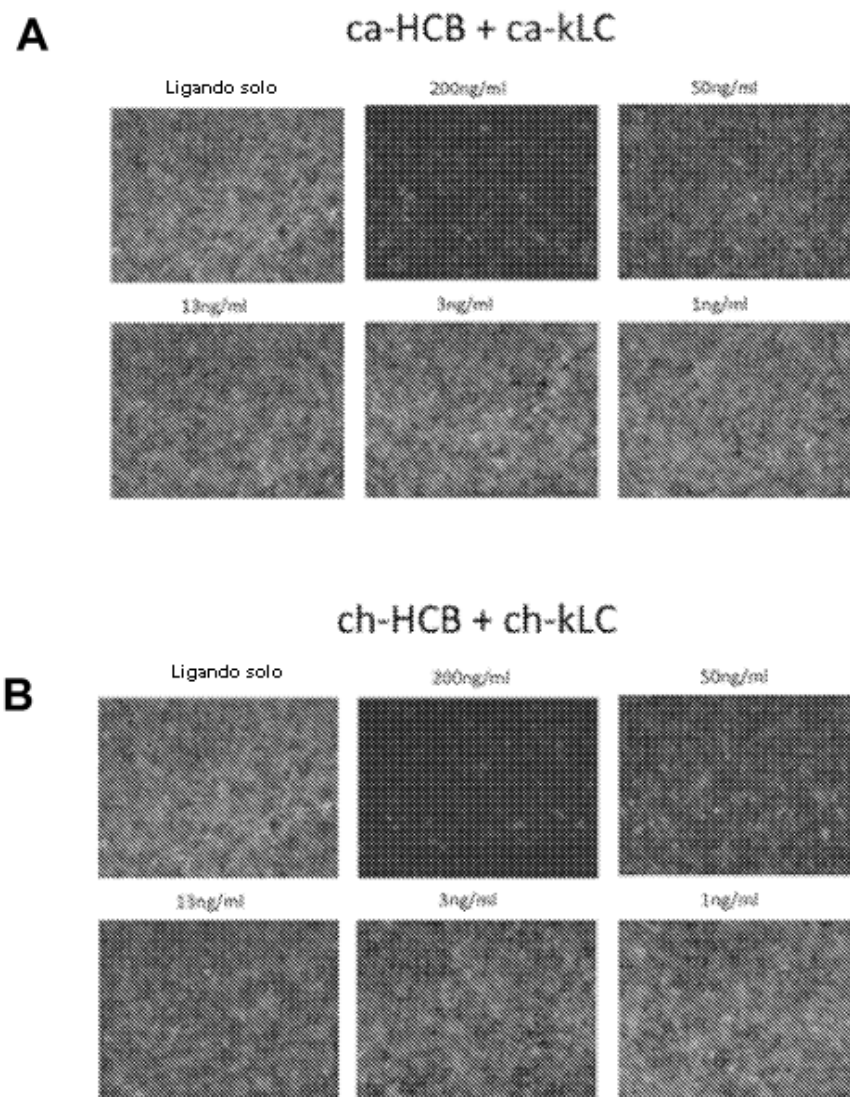


Figura 15

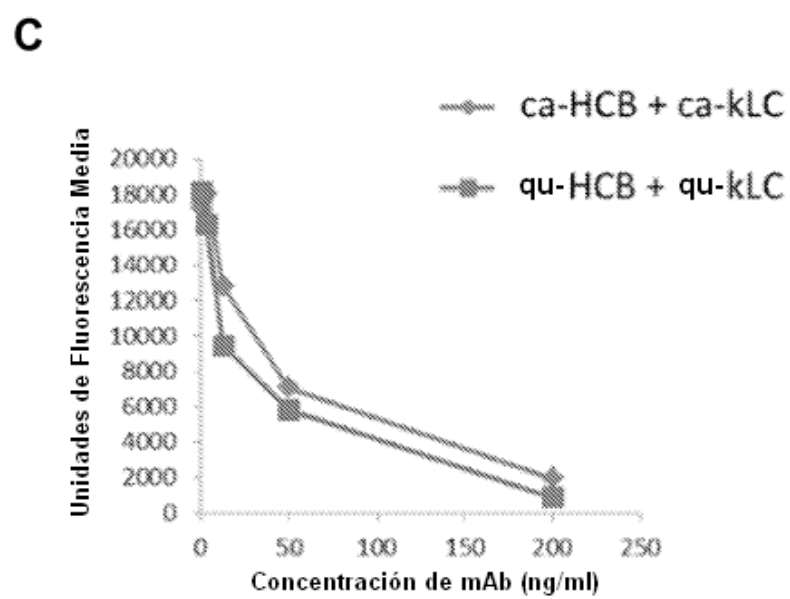


Figura 15

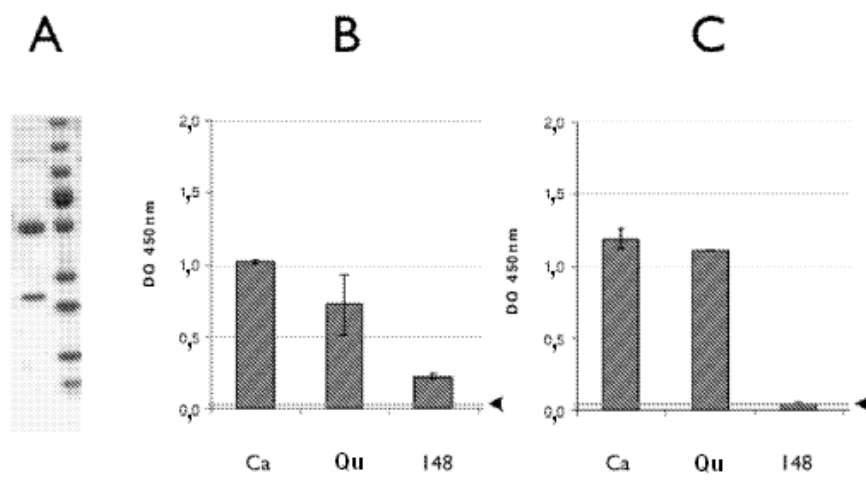


Figura 16

SEQ ID NO:26 - Cadena pesada de ca148-HCB

MGFGLSWVFLVALLRGVQCEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS
GFIFSSYAMRWVRQAPGKGLEWVAFMSYDGSNKKYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGIAAGGNYYYYGMD
VWGQGTSTVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYF
PEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWP
SETFTCNVAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPEML
GGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFDGK
QMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNK
ALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFY
PPDIDVEWQSNQEQEPESKYRTTPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSR
WQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLSHSPGK**

SEQ ID NO:27 - Cadena ligera de ca148-kLC

MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVMTQSPASLSLSPGEKATISCRAS
QSVYSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISSELPEDVAVYYCQQPSNWPPFTFGPGTKVDIKRNDAPPA
VYLFQPSPDQLHTGSASVVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGI
QESVTEQDKDSTYSLSSTLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLI
KSFQRSECQRVD**

Figura 17

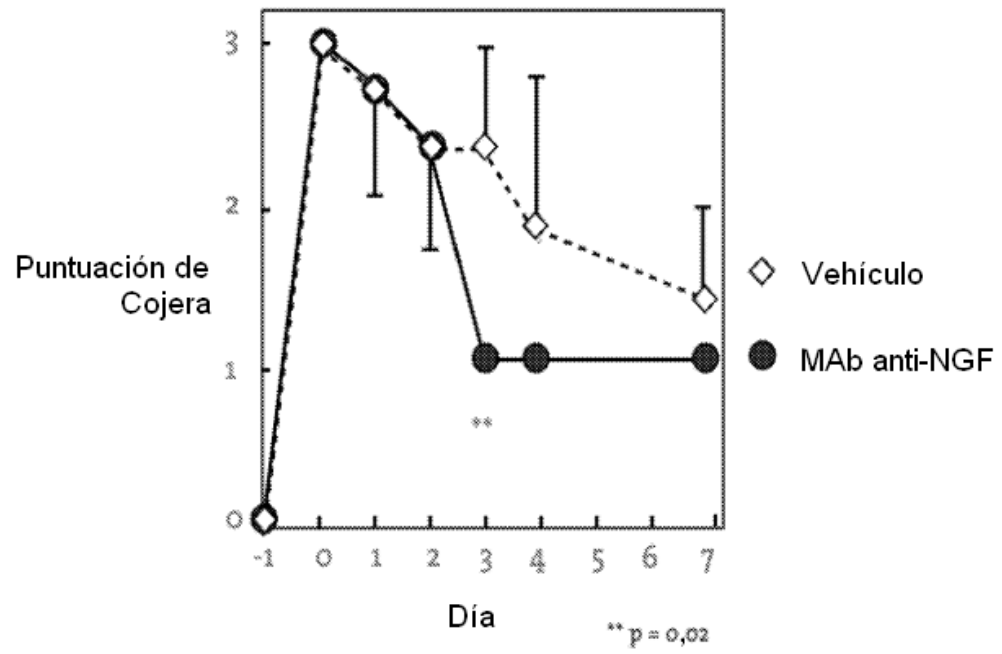


Figura 18