

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 954**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/22** (2006.01)

**G01N 33/566** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.08.2011 PCT/US2011/048518**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2012 WO12024650**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2011 E 11767319 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2606067**

54 Título: **Anticuerpos anti-NGF y su uso**

30 Prioridad:

**19.08.2010 US 375193 P**

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

**30.04.2018**

73 Titular/es:

**ZOETIS BELGIUM S.A. (100.0%)  
1, Rue Laid Burniat  
1348 Louvain-la-Neuve, BE**

72 Inventor/es:

**LACEY, SUSAN E.;  
BARBON, JEFFREY A.;  
CHHAYA, MEHA;  
FUNG, EMMA;  
HUTCHINS, CHARLES W.;  
LANG, DIANE M.;  
BARLOW, EVE H.;  
LEDDY, MARY y  
CHARI, RAVI**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 665 954 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-NGF y su uso

**Campo técnico**

5 La divulgación se refiere a anticuerpos anti-NGF y polinucleótidos que codifican los mismo, y uso de dichos anticuerpos y/o polinucleótidos en el tratamiento y/o la prevención del dolor, incluyendo, aunque no de forma limitativa, dolor posterior a cirugía, dolor de artritis reumatoide, dolor de cáncer, y dolor de artrosis.

**Antecedentes**

10 El factor de crecimiento nervioso (NGF) es una proteína secretada que se descubrió hace más de 50 años como una molécula que promueve la supervivencia y la diferenciación de las neuronas sensoriales y simpáticas. (Véase Levi-Montalcini, Science 187: 113 (1975), para una revisión). Se ha determinado la estructura cristalina de NGF y NGF en complejo con el receptor de la tirosinaquinasa A (TrkA) (McDonald y col., Nature 354: 411 (1991); Wiesmann y col., Nature 401: 184-188 (1999)).

15 Se ha caracterizado bien el papel de NGF en el desarrollo y la supervivencia de neuronas periféricas y centrales. Se ha mostrado que NGF es un factor de supervivencia y mantenimiento crítico en el desarrollo de las neuronas simpáticas periféricas y sensoriales del embrión y de las neuronas colinérgicas del cerebro anterior basal (véase, por ejemplo., Smeyne y col., Nature 368: 246-9 (1994); y Crowley y col., Cell, 76:1001-11 (1994)). Ha mostrado inhibir la amiloidogénesis que conduce a la enfermedad de Alzheimer (Calissano y col., Cell Death and Differentiation, 17: 1126-1133 (2010)). NGF regula en exceso la expresión de neuropéptidos en neuronas sensoriales (Lindsay y col., Nature, 337:362-364 (1989)) y su actividad está mediada mediante dos receptores diferentes unidos a membrana, el receptor de TrkA y el receptor p75 de la neurotrofina común (Chao y col., Science, 232:518-521 (1986); Huang y col., Annu. Rev. Neurosci., 24:677-736 (2001); Bibel y col., Genes Dev., 14:2919-2937 (2000)).

20 NGF es producido por numerosos tipos de células que incluyen mastocitos (Leon, y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 91:3739-3743 (1994)), Linfocitos B (Torcia, y col., Cell, 85: 345-356 (1996), queratinocitos (Di Marco, y col., J. Biol. Chem., 268: 22838-22846)), células del músculo liso (Ueyama, y col., J. Hypertens., 11:1061-1065 (1993)), fibroblastos (Lindholm, y col., Eur. J. Neurosci., 2:795-801 (1990)), células epiteliales bronquiales (Kassel, y col., Clin. Exp. Allergy, 31:1432-40 (2001)), células mesangiales renales (Steiner, y col., Am. J. Physiol., 261:F792-798 (1991)) y miotubos del músculo esquelético (Schwartz, y col., J Photochem. Photobiol., B66: 195-200 (2002)). Además, Se han encontrado receptores de NGF en una variedad de tipos de células fuera del sistema nervioso.

30 Se ha implicado a NGF en procesos fuera del sistema nervioso, *por ejemplo*, Se ha mostrado que NGF potencia la permeabilidad vascular (Otten, y col., Eur J Pharmacol., 106:199-201 (1984)), potencia las respuestas inmunitarias de los linfocitos T y B (Otten, y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 86: 10059-10063 (1989)), induce la diferenciación de los linfocitos y la proliferación de mastocitos y produce la liberación de señales biológicas solubles desde los mastocitos (Matsuda, y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 85: 6508-6512 (1988); Pearce, y col., J. Physiol., 372:379-393 (1986); Bischoff, y col., Blood, 79: 2662-2669 (1992); Horigome, y col., J. Biol. Chem., 268: 14881-14887 (1993)).

35 Las administraciones local y sistémica de NGF han mostrado estimular la hiperalgesia y la alodinia (Lewin, G.R. y col., Eur. J. Neurosci. 6: 1903-1912 (1994)). La infusión intravenosa de NGF en seres humanos produce una mialgia de todo el cuerpo mientras que la administración local evoca hiperalgesia en el sitio de inyección y alodinia además de los efectos sistémicos (Apfel, S.C. y col., Neurology, 51: 695-702(1998)). Además, en determinadas formas de cáncer, el NGF en exceso facilita el crecimiento y la infiltración de fibras nerviosas con inducción de dolor de cáncer (Zhu, Z. y col., J. Clin. Oncol., 17: 241-228 (1999)). Aunque el NGF añadido exógenamente ha mostrado ser capaz de tener todos estos efectos, es importante señalar que esto ha mostrado solo raramente que el NGF es importante en cualquiera de estos procesos *in vivo* (Torcia, y col., Cell, 85(3): 345-56 (1996)).

45 Se ha implicado un nivel elevado de NGF en determinadas dolencias inflamatorias en seres humanos y animales, por ejemplo, lupus sistémico eritematoso (Bracci-Laudiero, y col., Neuroreport, 4:563-565 (1993)), esclerosis múltiple (Bracci-Laudiero, y col., Neurosci. Lett., 147:9-12 (1992)), psoriasis (Raychaudhuri, y col., Acta Derm. l'eneeol., 78:84-86 (1998)), artritis (Falcim, y col., Ann. Rheum. Dis., 55:745-748 (1996)), cistitis intersticial (Okragly, y col., J. Urology, 161: 438-441 (1999)) y asma (Braun, y col., Eur. J Immunol., 28:3240-3251 (1998)). El sinovio de los pacientes afectados por artritis reumatoide expresa altos niveles de NGF mientras que en el sinovio no inflamado se ha notificado que NGF es indetectable (Aloe, y col., Arch. Rheum., 35:351-355 (1992)). Se observan resultados similares en ratas con artritis reumatoide inducida experimentalmente (Aloe, y col., Clin. Exp. Rheumatol., 10: 203-204 (1992)). Se han notificado niveles elevados de NGF en ratones artríticos transgénicos junto con un aumento en el número de mastocitos (Aloe, y col., Int. J. Tissue Reactions-Exp. Clin. Aspects, 15: 139-143 (1993)). Adicionalmente, se han mostrado niveles elevados de expresión de NGF de cánidos en perros cojos (Isola, M., Ferrari, V., Stabile, F., Bernardini, D., Carnier, P., Busetto, R. Nerve growth factor concentrations in the synovial fluid from healthy dogs and dogs with secondary osteoarthritis. Vet. Comp. Orthop. Traumatol. 4: 279 (2011)). La publicación PCT n.º WO 02/096458 desvela el uso de anticuerpos anti-NGF de determinadas propiedades en el tratamiento de diversos trastornos relacionados con NGF tales como dolencias inflamatorias (por ejemplo, artritis reumatoide). Se ha notificado que un anticuerpo anti-NGF purificado inyectado en ratones transgénicos artríticos que

transportan el gen del factor de necrosis tumoral (TNF) produjeron una reducción en el número de mastocitos, así como una disminución en los niveles de histamina y sustancia P en el sinovio de ratones artríticos (Aloe y col., *Rheumatol. Int.*, 14: 249-252 (1995)). Se ha mostrado que la administración exógena del anticuerpo anti-NGF redujo el nivel potenciado de TNF que se produce en ratones artríticos (Manni y col., *Rheumatol. Int.*, 18: 97-102 (1998)).

5 Se observó una expresión aumentada de NGF y un receptor de NGF de alta afinidad (TrkA) en condrocitos de artrosis humana (Iannone y col., *Rheumatology*, 41: 1413-1418 (2002)). Se han notificado anticuerpos antagonistas de roedores dirigidos contra NGF (Hongo y col., *Hybridoma*, 19(3):215-227 (2000); Ruberti y col., *Cell. Molec. Neurobiol.*, 13(5): 559-568 (1993)). Sin embargo, cuando se usan terapéuticamente anticuerpos de roedores en sujetos que no son roedores, y se desarrolla una respuesta de anticuerpo dirigida contra Ig de murino en una buena cantidad de sujetos tratados.

10 La implicación de NGF en el dolor crónico ha conducido a un considerable interés en las estrategias terapéuticas basadas en inhibir los efectos de NGF (Saragovi, y col., *Trends Pharmacol Sci.* 21: 93-98 (2000)). Por ejemplo, se utilizó una forma soluble del receptor TrkA para bloquear la actividad de NGF, que mostró reducir significativamente la formación de neuromas, responsables del dolor neuropático, sin dañar los cuerpos celulares de las neuronas lesionadas (Kryger, y col., *J. Hand Surg. (Am.)*, 26: 635-644 (2001)).

15 Se han descrito determinados anticuerpos anti-NGF (publicaciones PCT números WO 2001/78698, WO 2001/64247, WO 2002/096458, WO 2004/032870, WO 2005/061540, WO 2006/131951, WO 2006/110883; publicaciones de Estados Unidos números US 20050074821, US 20080033157, US 20080182978 y US 20090041717; y la patente de Estados Unidos n.º 7.449.616). En modelos animales de dolor neuropático (por ejemplo, tronco nervioso o ligadura del nervio espinal), la inyección sistémica de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra NGF evita la alodinia y la hiperalgesia (Ramer y col., *Eur. J. Neurosci.*, 11: 837-846 (1999); Ro y col., *Pain*, 79: \* 265-274 (1999)).

20 el documento WO 2002/096458 se refiere generalmente a procedimientos de utilizar anticuerpos anti-NGF en el tratamiento de varios trastornos relacionados con NGF, incluyendo asma, artritis y psoriasis. Los procedimientos son eficaces en el tratamiento de estos trastornos en un paciente sin tener un efecto significativo adverso sobre el sistema inmunitario del paciente.

25 El documento WO 2004/058184 se refiere a anticuerpos anti-NGF (tales como anticuerpos antagonistas dirigidos contra NGF), y polinucleótidos que codifican los mismos. Se desvela además el uso de dichos anticuerpos y/o polinucleótidos en el tratamiento y/o prevención del dolor, incluyendo dolor posterior a cirugía, dolor de artritis reumatoide, y dolor de artrosis.

30 El documento WO 2009/150623 se refiere al uso de un anticuerpo anti-NGF en el tratamiento o la prevención del dolor y/o síntomas en el tracto urinario inferior (LUTS) asociados con prostatitis crónica y/o síndrome de dolor pélvico crónico.

35 El documento US 2009/0041717 se refiere a un anticuerpo humano o a un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que se une específicamente a un factor de crecimiento del nervio humano (NFG) con KD de 5 pM o menos, según se mide mediante resonancia de plasmón superficial, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se une al NGF humano con una afinidad de aproximadamente 2-10 veces mayor que el anticuerpo o fragmento que se une a NGF de rata y ratón.

40 El documento WO 2003/060080 desvela ácidos nucleicos y polipéptidos del dominio variable lambda y [kappa] de la cadena pesada y la cadena ligera de cánido. La presente invención proporciona también anticuerpos caninizados comprendidos de las secuencias marco del dominio variable de cánido y las CDR específicas de un antígeno obtenido de anticuerpos diferentes de los de cánidos, preferentemente de ratón desveladas en el presente documento.

45 Además, el tratamiento con un anticuerpo anti-NGF neutralizante produce una significativa reducción del dolor en un modelo de dolor de cáncer de murino (Sevcik y col., *Pain*, 115: 128-141 (2005)). Por lo tanto, existe una imperiosa necesidad de anticuerpos antagonistas dirigidos contra NGF para seres humanos y animales.

### **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a un anticuerpo caninizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo capaz de reconocer NGF de cánido, que comprende:

- 50 (i) una región variable de la cadena pesada caninizada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 192,  
y  
una región variable de la cadena ligera caninizada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 193,  
55 en la que la constante de la velocidad de la reacción inversa  $K_{off}$  es como mucho  $10^{-4}s^{-1}$  según se mide mediante resonancia de plasmón superficial; o

(ii) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 192,

y

una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 193.

La presente invención se refiere además a un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo, una composición farmacéutica o diagnóstica que comprende el anticuerpo y un uso médico del anticuerpo.

La presente divulgación proporciona una novedosa familia de proteínas de unión, anticuerpos injertados a la CDR, anticuerpos mamiferizados (tales como bovinizados, camelizados, caninizados, equinizados, felinizados, humanizados, etc.), y fragmentos de los mismos, capaces de unirse y neutralizar NGF. La divulgación proporciona medios terapéuticos con los que inhibir NGF y proporciona composiciones y procedimientos para tratar la enfermedad asociada con niveles aumentados de NGF, particularmente trastornos inflamatorios.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una proteína de unión, o fragmento de la misma, que comprende secuencias de la región hipervariable completa o sustancialmente idénticas a las secuencias de un anticuerpo procedente de una especie donante; y secuencias de la región constante completa o sustancialmente idénticas a las secuencias de anticuerpos de una especie diana, en la que la especie donante y la especie diana son diferentes. La proteína de unión puede, por ejemplo, unirse específicamente a NGF y tener una cadena pesada que tiene una región variable de la cadena pesada y una cadena ligera que tiene una región variable de la cadena ligera.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una proteína de unión que se une específicamente a NGF y que tiene una cadena pesada que tiene una región variable de la cadena pesada y una cadena ligera que tiene una región variable de la cadena ligera, en la que la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 207, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una proteína de unión que se une específicamente a NGF y que tiene una cadena pesada que tiene una región variable de la cadena pesada y una cadena ligera que tiene una región variable de la cadena ligera, en la que la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, y SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 202, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.

Una proteína de unión de la presente divulgación puede comprender al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre: a) las CDR de cadena pesada que consisten en las SEQ ID NO: 55, 56, 57, 61, 62, 63, 67, 68, 69, 73, 74, 75, 79, 80, 81, y las secuencias de aminoácidos de las CDR modificadas que tienen una identidad de la secuencia de al menos 50% con una de dichas secuencias; y b) las CDR de cadena ligera que consisten en las SEQ ID NO: 58, 59, 60, 64, 65, 66, 70, 71, 72, 76, 77, 78, 82, 83, 84, y las secuencias de aminoácidos de las CDR modificadas que tienen una identidad de la secuencia de al menos 50% con una de dichas secuencias. Como alternativa, la proteína de unión de la presente divulgación puede comprender al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre: a) las CDR de cadena pesada que consisten en las SEQ ID NO: 55, 56, 57, 61, 62, 63, 67, 68, 69, 73, 74, 75, 79, 80, 81, y las secuencias de aminoácidos de las CDR modificadas que tienen una identidad de la secuencia de al menos 70% con una de dichas secuencias; y b) las CDR de cadena ligera que consisten en las SEQ ID NO: 58, 59, 60, 64, 65, 66, 70, 71, 72, 76, 77, 78, 82, 83, 84, y las secuencias de aminoácidos de las CDR modificadas que tienen una identidad de la secuencia de al menos 70% con una de dichas secuencias. La proteína de unión de la presente divulgación puede comprender al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre: a) las CDR de cadena pesada que consisten en las SEQ ID NO: 55, 56, 57, 61, 62, 63, 67, 68, 69, 73, 74, 75, 79, 80, 81, y las secuencias de aminoácidos de las CDR modificadas que tienen una identidad de la secuencia de al menos 80% con una de dichas secuencias; y b) las CDR de cadena ligera que consisten en las SEQ ID NO: 58, 59, 60, 64, 65, 66, 70, 71, 72, 76, 77, 78, 82, 83, 84, y las secuencias de aminoácidos de las CDR modificadas que tienen una identidad de la secuencia de al menos 80% con una de dichas secuencias. Las proteínas de unión de la presente divulgación pueden comprender al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre: a) las CDR de cadena pesada que consisten en las SEQ ID NO: 55, 56, 57, 61, 62, 63, 67, 68, 69, 73, 74, 75, 79, 80, 81, y las secuencias de aminoácidos de las CDR modificadas que tienen una identidad de la secuencia de al menos 90%

con una de dichas secuencias; y b) las CDR de cadena ligera que consisten en las SEQ ID NO: 58, 59, 60, 64, 65, 66, 70, 71, 72, 76, 77, 78, 82, 83, 84, y las secuencias de aminoácidos de las CDR modificadas que tienen una identidad de la secuencia de al menos 90% con una de dichas secuencias.

5 Una proteína de unión de la presente divulgación puede comprender un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana seleccionado entre el grupo que consiste en un dominio constante de IgM, dominio constante de IgG4, dominio constante de IgG1, dominio constante de IgE, dominio constante de IgG2, dominio constante de IgG3, y dominio constante de IgA. Una proteína de unión de la presente divulgación puede comprender  
10 alternativamente un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina de cánido seleccionado entre el grupo que consiste en un dominio constante de IgM, dominio constante de IgG4, dominio constante de IgG1, dominio constante de IgE, dominio constante de IgG2, dominio constante de IgG3, y dominio constante de IgA. Una proteína de unión de la presente divulgación puede comprender alternativamente un dominio constante de la  
15 inmunoglobulina de felino de cadena pesada. Una proteína de unión de la presente divulgación puede comprender alternativamente un dominio constante de la inmunoglobulina de equino de cadena pesada. Una proteína de unión de la presente divulgación puede comprender además una región constante que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO:52 y la SEQ ID NO:54.

Se puede seleccionar cualquiera de las anteriores proteínas de unión entre el grupo que consiste en; una molécula de inmunoglobulina, Fv unido a disulfuro, anticuerpo monoclonal, scFv, anticuerpo quimérico, anticuerpo de dominio  
20 único, anticuerpo injertado a la CDR, diacuerpo, anticuerpo humanizado, mAb caninizado, mAb de cánido, mAb de felino, mAb felinizado, mAb de equino, mAb equinizado, un anticuerpo multiespecífico, un Fab, un anticuerpo doblemente específico, una DVD-Ig, un Fab', un anticuerpo biespecífico, un F(ab')<sub>2</sub>, y un Fv.

Cualquiera de las anteriores proteínas de unión puede ser capaz de modular una función biológica de NGF, o NGF neutralizante.

Cualquiera de las anteriores proteínas de unión puede ser capaz de neutralizar NGF con una potencia (CI<sub>50</sub>) de al menos aproximadamente 10 nM, al menos aproximadamente 5 nM, al menos aproximadamente 1 nM, al menos  
25 aproximadamente 0,5 nM, al menos aproximadamente 0,1 nM, al menos aproximadamente 0,05 nM, al menos aproximadamente 0,01 nM, o al menos aproximadamente 0,001 nM, como se midió en el ensayo de proliferación de linfocitos TF-1 de las ensayos pERK y Pathhunter.

cualquiera de las anteriores proteínas de unión puede tener una velocidad constante (K<sub>on</sub>) para NGF de: al menos aproximadamente 10<sup>2</sup>M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, al menos aproximadamente 10<sup>3</sup>M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, al menos aproximadamente 10<sup>4</sup>M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, al menos  
30 aproximadamente 10<sup>5</sup>M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, o al menos aproximadamente 10<sup>6</sup>M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, o al menos aproximadamente 10<sup>7</sup>M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, según se mide mediante resonancia de plasmón superficial.

Cualquiera de las anteriores proteínas de unión puede tener una constante de velocidad de la reacción inversa (K<sub>off</sub>) para NGF seleccionada entre el grupo que consiste en: casi aproximadamente 10<sup>-3</sup>s<sup>-1</sup>, casi aproximadamente 10<sup>-4</sup>s<sup>-1</sup>, casi aproximadamente 10<sup>-5</sup>s<sup>-1</sup>, casi aproximadamente 10<sup>-6</sup>s<sup>-1</sup>, y casi aproximadamente 10<sup>-7</sup>s<sup>-1</sup>, según se mide  
35 mediante resonancia de plasmón superficial.

Cualquiera de las anteriores proteínas de unión puede tener una constante de disociación (K<sub>D</sub>) para NGF seleccionada entre el grupo que consiste en: casi aproximadamente 10<sup>-7</sup> M, casi aproximadamente 10<sup>-8</sup> M, casi aproximadamente 10<sup>-9</sup> M, casi aproximadamente 10<sup>-10</sup> M, casi aproximadamente 10<sup>-11</sup> M, casi aproximadamente 10<sup>-12</sup> M, casi aproximadamente 10<sup>-13</sup> M, y casi aproximadamente 10<sup>-14</sup>M. La constante de disociación (K<sub>D</sub>) puede ser,  
40 por ejemplo, aproximadamente 1x10<sup>-9</sup>M, aproximadamente 1x10<sup>-10</sup>M, aproximadamente 3.14x10<sup>-10</sup>M, aproximadamente 1x10<sup>-11</sup>M, aproximadamente 2.37x10<sup>-11</sup>M, aproximadamente 1x10<sup>-12</sup>M, aproximadamente 1x10<sup>-13</sup>M, y aproximadamente 3,3x10<sup>-14</sup>M.

Cualquiera de las anteriores proteínas de unión puede comprender además un agente seleccionado entre el grupo que consiste en; una molécula de inmuno adhesión, un agente de formación de imágenes, un agente terapéutico, y un agente citotóxico. El agente puede ser, por ejemplo, un agente de formación de imágenes seleccionado entre el grupo que consiste en una radiomarca, una enzima, una marca fluorescente, una marca luminiscente, una marca bioluminiscente, una marca magnética, y biotina. El agente de formación de imágenes puede ser una radiomarca seleccionada entre el grupo que consiste en: 3H, 14C, 35S, 90Y, 99Tc, 111In, 125I, 131I, 177Lu, 166Ho y 153Sm. Como alternativa, el agente puede ser un agente terapéutico o citotóxico, tal como, por ejemplo, un antimetabolito,  
50 un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citoquina, un agente antiangiogénico, un agente antimitótico, una antraciclina, una toxina, y un agente apoptótico.

Cualquiera de las proteínas de unión puede poseer un modelo de glicosilación de murino, cánido, felino, humano o equino.

Cualquiera de las proteínas de unión puede ser una proteína de unión cristalizada. La proteína de unión cristalizada puede ser una proteína de unión cristalizada de liberación farmacéuticamente controlada exenta de transportador.  
55

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de las proteínas de unión anteriores. El ácido nucleico aislado puede comprender ARN o ADN.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un ácido nucleico aislado que comprende o es complementario a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de unión que se une específicamente a NGF que tiene una cadena pesada que tiene una región variable de la cadena pesada y una cadena ligera que tiene una región variable de la cadena ligera, en la que la región variable de la cadena pesada está codificada por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90% de identidad con una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 13, 17, y 21.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un ácido nucleico aislado que comprende o es complementario a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de unión que se une específicamente a NGF que tiene una cadena pesada que tiene una región variable de la cadena pesada y una cadena ligera que tiene una región variable de la cadena ligera, en la que la región variable de la cadena ligera está codificada por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90% de identidad con una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NOS: 3, 7, 11, 15, 19 y 23.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un vector recombinante que comprende un ácido nucleico aislado que codifica una proteína de unión que se une específicamente a NGF como se describe en el presente documento. Un vector recombinante de acuerdo con la presente divulgación puede comprender pcADN, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV o pBJ. Se proporciona también una célula hospedadora que comprende dicho vector recombinante. La célula hospedadora puede ser, por ejemplo, una célula eucariota, o una célula procariota. La célula hospedadora puede ser una célula de protista; una célula animal tal como, aunque no de forma limitativa, una célula de mamífero, una célula de ave; una célula de insecto, tal como, aunque no de forma limitativa, una célula Sf9 de insecto; una célula vegetal; o una célula fúngica. La célula hospedadora puede ser, por ejemplo, una célula de *E. coli*. La célula hospedadora puede ser una célula CHO, o una célula COS. Se proporciona también una línea de células aislada que produce una proteína de unión que se une específicamente a NGF, como se describe en el presente documento.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende una proteína de unión que se une específicamente a NGF, como se describe en el presente documento, y un transportador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de unión a NGF.

En otro aspecto, La presente divulgación proporciona una composición para la liberación de una proteína de unión, comprendiendo la composición: (a) una composición que comprende una proteína de unión que se une específicamente a NGF, como se describe en el presente documento, y un transportador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable, y (b) al menos un transportador polimérico.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para reducir la actividad de NGF en un sujeto (por ejemplo, un perro, gato, caballo, visón, etc.) que padece un trastorno en el que la actividad de NGF es perjudicial, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión que se une específicamente a NGF, como se describe en el presente documento.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para preparar anticuerpos anti-NGF que comprende: (a) la producción de anticuerpos monoclonales de murino; (b) la selección de sobrenadantes de hibridoma; (c) el injerto de CDR donantes en los marcos diana; y (d) la introducción de retromutaciones en la región marco de los anticuerpos diana, en la que los anticuerpos anti-NGF comprenden secuencias de regiones hipervariables completa o sustancialmente idénticas a las secuencias de un anticuerpo procedente de la especie donante y secuencias de la región constante completa o sustancialmente idénticas a las secuencias de un anticuerpo procedente de la especie diana, en la que las especies donante y especie diana son diferentes. En el procedimiento, el donante puede ser, por ejemplo, un ratón y la diana un mamífero no de murino, tal como, aunque no de forma limitativa, un bóvido, cánido, equino, o mamífero felino, o un camélido, cabra, ser humano u oveja.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para detectar la presencia o la cantidad de NGF en una muestra, que comprende: proporcionar un reactivo que comprende cualquiera de las anteriores proteínas de unión que se une específicamente a NGF; combinar la proteína de unión con la muestra y en condiciones suficientes para que la proteína de unión se una a cualquier NGF en la muestra; y determinar la presencia o cantidad de NGF en la muestra basándose en la unión específica de la proteína de unión a NGF. En el procedimiento, La proteína de unión puede inmovilizarse o puede ser capaz de inmovilizarse sobre un soporte sólido. En el procedimiento, la proteína de unión puede acoplarse a una marca detectable, tal como, por ejemplo, un agente de formación de imágenes tal como, aunque no de forma limitativa, una radiomarca, una enzima, una marca fluorescente, una marca luminiscente, una marca bioluminiscente, una marca magnética, y biotina. El agente de formación de imágenes puede ser por ejemplo una radiomarca seleccionada entre el grupo que consiste en: <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>35</sup>S, <sup>90</sup>Y, <sup>99</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>177</sup>Lu, <sup>166</sup>Ho y <sup>153</sup>Sm.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un dispositivo de inmunoensayo para detectar la presencia o la cantidad de NGF en una muestra, el dispositivo que comprende cualquiera de las anteriores proteínas de unión que se une específicamente a NGF, inmovilizado sobre un soporte sólido.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un kit para detectar la presencia o la cantidad de NGF en una muestra, comprendiendo el kit: un inmunorreactivo que comprende cualquiera de las anteriores proteínas de unión que se unen específicamente a NGF, e instrucciones para determinar la presencia o la cantidad de NGF en la muestra basada en la unión específica del inmunorreactivo a NGF. En el kit, la proteína de unión puede inmovilizarse sobre un soporte sólido.

En un aspecto más adicional, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende:

una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 207, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; y

una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, y SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 202, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.

De manera más específica, el anticuerpo anteriormente descrito puede comprender al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre: a) las CDR de cadena pesada que consisten en las SEQ ID NO: 55, 56, 57, 61, 62, 63, 67, 68, 69, 73, 74, 75, 79, 80, 81, y las secuencias de aminoácidos de las CDR modificadas que tienen una identidad de la secuencia de al menos 50% con una de dichas secuencias; y b) las CDR de cadena ligera que consisten en las SEQ ID NO: 58, 59, 60, 64, 65, 66, 70, 71, 72, 76, 77, 78, 82, 83, 84, y las secuencias de aminoácidos de las CDR modificadas que tienen una identidad de la secuencia de al menos 50% con una de dichas secuencias. Como alternativa, el anticuerpo anteriormente descrito puede comprender al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre: a) las CDR de cadena pesada que consisten en las SEQ ID NO: 55, 56, 57, 61, 62, 63, 67, 68, 69, 73, 74, 75, 79, 80, 81, y las secuencias de aminoácidos de las CDR modificadas que tienen una identidad de la secuencia de al menos 70% con una de dichas secuencias; y b) las CDR de cadena ligera que consisten en las SEQ ID NO: 58, 59, 60, 64, 65, 66, 70, 71, 72, 76, 77, 78, 82, 83, 84, y las secuencias de aminoácidos de las CDR modificadas que tienen una identidad de la secuencia de al menos 70% con una de dichas secuencias. Como alternativa, el anticuerpo anteriormente descrito puede comprender al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre: a) las CDR de cadena pesada que consisten en las SEQ ID NO: 55, 56, 57, 61, 62, 63, 67, 68, 69, 73, 74, 75, 79, 80, 81, y las secuencias de aminoácidos de las CDR modificadas que tienen una identidad de la secuencia de al menos 80% con una de dichas secuencias; y b) las CDR de cadena ligera que consisten en las SEQ ID NO: 58, 59, 60, 64, 65, 66, 70, 71, 72, 76, 77, 78, 82, 83, 84, y las secuencias de aminoácidos de las CDR modificadas que tienen una identidad de la secuencia de al menos 80% con una de dichas secuencias. Como alternativa, el anticuerpo anteriormente descrito puede comprender al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre: a) las CDR de cadena pesada que consisten en las SEQ ID NO: 55, 56, 57, 61, 62, 63, 67, 68, 69, 73, 74, 75, 79, 80, 81, y las secuencias de aminoácidos de las CDR modificadas que tienen una identidad de la secuencia de al menos 90% con una de dichas secuencias; y b) las CDR de cadena ligera que consisten en las SEQ ID NO: 58, 59, 60, 64, 65, 66, 70, 71, 72, 76, 77, 78, 82, 83, 84, y las secuencias de aminoácidos de las CDR modificadas que tienen una identidad de la secuencia de al menos 90% con una de dichas secuencias.

El anticuerpo anteriormente descrito puede comprender un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana seleccionado entre el grupo que consiste en un dominio constante de IgM, dominio constante de IgG4, dominio constante de IgG1, dominio constante de IgE, dominio constante de IgG2, dominio constante de IgG3, y dominio constante de IgA. De manera más específica, el anticuerpo puede comprender alternativamente un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina de cánido seleccionado entre el grupo que consiste en un dominio constante de IgM, dominio constante de IgG4, dominio constante de IgG1, dominio constante de IgE, dominio constante de IgG2, dominio constante de IgG3, y dominio constante de IgA. Como alternativa, el anticuerpo comprende un dominio constante de la inmunoglobulina de cadena pesada. Aún más alternativamente, el anticuerpo comprende un dominio constante de la inmunoglobulina de cadena pesada de equino. Además, el anticuerpo anteriormente descrito puede comprender una región constante que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO:52 y la SEQ ID NO:54. Aún más, el anticuerpo anteriormente descrito se selecciona entre el grupo que consiste en: una molécula de inmunoglobulina, Fv unido a disulfuro, anticuerpo monoclonal, scFv, anticuerpo quimérico, anticuerpo de dominio único, anticuerpo injertado a la CDR, diacuerpo, anticuerpo humanizado, mAb caninizado, mAb de cánido, mAb de

felino, mAb felinizado, mAb de equino, mAb equinizado, un anticuerpo multiespecífico, un Fab, un anticuerpo doblemente específico, una DVD-Ig, un Fab', un anticuerpo biespecífico, un F(ab')<sub>2</sub>, y un Fv.

En otro aspecto, el anticuerpo anteriormente identificado es capaz de modular la función biológica de NGF.

5 En otro aspecto más adicional, la presente divulgación se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo anteriormente descrito.

10 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo o a un fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con una secuencia de la SEQ ID NO:37 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con una secuencia de la SEQ ID NO:38. El anticuerpo anteriormente descrito puede comprender un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana seleccionado entre el grupo que consiste en un dominio constante de IgM, dominio constante de IgG4, dominio constante de IgG1, dominio constante de IgE, dominio constante de IgG2, dominio constante de IgG3, y dominio constante de IgA. De manera más específica, el anticuerpo puede comprender 15 alternativamente un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina de cánido seleccionado entre el grupo que consiste en un dominio constante de IgM, dominio constante de IgG4, dominio constante de IgG1, dominio constante de IgE, dominio constante de IgG2, dominio constante de IgG3, y dominio constante de IgA. Como alternativa, el anticuerpo comprende un dominio constante de la inmunoglobulina de cadena pesada. Aún más alternativamente, el anticuerpo comprende un dominio constante de la inmunoglobulina de cadena pesada de equino. Además, el anticuerpo anteriormente descrito puede comprender una región constante que tiene una 20 secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO:52 y la SEQ ID NO:54. Aún más, el anticuerpo anteriormente descrito se selecciona entre el grupo que consiste en: una molécula de inmunoglobulina, Fv unido a disulfuro, anticuerpo monoclonal, scFv, anticuerpo quimérico, anticuerpo de dominio único, anticuerpo injertado a la CDR, diacuerpo, anticuerpo humanizado, mAb caninizado, mAb de cánido, mAb de felino, mAb felinizado, mAb de equino, mAb equinizado, un anticuerpo multiespecífico, un Fab, un anticuerpo 25 doblemente específico, una DVD-Ig, un Fab', un anticuerpo biespecífico, un F(ab')<sub>2</sub>, y un Fv.

En otro aspecto, el anticuerpo anteriormente identificado es capaz de modular la función biológica de NGF.

En otro aspecto más adicional, la presente divulgación se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo anteriormente descrito.

30 En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con una secuencia de la SEQ ID NO: 192 y la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con una secuencia de la SEQ ID NO: 193. El anticuerpo anteriormente descrito puede comprender un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana seleccionado entre el grupo que consiste en un dominio constante de IgM, dominio 35 constante de IgG4, dominio constante de IgG1, dominio constante de IgE, dominio constante de IgG2, dominio constante de IgG3, y dominio constante de IgA. De manera más específica, el anticuerpo puede comprender alternativamente un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina de cánido seleccionado entre el grupo que consiste en un dominio constante de IgM, dominio constante de IgG4, dominio constante de IgG1, dominio constante de IgE, dominio constante de IgG2, dominio constante de IgG3, y dominio constante de IgA. Como alternativa, el anticuerpo comprende un dominio constante de la inmunoglobulina de cadena pesada. Aún más 40 alternativamente, el anticuerpo comprende un dominio constante de la inmunoglobulina de cadena pesada de equino. Además, el anticuerpo anteriormente descrito puede comprender una región constante que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO:52 y la SEQ ID NO:54. Aún más, el anticuerpo anteriormente descrito se selecciona entre el grupo que consiste en: una molécula de 45 inmunoglobulina, Fv unido a disulfuro, anticuerpo monoclonal, scFv, anticuerpo quimérico, anticuerpo de dominio único, anticuerpo injertado a la CDR, diacuerpo, anticuerpo humanizado, mAb caninizado, mAb de cánido, mAb de felino, mAb felinizado, mAb de equino, mAb equinizado, un anticuerpo multiespecífico, un Fab, un anticuerpo doblemente específico, una DVD-Ig, un Fab', un anticuerpo biespecífico, un F(ab')<sub>2</sub>, y un Fv.

En otro aspecto, el anticuerpo anteriormente identificado es capaz de modular la función biológica de NGF.

50 En otro aspecto más adicional, la presente divulgación se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo anteriormente descrito.

55 En otro aspecto más adicional, la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica o diagnóstica que comprende al menos uno de los anticuerpos anteriormente descritos, y un transportador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. De manera más específica, la composición farmacéutica o diagnóstica puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno de los anticuerpos anteriormente descritos. Además, la composición farmacéutica o diagnóstica puede comprender al menos un conservante. Los ejemplos de al menos un conservante que pueden utilizarse son metilparabeno, propilparabeno, alcohol bencílico, clorobutanol o cloruro de benzalconio.

La composición farmacéutica puede tener un pH de más de aproximadamente 7,0. Como alternativa, la composición farmacéutica puede tener un pH de entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 8,2. Como alternativa, la composición farmacéutica puede tener un pH de entre aproximadamente 7,2 y aproximadamente 7,8. Aún más alternativamente, el pH de la composición farmacéutica puede estar entre aproximadamente 7,4 y aproximadamente 7,6. Aún más alternativamente, el pH de la composición farmacéutica puede ser aproximadamente 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1 o 8,2.

La composición farmacéutica de la presente divulgación puede tener una semivida de entre aproximadamente 8,0 días a aproximadamente 15,0 días cuando se dosifica por vía intravenosa o subcutánea. Como alternativa, la composición farmacéutica de la presente invención puede tener una semivida de entre aproximadamente 10,0 días a aproximadamente 13,0 días. Aún más alternativamente, la composición farmacéutica de la presente invención puede tener una semivida de aproximadamente 8,0 días, aproximadamente 8,5 días, aproximadamente 9,0 días, aproximadamente 9,5 días, aproximadamente 10,0 días, aproximadamente 10,5 días, aproximadamente 11,0 días, aproximadamente 11,5 días, aproximadamente 12,0 días, aproximadamente 12,5 días, aproximadamente 13,0 días, aproximadamente 13,5 días, aproximadamente 14,0 días, aproximadamente 14,5 días, o aproximadamente 15,0 días.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para reducir la actividad de NGF en un sujeto que padece un trastorno en el que la actividad de NGF es perjudicial, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o de un fragmento de unión al mismo de al menos uno de los anticuerpos anteriormente descritos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

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

La Figura 1 ilustra la secuencia de nucleótidos de PR-1254972 VH (SEQ ID NO: 1) de anticuerpo de ratón dirigido contra NGF.

La Figura 2 ilustra la secuencia de aminoácidos de PR-1254972 VH (SEQ ID NO: 2) de anticuerpo de ratón dirigido contra NGF.

25 La Figura 3 ilustra la secuencia de nucleótidos de PR-1254972 VL (SEQ ID NO: 3) de anticuerpo de ratón dirigido contra NGF.

La Figura 4 ilustra la secuencia de aminoácidos de PR-1254972 VL (SEQ ID NO: 4) de anticuerpo de ratón dirigido contra NGF.

30 La Figura 5 ilustra la secuencia de nucleótidos de PR-1254973 VH (SEQ ID NO: 5) de anticuerpo de ratón dirigido contra NGF.

La Figura 6 ilustra la secuencia de aminoácidos de PR-1254973 VH (SEQ ID NO: 6) de anticuerpo de ratón dirigido contra NGF.

La Figura 7 ilustra la secuencia de nucleótidos de PR-1254973 VL (SEQ ID NO: 7) de anticuerpo de ratón dirigido contra NGF.

35 La Figura 8 ilustra la secuencia de aminoácidos de PR-1254973 VL (SEQ ID NO: 8) de anticuerpo de ratón dirigido contra NGF.

La Figura 9 ilustra la secuencia de nucleótidos de PR-1254977 VH (SEQ ID NO: 9) de anticuerpo de ratón dirigido contra NGF.

40 La Figura 10 ilustra la secuencia de aminoácidos de PR-1254977 VH (SEQ ID NO: 10) de anticuerpo de ratón dirigido contra NGF.

La Figura 11 ilustra la secuencia de nucleótidos de PR-1254977 VL (SEQ ID NO: 11) de anticuerpo de ratón dirigido contra NGF.

La Figura 12 ilustra la secuencia de aminoácidos de PR-1254977 VL (SEQ ID NO: 12) de anticuerpo de ratón dirigido contra NGF.

45 La Figura 13 ilustra la secuencia de nucleótidos de PR-1254980 VH (SEQ ID NO: 13) de anticuerpo de ratón dirigido contra NGF.

La Figura 14 ilustra la secuencia de aminoácidos de PR-1254980 VH (SEQ ID NO: 14) de anticuerpo de ratón dirigido contra NGF.

50 La Figura 15 ilustra la secuencia de nucleótidos de PR-1254980 VL (SEQ ID NO: 15) de anticuerpo de ratón dirigido contra NGF.

- La Figura 16 ilustra la secuencia de aminoácidos de PR-1254980 VL (SEQ ID NO: 16) de anticuerpo de ratón dirigido contra NGF.
- La Figura 17 ilustra la secuencia de nucleótidos de PR-1254981 VH (SEQ ID NO: 17) de anticuerpo de ratón dirigido contra NGF.
- 5 La Figura 18 ilustra la secuencia de aminoácidos de PR-1254981 VH (SEQ ID NO: 18) de anticuerpo de ratón dirigido contra NGF.
- La Figura 19 ilustra la secuencia de nucleótidos de PR-1254981 VL (SEQ ID NO: 19) de anticuerpo de ratón dirigido contra NGF.
- 10 La Figura 20 ilustra la secuencia de aminoácidos de PR-1254981 VL (SEQ ID NO: 20) de anticuerpo de ratón dirigido contra NGF.
- La Figura 21 ilustra la secuencia de nucleótidos de PR-1254982 VH (SEQ ID NO: 21) de anticuerpo de ratón dirigido contra NGF.
- La Figura 22 ilustra la secuencia de aminoácidos de PR-1254982 VH (SEQ ID NO: 22) de anticuerpo de ratón dirigido contra NGF.
- 15 La Figura 23 ilustra la secuencia de nucleótidos de PR-1254982 VL (SEQ ID NO: 23) de anticuerpo de ratón dirigido contra NGF.
- La Figura 24 ilustra la secuencia de aminoácidos de PR-1254982 VL (SEQ ID NO: 24) de anticuerpo de ratón dirigido contra NGF.
- 20 La Figura 25 ilustra el mAb caninizado dirigido contra NGF mediante el injerto de la CDR sobre marcos de Ig de cánidos (las CDR están subrayadas), SEQ ID NO: 25 (aminoácido 72.1 VH).
- La Figura 26 ilustra el mAb caninizado dirigido contra NGF mediante el injerto de la CDR sobre marcos de Ig de cánidos (las CDR están subrayadas), SEQ ID NO: 26 (aminoácido 72.1 VL).
- La figura 27 ilustra el mAb caninizado dirigido contra NGF mediante el injerto de la CDR sobre marcos de Ig de cánidos (las CDR están subrayadas) SEQ ID NO: 27 (aminoácido 73.1 VH).
- 25 La figura 28 ilustra el mAb caninizado dirigido contra NGF mediante el injerto de la CDR sobre marcos de Ig de cánidos (las CDR están subrayadas) SEQ ID NO: 28 (aminoácido 73.1 VL).
- La Figura 29 ilustra el mAb caninizado dirigido contra NGF mediante el injerto de la CDR sobre marcos de Ig de cánidos (las CDR están subrayadas), SEQ ID NO: 29 (aminoácido 77.1 VH).
- 30 La Figura 30 ilustra el mAb caninizado dirigido contra NGF mediante el injerto de la CDR sobre marcos de Ig de cánidos (las CDR están subrayadas), SEQ ID NO: 30 (aminoácido 77.1 VL).
- La figura 31A ilustra el mAb de ratón dirigido contra NGF mediante el injerto de la CDR sobre marcos de Ig de cánidos (las CDR están subrayadas), SEQ ID NO: 31 (aminoácido 81.1 VH).
- La figura 31B ilustra el mAb de ratón dirigido contra NGF mediante el injerto de la CDR sobre marcos de Ig de cánidos (las CDR están subrayadas), SEQ ID NO: 177 (aminoácido 81.1B VH).
- 35 La Figura 32 ilustra el mAb caninizado dirigido contra NGF mediante el injerto de la CDR sobre marcos de Ig de cánidos (las CDR están subrayadas), SEQ ID NO: 32 (aminoácido 81.1 VL)
- La Figura 33 ilustra el mAb caninizado dirigido contra NGF mediante el injerto de la CDR sobre marcos de Ig de cánidos (las CDR están subrayadas), SEQ ID NO: 33 (aminoácido 82.1 VH)
- 40 La Figura 34 ilustra el mAb caninizado dirigido contra NGF mediante el injerto de la CDR sobre marcos de Ig de cánidos (las CDR están subrayadas), SEQ ID NO: 34 (aminoácido 82.1 VL).
- La Figura 35 ilustra los anticuerpos caninizados dirigidos contra NGF que contienen restos de retromutaciones (los restos de retromutaciones se muestran en **negrita**), SEQ ID NO: 35 (aminoácido 72.2 VH).
- La Figura 36A ilustra los anticuerpos caninizados dirigidos contra NGF que contienen restos de retromutaciones (los restos de retromutaciones se muestran en **negrita**), SEQ ID NO: 36 (aminoácido 72.2 VL).
- 45 La Figura 36B ilustra los anticuerpos caninizados dirigidos contra NGF que contienen restos de retromutaciones (los restos de retromutaciones se muestran en **negrita**), SEQ ID NO: 179 (aminoácido 72.3 VH).
- La Figura 36C ilustra los anticuerpos caninizados dirigidos contra NGF que contienen restos de retromutaciones



## ES 2 665 954 T3

- La Figura 45 ilustra la secuencia del cebador para clonar el NGF de cánido, SEQ ID NO: 45 (cebador NGF-Dog-S).
- La Figura 46 ilustra la secuencia del cebador para clonar el NGF de cánido, SEQ ID NO: 46 (cebador NGF-Dog-AS).
- 5 La Figura 47 ilustra la secuencia del cebador para clonar el NGF de cánido, SEQ ID NO: 47 (cebador NGF-d-Ec-S).
- La Figura 48 ilustra la secuencia del cebador para clonar el NGF de cánido, SEQ ID NO: 48 (cebador NGF-d-Ec-AS).
- La Figura 49 ilustra la secuencia de nucleótidos de la fusión NGF C-terminal 6His de cánido, SEQ ID NO: 49.
- 10 La Figura 50 ilustra la secuencia de aminoácidos de NGF C-terminal 6-His de cánido, SEQ ID NO: 50.
- La Figura 51 ilustra la secuencia de nucleótidos de la región constante de la IgG de cánido, SEQ ID NO: 51.
- La Figura 52 ilustra la secuencia de aminoácidos de la región constante de la IgG de cánido, SEQ ID NO: 52.
- La Figura 53 ilustra la secuencia de nucleótidos de la región constante kappa de cánido, SEQ ID NO: 53
- La Figura 54 ilustra la secuencia de aminoácidos de la región constante kappa de cánido, SEQ ID NO: 54.
- 15 La Figura 55 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 55 (aminoácido 72.1 VH; CDR1).
- La Figura 56 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 56 (aminoácido 72.1 VH; CDR2).
- 20 La Figura 57 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 57 (aminoácido 72.1 VH; CDR3).
- La Figura 58 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 58 (aminoácido 72.1 VL; CDR1).
- La Figura 59 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 59 (aminoácido 72.1 VL; CDR2).
- 25 La Figura 60 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 60 (aminoácido 72.1 VL; CDR3).
- La Figura 61 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 61 (aminoácido 73.1 VH; CDR1).
- 30 La Figura 62 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 62 (aminoácido 73.1 VH; CDR2).
- La Figura 63 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 63 (aminoácido 73.1 VH; CDR3).
- La Figura 64 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 64 (aminoácido 73.1 VL; CDR1).
- 35 La Figura 65 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 65 (aminoácido 73.1 VL; CDR2).
- La Figura 66 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 66 (aminoácido 73.1 VL; CDR3).
- 40 La Figura 67 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 67 (aminoácido 77.1 VH; CDR1).
- La Figura 68 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 68 (aminoácido 77.1 VH; CDR2).
- La Figura 69 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 69 (aminoácido 77.1 VH; CDR3).
- 45 La Figura 70 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 70 (aminoácido 77.1 VL;

CDR1).

La Figura 71 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 71 (aminoácido 77.1 VL; CDR2).

5 La Figura 72 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 72 (aminoácido 77.1 VL; CDR3).

La Figura 73 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 73 (aminoácido 81.1 VH; CDR1).

La Figura 74 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 74 (aminoácido 81.1 VH; CDR2).

10 La Figura 75 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 75 (aminoácido 81.1 VH; CDR3).

La Figura 76 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 76 (aminoácido 81.1 VL; CDR1).

15 La Figura 77 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 77 (aminoácido 81.1 VL; CDR2).

La Figura 78 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 78 (aminoácido 81.1 VL; CDR3).

La Figura 79 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 79 (aminoácido 82.1 VH; CDR1).

20 La Figura 80 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 80 (aminoácido 82.1 VH; CDR2).

La Figura 81 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 81 (aminoácido 82.1 VH; CDR3).

25 La Figura 82 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 82 (aminoácido 82.1 VL; CDR1).

La Figura 83 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 83 (aminoácido 82.1 VL; CDR2).

La Figura 84 ilustra la región determinante de la complementariedad, SEQ ID NO: 84 (aminoácido 82.1 VL; CDR3).

30 La Figura 85 ilustra la secuencia de  $\beta$ NGF humano (SEQ ID NO: 85).

La Figura 86 ilustra las secuencias que se muestran en la Tabla 12.

La Figura 87 ilustra las secuencias que se muestran en la Tabla 13.

La Figura 88 ilustra las secuencias que se muestran en la Tabla 14.

La Figura 89 ilustra las secuencias que se muestran en la Tabla 15.

35 La Figura 89 ilustra las secuencias que se muestran en la Tabla 15A.

#### **Descripción detallada de la divulgación**

40 La divulgación describe proteínas unión a NGF, particularmente los anticuerpos anti-NGF, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen a NGF. Diversos aspectos de la divulgación se refieren a anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, y composiciones farmacéuticas de los mismos, así como ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes y las células hospedadoras para preparar dichos anticuerpos y fragmentos. Los procedimientos para utilizar los anticuerpos de la divulgación para detectar el NFG de cánido y humano, para inhibir la actividad del NGF de humano y cánido, tanto *in vitro* como *in vivo*; y para regular la expresión génica están también abarcados por la divulgación.

45 A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en conexión con la presente divulgación deben tener los significados que se entienden comúnmente por aquellas personas normalmente expertas en la técnica. El significado y el ámbito de los términos debe ser claro, sin embargo, en el caso de cualquier ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en el presente documento tienen prioridad

sobre cualquier diccionario o definición extrínseca. Además, a menos que se requiere lo contrario por contexto, los términos en singular incluyen pluralidades y los términos en plural incluyen el singular. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "incluyendo", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitante. También, los términos tales como "elemento" o "componente" abarcan elementos y componentes que comprende una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad salvo que se indique específicamente lo contrario.

Generalmente, las nomenclaturas utilizadas vinculadas con, y las técnicas de, cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y de ácidos nucleicos y de hibridación descritas en el presente documento son aquellas bien conocidas y habitualmente utilizadas en la materia. Los procedimientos y técnicas de la presente divulgación se llevan a cabo generalmente de acuerdo con los procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica y según se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y describen en la totalidad de la presente memoria descriptiva salvo que se indique otra cosa. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se llevan a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como comúnmente se realizan en la técnica o como se describen en el presente documento. Las nomenclaturas utilizadas vinculadas con, y los procedimientos de laboratorio y las técnicas de, química analítica, química orgánica sintética, y la química médica y farmacéutica descritas en el presente documento son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la materia. Se usan técnicas normalizadas para la síntesis química, análisis químicos, preparaciones farmacéuticas, formulaciones, y administración, y tratamiento de pacientes.

Para que la presente divulgación pueda entenderse más fácilmente, se definen a continuación los términos y frases seleccionadas que se usan en el presente documento.

#### **A. Definiciones**

Los términos "aceptor" y "anticuerpo aceptor" se refiere al anticuerpo o a la secuencia de ácido nucleico que proporciona o codifica al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o 100% de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones marco. El término "aceptor" abarca una secuencia de aminoácidos o ácido nucleico del anticuerpo que proporciona o codifica la(s) región(ones) constante(s). El término abarca también la secuencia de aminoácidos o ácido nucleico del anticuerpo que proporciona o codifica una de las regiones marco y la(s) región(ones) constante(s). Por ejemplo, el término "aceptor" se refieren a la secuencia de aminoácidos o ácido nucleico del anticuerpo que proporciona o codifica al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, o 100% de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones marco. Dicho aceptor puede contener al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, o al menos 10 restos de aminoácidos que no se producen en una o más posiciones específicas de un anticuerpo humano. una región marco aceptora y/o una región(ones) constante(s) aceptora(s) pueden, por ejemplo, derivarse u obtenerse a partir de un gen del anticuerpo de la línea germinal, un gen de anticuerpo maduro, un anticuerpo funcional (por ejemplo, anticuerpos bien conocidos en la materia, anticuerpos en desarrollo, o anticuerpos comercialmente disponibles).

El término "agonista" se refiere a un modulador que, cuando entra en contacto con una molécula de interés, da lugar a un aumento en la magnitud de determinada actividad o función de la molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en la ausencia del agonista. Los agonistas concretos de interés pueden incluir, aunque no de forma limitativa, polipéptidos NGF o polipéptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, o cualesquiera otras moléculas que se unan a NGF.

El término "antagonista" o "inhibidor" se refiere a un modulador que, cuando entra en contacto con una molécula de interés da lugar a una disminución en la magnitud de una determinada actividad o función de la molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en la ausencia del antagonista. Los antagonistas concretos de interés incluyen aquellos que bloquean o modulan la actividad biológica o inmunológica de NGF. Los antagonistas e inhibidores de NGF pueden incluir, aunque no de forma limitativa, proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, o cualesquiera otras moléculas, que se unen a NGF.

El término "anticuerpo" se refiere de forma amplia a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) comprendida por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), o cualquier fragmento funcional, mutante, variante, o derivación del mismo, que retiene las características esenciales de unión al epítipo de una molécula de Ig. Dicho mutante, variante, o fragmentos derivados de anticuerpo son conocidos en la técnica. Se describen en el presente documento a continuación los ejemplos no limitantes.

En un anticuerpo de longitud completa, cada cadena pesada está comprendida de una región variable de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está comprendida por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está comprendida por una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está comprendida por un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el

extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase.

5 La expresión "conjugado de anticuerpo" se refiere a una proteína de unión, tal como un anticuerpo, unido químicamente a un segundo resto químico, tal como un agente terapéutico o citotóxico. El término "agente" se utiliza en el presente documento para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto preparado a partir de materiales biológicos. En un aspecto, los agentes terapéuticos o citotóxicos incluyen, aunque no de forma limitativa, toxina pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

10 La expresión "construcción de anticuerpo" se refiere a un polipéptido que comprende una o más de las porciones de unión a antígeno unidas a un polipéptido enlazador o a un dominio constante de inmunoglobulina. Los polipéptidos enlazadores comprenden dos o más restos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y se utilizan para unir una o más porciones de unión a antígeno. Dichos polipéptidos enlazadores son bien conocidos en la técnica. (Holliger, y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 90: 6444-6448 (1993); Poljak, y col., Structure 2: 1121-1123 (1994)). Un dominio constante de inmunoglobulina se refiere a un dominio constante de cadena pesada o ligera. Se conocen en la técnica las secuencias de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada y la cadena ligera de la IgG humana; de cánido, equino, y felino son más raras.

15 La expresión "fragmentos de anticuerpos" o "resto de unión a antígeno" comprende una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la unión al antígeno o el dominio variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, Fv, fragmentos sFv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios.

20 La expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo") se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, NGF). Se ha mostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo pueden llevarla a cabo los fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Estos pueden ser también formatos biespecíficos, doblemente específicos, o multiespecíficos; unidos específicamente a dos o más antígenos diferentes. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos en la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en VL, VH, los dominios CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente de disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward y col., Nature, 341: 544-546 (1989); la publicación PCT WO 90/05144), que comprende un único dominio variable; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Además, a pesar de que los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes distintos, pueden unirse, utilizando procedimientos recombinantes, mediante un enlazador sintético que permite fabricarlos como una proteína monocatenaria en el que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv) (Bird y col., Science, 242: 423-426 (1988); y Huston y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 85: 5879-5883 (1988)). Se pretende también que dichos anticuerpos monocatenarios se incluyan en la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Están también incluidas otras formas de anticuerpos monocatenarios, tales como diacuerpos. Los diacuerpos son bivalentes, anticuerpos biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una única cadena polipeptídica, pero utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre dos dominios de la misma cadena, se fuerza por tanto a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno (Holliger, y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 90: 6444-6448 (1993); Poljak, y col., Structure 2: 1121-1123 (1994)). Dichas porciones de unión a anticuerpo se conocen en la técnica (Kontermann y Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. Nueva York. 790 págs. (ISBN 3-540-41354-5).

25 Aún más, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión más grande, formada por la asociación covalente o no covalente del anticuerpo o la porción del anticuerpo con una o más proteínas o péptidos diferentes. Los ejemplos de dichas moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de una región nuclear de estreptavidina para preparar una molécula de scFv tetramérico (Kipriyanov, S.M., y col., Human Antibodies and Hybridomas, 6: 93-101 (1995)) y el uso de un resto de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina en el extremo X para preparar moléculas de scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, y col., Mol. Immunol., 31: 1047-1058 (1994)). Se pueden preparar porciones de anticuerpos, tales como fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub>, a partir de anticuerpos completos utilizando técnicas convencionales, tales como digestión con papaína o pepsina, respectivamente, o anticuerpos completos. Además, los anticuerpos, porciones de anticuerpos y moléculas de inmunoadhesión pueden obtenerse utilizando técnicas de ADN recombinante normalizadas, tal como se describe en el presente documento.

30 La expresión "anticuerpo anti-NGF" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse al factor de crecimiento nervioso (NGF) e inhibir la actividad biológica de NGF y/o la(s) ruta(s) posteriores mediadas por la señalización de NGF. Un anticuerpo anti-NGF abarca los anticuerpos que bloquean, antagonizan, suprimen o reducen (incluyendo

significativamente) la actividad biológica de NGF, incluyendo las rutas posteriores mediadas por la señalización de NGF, tales como la unión al receptor y/o la estimulación de una respuesta celular a NGF. Los anticuerpos anti-NGF abarcan aquellos que neutralizan la actividad biológica de NGF, se une a NGF y evitan la dimerización de NGF y/o la unión a un receptor de NGF (tal como p75 y/o trkA), y/o se unen a NGF y evitan la dimerización del receptor trkA y/o la autofosforilación de trkA. Se proporcionan en el presente documento ejemplos de anticuerpos anti-NGF.

La expresión "proteína de unión" se refiere a un polipéptido natural o sintético que se une específicamente a cualquier porción de una diana tal como un antígeno. La expresión "proteína de unión" abarca anticuerpos como se describen en el presente documento, incluyendo un anticuerpo aislado, la porción de unión a antígeno del mismo, o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo.

La expresión "anticuerpo de cánido" se refiere a una inmunoglobulina de origen natural o producida de forma recombinante compuesta de secuencias de aminoácidos representativas de anticuerpos naturales aislados de cánidos de diversas razas. Los anticuerpos de cánidos son anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal de cánido. Los anticuerpos de cánidos de la divulgación pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal de cánido (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis *in vitro* aleatorias o específicas de sitio, o mediante mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y en la CDR3 en concreto. Sin embargo, no se pretende que la expresión "anticuerpo de cánido" incluya anticuerpos en los que las secuencias de la CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como ratón, hayan de injertarse sobre secuencias del marco de cánidos.

El término "caninización" se define como un procedimiento para transferir aminoácidos de unión a antígeno no de cánido desde un marco de anticuerpo donante a un marco de anticuerpo aceptor de cánido para generar tratamientos terapéuticos de proteínas útiles en perros.

La expresión "anticuerpo caninizado" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y la cadena ligera de una especie no de cánido (*por ejemplo*, un ratón) pero en la que al menos una porción de la secuencia VH y/o VL se ha alterado para ser más "similar a cánido", es decir, más similar a las secuencias variables de la línea germinal de cánido. Un tipo de anticuerpo caninizado es un anticuerpo injertado a CDR, en el que las secuencias de la CDR no de cánido se introducen en secuencias VH y VL de cánido para sustituir las correspondientes secuencias de la CDR de cánido.

Las formas caninizadas de anticuerpos no de cánido que se proporcionan en el presente documento son anticuerpos de cánido que contienen una secuencia derivada de un anticuerpo no de cánido. Para la mayor parte, los anticuerpos caninizados son secuencias de anticuerpo de cánido (anticuerpo "aceptor" o "receptor" en el que los restos de la región hipervariable del receptor se sustituyen por restos de la región hipervariable de una especie no de cánido (anticuerpo "donante") tal como de ratón, rata, conejo, gato, cabra, pollo, bovino, caballo, llama, camello, dromedarios, tiburones, primates no humanos, humanos, humanizados, una secuencia recombinante, o una secuencia diseñada mediante ingeniería genética que tenga las propiedades deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco (FR) del anticuerpo de cánido se sustituyen por los restos no de cánido correspondientes. Además, los anticuerpos caninizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se efectúan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. El anticuerpo caninizado puede comprender también al menos una porción de la región constante de inmunoglobulina (Fc) de un anticuerpo de cánido. Las estrategias para la caninización de anticuerpos incluyen, aunque no de forma limitativa, las estrategias desveladas en el documento WO 2003/060080.

El anticuerpo caninizado es un anticuerpo o una variante, derivado, análogo o fragmento del mismo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de interés y que comprende una región marco (FR) que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de cánido y una región determinante de la complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no de cánido. Un anticuerpo caninizado comprende sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, FabC, Fv) en el que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no de cánido y todas o sustancialmente todas las regiones marco son aquellas de una secuencia consenso de la inmunoglobulina de cánido. Un anticuerpo caninizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente, la de una inmunoglobulina de cánido. Un anticuerpo de cánido o caninizado puede contener la cadena ligera así como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo puede incluir también las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3, y CH4 de la cadena pesada. Un anticuerpo caninizado puede contener solo una cadena ligera caninizada, o puede contener solo una cadena pesada caninizada. Un anticuerpo caninizado ilustrativos contiene un dominio variable caninizado de una cadena ligera y un dominio variable caninizado de una cadena pesada.

El término resto "convencional" se refiere a un resto en una CDR o en un marco que define una estructura de CDR convencional como se define por Chothia y col. (J. Mol. Biol., 196:901-907 (1987); Chothia y col., J. Mol. Biol., 227:799 (1992). De acuerdo con Chothia y col., las porciones críticas de las CDR de muchos anticuerpos tienen conformaciones de la estructura peptídica casi idénticas a pesar de la gran diversidad al nivel de la secuencia de aminoácidos. Cada estructura convencional específica principalmente un conjunto de ángulos de torsión de la

estructura peptídica de un segmento continuo de restos de aminoácidos formador de un bucle.

el término "CDR" se refiere a la región determinante de la complementariedad comprendido en las secuencias variables de anticuerpos. Existen tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, que se designan CDR1, CDR2 y CDR3, para cada una de las regiones variables. La expresión "conjunto de CDR" se refiere a un grupo de tres CDR que se produce en una única región variable capaz de unirse al antígeno. Los límites exactos de estas CDR se han definido de forma diferente de acuerdo con diferentes sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Doctor en medicina, (1987) y (1991)) no solo proporciona un sistema de numeración de restos inequívoco aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también proporciona límites precisos de restos que definen las tres CDR. Estas CDR pueden denominarse como CDR de Kabat. Chothia y colaboradores (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) y Chothia y col., *Nature* 342:877-883 (1989)) encuentran que determinadas subporciones comprendidas en las CDR de Kabat adoptan conformaciones de la estructura peptídica casi idénticas, a pesar que tienen gran diversidad al nivel de la secuencia de aminoácidos. Estas subporciones se designaron L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3 donde la "L" y la "H" designan las regiones de la cadena ligera y la cadena pesada, respectivamente. Estas regiones pueden denominarse CDR de Chothia, que tienen límites que solapan con las CDR de Kabat. Se han descrito otros límites que definen las CDR solapantes con la región de Kabat CDRs por Padlan (*FASEB J.* 9:133-139 (1995)) y MacCallum (*J Mol Biol* 262(5):732-45 (1996)). Además, otras definiciones de límites de la CDR pueden no seguir estrictamente uno de los anteriores sistemas, pero aun así se superpondrán con las CDR de Kabat, aunque pueden acortarse o alargarse a la luz de la predicción o los hallazgos experimentales de que restos o grupos de restos concretos o incluso CDR completas no alteran significativamente la unión con el antígeno. Los procedimientos utilizados en el presente documento pueden utilizar CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque determinados procedimientos descritos en el presente documento utilizan las CDR definidas en Kabat o Chothia.

La expresión "anticuerpo injertado en la CDR" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera procedentes de una especie pero en la que las secuencias de una o más de las regiones de la CDR de VH y/o VL están sustituidas con secuencias de la CDR de otras especies, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de la cadena pesada y ligera de murino en las que una o más de las CDR de murino (*por ejemplo*, CDR3) se han sustituido con secuencias de las CDR humanas.

La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de una especie y secuencias de la región constante de otras especies, dichos anticuerpos tienen regiones variables de la cadena pesada y ligera de murino unidas a regiones constantes humanas, de cánido, equino, o felino. Los anticuerpos quiméricos comprenden una porción de la cadena pesada y/o ligera que es idéntica a, u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivadas de una especie concreta o que pertenecen a una clase o subclase concreta de anticuerpo, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es(son) idéntico(s) a u homólogas a las secuencias correspondientes en los anticuerpos de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como los fragmentos de dichos anticuerpos, que presentan la actividad biológica deseada (Véase, patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; y Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)).

Los términos "cristal" y "cristalizado" se refieren a un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, que existe en la forma de un cristal. Los cristales son una forma del estado sólido de la materia, que es distinta de otras formas tales como el estado sólido amorfo o el estado cristalino líquido. Los cristales están compuestos de matrices tridimensionales de átomos con repeticiones, regulares, iones, moléculas (por ejemplo, proteínas tales como anticuerpos), o ensamblajes moleculares (por ejemplo, complejos de antígeno/anticuerpo). Estas matrices tridimensionales están dispuestas de acuerdo con relaciones matemáticas específicas que se entienden bien en el campo. La unidad fundamental, o bloque de construcción, que está repetida en un cristal se denomina la unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en una disposición que conforma una simetría cristalográfica bien definida dada proporciona la "celda unidad" del cristal. La repetición de la celda unidad en traslaciones regulares en las tres dimensiones proporciona el cristal. Véase Giege, R. y Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2ª ed., págs. 201-16, Oxford University Press, Nueva York, Nueva York, (1999).

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Utilizando un enlazador que es corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno.

Las expresiones "donante" y "anticuerpo donante" se refieren a un anticuerpo que proporciona una o más CDR. Un anticuerpo donante puede ser un anticuerpo de una especie diferente del anticuerpo del cual se obtienen o se derivan las regiones marco. En el contexto de un anticuerpo humanizado, la expresión "anticuerpo donante" se refiere a un anticuerpo no humano que proporciona una o más CDR. En el contexto de un anticuerpo caninizado, la expresión "anticuerpo donante" se refiere a un anticuerpo no de cánido que proporciona una o más CDR. En el contexto de un anticuerpo felinizado, la expresión "anticuerpo donante" se refiere a un anticuerpo no de felino que proporciona una o más CDR. En el contexto de un anticuerpo equinizado, la expresión "anticuerpo donante" se

refiere a un anticuerpo no de equino que proporciona una o más CDR.

El término "epítipo" incluye cualquier determinante polipeptídico capaz de unirse de forma específica a una inmunoglobulina o receptor de linfocitos T. Los determinantes de epítipos pueden incluir agrupaciones de moléculas superficiales químicamente activas tales como aminoácidos, cadenas secundarias de azúcares, fosforilo, o sulfonilo, y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que está unida por un anticuerpo. Se dice que un anticuerpo está unido específicamente a un antígeno cuando este reconoce preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

La expresión "anticuerpo de equino" se refiere a una inmunoglobulina de origen natural o producida de forma recombinante compuesta de secuencias de aminoácidos representativas de anticuerpos naturales aislados de cánidos de diversas razas. Los anticuerpos de equinos son anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal de equino. Los anticuerpos de equino de la divulgación pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal de cánido (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis *in vitro* aleatorias o específicas de sitio, o mediante mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y en la CDR3 en concreto. Sin embargo, no se pretende que la expresión "anticuerpo de equino" incluya anticuerpos en los que las secuencias de la CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como ratón, hayan de injertarse sobre secuencias del marco de equino.

El término "equinización" se define como un procedimiento para transferir aminoácidos de unión a antígeno no de equino desde un marco de anticuerpo donante a un marco de anticuerpo aceptor de equino para generar tratamientos terapéuticos de proteínas útiles en caballos.

La expresión "anticuerpo equinizado" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y la cadena ligera de una especie no de equino (*por ejemplo*, un ratón) pero en la que al menos una porción de la secuencia VH y/o VL se ha alterado para ser más "similar a equino", *es decir*, más similar a las secuencias variables de la línea germinal de equino. Un tipo de anticuerpo equinizado es un anticuerpo injertado a CDR, en el que las secuencias de la CDR no de equino se introducen en secuencias VH y VL de equino para sustituir las correspondientes secuencias de la CDR de equino.

Las formas equinizadas de anticuerpos no de equino que se proporcionan en el presente documento son anticuerpos de equino que contienen una secuencia derivada de un anticuerpo no de equino. Para la mayor parte, los anticuerpos equinizados son secuencias de anticuerpo de equino (anticuerpo "ceptor" o "receptor") en el que los restos de la región hipervariable del receptor se sustituyen por restos de la región hipervariable de una especie no de equino (anticuerpo "donante") tal como de ratón, rata, conejo, gato, perros, cabra, pollo, bovino, caballo, llama, camello, dromedarios, tiburones, primates no humanos, humanos, humanizados, una secuencia recombinante, o una secuencia diseñada mediante ingeniería genética que tenga las propiedades deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco (FR) del anticuerpo de equino se sustituyen por los restos FR no de equino correspondientes. Además, los anticuerpos equinizados pueden incluir restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se efectúan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. El anticuerpo equinizado puede comprender también al menos una porción de la región constante de inmunoglobulina (Fc) de un anticuerpo de equino.

El anticuerpo equinizado es un anticuerpo o una variante, derivado, análogo o fragmento del mismo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de interés y que comprende una región marco (FR) que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de equino y una región determinante de la complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no de equino. Un anticuerpo equinizado comprende sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, FabC, Fv) en el que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no de equino y todas o sustancialmente todas las regiones marco son aquellas de una secuencia consenso de la inmunoglobulina de equino. Un anticuerpo equinizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente, la de una inmunoglobulina de equino. Un anticuerpo de equino o equinizado puede contener la cadena ligera así como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo puede incluir también las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3, y CH4 de la cadena pesada. Un anticuerpo equinizado puede contener solo una cadena ligera equinizada, o una cadena pesada equinizada. Un anticuerpo equinizado ilustrativo contiene un dominio variable equinizado de una cadena ligera y un dominio variable equinizado de una cadena pesada. Los isotipos de equino incluyen, por ejemplo, IgGa, IgGb, IgGc, IgG(T), IgM, IgA.

El término "Fab" se refiere a fragmentos de anticuerpos. La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina de como resultado un antígeno de unión con reticulación. El fragmento Fab contiene también el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteína(s) de la "región bisagra" del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en

el presente documento de Fab' en la que el(los) resto(s) de cisteína de los dominios constantes soportan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> se produjeron originalmente como parejas de fragmento Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. Se conocen también otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

5 La expresión "anticuerpo de felino" se refiere a una inmunoglobulina de origen natural o producida de forma recombinante compuesta de secuencias de aminoácidos representativas de anticuerpos naturales aislados de felinos de diversas razas. Los anticuerpos de felinos son anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal de felino. Los anticuerpos de felino de la divulgación pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal de felino (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis *in vitro* aleatorias o específicas de sitio, o mediante mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y en la CDR3 en concreto. Sin embargo, no se pretende que la expresión "anticuerpo de felino" incluya anticuerpos en los que las secuencias de la CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como ratón, hayan de injertarse sobre secuencias del marco de felino.

15 El término "felinización" se define como un procedimiento para transferir aminoácidos de unión a antígeno no de felino desde un marco de anticuerpo donante a un marco de anticuerpo aceptor de felino para generar tratamientos terapéuticos de proteínas útiles en gatos.

La expresión "anticuerpo felinizado" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y la cadena ligera de una especie no de felino (*por ejemplo*, un ratón) pero en la que al menos una porción de la secuencia VH y/o VL se ha alterado para ser más "similar a felino", *es decir*, más similar a las secuencias variables de la línea germinal de felino. Un tipo de anticuerpo felinizado es un anticuerpo injertado a CDR, en el que las secuencias de la CDR no de felino se introducen en secuencias VH y VL de equino para sustituir las correspondientes secuencias de la CDR de felino.

25 Las formas felinizadas de anticuerpos no de felino que se proporcionan en el presente documento son anticuerpos de felino que contienen una secuencia derivada de un anticuerpo no de felino. Para la mayor parte, los anticuerpos felinizados son secuencias de anticuerpo de felino (anticuerpo "aceptor" o "receptor") en las que los restos de la región hipervariable del receptor se sustituyen por restos de la región hipervariable de una especie no de felino (anticuerpo "donante") tal como de ratón, rata, conejo, gato, perros, cabra, pollo, bovino, caballo, llama, camello, dromedarios, tiburones, primates no humanos, humanos, humanizados, una secuencia recombinante, o una secuencia diseñada mediante ingeniería genética que tenga las propiedades deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco (FR) del anticuerpo de felino se sustituyen por los restos FR no de felino correspondientes. Además, los anticuerpos felinizados pueden incluir restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se efectúan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. El anticuerpo felinizado puede comprender también al menos una porción de la región constante de inmunoglobulina (Fc) de un anticuerpo de felino.

El anticuerpo felinizado es un anticuerpo o una variante, derivado, análogo o fragmento del mismo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de interés y que comprende una región marco (FR) que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de felino y una región determinante de la complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no de felino. Un anticuerpo felinizado comprende sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, FabC, Fv) en el que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no de felino y todas o sustancialmente todas las regiones marco son aquellas de una secuencia consenso de la inmunoglobulina de felino. Un anticuerpo felinizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente, la de una inmunoglobulina de felino. Un anticuerpo de felino o felinizado puede contener la cadena ligera así como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo puede incluir también las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3, y CH4 de la cadena pesada. Un anticuerpo felinizado puede contener solo una cadena ligera felinizada una cadena pesada felinizada. Un anticuerpo felinizado ilustrativo contiene solo un dominio variable felinizado de una cadena ligera y un dominio variable caninizado de una cadena pesada.

50 El término "marco" o "secuencia del marco" se refiere a las secuencias restantes de una región variable menos las CDR. Ya que la definición exacta de una secuencia CDR puede determinarse mediante diferentes sistemas, el significado de una secuencia del marco es sujeto de interpretaciones correspondientemente diferentes. Las seis CDR (CDR-L1, -L2 y -L3 de la cadena ligera y CDR-H1, -H2 y -H3 de la cadena pesada) dividen también las regiones marco en la cadena ligera y la cadena pesada en cuatro subregiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, en el que la CDR1 se sitúa entre FR1 y FR2, la CDR2 entre FR2 y FR3 y la CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las subregiones concretas como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región marco, como citan otros autores, representa las FR combinadas en la región variable de una única, cadena de inmunoglobulina de origen natural. Una FR representa una de las cuatro subregiones y las FR representan dos o más de las cuatro subregiones que constituyen una región marco. Se conocen en la técnica las secuencias aceptoras de la cadena pesada y la cadena ligera humanas. Se conocen también las secuencias aceptoras de la cadena pesada y la cadena ligera de cánido (publicación de solicitud de patente WO03/060080 y la patente de Estados Unidos 7261890B2).

- La expresión "gen del anticuerpo de la línea germinal" o "fragmento de gen" se refiere a una secuencia de inmunoglobulina codificada por células no linfoides que no han experimentado el proceso de maduración que conduce a la redistribución genética y a la mutación para la expresión de una inmunoglobulina concreta (Shapiro y col., Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis y col., Adv Exp Med Biol. 484:13-30 (2001)). Una de las ventajas proporcionadas por las proteínas de unión de la presente divulgación procede del reconocimiento de que los genes del anticuerpo de la línea germinal es más probable que sean genes de anticuerpo maduros que conservan las estructuras de la secuencia de aminoácidos esencial de los individuos en la especie, por tanto, es menos probable que sean reconocidas como procedentes de una fuente extraña cuando se usa terapéuticamente en esta especie.
- El término "Fv" se refiere al fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de una cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera.
- La expresión "anticuerpo humano" se refiere a anticuerpos que tiene regiones variable y constante derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la divulgación pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis *in vitro* aleatorias o específicas de sitio, o mediante mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y en la CDR3 en concreto. Sin embargo, no se pretende que la expresión "anticuerpo humano" incluya anticuerpos en los que las secuencias de la CDR derivados de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como ratón, hayan de injertarse sobre secuencias del marco de humano.
- La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y la cadena ligera de una especie no humana (*por ejemplo*, un ratón) pero en la que al menos una porción de la secuencia VH y/o VL se ha alterado para ser más "similar a humana", es decir, más similar a las secuencias variables de la línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo injertado a CDR, en el que las secuencias de la CDR no humana se introducen en secuencias VH y VL humanas para sustituir las correspondientes secuencias de la CDR humana.
- El anticuerpo humanizado es un anticuerpo o una variante, derivado, análogo o fragmento del mismo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de interés y que comprende una región marco (FR) que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región determinante de la complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, FabC, Fv) en el que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones marco son aquellas de una secuencia consenso de la inmunoglobulina humana. Un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Un anticuerpo humanizado o caninizado puede contener la cadena ligera así como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo puede incluir también las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3, y CH4 de la cadena pesada. Como alternativa, Un anticuerpo humanizado puede contener solo una cadena ligera humanizada, o una cadena pesada humanizada. Un anticuerpo humanizado ilustrativo contiene un dominio variable humanizado de una cadena ligera y un dominio variable caninizado de una cadena pesada.
- El anticuerpo bovinizado, camelizado, caninizado, equinizado, felinizado, o humanizado se puede seleccionar a partir de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE y cualquier isotipo, incluyendo, aunque no de forma limitativa IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4. el anticuerpo bovinizado, camelizado, caninizado, equinizado, felinizado, o humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y se pueden seleccionar dominios constantes concretos para optimizar las funciones efectoras deseadas utilizando técnicas bien conocidas en la materia.
- El marco y las regiones CDR de un anticuerpo bovinizado, camelizado, caninizado, equinizado, felinizado, o humanizado no necesita corresponder precisamente a las secuencias precursoras, por ejemplo, la CDR del anticuerpo donante del marco consenso puede mutagenizarse mediante sustitución, inserción y/o delección de al menos un resto de aminoácido de tal manera que la CDR o el resto marco en este sitio no corresponden a cualquiera del anticuerpo donante o el marco consenso. Dichas mutaciones, sin embargo, no serán extensas. Normalmente, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% y al menos 95% de los restos del anticuerpo bovinizado, camelizado, caninizado, equinizado, felinizado, o humanizado corresponderán a aquellos de las secuencias FR y de la CDR precursoras. La expresión "marco consenso" se refiere a una región marco en la secuencia consenso de la inmunoglobulina. La expresión "secuencia consenso de la inmunoglobulina" se refiere a la secuencia formada a partir de los aminoácidos (o nucleótidos) que se producen más frecuentemente en una familia de secuencias de inmunoglobulina relacionadas (Véase, por ejemplo, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania 1987). En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por la secuencia de aminoácidos que se produce más frecuentemente en esta posición en la familia. si las dos familias se producen igualmente de forma frecuente, cualquiera puede estar incluida en la secuencia consenso.

La expresión "región hipervariable" se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" en el dominio variable de la cadena ligera y en el dominio variable de la cadena pesada como se define por Kabat y col., 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Doctor en medicina, (1991) y/o como se define por (Chothia y Lesk, Mol. Biol. 196:901-917 (1987) y/o tal como se define por "bucles AbM" por Martin, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272 (1989) y/o como se define por Lefranc y col., Nucleic Acids Res, 27:209-212 (1999) en la base de datos de los sistemas de información internacionales ImMunoGeneTics. Los restos "marco" o "FR" son aquellos restos del dominio variable diferentes de los restos de la región hipervariable tal como se definen en el presente documento.

El término "identidad" se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más moléculas polipeptídicas o dos o más moléculas de ácido nucleico, como se determina mediante la comparación de sus secuencias, en el que "identidad" se refiere más específicamente hasta el grado de secuencia relacionado entre moléculas de ácido nucleico o polipéptidos, según lo determinado por la correspondencia entre cadenas de dos o más nucleótidos o dos o más secuencias de aminoácidos. "identidad" mide el porcentaje de correspondencias idénticas entre las dos o más secuencias más pequeñas con alineación de huecos (si acaso) resueltos por un modelo matemático o programa informático concreto (es decir, "algoritmos"). El término "similitud" se usa para referirse a un concepto relacionado con respecto a la relación de dos o más moléculas de ácido nucleico o dos o más moléculas polipeptídicas. En contraste con "identidad", "similitud" se refiere a una medida relacionada, que incluye correspondencias idénticas y correspondencias de sustituciones conservativas. Por ejemplo, para dos secuencias de polipéptidos que tienen aminoácidos 50/100 idénticos, y el resto son todas sustituciones no conservativas, a continuación, el porcentaje de identidad y similitud serían el 50%. Con respecto a las mismas dos secuencias, si 25 posiciones más tenían sustituciones conservativas, a continuación, el porcentaje de identidad sigue siendo del 50%, mientras que el porcentaje de similitud sería del 75% (75/100). La identidad y la similitud de los ácidos nucleicos y polipéptidos relacionados puede calcularse fácilmente por procedimientos bien conocidos y fácilmente disponibles en la técnica, incluyendo, aunque no de forma limitativa, los descritos en COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, (Lesk, A. M., ed.), 1988, Oxford University Press, Nueva York; BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS, (Smith, D. W., ed.), 1993, Academic Press, Nueva York; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, Parte 1, (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.), 1994, Humana Press, Nueva Jersey; von Heinje, G., SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1987, Academic Press; SEQUENCE ANALYSIS PRIMER, (Gribskov, M. y Devereux, J., eds.), 1991, M. Stockton Press, Nueva York; Carillo y col., 1988, SIAM J. Applied Math., 48:1073; y Durbin y col., 1998, ANÁLISIS DE LA SECUENCIA BIOLÓGICA, Cambridge University Press.

Los procedimientos preferidos para determinar la identidad se diseñan para proporcionar la correspondencia más elevada entre las secuencias comparadas y se describen bien en programas informáticos públicamente disponibles de forma fácil. Dichos procedimientos informáticos preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, aunque no de forma limitativa, el paquete del programa GCG, que incluye GAP (Devereux y col., 1984, Nucl. Acid. Res., 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul y col., 1990, J. Mol Biol., 215:403-410). El programa BLASTX está públicamente disponible del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul y col. NCB/NLM/NIH Bethesda, Doctor en medicina, 20894; Altschul y col., 1990, anteriormente). El conocido algoritmo de Smith Waterman también puede usarse para determinar la identidad.

Los términos "individuo," "paciente", y "sujeto" se usan de manera indistinta en el presente documento, para referirse a mamíferos, incluyendo, aunque no de forma limitativa, seres humanos, murinos, simios, felinos, cánidos, équidos, bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, mamíferos de granja y animales agrícolas, animales mamíferos para el deporte y mascotas de mamíferos. Sujetos ilustrativos de animales de compañía, tal como un perro, gato o caballo.

Un "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente exento de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une a NGF está sustancialmente exento de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes de NGF). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a NGF puede, sin embargo, tiene reactividad cruzada con otros antígenos, tal como moléculas NGF procedentes de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede sustancialmente no tener otros materiales celulares y/o productos químicos.

Las expresiones "polinucleótido aislado" y "ácido nucleico aislado" que se usan de manera indistinta en el presente documento se refieren a un polinucleótido de ADNc genómico, o de origen sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen no se asocia con toda o una parte de un polinucleótido en el que el polinucleótido aislado se encuentra en la naturaleza, o está unido a otro polinucleótido al cual no está unido en la naturaleza, o no se encuentra en la naturaleza en una secuencia más grande.

La expresión "proteína aislada" o "polipéptido aislado" es una proteína o polipéptido que, en virtud de su origen o fuente de derivación no se asocia con componentes asociados naturalmente que acompañan a esta en su estado nativo; está sustancialmente exenta de otras proteínas procedentes de la misma especie; se expresa procedente de una especie diferente; o que no se produzca en la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido que está sintetizado químicamente o sintetizado en un sistema celular diferente de la célula del cual se origina naturalmente estará "aislado" de sus componentes asociados naturalmente. Una proteína puede también volverse sustancialmente

exenta de los componentes asociados naturalmente mediante aislamiento, utilizando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la materia.

El término " $K_d$ " se refiere a la constante de disociación de una interacción antígeno-anticuerpo concreta como se conoce en la técnica.

- 5 El término " $K_{on}$ " se refiere a la constante de asociación para la asociación de un anticuerpo al antígeno para formar el complejo de antígeno/anticuerpo como se conoce en la técnica.

El término " $K_{off}$ " se refiere a la constante de disociación para la disociación de un anticuerpo del complejo antígeno/anticuerpo como se conoce en la técnica.

- 10 Los términos "numeración de Kabat", Las "definiciones de Kabat" y "marcado de Kabat" se usan de manera indistinta en el presente documento. estos términos, que se reconocen en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de restos de aminoácidos que son más variables (*es decir*, hipervariables) que los diferentes restos de aminoácidos en las regiones variables de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo (Kabat y col., Ann. NY Acad. Sci., 190:382-391 (1971); y Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N.º 91-3242 (1991)). Para la región variable de la cadena pesada, la región hipervariable varía desde las posiciones de los aminoácidos 31 a 35 para la CDR1, las posiciones de los aminoácidos 50 a 65 para la CDR2 y las posiciones de los aminoácidos 95 a 102 para la CDR3. Para la región variable de la cadena ligera, la región hipervariable varía desde las posiciones de los aminoácidos 24 a 34 para la CDR1, las posiciones de los aminoácidos 50 a 56 para la CDR2 y las posiciones de los aminoácidos 89 a 97 para la CDR3.

- 20 El término "resto clave" se refiere a determinados restos comprendidos en la región variable que tienen más impacto sobre la especificidad de unión y/o la afinidad de un anticuerpo, particular, un anticuerpo mamiferizado tal como un anticuerpo humanizado, caninizado, equinizado o felinizado. Un resto clave incluye, aunque no de forma limitativa, uno o más de los siguientes: un resto que es adyacente a una CDR, un sitio de glicosilación potencial (puede ser cualquier sitio de N u O-glicosilación), un resto raro, un resto capaz de interactuar con el antígeno, un resto capaz de interactuar con una CDR, un resto convencional, un resto de contacto entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera, un resto en la zona de Vernier, y un resto en la región que solapa entre la definición de Chothia de una CDR1 de una cadena pesada variable y la definición de Kabat del primer resto de la cadena pesada.

- 30 La expresión "proteína de unión marcada" se refiere a una proteína con una marca incorporada que proporciona la identificación de la proteína de unión. En un aspecto, la marca es un marcador detectable, por ejemplo, la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la unión a un polipéptido de restos biotinilo que se pueden detectar mediante la avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o la actividad enzimática que se puede detectar mediante procedimientos ópticos o colorimétricos). Los ejemplos de marcas para polipéptidos incluyen, aunque no de forma limitativa, los siguientes: radioisótopos o radionucleidos (por ejemplo,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ , o  $^{153}\text{Sm}$ ); marcas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos basados en lantánidos), marcas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcadores quimioluminiscentes; grupos biotinilo; epítopos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítopos); y agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio.

El término "mamiferización" se refiere a un procedimiento para transferir información de la unión al antígeno donante a un anticuerpo aceptor de mamífero para generar tratamientos terapéuticos útiles. De manera más específica, la divulgación proporciona procedimientos para la felinización, equinización y caninización de anticuerpos.

- 45 La expresión "anticuerpo mamiferizado" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y la cadena ligera de una especie mamífero (*por ejemplo*, un ratón) pero en la que al menos una porción de la secuencia VH y/o VL se ha alterado para ser más similar al "mamífero de interés", véanse, por ejemplo, los anticuerpos humanizados, caninizados, equinizados o felinizados definidos en el presente documento. Dichos anticuerpos mamiferizados incluyen, aunque no de forma limitativa, anticuerpos bovinizados, camelizados, caninizados, equinizados, felinizados, o humanizados.

- 50 Los términos "modular" y "regular" se usan de manera indistinta y se refieren a un cambio o una alteración en la actividad de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de NGF). La modulación puede ser un aumento o una disminución en la magnitud de una determinada actividad o función de la molécula de interés. Las actividades y funciones ilustrativas de una molécula incluyen, aunque no de forma limitativa, características de unión, actividad enzimática, activación del receptor celular, y transducción de la señal.

- 55 El término "modulador" es un compuesto capaz de cambiar o alterar una actividad o función de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de NGF). Por ejemplo, un modulador puede producir un aumento o disminución en la magnitud de una determinada actividad o función de la molécula en comparación con la magnitud de la actividad o la función observada en la ausencia del modulador. Un modulador puede ser un inhibidor, que

disminuye la magnitud de al menos una actividad o función de una molécula. Los inhibidores ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, proteínas, péptidos, anticuerpos, pepticuerpos, hidratos de carbono o moléculas orgánicas pequeñas. Los pepticuerpos se describen, por ejemplo, En el documento WO01/8352.

5 La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota, o de fago; y no el procedimiento por el cual se produce y no está limitado a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma.

10 La expresión "proteína de unión multivalente" se usa en esta memoria descriptiva para denotar una proteína de unión que comprende dos o más sitios de unión a antígeno. La proteína de unión multivalente se diseña mediante ingeniería genética para tener tres o más sitios de unión a antígenos, y es generalmente un anticuerpo que no se produce de manera natural. La expresión "proteína de unión multiespecífica" se refiere a una proteína de unión capaz de unirse a dos o más dianas relacionadas o no relacionadas. Las proteínas de unión al dominio variable doble (DVD) son proteínas de unión que comprenden dos o más sitios de unión a antígenos y las proteínas de unión son tetravalentes o multivalentes. Dichos DVD pueden ser monoespecíficos, es decir, capaces de unirse a un antígeno o multiespecíficos, es decir, capaces de unirse a dos o más antígenos. Las proteínas de unión DVD que comprenden dos polipéptidos DVD de cadena pesada y dos polipéptidos DVD de cadena ligera se denominan DVD Ig. Cada mitad de un DVD Ig comprende un polipéptido DVD de cadena pesada, y un polipéptido DVD de cadena ligera, y dos sitios de unión a antígeno. Cada sitio de unión comprende un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera con un total de 6 CDR implicadas en una unión a antígeno por sitio de unión a antígeno. Las proteínas de unión a DVD y los procedimientos de preparar las proteínas de unión a DVD se desvelan en la publicación número WO/2008/024188. Un aspecto de la divulgación se refiere a una proteína de unión DVD que comprende proteínas de unión capaces de unirse a NGF. En otro aspecto, la proteína de unión a DVD es capaz de unirse a NGF y a una segunda diana.

25 Las expresiones "factor de crecimiento nervioso" y "NGF" se refieren al factor de crecimiento nervioso y a las variantes del mismo que retienen al menos parte de la actividad biológica de NGF. NGF incluye todas las especies de mamíferos de la secuencia nativa de NGF, incluyendo de murino, rata, humanos, conejo, cánido, felino, equino, o bovino.

**Tabla 1: Secuencia de NGF**

Proteína	Identificador de secuencia
C-terminal 6-His de NGF de cánido	SEQ ID NO: 50
NGF humano	SEQ ID NO: 85

30 La expresión "receptor de NGF" se refiere a un polipéptido que se une por o se activa por NGF. Los receptores de NGF incluyen el receptor TrkA y el receptor p75 de cualquier especie de mamífero, incluyendo, aunque no de forma limitativa, ser humano, cánido, felino, equino, primate, o bovino.

35 Las expresiones "enfermedad relacionada con NGF" y "trastorno relacionado con NGF" abarca cualquier enfermedad o trastorno en el que la actividad de NGF en sujeto que padece la enfermedad o trastorno ha mostrado ser o es sospechosa de ser tanto responsable de la patofisiología de la enfermedad o trastorno, como un factor que contribuye al empeoramiento de la enfermedad o trastorno, que se puede producir como resultado de niveles aumentados de NGF, o de una sensibilidad aumentada del sujeto a NGF. En consecuencia, una enfermedad relacionada con NGF o un trastorno relacionado con NGF es una enfermedad o trastorno en la que la reducción de la actividad de NGF se espera que alivie los síntomas y/o la progresión de la enfermedad o trastorno. Dichas enfermedades y trastornos pueden evidenciarse, por ejemplo, por un aumento en la concentración de NGF en un fluido biológico de un sujeto que padece el trastorno (*por ejemplo*, un aumento en la concentración del NGF en suero, plasma, líquido sinovial, etc. del sujeto), que puede detectarse, por ejemplo, utilizando un anticuerpo anti-NGF como se ha descrito anteriormente. Los ejemplos no limitantes de enfermedades y trastornos que se pueden tratar con los anticuerpos de la divulgación incluyen aquellas enfermedades y trastornos descritos en la siguiente sección que se refieren a composiciones farmacéuticas de los anticuerpos de la divulgación, y abarcan el dolor agudo resultante por ejemplo de cirugía u otro trauma, y dolor crónico.

45 El término "neutralizante" se refiere a la neutralización de la actividad biológica de un NGF cuando una proteína de unión se une específicamente a NGF. Una proteína de unión neutralizante es un anticuerpo neutralizante, cuya unión a NGF da como resultado la inhibición de la actividad biológica de NGF. La proteína de unión neutralizante se une a NGF y reduce la actividad biológica de NGF en al menos aproximadamente 20%, 40%, 60%, 80%, 85% o más. Se puede evaluar la inhibición de la actividad biológica de NGF al neutralizar la proteína de unión midiendo uno o más indicadores de la actividad biológica de NGF bien conocidos en la técnica, incluyendo la proliferación celular, cambios en la morfología celular, señalización celular, o cualquier respuesta celular detectable resultante de la unión de NGF al receptor TrkA.

La expresión "unido operativamente" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en

una relación que les permite funcionar en su manera prevista. Una secuencia control "unida operativamente" a una secuencia de codificación está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia de codificación se consigue en condiciones compatibles con las secuencias del control. Las secuencias "unidas operativamente" incluyen tanto secuencias de control de la expresión que son contiguas al gen de interés como secuencias de control de la expresión que actúan en *trans* o a una distancia para controlar al gen de interés. La expresión "secuencia control de la expresión", se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias de codificación a las cuales están ligadas. Las secuencias control de la expresión incluyen un inicio de la transcripción adecuado, la terminación, las secuencias promotoras y potenciadoras; señales de procesamiento del ARN eficaces tales como las señales de corte y empalme y de poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que potencian la eficacia de la traducción (es decir, la secuencia consenso de Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de la proteína; y cuando se desea, secuencias que potencian la secreción de la proteína. La naturaleza de dichas secuencias control difiere dependiendo del organismo hospedador; en procariontes, dichas secuencias control incluyen generalmente un promotor, un sitio de unión a ribosoma, y una secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotes, en general, dichas secuencias control incluyen promotores y secuencias de terminación de la transcripción. Se pretende que "secuencias control" incluya componentes cuya presencia es esencial para la expresión y procesamiento, y puede incluir también componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de ligandos.

La expresión "transportador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, que sean fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de transportadores farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que aumenta la vida media o la eficacia del anticuerpo o porción de anticuerpo.

El término "polinucleótido" significa una forma polimérica de dos o más nucleótidos, tanto ribonucleótidos como desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas monocatenarias y bicatenarias de ADN. La expresión "polinucleótido aislado" significará un polinucleótido (por ejemplo, de ADN genómico o de origen sintético, o alguna combinación de los mismos) que, en virtud de su origen, el "polinucleótido aislado" no está asociado con toda o una parte de un polinucleótido con el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza; está unido operativamente a un polinucleótido que no está unido en la naturaleza; o no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Los términos "péptido" y "proteína" se usan de manera indistinta con el término polipéptido y se refieren también a una cadena polimérica de aminoácidos. El término "polipéptido" abarca proteínas nativas o artificiales, fragmentos de proteínas y análogos polipeptídicos de una secuencia de proteína. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

La expresión "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado.

Se pretende que la expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora") se refiera a una célula en la que se ha introducido ADN exógeno. Debe entenderse que dichos términos se pretende que se refieran no solo a la célula sujeto concreta, sino, a la progenie de dicha célula. Debido a que se pueden producir determinadas modificaciones en las generaciones sucesivas debido tanto a mutación como a influencias ambientales, dicha progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula precursora, pero sigue incluida en el ámbito de la expresión "célula hospedadora". En un aspecto, las células hospedadoras incluyen células procariontes y eucariotes seleccionadas de cualquiera de los reinos de la vida. Las células eucariotes incluyen protistas, células fúngicas, vegetales y animales. En otro aspecto, las células hospedadoras incluyen, aunque no de forma limitativa, la línea de células procariontes *E. Coli*; las líneas de células de mamíferos CHO, HEK 293 y COS; la línea de células de insecto Sf9; y la célula fúngica *Saccharomyces cerevisiae*.

Se pueden usar técnicas normalizadas para el ADN recombinante, la síntesis de oligonucleótidos, y el cultivo y la transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Se pueden llevar a cabo reacciones enzimáticas y técnicas de purificación de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se lleva a cabo comúnmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Las anteriores técnicas y procedimientos pueden llevarse a cabo generalmente de acuerdo con los procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y describen en la totalidad de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook y col. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)).

La expresión "anticuerpo recombinante" se refiere a todas las especies de anticuerpos o inmunoglobulinas que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como los anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora, los anticuerpos aislados de una

5 biblioteca de anticuerpos humanos combinatoria, recombinante (Hoogenboom, TIB Tech., 15: 62-70 (1997); Azzazy y col., Clin. Biochem., 35: 425-445 (2002); Gavilondo y col., BioTechniques, 29: 128-145 (2002); Hoogenboom y col., Immunology Today, 21: 371-378 (2000)), los anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para los genes de la inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor, L. D., y col. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellennann y col., Current Opinion in Biotechnology, 13: 593-597 (2002); Little y col., Immunology Today, 21: 364-370 (2000)) o los anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualesquiera otros medios que implican el corte y empalme de las secuencias génicas de la inmunoglobulina con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal específicas de especie. Dichos anticuerpos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o cuando se usa un animal transgénico para las secuencias de la Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan y están relacionadas con las secuencias VH y VL de la línea germinal específicas de la especie, pueden no existir naturalmente en el repertorio de la línea germinal del anticuerpo *in vivo*.

15 El término "recuperar" se refiere al proceso de volver una especie química tal como un polipéptido sustancialmente exento de componentes asociados naturalmente mediante aislamiento, por ejemplo, utilizando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la materia.

20 El término "muestra" se usa en su sentido más amplio. Una "muestra biológica" incluye, aunque no de forma limitativa, cualquier cantidad de una sustancia procedente de un ser vivo o algo que vivía anteriormente. Dichos seres vivos incluyen, aunque no de forma limitativa, seres humanos, ratones, ratas, monos, perros, conejos y otros animales. Dichas sustancias incluyen, aunque no de forma limitativa, sangre, suero, orina, líquido sinovial, células, órganos, tejidos, médula ósea, ganglios linfáticos y bazo.

25 La expresión "Fv monocatenario" o "scFv" se refiere a fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite al sFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).

30 Las expresiones "unión específica" o "unir específicamente" en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína, o un péptido con una segunda especie química, significan que la interacción es dependiente de la presencia de una estructura concreta (por ejemplo, un determinante antigénico o epítipo) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura de proteína específica más bien que a las proteínas generalmente. Si un anticuerpo es específico para el epítipo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítipo A (o A libre, sin marcar), en una reacción que contiene "A" marcada y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcada unida al anticuerpo.

35 El término "sustancialmente" en el contexto de una CDR, se refiere a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una CDR de anticuerpo no humano.

40 La expresión "resonancia de plasmón superficial" se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de las interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas en una matriz biosensora, utilizando, por ejemplo, el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para descripciones adicionales (Jönsson, y col. Ann. Biol. Clin. 51: 19-26 (1993); Jönsson, y col., Biotechniques 11: 620-627 (1991); Johnsson, y col., J. Mol. Recognit. 8:125-131 (1995); y Johnsson, B., y col., Anal. Biochem., 198: 268-277 (1991)).

45 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser la cantidad y/o la duración de un tratamiento que es suficiente para reducir o mejorar la gravedad y/o la duración de un trastorno o uno o más síntomas del mismo, evitar el avance de un trastorno, producir la regresión de un trastorno, evitar la reincidencia, el desarrollo, el inicio o la progresión de uno o más síntomas asociados con un trastorno, detectar un trastorno, o aumentar o mejorar el(los) efectos profilácticos o terapéuticos de otro tratamiento (por ejemplo, un agente profiláctico o un agente terapéutico). Una persona experta en la materia puede determinar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o una porción de anticuerpo y puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo, y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo de desencadenar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella en la que los efectos tóxicos o perjudiciales del anticuerpo, o porción de anticuerpo, se compensan con los efectos terapéuticos beneficiosos.

55 El término "transformación" se refiere a cualquier proceso por el cual el ADN exógeno entra en una célula hospedadora. La transformación puede producirse en condiciones naturales o artificiales utilizando diversos procedimientos bien conocidos en la materia. La transformación puede basarse en cualquier procedimiento conocido para la inserción de las secuencias de ácido nucleico extraño en una célula hospedadora procarionota o eucariota. El

procedimiento se selecciona basándose en la célula hospedadora que se transforma y puede incluir, aunque no de forma limitativa, infección vírica, electroporación, lipofección, y bombardeo de partículas. Dichas células "transformadas" incluyen células transformadas de forma estable en las que el ADN insertado es capaz de replicación tanto como plásmido que se replica de forma autónoma o como parte del cromosoma hospedador. También incluyen células que expresan transitoriamente el ADN o ARN insertado durante periodos de tiempo limitados.

La expresión "organismo transgénico" se refiere a un organismo que tiene células que contienen un transgén, en el que el transgén introducido en el organismo (o un ancestro del organismo) expresa un polipéptido que no se expresa naturalmente en el organismo. Un "transgén" es una construcción de ADN, que se integra de forma estable y operativa en el genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla el organismo transgénico, dirigiendo la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos de células o tejidos del organismo transgénico.

Se pretende que el término "vector" se refiera a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden estar ligados segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que pueden estar ligados segmentos de ADN adicionales en el genoma vírico. Determinados vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episómicos de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora, y por tanto, se replican junto con el genoma hospedador. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales está unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores recombinantes"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están a menudo en la forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse de manera indistinta ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, se pretende que la divulgación incluya dichas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus defectivos en la replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que sirven funciones equivalentes.

La expresión "zona Vernier" se refiere a un subconjunto de restos del marco que pueden ajustarse a la estructura de la CDR y afinar el ajuste al antígeno, como se describe por Foote y Winter (1992, J. Mol. Biol. 224:487-499). Los restos de la zona Vernier forman una capa que subyace a las CDR y puede afectar la estructura de las CDR y la afinidad del anticuerpo.

### **B. Proteínas de unión dirigidas contra NGF**

La presente divulgación proporciona una novedosa familia de proteínas de unión, anticuerpos de murino, anticuerpos injertados a la CDR, anticuerpos mamiferizados (bovinizados, camelizados, caninizados, equinizados, felinizados, o humanizados) y fragmentos de los mismos, capaces de unirse y modular la actividad biológica en función de NGF, incluyendo la capacidad de neutralizar NGF. La divulgación proporciona también por tanto medios terapéuticos con los que inhibir NGF y proporciona composiciones y procedimientos para tratar la enfermedad asociada con niveles aumentados de NGF, particularmente una enfermedad, dolencia o trastorno donde niveles aumentados de NGF, en comparación con los niveles de NGF observados en sujetos normales comparables, son perjudiciales.

Las proteínas de unión de la presente divulgación pueden prepararse mediante cualquiera de numerosas técnicas conocidas en la materia y como se describe en el presente documento, incluyendo cultivar una célula hospedadora descrita en el presente documento en medio de cultivo en condiciones suficientes para producir una proteína de unión capaz de unirse a NGF.

Se pueden preparar anticuerpos monoclonales usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la materia que incluyen el uso de tecnologías de hibridoma recombinante y tecnologías de expresión en fago, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos monoclonales utilizando técnicas del hibridoma incluyendo las conocidas y enseñadas en la técnica, por ejemplo, en Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling, y col., *En: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, NY, 1981).

Se conocen bien en la técnica los procedimientos para producir y cribar anticuerpos específicos utilizando la tecnología del hibridoma. Dichos procedimientos incluyen, por ejemplo, cultivar una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo de la divulgación en el que el hibridoma se genera fusionando esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con un antígeno de la divulgación con células de mieloma y a continuación cribando los hibridomas resultantes de la fusión de los clones de hibridoma que secretan un anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido de la divulgación. En resumen, o como ejemplo, se inmunizaron los ratones con un antígeno de NGF. El antígeno de NGF se puede administrar, con o sin un adyuvante, para estimular la respuesta inmunitaria. Dichos adyuvantes incluyen adyuvante de Freund completo o incompleto, RIBI (dipéptidos de muramilo) o ISCOM (complejos de inmunoestimulación). Dichos adyuvantes pueden proteger el polipéptido de una rápida dispersión secuestrándolo en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan al hospedador a secretar factores que son quimiotácticos para los macrófagos y otros componentes. Si se administra un polipéptido, el calendario de

inmunización implicará dos o más administraciones del polipéptido, repartidas a lo largo de varias semanas.

Tras la inmunización de un animal con un antígeno de NGF, se pueden obtener los anticuerpos y/o las células productoras de anticuerpos a partir del animal. Se puede obtener suero que contenga un anticuerpo anti-NGF del animal sometiéndolo a sangría o sacrificando el animal. El suero puede utilizarse a medida que se obtiene del animal, se puede obtener una fracción de inmunoglobulina del suero, o se pueden purificar los anticuerpos anti-NGF a partir del suero. El suero o las inmunoglobulinas obtenidas de esta manera son policlonales, teniendo por tanto una matriz heterogénea de propiedades.

Una vez que se detecta una respuesta inmunitaria, por ejemplo, los anticuerpos específicos para el antígeno de NGF se detectan en el suero de ratón, puede extraerse al bazo de ratón y aislarse los esplenocitos. A continuación los esplenocitos se fusionan mediante técnicas bien conocidas a cualesquiera células de mieloma adecuadas, tal como, por ejemplo, células procedentes de la línea de células SP20 disponibles de la ATCC. se pueden seleccionar los hibridomas y clonarse mediante dilución limitada. Los clones de hibridoma pueden a continuación evaluarse mediante procedimientos conocidos en la materia para células que secretan anticuerpos capaces de unirse a NGF. líquido ascítico, que contiene generalmente altos niveles de anticuerpos, pueden generarse inmunizando ratones con clones de hibridoma positivos.

Se pueden generar hibridomas inmortalizados productores de anticuerpos procedentes de los animales inmunizados. Tras la inmunización, el animal puede sacrificarse y los linfocitos B esplénicos fusionarse en células de mieloma inmortalizadas como se sabe bien en la técnica (Harlow y col., *anteriormente*). Como alternativa, las células de mieloma pueden ser de una línea de células no secretora y no secretar polipéptidos de inmunoglobulina. Tras la fusión y selección de antibióticos, los hibridomas pueden cribarse utilizando NGF, o una parte del mismo, o una célula que expresa NGF. Se puede llevar a cabo el cribado inicial, por ejemplo, utilizando un inmunoanálisis de adsorción (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA). Se proporciona un ejemplo de cribado de ELISA en el documento WO 00/37504.

Se puede seleccionar un anticuerpo anti-NGF productor de hibridomas, clonarse y cribarse además para las características deseables, incluyendo un crecimiento sólido del hibridoma, una producción de anticuerpos alta y unas características deseables del anticuerpo, como se describe además a continuación. Los hibridomas pueden cultivarse y expandirse *in vivo* en animales sinérgicos, en animales que carecen de un sistema inmunitario, por ejemplo, ratones alotímicos, o en cultivos celulares *in vitro*. Son bien conocidos por las personas normalmente expertas en la técnica los procedimientos de seleccionar, clonar y expandir hibridomas.

Un sistema animal ilustrativo para preparar hibridomas es el ratón. La producción de hibridomas en el ratón está muy bien establecida, y son bien conocidos los protocolos y las técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión. Son también conocidos los ligandos (por ejemplo, células de mieloma) y los procedimientos de fusión. Como alternativa, los hibridomas pueden producirse en una especie no humana, especies no de ratón tal como rata, oveja, cerdo, cabra, ganado vacuno o caballos. Como alternativa, Se pueden producir hibridomas humanos, en los que un mieloma no secretor humano se fusiona con una célula humana que expresa un anticuerpo anti-NGF.

Pueden generarse fragmentos de anticuerpos que reconocen epítomos específicos mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, Los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> de la divulgación pueden producirse mediante escisión proteolítica de las moléculas de inmunoglobulina, utilizando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')<sub>2</sub>). Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> contienen la región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio CHI de la cadena pesada.

Pueden generarse anticuerpos recombinantes a partir de linfocitos individuales aislados utilizando un procedimiento denominado en la técnica procedimiento para seleccionar anticuerpos de linfocitos (SLAM), como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.627.052, publicación PCT WO 92/02551 y Babcock y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 93: 7843-7848 (1996). En este procedimiento, las células individuales que secretan anticuerpos de interés, por ejemplo, los linfocitos derivados de uno cualquiera de los animales inmunizados descritos en la sección 1, se criban utilizando un ensayo de placas hemolítico, en el que el antígeno de NGF, o un fragmento del mismo, se acopla a glóbulos rojos de oveja utilizando un enlazador, tales como biotina, y se usan para identificar células individuales que secretan anticuerpos con especificidad por NGF. Tras la identificación de las células secretoras de anticuerpos de interés, los ADNc de la región variable de la cadena pesada y la cadena ligera pueden rescatarse de las células mediante la PCR con transcriptasa inversa y estas regiones variables pueden, a continuación, expresarse, en el contexto de las regiones constantes de la inmunoglobulina adecuada (por ejemplo, regiones constantes humanas), en células hospedadoras de mamíferos, tales como células COS o células CHO. Las células hospedadoras transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas, derivadas de linfocitos seleccionados *in vivo*, pueden a continuación experimentar un análisis y selección adicionales *in vitro*, por ejemplo, mediante separación mediante cribado biológico de las células transfectadas para aislar las células que expresan anticuerpos anti-NGF. Las secuencias de inmunoglobulina amplificadas pueden además manipularse *in vitro*, tal como mediante procedimientos de maduración por afinidad *in vitro* como los descritos en la publicación PCT WO 97/29131 y la publicación PCT WO 00/56772.

Se pueden producir anticuerpos inmunizando un animal no humano que comprende alguno o todos los loci de la inmunoglobulina humana con un antígeno de NGF. Por ejemplo, Pueden generarse anticuerpos monoclonales dirigidos contra NGF utilizando ratones transgénicos que transportan partes del sistema inmunitario humano más bien que del sistema de ratón, denominados en la literatura y en el presente documento ratones "HuMab", contienen un minilocus del gen de la inmunoglobulina humana que codifica las secuencias de la inmunoglobulina de la cadena pesada ( $\mu$  y  $\gamma$ ) y la cadena ligera k que no se han reordenado, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de la cadena  $\mu$  and k (Lonberg y col., 1994, Nature 368:856-859). Estos ratones presentan una expresión reducida de la IgM o k de ratón, en respuesta a la inmunización y los transgenes de la cadena pesada y la cadena ligera humanas introducidos experimentan un intercambio de clases y la mutación somática para generar anticuerpos monoclonales de IgG k humanos de alta afinidad. La preparación de ratones HuMab se describe bien en la literatura. (Véase, *por ejemplo*, Lonberg y col., 1994, Nature 368:856-859; Lonberg, 1994, Handbook of Exp. Pharmacology 113:49-101; Taylor y col., 1994, International Immunology 6:579-591; Lonberg & Huszar, 1995, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93; y Harding & Lonberg, 1995, Ann. N.Y. Acad. Sci 764:536-546). Como alternativa, se pueden usar otras cepas tales como las variedades de ratones transgénicos HCo7, HCo12, y KM para generar anticuerpos anti-NGF. Otro ejemplo adecuado, aunque no limitante de un ratón transgénico es el ratón transgénico XENOMOUSE® que es una variedad de ratón diseñada mediante ingeniería genética que comprende grandes fragmentos de los loci de la inmunoglobulina humana y es deficiente en la producción de anticuerpos de ratón. Véanse, *por ejemplo*, Green y col. Nature Genetics, 7:13-21 (1994); y las patentes de Estados Unidos 5.916.771, 5.939.598, 5.985.615, 5.998.209, 6.075.181, 6.091.001, 6.114.598, y 6.130.364; WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 96/33735, WO 98/16654, WO 98/24893, WO 98/50433, WO 99/45031, WO 99/53049, WO 00 09560, y WO 00/037504. El ratón transgénico XENOMOUSE® produce un repertorio humano similar a adulto de anticuerpos completamente humanos, y genera Mab humanos específicos de antígeno. El ratón transgénico XENOMOUSE® contiene aproximadamente un 80% del repertorio del anticuerpo humano mediante la introducción de fragmentos YAC de configuración de la línea germinal dimensionados como megabases de los loci de la cadena pesada y los loci de la cadena ligera humana (Mendez y col., Nature Genetics 15:146-156 (1997), Green y col., J. Exp. Med., 188: 483-495 (1998)).

Se pueden usar también procedimientos *in vitro* para preparar los anticuerpos de la divulgación, en el que una biblioteca de anticuerpos se criba para identificar un anticuerpo que tiene la especificidad de unión deseada. Los procedimientos para dicho cribado de las bibliotecas de anticuerpos recombinantes son bien conocidos en la técnica e incluyen los procedimientos descritos en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.223.409; Las publicaciones PCT números WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; Fuchs y col. Bio/Technology, 9:1370-1372 (1991); Hay y col., Hum Antibod Hybridomas, 3: 81-85 (1992); Huse y col., Science, 246: 1275-1281 (1989); McCafferty y col., Nature, 348: 552-554 (1990); Griffiths y col., EMBO J., 12: 725-734 (1993); Hawkins y col., J Mol Biol., 226: 889-896 (1992); Clackson y col., Nature, 352: 624-628 (1991); Gram y col., PNAS, 89: 3576-3580 (1992); Garrad y col., Bio/Technology, 9:1373-1377 (1991); Hoogenboom y col., Nuc Acid Res, 19: 4133-4137 (1991); y Barbas y col., PNAS, 88: 7978-7982 (1991), la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 20030186374 y la publicación PCT n.º WO 97/29131.

La biblioteca de anticuerpos recombinantes puede ser de un sujeto inmunizado con NGF, o una porción de NGF. Como alternativa, la biblioteca de anticuerpos recombinantes puede ser de un sujeto no expuesto a tratamiento anteriormente que no se ha inmunizado con NGF, tal como una biblioteca de anticuerpos de cánido procedente de un sujeto cánido que no se ha inmunizado con NGF de cánido. Los anticuerpos de la divulgación se seleccionan cribando la biblioteca de anticuerpos recombinantes con el NGF de cánido que comprende el péptido para seleccionar por tanto aquellos anticuerpos que reconocen NGF. Los procedimientos para llevar a cabo dicho cribado y selección son bien conocidos en la materia, tal como se describe en las referencias en el párrafo precedente. Para seleccionar los anticuerpos de la divulgación que tienen afinidades de unión concretas por hNGF, tales como los que se disocian de NGF de cánido con una constante de velocidad de la reacción inversa  $k_{off}$  concreta, Se puede usar el procedimiento conocido en la técnica de resonancia de plasmón superficial para seleccionar anticuerpos que tienen la constante de velocidad de la reacción inversa  $k_{off}$  deseada. Para seleccionar los anticuerpos de la divulgación que tienen una actividad neutralizante concreta por hNGF, tales como aquellos con una  $CI_{50}$  concreta, se pueden usar los procedimientos normalizados conocidos en la técnica para evaluar la inhibición de la actividad de hNGF.

Por ejemplo, los anticuerpos de la presente divulgación se pueden generar también utilizando diversos procedimientos de expresión en fagos conocidos en la materia. En los procedimientos de expresión en fagos, los dominios de anticuerpos funcionales se presentan sobre la superficie de las partículas de fagos que pueden transportar las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En un aspecto concreto, dicho fago puede utilizarse para expresar los dominios de unión a antígenos expresados a partir de un repertorio de bibliotecas de anticuerpos combinatorios (por ejemplo, de cánido, humano o murino). Se puede seleccionar la expresión en fago de un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés o identificarse con un antígeno, por ejemplo, utilizando un antígeno marcado o un antígeno unido o capturado a una superficie sólida o perla. Los fagos usados en estos procedimientos son normalmente fagos filamentosos que incluyen dominios de unión fd y M13 expresados a partir de fagos con dominios de anticuerpos Fv estabilizados con Fab, Fv o disulfuro, fusionados de manera recombinante a cualquier proteína del gen III o gen VIII del fago. Los ejemplos de procedimientos de expresión en fagos que se pueden usar para preparar los anticuerpos de la presente divulgación incluyen los desvelados en Brinkman y col., J. Immunol. Methods, 182: 41-50 (1995); Ames y col., J. Immunol. Methods, 184: 177-186 (1995); Kettleborough y col.,

Eur. J. Immunol., 24:952-958 (1994); Persic y col., Gene, 187: 9-18 (1997); Burton y col., Advances in Immunology, 57: 191-280 (1994); solicitud PCT n.º PCT/GB91/01134; publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y patentes de Estados Unidos números 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780, 225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Como se describe en las referencias anteriores, tras la selección del fago, se pueden aislar las regiones de codificación del anticuerpo procedentes del fago y utilizarse para generar anticuerpos completos que incluyen anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresarse en cualquier hospedador deseado, incluyendo células de mamíferos, células de insectos, células vegetales, levaduras, y bacterias, por ejemplo, como se describe en detalle a continuación. Por ejemplo, las técnicas para producir fragmentos Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub> de manera recombinante pueden emplearse también utilizando procedimientos conocidos en la materia tales como los desvelados en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax y col., BioTechniques, 12(6):864-869 (1992); y Sawai y col., AJRI 34:26-34 (1995); y Better y col., Science, 240:1041-1043 (1988). Los ejemplos de técnicas que se pueden usar para producir Fv monocatenarios y anticuerpos incluyen aquellas descritas en las patentes de Estados Unidos 4.946.778 y 5.258.498; Huston y col., Methods in Enzymology, 203:46-88 (1991); Shu y col., PNAS, 90:7995-7999 (1993); y Skerra y col., Science, 240:1038-1040 (1988).

Son conocidas las alternativas para cribar bibliotecas de anticuerpos recombinantes mediante la expresión en fagos e incluyen otras metodologías para cribar bibliotecas combinatorias grandes que pueden aplicarse a la identificación anticuerpos de doble especificidad de la divulgación. Un tipo de sistema de expresión alternativo es aquel en el que la biblioteca de anticuerpos recombinantes se expresa como fusiones de proteína-ARN, como se describe en la publicación PCT n.º WO 98/31700 y Roberts y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 94:12297-12302 (1997). En este sistema, se crea una fusión covalente entre un ARNm y el péptido o la proteína que codifica este mediante la traducción *in vitro* de los ARNm sintéticos que transportan puromicina, un antibiótico aceptor de peptidilo, en su extremo 3'. Por lo tanto, se puede enriquecer un ARNm específico a partir de una mezcla compleja de ARNm (por ejemplo, una biblioteca combinatoria) basándose en las propiedades del péptido o la proteína codificada, por ejemplo, un anticuerpo, o una porción del mismo, tal como la unión del anticuerpo, o porción del mismo, al antígeno de doble especificidad. Las secuencias de anticuerpos que codifican anticuerpos, o las porciones del mismo, recuperadas del cribado de dichas bibliotecas se pueden expresar mediante medios recombinantes como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, en células hospedadoras de mamíferos) y, además, pueden someterse a maduración por afinidad adicional mediante cualesquiera ciclos de cribado adicionales de fusiones de ARNm-péptidos en las que se han introducido mutaciones en la(s) secuencia(s) seleccionadas originalmente, o mediante otros procedimientos para la maduración por afinidad *in vitro* de anticuerpos recombinantes, como se ha descrito anteriormente.

En otra estrategia, los anticuerpos de la presente divulgación se pueden generar también utilizando diversos procedimientos de expresión en levaduras conocidos en la materia. En los procedimientos de expresión en levaduras, se usan procedimientos genéticos para enlazar dominios de anticuerpos a la pared de la célula de levadura y expresarlos sobre la superficie de la levadura. En particular, dicha levadura puede utilizarse para expresar dominios de unión a antígenos expresados a partir de un repertorio de bibliotecas de anticuerpos combinatorias (por ejemplo, de humano o de murino). Los ejemplos de procedimientos de expresión de levaduras que se pueden usar para preparar los anticuerpos de la presente divulgación incluyen los desvelados en Wittrup y col., patente de Estados Unidos n.º 6.699.658.

Los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento pueden producirse también mediante ingeniería genética. Por ejemplo, la tecnología para la expresión de los genes de la cadena pesada y la cadena ligera en *E. coli* es el sujeto de las solicitudes de patente PCT: números de publicación WO 901443, WO901443, y WO 9014424 y en Huse y col., 1989 Science 246:1275-81. La presente divulgación abarca también por tanto los ácidos nucleicos aislados que codifican cualquiera de las proteínas de unión descritas en el presente documento, así como un vector recombinante que comprende dicha molécula de ácido nucleico y una célula hospedadora que comprende dichos vector recombinante.

Un vector es una molécula de ácido nucleico, que puede ser una construcción, capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha unido. Un vector puede incluir cualesquiera elementos operativos preferidos o requeridos. Los vectores preferidos son aquellos para los cuales se han descrito los sitios de restricción y que contienen los elementos operativos necesarios para la transcripción de la secuencia de ácido nucleico. Dichos elementos operativos incluyen, por ejemplo, al menos un promotor adecuado, al menos un operador, al menos una secuencia líder, al menos un codón terminador y cualesquiera otras secuencias de ADN necesarias o preferidas para la transcripción adecuada y la posterior traducción de la secuencia de ácido nucleico. Dichos vectores contienen al menos un origen de replicación reconocido por el organismo hospedador junto con al menos un marcador seleccionable y al menos una secuencia promotora capaz de iniciar la transcripción de la secuencia de ácido nucleico. Un vector puede ser un plásmido en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Un vector puede ser un vector vírico, en el que pueden estar ligados segmentos de ADN adicionales en el genoma vírico. Determinados vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episómicos de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora, y por tanto, se replican junto con el genoma

hospedador. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales está unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores recombinantes"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están a menudo en la forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse de manera indistinta ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, se pretende que la divulgación incluya dichas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus defectivos en la replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que sirven funciones equivalentes. a modo de ejemplo y no de limitación, los vectores adecuados incluyen pcADN, pTT (Durocher y col., Nucleic Acids Research, Vol 30, N.º 2 (2002)); pTT3 (pTT con múltiples sitios de clonación, pEFBOS (Mizushima y col., Nucleic acids Research, Vol 18, N.º 17 (1990)), pBV, pJV, pBJ, o pHybE (publicación de patente n.º: US 2009/0239259 A1).

Las secuencias que se unen de manera operativa están en una relación que les permite funcionar en su manera prevista. Una secuencia control unida operativamente a una secuencia de codificación está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia de codificación se consigue en condiciones compatibles con las secuencias del control. las secuencias unidas operativamente incluyen tanto secuencias de control de la expresión que son contiguas al gen de interés como secuencias de control de la expresión que actúan en trans o a una distancia para controlar al gen de interés. Las secuencias de control de la expresión, son secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de las secuencias de codificación a las cuales están ligadas. Las secuencias control de la expresión incluyen un inicio de la transcripción adecuado, la terminación, las secuencias promotoras y potenciadoras; señales de procesamiento del ARN eficaces tales como las señales de corte y empalme y de poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que potencian la eficacia de la traducción (es decir, la secuencia consenso de Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de la proteína; y cuando se desea, secuencias que potencian la secreción de la proteína. la naturaleza de dichas secuencias control difiere dependiendo del organismo hospedador; en procariotas, dichas secuencias control incluyen generalmente un promotor, un sitio de unión a ribosoma, y una secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotas, dichas secuencias de control incluyen promotores y secuencias de terminación de la transcripción. Las secuencias de control pueden incluir componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y pueden incluir también componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de ligandos.

Una célula hospedadora puede transformarse con un vector que introduce ADN exógeno en una célula hospedadora. La transformación puede producirse en condiciones naturales o artificiales utilizando diversos procedimientos bien conocidos en la materia. La transformación puede basarse en cualquier procedimiento conocido para la inserción de las secuencias de ácido nucleico extraño en una célula hospedadora procariota o eucariota. El procedimiento se selecciona basándose en la célula hospedadora que se transforma y puede incluir, aunque no de forma limitativa, infección vírica, electroporación, lipofección, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, bombardeo de partículas. Las células transformadas incluyen células transformadas de forma estable en las que el ADN insertado es capaz de replicación, ya sea como un plásmido que se replica de forma autónoma o como parte del cromosoma hospedador, y las células que expresan transitoriamente el ADN o ARN insertado durante periodos de tiempo limitados.

Los organismos hospedadores, tales como las células hospedadoras, se cultivan en condiciones adecuadas para la amplificación del vector y la expresión de la proteína, como es bien conocido en la materia. Se pueden detectar las proteínas recombinantes expresadas mediante cualquiera de numerosos procedimientos también bien conocidos en la materia.

Los organismos hospedadores adecuados incluyen, por ejemplo, un sistema de células procariotas o eucariotas. Una célula hospedadora puede ser una célula de protista, una célula animal, una célula vegetal o una célula fúngica. Una célula eucariota es, por ejemplo, una célula animal que puede ser una célula de mamífero, una célula de ave o una célula de insecto tal como una célula de insecto Sf9. Se pueden utilizar células procedentes de las establecidas y fácilmente disponibles, tales como, aunque no de forma limitativa, HeLa, MRC-5 o CV-1. La célula hospedadora puede ser una célula de *E. coli*, o una célula de levadura tal como, aunque no de forma limitativa *Saccharomyces cerevisiae*. Las células hospedadoras de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la divulgación incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr, descritas en Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 77: 4216-4220 (1980), utilizadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman y col., Mol. Biol., 159: 601-621 (1982)), células NSO de mieloma, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos se introducen en células hospedadoras de mamíferos, se producen los anticuerpos cultivando las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras, o mediante secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se hacen crecer las células hospedadoras. los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo utilizando procedimientos de purificación de proteínas convencionales.

Se pueden usar también células hospedadoras para producir fragmentos de anticuerpo funcionales, tales como fragmentos Fab o moléculas de scFv. se entenderá que las variaciones sobre el procedimiento anterior están comprendidas en el ámbito de la presente divulgación. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula

hospedadora con fragmentos funcionales que codifican ADN de cualquiera de la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo de la presente divulgación. Se puede usar también la tecnología de ADN recombinante para eliminar algo, o todo, el ADN cualquiera o ambas de las cadenas ligera y pesada que no sea necesaria para la unión a los antígenos de interés. Las moléculas expresadas a partir de dichas moléculas de ADN truncado están también abarcadas por los anticuerpos de la divulgación. Además, se pueden producir anticuerpos bifuncionales en los que una cadena pesada y una cadena ligera son un anticuerpo de la divulgación y las otras cadenas pesada y ligera son específicas de un antígeno diferente que los antígenos de interés reticulando un anticuerpo de la divulgación con un segundo anticuerpo mediante procedimientos de reticulación química normalizados.

En un sistema para la expresión recombinante de un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la divulgación, un vector de expresión recombinante que codifica la cadena pesada del anticuerpo y la cadena ligera del anticuerpo se introduce en las células dhfr-CHO mediante transfección mediada por calcio fosfato. En el vector de expresión recombinante, los genes de la cadena pesada y ligera del anticuerpo se unen cada uno operativamente a los elementos reguladores del potenciador del CMV/promotor de AdMLP para impulsar altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante transporta también un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que se han transfectado con el vector utilizando la selección/amplificación con metotrexato. Las células hospedadoras transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera del medio de cultivo. Se usan técnicas normalizadas de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, se transfectan las células hospedadoras, se seleccionan los transformantes, se cultivan las células hospedadoras y se recupera el anticuerpo del medio de cultivo. De forma más adicional, la divulgación proporciona un procedimiento para sintetizar un anticuerpo recombinante de la divulgación cultivando una célula hospedadora en un medio de cultivo adecuado hasta que se sintetiza un anticuerpo recombinante de la divulgación. El procedimiento puede comprender además aislar el anticuerpo recombinante a partir del medio de cultivo.

La presente divulgación proporciona por tanto proteínas de unión dirigidas contra NGF que son específicas y neutralizan sustancialmente los polipéptidos de NGF, incluyendo el NGF humano activo. Se proporcionan también secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera del anticuerpo que son sustancialmente específicas y neutralizan sustancialmente los polipéptidos de NGF cuando se unen a ellos. Esto permite la especificidad de los anticuerpos anti-NGF humano, y los anticuerpos monoclonales humanos con especificidad similar, para ser una inmunoterapia eficaz para las enfermedades asociadas a NGF.

La presente divulgación abarca las proteínas de unión dirigidas contra NGF que comprenden al menos una de las secuencias de aminoácidos seleccionadas entre el grupo que consiste en: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 207 y SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, y SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 202, y que se une a un epítipo del polipéptido NGF con una afinidad sustancialmente alta, como se describe en el presente documento y tiene la capacidad de modular sustancialmente, incluyendo reducir sustancialmente, la actividad del polipéptido NGF.

Los ejemplos de dichas proteínas de unión incluyen proteínas de unión que comprenden un polipéptido de cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 206 y SEQ ID NO: 207; y un polipéptido de cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, y SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 200 y SEQ ID NO: 202.

Los emparejamientos ilustrativos de un polipéptido de cadena pesada variable y un polipéptido de cadena ligera variable se representan por los siguientes emparejamientos: SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29 y

SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 177 y SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO:36; SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 180 y SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182 y SEQ ID NO: 183; SEQ ID NO: 185 y SEQ ID NO: 186; SEQ ID NO: 187 y SEQ ID NO: 188; y SEQ ID NO: 192 y SEQ ID NO: 193.

Abarcadas también en la divulgación están las proteínas de unión que se unen específicamente a NGF, como se describe en el presente documento y comprenden una región variable de la cadena pesada que tiene al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad con cualquiera de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 207. Abarcadas también están las proteínas de unión que se unen específicamente a NGF, como se describe en el presente documento, y comprenden una región variable de la cadena ligera que tiene al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad con cualquiera de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, y SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 202.

Las proteínas de unión ilustrativas que se unen específicamente a NGF, como se describe en el presente documento, comprenden preferentemente una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera del siguiente modo:

una región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 4, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo;

una región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 6 o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 8, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo;

una región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 10 o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 12, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo;

una región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 14 o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 16, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo;

una región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 18 o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 20, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo;

una región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 22 o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 24, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo;

una región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 25 o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 26, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo;

una región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 27 o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina



aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 188, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo;

una región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 189 o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 42, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo;

una región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 190 o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 188, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo;

una región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 206 o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 42, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo;

una región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 207 o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 188, o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; y

una región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 192 o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, y la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 193 o un fragmento de unión a antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.

Las proteínas de unión ilustrativas, como se desvelan en el presente documento puedes incluir al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre: a) las CDR de cadena pesada que consisten en las SEQ ID NOS: 55, 56, 57, 61, 62, 63, 67, 68, 69, 73, 74, 75, 79, 80, 81; o las secuencias de aminoácidos de las CDR modificadas que tienen una identidad de secuencias de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, o al menos 90% con una de dichas secuencias; b) las CDR de cadena ligera que consisten en las SEQ ID NOS: 58, 59, 60, 64, 65, 66, 70, 71, 72, 76, 77, 78, 82, 83, 84; o las secuencias de aminoácidos de las CDR modificadas que tienen una identidad de secuencias de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, o al menos 90% en peso con una de dichas secuencias.

Debe entenderse que se contemplan variaciones en cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos y secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento. Dichas variaciones incluyen aquellas que darán como resultado una secuencia de ácido nucleico que es capaz de dirigir la producción de análogos de las proteínas de unión a NGF correspondientes. Se entenderá que debido a la degeneración del código genético, se pueden realizar muchas sustituciones de nucleótidos que conducirán a una secuencia de ADN que sigue siendo capaz de dirigir la producción de la proteína correspondiente o sus análogos. Todas las mencionadas secuencias variantes de ADN que son funcionalmente equivalentes a cualquiera de las secuencias descritas en el presente documento, están abarcadas por la presente divulgación.

Una variante de cualquiera de las proteínas de unión descritas en el presente documento significa una proteína (o polipéptido) que difiere de una proteína dada (por ejemplo, un anticuerpo anti-NGF) en la secuencia de aminoácidos mediante la adición (por ejemplo, inserción), Delección o sustitución conservativa de aminoácidos, pero que retiene la actividad biológica de una proteína dada. Una sustitución conservativa de un aminoácido, es decir, se reconoce en la técnica que sustituir un aminoácido con un aminoácido diferentes de propiedades similares (por ejemplo, hidrofiliidad y grado de distribución de las regiones cargadas) implica normalmente un cambio menor. Estos cambios menores pueden identificarse, en parte, considerando el índice hidropático de los aminoácidos, como se entiende en la técnica (véase, por ejemplo, Kyte y col., J. Mol. Biol. 157: 105-132 (1982)). El índice hidropático de un aminoácido está basado en la consideración de su hidrofobicidad y carga. Se conoce en la técnica que los aminoácidos de índices hidropáticos similares pueden sustituirse y retener todavía la función de la proteína. En un aspecto, los aminoácidos que tienen índices hidropáticos de  $\pm 2$  están sustituidos. La hidrofiliidad de los aminoácidos puede también utilizarse para desvelar sustituciones que darían como resultado proteínas que retienen la función biológica. Una consideración de la hidrofiliidad de los aminoácidos en el contexto de un péptido permite el cálculo de la hidrofiliidad promedio local mayor que la del péptido, una medida útil que se ha notificado por correlacionarse bien con la antigenicidad y la inmunogenicidad (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 4.554.101). La sustitución de aminoácidos que tienen valores de hidrofiliidad similares puede dar como resultado péptidos que retienen la actividad biológica, por ejemplo, la inmunogenicidad, como se entiende en la técnica. En un aspecto, las sustituciones se llevan a cabo con aminoácidos que tienen valores de hidrofiliidad de  $\pm 2$  entre sí. El índice de hidrofobicidad y el valor de hidrofiliidad de los aminoácidos están influenciados por la cadena secundaria concreta de este aminoácido. Consistente con esta observación, se entiende que las sustituciones de

aminoácidos que son compatibles con la función biológica dependen de la similitud relativa de los aminoácidos, y particularmente las cadenas secundarias de aquellos aminoácidos, como se desveló por la hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño, y otras propiedades. Se puede usar también "variante" para describir un polipéptido o fragmento del mismo que se ha procesado de forma diferente, tal como mediante proteólisis, fosforilación, u otras modificaciones posteriores a la traducción, que retienen aún su actividad biológica o la reactividad del antígeno, por ejemplo, la capacidad de unirse a NGF. Se pretende que el uso de "variante" en el presente documento abarque fragmentos de una variante salvo que el contexto diga lo contrario.

Las proteínas de unión descritas en el presente documento abarcan una molécula de inmunoglobulina, Fv unido a disulfuro, scFv, anticuerpo monoclonal, anticuerpo de murino, anticuerpo quimérico, anticuerpo de dominio único, anticuerpo injertado a la CDR, diacuerpo, anticuerpos mamiferizados (bovinizados, camelizados, caninizados, equinizados, felinizados, o humanizados), anticuerpo de cánido, anticuerpo de felino, anticuerpo de equino, anticuerpo de murino, anticuerpo multiespecífico, Fab, anticuerpo doblemente específico, DVD, Fab', anticuerpo biespecífico, F(ab')<sub>2</sub>, o Fv incluyendo un fragmento Fv monocatenario.

Una proteína de unión puede comprender una región constante de la cadena pesada concreta, tal como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. Una proteína de unión ilustrativa incluye una región constante de la cadena pesada de IgG1 o una región constante de la cadena pesada de IgG4. Además, el anticuerpo puede comprender una región constante de la cadena ligera, tal como una región constante de la cadena ligera kappa o una región constante de la cadena ligera lambda. Una proteína de unión ilustrativa comprende una región constante de la cadena ligera kappa.

Se conocen en la técnica las sustituciones de los restos de aminoácidos en la porción Fc que alteran la función efectora del anticuerpo (Winter, y col. patentes de Estados Unidos números 5.648.260; 5.624.821). La porción Fc de un anticuerpo media algunas funciones efectoras importantes, por ejemplo, la inducción de citoquinas, ADCC, la fagocitosis, la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la semivida / velocidad de aclaramiento del anticuerpo y de los complejos de antígeno-anticuerpo. En algunos casos, estas funciones efectoras son deseables para el anticuerpo terapéutico, pero, en otros casos, pueden ser innecesarias o incluso perjudiciales, dependiendo de los objetivos terapéuticos. Determinados isotipos de la IgG humana, particularmente IgG1 e IgG3, median ADCC y CDC mediante la unión a FcγRs y al complemento C1q, respectivamente. Los receptores Fc neonatales (FcRn) son componentes críticos que determinan la semivida en circulación de los anticuerpos. Se puede sustituir al menos un resto de aminoácido en la región constante del anticuerpo, por ejemplo, la región Fc del anticuerpo, de tal manera que se alteran las funciones efectoras del anticuerpo.

Las proteínas de unión de acuerdo con la presente divulgación pueden comprender un dominio constante de la inmunoglobulina de cadena pesada tal como, por ejemplo, un dominio constante de IgM de humano o cánido o de equino o felino, un dominio constante de IgG4 de humano o cánido o de equino o felino, un dominio constante de IgG1 de humano o cánido o de equino o felino, un dominio constante de IgE de humano o cánido o de equino o felino, un dominio constante de IgG2 de humano o cánido o de equino o felino, un dominio constante de IgG3 de humano o cánido o de equino o felino, y un dominio constante de IgGA de humano o cánido o de equino o felino. Una proteína de unión como se describe en el presente documento puede comprender un dominio constante de la inmunoglobulina de cadena ligera tal como, aunque no de forma limitativa, cualquiera de humano, cánido, equino o felino, los dominios constantes kappa o lambda, o cualquiera de los dominios constantes equivalentes kappa p lambda de cánido, equino o felino. Una de dichas proteínas de unión ilustrativas tiene una región constante que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52 o SEQ ID NO: 54.

Las proteínas de unión que se describen en el presente documento pueden abarcar también un anticuerpo antiidiotipo contra NGF con respecto a al menos una proteína de unión a NGF de la presente divulgación. El anticuerpo antiidiotipo incluye cualquier proteína o péptido que contiene una molécula que comprende al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina tal como, aunque no de forma limitativa, al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada o la cadena ligera o una porción de unión a ligando de la misma, una región variable de cadena pesada o cadena ligera, una región constante de cadena pesada o cadena ligera, una región marco, o; cualquier porción de la misma, que puede incorporarse en una proteína de unión de la presente divulgación.

Las proteínas de unión de la divulgación son capaces de unirse a un NGF humano y de cánido con alta especificidad, y adicionalmente son capaces de modular la actividad o función biológica de NGF en un organismo o un sujeto, incluyendo neutralizar sustancialmente NGF humano y de cánido. Abarcados también por la presente divulgación están los anticuerpos monoclonales de murino aislados, o las porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen a NGF con una afinidad sustancialmente alta, tienen una velocidad lenta de la reacción inversa y/o tienen una capacidad neutralizante sustancialmente alta. Una proteína de unión ilustrativa como se desvela en el presente documento es capaz de neutralizar NGF con una potencia (CI<sub>50</sub>) de al menos aproximadamente 10 nM, al menos aproximadamente 5 nM, al menos aproximadamente 1 nM, al menos aproximadamente 0,5 nM, al menos aproximadamente 0,1 nM, al menos aproximadamente 0,05 nM, al menos aproximadamente 0,01 nM, o al menos aproximadamente 0,001 nM, como se midió en el ensayo de proliferación de linfocitos TF-1 de las ensayos pERK y Pathhunter. Las proteínas de unión que se describen en el presente documento pueden tener una constante de velocidad de la reacción directa (K<sub>on</sub>) respecto de NGF de al menos aproximadamente 10<sup>2</sup>M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>; al menos

aproximadamente  $10^3\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; al menos aproximadamente  $10^4\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; al menos aproximadamente  $10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; al menos aproximadamente  $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; o al menos aproximadamente  $10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , según se mide mediante resonancia de plasmón superficial. Las proteínas de unión que se describen en el presente documento pueden tener una constante de velocidad de la reacción inversa ( $K_{\text{off}}$ ) respecto de NGF de casi aproximadamente  $10^{-3}\text{s}^{-1}$ ; casi aproximadamente  $10^{-4}\text{s}^{-1}$ ; casi aproximadamente  $10^{-5}\text{s}^{-1}$ ; casi aproximadamente  $10^{-6}\text{s}^{-1}$  o casi aproximadamente  $10^{-7}\text{s}^{-1}$ , según se mide mediante resonancia de plasmón superficial. Las proteínas de unión que se describen en el presente documento pueden tener una constante de disociación ( $K_D$ ) respecto de NGF de al menos aproximadamente  $10^{-7}\text{M}$ ; casi aproximadamente  $10^{-8}\text{M}$ ; casi aproximadamente  $10^{-9}\text{M}$ ; casi aproximadamente  $10^{-10}\text{M}$ ; casi aproximadamente  $10^{-11}\text{M}$ ; casi aproximadamente  $10^{-12}\text{M}$ ; casi aproximadamente  $10^{-13}\text{M}$ , y casi aproximadamente  $10^{-14}\text{M}$ . Por ejemplo, una proteína de unión como se describe en el presente documento puede tener una constante de disociación ( $K_D$ ) de aproximadamente  $1 \times 10^{-9}\text{M}$ , aproximadamente  $1 \times 10^{-10}\text{M}$ , aproximadamente  $3.14 \times 10^{-10}\text{M}$ , aproximadamente  $1 \times 10^{-11}\text{M}$ , aproximadamente  $2.37 \times 10^{-11}\text{M}$ , aproximadamente  $1 \times 10^{-12}\text{M}$ , aproximadamente  $1 \times 10^{-13}\text{M}$ , o aproximadamente  $3,3 \times 10^{-14}\text{M}$ .

Las proteínas de unión que se describen en el presente documento incluyen un anticuerpo aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo, puede unirse a NGF y disociarse de NGF con una constante de velocidad de la reacción inversa  $k_{\text{off}}$  de aproximadamente  $0,1\text{s}^{-1}$  o menos, como se determinó mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad de NGF con una  $\text{CI}_{50}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-6}\text{M}$  o menos. Como alternativa, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, puede disociarse de NGF con una constante de velocidad de la reacción inversa  $k_{\text{off}}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$  o menos, como se determinó mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad de NGF con una  $\text{CI}_{50}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-7}\text{M}$  o menos. Como alternativa, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, puede disociarse de NGF con una constante de velocidad de la reacción inversa  $k_{\text{off}}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$  o menos, como se determinó mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad de NGF con una  $\text{CI}_{50}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-8}\text{M}$  o menos. Como alternativa, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, puede disociarse de NGF con una constante de velocidad de la reacción inversa  $k_{\text{off}}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$  o menos, como se determinó mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad de NGF con una  $\text{CI}_{50}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-9}\text{M}$  o menos. Como alternativa, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, puede disociarse de NGF con una constante de velocidad de la reacción inversa  $k_{\text{off}}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$  o menos, como se determinó mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad de NGF con una  $\text{CI}_{50}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-10}\text{M}$  o menos. Como alternativa, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, puede disociarse de NGF con una constante de velocidad de la reacción inversa  $k_{\text{off}}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$  o menos, como se determinó mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad de NGF con una  $\text{CI}_{50}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-11}\text{M}$  o menos.

Una proteína de unión como se describe en el presente documento puede unirse a NGF de cánido, en el que el anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, puede disociarse de NGF de cánido con una constante de velocidad de la reacción inversa  $k_{\text{off}}$  de aproximadamente  $0,1\text{s}^{-1}$  o menos, como se determinó mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad de NGF de cánido con una  $\text{CI}_{50}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-6}\text{M}$  o menos. Como alternativa, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, puede disociarse de NGF de cánido con una constante de velocidad de la reacción inversa  $k_{\text{off}}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$  o menos, como se determinó mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad de NGF de cánido con una  $\text{CI}_{50}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-7}\text{M}$  o menos. Como alternativa, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, puede disociarse de NGF de cánido con una constante de velocidad de la reacción inversa  $k_{\text{off}}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$  o menos, como se determinó mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la de NGF de cánido con una  $\text{CI}_{50}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-8}\text{M}$  o menos. Como alternativa, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, puede disociarse de NGF de cánido con una constante de velocidad de la reacción inversa  $k_{\text{off}}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$  o menos, como se determinó mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad de NGF de cánido con una  $\text{CI}_{50}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-9}\text{M}$  o menos. Como alternativa, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, puede disociarse de NGF de cánido con una constante de velocidad de la reacción inversa  $k_{\text{off}}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$  o menos, como se determinó mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad de NGF de cánido con una  $\text{CI}_{50}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-10}\text{M}$  o menos. Como alternativa, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, puede disociarse de NGF de cánido con una constante de velocidad de la reacción inversa  $k_{\text{off}}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$  o menos, como se determinó mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad de NGF de cánido con una  $\text{CI}_{50}$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-11}\text{M}$  o menos.

Las proteínas de unión de la divulgación abarcan además las proteínas de unión acopladas a una molécula de inmunoadhesión, agente de formación de imágenes, agente terapéutico, o agente citotóxico. Los ejemplos no limitantes de agentes de formación de imágenes adecuados incluyen una enzima, marca fluorescente, marca luminiscente, marca bioluminiscente, marca magnética, biotina o una radiomarca que incluye, aunque no de forma limitativa,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{166}\text{Ho}$  y  $^{153}\text{Sm}$ . El agente terapéutico o citotóxico puede ser un antimetabolito, agente alquilante, antibiótico, factor de crecimiento, citoquina, agente antiangiogénico, agente antimitótico, antraciclina, toxina, o agente apoptótico. Se proporciona también en el presente documento una proteína de unión marcada en la que un anticuerpo o porción de anticuerpo de la divulgación se derivatiza o se une a

otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido o proteína). Por ejemplo, una proteína de unión marcada de la divulgación puede derivarse uniendo funcionalmente un anticuerpo o porción de anticuerpo de la proteína de unión divulgada (mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra forma) a una o más entidades moleculares diferentes, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar en la asociación del anticuerpo o porción de anticuerpo con otra molécula (tal como una región nuclear de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina).

Los agentes detectables útiles con los que se puede derivatizar un anticuerpo o porción de anticuerpo de la divulgación, pueden incluir compuestos fluorescentes. Los agentes detectables fluorescentes ilustrativos incluyen, por ejemplo, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-nafalensulfonilo, ficoeritrina. Un anticuerpo puede también derivatizarse con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa. Cuando un anticuerpo se derivatiza con una enzima detectable, se detecta añadiendo reactivos adicionales que la enzima utiliza para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando está presente el agente peroxidasa de rábano picante detectable, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Se puede derivatizar también un anticuerpo con biotina, y detectarse mediante la medición indirecta de la unión de avidina o estreptavidina.

Las proteínas de unión descritas en el presente documento pueden estar en forma cristalizada. Las proteínas de unión cristalizadas de acuerdo con la presente divulgación pueden producirse de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica, como se desvela, por ejemplo, en el documento WO 02072636. Preferentemente, la proteína de unión cristalizada retiene la actividad biológica tras la cristalización. Las proteínas de unión pueden, por tanto, proporcionarse como anticuerpos de anticuerpos completos dirigidos contra NGF o porciones o fragmentos de los mismos, como se desvela en el presente documento. Dichos cristales se pueden usar para preparar formulaciones y composiciones que incorporan proteínas de unión dirigidas contra NGF, incluyendo composiciones diagnósticas y terapéuticas. Una de las mencionadas proteínas de unión cristalizadas es una proteína de unión cristalizada de liberación controlada exenta de transportador. Una proteína de unión cristalizada ilustrativa demuestra una mayor semivida *in vivo* que la equivalente soluble de la proteína de unión.

Las proteínas de unión dirigidas contra NGF que se describen en el presente documento pueden estar glicosiladas. La glicosilación puede demostrar, por ejemplo, un modelo de glicosilación de bovino, camello, cánido, murino, equino, felino, o humano. Las proteínas de unión glicosiladas que se describen en el presente documento incluyen el anticuerpo o la porción de unión a antígeno acoplada a uno o más restos de hidratos de carbono. La producción de proteínas nascentes *in vivo* puede experimentar un procesamiento adicional, conocido como modificación posterior a la traducción. Se pueden añadir enzimáticamente restos azucarados (glicosilo), un proceso conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes que transportan las cadenas de oligosacáridos unidas covalentemente se conocen como proteínas glicosiladas o glicoproteínas. La glicosilación de las proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, así como de la célula hospedadora en la que la proteína se expresa. Diferentes organismos pueden producir diferentes enzimas de glicosilación (por ejemplo, glicosiltransferasas y glicosidasas) y que tienen diferentes sustratos (azúcares de nucleótidos) disponibles. Debido a dichos factores, el modelo de glicosilación de las proteínas, y la composición de los restos glicosilo, pueden diferir dependiendo del sistema hospedador en el que se expresa la proteína concreta. Los restos de glicosilo útiles en la divulgación pueden incluir, aunque no de forma limitativa, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, n-acetilglucosamina y ácido siálico. La proteína de unión glicosilada comprende restos glicosilo, de tal manera que el modelo de glicosilación es humano, de murino, cánido, felino, bovino o equino.

Los expertos en la materia saben que esa diferente glicosilación de las proteínas puede dar como resultado diferentes características de proteínas. Por ejemplo, la eficacia de una proteína terapéutica producida en un microorganismo hospedador, tal como levadura, y glicosilada utilizando la ruta endógena del hospedador puede reducirse en comparación con la de la misma proteína expresada en una célula de mamífero, tal como la línea de células CHO. Dichas glicoproteínas pueden también ser inmunógenas en seres humanos y muestran una semivida reducida *in vivo* tras la administración. Los receptores específicos en seres humanos y otros animales pueden reconocer restos glicosilo específicos y promover el aclaramiento rápido de la proteína procedente del torrente sanguíneo. Otros efectos adversos pueden incluir cambios en el plegamiento de la proteína, la solubilidad, susceptibilidad a las proteasas, tráfico, transporte, compartimentalización, secreción, reconocimiento por otras proteínas o factores, antigenicidad, o alergenicidad. En consecuencia, un médico puede preferir una proteína terapéutica con una composición y un modelo de glicosilación específicos, tal como una composición de glicosilación y un modelo idéntico, o al menos similar, al producido en células humanas o en células específicas de especies del animal sujeto previsto.

Puede conseguirse la expresión de proteínas glicosiladas diferentes de las de una célula hospedadora modificando la célula hospedadora para expresar enzimas de glicosilación heterólogas. Utilizando técnicas conocidas en la materia, un médico puede generar anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos que presentan glicosilación de proteínas humanas. Por ejemplo, se han modificado genéticamente cepas de levaduras para expresar enzimas de glicosilación que no se producen naturalmente de tal manera que las proteínas glicosiladas (glicoproteínas) producidas en estas cepas de levaduras presentan una glicosilación de las proteínas idéntica a la de

las células animales, especialmente células humanas (publicaciones de patente de Estados Unidos 20040018590 y 20020137134).

Además, los expertos en la materia apreciarán que una proteína de interés puede expresarse utilizando una biblioteca de células hospedadoras diseñada mediante ingeniería genética para expresar diversas enzimas de glicosilación de tal manera que los miembros de las células hospedadoras de la biblioteca producen la proteína de interés con modelos de glicosilación variantes. Un médico puede a continuación seleccionar y aislar la proteína de interés con modelos concretos de glicosilación novedosos. La proteína que tiene un modelo de glicosilación novedoso seleccionado particularmente presenta propiedades biológicas mejoradas o alteradas.

#### **Anticuerpos quiméricos dirigidos contra NGF**

Un anticuerpo quimérico es una molécula que la que diferentes porciones del anticuerpo se derivan de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de regiones constantes de un anticuerpo monoclonal de murino y de inmunoglobulina- de murino. Se conocen en la técnica los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos, véase, por ejemplo, Morrison, Science, 229: 1202 (1985); Oi y col., BioTechniques, 4: 214 (1986); Gillies y col., J. Immunol. Methods, 125: 191-202 (1989); las patentes de Estados Unidos n.º 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397. Además, las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 851-855 (1984); Neuberger y col., Nature, 312:604-608 (1984); Takeda y col., Nature, 314: 452-454 (1985)) se puede utilizar el corte y empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón de una especificidad de antígeno adecuada junto con los genes de una molécula de anticuerpo humano.

#### **Anticuerpos injertados a CDR dirigidos contra NGF**

Los anticuerpos injertados a CDR de la divulgación pueden comprender secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo no de murino en el que una o más de las regiones CDR de  $V_H$  y/o  $V_L$  están sustituidas con secuencias CDR de los anticuerpos de murino de la divulgación. Una secuencia marco de cualquier anticuerpo no de murino puede servir como el molde para el injerto de la CDR. Sin embargo, la sustitución de la cadena lineal sobre dicho marco conduce a menudo a algo de pérdida de la afinidad de unión al antígeno. El anticuerpo no de murino más homólogo es para el anticuerpo de murino original, es menos probable que la posibilidad de combinar las CDR de murino con el marco no de murino introduzca distorsiones en las CDR que podría reducir la afinidad.

Un marco variable no de murino que se selecciona para sustituir el marco variable de murino separado de las CDR puede tener al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90% de identidad de la secuencia con el marco de la región variable del anticuerpo de murino. El marco variable no de murino, separado de las CDR, que se selecciona para sustituir el marco variable de murino, separado de las CDR, puede ser un marco variable de bovino, camello, cánido, equino, felino o humano. Por ejemplo, el marco variable no de murino que se selecciona para sustituir el marco variable de murino, separado de las CDR, es un marco variable de cánidos y tiene al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 91 %, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de la secuencia con el marco de la región variable del anticuerpo de murino.

Se conocen en la técnica los procedimientos para producir anticuerpos injertados a CDR-(véanse documento EP 239,400; publicación PCT WO 91/09967; las patentes de Estados Unidos n.º 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), e incluyen recubrimiento o revestimiento (documento EP 592,106; Documento EP 519,596; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5): 489-498 (1991); Studnicka y col., Protein Engineering, 7(6):805-814 (1994); Roguska y col., PNAS, 91:969-973 (1994)), e intercambio de cadenas (patente de Estados Unidos n.º 5.565.352).

#### **Anticuerpos humanizados dirigidos contra NGF**

El procedimiento de modificar un anticuerpo monoclonal de un animal para volver este menos inmunógeno para la administración terapéutica a seres humanos (humanización) se ha buscado de manera intensiva y se ha descrito en numerosas publicaciones (Antibody Engineering: A practical Guide. Carl A.K. Borrebaeck ed. W.H. Freeman and Company, 1992; y las referencias citadas anteriormente). Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo procedentes de anticuerpos de especies no humanas que se unen al antígeno deseado que tiene una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de especies no humanas y regiones marco de una molécula de inmunoglobulina humana. Las secuencias de Ig humanas conocidas se desvelan en una variedad de sitios web que están disponibles en Internet (tal como el sitio web NCBI, Antibody Resource, y conocidos por los expertos en la materia así como en Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983). En la Tabla 1A siguiente, se muestran secuencias adicionales. Dichas secuencias importadas se pueden usar para reducir inmunogenicidad o reducir, aumentar o modificar la unión, afinidad, reacción directa, reacción inversa, avidéz, especificidad, vida media, o cualquier otra característica adecuada del anticuerpo, como se conoce en la materia.

Tabla 1A: CDR de mAb de ratón dirigidos contra NGF injertadas sobre marcos de Ig humana (Ab injertado a CDR dirigido contra NGF) Esta Tabla 1A es idéntica a la Tabla 15 en los Ejemplos)

ES 2 665 954 T3

Nombre	Secuencia (las CDR están subrayadas)
HU72 VH (CDR-GRAFT VH3-13/JH5)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMFVWRQATGKGLE WVSTISDGGSYTYTNDNVKGRFTISRENAKNSLYLQMNSLRAGDT AVYYCARDWSDSEGFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 165)
Hu73 VH (CDR-GRAFT VH1-18/JH6)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGL EWMGRIDPYGGGTKHNEKFKRRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTA VYYCARSGYDYFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 166)
HU77 VH (CDR-GRAFT VH1-69/JH6)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFNIKDTIYIYVWRQAPGQGLEW MGRIDPANGNTIYASKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARYGYAYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 167)
HU80 VH (CDR-GRAFT VH1-18/JH6)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNIKDTIYIYVWRQAPGQGLE WMGRIDPANGNTIYASKFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAV YYCARYGYAYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 168)
HU81 VH (CDR-GRAFT VH3-15/JH1)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNHMYWVRQAPGKGLE WVGSISDGGAYTFYPDTVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAV YYCTTEESANNGFAFWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 169)
HU82 VH (CDR-GRAFT VH2-26/JH6)	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLTGYNINWIRQPPGKALEWL AMIWGYGDDYNSALKSRLTISKDTSKQVVLMTNMDPVDATYY CARDHYGGNDWYFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 170)
HU72 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSIVQSNNGNTYLEWYLQKPGQSP QLLIYKVSNRFSQVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCFQGS IIVPFTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO: 171)
HU73 VL (CDR-GRAFT L22/JK2)	DIQMIQSPSFLSASVGDVRSIICRASENIYSFLAWYLQKPGKSPKLFYLN ANTLAEGVSSRFSGRSGTDFTLTHSLKPEDFAAYYCQHIIIFGTFPTFG QGTKLEIKR (SEQ ID NO: 172)
HU77 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCKSIKSLNNGDGFYLDWYLQKPGQSP QLLIYLVSNRFSQVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCFESNY LFTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO: 173)

(continuación)

Nombre	Secuencia (las CDR están subrayadas)
HU80 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)	DIVMTQTPLSLPVT <b>P</b> GP <b>E</b> PASIS <b>C</b> <u><b>K</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>T</b></u> <u><b>K</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>L</b></u> <u><b>L</b></u> <u><b>N</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>D</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>F</b></u> <u><b>T</b></u> <u><b>Y</b></u> <u><b>L</b></u> <u><b>D</b></u> <u><b>W</b></u> <u><b>Y</b></u> <u><b>L</b></u> <u><b>Q</b></u> <u><b>K</b></u> <u><b>P</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>Q</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>P</b></u> <b>Q</b> <u><b>L</b></u> <u><b>L</b></u> <u><b>I</b></u> <u><b>Y</b></u> <u><b>L</b></u> <u><b>V</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>N</b></u> <u><b>R</b></u> <u><b>F</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>V</b></u> <u><b>P</b></u> <u><b>D</b></u> <u><b>R</b></u> <u><b>F</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>T</b></u> <u><b>D</b></u> <u><b>F</b></u> <u><b>T</b></u> <u><b>L</b></u> <u><b>K</b></u> <u><b>I</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>R</b></u> <u><b>V</b></u> <u><b>E</b></u> <u><b>A</b></u> <u><b>E</b></u> <u><b>D</b></u> <u><b>V</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>V</b></u> <u><b>Y</b></u> <u><b>Y</b></u> <u><b>C</b></u> <u><b>F</b></u> <u><b>E</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>N</b></u> <u><b>Y</b></u> <u><b>L</b></u> <u><b>F</b></u> <u><b>T</b></u> <u><b>F</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>Q</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>T</b></u> <u><b>K</b></u> <u><b>L</b></u> <u><b>E</b></u> <u><b>I</b></u> <u><b>K</b></u> <u><b>R</b></u> (SEQ ID NO: 174)
HU81 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)	DIVMTQTPLSLPVT <b>P</b> GP <b>E</b> PASIS <b>C</b> <u><b>R</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>I</b></u> <u><b>L</b></u> <u><b>L</b></u> <u><b>H</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>N</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>N</b></u> <u><b>T</b></u> <u><b>Y</b></u> <u><b>L</b></u> <u><b>E</b></u> <u><b>W</b></u> <u><b>Y</b></u> <u><b>L</b></u> <u><b>Q</b></u> <u><b>K</b></u> <u><b>P</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>Q</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>P</b></u> <b>Q</b> <u><b>L</b></u> <u><b>L</b></u> <u><b>I</b></u> <u><b>Y</b></u> <u><b>R</b></u> <u><b>V</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>N</b></u> <u><b>R</b></u> <u><b>F</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>V</b></u> <u><b>P</b></u> <u><b>D</b></u> <u><b>R</b></u> <u><b>F</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>T</b></u> <u><b>D</b></u> <u><b>F</b></u> <u><b>T</b></u> <u><b>L</b></u> <u><b>K</b></u> <u><b>I</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>R</b></u> <u><b>V</b></u> <u><b>E</b></u> <u><b>A</b></u> <u><b>E</b></u> <u><b>D</b></u> <u><b>V</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>V</b></u> <u><b>Y</b></u> <u><b>Y</b></u> <u><b>C</b></u> <u><b>F</b></u> <u><b>O</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>A</b></u> <u><b>H</b></u> <u><b>V</b></u> <u><b>P</b></u> <u><b>F</b></u> <u><b>T</b></u> <u><b>F</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>Q</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>T</b></u> <u><b>K</b></u> <u><b>L</b></u> <u><b>E</b></u> <u><b>I</b></u> <u><b>K</b></u> <u><b>R</b></u> (SEQ ID NO: 175)
HU82 VL (CDR-GRAFT 08/JK2)	<u><b>D</b></u> <u><b>I</b></u> <u><b>Q</b></u> <u><b>M</b></u> <u><b>T</b></u> <u><b>Q</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>P</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>L</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>A</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>V</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>D</b></u> <u><b>R</b></u> <u><b>V</b></u> <u><b>T</b></u> <u><b>I</b></u> <u><b>T</b></u> <u><b>C</b></u> <u><b>R</b></u> <u><b>A</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>Q</b></u> <u><b>D</b></u> <u><b>I</b></u> <u><b>T</b></u> <u><b>N</b></u> <u><b>Y</b></u> <u><b>L</b></u> <u><b>N</b></u> <u><b>W</b></u> <u><b>Y</b></u> <u><b>Q</b></u> <u><b>Q</b></u> <u><b>K</b></u> <u><b>P</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>K</b></u> <u><b>A</b></u> <u><b>P</b></u> <u><b>K</b></u> <u><b>L</b></u> <u><b>L</b></u> <u><b>Y</b></u> <u><b>Y</b></u> <u><b>T</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>R</b></u> <u><b>L</b></u> <u><b>H</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>V</b></u> <u><b>P</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>R</b></u> <u><b>F</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>T</b></u> <u><b>D</b></u> <u><b>F</b></u> <u><b>T</b></u> <u><b>F</b></u> <u><b>T</b></u> <u><b>I</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>S</b></u> <u><b>L</b></u> <u><b>Q</b></u> <u><b>P</b></u> <u><b>E</b></u> <u><b>D</b></u> <u><b>I</b></u> <u><b>A</b></u> <u><b>T</b></u> <u><b>Y</b></u> <u><b>Y</b></u> <u><b>C</b></u> <u><b>Q</b></u> <u><b>Q</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>K</b></u> <u><b>T</b></u> <u><b>L</b></u> <u><b>P</b></u> <u><b>R</b></u> <u><b>T</b></u> <u><b>F</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>Q</b></u> <u><b>G</b></u> <u><b>T</b></u> <u><b>K</b></u> <u><b>L</b></u> <u><b>E</b></u> <u><b>I</b></u> <u><b>K</b></u> <u><b>R</b></u> (SEQ ID NO: 176)

Los restos marco en las regiones marco humanas pueden estar sustituidos con el correspondiente resto procedente del anticuerpo donante de la CDR para alterar o mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones se identifican mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, modelando las interacciones de la CDR y los restos marco para identificar los restos marco importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencias para identificar restos marco inusuales en posiciones concretas. (Véase, por ejemplo, Queen y col., patente de Estados Unidos n.º 5.585.089; Riechmann y col., Nature 332:323 (1988). Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles de manera común y son familiares para los expertos en la materia. Hay disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, los restos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias consenso e importadas de tal forma que se logra la característica deseada del anticuerpo, de tal manera que se consigue una afinidad aumentada por el antígeno (o los antígenos) diana. En general, los restos de la CDR están directa y muy sustancialmente implicados en influenciar la unión al antígeno. Los anticuerpos pueden humanizarse usando una variedad de técnicas conocidas en la materia, tales como, aunque no de forma limitativa, las descritas en Jones y col., Nature 321:522 (1986); Verhoeven y col., Science 239:1534 (1988), Sims y col., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta y col., J. Immunol. 151:2623 (1993), Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka y col., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. y col., PNAS 91:969-973 (1994); publicación PCT WO 91/09967, PCT: documentos US98/16280, documentos US96/18978, documentos US91/09630, documentos US91/05939, documentos US94/01234, documentos GB89/01334, documentos GB91/01134, GB92/01755; documentos WO90/14443, documentos WO90/14424, documentos WO90/14430, EP 229.246, Documento EP 592.106; EP 519.596, EP 239.400, las patentes de Estados Unidos 5.565.332, 5.723.323, 5.976.862, 5.824.514, 5.817.483, 5.814.476, 5.763.192, 5.723.323, 5.766.886, 5.714.352, 6.204.023, 6.180.370, 5.693.762, 5.530.101, 5.585.089, 5.225.539; y 4.816.567.

#### Anticuerpos caninizados dirigidos contra NGF

El procedimiento de modificar un anticuerpo monoclonal de un animal para volver este menos inmunógeno para la administración terapéutica a cánidos (caninización) se ha descrito en US 7.261.890 B2 2007). La secuencia de aminoácidos de la IgG1 de cánido se proporciona en el GenBank (AF354264). Determinación de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la IgM de cánido y la cadena pesada de la IgA de cánido (Wasserman y col., Biochem., 16, 3160 (1977), determinación de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera k de la IgA de cánido Wasserman y col., Immunochem., 15, 303 (1978)), se divulgó la secuencia de aminoácidos completa de la cadena  $\mu$  de cánido (McCumber y col., Mol. Immunol., 16, 565 (1979)), se divulgaron el único ADNc de la cadena IgG-A $\gamma$  y cuatro secuencias de proteínas de la cadena IgG-A $\gamma$  de cánido (Tang y col., Vet. Immunology Immunopathology, 80, 259 (2001)). Describe la amplificación de la PCR de una biblioteca de ADNc de bazo de cánido con un cebador de oligonucleótidos degenerado diseñado a partir de las regiones conservadas de las IgG humana, de ratón, de cerdo, y de bovino. Los dominios variables de la inmunoglobulina de cánido, los anticuerpos caninizados y los procedimientos para prepararlos y usarlos se desvelan en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2004/0181039 y las patentes de Estados Unidos números 7.261.890; 6.504.013; 5.852.183; 5.5225.539.

## ES 2 665 954 T3

La Tabla 2 siguiente es una lista de las secuencias de aminoácidos de las regiones de VH y VL de anticuerpos caninizados seleccionados dirigidos contra NGF de la divulgación.

Tabla 2

<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Regiones</b>
25	72.1 VH
26	72.1 VL
27	73.1 VH
28	73.1 VL
29	77.1 VH
30	77.1 VL
31	81.1 VH
32	81.1 VL
33	82.1 VH
34	82.1 VL
35	72.2 VH
36	72.2 VL
37	73.2 VH
38	73.2 VL
39	77.2 VH
40	77.2 VL
41	81.2 VH
42	81.2 VL
43	82.2 VH
44	82.2 VL
177	81.1B VH
179	72.3 VH
180	72.4 VH
181	72.4 VL
182	73.4 VH
183	73.4 VL
184	77.3 VH
185	77.4 VH
186	77.4 VL
187	81.4 VH

(continuación)

SEQ ID NO:	Regiones
188	81.4 VL
189	81.2B VH
190	81.4B VH
191	82.3 VL
192	82.4 VH
193	82.4 VL
206	81.5 VH
207	81.6B VH

### C. Usos de anticuerpos anti-NGF

Las proteínas de unión, como se describe en el presente documento se pueden usar en un procedimiento para detectar la presencia de NGF en una muestra *in vivo* o *in vitro* (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como suero, plasma, tejido, biopsia). El procedimiento *in vitro* puede utilizarse por ejemplo para diagnosticar una enfermedad o trastorno, por ejemplo, un trastorno asociado a NGF. El procedimiento incluye (i) poner en contacto la muestra o una muestra del control con el anticuerpo anti-NGF o un fragmento del mismo, como se describe en el presente documento; y (ii) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo, y la muestra o la muestra del control, en el que un cambio estadísticamente significativo en la formación del complejo en la muestra con respecto a la muestra del control es indicativo de la presencia del NGF en la muestra.

las proteínas de unión, como se describe en el presente documento se pueden usar en un procedimiento para detectar la presencia de NGF *in vivo* (por ejemplo, en la formación de imágenes *in vivo* en un sujeto). El procedimiento puede usarse para diagnosticar un trastorno, por ejemplo, un trastorno asociado a NGF. El procedimiento incluye: (i) administrar el anticuerpo anti-NGF o un fragmento del mismo, como se describe en el presente documento, a un sujeto o a un sujeto del control en condiciones que permitan unir el anticuerpo o el fragmento a NGF; y (ii) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo o el fragmento y NGF, en el que un cambio estadísticamente significativo en la formación del complejo en el sujeto con respecto al sujeto del control es indicativo de la presencia de NGF.

Dada la capacidad de unirse a NGF, los anticuerpos anti-NGF, o porciones de los mismos, o combinaciones de los mismos, como se describe en el presente documento, se pueden usar como inmunorreactivo(s) para detectar NGF (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como suero o plasma), en un inmunoensayo convencional, tal como en un enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o en una inmunohistoquímica del tejido. Un procedimiento para detectar NGF en una muestra biológica implica poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la divulgación y detectar tanto el anticuerpo (o porción de anticuerpo) unido a NGF como el anticuerpo sin unir (o la porción de anticuerpo), para detectar por tanto NGF en la muestra biológica. La proteína de unión puede marcarse de forma directa o indirecta con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o sin unir. Las sustancias detectables adecuadas incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radioactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y los ejemplos de materiales radioactivos adecuados incluyen  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ , o  $^{153}\text{Sm}$ .

NGF puede ensayarse alternativamente en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo de competición utilizando patrones de NGF recombinantes marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo sin marcar dirigido contra NGF. En este ensayo, la muestra biológica, los patrones de NGF recombinantes marcados y el anticuerpo anti-NGF se combinaron y se determinó el patrón de rNGF marcado unido al anticuerpo sin marcar. La cantidad de NGF en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de rNGF marcado unido al anticuerpo anti-NGF. De manera análoga, NGF puede ensayarse también en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo de competición utilizando patrones de rNGF marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo sin marcar dirigido contra NGF.

La divulgación contempla también por tanto reactivos, dispositivos y kits de inmunoensayo que incluyen una o más de las proteínas de unión desveladas actualmente para detectar la presencia o la cantidad de NGF en una muestra.

- Se contempla por ejemplo que se puede proporcionar un inmunorreactivo que comprende uno o más de las proteínas de unión desveladas actualmente en la forma de un kit con uno o más recipientes tales como viales o frascos, conteniendo cada recipiente un reactivo separado tal como una proteína de unión dirigida contra NGF, o un cóctel de proteínas de unión dirigidas contra NGF, reactivos de detección y reactivos de lavado empleados en el ensayo. El(los) inmunorreactivo(s) puede(n) proporcionarse de forma ventajosa en un dispositivo en el que el(los) inmunorreactivo(s) está(n) inmovilizado(s) sobre un soporte sólido, tal como, aunque no de forma limitativa, una cubeta, tubo, placas o pocillos de microvaloración, tiras, chips o perlas. El kit puede comprender al menos un recipiente para llevar a cabo el ensayo, y/o un tampón, tal como un tampón de ensayo o un tampón de lavado, cualquiera de los cuales se puede proporcionar como una solución concentrada, una solución sustrato para la marca detectable (por ejemplo, una marca enzimática), o una solución de detención. Preferentemente, el kit comprende todos los componentes, es decir, reactivos, patrones, tampones, diluyentes, etc., que son necesarios para llevar a cabo el ensayo. El kit puede contener instrucciones para determinar la presencia o cantidad de NGF en la muestra basándose en la unión específica del inmunorreactivo a NGF, en forma de papel o en forma legible por un ordenador, tal como un disco, CD, DVD, o similar, y/o puede estar disponible en línea.
- 15 Las proteínas de unión en el kit pueden marcarse con una marca detectable tal como las descritas anteriormente incluyendo un fluoróforo, un resto radioactivo, una enzima, una marca de biotina/avidina, un cromóforo, una marca quimioluminiscente, o similares; o el kit puede incluir reactivos para llevar a cabo el marcado detectable. Los anticuerpos, calibradores y/o controles se pueden proporcionar en recipientes separados o dispensarse previamente en un formato de ensayo adecuado, por ejemplo, en placas de microvaloración.
- 20 Opcionalmente, el kit incluye componentes de control de calidad (por ejemplo, paneles de sensibilidad, calibradores, y controles positivos). La preparación de los reactivos de control de calidad es bien conocida en la técnica y se describe en hojas adicionales para una variedad de productos de inmunodiagnóstico. Los miembros del panel de sensibilidad se usan opcionalmente para establecer las características del ensayo de comportamiento y opcionalmente además son indicadores útiles de la integridad de reactivos del kit de inmunoensayo, y de la estandarización de los ensayos.
- 25 El kit puede incluir también opcionalmente otros reactivos requeridos para llevar a cabo un ensayo diagnóstico o facilitar las evaluaciones del control de calidad, tales como tampones, sales, enzimas, cofactores de enzimas, sustratos de enzimas, reactivos de detección. Otros componentes, tales como tampones y soluciones para el aislamiento y/o el tratamiento de una muestra de ensayo (por ejemplo, reactivos de pretratamiento), se pueden incluir también en el kit. El kit puede incluir adicionalmente uno o más controles diferentes. Se puede(n) liofilizar uno o más de los componentes del kit, en cuyo caso, el kit puede comprender además reactivos adecuados para la reconstitución de los componentes liofilizados.
- 30 Los diversos componentes del kit se proporcionan opcionalmente en recipientes adecuados según sea necesario, por ejemplo, una placa de microvaloración. El kit puede incluir además recipientes para mantener o almacenar una muestra (por ejemplo, un recipiente o cartucho para una muestra de orina). Cuando sea adecuado, el kit puede contener también opcionalmente recipientes de reacción, recipientes de mezcla, y otros componentes que facilitan la preparación de reactivos o la muestra de ensayo. El kit puede incluir también uno o más instrumentos para ayudar a obtener una muestra de ensayo, tal como una jeringuilla, pipeta, pinzas, una cucharilla medidora, o similares. Instrucciones:
- 35 Se apreciará que los anticuerpos y las porciones de anticuerpos de la divulgación son capaces de neutralizar sustancialmente la actividad de NGF *in vitro* e *in vivo*. En consecuencia, dichos anticuerpos y porciones de anticuerpos de la divulgación se pueden usar también para inhibir sustancialmente la actividad de NGF, *por ejemplo*, en un medio de cultivo que contiene NGF, en sujetos mamíferos que tienen NGF con los que un anticuerpo de la divulgación reacciona en cruzado. La divulgación proporciona por tanto un procedimiento para inhibir la actividad de NGF que comprende poner en contacto NGF con un anticuerpo o porción de anticuerpo de la divulgación de tal manera que la actividad de NGF se inhibe sustancialmente. Por ejemplo, en un cultivo celular que contiene, o se sospecha que contiene NGF, se puede añadir un anticuerpo o porción de anticuerpo de la divulgación al medio de cultivo para inhibir la actividad de NGF en el cultivo.
- 40 Por consiguiente, la divulgación proporciona también un procedimiento para inhibir la actividad de NGF que comprende poner en contacto NGF con una proteína de unión de tal manera que se inhibe sustancialmente la actividad de NGF. En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para inhibir la actividad de NGF en un sujeto que padece un trastorno en el que la actividad de NGF es perjudicial, que comprende administrar al sujeto una proteína de unión divulgada anteriormente de tal manera que la actividad de NGF en el sujeto se inhibe sustancialmente y se consigue el tratamiento.
- 45 La divulgación proporciona también un procedimiento para reducir la actividad de NGF en un sujeto, tal como un sujeto que padece una enfermedad o trastorno en la que la actividad de NGF es perjudicial. La divulgación proporciona procedimientos para reducir la actividad de NGF en un sujeto que padece dicha enfermedad o trastorno, cuyo procedimiento comprende administrar al sujeto un anticuerpo o porción de anticuerpo de la divulgación de tal manera que se reduce la actividad de NGF en el sujeto. El sujeto puede ser un mamífero que expresa un NGF al cual un anticuerpo de la divulgación es capaz de unirse. Más adicionalmente, el sujeto puede ser un mamífero en el
- 50
- 55
- 60

que se ha introducido NGF (por ejemplo, mediante la administración de NGF o mediante la expresión de un transgén de NGF). Se puede administrar un anticuerpo de la divulgación a un sujeto que lo necesita para fines terapéuticos.

Se puede administrar un anticuerpo de la divulgación para fines veterinarios a un mamífero no humano que expresa un NGF con el cual el anticuerpo es capaz de unirse. Por ejemplo, se puede administrar un anticuerpo de la divulgación para fines veterinarios a un mamífero no humano tal como un perro, caballo, gato, o ganado (ganado vacuno y lechero, cerdos, ovejas, cabras, aves de corral, etc.) que expresan un NGF con el cual el anticuerpo es capaz de unirse.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar (por ejemplo, curando, suprimiendo, mejorando, retrasando o previniendo o disminuyendo el riesgo del inicio, reincidencia o recidiva de) o prevención de un trastorno asociado a NGF, en un sujeto. El procedimiento incluye: administrar al sujeto una proteína de unión a NGF divulgada (particularmente un antagonista), por ejemplo, un anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo como se describe en el presente documento, en una cantidad suficiente para tratar o prevenir el trastorno asociado a NGF. el antagonista de NGF, por ejemplo, el anticuerpo anti-NGF o fragmento del mismo, puede administrarse al sujeto, solo o en combinación con otras modalidades terapéuticas, como se describe en el presente documento.

Un anticuerpo de la divulgación puede administrarse a un mamífero no humano que expresa un NGF con el cual el anticuerpo es capaz de unirse como un modelo animal de enfermedad humana. Dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la divulgación (*por ejemplo*, ensayando las dosificaciones y cursos de tiempo de la administración).

En otro aspecto, los anticuerpos y proteínas de unión de la divulgación son útiles para tratar las enfermedades y trastornos relacionados con NGF que incluyen o implican dolor agudo o crónico. Los ejemplos no limitantes de enfermedades y trastornos relacionados incluyen la inflamación general, dolor por cirugía y posterior a cirugía incluyendo el dolor procedente de amputación, dolor dental, dolor procedente de trauma, dolor por fractura, dolor procedente de absceso, dolor neuropático, hiperalgesia y alodinia, dolor neuropático, neuralgia postherpética, diabetes que incluye, aunque no de forma limitativa, dolor por neuropatía diabética, ictus, síndrome de dolor talámico, dolor de articulaciones por gota, dolor artrosis o artritis reumatoide, enfermedades reumáticas, lupus, psoriasis, ciática, dolor asociado con enfermedades musculoesqueléticas que incluyen, aunque no de forma limitativa, dolor crónico en la parte inferior de la espalda, fibromialgia, esguinces, dolores asociados con crisis de las células falciformes, cefalea general, migraña, migraña en racimo, cefalea tensional, neuralgia del trigémino, dismenorrea, endometriosis, quistes en ovarios, dolor visceral, prostatitis, cistitis, cistitis intersticial, eritromelalgia o dolor producido por pancreatitis o piedras en los riñones, trastornos gastrointestinales generales incluyendo, aunque no de forma limitativa, colitis, ulceración gástrica y úlceras duodenales, reflujo gastroesofágico, dispepsia, trastornos inflamatorios del intestino, síndrome del intestino irritable, trastornos inflamatorios de la vejiga, dolor por incisión, dolor procedente de quemaduras y/o heridas, espondilitis anquilosante, patologías periarticulares, dolor de cáncer incluyendo, aunque no de forma limitativa, dolor procedente de metástasis óseas y dolor procedente de tratamiento contra el cáncer, y dolor debido a VIH o SIDA. Otros ejemplos de enfermedades y dolencias relacionadas con NGF incluyen melanoma maligno, síndrome de Sjogren, rinitis, trastornos bronquiales, y asma, tales como asma sin control con hipersensibilidad grave de las vías aéreas, tos intratable; y dolor procedente de enfermedades o trastornos de la piel con un componente inflamatorio tal como, aunque no de forma limitativa, quemaduras solares, reacciones alérgicas de la piel, dermatitis, pruritis, y vitiligo.

La divulgación proporciona también un procedimiento para tratar un sujeto que padece de un trastorno en el que NGF es perjudicial que comprende administrar una proteína de unión antes, de forma simultánea, o después de la administración de un segundo agente. En otro aspecto, el agente terapéutico adicional que se puede administrar y/o formular simultáneamente con uno o más antagonistas de NGF, (por ejemplo, anticuerpos anti-NGF o fragmentos de los mismos,) incluye, aunque no de forma limitativa, antagonistas de TNF; un fragmento soluble de un receptor de TNF; ENBREL®; antagonistas de la enzima TNF; inhibidores de la enzima convertidora de TNF (TACE); antagonistas de los receptores muscarínicos; antagonistas de TGF-beta; interferón gamma; perfenidona; agentes quimioterapéuticos, metotrexato; leflunomida; sirolimus (rapamicina) o un análogo del mismo, CCI-779; inhibidores de COX2 o cPLA2; AINE; inmunomoduladores; inhibidores de p38; TPL-2, inhibidores de MK-2 y NFkB; budenosida; factor de crecimiento epidérmico; corticoesteroides; ciclosporina; sulfasalazina; aminosalicilatos; 6-mercaptopurina; azatioprina; metronidazol; inhibidores de la lipooxigenasa; mesalamina; olsalazina; balsalazida; antioxidantes; inhibidores del tromboxano; anticuerpos dirigidos contra IL-6; factores de crecimiento; inhibidores de la elastasa; compuestos de piridinilo-imidazol; anticuerpos o agonistas de TNF, CGRP, sustancia P, bradiquinina, MMP-2, MMP-9, MMP-13, LT, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, EMAP-II, GM-CSF, FGF, o PDGF; anticuerpos de CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos; FK506; rapamicina; mofetilo micofenolato; ibuprofeno; prednisolona; inhibidores de la fosfodiesterasa; agonistas de la adenosina; agentes antitrombóticos; inhibidores del complemento; agentes adrenérgicos; IRAK, NIK, IKK, p38, o inhibidores de la quinasa MAP; inhibidores de la enzima convertidora de IL-1  $\beta$ ; inhibidores de la enzima convertidora de TNF $\alpha$ ; inhibidores de la señalización de los linfocitos T; inhibidores de la metaloproteinasas; 6-mercaptopurinas; inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina; receptores de citoquinas solubles; receptor de p55 TNF soluble; receptor de p75 TNF soluble; sIL-1RI; sIL-1RII; sIL-6R; citoquinas antiinflamatorias; IL-4; IL-10; IL-11; y TGF $\beta$ .

**D. Composiciones farmacéuticas**

Los anticuerpos y las porciones de anticuerpos de la divulgación se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto. Normalmente, la composición farmacéutica comprende al menos un anticuerpo o porción de anticuerpo de la divulgación y un transportador farmacéuticamente aceptable.

5 Dichas composiciones se pueden usar, por ejemplo, en un procedimiento para tratar un mamífero de una enfermedad o trastorno que implica niveles aumentados de NGF administrando al mamífero una cantidad eficaz de la composición. Una composición farmacéutica puede incluir una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o porción de anticuerpo. Las composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento pueden utilizarse para diagnosticar, detectar, o vigilar un trastorno o uno o más síntomas del mismo; prevenir, tratar, 10 gestionar, o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo; y/o una investigación. Como se usa en el presente documento, la frase "niveles aumentados de NGF" se refiere a un nivel de NGF en un sujeto, tal como un mamífero, que es mayor o superior a un nivel inicial de NGF establecido o predeterminado, tal como, por ejemplo, un nivel previamente establecido para dicho sujeto o promediado entre un grupo de sujetos.

Una composición farmacéutica puede comprender, por ejemplo, una proteína de unión y un transportador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden comprender una 15 cantidad terapéuticamente eficaz de una o más de las proteínas de unión, como se desvela en el presente documento, junto con un diluyente, vehículo, solubilizante, emulsionante conservante y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede contener uno o más materiales de formulación diversos para modificar, mantener o preservar la composición o las propiedades de la composición, por ejemplo, el 20 color, la consistencia, la isotonicidad, el olor, la osmolaridad, el pH, la esterilidad, la estabilidad, la viscosidad y otras propiedades de la composición. Dichos materiales de formulación son generalmente bien conocidos y se describen muchos materiales de formulación adecuados, por ejemplo, en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª Ed. (A. R. Gennaro, ed.) 1990, Mack Publishing Company. Los ejemplos no limitantes de materiales de formulación adecuados incluyen aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); 25 antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrogenosulfito de sodio); tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos); agentes de volumen (tal como manitol o glicina); agentes quelantes (tales como ácido etilendiamina tetraacético (EDTA)); agentes complejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monosacáridos; disacáridos; y otros hidratos de carbono (tales como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas); colorantes, aromatizantes y agentes diluyentes; agentes emulsionantes; 30 polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sales (tales como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes azucarados (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (tales como pluronics, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbatos tales como polisorbato 20, polisorbato 80, triton, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); 35 agentes potenciadores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos, preferentemente cloruro de sodio o potasio, manitol sorbitol); vehículos de administración; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. Además, la composición farmacéutica puede contener también uno o más conservantes. Los ejemplos de conservantes adecuados que se pueden usar incluyen, aunque no de forma limitativa, metilparabeno, propilparabeno, alcohol bencílico, clorobutanol y cloruro de benzalconio. Un experto en la materia puede determinar fácilmente las formulaciones farmacéuticas óptimas dependiendo de, por ejemplo, la ruta prevista de administración, el formato de administración y la dosificación deseada.

45 La composición farmacéutica puede comprender al menos un agente terapéutico adicional para tratar un trastorno en el que la actividad de NGF es perjudicial. El agente adicional puede ser, por ejemplo, un agente terapéutico, un agente de formación de imágenes, un agente citotóxico, inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de quinasa, bloqueantes de la molécula de coestimulación, bloqueantes de la molécula de adhesión, anticuerpos dirigidos contra citoquinas o un fragmento funcional de los mismos, metotrexato, ciclosporina, rapamicina, FK506, una marca o 50 indicador detectable, un antagonista de TNF, una antirreumático, relajante muscular, narcótico, antiinflamatorio no esteroideo (AINE), analgésico, anestésico, sedante, anestésico local, bloqueante neuromuscular, antimicrobiano, antipsoriásico, corticoesteroide, esteroide anabólico, eritropoyetina, inmunoglobulina, un inmunosupresor, hormona del crecimiento, fármaco de sustitución de hormonas, radiofármaco, antidepresivo, antipsicótico, estimulante, medicación contra el asma, un agonista beta, esteroide inhalado, esteroide oral, epinefrina o análogo, citoquina o un 55 antagonista de citoquina.

La composición farmacéutica de la presente divulgación puede tener un pH mayor de aproximadamente 7,0 o entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 8,0. Como alternativa, la composición farmacéutica puede tener un pH de entre aproximadamente 7,2 a aproximadamente 7,8. Aún más alternativamente, el pH de la composición farmacéutica puede estar entre aproximadamente 7,4 y aproximadamente 7,6. Aún más alternativamente, el pH de 60 la composición farmacéutica puede ser aproximadamente 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 u 8,0. Con respecto a las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación, existe un aumento en la degradación, un aumento en la fragmentación o un aumento en la degradación y un aumento en la fragmentación a un pH de 6,0 o menos. Este hallazgo fue sorprendente ya que muchas composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos

humanizados presentan un aumento en la degradación, un aumento en la fragmentación o un aumento en la degradación y un aumento en la fragmentación a un pH menor de 5,0 y de nuevo a un pH mayor de aproximadamente 6,0. En consecuencia, La mayoría de las composiciones farmacéuticas que contienen anticuerpos humanizados son estables a un pH entre aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0.

- 5 Una composición para la liberación de una proteína de unión puede comprender, por ejemplo, una formulación que incluye una cantidad de una proteína de unión cristalizada, una construcción de anticuerpo cristalizada o un conjugado de anticuerpo cristalizado, como se desvela anteriormente. La composición puede comprender además un ingrediente adicional, tal como un transportador, excipiente o diluyente, y al menos un transportador polimérico. El transportador polimérico puede comprender uno o más polímeros seleccionados entre lo siguiente: poli (ácido acrílico), poli (ciano acrilatos), poli (aminoácidos), poli (anhídridos), poli (depsipéptido), poli (ésteres), poli (ácido láctico), poli (ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli (b-hidroxibutirato), poli (caprolactona), poli (dioxanona); poli (etilenglicol), poli ((hidroxipropil) metacrilamida, poli [(organo)fosfaceno], poli (ortoésteres), poli (alcohol vinílico), poli (vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maleico alquil vinil éter, polioles plurónicos, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicosaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, mezclas y copolímeros de los mismos. El ingrediente adicional puede ser, por ejemplo, albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, metoxipolietilenglicol y polietilenglicol.

El transportador polimérico puede ser capaz de afectar la liberación de la proteína de unión de la composición, como se describe además en el presente documento a continuación. Se pueden usar materiales poliméricos en la formulación de las composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas de unión desveladas para conseguir la liberación controlada o sostenida de las proteínas de unión desveladas (Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Rangery col., J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem., 23:61 (1983); Levy y col., Science, 228: 190 (1985); During y col., Ann. Neurol., 25: 351 (1989); Howard y col., J. Neurosurg., 7 1:105 (1989); las patentes de Estados Unidos n.º 5.679.377; 5, 916.597; 5.912.015; 5.989.463; 5.128.326; Las publicaciones PCT números WO 99/15154; y WO 99/20253). Los ejemplos de polímeros utilizados en las formulaciones de liberación sostenida incluyen, aunque no de forma limitativa, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(acetato de etileno-co-vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida, poli(etilenglicol), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido-co-glicólidos) (PLGA), y poliortoésteres. El polímero utilizado en una formulación de liberación sostenida puede ser inerte, exento de impurezas lixiviables, estable en almacenamiento, estéril, y biodegradable. Un sistema de liberación controlada o sostenida puede colocarse en la proximidad de la diana profiláctica o terapéutica, requiriendo de esta manera solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, citada anteriormente, vol. 2, págs. 115-138 (1984)).

Los sistemas de liberación controlada se describen en la revisión de Langer (Science, 249:1527-1533 (1990)). Se puede usar cualquier técnica conocida por un experto en la materia para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la divulgación (patente de Estados Unidos n.º 4.526.938; las publicaciones PCT números WO 91/05548 y WO 96/20698; Ning y col., Radiotherapy & Oncology, 39: 179-189 (1996), Song y col., PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology, 50: 372-397 (1995); Cleek y col., Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 24: 853-854 (1997); y Lam y col., Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater., 24: 759-760 (1997)).

Las proteínas de unión de la presente divulgación se pueden administrar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la materia. Por ejemplo, las proteínas de unión de la presente divulgación pueden administrarse mediante inyección subcutánea, inyección o infusión intravenosa. La administración puede ser sistémica o local. Como apreciará el técnico experto, la ruta y/o modo de administración puede variar dependiendo de los resultados deseados. Se puede preparar el compuesto activo con un transportador que protegerá el compuesto frente a una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poli(ácido). Los expertos en la materia conocen muchos procedimientos para la preparación de dichas formulaciones. Véanse, *por ejemplo*, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Por ejemplo, se pueden administrar dichas composiciones farmacéuticas a un sujeto mediante la ruta parenteral, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intrarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelíaca, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocardial, intraósea, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, o transdérmica. Los procedimientos de administrar un agente profiláctico o terapéutico de la divulgación incluyen también, aunque no de forma limitativa, administración epidural, administración intratumoral, y administración mucosal (por ejemplo, rutas intranasal y oral). Además, se puede emplear la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente aerosolizante (patentes de Estados Unidos números 6.019.968; 5.985, 320; 5.985.309; 5.934, 272; 5.874.064; 5.855.913; 5.290, 540; y 4.880.078; y las publicaciones PCT números WO

92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903). Los anticuerpos y porciones de anticuerpos descritos en el presente documento se pueden administrar por ejemplo utilizando la tecnología de administración pulmonar del fármaco Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.). Los agentes profilácticos o terapéuticos pueden administrarse mediante cualquier ruta conveniente, y pueden administrarse juntos con otros agentes biológicamente activos.

Son conocidos varios sistemas de administración y se pueden usar una o más proteínas de unión desveladas o la combinación de una o más proteínas de unión desveladas y un agente profiláctico o agente terapéutico útil para prevenir, gestionar, tratar o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo, endocitosis mediada por receptores (véase, por ejemplo, Wu y col., J. Biol. Chem., 262: 4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral o un vector diferente, etc. Puede ser deseable administrar las proteínas de unión desveladas de forma local a la zona que necesita tratamiento, que puede conseguirse, a modo de ejemplo pero no como limitación, mediante infusión local, mediante inyección, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso o no poroso, incluyendo membranas y matrices, como membranas sialísticas, polímeros, matrices fibrosas (por ejemplo, Tissuel®), o matrices de colágeno. Se puede administrar localmente una cantidad eficaz de una o más proteínas de unión desveladas a la zona afectada de un sujeto para prevenir, tratar, gestionar, y/o mejorar un trastorno o un síntoma del mismo. Como alternativa, una cantidad eficaz de una o más de las proteínas de unión desveladas se administra localmente a la zona afectada en combinación con una cantidad eficaz de uno o más tratamientos (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) diferentes de las proteínas de unión desveladas a un sujeto para prevenir, tratar, gestionar, y/o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo.

Las proteínas de unión desveladas se pueden administrar en un sistema de liberación controlada o sostenida tal como, por ejemplo, un dispositivo de bomba de infusión operativo para conseguir la liberación controlada o sostenida de las proteínas de unión desveladas (véanse Langer, anteriormente; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20 (1987); Buchwald y col., Surgery, 88: 507 (1980); Saudek y col., N. Engl. J. Med., 321: 574 (1989)).

Cuando una composición, como se describe en el presente documento comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de unión que se describe en el presente documento como un agente profiláctico o terapéutico, el ácido nucleico se puede administrar *in vivo* para promover la expresión de su agente profiláctico o terapéutico codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico adecuado y administrándolo para que se convierta en intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase patente de Estados Unidos n.º 4.980.286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o revestimiento con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes de transfección, o mediante la administración en un enlace con un péptido tipo homeobox que se sabe que penetra en el núcleo (Joliot y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 88: 1864-1868 (1991)). Como alternativa, un ácido nucleico se puede introducir intracelularmente e incorporarse al ADN de la célula hospedadora para su expresión mediante recombinación homóloga.

Una composición farmacéutica de la divulgación se formula para que sea compatible con su ruta de administración prevista. Entre los ejemplos de rutas de administración incluyen, aunque no de forma limitativa, administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal (por ejemplo, inhalación), transdérmica (por ejemplo, tópica), transmucosal y rectal. Por ejemplo, la composición puede formularse de acuerdo con los procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, intranasal, o tópica a seres humanos y animales de compañía. Normalmente, las composiciones para la administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, La composición puede incluir también un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para disminuir el dolor en el sitio de la inyección.

Si las composiciones de la divulgación son para administrarse por vía tópica, Las composiciones pueden formularse en la forma de una pomada, crema, parche transdérmico, una loción, gel, champú, pulverización, aerosol, solución, emulsión u otra forma bien conocida por un experto en la materia (Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19ª ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995)). Para las formas de dosificación tópicas no pulverizables, se emplean normalmente formas viscosas a semisólidas o sólidas que comprende un transportador o uno o más excipientes compatibles con la aplicación tópica y que tienen una viscosidad dinámica mayor que el agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, pomadas, polvos, linimentos, bálsamos, que, si se desea, se esterilizan o mezclan con agentes auxiliares (por ejemplo, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, tampones, o sales) para influencias diversas propiedades, tales como, por ejemplo, la presión osmótica. Otras formas de dosificación tópicas adecuadas incluyen preparaciones de aerosol pulverizables en las que el principio activo, en combinación con un transportador inerte sólido o líquido, se envasan en una mezcla con un compuesto volátil presurizado (por ejemplo, un propulsor gaseoso, tal como freón) o en una botella a compresión. Se pueden añadir también hidratantes o humectantes a las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación si se desea. Son bien conocidos en la técnica los ejemplos de dichos ingredientes adicionales.

La composición farmacéutica de la presente divulgación puede tener una semivida de entre aproximadamente 8 días

a aproximadamente 15 días cuando se dosifica por vía intravenosa o subcutánea. Como alternativa, la composición farmacéutica de la presente invención puede tener una semivida de entre aproximadamente 10 días a aproximadamente 13 días. Aún más alternativamente, la composición farmacéutica de la presente invención puede tener una semivida de aproximadamente 8 días, tal como aproximadamente 8,5 días, aproximadamente 9 días, tal como aproximadamente 9,5 días, aproximadamente 10 días, tal como aproximadamente 10,5 días, aproximadamente 11 días, tal como aproximadamente 11,5 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 12,5 días, aproximadamente 13 días, tal como aproximadamente 13,5 días, aproximadamente 14 días, tal como aproximadamente 14,5 días, o aproximadamente 15 días.

Si el procedimiento de la divulgación comprende la administración intranasal de una composición, la composición puede formularse en forma de aerosol, pulverización, nebulización o en forma de gotas. En particular, los agentes profilácticos o terapéuticos para su uso de acuerdo con la presente divulgación pueden administrarse convenientemente en la forma de una presentación de pulverización en aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos (compuestos de, por ejemplo, gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador que contiene una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Si el procedimiento de la divulgación comprende la administración oral, las composiciones pueden formularse por vía oral en la forma de comprimidos, cápsulas, sellos, cápsulas de gel, soluciones, suspensiones, y similares. Los comprimidos o cápsulas pueden prepararse mediante medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o almidón glicolato de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden revestirse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tomar la forma de, aunque no de forma limitativa, soluciones, jarabes o suspensiones o pueden presentarse como un producto seco para reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes de usar. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse mediante medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres grasos, alcohol etílico, o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tamponantes, aromatizantes, colorantes y agentes edulcorantes según sea adecuado. Las preparaciones para la administración oral pueden formularse de forma adecuada para una liberación lenta, una liberación controlada, o liberación sostenida de un(os) agente(s) profiláctico(s) o terapéutico(s).

El procedimiento de la divulgación puede comprender la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, de una composición formulada con un agente aerosolizante (patentes de Estados Unidos números 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540, y 4.880.078; y las publicaciones PCT números WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903). Por ejemplo, un anticuerpo de la divulgación, el tratamiento combinado, y/o la composición de la divulgación puede administrarse utilizando la tecnología de administración pulmonar del fármaco Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.).

El procedimiento de la divulgación puede comprender la administración de una composición formulada para la administración parenteral mediante inyección (por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua). Las formulaciones para inyección pueden presentarse en una forma farmacéutica unitaria (por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis) con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar dichas formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes formulatorios tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril exenta de pirógenos) antes del uso.

Los procedimientos de la divulgación pueden comprender adicionalmente la administración de composiciones formuladas como preparaciones de depósito. Dichas formulaciones de acción larga pueden administrarse mediante implante (por ejemplo, subcutáneo o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, Las composiciones pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico o como derivados poco solubles (por ejemplo, como una sal poco soluble).

Los procedimientos de la divulgación abarcan la administración de composiciones formuladas como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con aniones, tales como las derivadas de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como las derivadas de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

Los ingredientes de las composiciones desveladas se pueden suministrar bien por separado o bien mezclados juntos en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo seco liofilizado o como un concentrado sustancialmente exento de agua en un recipiente hermético tal como una ampolla o bolsita indicando la cantidad de principio activo. Donde el modo de administración es infusión, las composiciones desveladas pueden dispensarse con una solución en infusión que contiene la solución de calidad farmacéutica estéril tal como agua o solución salina. Donde el modo de administración es mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de solución estéril tal como agua o solución salina con el fin de que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

En particular, la divulgación proporciona también que una o más de las proteínas de unión desveladas o las composiciones farmacéuticas de las mismas se envasa en un recipiente hermético tal como una ampolla o bolsita que puede indicar la cantidad del agente. Una o más de las proteínas de unión desveladas o las composiciones farmacéuticas de las mismas pueden suministrarse como un polvo liofilizado esterilizado seco o sustancialmente un concentrado exento de agua en el recipiente cerrado herméticamente y se puede reconstituir (por ejemplo, con agua o solución salina) a la concentración adecuada para la administración a un sujeto. Una o más de las proteínas de unión desveladas o las composiciones farmacéuticas de las mismas puede suministrarse como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente cerrado herméticamente a una dosificación unitaria de al menos aproximadamente 0,5 mg, 1 mg, 2 mg, 4 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 25 mg, 35 mg, 45 mg, 50 mg, 75 mg, o 100 mg. Las proteínas de unión liofilizadas desveladas o las composiciones farmacéuticas de las mismas pueden almacenarse a cualquier temperatura adecuada, tal como, por ejemplo, entre aproximadamente 2° C y aproximadamente 8° C y se pueden almacenar en su recipiente original. Las proteínas de unión desveladas o las composiciones farmacéuticas de las mismas pueden administrarse en aproximadamente 1 semana, en aproximadamente 5 días, en aproximadamente 72 horas, en aproximadamente 48 horas, en aproximadamente 24 horas, en aproximadamente 12 horas, en aproximadamente 6 horas, en aproximadamente 5 horas, en aproximadamente 3 horas, o en aproximadamente 1 hora después de reconstituirse. Como alternativa, una o más de las proteínas de unión desveladas o las composiciones farmacéuticas de las mismas se pueden suministrar en forma líquida en un recipiente cerrado hermético que puede indicar la cantidad y la concentración del agente. La forma líquida de la composición administrada puede suministrarse en un recipiente cerrado hermético a concentraciones de al menos aproximadamente 0,01 mg/ml, al menos aproximadamente 0,05 mg/ml, al menos aproximadamente 0,1 mg/ml, al menos aproximadamente 0,2 mg/ml, al menos aproximadamente 0,25 mg/ml, al menos aproximadamente 0,5 mg/ml, al menos aproximadamente 1 mg/ml, al menos aproximadamente 2,5 mg/ml, al menos aproximadamente 5 mg/ml, al menos aproximadamente 8 mg/ml, al menos aproximadamente 10 mg/ml, al menos aproximadamente 15 mg/ml, al menos aproximadamente 25 mg/ml, al menos aproximadamente 50 mg/ml, al menos aproximadamente 75 mg/ml, o al menos aproximadamente 100 mg/ml. La forma líquida puede almacenarse a cualquier temperatura adecuada tal como entre aproximadamente 2° C y aproximadamente 8° C y puede almacenarse en su recipiente original.

Las proteínas de unión de la divulgación pueden incorporarse en una composición farmacéutica adecuada para la administración parenteral. En un aspecto, las proteínas de unión se preparan como una solución inyectable que contiene entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 250 mg/ml de anticuerpo. La solución inyectable puede estar compuesta tanto de una forma farmacéutica líquida como de una forma farmacéutica liofilizada en un vial de sílex o ámbar, una ampolla o una jeringuilla precargada. El tampón puede ser cualquier tampón adecuado tal como L-histidina o una solución salina tamponada con fosfato a una concentración de aproximadamente 1-50 mM, o aproximadamente 5-10 mM. Otros tampones adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio y fosfato de potasio. Se pueden utilizar tampones para modificar la toxicidad de la composición farmacéutica. Por ejemplo, Se puede usar cloruro de sodio para modificar la toxicidad de la solución de la proteína de unión a una concentración de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 300 mM, tal como una solución salina aproximadamente 150 mM para modificar la toxicidad de la forma farmacéutica líquida. Se pueden incluir crioprotectores, tales como sacarosa, en la forma farmacéutica liofilizada a una concentración de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10% o se puede usar de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,0%. Otros crioprotectores adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, trehalosa y lactosa. Se pueden incluir agentes de volumen, tales como manitol, en una forma farmacéutica liofilizada a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 10%, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 4%. Se pueden usar estabilizantes, tales como L-metionina en formas de dosificación líquidas y liofilizadas a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 5 a aproximadamente 10 mM). Otros agentes de volumen adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, glicina y arginina. Se pueden incluir tensioactivos, tales como polisorbato-80, en formas de dosificación líquidas y liofilizadas a una concentración de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,05% o aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,01%. Los tensioactivos adicionales incluyen, aunque no de forma limitativa, tensioactivos de polisorbato 20 y BRIJ.

Una formulación farmacéutica o composición ilustrativa de la presente divulgación puede ser una composición farmacéutica líquida que tenga un pH entre aproximadamente 7,4 a aproximadamente 8,0. La composición farmacéutica líquida comprende aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml de un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 37 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 38. La composición farmacéutica líquida comprende además al menos un tampón (tal como, solución salina tamponada con fosfato, tris o histidina). La molaridad del tampón que se puede usar puede ser de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 60 mM. Opcionalmente, dicha

composición o formulación farmacéutica puede contener también al menos un conservante, tal como, metilparabeno, propilparabeno, alcohol bencílico, clorobutanol o cloruro de benzalconio. La cantidad de conservante que se puede usar puede ser de aproximadamente 0,01 por ciento en volumen a aproximadamente 5,0% en volumen, dependiendo del conservante utilizado.

- 5 Otra formulación o composición farmacéutica ilustrativa de la presente divulgación puede ser una composición farmacéutica líquida que comprende un pH entre aproximadamente 7,4 a aproximadamente 8,0. La composición farmacéutica líquida comprende aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml de un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 192 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 193. La composición farmacéutica líquida comprende además al menos un tampón (tal como, solución salina tamponada con fosfato, tris o histidina). La molaridad del tampón que se puede usar puede ser de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 60 mM. Opcionalmente, dicha composición o formulación farmacéutica puede contener también al menos un conservante, tal como, metilparabeno, propilparabeno, alcohol bencílico, clorobutanol o cloruro de benzalconio. La cantidad de conservante que se puede usar puede ser de aproximadamente 0,01 por ciento en volumen a aproximadamente 5,0% en volumen, dependiendo del conservante utilizado.

Las composiciones de esta divulgación pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (*por ejemplo*, soluciones inyectables o infusibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma de la composición desvelada puede depender del modo de administración previsto y de la aplicación terapéutica. Las composiciones desveladas pueden estar en la forma de soluciones inyectables o infundibles, dichas composiciones son similares a las utilizadas para la inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos. El modo de administración puede ser parenteral (*por ejemplo*, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). Las proteínas de unión desveladas pueden administrarse mediante infusión o inyección intravenosa, o mediante inyección intramuscular o subcutánea.

Las composiciones terapéuticas deben ser normalmente estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada tal como aquella adecuada para una alta concentración de fármaco. Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando el principio activo (*es decir*, el anticuerpo o porción de anticuerpo) en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con uno o una combinación de principios enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Se pueden preparar dispersiones incorporando el principio activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico, y los otros principios requeridos a partir de los que se han enumerado anteriormente. En el caso de polvos liofilizados estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación incluyen, aunque no de forma limitativa, secado al vacío y secado por pulverización, que producen un polvo del principio activo más cualquier principio adicional deseado a partir de una solución del mismo previamente esterilizada por filtración. Puede mantenerse la fluidez adecuada de una solución, por ejemplo, usando un recubrimiento con lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables se puede conseguir incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción tal como, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Un anticuerpo o porción de anticuerpo de la divulgación se puede administrar por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un transportador comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) puede también encerrarse en una cápsula de envoltura de gelatina dura o blanda, comprimido en comprimidos, o incorporarse directamente a la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, Los compuestos pueden incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas. Para administrar un compuesto de la divulgación mediante otra administración diferente de la parenteral, puede ser necesario revestir el compuesto con, o administrar simultáneamente el compuesto con, un material que evite su inactivación.

Las proteínas de unión desveladas pueden administrarse simultáneamente con otros principios activos que se pueden incorporar también en las composiciones desveladas. Un anticuerpo o porción de anticuerpo de la divulgación puede formularse simultáneamente con y/o administrarse simultáneamente con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para tratar trastornos en los que la actividad de NGF es perjudicial. Por ejemplo, un anticuerpo o porción de anticuerpo anti-NGF de la divulgación puede formularse simultáneamente y/o administrarse simultáneamente con uno o más anticuerpos adicionales que se unen a otras dianas (por ejemplo, anticuerpos que se unen a citoquinas diferentes o que se unen a moléculas de la superficie celular). Además, Se pueden usar una o más proteínas de unión desveladas en combinación con dos o más de los anteriores agentes terapéuticos. Dichos tratamientos combinados pueden, por ejemplo, permitir el uso de dosificaciones más bajas de los agentes terapéuticos administrados, evitando por tanto posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

60 Un anticuerpo contra NGF o fragmento del mismo puede formularse con un vehículo que extienda la semivida de la proteína de unión. Los vehículos adecuados conocidos en la técnica incluyen, aunque no de forma limitativa, el

dominio Fc, polietilenglicol, y dextrano. Dichos vehículos se describen, por ejemplo, en la publicación de Estados Unidos número US6660843 y la solicitud PCT publicada n.º WO 99/25044.

Las secuencias de ácidos nucleicos aisladas que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de unión desveladas u otro agente profiláctico o terapéutico de la divulgación pueden administrarse para tratar, prevenir, gestionar, o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo por medio de terapia génica. La terapia génica se refiere a la terapia llevada a cabo mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable, en el que los ácidos nucleicos producen su anticuerpo codificado o el agente profiláctico o terapéutico de la divulgación que media un efecto profiláctico o terapéutico.

Pueden utilizarse cualquiera de los procedimientos para la terapia génica disponibles en la técnica de acuerdo con la presente divulgación. Para las revisiones generales de los procedimientos de terapia génica, véanse Goldspiel y col., *Clinical Pharmacy*, 12: 488-505 (1993); Wu y col., *Biotherapy*, 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32: 573-596 (1993); Mulligan, *Science*, 260: 926-932 (1993); y Morgan y col., *Ann. Rev. Biochem.*, 62: 191-217 (1993); TIBTECH, 11(5):155-215 (1993). Los procedimientos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que se pueden usar se describen en, por ejemplo, Ausubel y col. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990). Las descripciones detalladas de diversos procedimientos de terapia génica se desvelan en el documento US20050042664A1.

Los anticuerpos de la divulgación, o las porciones de unión a antígeno de los mismos, se pueden usar solos o en combinación para tratar los trastornos relacionados con NGF. Debe entenderse que los anticuerpos de la divulgación o la porción de unión a antígeno de los mismos se pueden usar solo o en combinación con un agente adicional, por ejemplo, un agente terapéutico, seleccionándose dicho agente adicional por el experto en la materia para su uso previsto. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica que es útil para tratar la enfermedad o dolencia que se trata por el anticuerpo de la presente divulgación. El agente adicional puede ser también un agente que imparte un atributo beneficioso a la composición terapéutica, por ejemplo, un agente que altera la viscosidad de la composición.

Debe entenderse además que las combinaciones que se van a incluir en esta divulgación son aquellas combinaciones útiles para sus fines previstos. Los agentes que se muestran a continuación son ilustrativos para los fines y no se pretende que sean limitantes. Las combinaciones, que son parte de esta divulgación, pueden ser los anticuerpos de la presente divulgación y al menos un agente adicional seleccionado entre las siguientes listas. La combinación puede incluir también más de un agente adicional, por ejemplo, dos o tres agentes adicionales si la combinación es tal que la composición formada puede llevar a cabo su función prevista.

Las combinaciones incluyen fármaco(s) antiinflamatorios no esteroideos, denominados también AINE que incluyen fármacos similares a ibuprofeno. Otras combinaciones son corticoesteroides que incluyen prednisolona; los efectos secundarios bien conocidos del uso de esteroides pueden reducirse o incluso eliminarse disminuyendo la dosis de esteroides requerida cuando se tratan pacientes en combinación con los anticuerpos anti-NGF de la presente divulgación. Los ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la artritis reumatoide o el dolor, con los cuales un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la divulgación pueden combinarse incluyen los siguientes: fármaco(s) antiinflamatorios supresores de las citoquinas (CSAID); anticuerpos contra o antagonistas de citoquinas o factores de crecimiento, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21, interferones, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF. Los anticuerpos de la divulgación, o las porciones de unión a antígeno de los mismos, se pueden combinar con anticuerpos contra moléculas de la superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, CTLA o sus ligandos, incluyendo CD154 (gp39 o CD40L).

Las combinaciones de agentes terapéuticos pueden interferir en diferentes puntos en la autoinmunidad y la posterior cascada inflamatorio; los ejemplos incluyen antagonistas de TNF análogos a anticuerpos a anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos, contra TNF, D2E7, (Publicación PCT n.º WO 97/29131), CA2 (Remicade™), CDP 571, y receptores de TNF p55 o p75 TNF solubles, derivados, de los mismos, (p75TNFR1gG (Enbrel™) o p55TNFR1gG (Lenercept), y también inhibidores de la enzima convertidora de TNF $\alpha$  (TACE); de forma similar, otros inhibidores de IL-1 (inhibidores de la enzima convertidora de Interleuquina-1, IL-1RA, etc.) puede ser eficaz por el mismo motivo. Otras combinaciones incluyen Interleuquina 11.

Los anticuerpos de la divulgación, o las porciones de unión a antígeno de los mismos, pueden combinarse también con agentes, tales como metotrexato, 6-MP, azatioprina sulfasalazina, mesalazina, olsalazina cloroquinina/hidroxicloroquina, pencilamina, aurotiomalato (intramuscular y oral), azatioprina, colchicina, corticoesteroides (orales, inhalados e inyección local), agonistas de los beta-2 adrenorreceptores (salbutamol, terbutalina, salmeteral), xantinas (teofilina, aminofilina), cromoglicato, nedocromilo, ketotifeno, ipratropio y oxitropio, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetilo, leflunomida, AINE, por ejemplo, ibuprofeno, corticoesteroides tales como prednisolona, inhibidores de la fosfodiesterasa, agonistas de la adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización por las citoquinas proinflamatorias tales como TNF $\alpha$  o IL-1 (por ejemplo, IRAK, NIK, IKK, inhibidores de la quinasa p38 o MAP), inhibidores de la enzima convertidora de IL-1  $\beta$ , inhibidores de la enzima convertidora de TNF $\alpha$  (TACE), inhibidores

de la señalización de los linfocitos T tales como inhibidores de la quinasa, inhibidores de la metaloproteínasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, receptores solubles de las citoquinas y derivados de los mismos por ejemplo, receptores de TNF solubles p55 o p75 y los derivados p75TNFRlgG (Enbrel™ y p55TNFRlgG (Lenercept)), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), citoquinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGFβ), celecoxib, ácido fólico, sulfato de hidroxiclороquina, rofecoxib, etanercept, infliximab, naproxeno, valdecoxib, sulfasalazina, metilprednisolona, meloxicam, acetato de metilprednisolona, tiomalato de oro sodio, aspirina, acetónido de triamcinolona, napsilato/apap de propoxifeno, folato, nabumetona, diclofenaco, piroxicam, etodolaco, diclofenaco de sodio, oxaprozina, clorhidrato de oxicodona, bitartrato/apap de hidrocodona, diclofenaco de sodio/misoprostol, fentanilo, anakinra, insulina recombinante humana, clorhidrato de tramadol, salsalato, sulindaco, cianocobalamina/fa/piridoxina, acetaminofeno, alendronato de sodio, prednisolona, sulfato de morfina, clorhidrato de lidocaína, indometacina, glucosamina sulfato de condroitina, clorhidrato de amitriptilina, sulfadiazina, clorhidrato de oxicodona/acetaminofeno, clorhidrato de olopatadina, misoprostol, naproxeno sodio, omeprazol, ciclofosfamida, rituximab, IL-1 TRAP, MRA, CTLA4-IG, IL-18 BP, dirigidos contra IL-18, dirigidos contra IL15, BIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-548, VX-740, Roflumilast, IC-485, CDC-801, y Mesopram. Otras combinaciones incluyen metotrexato o leflunomida y en casos de artritis reumatoide moderada o grave, ciclosporina. Los anticuerpos de la divulgación, o las porciones de unión a antígeno de los mismos, pueden combinarse también con agentes, tales como agentes quimioterapéuticos contra el cáncer, antimicrobianos, antiinflamatorios, y antihelmínticos utilizados en animales.

El AINE puede ser cualquier compuesto antiinflamatorio no esteroideo. Los AINE se clasifican en virtud de su capacidad de inhibir la ciclooxigenasa. La ciclooxigenasa 1 y la ciclooxigenasa 2 son dos isoformas principales de ciclooxigenasa y los AINE más estándares son inhibidores mixtos de las dos isoformas. Los AINE más estándares estarán comprendido en una de las siguientes cinco categorías estructurales: (1) derivados de ácido propiónico, tales como ibuprofeno, naproxeno, naproxina, diclofenaco, y ketoprofeno; (2) derivados de ácido acético, tales como tolmetina y sulindaco; (3) derivados de ácido fenamínico, tales como ácido mefenámico y ácido meclofenámico; (4) derivados de ácido bifenilcarboxílico, tales como diflunisal y flufenisal; y (5) oxicamos, tales como piroxim, sudoxicam, e isoxicam. Se ha descrito otra clase de AINE que inhibe selectivamente la ciclooxigenasa 2. Se han descritos inhibidores de Cox-2 (patentes de Estados Unidos números 5.616.601; 5.604.260; 5.593.994; 5.550.142; 5.536.752; 5.521.213; 5.475.995; 5.639.780; 5.604.253; 5.552.422; 5.510.368; 5.436.265; 5.409.944; y 5.130.311). Determinados inhibidores de COX-2 ilustrativos incluyen celecoxib (SC-58635), rofecoxib, DUP-697, flosulida (CGP-28238), meloxicam, ácido 6-metoxi-2-naftilacético (6-MNA), MK-966, nabumetona (profármaco de 6-MNA), nimesulida, NS-398, SC-5766, SC-58215, T-614; o las combinaciones de los mismos.

El antagonista de NGF y/o un agente terapéutico adicional, tal como AINE, se puede administrar a un sujeto mediante cualquier ruta adecuada. Por ejemplo, se pueden administrar juntos o por separado, y/o simultánea y/o secuencialmente, por vía oral, intravenosa, sublingual, subcutánea, intraarterial, intramuscular, rectal, intraespinal, intratorácica, intraperitoneal, intraventricular, sublingual, transdérmica o mediante inhalación. La administración puede ser sistémica, por ejemplo, intravenosa, o localizada. El antagonista del factor de crecimiento nervioso y el agente terapéutico adicional pueden estar presentes junto con uno o más transportadores o excipientes farmacéuticamente aceptables, o pueden estar presentes en composiciones separadas. En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición sinérgica de un antagonista de NGF y un AINE.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una cantidad "profilácticamente eficaz" de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la divulgación. Se pueden ajustar los regímenes de dosificación para proporcionar la respuesta óptima deseada response (*por ejemplo*, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar proporcionalmente la dosis tal como se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en una forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Las formas de dosificación unitarias se refieren a unidades físicamente individuales adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de un principio activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el vehículo farmacéuticamente aceptable. La especificación de las formas de dosificación unitarias de la divulgación viene dictaminada por y dependen directamente de (a) las características únicas del principio activo y el agente concreto o el efecto profiláctico a lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica para componer tal principio activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Un intervalo ilustrativo no limitante, para una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la divulgación es de aproximadamente de 0,001 a aproximadamente 20 mg/kg o de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10 mg/kg. Se debe indicar que los valores de dosificación pueden variar en función del tipo y de la gravedad de la enfermedad que se va a aliviar. Debe entenderse además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos se deberían ajustar con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación establecidos en el presente documento son solo ilustrativos y no pretenden limitar el ámbito o la práctica de la composición reivindicada.

Será fácilmente evidente a los expertos en la materia que otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de los

procedimientos de la divulgación descritos en el presente documento son obvias y se pueden realizar utilizando equivalentes adecuados sin apartarse del ámbito de la divulgación de las realizaciones desveladas en el presente documento. Habiendo descrito ahora la presente divulgación en detalle, la misma será más claramente comprensible por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen solo a fines ilustrativos y no se pretende que limiten la divulgación.que se presentan con fines de ilustración y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

**E. Ejemplos**

**Ejemplo 1: Inmunización de ratones con NGF**

Para generar mAb de ratón dirigidos contra NGF, se inmunizaron ratones A/J hembras por vía subcutánea con 25 µg de β NGF humano (R&D Systems n.º de catálogo 256-GF/CF) en CFA. Los animales recibieron un refuerzo cada tres semanas con 25 µg de β NGF humano en IFA. Cuatro días antes de la fusión, los ratones recibieron un refuerzo con 10 µg de β NGF humano en solución salina estéril de forma intravenosa. Los esplenocitos del ratón inmunizado se fusionaron con células de mieloma SP2/0-Ag14 a una relación 5:1 de esplenocitos a células SP2/0, utilizando técnicas convencionales. Siete a diez días después de la fusión, cuando se observaron colonias macroscópicas, se ensayaron los sobrenadantes en un formato ELISA de captura para la unión a β NGF biotinilado humano o de rata. Los pocillos positivos para ELISA se expandieron en placas de 24 pocillos y se ensayaron para la unión a β NGF biotinilado de rata. Los sobrenadantes positivos para el ensayo de las líneas de células de hibridomas de NGF humano y de rata se evaluaron en un formato de bioensayo. Se clonaron las líneas de células de interés mediante dilución limitante para aislar un anticuerpo monoclonal de ratón específico de NGF.

**Ejemplo 2: Cribado de sobrenadantes de hibridoma para identificar mAb dirigidos contra NGF secretados**

A. ELISA de unión indirecta

Para determinar si los mAb estaban presentes en sobrenadantes de hibridomas, Se revistieron placas ELISA con Fc de cabra contra IgG de murino (Jackson ImmunoResearch, n.º de cat. 115-005-164) y se incubó durante una noche a 4°C. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. Se bloquearon las placas con 200 µl de leche al 2% y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas como anteriormente. Se diluyeron sobrenadantes de hibridomas 5 veces, 25 veces, 125 veces y 1625 veces con PBS y a continuación se añadieron a los pocillos de las placas y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. El control positivo era suero bruto (diluido 1:500 con PBS) aislado de un ratón inmunizado con β NGF y el control negativo era sobrenadante de hibridoma derivado de un ratón inmunizado con un antígeno diferente de NGF. Las placas se lavaron y a continuación se añadieron 50 µl de β NGF biotinilado humano o de rata a 50 ng/ml y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron las placas. Un conjugado de estreptavidina-HRP (Thermo, n.º de cat. 21126) se diluyó a 10.000 y se añadió a las placas. Las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y a continuación se añadió sustrato TMB (Invitrogen, n.º de catálogo 00-2023). La reacción se detuvo usando 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (VWR, n.º de catálogo BDH3500-1). Se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Spectromax 2E (Molecular Devices); estas lecturas de la absorbancia se muestran en las Tablas 1 y 2. El valor numérico indica la unión de los anticuerpo dirigidos contra NGF de ratón al β NGF.biotinilado humano o de rata. Este dato indica que algunos sobrenadantes de hibridomas contenían anticuerpos anti-NGF.

Tabla 1: Datos del ELISA de unión indirecta de NGF humano biotinilado

Dilución del sobrenadante (veces)	30F11	23F1	22E1	3C3	16B9	17G6	23H2	25E5	29E6	7H1	19C1	30A1
5	1,066	1,143	1,288	1,137	0,821	1,122	0,913	1,299	1,196	1,155	0,936	1,090
25	1,005	1,171	1,255	1,108	0,644	1,127	0,529	1,254	1,127	1,159	0,555	0,926
125	0,873	0,979	0,772	0,948	0,340	1,017	0,191	0,988	0,889	1,002	0,234	0,507
625	0,436	0,696	0,296	0,571	0,107	0,713	0,085	0,512	0,426	0,673	0,100	0,223

Dilución del sobrenadante (veces)	29A7	27A5	26D5	26H12	23D7	22A9	22G3	21D4	3E9	3F9	2G11	1D6
5	1,198	1,116	0,954	0,943	1,087	0,707	0,662	1,154	1,167	0,974	1,038	0,545
25	1,092	0,887	0,903	0,794	1,060	0,549	0,498	1,042	0,996	0,694	0,992	0,457

ES 2 665 954 T3

(continuación)

Dilución del sobrenadante (veces)	29A7	27A5	26D5	26H12	23D7	22A9	22G3	21D4	3E9	3F9	2G11	1D6
125	0,762	0,395	0,823	0,381	0,857	0,348	0,240	0,899	0,655	0,323	0,819	0,164
625	0,293	0,174	0,542	0,135	0,489	0,168	0,126	0,543	0,298	0,145	0,486	0,066

Dilución del sobrenadante (veces)	4B6	8E4	9E2	9H2	20B10	14G6	12H12	11D1
5	1,252	1,294	1,126	1,167	1,098	1,274	1,222	0,642
25	1,131	1,076	1,085	0,915	0,997	1,206	1,083	0,497
125	0,768	0,595	0,938	0,395	0,576	0,956	0,741	0,275
625	0,341	0,250	0,605	0,171	0,143	0,598	0,363	0,117

Dilución del sobrenadante (veces)	Control positivo	4E2	12D6	1D10	2D8	3F7	4F11	4H2	5D8	5G9	6B2	6F10
3	1,018	1,078	0,985	1,105	1,046	1,282	1,192	1,013	0,790	1,052	1,231	1,096
15	0,981	0,991	0,844	0,963	0,868	1,166	1,016	0,800	0,654	0,919	0,939	1,045
75	1,020	0,705	0,501	0,655	0,436	1,049	0,702	0,447	0,420	0,534	0,505	0,999

Dilución del sobrenadante (veces)	6H2	7C10	7G1	8G9	10A12	10B6	11A9	12A5	12F6	13E3	14A9	Control negativo
3	1,322	0,745	0,233	0,849	0,192	1,135	0,056	0,725	1,003	1,003	1,107	0,054
15	1,221	0,378	0,106	0,548	0,089	1,088	0,051	0,401	0,944	0,881	1,082	0,053
75	0,791	0,151	0,066	0,220	0,060	0,872	0,050	0,183	0,681	0,463	0,951	0,051

5 Tabla 2: Datos de ELISA de unión indirecta de NGF biotinilado de rata

Dilución del sobrenadante (veces)	30F11	23F1	22E1	3C3	16B9	17G6	23H2	25E5	29E6	7H1	19C1	30A1
5	0,694	0,764	1,054	0,698	0,443	0,749	0,670	1,091	0,677	0,733	0,660	0,690
25	0,734	0,767	0,936	0,729	0,350	0,758	0,412	1,099	0,655	0,664	0,462	0,681
125	0,603	0,737	0,557	0,628	0,218	0,751	0,176	0,803	0,523	0,603	0,197	0,445
625	0,361	0,528	0,229	0,520	0,094	0,567	0,083	0,396	0,261	0,401	0,088	0,180

(continuación)

Dilución del sobrenadante (veces)	29A7	27A5	26D5	26H12	23D7	22A9	22G3	21D4	3E9	3F9	2G11	1D6
5	0,967	0,610	0,611	0,538	0,684	0,508	0,521	0,787	1,098	0,633	0,705	0,327
25	0,907	0,514	0,571	0,368	0,775	0,417	0,384	0,760	0,945	0,502	0,669	0,278
125	0,441	0,236	0,516	0,169	0,654	0,240	0,209	0,671	0,530	0,264	0,588	0,132
625	0,224	0,113	0,413	0,082	0,396	0,117	0,107	0,453	0,219	0,117	0,353	0,063

Dilución del sobrenadante (veces)	4B6	8E4	9E2	9H2	20B10	14G6	12H12	11D1
5	0,607	0,685	0,632	0,453	0,472	0,755	0,676	0,122
25	0,508	0,518	0,559	0,310	0,431	0,739	0,571	0,095
125	0,438	0,317	0,529	0,157	0,261	0,665	0,357	0,076
625	0,234	0,150	0,382	0,085	0,108	0,424	0,173	0,060

Dilución del sobrenadante (veces)	Control positivo	4E2	12D6	1D10	2D8	3F7	4F11	4H2	5D8	5G9	6B2	6F10
3	0,773	0,777	0,459	1,023	0,590	1,097	0,952	0,945	0,565	0,952	1,122	0,937
15	0,736	0,651	0,379	0,877	0,599	1,125	0,690	0,684	0,467	0,767	0,876	1,005
75	0,760	0,471	0,210	0,548	0,323	1,044	0,576	0,348	0,294	0,406	0,453	0,849

Dilución del sobrenadante (veces)	6H2	7C10	7G1	8G9	10A12	10B6	11A9	12A5	12F6	13E3	14A9	Control negativo
3	1,108	0,541	0,197	0,681	0,145	0,440	0,058	0,521	0,904	0,786	0,845	0,055
15	0,860	0,275	0,093	0,396	0,077	0,784	0,052	0,334	0,810	0,737	0,777	0,053
75	0,603	0,115	0,061	0,155	0,060	0,727	0,051	0,153	0,565	0,413	0,582	0,052

## 5 B. ELISA de unión a TrkA

Para determinar si los mAb de NGF en sobrenadante de hibridoma bloquearon NGF de la unión al receptor TrkA, Se revistieron placas ELISA con Fc de cabra dirigido contra IgG humana (Jackson ImmunoResearch, n.º de cat. 109-005-008) a 2 µg/ml en PBS y se incubaron durante la noche a 4°C. Se lavaron las placas tres veces con PBS/Tween. Se bloquearon las placas con 200 µl/pocillo de leche al 2% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas tres veces como anteriormente. se añadió quimera TrkA/Fc de rata (R&D Systems, n.º de catálogo 1056-TK) a 1 µg/ml (50 µl/pocillo) en PBS/BSA al 0,1% y a continuación se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se tituló NGF biotinilado humano y se preincubó con sobrenadantes de anticuerpo anti-NGF diluidos 1 vez, 5 veces, y 25 veces, o mAB purificados dirigidos contra NGF diluidos a 0,08, 0,4, 2 o 10 µg/ml durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador de placas. El control negativo era un sobrenadante acondicionado no relacionado. El control positivo era suero de un ratón inmunizado con NGF. Se lavaron las placas y a continuación se añadieron 50 µl de cada mezcla de NGF/Ab biotinilado a los pocillos adecuados. Se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas. Se añadieron 50 µl de estreptavidina-HRP (Thermo, n.º de cat. 21126) a una dilución de 10.000. Se incubaron las placas durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavaron las

placas. Se añadieron 50 µl de TMB (Invitrogen, n.º de cat. 00-2023) y se detuvo la reacción utilizando 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (VWR, n.º de cat. BDH3500-1). Se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Spectromax 2E (Molecular Devices), y las lecturas de la absorbancia se muestran en la Tabla 3. El valor numérico indica la unión del β NGF biotinilado humano a la quimera de TrkA/Fc de rata. Este dato indica que algunos sobrenadantes de hibridomas contenían anticuerpos bloqueantes del receptor dirigidos contra NGF.

5

Tabla 3: Datos del ELISA de inhibición de la unión del TrkA de rata para los sobrenadantes del hibridoma dirigidos contra NGF

Dilución del sobrenadante (veces)	Control negativo	Control positivo	30F11	23F1	22E1	3C3	16B9	17G6	23H2	25E5	29E6	7H1
1	0,465	0,050	0,158	0,108	0,357	0,146	0,142	0,091	0,379	0,304	0,291	0,217
5	0,456	0,055	0,210	0,140	0,429	0,195	0,249	0,123	0,622	0,354	0,600	0,419
25	0,462	0,102	0,331	0,276	0,558	0,345	0,409	0,210	0,418	0,505	0,881	0,758

Dilución del sobrenadante (veces)	19C1	30A1	29A7	27A5	26D5	26H12	23D7	22A9	22G3	21D4	3E9	3F9
1	0,285	0,148	0,427	0,444	0,063	0,344	0,131	0,322	0,150	0,133	0,328	0,186
5	0,567	0,281	0,462	0,800	0,076	0,621	0,212	0,362	0,211	0,242	0,416	0,295
25	0,686	0,464	0,502	0,680	0,101	0,665	0,393	0,453	0,337	0,404	0,682	0,498

Dilución del sobrenadante (veces)	Neg	Pos	2G11	1D6	4B6	8E4	9E2	9H2
1	0,372	0,052	0,138	0,226	0,169	0,273	0,103	0,380
5	0,336	0,073	0,205	0,281	0,287	0,669	0,125	0,604
25	0,318	0,228	0,328	0,343	0,424	0,693	0,151	0,521

10

Dilución del sobrenadante (veces)	20B10	14G6	12H12	11D1	19A12	2B12	PBS	PBS
1	0,166	0,113	0,060	0,101	0,100	0,065	0,295	0,315
5	0,200	0,192	0,099	0,152	0,170	0,070	0,334	0,297
25	0,289	0,334	0,190	0,264	0,295	0,095	0,306	0,289

Dilución del sobrenadante (veces)	-ve contrl	+ve contrl	+ve contrl	+ve contrl	13E3	14A9	4E2	12D6	1D10	2D8	3F7	4F11
1	0,386	0,112	0,145	0,104	0,400	0,121	0,283	0,145	0,248	0,359	0,056	0,286
5	0,388	0,164	0,234	0,140	0,383	0,208	0,290	0,211	0,312	0,588	0,083	0,356
25	0,386	0,308	0,488	0,216	0,497	0,376	0,334	0,364	0,447	0,497	0,149	0,541

(continuación)

Dilución del sobrenadante (veces)	4H2	5D8	5G9	6B2	6F10	6H2	7C10	8G9	10B6	12A5	12F6	PBS
1	0,396	0,363	0,344	0,096	0,206	0,400	0,230	0,409	0,329	0,306	0,172	0,436
5	0,457	0,398	0,387	0,215	0,212	0,523	0,489	0,473	0,364	0,328	0,227	0,351
25	0,606	0,504	0,473	0,451	0,242	0,738	0,487	0,413	0,399	0,406	0,324	0,338

C. Ensayo SureFire de Fosfo-ERK Celular (pERK)

5 Para determinar si los mAb dirigidos contra NGF en los sobrenadantes del hibridoma bloquearon la señalización posterior como resultado del bloqueo de la unión de NGF a TrkA, células Neuroscreen-1 (Thermo Fisher Scientific) se hicieron crecer en matraces revestidos con colágeno I en medio RPMI suplementado con suero de caballo al 10%, FBS al 5%, 100 unidades/ml de penicilina/estreptomina, L-glutamina 2 mM, y HEPES 10 mM a 37°C en una atmósfera humidificada con un 95% de aire y un 5% de CO<sub>2</sub>. Para el ensayo de fosforilación de ERK, se sembraron 5 x 10<sup>4</sup> células en cada pocillo de una placa de 96 pocillo revestida con colágeno I (Becton Dickinson). A 10 continuación se privaron las células de suero durante 24 horas antes de la estimulación. Se mezclaron 130 pM de β NGF humano (R&D Systems n.º de catálogo 256-GF/CF) en sobrenadantes del hibridoma diluido (para conseguir una dilución final del sobrenadante (veces) de 10 veces, 100 veces, 500 veces o 1.000 veces) y las mezclas se preincubaron durante 15 min a 37°C antes de añadirse a las células. Cada sobrenadante de hibridoma diluido se ensayó por cuadruplicado. Tras 5 min de estimulación, el medio se retiró y se sustituyó con el reactor de lisis celular SureFire™ AlphaScreen (PerkinElmer). A 15 continuación se procesaron los lisados celulares de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se cuantificaron las señales de la fluorescencia utilizando un lector de placas EnVision (PerkinElmer); en la Tabla 4 se resumen los datos de fluorescencia. El valor numérico indica la fosforilación de ERK debida a la señalización de TrkA en presencia de β NGF humano y se expresa como el porcentaje de la señal frente a la señal máxima. La señal máxima se define como el 100% de respuesta de las células que muestran la fosforilación de ERK en presencia solo de β NGF (sin sobrenadante del hibridoma). Este dato indica que algunos 20 sobrenadantes de hibridomas contenían anticuerpos neutralizantes dirigidos contra NGF.

Tabla 4: Datos del ensayo SureFire de pERK generados con sobrenadantes del mAb dirigido contra NGF

Dilución del sobrenadante (veces)	23F1				17G6				30F11				3C3			
100	5	2	4	2	2	0	1	1	5	2	2	0	5	2	5	3
1000	5	3	4	3	2	2	2	1	4	2	4	3	6	3	5	4
5000	8	7	8	8	13	7	15	8	30	26	28	25	24	25	22	23
10000	35	33	32	32	44	25	43	23	65	45	56	42	57	52	68	62

Dilución del sobrenadante (veces)	2B12				21D4				4B6				22G3			
100	0	0	-1	0	4	3	5	2	5	4	1	0	13	7	7	2
1000	0	0	0	0	5	3	5	3	1	0	2	1	3	2	4	2
5000	18	16	21	17	11	7	12	8	8	8	7	8	23	18	25	20
10000	51	43	49	41	38	23	37	23	30	34	30	35	51	45	47	43

(continuación)

Dilución del sobrenadante (veces)	2G11				14G6				16B9				19A12			
100	5	2	6	3	4	3	0	-1	3	3	3	2	2	1	2	1
1000	6	3	6	3	-1	0	0	0	65	57	70	60	3	2	3	2
5000	14	8	14	8	7	7	8	7	72	63	73	62	47	36	46	32
10000	44	30	74	48	38	36	36	36	76	62	77	62	69	55	81	65

Dilución del sobrenadante (veces)	30A1				26D5				23D7				23H2			
100	0	0	1	0	0	0	0	0	2	2	-1	0	47	41	44	44
1000	1	2	2	2	1	1	1	1	1	0	1	1	86	80	79	82
5000	40	41	42	40	37	30	35	30	59	48	56	54	85	80	85	83
10000	62	67	63	64	64	52	80	71	74	63	70	60	85	84	82	84

Dilución del sobrenadante (veces)	9E2				20B10				12H12				11D1			
100	3	3	3	4	2	1	1	1	3	3	3	2	69	75	70	78
1000	5	7	5	8	1	1	1	0	30	30	30	32	71	84	72	85
5000	37	57	36	55	20	28	19	29	62	64	60	61	76	78	80	76
10000	55	69	56	67	55	71	73	84	69	78	76	77	89	95	102	101

D. Ensayo PathHunter

5 Para determinar si los mAb dirigidos contra NGF en los sobrenadantes del hibridoma bloquearon la señalización posterior como resultado del bloqueo de la unión de NGF a TrkA, la línea de células estable PathHunter U2OS que expresa el TrkA del receptor de NGF y la proteína coactivadora SHC1 fusionada a los fragmentos complementantes de la  $\beta$ -galactosidasa se adquirió de DiscoverX. Se hicieron crecer células en medio MEM suplementado con FBS al 10%, 100 unidades/ml de penicilina/estreptomicina, L-glutamina 2 mM, 500  $\mu$ g/ml de Geneticina G418, y 250  $\mu$ g/ml de Higromicina aa 37°C en una atmósfera humidificada con un 95% de aire y un 5% de CO<sub>2</sub>. Dieciséis horas antes del ensayo, se sembraron 2 x 10<sup>4</sup> células en cada pocillo de una placa negra de volumen medio de 96 pocillos en 40  $\mu$ l de medio MEM suplementado con suero de caballo al 0,5%. Se mezclaron 440 pM de  $\beta$  NGF humano (R y D Systems n.º de catálogo 256-GF/CF) en sobrenadantes del hibridoma diluido (para conseguir una dilución final del sobrenadante de 10 veces, 100 veces, 500 veces o 1.000 veces) y las mezclas se preincubaron durante 15 min a 37°C antes de añadirse a las células. Las placas de células se incubaron durante 5 min antes de la estimulación con 10  $\mu$ l por pocillo de mezcla de NGF/anticuerpo. Después de 3 horas de inducción celular a temperatura ambiente, se añadieron 25  $\mu$ l de reactivo de detección PathHunter a cada pocillo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se detectó la señal quimioluminiscente 1 hora después usando un lector de placas TopCount (PerkinElmer); en la Tabla 5 se muestran los datos de la señal de quimioluminiscencia. El valor numérico indica la fosforilación la generación de  $\beta$ -galactosidasa debida a la señalización de TrkA en presencia de  $\beta$  NGF humano y se expresa como el porcentaje de la señal frente a la señal máxima. La señal máxima se define como el 100% de respuesta de las células que muestran la generación de  $\beta$ -galactosidasa en presencia solo de  $\beta$  NGF (sin sobrenadante del hibridoma). Este dato indica que algunos sobrenadantes de hibridomas contenían anticuerpos neutralizantes dirigidos contra NGF.

25

Tabla 5: Fatos de PathHunter generados con sobrenadantes de hibridomas

Dilución del sobrenadante (veces)	30F11		23F1		3C3		16B9		17G6		19A12	
100	21	22	5	5	16	29	19	24	10	14	25	28
1000	42	37	23	13	40	46	117	114	23	24	21	30
5000	97	99	69	70	71	81	120	127	100	115	93	92
10000	94	93	92	91	78	84	114	129	115	120	89	98

Dilución del sobrenadante (veces)	2B12		30A1		26D5		23D7		23H2		22G3	
100	89	90	21	24	83	84	31	28	142	176	16	16
1000	64	70	50	57	49	51	54	53	88	134	20	23
5000	128	127	126	139	92	96	112	131	117	120	89	99
10000	128	133	133	129	95	84	124	148	111	136	86	101

Dilución del sobrenadante (veces)	21D4		2G11		4B6		9E2		20B10	
100	9	10	22	22	24	31	102	104	6	5
1000	16	17	29	27	46	49	77	91	0	4
5000	107	100	66	72	88	94	137	152	25	31
10000	108	112	66	72	102	109	137	143	52	58

Dilución del sobrenadante (veces)	14G6		12H12		11D1		26H12		Hibridoma sin relacionar	
100	18	17	26	23	117	101	106	119	156	185
1000	27	27	46	56	127	118	124	115	136	144
5000	105	83	145	137	109	99	137	166	126	132
10000	113	109	122	145	91	98	151	167	138	137

5 **Ejemplo 3: Subclonación de hibridomas**

Se subclonaron líneas de células de hibridomas utilizando técnicas de dilución limitante normalizadas. Se diluyeron las células a una concentración de 50, 5, o 0,5 células/ml. Se sembraron en placas 200 ul de las suspensiones celulares diluidas en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos. Se incubaron las placas a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% y ~90% de humedad relativa. El crecimiento se comprobó visualmente en el día 7 para las colonias macroscópicas. Los sobrenadantes de los pocillos se cribaron para la producción de anticuerpo cuando fue visible el crecimiento de las colonias. La Tabla 6 muestra la nomenclatura de identificación de los subclones y las denominaciones. Estos datos indican que algunos anticuerpos anti-NGF podrían aislarse de una población clonal de células.

10

Tabla 6: Identificación y denominaciones de los subclones de hibridomas

Nombre del sobrenadante del hibridoma	Nombre del hibridoma subclonado	Denominación	Lote n.º
14G6	ML129-14G6.3H3	PR-1254970	1734671
2G11	ML129-2G11.3B1	PR-1254971	1734673
20B10	ML129-20B10.3F4	PR-1254972	1734675
2B12	ML129-2B12.5G9	PR-1254973	1734676
17G6	ML129-17G6.3E7	PR-1254974	1734677
21D4	ML129-21D4.4A11	PR-1254977	1734678
4B6	ML129-4B6.4H3	PR-1254978	1734679
22G3	ML129-22G3.3F3	PR-1254979	1734680
23F1	ML129-23F1.4G3	PR-1254980	1734681
14A9	ML130-14A9.5B12	PR-1254981	1734682
3F7	ML130-3F7.4A8	PR-1254982	1734683

#### Ejemplo 4: Escalado y purificación de anticuerpos monoclonales

Las líneas de células de hibridoma subclonadas se expandieron en Hibridoma SFM (Invitrogen n.º de catálogo 12045) con suero de feto de bovino bajo en IgG al 5% (Invitrogen n.º de catálogo 16250-078). Se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron y se filtraron para eliminar los desechos celulares, y se concentraron. Se mezclaron los anticuerpos con tampón de unión A Pierce (Thermo, n.º de catálogo 21001) en una relación de 1. Se cargaron los anticuerpos en una columna de cromatografía de Proteína A sefarosa recombinante (GE Healthcare, n.º de catálogo 17-1279-04), se eluyeron utilizando tampón de elución Pierce (Thermo, n.º de catálogo 21004), se neutralizaron utilizando Tris 2M pH 7,5 y a continuación se dializaron en PBS. Este trabajo permitió el aislamiento de mAb dirigidos contra NGF para los estudios de caracterización.

#### Ejemplo 5: Clonación de NGF de cánido

Se amplificó la región de codificación del NGF de cánido a partir de ADNc universal de cánido (Biochain Institute, n.º de catálogo 4734565) utilizando los cebadores de la SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46 o los cebadores de la SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48 y se clonó en un vector de expresión de mamífero o bacteriano, respectivamente. Se ajustaron las reacciones de la PCR como recomendó el fabricante (Novagen, KOD Hot Start Master Mix, n.º de catálogo 71842-3). El clon de mamífero se preparó como una proteína de fusión C-terminal 6-His ligando el producto de la PCR con el vector pTT6 (Abbott) en los sitios de restricción KpnI/XbaI. Se preparó el clon bacteriano con la secuencia pro-NGF utilizando el clon de mamífero como un molde y se ligó con pET15B (Novagen) en los sitios de restricción NdeI/XhoI. La secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos del NGF de cánido se relacionaron como la SEQ ID NO: 49 y la SEQ ID NO: 50, respectivamente. Este trabajo permitió la expresión de la proteína NGF de cánido para la purificación.

#### Ejemplo 6: Expresión de NGF de cánido

El clon NGF de cánido en el vector de expresión bacteriana se hizo crecer a 37° C durante la noche en caldo Terrific (Novagen) en cepas de E. coli hospedadoras Rosetta2 (DE3) (EMD Biosciences) en matraces de 2 l sin deflectores. Se centrifugaron las células posteriormente y la pasta celular se volvió a suspender en 100 ml de tampón de lisis (Tris 25 mM, NaCl 300 mM, glicerol al 10 %, Triton X 100 al 0,1% pH 8,0) con lisonasa y se sonicó durante 2 min en hielo. Se centrifugó la muestra a 15000 RPM y se solubilizó el aglomerado en 50 ml de Tris 25 mM, GdHCl 6 M a pH 8,0. Se centrifugó la muestra a 15000 rpm durante 30 min y se cargó el sobrenadante sobre 10 ml de resina IMAC.

##### A. cromatografía IMAC

Se preparó una columna GE-Ni FF de 10 ml. Tampón A: Tris 25 mM, GdHCl 6 M a pH 8,0, Tampón B: A + imidazol 500 mM. Se equilibró la resina y se cargó con recirculación para permitir la unión completa (~10 pasos) durante la noche a 4°C. La columna se lavó con Tampón A. La elución del lote se llevó a cabo con 40 ml de Tampón A, seguido por 30 ml de Tampón B. Se recogieron fracciones de 5 ml y se combinaron.

B. Replegado mediante dilución rápida

La fracción combinada se redujo añadiendo DTT 50 mM y se añadió EDTA a 10 mM, y se incubaron durante 1h a TA. Se acidificó la muestra añadiendo HCl 6M a pH 4,0 y se dializó en GdHCl 6M a pH 5,0 para eliminar el DTT en exceso. Se llevó a cabo el replegado diluyendo la muestra reducida/acidificada en 1 l de Tris 100 mM, Arginina 1 M, EDTA 5 mM, GSH 5 mM, GSSG 1 mM a pH 9,5 durante 4 h a 4°C. La proteína replegada se dializó frente a Tris 25 mM, NaCl 200 mM, Glicerol al 10% pH 8,0. La precipitación se clarificó mediante filtración. La muestra clarificada se concentró y diafiltró en Tris 25 mM, NaCl 200 mM, Glicerol al 10% pH 8,0 utilizando una membrana de 10K.

C. Ni-IMAC

pro-NGF replegado se cargó en un Ni-IMAC de 5 ml. Tampón A: Tris 25 mM, NaCl 300 mM, Glicerol al 10% pH 8,0. Tampón B: A + imidazol 500 mM. Se lavó la columna con Tampón A. Se recogieron fracciones de 8 ml. Se llevó a cabo la elución con un gradiente lineal de 0-100% de Tampón B. Se recogieron fracciones de 5 ml. Las muestras de cada fracción se mezclaron con NuPage SLB no reductor (Invitrogen) y se separaron en un gel NuPAGE Novex Bis-Tris Midi en un gradiente del 4-12% para el análisis. Las fracciones que contenían proteínas se combinaron y dializaron frente a Fosfato de Na 20 mM, NaCl 50 mM, Glicerol al 10% pH 7,4.

D. Digestión con tripsina

Se mezcló Pro-β NGF con tripsina en un tampón de resuspensión y se incubó en hielo durante 30 min. Se añadió inhibidor inmovilizado y se incubó durante 15 min, y a continuación se filtró.

E. Cromatografía de intercambio catiónico en sefarosa

La muestra se cargó en una columna de cromatografía de alto rendimiento de SP Sefarosa de 5 ml (GE Healthcare). Tampón A: Fosfato de sodio 20 mM, NaCl 50 mM, Glicerol al 10% pH 7,4, Tampón B: A + NaCl 1 M. La columna se lavó con Tampón A. Se llevó a cabo la elución con un gradiente lineal de 0-100% de Tampón B. Se recogieron fracciones de 5 ml. Se separaron las fracciones en un gel Criterion XT Bis-Tris Midi en un gradiente del 4-12% para el análisis. Las fracciones que contenían la proteína se combinaron, se dializaron en PBS a pH 7,4 y se concentraron.

Este trabajo dio como resultado la producción de algunos miligramos de NGF de cánido purificado para los estudios de caracterización y para los estudios de anticuerpos de cánidos dirigidos contra NGF.

**Ejemplo 7: Caracterización de anticuerpos de hibridomas subclonados y purificados**A. ELISA de unión directa a NGF de cánido

Para determinar si los mAb de ratón dirigidos contra NGF se unen a β NGF de cánido, Se revistieron placas ELISA con 50 µl/pocillo de NGF de cánido (Abbott Laboratories) a 1 µg/ml en PBS y se incubaron durante la noche a 4°C. Se lavaron las placas tres veces con tampón PBS+ Tween. Se bloquearon las placas con 200 µl/pocillo de leche al 2% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas tres veces como anteriormente. Se diluyeron los anticuerpos purificados a 0,4, 2, o 10 µg/ml. Se añadieron 50 µl de cada concentración de anticuerpo purificado a las placas. Se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas. Se añadieron 50 µl de un Fc-HRP de cabra diluido 5000 veces dirigido contra IgG de ratón (Thermo, n.º de catálogo 31439). Se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadieron 50 µl de TMB (Invitrogen, n.º de cat. 00-2023) y se detuvo la reacción utilizando 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (VWR, n.º de cat. BDH3500-1). Se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Spectromax 2E (Molecular Devices). En la Tabla 7 se muestran los resultados, y el valor numérico indica la unión de los anticuerpos de ratón dirigidos contra NGF a β NGF de cánido.

40

Tabla 7: Datos de ELISA de unión directa a NGF de cáñido utilizando mAb dirigidos contra NGF purificados

$\mu\text{g/ml}$ de Mab	PR-125497 0	PR-125497 1	PR-1254972	PR-125497 3	PR-125497 4	PR-125497 7	PR-125497 8	PR-1254979	PR-125498 0	PR-1254981	PR-1254982
10	0,530	0,497	0,154	0,905	0,552	0,552	0,579	0,683	0,491	0,610	0,208
2	0,342	0,324	0,091	0,836	0,383	0,414	0,458	0,566	0,334	0,458	0,142
0,4	0,176	0,165	0,071	0,769	0,209	0,223	0,253	0,313	0,168	0,229	0,095

B. Ensayo de potencia de la proliferación de células TF-1

TF-1 es una línea de células eritroleucémica humana que expresa TrkA humano y prolifera en respuesta a  $\beta$  NGF recombinante. Para determinar si los mAb dirigidos contra NGF purificados bloquearon la proliferación inducida por NGF, Las células TF-1 (ATCC n.º CRL-2003) se mantuvieron a 37°C y CO<sub>2</sub> 5% en medio RPMI (Gibco, n.º de cat 11875-093) que contenía GM-CSF humano recombinante a 2 ng/ml (R&D Systems, n.º de cat 215-GM) y suero de feto de bovino (FBS, Hyclone, n.º de cat SH 30070.03). GMCSF y FBS se retiraron 24 horas antes del ensayo. En el día uno del ensayo se tituló cada mAb dirigido contra NGF (concentraciones que varían de 33,3 nM a 1,7 fM) y se añadieron a una concentración fija de NGF de cánido recombinante (70 pM) y células TF-1 (2,5 x 10<sup>4</sup> células/ pocillo) en RPMI + FBS al 4% durante 72 horas. Se midió la proliferación celular utilizando Cell Titerglo (Promega, n.º de cat. G7571). En la Tabla 8 se muestran los valores de la CI<sub>50</sub> de cada mAb dirigido contra-NGF sobre la proliferación de células TF-1 inducida por NGF de cánido y los datos muestran que en presencia de 70 pM de NGF de cánido, la mayoría de los anticuerpos anti-NGF expresa potencias sub-nM, y alguno expresa potencias de menos de 50 pM.

Tabla 8: Potencia de anticuerpos de ratón dirigidos contra NGF sobre la proliferación de células TF-1 inducida por NGF de cánido

Denominación	Lote	CI <sub>50</sub> (nM)
PR-1254970	1734671	0,662
PR-1254971	1734673	1,088
PR-1254972	1734675	0,303
PR-1254973	1734676	0,039
PR-1254974	1734677	0,230
PR-1254977	1734678	0,217
PR-1254978	1734679	0,978
PR-1254979	1734680	0,288
PR-1254980	1734681	0,343
PR-1254981	1734682	0,046
PR-1254982	1734683	0,025

15 C. Ensayos de pERK celular SureFire y PathHunter

Para determinar si los mAb de ratón purificados dirigidos contra NGF bloquearon las respuestas celulares inducidas por NGF de cánido, se caracterizaron anticuerpos purificados mediante titulación en los ensayos de pERK celular SureFire (utilizando  $\beta$  NGF 128 pM de cánido en cada pocillo de ensayo) y PathHunter (utilizando NGF 441 pM de cánido en cada pocillo de ensayo) como se describe en el Ejemplo 2 Secciones C y D. Las CI<sub>50</sub> de cada mAb dirigido contra NGF sobre  $\beta$  NGF que indujeron respuestas celulares se resumen en la Tabla 9 y los datos muestran que en presencia de NGF 128 pM de cánido, todos los anticuerpos anti-NGF expresan potencias sub-nM, y algunos expresan potencias de menos de 50 pM (ensayo pERK). También, en presencia de NGF 441 pM de cánido, todos los anticuerpos anti-NGF expresan potencias sub-nM, y alguno expresa potencias de menos de 150 pM (ensayo PathHunter).

25 Tabla 9: Resumen de los datos de los ensayos pERK y del ensayo Path Hunter para los mAb dirigidos contra NGF purificados

Anticuerpo	K <sub>50</sub> (nM) de pERK SureFire	K <sub>50</sub> (nM) de PathHunter
PR-1254970	0,02711	0,3346
PR-1254971	0,04750	0,4986
PR-1254972	0,2282	0,3133
PR-1254973	0,01876	0,1428
PR-1254974	0,01561	0,2464

(continuación)

<u>Anticuerpo</u>	<u>K50 (nM) de pERK SureFire</u>	<u>K<sub>50</sub> (nM) de PathHunter</u>
PR-1254977	0,01759	0,1810
PR-1254978	0,02466	0,3559
PR-1254979	0,01627	0,2414
PR-1254980	0,01371	0,3812
PR-1254981	0,02135	0,2794
PR-1254982	0,005804	0,1505

**Ejemplo 8: Caracterización de los anticuerpos anti-NGF purificados tras la subclonación del hibridoma****A. Análisis de Espectrometría de masas (EM) y Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) sobre anticuerpos anti-NGF**

5 Los mAb de ratón dirigidos contra NGF se redujeron utilizando DTT 1M y se analizaron utilizando HPLC/EM en un espectrómetro de masas 6224 TOF y un HPLC 1200 (Agilent technologies) utilizando una columna Vydac C4, 1MMx150mm (CN n.º 214TP5115, the Nest Group) a un caudal de 50 µl/min. Tampón A: 99,9% de agua de calidad HPLC +0,1% de FA + 0,01% de TFA y tampón B: 99,9% de ACN +0,1% de FA + 0,01% de TFA. Se llevaron a cabo el equilibrio del CL y la desalación de la muestra utilizando un tampón B al 5% durante 7 min. Se llevó a cabo el gradiente de separación utilizando 30% a 50% de Tampón B durante 10 min y se llevó a cabo una etapa de lavado a un 95% de tampón B durante 10 min. Los parámetros de adquisición de TOF eran: temperatura del gas a 350C y OCT/RF a 750V. El intervalo de masa era de 600-3200 m/z y la velocidad especificada era de 1,03 espectros/s. Se usó software de análisis cualitativo (Agilent) para deconvolucionar los pesos moleculares de los anticuerpos.

15 Se analizaron los anticuerpos en un sistema Shimadzu LC-10AVP (Shimadzu Scientific). La columna SEC utilizada era una Superdex-200 10/300L (GE Healthcare). El caudal era de 0,75 ml/min y se usó UV280 para vigilar los picos. El tampón usado era Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + NaPO<sub>4</sub>92mM+ NaZ<sub>3</sub>5mM, pH 7,0. Se inyectó el anticuerpo reactivo en 10 µl (10 µg). Los marcadores de proteínas del gel en SEC eran de Bio-Rad (CN n.º 151-1901). En la Tabla 10 se resumen los resultados de EM y SEC. Estos datos determinaron que los anticuerpos derivados de hibridomas eran muy monoméricos tras la purificación. Además, se determinaron los pesos moleculares de las cadenas pesada y ligera que comprenden los anticuerpos derivados de hibridomas.

**B. Determinación del isotipo del anticuerpo**

Se determinó el isotipo de los mAb dirigidos contra NGF utilizando el Kit Zymed Mouse MonoAb-ID Kit (Invitrogen n.º de catálogo 90-6550 lote n.º 1407589). En la Tabla 10 se resumen los resultados de la isotipación. Estos datos indican que los anticuerpos de ratón IgG1/k, IgG2a/k, e IgG2b/k de murino son capaces de unir y neutralizar NGF.

25 Tabla 10: Análisis de isotipación, cromatografía de exclusión molecular y espectrometría de masas de anticuerpos anti-NGF

<u>Nombre del hibridoma</u>	<u>Denominación</u>	<u>Lote</u>	<u>Isotipo</u>	<u>% de monómero</u>	<u>Peso molecular (Dal) de la cadena ligera</u>	<u>Peso molecular (Dal) de la cadena pesada</u>
ML129-14G6.3H3	PR-1254970	1734671	IgG1 Kappa	96,9	24221,43	49479,67
ML129-2G11.3B1	PR-1254971	1734673	IgG1 Kappa	96,8	24156,26	49491,69
ML129-20B10.3F4	PR-1254972	1734675	IgG2b Kappa	99,0	24159,34	50329,24
ML129-2B12.5G9	PR-1254973	1734676	IgG2b Kappa	99,4	23539,38	51102,21
ML129-17G6.3E7	PR-1254974	1734677	IgG1 Kappa	98,8	24221,43	49479,45

(continuación)

Nombre del hibridoma	Denominación	Lote	Isotipo	% de monómero	Peso molecular (Dal) de la cadena ligera	Peso molecular (Dal) de la cadena pesada
ML129-21D4.4A11	PR-1254977	1734678	IgG1 Kappa	98,4	24221,46	49479,70
ML129-4B6.4H3	PR-1254978	1734679	IgG1 Kappa	96,7	24170,40	49533,92
ML129-22G3.3F3	PR-1254979	1734680	IgG2a Kappa	99,0	24221,42	50123,17
ML129-23F1.4G3	PR-1254980	1734681	IgG1 Kappa	99,5	24221,42	49493,95
ML130-14A9.5B12	PR-1254981	1734682	IgG1 Kappa	99,1	24180,28	50241,85
ML130-3F7.4A8	PR-1254982	1734683	IgG1 Kappa	99,4	23708,54	50289,13

**Ejemplo 9: Cinética de unión de los anticuerpos anti-NGF**

Se utilizó un análisis biomolecular de interacción de proteínas para evaluar la cinética de unión de la interacción entre los anticuerpos dirigidos contra el hibridoma de NGF purificados y  $\beta$  NGF de cánido recombinante. Los anticuerpos se capturaron utilizando la superficie de un Fc de cabra dirigido contra IgG de ratón (10000 UR) que se inmovilizó directamente a un chip CM5 utilizando un procedimiento de acoplamiento de amina de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Biacore). Un tamaño de muestra de 5  $\mu$ l de anticuerpo a una concentración de 1  $\mu$ g/ml se capturó a 10  $\mu$ l/ minuto. Se usó NGF de cánido recombinante como el antígeno. Se inyectó NGF de cánido a 75  $\mu$ l/min (intervalo de concentración: 5-0,039 nM) para los anticuerpos de ratón. La constante de asociación se vigiló durante 3,3 minutos y la constante de disociación se vigiló durante 10 minutos. Se inyectaron también simultáneamente alícuotas de NGF de cánido sobre la superficie CM de una reacción de para registrar referencia para registrar cualquier formación de unión no específica. La sensibilidad del instrumento para la reacción directa es de  $1 \times 10^7$ , de tal manera que cualquier reacción directa que sea más rápida que  $1 \times 10^7$  no se puede medir de forma precisa; la sensibilidad del instrumento para la reacción inversa es de  $1 \times 10^{-6}$ , de tal manera que cualquier reacción inversa que sea más lenta que  $1 \times 10^{-6}$  no se puede medir de forma precisa. Por lo tanto, una reacción directa que es más rápida que  $1 \times 10^7$  se registra como  $>1 \times 10^7$  y una reacción inversa que es más lenta que  $1 \times 10^{-6}$  se registra como  $<1 \times 10^{-6}$ . En la Tabla 11 se resumen los resultados del análisis de interacción de proteínas biomoleculares. Esto indica que los mAb de murino aislado dirigidos contra NGF tienen constantes de la reacción directa rápidas (de más de  $7 \times 10^6$ ) y constantes de la reacción inversa lentas (de menos de  $1 \times 10^{-3}$ ). Las KD globales de los mAb de murino dirigidos contra NGF de aproximadamente 300 pM a 0,1 pM que demuestra una unión eficaz de los anticuerpos de hibridomas dirigidos contra NGF purificados al  $\beta$  NGF de cánido recombinante.

Tabla 11: Cinética de unión de mAb dirigidos contra NGF a NGF de cánido

Anticuerpo		Reacción directa (1/Ms)	Reacción inversa (1/s)	Afinidad global (M)
lote PR-1254972: 1734675	Expt 1	$>1 \times 10^7$	$3,14 \times 10^{-3}$	$<3,14 \times 10^{-10}$
	Expt 2	$>1 \times 10^7$	$3,21 \times 10^{-3}$	$<3,21 \times 10^{-10}$
	Promedio	$>1 \times 10^7$	$3,18 \times 10^{-3}$	$<3,18 \times 10^{-10}$
lote PR-1254973: 1734676	Expt 1	$>1 \times 10^7$	$1,21 \times 10^{-4}$	$<1,21 \times 10^{-11}$
	Expt 2	$>1 \times 10^7$	$1,38 \times 10^{-4}$	$<1,38 \times 10^{-11}$
	Promedio	$>1 \times 10^7$	$1,30 \times 10^{-4}$	$<1,30 \times 10^{-11}$
lote PR-1254977: 1734678	Expt 1	$>1 \times 10^7$	$1,39 \times 10^{-4}$	$<1,39 \times 10^{-11}$
	Expt 2	$>1 \times 10^7$	$1,60 \times 10^{-4}$	$<1,60 \times 10^{-11}$
	Promedio	$>1 \times 10^7$	$1,50 \times 10^{-4}$	$<1,50 \times 10^{-11}$

(continuación)

Anticuerpo		Reacción directa (1/Ms)	Reacción inversa (1/s)	Afinidad global (M)
lote PR-1254980: 1734681	Expt 1	$>1 \times 10^7$	$2,37 \times 10^{-4}$	$<2,37 \times 10^{-11}$
	Expt 2	$>1 \times 10^7$	$2,25 \times 10^{-4}$	$<2,25 \times 10^{-11}$
	Promedio	$>1 \times 10^7$	$2,31 \times 10^{-4}$	$<2,31 \times 10^{-11}$
lote PR-1254981: 1734682	Expt 1	$8,67 \times 10^6$	$1,27 \times 10^{-4}$	$1,47 \times 10^{-11}$
	Expt 2	$7,48 \times 10^6$	$1,40 \times 10^{-4}$	$1,87 \times 10^{-11}$
	Promedio	$8,08 \times 10^6$	$1,34 \times 10^{-4}$	$1,67 \times 10^{-11}$
PR-1254982	Expt 1	$>1 \times 10^7$	$<1 \times 10^{-6}$	$<1 \times 10^{-13}$
lote: 1734683	Expt 2	$>1 \times 10^7$	$<1 \times 10^{-6}$	$<1 \times 10^{-3}$
	Promedio	$>1 \times 10^7$	$<1 \times 10^{-6}$	$<1 \times 10^{-13}$

#### Ejemplo 10: Procedimiento para identificar secuencias de anticuerpos anti-NGF de hibridomas mediante clonación y secuenciación

5 Para identificar las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los seis mAb de hibridomas subclonados que se muestran en la Tabla 11, se extrajo el ARN de cultivos de hibridomas individuales con el kit RNeasy de Qiagen (Qiagen, n.º de cat 74104). Se transcribió el ARN de forma inversa y se amplificaron secuencias de anticuerpos de ADNc utilizando el kit de la RT-PC en una etapa de Qiagen (Qiagen, n.º de catálogo 210212). Se degeneraron los cebadores directos y se diseñaron para hibridarse con las regiones variables (cebadores de la cadena pesada: 1HA, 1HB, 1HC, 1HD, 1HE, 1HF; y cebadores de la cadena ligera: 1LA, 1LB, 1LC, 1LD, 1LE, 1LF, 1LG) (EMD4 Biosciences n.º de catálogo 69896). Se degeneraron también los cebadores inversos y se fabricaron regiones constantes de gamma (cadenas pesadas) y kappa (cadenas ligeras). Se aislaron y purificaron productos de la PCR de aproximadamente 400-450 pares de bases con el kit de Extracción en gel de Qiagen (Qiagen, n.º de cat. 28706).

15 Se clonaron los productos de la PCR purificados en vectores de clonación TOPO TA (Invitrogen, n.º de cat. K4500-01SC). Se usó cada mezcla de reacción de la topoisomerasa las 10 bacterias químicamente competentes principales y se sembraron en placas en placas LB con 75 µg/ml de ampicilina y 60 µl de Bluo-Gal al 2% (Invitrogen, n.º de cat.15519-028). Se repicaron clones aislados de la placa LB para inocular 20 µl de caldo LB/100 µg/ml de carbenicilina. Se usó un µl de este minicultivo en una reacción de la PCR con cebadores M13 directos e inversos para amplificar la inserción en el vector TOPO. Se separaron los productos de la PCR en geles de agarosa al 2%; las muestras que indicaban una inserción dimensionada adecuadamente en el vector se secuenciaron usando un secuenciador de ADN modelo 3730S de Applied Biosystems. Las secuencias de ADN derivadas de la identificación de todos los dominios variables de cadena pesada y cadena ligera de los mAb de murino se tradujeron en una secuencia de proteínas y se muestran en la Figura 1 a la Figura 24.

#### Ejemplo 11: Modelización de la homología de anticuerpos de murino dirigidos contra NGF

25 Las secuencias de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de cada anticuerpo anti-NGF se importaron en InsightII (Accelrys, San Diego, CA). Se usó cada secuencia como un molde para BLAST para encontrar las estructuras cristalinas mediante rayos X del Banco de datos de proteínas (www.rcsb.org) que estaban más cercanas en identidad. Se seleccionó una estructura para cada una de las cadenas pesada y ligera basándose en el porcentaje de identidad y en la correspondencia de la longitud exacta de todos los bucles de CDR. Las secuencias de cada molde y cada secuencia buscada se alinearon y se utilizaron técnicas normalizadas de modelización de la homología para construir modelos de homología de cada cadena. A continuación se minimizó el complejo de ambas cadenas modeladas durante 50 ciclos de minimización restringida (500 Kcal/Angstrom para todos los átomos pesados) del gradiente del conjugado usando el campo de fuerza CVFF en el programa DISCOVER (Accelrys, San Diego, CA).

35 La probabilidad de que un resto de marco dado altere las propiedades de unión del anticuerpo depende de su proximidad a los restos de CDR. Por lo tanto, usando las estructuras del modelo, los restos comprendidos en 5 Å de cualquier átomo de CDR se identificaron como más importantes y se recomendaron como candidatos para la retención del resto de murino en las secuencias de anticuerpos caninizados. Un cambio en el(los) nucleótido(s) en un gen mutante que restaura la secuencia original y por tanto el fenotipo original se denomina a menudo retromutación. Por lo tanto, Los inventores se refieren a restos que son candidatos para la retención del resto de murino en las secuencias de anticuerpos caninizados como retromutaciones.

40

**Ejemplo 12: Identificación de secuencias de anticuerpos de cadena pesada y ligera de cánidos procedentes de PBMC de cánidos**

Para identificar secuencias de aminoácidos del dominio variable del anticuerpo de la secuencia pesada y la secuencia ligera lambda de Ig de cánido, se aisló el ARN procedente de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de cánido sin raza utilizando un kit RNEasy (Qiagen n.º 74104). Se transcribió de forma inversa el ARNm de PBMC de cánido (RT) con transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen n.º de catálogo 18080-093) y se amplificaron los ADNc usando el sistema 5' RACE (Amplificación rápida de los extremos del ADNc) (Invitrogen n.º 18374-058). Se describen cebadores de la RT y de la PCR (RK323, RK324, RK122, LG010, LG011, LG012) en el número de publicación de patente: US 7.261.890 B2 titulada *Methods for Using Canine Immunoglobulin Variable Domains and Caninized Antibodies*. Se usaron los cebadores RK323 y RK324 para la transcripción inversa de la IgG de cánido seguido por la PCR anidada con RK326 y el Abridged Anchor Primer (AAP) (Invitrogen). Se usó LG011 para la RT PCR de la cadena ligera lambda de cánido, seguido por la PCR anidada con LG010 y LG012 y AAP.

Los productos de la PCR resultantes se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Los productos de la PCR de 600 pares de bases (cadenas ligeras lambda y kappa de cánido) y 800 pares de bases (cadena pesada de Ig de cánido) se purificaron a partir de la agarosa utilizando un kit de extracción en gel (Qiagen n.º 28706) y se clonaron en el sitio TA de los vectores pCR2.1 TOPO utilizando el sistema de clonación TOPO-TA (Invitrogen n.º K4500-01SC). Se seleccionaron las 10 bacterias principales transformadas y se aisló el plásmido de ADN utilizando el Kit Qiaprep Spin Mini-Prep (Qiagen n.º 27104). se secuenció el ADN plásmido de las colonias de la cadenas pesada 25, la cadena ligera kappa 38 y la cadena ligera lambda 23 para identificar las secuencias de nucleótidos y aminoácidos correspondientes. Se obtuvieron los datos de la secuencia completa del dominio variable de los clones de la cadena pesada 25, la cadena ligera kappa 38 y la cadena ligera lambda 19. En las Tablas 12, 13 y 14 se muestran los datos de las secuencias del dominio variable incluyendo el péptido líder (cuando se identifica). Todas las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera derivadas son únicas en comparación con las desveladas en el número de publicación de patente: US 7.261.890 B2.

Tabla 12: Secuencias del dominio variable de la cadena pesada de cánido derivadas del ARN de PBMC de cánido

Nombre	Secuencia
Ca-1005	EVQLEESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFSIGSYGMSWVRQSPGKGLQWVAWIK YDGSRTFYADAVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYFCVKGPNSSW LPSTYFASWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO:178)
Ca-2301	EMQLVESGGDLVLRPGGSLRLSCVASGFTFSTYGMTWVRQSPGKGLQWVATIG PGGRNTYYADAVKGRFTISRDDAENTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAQAFDATY YTSFDCWGRGSLVAVSS (SEQ ID NO: 86)
Ca-2302	MESVLSWVFLVALLQGIQGEIRLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFIFGNYDM SWVRQAPGKGLQWVAARYDGSSTYYSDAVKGRITISRDDPGNTVYLQLDSL RAEDTATYYCVRGGYYSSSFYIGGAFGIHWPGTLITVSS (SEQ ID NO: 87)
Ca-2303	MECVLGWVFLVAILRGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSDYY MSWIRQAPGKGLQWVADISDGGDGTGYAGAVKGRFTVSRENVKNTLYLQMN DLRAEDTAIYYCTKAREMYGYRDFDSWGPGLTLTVSS (SEQ ID NO: 88)
Ca-2304	MESVLGLVALLTILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNYM TWVRQAPGKGLEWVGYIHNGGTYYADAVKGRFTISRDDAKNTLYLEMNS LRAEDTAVYYCGKMIFDYWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO: 89)
Ca-2305	MESALSWVFLVTILKGVQGEVLLVESGGDLVKPGGSLRLSCLTSGFTFNTYDW GWVRQAPGKGLQWIAIYIKKGSVDVRYADAVKGRFTISRDDAKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARSAWDSFDYWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO: 90)

ES 2 665 954 T3

(continuación)

Nombre	Secuencia
Ca-2306	MESVFCWVFLVAILKGVQGEVQLVESGGDLVKPAGSLRLSCVASGFTFT DYSMNWVRQAPGKGLQWVATISNDGTSTDYTDVAVKGRFTVSRDSARNTVYL QMTSLRADDATATYYCVSRIISYSLLADYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 91)
Ca-2307	MQMPWSLLCLLAAPLGVLESEVTLQESGPGLVKPSQTLSTCAVSGGSVIRNYY WHWIRQRPGRGLEWMGCWSETTYTSPAFRGRISITIDAATDQFSLHLNSMTTD DTAVYYCARALYPTSSWYDGMWYWGASVVVSS (SEQ ID NO: 92)
Ca-2308	EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVSSGFIQSQYAMNWRQAPGKGLQWVAYIG GAGFITYHADDVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLTINDTAVYYCVRSNSRIPD YWGQGTLLVAVSS (SEQ ID NO: 93)
Ca-2309	MESVFCWVFLVAILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSSVY MSWVRQAPGKGLQWVARITTDGTDTFYADAVKGRFTISRDNVKNMLYLEMN SLRAEDTATYYCGDPWQPAYPDLWGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO: 94)
Ca-2310	MESVLCWVFLVAILKGVQGEVHILVESGGDLVKPGGTLRLSCVASGFTFSQYD MSWVRQSPGKGLQWVALSRYHGGTTYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMN NSLRAEDTAVYYCVKEGSRWDLRGDYDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 95)
Ca-2311	MQMPWSLLCLLAAPLGVLESELTLQESGPGLVKPSQTLSTCVVSGGSVTSSHY WNWIRQRPGRGLEWMGYWTGNVNYNPAFQGRISIIIGDAAKNQFSLHLSMTT DDTAVYYCARCGIVAPGFLPIGDFDFWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 96)
Ca-2312	MESVFCWVFLVAILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFSFSNYFM FWGRQAPGKGLQWVARIRSDGGSTYYADAVKGRFTISRDNARNTLYLQMNLSL RAEDTATYYCAKADIKLPYRGGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 97)
Ca-2401	ESVLGWIFLATILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVSGSFTFSSSWMN WVRQAPGKGLQWIAEISGTGSSTNYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSL AEDTAMYYCARAAYYGNRNDLDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 98)
Ca-2402	KPAGSLRLSCVASGFTFSSHSVTWVRQAPGKGLQFVAGITSGGNNRYTDAVR GRFTLSRDNKNTVYLQMNLSLRAEDTAMFYFCALGSYEWLSGEFDYWGQGTLL TVSS (SEQ ID NO: 99)
Ca-2403	MESVFCWVFLVAILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTLNYYF MYWVRQAPGKGLQWVARLNSNGDSTFYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMN NSLRAEDTSMYYCAKDLIYGYTLWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 100)

ES 2 665 954 T3

(continuación)

Nombre	Secuencia
Ca-2404	MASVLSWVFLVAIVKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFIFNKYEV YWVRQAPGKGLEWVARILESGNPTYAAEAVEGRFTISRDNAMAYLQMNS LRADDTAVYYCATPSVSSTVAIDYWGQALVTVSS (SEQ ID NO: 101)
Ca-2405	MQMPWSLLCLLATPLGVLSLTLQESGPGLVKPSQTLSTCVVSRGVSVDYY WNWIRQRPGRGLEWGMHIGWSTAYNPAFQGRISITADTAQNQLSLQLRSMTT EDTAVYFCARGSSWTPSGDSWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 102)
Ca-2406	MASVLKLGFCRYCKKVSRCNXVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFIFNKYE VYWVRQAPGKGLEWVARILESGNPTYAAEAVEGRFTISRDNAMAYLQMN SLRADDTAVYYCATPSVSSTVAIDYWGQALVTVSS (SEQ ID NO: 103)
Ca-2407	MDCSWRIFLLALATGVHSEVQLVQSAAEVKKPGASVKVSKTSGYTLTDYYI HWVQQAPGTGLHWMGWIDPEXGTTDYAQKFQGXVTLTADTSTNTAYMELS GLRAEDTAVYYCARFPRSLDYGSPFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 104)
Ca-2408	MESVLCWVFLVAILKGVQGEVRLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFRNYG MSWVRQRPKGGLQWVAAIRSDGVTTYADDLKVRFVSRDDARNTLYLQNS LGAEDTAVYYCAKAPWGLYDAWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 105)
Ca-2409	MESVLSWVFLVAILQGVQGEVQVVEESGGDLVKPAGSLRLSCVASGYSISTYTM TWVRQVPKGGLQLVAGINGDGSSTYYTDAVKGRFTISRDNARNTVYLQMNSL RAEDTAMYYCLGEYSWFYYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 106)
Ca-2410	MQMPWSLLCLLAAPLGVLSLTLQESGPRLVKPSQTLSTCAVSGGSVTTTSY WSWIRQRPGRGLEWVGWYWTGTTNYSAPAFQGRISISADTAQNQFSLIHLSSVTE DTALYFCASKSASTSWYFSLFESWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 107)
Ca-2411	MESVLGLVFLLTILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSSYSM SWVRQAPGKGLQWVGIDNGGTSTYYADAVKGRFTISRDNAMNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCGRGSYGMYYWGHGTSLVSS (SEQ ID NO: 108)
Ca-2412	MESVLGLLFLVAILKGVQGEIQLVESGGDLLKPGGSLRLSCVASGFTFSGSDMN WIRQAPGKGLQWVAHITHEGIGTSYVGSVKGRFTISRDNAMNTLYLQMNDLR AEDTAMYYCAYSWNYYSFDSWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 109)

ES 2 665 954 T3

Tabla 13: Secuencias del dominio variable de la cadena ligera Lambda de cánido derivadas del ARN de PBMC de cánido

Nombre	Secuencia
Ca-1001	MTSTMAWSPLLLTLTHICTVSWAQTVLTQSPSVSAVLGRRVTISCTGSDT NIGSHRDVQWYQLVPGKSPKTLIYGTDNRPSPGIPVRFSGSKSGNSGTLTIT GIQAEDYCYCQSYDDDLNLSMNVFVGGGTHLTVLG (SEQ ID NO: 110)
Ca-1002	MDWVPFYILPFIFSTGFCALPVLTPQTNASASLEESVKLCTLSSEHSNYIV RWYQQQPGKAPRYLMYVRSRSDGSYKRGDGPVRFSGSSSGADRYLTISNIK SEDEDDYCYCGADYTISSGQYGSVFGGGTHLTVLG (SEQ ID NO:111)
Ca-1003	LWISGGSALGPTMAWTHLLLPVLTLCGTVASSVLTQPPSVSVSLGQTA TISCSGESLSKYAQAQWFQKAGQVPVLYIKDTERPSGIPDRFSGSSSGNT HTLTISRARAEDYCYCESEVSTGTVCVRRRHPSNRPRSAQGLPLGHTLP ALL (SEQ ID NO:204)
Ca-1006	MTSTMAWSPLLLTLTHCTGSWAQSFLTQPASLSGSLGQRVTISCTGSSS NIGGYSVNWLQQLPGTGPRTIYNNNSNRPSGVPDRFSGSRSGTTATLTISGL QAEDYCYCSTWDSNLRITIVFGGGTHLTVLG (SEQ ID NO: 112)
Ca-1007	MTSTMDWSPLLLTLAHCTGSWAQSFLTQPASVSGSLGQRVTISCTGSTS NLGTYNVGLWQQLVPGTGPRTVIYTNIRPSGVPDRFSGSESGSTATLTISD LQAEDAEYCYCTAWDSSLNAYVFGSGTQLTVLG (SEQ ID NO: 113)
Ca-1008	MTSNMAWCPFLLTLLAYCTGSWAQSFLTQPASVSGSLGQRVTISCSGSTN NIGIVGASWYQQLPGKAPKLLVYSDGDRPSGVPDRFSGSNSGNSDTLTITG LQAEDYCYCQSFDTLLDAAVFGGGTHLTVLG (SEQ ID NO: 114)
Ca-1009	MTSTMAWSPLLLTLAHCTVSWAQAFLTQPPSVSAALGQRVTISCTGSDT NIGSGYEVIIWYRQVPGKSPAIIIYGNSNRPSGVPVRFSGSKSGSTATLTITG IEAEDYCYCQSYDGNLDGGVFGGGTHLTVLG (SEQ ID NO: 115)
Ca-1010	MTSTMGWFPLLLTLLAHCAGSWAQSFLTQPASVSGSLGQRVTISCTGSSP NVGYGDFVAWYQQLVPGTSPRTLIYNTRSRPSGVPDRFSASRSGNTATLTIS GLQAEDYCYCSSYDNTLIGIVFGGGTHLTVLG (SEQ ID NO: 116)
Ca-1011	MTSTMGWSPLLLTLAHCTGSWAQSFLTQPASVSGSLGQRVTITCTGSSS NIGRANVAWFQQLVPGTGPRTVIYTSVKRPSGVPDRFSGSKSGSTATLTISG LQAEDYCYCSSWDNSLDAGVFGGGTHLTVLG (SEQ ID NO: 117)
Ca-1012	MTSTMGWFPLLLTLLAHSTGSWAQSFLTQPASVSGSLGQRVTITCTGGTS NIGRGFVSWFQQLVPGIGPKILIFDAYRRPSGVPDRFSGSRSGNTATLTISGL QAEDYCYCAVYDSRLDVGDFVFGSGSQLTVLS (SEQ ID NO: 118)

ES 2 665 954 T3

(continuación)

Nombre	Secuencia
Ca-1202	MTSNMAWCPFLLLTLLTYCTGSWARSVLTQPASVSGSPGQKVTIYCSGTM SDIGVLGANWYQQLPGKAPKLLVDNDGDRPSGVPDRFSASKSGHSDTLTI TGLQPEDEGDYCYCSFDSSLDAAIFGEGTHLTVLG (SEQ ID NO: 119)
Ca-1203	SVASYVLTQSPSQNVTLRQAAIITCEGIINIGTKSVIHWYQQKQGQAPVLII YDDKSRPSGIPERFSGANSNTATLTISGALAEDEADYYCLVWSSAIWV FGEGTHLTVLG (SEQ ID NO: 120)
Ca-1204	MTSTMAWSPLLLTLAHTGSWAQSFLTQPTSVSGSLGQRVTISCTASSS NIDRDYVAWYQQLPGTRPRALIYANSNRPSGVPDRFSGSKSGSTATLTISG LQAEDEADYYCSTWDNSLTYVFGSGTQLTVLG (SEQ ID NO: 121)
Ca-1205	SVASYVLTQVPSVSVNLGKTATITCEGDNVGEKYTHWYQQEYQAPVLII YEDSRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGARAEDTDYYCQVWDDSGNVF GGGTHLTVLG (SEQ ID NO: 122)
Ca-1206	MTSTMGWFPILLTLAHCAGSWAQSFLTQPASVSGSLGQRVTISCTGSDS NVGYGDSIAYGDSVAWYQQVPGTSPRTLIDVTSRPSGVPDRFSGSRSGT TATLTISGLQAEDEADYYCSSFDKTLNGLIVGGGTHLTVLG (SEQ ID NO: 123)
Ca-1207	MTSNMAWSPLLLTLAYCTGSWAQSALTQPTSVSGSLGQRVSISCSGGIH NIGSVGATWYQQLPGKAPKLLVSSDGDPSGIPDRFSGSRSGNSVTLTITG LQAEDEAEYYCQSFDSLGVHVVFGGGTHLTVLG (SEQ ID NO: 124)
Ca-1208	LCSAVGPPKTESVMTSTMGWSPLLLTLAHTGSWAQSFLTQPASVSGSL GQRVTIPCTGSSSNIDRYNVAWFQQLPGTGPKPSSIVLLTDPQGLIDSLAP SQAA (SEQ ID NO:205)
Ca-1209	MTSTMAWFPLLLTLAHTGWARSDLTQPASVSGSLGQRITISCTGSSSN IGRNYVGWYQQLPGRGPRTVVYGINSRPSGVPDRFSGSKSGSTVTLTISGL QAEDEADYYCSTWDDSLSVVFGGGTHLTVLG (SEQ ID NO: 125)
Ca-1210	MTSTMGWSPLLLTLTHWTGSWAQSFLSQPASMSGSLGLRITICCTGKNSN INNSYVDWNQPLAGTGPRTVIHDDGDRPSGVPDQFSGSKSGNTATLTISRL QAEDEADYNGASFETSFNAVFGGGTHVTVLG (SEQ ID NO: 126)

ES 2 665 954 T3

Tabla 14: Secuencias del dominio variable de la cadena ligera Kappa de cánido derivadas del ARN de PBMC de cánido

Ca Ka016-A1	LSWLRQKPGHSPQRLIHQVSSRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRVEADDGGV YYCGQGSQSIPTFG QGTKVEIKR (SEQ. ID NO. 127)
Ca Ka016-A2	MRFPSQLLGLLMLWIPGSAGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLHNS GNTYLYWFRQKPGQSPQRLIYKVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVE DDAGVYYCGQVIQDPWTFGVGKLELKR (SEQ. ID NO. 128)
Ca Ka016-A3	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQTLLYSN GKNYLFWYRQKPGQSPQRLIDLASNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEA DDAGVYYCGQGMEIPWTFGAGTKVELKR (SEQ. ID NO. 129)
Ca Ka016-A4	MKFPSLLLGLLMLWIPGSTGEAVMTQTPLSLAVTPGEVATISCRASQSLHSD GKSYLNWYLQKPGQTPRPLIYEASKRFSGVSDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAE DVGVIYCYQSLIHFPTFGPGTKVELKR (SEQ. ID NO. 130)
Ca Ka016-A5	PDRFSGSGSGTDFTLTISRVEADDAGIYYCGQATQTPPTFGAGTKLDLKR (SEQ. ID NO. 131)
Ca Ka016-A6	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVRPGESASISCKASQSLHSG GGTYLNWFRQKPGQSPQRLIYEVSKRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRITRVEA DDTGIIYCYGQNTQLPLTFGQGTKVEIKR (SEQ. ID NO. 132)
Ca Ka016-A7	MRFPSQLLGLLMLWIPGSTGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLHNS GNTYLFWLRQKPGQSPQRLIYRVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEA DDAGVYYCGQVRSPWTFGAGTKVEVKR (SEQ. ID NO. 133)
Ca Ka016-A8	MRFPSQLLGLLMLWIPGSAGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLHNS GNTYLYWFRQKPGQSPQRLIYKVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVE DDAGVYYCGQVIQDPWTFGVGKLELKR (SEQ. ID NO. 134)
Ca Ka016-A9	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDVMAQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLHNS GNTFLFWFRQKPGQSPQRLINFLSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRINRVEAD DAGLIYCYGQGLQAPLTFGQGTKLEIKR (SEQ. ID NO. 135)
Ca Ka016-A10	MRFPSQLLGLLMLWIPGSNGDDVLTQTPLSLSVRPGETVSILCKASESLLHSD GNTYLSWVRQKAGQSPQRLMYRVSDRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISGVE ADDAGIYYCGQATHYPLEFGQGRVEIKR (SEQ. ID NO. 136)
Ca Ka016-A11	LMLWIPGSTGEIVLTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLHNPNGVTYLYWFRQ KPGQSPQRLIYKVSNRDPGVPDRFSGSGSEIDFTLIISRVEADDGGIYYCGQGI QNPFTFGQGTKLEIKR (SEQ. ID NO. 137)

(continuación)

Ca Ka016-A12	MRFPSQLLGLLMLWIPGSIGDIVMTQTPLSLSVSPGESASISCKASQSLHNSG NTYLYWFRQKPGHSPQRLIHQVSSRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAD DAGLYYCGQGTQFPFTFGQGTKVEIKR (SEQ. ID NO. 138)
Ca Ka016-B1	MRFPSQLLGLLMLWIPGSIGDIVMTQTPLSLSVSPGESASISCKASQSLHNSG NTYLYWFRQKPGH SPQRLIHQVSSRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGLYYCGQGTQFP FTFGQGTKVEIKR (SEQ. ID NO. 139)
Ca Ka016-B2	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLHNS GNTYSFWFRQKPGQSPQRLINLVSSRGPVDRFSGSGSGTDFTLISRVEAD DAGVYYCGHGKEAPYTFSSQGTKLEIKR (SEQ. ID NO. 140)
Ca Ka016-B3	MRFPSQLLGLLMLWIPGSVGDIVMTQSPMSLSVGPGESASMSCKANQSLLYS DGITYLSWFLQRPQSPQRLIYEVSKRDTGVPGRFIGSGAGTDFTLRISRVEA DDAGVYYCGQALQFPLTFSQGAKEIER (SEQ. ID NO. 141)
Ca Ka016-B4	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDVVMVTQTPLSLSVRPGETASISCRASQSLLISS GITKLFWYRQKPGQSPQRLVYWVSNRDPGVPDRFTGSGSGTDFTLRISRLEA DDAGIYYCGHAIGFPLTFGQGTKVEIKR (SEQ. ID NO. 142)
Ca Ka016-B5	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVRPGESASISCKASQSLHNSG GGTYLNWFRQRPQSPQRLIYEVSKRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRITRVEA DDTGIIYCGQNTQFPLTFGQGTKVEIKR (SEQ. ID NO. 143)
Ca Ka016-B6	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGGIVMTQTPLSLSVRPGETASISCRASQSLLYSD GNTYLFWFRQKPGQSPQRLMYRVSDRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISGVEA DDAGIYYCGQATIYPLEFGQGTXVEIKR (SEQ. ID NO. 144)
Ca Ka016-B7	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVRPGESASISCKASQSLHNSG GGTYLNWFRQRPQSPQRLIYEVSKRDTGVPDRFIGSGAGTDFTLRISRVEA DDAGVYYCGQGVQGPWTIGAGTKLELQR (SEQ. ID NO. 145)
Ca Ka016-B8	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSVSVSPGETASISCKASQSLSHD GNTYLIHWFRQKPGQSPQRLIYKVSNRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA DDTGVIYCGQITQDPFTFGQGTKLEIKR (SEQ. ID NO. 146)
Ca Ka016-B9	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLHNS GNTYLFWFRQKPGQSPQRLINWVSNRDPGVPDRFGGSGSGTDFTLRISRVEA DDAGIYYCGQIQGPYTFSSQGTKLEIKR (SEQ. ID NO. 147)

ES 2 665 954 T3

(continuación)

Ca Ka016-B10	MRFPSQFLGLLMLWIPGSSGDIAMTQTPLSLSVGPGETASITCKASQSLLSN GNTYLFWFRQKPGQSPQRLIYLVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRVEAD DAGIYYCGQATQTPPTFGAGTKLDLKR (SEQ. ID NO. 148)
Ca Ka016-B11	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMAQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLSHSD GRTCLSWFRQKSGQSPQRLIYEVSNRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAD DTGIYYCGQTVQFPLTFGQGTKLEIKR (SEQ. ID NO. 149)
Ca Ka016-B12	GQSPQRLIYKVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEPEDVGVYYCGQGT LNPWTFGAGTKVELK R (SEQ. ID NO. 150)
Ca Ka017-1	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDVVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLLSN GNTFLFWFRQ*PGQSPQRLINFSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAD DAGIYYCGQGLLAPPTFGQGTKVEIRR (SEQ. ID NO. 151)
	NOTA: * INDICA UN CODÓN DE TERMINACIÓN
Ca Ka017-2	MRFPSQLLGLLMLWIPGSGGDIVMTQTPPSLSVSPREPASISCKASQSLLSN GNTYLYWFRQKPGQSPEGLIYRVSNRFTGVSDRFSGSGSGTDFTLRISTVEAD DAGVYYCGQATQFPSTFSQGTKLEIKR (SEQ. ID NO. 152)
Ca Ka017-3	MRFPSQLLGLLMLWIPGSXGDIVLTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLIISNG ITYLNWYRQRPGQSPQXLIYKVSNRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRXSKVEAD DTGIYYCGQDTQFPLTLGXGTHXEIKR (SEQ. ID NO. 153)
Ca Ka017-5	MRFPSQLLGLLMLWIPGSTGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASIYCKASQSLLSN GKTFLYWFRQKPGQS PQRLIYRVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGIYYCGQIQDPT FGQGTKVEIKR (SEQ. ID NO. 154)
Ca Ka017-6	MRFPSQLLGLLMLWIPGSGGDIVMTQTPPSLSVSPREAASISCKASQSLLSN GNTYFYWFRQKPG QVSEGLIYKVSSRFTGVSDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVYFCGQALQF PYTFSQGTKLDIKR (SEQ. ID NO. 155)
Ca Ka017-10	MRFPSQLLGLLMLWIPESGGDVVLTQTPPSLSLSPGETASISCKASRSLLSND GSTYLDWYLQKPGQSPRLIYLVSNRFSGVSDRFSGSGSGTDFTLTISRVEAD DAGVYYCGQGSRVPLTFGQGTKVEIKR (SEQ. ID NO. 156)

ES 2 665 954 T3

(continuación)

Ca Ka017-11	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLLRN GITYLSWFRQRPGQSP QRLINLVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDVGVYYCGHGLQTPY TFGQGTSLIEIER (SEQ. ID NO. 157)
Ca Ka017-12	MRFPSQLLGLLVLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETVSISCRASQSLLYSDG NIYLFWFRRKPGQSP QHLINLVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVYYCGQGTQPPY TFSQGTKVEIKR (SEQ. ID NO. 158)
Ca Ka017-13	MRFPSQLLGLLMLWIPESGGDVVLTQTTPSLSLSPGETASISCKASRLLNSD GSTYLDWYLQKPGQS PRLIYLVSNRFGVSDRFSGSGSGTDFTLTISRVEADDAGVYYCGQGSRVPL TFGQGTKVEIKR (SEQ. ID NO. 159)
Ca Ka017-14	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMAQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLLSHN GITYLFWYRQKPGQS PQRLISMVFNDRPGVPDRFGGSGSGTDFTLRISRVEADDAGLYFCGHGTQIPY SFSQGTKLEIKR (SEQ. ID NO. 160)
Ca Ka017-16	MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSISPGEPASISCKASQSLLSHGG DTYLNWFRQRPGQS PQLLINRVSSRKKGVDPDRFSGSGSGTEFTLRISRVEADDAGIYFCGQGTQFPY TFSQGTKLEIKR (SEQ. ID NO. 161)
Ca Ka017-20	MRFPSQLLGLLMLWIPGSGGDIVMTQTTPSLSVSPGEPASMSCKASQSLLSHN GNTYLYWFRQKP GQSPEALIYKVSNRFTGVSDRFSGSGSGTDFTLRINRVEADDVGVYYCGQGI QIPYTFGQGTKLEIKR (SEQ. ID NO. 162)
Ca Ka017-23	MRFPSQLLGLLMLWIPGSTGEIVLTQTPLSLSVSPGESASISCKASQSLLYSNG NTYLYWFRQKAGQSP QRVIYRVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISSEVENDDAGVYYCGQGSSEDP TFGAGTKVELKR (SEQ. ID NO. 163)
Ca Ka017-24	MRFPSQLLGLLTLWIPGSTGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLSHNG NTYLYWFRQKPGQS PQRLIYKVSNRDPGVXRFSGSGSGTDFTLRVSVXVEADDAGVYYCGQGVQD PFTFGQGTKLEIKR (SEQ. ID NO. 164)

**Ejemplo 13: Injerto de CDR para crear anticuerpos monoclonales caninizados**

Para generar secuencias de anticuerpos caninizados de anticuerpos de ratón dirigidos contra NGF, cada secuencia génica de anticuerpo de cadena pesada variable de murino se alineó por separado frente a las secuencias de cadena pesada variable de la línea germinal 36 de Ig de cánido utilizando el software Vector NTI. Se derivaron once secuencias de cadena pesada variable de la línea germinal de Ig de cánido a partir de la patente de Estados Unidos n.º 7.261.890 B2, (*Methods for Using Canine Immunoglobulin Variable Domains and Caninized Antibodies*), y las secuencias de cadena pesada variable de la línea germinal 25 de Ig de cánido se derivaron de la Tabla 12 (Secuencias del dominio variable de la cadena pesada de cánido derivadas de ARN de PBMC de cánido). Cada secuencia génica de la cadena ligera variable de murino se alineó por separado frente a las secuencias de la cadena ligera variable de la línea germinal 68 (derivadas de la patente de Estados Unidos n.º 7.261.890 B2) utilizando el software Vector NTI. Las secuencias del dominio variable de cánido que tienen la homología global más alta con las secuencias de murino originales se seleccionaron para cada secuencia de cadena pesada y cadena ligera para proporcionar la secuencia del marco. Se llevó a cabo *in silico* la construcción de anticuerpos completos injertados a la CDR mediante sustitución de las secuencias de la CDR del dominio variable de cánido con secuencias de CDR de murino (derivadas de los mAb de hibridoma del anticuerpo anti-NGF subclonado). Para identificar los restos en cada secuencia, el primer aminoácido en cada secuencia relacionada se definió como 1 y todos los restos que permanecían se numeraron de forma consecutiva posteriormente utilizando el sistema de numeración de Kabat.

Las secuencias de la CDR de cadena pesada de PR-1254972 se injertaron *in silico* sobre 894 de cánido del siguiente modo: (1) se encontró un modelo de glicosilación unido a N (N-{P}-S/T) en estas construcciones propuestas. (2) Se introdujeron seis retromutaciones (Q3H, V37I, Q46E, D73N, T77N, R83K) para fabricar la secuencia 72.2 VH. (3) Podrían introducirse una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis de las retromutaciones desveladas anteriormente en 72.2 VH para mantener la afinidad del anticuerpo con NGF tras la caninización del mAb 72.2. (4) Pueden sustituirse una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis de estas retromutaciones durante la maduración por afinidad posterior de 72.2 VH. Se generó 72.3 VH introduciendo las retromutaciones en 72.2 VH con la adición de la retromutación H39Q. Se generó 72.4 VH introduciendo las retromutaciones Q3H, H39Q, Q46E, D73N. Las secuencias de la CDR de cadena ligera de PR-1254972 se injertaron *in silico* sobre 1001 de cánido del siguiente modo: (1) No se encontró modelo de glicosilación unido a N (N-{P}-S/T) en estas construcciones propuestas. (2) Se introdujeron cuatro retromutaciones (I2V, V3L, Q45K, S59P) para fabricar la secuencia 72.2 VL. (3) Podrían introducirse una, dos, tres, o cuatro de estas retromutaciones en 72.2 VL para mantener la afinidad del anticuerpo con NGF tras la caninización del mAb 72.2. (4) Pueden sustituirse una, dos, tres, o cuatro de estas retromutaciones durante la maduración por afinidad posterior de 72.2 VL. Se generó 72.4 VL introduciendo las retromutaciones Q45K, e S59P.

Las secuencias de la CDR de cadena pesada de PR-1254973 se injertaron *in silico* sobre 894 de cánido del siguiente modo: (1) No se encontró modelo de glicosilación unido a N (N-{P}-S/T) en estas construcciones propuestas. (2) Se introdujeron ocho retromutaciones (T24A, M48I, V67A, L69V, T73K, N76S, V78A, A93T) para fabricar la secuencia 73.2 VH. (3) Podrían introducirse una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho de estas retromutaciones en 73.2 VH para mantener la afinidad del anticuerpo con NGF tras la caninización del mAb 73.2. (4) Pueden sustituirse una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, u ocho de estas retromutaciones durante la maduración por afinidad posterior de 73.2 VH. Se generó 73.4 VH introduciendo las retromutaciones T24A, T73K, A93T. Las secuencias de la CDR de cadena ligera de PR-1254973 se injertaron *in silico* sobre 1034 de cánido del siguiente modo: (1) No se encontró modelo de glicosilación unido a N (N-{P}-S/T) en estas construcciones propuestas. (2) Se introdujeron ocho retromutaciones (I1D, V3Q, S22T, F36H, R46L, I48V, D60S, D70Q) para preparar la secuencia 73.2 VL. (3) Podrían introducirse una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, u ocho de estas retromutaciones en 73.2 VL para mantener la afinidad del anticuerpo con NGF tras la caninización del mAb 73.2. (4) Pueden sustituirse una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, u ocho de estas retromutaciones durante la maduración por afinidad posterior de 73.2 VL. Se generó 73.4 VL introduciendo las retromutaciones I1D, V3Q, F36H, R46L, D60S, D70Q.

Las secuencias de la CDR de cadena pesada de PR-1254977 se injertaron *in silico* sobre 894 de cánido del siguiente modo: (1) No se encontró modelo de glicosilación unido a N (N-{P}-S/T) en estas construcciones propuestas. (2) Se introdujeron ocho retromutaciones (T24A, Q38K, M48I, R66K, V67A, T68S, L69I, V78A) para fabricar la secuencia 77.2 VH. (3) Podrían introducirse una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, u ocho de estas retromutaciones en 77.2 VH para mantener la afinidad del anticuerpo con NGF tras la caninización del mAb 77.2. (4) Pueden sustituirse una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho de estas retromutaciones durante la maduración por afinidad posterior de 77.2 VH. Se generó 77.3 VH introduciendo las retromutaciones en 77.2 VH con la adición de la retromutación R94G. Se generó 77.4 VH introduciendo las retromutaciones T24A, Q38K y R94G. Las secuencias de la CDR de cadena ligera de PR-1254977 se injertaron *in silico* sobre 997 de cánido del siguiente modo: (1) No se encontró modelo de glicosilación unido a N (N-{P}-S/T) en estas construcciones propuestas. (2) Se introdujeron cuatro retromutaciones (L2V F36Y, R46L, S98G) para fabricar la secuencia 77.2 VL. (3) Podrían introducirse una, dos, tres, o cuatro de estas retromutaciones en 77.2 VL para mantener la afinidad del anticuerpo con NGF tras la caninización del mAb 77.2. (4) Pueden sustituirse una, dos, tres, o cuatro de estas retromutaciones durante la maduración por afinidad posterior de 77.2 VL. Se generó 77.4 VL introduciendo las retromutaciones F36Y y R46L.

Las secuencias de la CDR de cadena pesada de PR-1254981 se injertaron *in silico* sobre 876 de cánido del

siguiente modo: (1) No se encontró modelo de glicosilación unido a N (N-{P}-S/T) en estas construcciones propuestas. (2) Se introdujeron seis retromutaciones (Q46E, G49A, T77N, R83K, L91Y, E93T) para fabricar la secuencia 81.2 VH. (3) Podrían introducirse una, dos, tres, cuatro, cinco o seis en 81.2 VH para mantener la afinidad del anticuerpo con NGF tras la caninización del mAb 81.2. (4) Pueden sustituirse una, dos, tres, cuatro, cinco o seis de estas retromutaciones durante la maduración por afinidad posterior de 81.2 VL. Se generó 81.4 VH introduciendo las retromutaciones Q46E, G49A, L91Y y E93T.

Las secuencias de la CDR de cadena ligera de PR-1254981 se injertaron *in silico* sobre 1011 de cánido del siguiente modo: (1) No se encontró modelo de glicosilación unido a N (N-{P}-S/T) en estas construcciones propuestas. (2) Se introdujeron cuatro retromutaciones (V3L, A7T, F36Y, R46L) para fabricar la secuencia 81.2 VL. (3) Podrían introducirse una, dos, tres, o cuatro de estas retromutaciones en 81.2 VL para mantener la afinidad del anticuerpo con NGF tras la caninización del mAb 81.2. (4) Pueden sustituirse una, dos, tres, o cuatro de estas retromutaciones durante la maduración por afinidad posterior de 81.2 VL. Se generó 81.4 VL introduciendo las retromutaciones A7T, F36Y y R46L.

Como alternativa, Las secuencias de la CDR de cadena pesada de PR-1254981 VH se injertaron *in silico* sobre 1005 VH de cánido del siguiente modo: (1) No se encontró modelo de glicosilación unido a N (N-{P}-S/T) en estas construcciones propuestas. (2) Se introdujeron siete retromutaciones (Q46E, T77N, F79Y, R83K, F91Y, V93T, K94R) para fabricar la secuencia 81.5B VH. (3) Podrían introducirse una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete de estas retromutaciones en 81.5B VH para mantener la afinidad del anticuerpo con NGF tras la caninización del mAb 81.5B. (4) Pueden sustituirse una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o siete de estas retromutaciones durante la maduración por afinidad posterior de 81.5B VH. Se generó 81.6B introduciendo las retromutaciones Q46E, F79Y, F91Y y V93T. Se generaron las variantes 81.2B y 81.4B introduciendo la mutación A84K en 81.5B y 81.6B, respectivamente.

Las secuencias de la CDR de cadena pesada de PR-1254982 se injertaron *in silico* sobre 892 de cánido del siguiente modo: (1) No se encontró modelo de glicosilación unido a N (N-{P}-S/T) en estas construcciones propuestas. (2) Se introdujeron doce retromutaciones (I3Q, I37V, M48L, I67L, T70S, A71K, G73N, N76S, H77Q, L78V, S79F, T93A) para fabricar la secuencia 82.2 VH. (3) podrían introducirse una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, o doce de estas retromutaciones en 82.2 VH para mantener la afinidad del anticuerpo con NGF tras la caninización del mAb 82.2. (4) Pueden sustituirse una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, o doce de estas retromutaciones durante la maduración por afinidad posterior de 82.2 VH. Se generó 82.4 VH introduciendo las retromutaciones I3Q, A71K, H77Q, S79F y T93A. Las secuencias de la CDR de cadena ligera de PR-1254982 se injertaron *in silico* sobre 1034 de cánido del siguiente modo: (1) No se encontró modelo de glicosilación unido a N (N-{P}-S/T) en estas construcciones propuestas. (2) Se introdujeron diez retromutaciones (I1D, V3Q, S22T, F36Y, Q45K, R46L, D60S, F71Y, T72S, Y87F) para fabricar la secuencia 82.2 VL. (3) Podrían introducirse una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o diez de estas retromutaciones en 82.2 VL para mantener la afinidad del anticuerpo con NGF tras la caninización del mAb 82.2. (4) Pueden sustituirse una, dos, tres, cuatro cinco, seis, siete, ocho, nueve, o diez de estas retromutaciones durante la maduración por afinidad posterior de 82.2 VL. Se generó 82.3 VH introduciendo las retromutaciones en 82.2 VH con la adición de la retromutación P44V. Se generó 82.4 VL introduciendo las retromutaciones I1D, V3Q, F36Y, Q45K, R46L, D60S, F71Y y Y87F.

#### Ejemplo 14: Punto isoeléctrico de aminoácidos del marco de cánido

Los aminoácidos del marco de la cadena pesada (es decir, aminoácidos sin CDR) de los anticuerpos de la kappa de IgG1 caninizados dieron como resultado un punto isoeléctrico calculado de menos de 8,0. Los aminoácidos del marco de la cadena ligera, cuando la cadena ligera es kappa, dieron como resultado un punto isoeléctrico calculado de menos de 6,5. el punto isoeléctrico de los anticuerpos caninizados como un completo, es decir, las cadenas pesada y ligera combinadas, debido a los aminoácidos del marco, y cuando la cadena ligera es kappa, es menor de 8,0. En comparación, los aminoácidos del marco de las cadenas pesadas de la IgG1 humana dan como resultado normalmente puntos isoeléctricos de más de 8,0. Los aminoácidos del marco de las cadenas ligeras kappa humanas dan como resultado normalmente puntos isoeléctricos de más de 6,5. Los aminoácidos del marco de los anticuerpos de la IgG1/k humana completa dan como resultado puntos isoeléctricos de más de 8,0.

#### Ejemplo 15: Injerto de CDR para crear anticuerpos monoclonales humanizados

La secuencia génica de cada anticuerpo de cadena pesada variable y cadena ligera variable de murino (como se muestra en la Tabla 14) se alineó por separado frente a la cadena pesada variable de la línea germinal 44 de la inmunoglobulina humana o las secuencias de la cadena ligera variable de la línea germinal 46 derivadas en el sitio web de Ig BLAST de la NCBI, que es bien conocido por los expertos en la materia) utilizando el software Vector NTI. Las secuencias del dominio variable de cánido que tienen la homología global más alta con las secuencias de murino originales se seleccionaron para cada secuencia de cadena pesada y cadena ligera para proporcionar las secuencias 1, 2 y 3 del marco (FW) a fin de injertar la CDR. La identificación de una región FW4 de la cadena pesada y la cadena ligera variable humanas adecuada (conocida también como la región de "unión") se llevó a cabo alineando por separado cada región FW4 de la cadena pesada y la cadena ligera de murino con las secuencias de la cadena ligera de unión a la línea germinal 5 y la cadena pesada de unión a la línea germinal 6 de la inmunoglobulina

5 humana. La construcción *In silico* de dominios variables completos injertados a la CDR se llevó a cabo mediante sustitución de las secuencias de la CDR del dominio variable humano (derivadas del sitio web de la NCBI) con las secuencias de la CDR de murino (derivadas de los anticuerpos de murino) con adición de una región FW4 (derivada del sitio web de la NCBI) en cada extremo 3'. Se puede llevar a cabo la humanización adicional mediante la identificación de las retromutaciones. Las Ig humanas de longitud completa pueden producirse expresando los dominios variables de cada mAb injertado con la CDR con un dominio constante de la IgG humana en marco. Las CDR de mAb de ratón dirigidos contra NGF injertadas sobre marcos de Ig humana (Ab injertado a CDR dirigido contra NGF) producidas son aquellas relacionadas en la Tabla 15.

10 Tabla 15: CDR de mAb de ratón dirigidas contra NGF humanizadas mediante el injerto de la CDR sobre marcos de la Ig humana

Nombre	Secuencia (Las CDR están subrayadas)
HU72 VH (CDR-GRAFT VH3-13/JH5)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMFVWRQATGKGLE WVSTISDGGSYTTYTDNVKGRFTISRENAKNSLYLQMNSLRAGDT AVYYCARDWSDSEGFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 165)
Hu73 VH (CDR-GRAFT VH1-18/JH6)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGL EWMGRIDPYGGGTKIINEKFKRRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTA VYYCARSGYDYFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 166)
HU77 VH (CDR-GRAFT VH1-69/JH6)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYIYWVRQAPGQGLEW MGRIDPANGNTIYASKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARYGYYAYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 167)
HU80 VH (CDR-GRAFT VH1-18/JH6)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIYWVRQAPGQGLE WMGRIDPANGNTIYASKFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAV YYCARYGYYAYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 168)
HU81 VH (CDR-GRAFT VH3-15/JH1)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNHMYWVRQAPGKGLE WVGSISDGGAYTFYPDTVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAV YYCTTEESANNGFAFWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 169)
HU82 VH (CDR-GRAFT VH2-26/JH6)	QVTLKESGPVLVKPTETLTLCTVSGFSLTGYNINWIRQPPGKALEWL AMIWGYGDTDYNALKSRLTISKDTSKSQVLTMTNMDPVDATYY CARDIHYGGNDWYFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 170)
HU72 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)	DIVMTQTPLSLPVTPEPASISCRSSQSIVQSNGNTYLEWYLQKPGQSP QLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGS HVPFTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO: 171)
HU73 VL (CDR-GRAFT L22/JK2)	DIQMIQSPSFLSASVGDVSIICRASENIYSFLAWYLQKPGKSPKLFYN ANTLAEGVSSRFSGRGSGTDFTLTHSLKPEDFAAYYQCIIIFGTPFTFG QGTKLEIKR (SEQ ID NO: 172)
HU77 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)	DIVMTQTPLSLPVTPEPASISCKSTKSLNLDGFTYLDWYLQKPGQSP QLLIYLVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFESNY LFTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO: 173)

(continuación)

Nombre	Secuencia (Las CDR están subrayadas)
HU80 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)	DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCKSTKSLNNGDGFTYLDWYLQKPGQSP QLLIYLVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCFESNY LFTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO: 174)
HU81 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)	DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSILISNGNTYLEWYLQKPGQSP QLLIYRVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCFQGA IIVPFTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO: 175)
HU82 VL (CDR-GRAFT 08/JK2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDITNYLNWYQKPGKAPKLLI YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQOGKTLPRTF GQGTKLEIKR (SEQ ID NO: 176)

**Ejemplo 16: Procedimiento para construir anticuerpos e ratón/cánido de longitud completa y anticuerpos caninizados**

5 utilizando técnicas de biología molecular convencionales, se obtuvo un fragmento de ADNc que codificaba la región constante de la IgG1 de cánido (que se obtuvo del IMGT®, el sistema de información internacional ImMunoGeneTics, que es la referencia global en inmunogenética e inmunoinformática, creado por Marie-Paule Lefranc (Université Montpellier 2 y CNRS)) se sintetizó y se ligó al extremo 3' de cada uno de los dominios variables de la cadena pesada derivados de anticuerpos monoclonales de murino dirigidos contra NGF PR-1254972, PR-1254973, PR-1254977, PR-1254981, PR-1254982. Para estos mismos mAb dirigidos contra NGF, se sintetizó un  
10 fragmento de ADNc que codificaba la región constante kappa de cánido obtenido a partir de la patente de Estados Unidos n.º 5.852.183A, (Secuencia ID n.º 54) y se ligó al extremo 3' de cada uno de los dominios variables de la cadena ligera. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del dominio constante completo de la cadena pesada de la IgG de cánido se muestran como la SEQ ID NO: 51 y la SEQ ID NO: 52, respectivamente. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del dominio constante completo de la cadena ligera kappa  
15 de cánido se muestran como la SEQ ID NO: 53 y la SEQ ID NO: 54, respectivamente. Los ADNc quiméricos completos de la cadena pesada y la cadena ligera se ligaron en el plásmido de expresión pHybE; las secuencias de estos mAb quiméricos están en la Tabla 15A siguiente.

Tabla 15A: Secuencias de anticuerpos quiméricos de ratón/cánido

Nombre	Secuencia (las CDR están subrayadas)
secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de PR-1290646	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVQSNNGNTYLEWYLQKPGQS PKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISREAEDLGVVYCFQGSII VPFTFGSGTKLEIKRNDAQPAVYLFQPSPDQLHTGSASVVCLLNSFYPK DINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYLSSTLTMSSTEYLSHIEL YSCEITTIKSLPSTLIKSFQRSECQRVD (SEQ ID NO:194)

(continuación)

Nombre	Secuencia (las CDR están subrayadas)
secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de PR-1290646	<p>EVHLVESGGGLVKPGGFLILSCAASGFTFS<u>DYYME</u>WIRQTPGKRLEWV  <u>ATISDGGSYTYTYTDNVKGRFTIS</u>RDNVKNLQMSHLKSADTAMYY            CARD<u>WSDSEGFAY</u>WGQGLVTVSAASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTV            ALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLHSLSSMVTV            PSSRWPSETFTCNVVHPASNTKVDKPVFNECRCTDTPPCPVPEPLGGPS            VLIFPPKPKDILRITRTPVTCVLDLGGREDPEVQISWFVDGKEVHTAK            TQSREQQFNGTYRVVSVLPIEQDWLTGKEFKCRVNHIDLPSPIERTIS            KARGRAHKPSVYVLPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNQ            QQEPERKHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMH            ETLQNHYTDLSSLHSPGK (SEQ ID NO:195)</p>
secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de PR-1290654	<p>DIQMTQSPASLSASVGETVTVTCRASENIYSFLAWIIQQKQGKSPQLLV  <u>YNANTLAEGVPSRFS</u>SGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYCYQHFGTPTF            FSGGKLEIKRNDAPAVYLFQSPDQLIITGSASVCLLNSFYPKDIN            VKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYLSSTLTMSSTEYLSHIELYSC            EITHKSLPSTLIKSFQR SECQRVD (SEQ ID NO:196)</p>
secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de PR-1290654	<p>QVQLQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMHWVKQRPGQGL  <u>EWIGRIDPYGGG</u>TKHNEKFKRKATVTADKSSSTAYILLSSLTSEDSAV  <u>YYCTRSGYDYYFDV</u>WGTTTVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTV            ALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLHSLSSMVTV            PSSRWPSETFTCNVVHPASNTKVDKPVFNECRCTDTPPCPVPEPLGGPS            VLIFPPKPKDILRITRTPVTCVLDLGGREDPEVQISWFVDGKEVHTAK            TQSREQQFNGTYRVVSVLPIEQDWLTGKEFKCRVNHIDLPSPIERTIS            KARGRAHKPSVYVLPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNQ            QQEPERKHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMH            ETLQNHYTDLSSLHSPGV (SEQ ID NO:197)</p>
secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de PR-1290656	<p>DVVLTTQPLSLPVNIGDQASISCKSTK<u>SLLNGDGFTYLD</u>WYLQKPGQS            PQLLIYLVSNRFSGVPDRFSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFESN  <u>YLFT</u>FGSGTKLEMKRNDAQPAVYLFQSPDQLIITGSASVCLLNSFY            KDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYLSSTLTMSSTEYLSHE            LYSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD (SEQ ID NO:198)</p>

(continuación)

Nombre	Secuencia (las CDR están subrayadas)
secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de PR-1290656	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIK <u>DTYIY</u> WVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTIYASKFQGKASITADTSSNTAYMQLSSLTSGDTAVYYCAGYGYAYWGQGTTLTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVIITFPSVLQSSGLIISLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVVHPASNTKVDKPVFNECRCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILRITRTP EVT CVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVIITAKTQSREQQFNGTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIDLPSPIERTISKARGRAHKPSVYVLPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNQGQEPERKHHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMIHETLQNIHYTDLSLSHSPGK (SEQ ID NO:199)
secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de PR-1290657	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSILISNGNTYLEWYLQKPGQSPNLLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGAIIVPETFSGGTKLEIKRND A QPAVYLFQSPDQLIHTGSASVVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYLSSTLTMSSTEYLSIHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD (SEQ ID NO:200)
secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de PR-1290657	EVQLVESGGGAVKPGGSLTSCAASGFTFSNHMYWVRQTPEKRLEWVASISDGGAYTFYPD TVKGRFTISRDNVNNLYLQMRHLKSEDTAMYYCTREESANNGFAFWGQGT LVTVSAASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLHSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVVHPASNTKVDKPVFNECRCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILRITRTP EVT CVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHTAKTQSREQQFNGTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIDLPSPIERTISKARGRAHKPSVYVLPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNQGQEPERKHHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMIHETLQNHYTDLSLSHSPGV (SEQ ID NO:201)
secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de PR-1290658	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTITCRASQDITNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLIISGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLDQEDIATYFCQOGKTLPRTFGGGTKLEIKRND A QPAVYLFQSPDQLHTGSASVVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYLSSTLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD (SEQ ID NO:202)

(continuación)

Nombre	Secuencia (las CDR están subrayadas)
secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de PR-1290658	<p>QVQLKESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLT<u>GYNIN</u>WVRQPPGKGLEWL  <u>GMIWGYGDTDYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTD</u>DARTARYYC  <u>ARDHYGGNDWYFDV</u>WGTGTTVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGST  VALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLHSLSSMVT  VPSSRWPSETFTCNVHPASNTKVDPVFNECRCTDTPPCPVPEPLGG  PSVLIFPPKPKDILRITRTPEVTCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHTA  KTQSREQQFNGTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIDLPSPIERTI  SKARGRAHKPSVYVLPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSN  GQQEPPERKHRMTPPQLDEEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVM  HETLQNHYTDLSLSHSPGK (SEQ ID NO:203)</p>

5 La secuencia de nucleótidos de la región constante de la IgG1 de cánido descrita anteriormente se ligó también al extremo 3' de cada uno de los ADNc que codifican los dominios variables de la cadena pesada derivados de los anticuerpos monoclonales caninizados dirigidos contra NGF 72.2 VH, 72.3 VH, 72.4 VH, 73.2 VH, 73.4 VH, 77.2 VH, 77.3 VH, 77.4 VH, 81.2 VH, 81.4 VH, 81.2B, 81.4B, 81.5B, 81.6B, 82.2 VH, 82.4 VH. La secuencia de nucleótidos de la cadena ligera kappa de cánido descrita anteriormente se ligó también al extremo 3' de cada uno de los dominios variables de la cadena ligera que codifican los ADNc derivados de los anticuerpos monoclonales caninizados dirigidos contra NGF 72.2 VL, 72.4, 73.2 VL, 73.4 VL, 77.2 VL, 77.4 VL, 81.2 VL, 81.4 VL, 82.2 VL.

10 Los anticuerpos quiméricos o caninizados de longitud completa se expresaron transitoriamente en células 293-6E mediante transfección simultánea de combinaciones de plásmidos pHybE de cadena pesada y ligera. La Tabla 17A resalta todas las posibles combinaciones de las cadenas pesada y ligera caninizadas que se pueden combinar para producir un anticuerpo caninizado por el nombre en la tabla (Tabla 17A). En la Tabla 17A, los plásmidos de la cadena pesada que codifican versiones caninizadas de cadenas pesadas de murino se relacionan en la línea superior y siguen hacia la derecha. Los plásmidos de la cadena ligera que codifican versiones caninizadas de cadenas ligeras de murino se relacionan en la columna de la izquierda y siguen hacia abajo. En cada punto donde estos recuadros interseccionan, se ha indicado un nombre para describir un potencial anticuerpo caninizado resultante.

**Ejemplo 17: Expresión y purificación de anticuerpos monoclonales caninizados**

20 Los plásmidos de anticuerpos quiméricos y caninizados de la cadena pesada y la cadena ligera de ratón/cánido seleccionados se transfectaron simultáneamente en células 293-6E en suspensión y se dejaron crecer durante 7-8 días. Se recogieron los sobrenadantes celulares, se centrifugaron, y se filtraron. Para cada anticuerpo expresado, se mezcló el sobrenadante con un volumen igual de tampón de unión Pierce para llevar a cabo la cromatografía de afinidad de la Proteína A sefariosa de acuerdo con las instrucciones del fabricante (GE Healthcare n.º 17-1279-04). Aunque de acuerdo con algunas fuentes, las IgG de cánidos se unen directamente a la Proteína A moderadamente bien (folleto del GE Healthcare Antibody Purification Handbook; Scott, M.A., y col., Vet Immunol-Immunopatho, 59:205, 1997; Warr, G.W y Hart, I.R., Am J Vet Res, 40:922, 1979; Thermo Scientific Pierce Antibody Production and Purification Technical Handbook) los mAb monoclonales de cánido no se unen cuantitativamente a la Proteína A y por tanto no podría purificarse de los sobrenadantes sin modificación de la metodología de purificación de la Proteína A.

30 Para permitir la unión cuantitativa de las IgG de cánido a la Proteína A, los sobrenadantes se concentraron y mezclaron con un volumen igual de tampón de unión Pierce (Thermo n.º 21007). A los sobrenadantes concentrados y diluidos, se añadió NaCl hasta una concentración final de 2,5 M. El sobrenadante ajustado con NaCl se cargó sobre Proteína A Sefarosa mediante carga continua durante la noche, se lavó con tampón de unión Pierce, y se eluyó usando tampón de elución Pierce (Thermo n.º 21004). Los eluatos se neutralizaron mediante adición gota a gota de Tris 1M a pH 8,0; tras esto, los anticuerpos neutralizados se dializaron en PBS y las cantidades de anticuerpo se cuantificaron espectrofotométricamente mediante la DO<sub>280</sub>. La cantidad purificada se dividió matemáticamente por el volumen total del sobrenadante celular purificado para determinar los niveles de expresión globales estimados en ug/ml. El aislamiento y la purificación de estos mAb de iff1/k de cánidos permitió realizar estudios de caracterización analítica de los mAb a completar.

35 Para la purificación a gran escala de los sobrenadantes celulares (10-15 l), los sobrenadantes celulares se concentraron, a continuación se mezclaron con tampón de unión A Pierce (Thermo, n.º de catálogo 21001) en una

relación de 1 a 1. A esta mezcla, se añadió NaCl 5 M hasta una concentración final de 1,3 M. el pH de la mezcla se ajustó a 8,5 con NaOH 10 N. Las suspensiones celulares ajustadas al pH se cargaron en una columna de cromatografía Protein A MabSelect SuRe (GE Healthcare, n.º de catálogo 17-5438-03) y se eluyeron utilizando dos etapas. La primera etapa de la elución se llevó a cabo utilizando Tris 20 mM, NaCl 25 mM, pH 8,0, 7,4 mS/cm. Las fracciones que contenían los anticuerpos se identificaron mediante la  $DO_{280}$  y la cromatografía de exclusión molecular. Para aislar cuantitativamente el anticuerpo restante unido a la columna de Proteína A, la segunda etapa de elución se llevó a cabo utilizando tampón de elución Pierce (Thermo, n.º de catálogo 21004), pH 2,7, 3,7 mS/cm y las fracciones que contenían los anticuerpos se identificaron mediante la  $DO_{280}$  y la cromatografía de exclusión molecular. Todas las fracciones que contenían los anticuerpos se neutralizaron utilizando Tris 2M pH 8,5 y a continuación se dializaron en PBS. El procedimiento empleado para purificar grandes volúmenes de sobrenadantes celulares que contienen anticuerpos monoclonales de cánidos (por ejemplo, 10-15 l) difiere del procedimiento empleado normalmente para purificar anticuerpos humanos a partir de grandes volúmenes. Para anticuerpos humanos, la purificación de la proteína A se lleva a cabo normalmente con condiciones de unión al sobrenadante celular de pH 7,0 a 8,3 y 15 a 20 mS/cm, lavando con condiciones similares (1 x PBS) y una elución en 1 etapa de anticuerpos humanos con ácido acético 0,1 M, cloruro de sodio 0,15 mM, pH 2,7 de 15 a 20 mS/cm o tampón de elución Thermo IgG, pH 2,7, a 15 mS/cm.

Los anticuerpos de cánido purificados se analizaron mediante espectrometría de masas (EM) para confirmar el peso molecular de la proteína del anticuerpo expresado emparejado al peso esperado basado en la secuencia de aminoácidos. Además, los anticuerpos de cánido se analizaron mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) para determinar el porcentaje de monómero. Estos datos indicaron que los mAb de IgG1/k quiméricos de ratón/cánido que pueden expresarse transitoriamente en células 293-6ey son un 81% o más monoméricos tras la purificación. Estos datos indicaron también que los mAb de IgG1/k caninizados que pueden expresarse transitoriamente en células 293-6e son 80% o más monoméricos tras la purificación. En algunos casos, no se puede detectar la expresión de la proteína y en algunos casos, el mAb caninizado es entre un 24 y un 34% monomérico. En las tablas 16 y 17B se resumen los datos.

Tabla 16: Datos de caracterización de anticuerpos monoclonales quiméricos de ratón/cánido

Denominación del hibridoma	Nombre de la versión quimérica de ratón/cánido	denominación de la versión quimérica de ratón/cánido	Nivel de expresión estimado en sobrenadantes celulares (ug/ml)	% de mAb monomérico
PR-1254972	Quimera de IgG1/k de cánido Mu72	PR-1290646	3,2	97
PR-1254973	Quimera de IgG1/k de cánido Mu73	PR-1290654	7	88,3
PR-1254977	Quimera de IgG1/k de cánido Mu77	PR-1290656	0,3	82,4
PR-1254981	Quimera de IgG1/k de cánido Mu81	PR-1290657	0,9	81
PR-1254982	Quimera de IgG1/k de cánido Mu82	PR-1290658	11,9	92,3

Tabla 17A: Producción de anticuerpos caninizados por combinaciones de las cadenas pesada y ligera caninizadas

Cadena pesada / Cadena ligera	72.2 VH	72.3 VH	72.4 VH	73.2 VH	73.4 VH	77.2 VH	77.3 VH	77.4 VH	81.2 VH	81.4 VH	82.2 VH	82.4 VH
72.2 VL	72VHV2/ 72VLv2	72.3 CalgG1/k	72VH v4/ 72VLv2	73.5 CalgG1/k	73VHV4/ 72VLv2	77VHV2/ 72VLv2	77.5 CalgG1/k	77VHV4 /72VLv2	81.5 CalgG1/k	81VHV4 /72VLv2	82.5 CalgG1/k	82VHV4 /72VLv2
72.4 VL	72VHV2/ 72VLv4	72VHV3 /72VLv4	72.4 CalgG1/k	73VHV2 /72VLv4	73VHV4/ 72VLv4	77VHV2/ 72VLv4	77VHV3 /72VLv4	77VHV4 /72VLv4	81 VHV2 /72VLv4	81VHV4 /72VLv4	82VHV2 /72VLv4	82VHV4/ 72VLv4
73.2 VL	72VHV2/ 73VLv2	72.5 CalgG/k	72VH v4 /73VLv2	73.2 CalgG1/k	73VHV4/ 73VLv2	77VHV2/ 73VLv2	77.6 CalgG1/k	77VHV4 /73VLv2	81.6 CalgG1/k	81VHV4 /73VLv2	82.6 CalgG1/k	82VHV4 /73VLv2
73.4 VL	72VHV2/ 73VLv4	72VHV3 /73VLv4	72VH v4 /73VLv4	73VHV2 /73VLv4	73.4 CalgG/k	77VHV2/ 73VLv4	77VHV3 /73VLv4	77VHV4 /73VLv4	81 VHV2 /73VLv4	81VHV4 /73VLv4	82VHV2 /73VLv4	82VHV4 /73VLv4
77.2 VL	72VHV2/ 77VLv2	72.6 CalgG/k	72VH v4 /77VLv2	73.6 CalgG1/k	73VHV4/ 77VLv2	77VHV2/ 77VLv2	77.3 CalgG1/k	77VHV4 /77VLv2	81.7 CalgG1/k	81VHV4 /77VLv2	82.7 CalgG1/k	82VHV4 77VLv2
77.4 VL	72VHV2/ 77VLv4	72VHV3 /77VLv4	72VH v4 /77VLv4	73VHV2 /77VLv4	73VHV4/ 77VLv4	77VHV2/ 77VLv4	77VHV3 /77VLv4	77.4 CalgG1/k	81 VHV2 /77VLv4	81VHV4 /77VLv4	82VHV2 /77VLv4	82VHV4 /77VLv4
81.2 VL	72VHV2/ 81VLv2	72.7 CalgG/k	72VH v4 /81VLv2	73.7 CalgG1/k	73VHV4/ 81VLv2	77VHV2/ 81VLv2	77.7 CalgG1/k	77VHV4/ 81VLv2	81.2 CalgG1/k	81VHV4 /81VLv2	82.8 CalgG1/k	82VHV4/ 81VLv2
81.4 VL	72VHV2/ 81VLv4	72VHV3/ 81VLv4	72VH v4/ 81VLv4	73VHV2/ 81VLv4	73VHV4/ 81VLv4	77VHV2/ 81VLv4	77VHV3/ 81VLv4	77VHV4/ 81VLv4	81 VHV2/ 81VLv4	81.4 CalgG1/k	82VHV2 / 81 VLv4	82VHV4/ 81VLv4
82.2 VL	72VHV2/ 82VLv2	72VHV3/ 82VLv2	72VH v4/ 82VLv2	73VHV2/ 82VLv2	73VHV4/ 82VLv2	77VHV2/ 82VLv2	77VHV3/ 82VLv2	77VHV4/ 82VLv2	81 VHV2/ 82VLv2	81VHV4/ 82VLv2	82VHV2/ 82VLv2	82VHV4/ 82VLv2
82.3 VL	72VHV2/ 82VLv3	72.8 CalgG/k	72VH v4/ 82VLv3	73.8 CalgG1/k	73VHV4/ 82VLv3	77VHV2/ 82VLv3	77.8 CalgG1/k	77VHV4/ 82VLv3	81.8 CalgG1/k	81VHV4/ 82VLv3	82.3 CalgG1/k	82VHV4/ 82VLv3
82.4 VL	72VHV2/ 82VLv4	72VHV3/ 82VLv4	72VH v4/ 82VLv4	73VHV2/ 82VLv4	73VHV4/ 82VLv4	77VHV2/ 82VLv4	77VHV3/ 82VLv4	77VHV4/ 82VLv4	81 VHV2/ 82VLv4	81VHV4/ 82VLv4	82VHV2/ 82VLv4	82.4 CalgG1/k

Tabla 17B: Datos de caracterización de anticuerpos monoclonales caninizados

Nombre	Denominación	Lote	Nivel de expresión estimado en sobrenadantes celulares (ug/ml)	% de mAb monomérico
IgG1/k de cánido 72.3	PR-1313524	1804091	2,63	88,3
IgG1/k de cánido 72.4	PR-1314949	1805928	1,6	81,5
IgG1/k de cánido 73.2	PR-1313520	1810546	13,4	96,5
IgG1/k de cánido 73.4	PR-1314950	1805932	1,8	90
IgG1/k de cánido 77.3	N/A	N/A	0,7	24,8
IgG1/k de cánido 77.4	N/A	N/A	1	34,6
IgG1/k de cánido 81.2	N/A	Sin detectarse mAb	Sin detectarse mAb	N/A
IgG1/k de cánido 81.4	N/A	Sin detectarse mAb	Sin detectarse mAb	N/A
IgG1/k de cánido 82.3	PR-1313519	1810585	4,4	80,7
IgG1/k de cánido 82.4	PR-1313521	1816320	9,8	94,2

**Ejemplo 18: Análisis de afinidad de anticuerpos de cánidos**

Se analizaron anticuerpos quiméricos de ratón/cánido purificados y anticuerpos caninizados para la afinidad a NGF de cánido utilizando un instrumento Biacore T100. Se inmovilizó un anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de cánido (Southern Biotech) a 5000-10000 UR sobre un chip CM5 utilizando un procedimiento de acoplamiento de amina de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Biacore). Se inyectó NGF de cánido a 50 ul/min a un intervalo de concentración de 50-0,156 nM para los anticuerpos quiméricos de ratón/cánido o 10-0,156 nM para los anticuerpos caninizados. Se vigiló la constante de asociación durante 5 min y se vigiló la constante de disociación durante 10-20 min. La superficie del chip se regeneró utilizando 50-75 ul de glicina 10 mM pH 1,5 a un caudal de 50-100 ul/min. Se analizaron los datos utilizando el software Biaevaluation T100 versión 2.0.2, del software, GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, NJ). En la Tabla 18 se resumen los parámetros de afinidad globales establecidos para anticuerpos quiméricos de ratón/cánido y para los anticuerpos caninizados en la 19. Estos datos indican que los mAb quiméricos dirigidos contra NGF de ratón/cánido aislados tienen constantes de la reacción directa rápidas (de más de  $2 \times 10^6$ ) y constantes de la reacción inversa lentas (de menos de  $3 \times 10^{-3}$ ). Las  $K_D$ s globales de los Mab dirigidos contra NGF de ratón cánido varían desde aproximadamente 1300 pM a 1,6 pM. Estos datos indican también que los mAb quiméricos caninizados aislados dirigidos contra NGF tienen constantes de la reacción directa rápidas (de más de  $6 \times 10^6$ ) y constantes de la reacción inversa lentas (de menos de  $2 \times 10^{-4}$ ). Las  $K_D$ s globales de los mAb caninizados dirigidos contra NGF varían de aproximadamente 42 pM a 1,2 pM.

Tabla 18: Parámetros de afinidad de anticuerpos monoclonales quiméricos de ratón/cánido con NGF de cánido

Nombre	Denominación	Reacción directa (1/MS)	Reacción inversa (1/s)	Afinidad global (M)
Quimera de IgG1/k de cánido Mu72	PR-1290646	2,9x10 <sup>6</sup>	3,8x10 <sup>-3</sup>	1,3x10 <sup>-9</sup>
Quimera de IpG1/k de cánido Mu73	PR-1290654	6,3x10 <sup>6</sup>	9x10 <sup>-5</sup>	1.4x10 <sup>-11</sup>
Quimera de IgG1/k de cánido Mu77	PR-1290656	9.1x10 <sup>6</sup>	1.9X10 <sup>-4</sup>	2.1x10 <sup>-11</sup>
Quimera de IgG1/k de cánido Mu81	PR-1290657	4.2x10 <sup>6</sup>	3.5X10 <sup>-4</sup>	8.2x10 <sup>-11</sup>
Quimera de IgG1/k de cánido Mu82	PR-1290658	8.7x10 <sup>6</sup>	1.4x10 <sup>-5</sup>	1.6x10 <sup>-12</sup>

Tabla 19: Parámetros de afinidad de anticuerpos monoclonales caninizados con NGF de cánido

Nombre		Reacción directa (1/MS)	Reacción inversa (1/s)	Afinidad global (M)
IgG1/k de cánido 73.2 PR-13113520	Expt 1	6.3x10 <sup>6</sup>	2.8x10 <sup>-4</sup>	4.4x10 <sup>-11</sup>
	Expt 2	6.9x10 <sup>6</sup>	2.9x10 <sup>-4</sup>	4.2x10 <sup>-11</sup>
	Promedio	6.6x10 <sup>6</sup>	2.9x10 <sup>-4</sup>	4.3x10 <sup>-11</sup>
IgG1/k de cánido 82.3 PR-13113519	Expt 1	8.2x10 <sup>6</sup>	2x10 <sup>-5</sup>	2.4x10 <sup>-12</sup>
	Expt 2	8.5x10 <sup>6</sup>	1.3x10 <sup>-5</sup>	1.6x10 <sup>-12</sup>
	Promedio	8.4x10 <sup>6</sup>	1.7x10 <sup>-5</sup>	2x10 <sup>-12</sup>
IgG1/k de cánido 82.4 PR-13113521	Expt 1	8.6x10 <sup>6</sup>	1.1x10 <sup>-5</sup>	1.2x10 <sup>-12</sup>
	Expt 2	7.7x10 <sup>6</sup>	1.2x10 <sup>-5</sup>	1.5x10 <sup>-12</sup>
	Promedio	8.2x10 <sup>6</sup>	1.2x10 <sup>-5</sup>	1.4x10 <sup>-12</sup>

**Ejemplo 19: Caracterización de anticuerpos de cánidos mediante el ensayo de potencia de la proliferación de células TF-1**

- 5 Anticuerpos quiméricos de ratón/cánido purificados y anticuerpos caninizados se caracterizaron usando el ensayo de potencia de la proliferación de células TF-1 (descrito anteriormente) utilizando NGF de cánido 70 pM en el ensayo. En las Tablas 20 y 21 se resumen los datos de potencia. Los datos muestran que en presencia de NGF 70 pM de cánido, todos los anticuerpos quiméricos dirigidos contra NGF de ratón cánido expresan potencias sub-nM, y todos expresan potencias de menos de 50 pM. Los datos muestran que en presencia de NGF 70 pM de cánido, algunos de los anticuerpos anti-NGF caninizados no tienen potencia de neutralización sobre NGF 70 pM de cánido. Algunos mAb caninizados tienen potencias sub-nM, y algunos tienen potencias de menos de 20 pM.

Tabla 20: Potencia de anticuerpos monoclonales quiméricos contra NGD de ratón/cánido sobre la proliferación de células TF-1 inducida por NGF de cánido

Nombre	Denominación	Lote	CI <sub>50</sub> (nM)
Quimera de IgG1/k de cánido Mu72	PR-1290646	1785614	0,041
Quimera de IgG1/k de cánido Mu73	PR-1290654	1785658	0,008
Quimera de IgG1/k de cánido Mu77	PR-1290656	1785699	0,028

(continuación)

Nombre	Denominación	Lote	CI <sub>50</sub> (nM)
Quimera de IgG1/k de cánido Mu81	PR-1290657	1778832	0,012
Quimera de IgG1/k de cánido Mu82	PR-1290658	1785732	0,007

Tabla 21: Potencia de anticuerpos monoclonales caninizados contra NGF sobre la proliferación de células TF-1 inducida por NGF de cánido (N/A = no aplicable)

Nombre	Denominación	Lote	CI <sub>50</sub> (nM)
IgG1/k de cánido 72.3	PR-1313524	1804091	0
IgG1/k de cánido 72.4	PR-1314949	1805928	0
IgG1/k de cánido 73.2	PR-1313520	1810546	0,422
IgG1/k de cánido 73.4	PR-1314950	1805932	0
IgG1/k de cánido 77.3	N/A	N/A	0,625
IgG1/k de cánido 77.4	N/A	N/A	0
IgG1/k de cánido 82.3	PR-1313519	1810585	0,017
IgG1/k de cánido 82.4	PR-1313521	1816320	0,016

#### **Ejemplo 20: Caracterización de la solubilidad y la estabilidad de anticuerpos caninizados dirigidos contra NGF**

Se obtuvieron soluciones madre de dos anticuerpos caninizados dirigidos contra NGF (IgG1/k de cánido 73.2 e IgG1/k de cánido 82.4). **[¿Son estos los Ab caninizados producidos en el Ej. 13?]** Los anticuerpos se formularon en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a concentraciones por debajo de 5 mg/ml (PBS contiene, aunque no de forma limitativa, los siguientes ingredientes: tampón fosfato 15 mM y cloruro de sodio 150 mM a pH 7,4).

#### Solubilidad:

Se evaluaron las solubilidades de los anticuerpos caninizados a altas concentraciones en PBS concentrando los anticuerpos con filtros de centrifuga Amicon con un corte de pesos moleculares de 30K. Se determinaron las concentraciones finales mediante absorbancia UV.

A temperatura ambiente, IgG1/k de cánido 73.2 era soluble a al menos 54 mg/ml e IgG1 de cánido 82.4 era soluble a al menos 83 mg/ml. Cuando se almacenaron a 5°C durante 5 horas a aquellas concentraciones, IgG1/k de cánido 73.2 formó una capa de gel en la parte inferior del recipiente mientras que IgG1/k de cánido 82.4 permaneció como una solución uniforme. Cuando se reequilibró a temperatura ambiente, IgG1/k de cánido 73.2 se volvió una solución uniforme. cuando se diluyó IgG1/k de cánido 73.2 a 27 mg/ml, permaneció como una solución uniforme a 5°C.

En comparación, adalimumab, un anticuerpo humano, demostró una solubilidad de al menos 150 mg/ml a 5°C y a temperatura ambiente. Esto se observó en una formulación con un pH de 7 y con una concentración de cloruro de sodio de 150 mM. En la Tabla 22 se describen las observaciones.

Tabla 22: Solubilidad de IgG1/k de cánido 73.2, IgG1/k de cánido 82.4m y el anticuerpo humano adalimumab en PBS.

Anticuerpo	Solubilidad a temperatura ambiente (mg/ml)	Observaciones cuando se coloca a 5°C
IgG1/k de cánido 73.2	≥ 54	capa de gel formada en la parte inferior *
IgG1/k de cánido 82.4	≥ 83	Permaneció como una solución
adalimumab	≥ 150	Permaneció como una solución

\* volvió a ser una solución uniforme cuando se llevó de nuevo a temperatura ambiente; cuando se diluyó a 27 mg/ml, permaneció como una solución uniforme a 5°C.

5 La solubilidad de IgG1/k de cánido 73.2 y de IgG1/k de cánido 82.4 se evaluó también en tampón histidina 15 mM pH 6,0. Este es un tampón usado normalmente para formular anticuerpos terapéuticos humanos. El tampón PBS que comprende las soluciones madre de IgG1/k de cánido 73.2 e IgG1/k de cánido 82.4 se intercambiaron con el tampón histidina utilizando filtros de centrifuga Amicon con un corte de pesos moleculares de 30K. Tras el intercambio del tampón, los anticuerpos presentaron precipitación blanca y solubilidades de menos de 2 mg/ml a temperatura ambiente, como se determinó por la absorbancia UV. En comparación, se observó que el anticuerpo humano adalimumab alcanza una concentración de al menos 150 mg/ml en tampón histidina 15 mM pH 6,0 a temperatura ambiente. En la Tabla 23 se resumen estas observaciones.

Tabla 23: Solubilidad de anticuerpos caninizados dirigidos contra NGF de IgG1/k de cánido 73.2, IgG1/k de cánido 82.4 y anticuerpo humano adalimumab en tampón histidina 15 mM pH 6,0.

Anticuerpo	Solubilidad a temperatura ambiente (mg/ml)	Observaciones
IgG1/k de cánido 73.2	<2	Precipitado blanco observado
IgG1/k de cánido 82.4	< 2	Precipitado blanco observado
adalimumab	≥ 150	Permaneció como una solución

Estabilidad a la congelación-descongelación

15 Se llevó a cabo una evaluación de la estabilidad a la congelación-descongelación (FT) de IgG1/k de cánido 73.2 e IgG1/k de cánido 82.4 en PBS y tras dilución con PBS a 1 mg/ml. Ambos anticuerpos se congelaron a -80°C durante al menos 4 horas. A continuación se descongelaron en un baño de agua a 30°C (esto constituye un ciclo de congelación-descongelación). Se evaluó la estabilidad para cuatro ciclos de congelación-descongelación mediante HPLC de exclusión molecular (SEC). En la Tabla 24 se resume el análisis de congelación-descongelación.

20 Tabla 24: Estabilidad a la congelación-descongelación de IgG1/k de cánido 73.2 e IgG1/k de cánido 82.4 a 1 mg/ml en PBS.

Anticuerpo	Especie	Porcentaje de especies			
		Pre-FT	Post FT n.º1	Post FT n.º 2	Post FT n.º 4
IgG1/k de cánido 73.2	Monómero	97,4	97,3	97,3	97,2
	Agregados	1,7	1,8	1,8	1,8
	Fragmentos	0,9	0,9	0,9	1
IgG1/k de cánido 82.4	Monómero	96,6	96,6	96,6	96,1
	Agregados	2,9	2,9	2,9	3,2
	Fragmentos	0,5	0,5	0,5	0,7

Estabilidad en almacenamiento y estabilidad acelerada:

Se evaluó la estabilidad de IgG1/k de cánido 73.2 e IgG1/k de cánido 82.4 cuando se formuló a una concentración

de 10 mg/ml y en un intervalo de pH de 5 a 8 a fuerzas iónicas baja (~7,5 mM) y alta (~> 150 mM). se evaluó la estabilidad en estas condiciones vigilando la estabilidad de los anticuerpos en los siguientes tampones y concentraciones salinas: (A) acetato 15 mM pH 5; (B) acetato 15 mM pH 5 + NaCl 150 mM; (C) histidina 15 mM pH 6 + NaCl 150 mM; (D) fosfato 15 mM pH 7,4; (E) PBS pH 7,4; (F) Tris 15 mM pH 7,5; (G) Tris 15 mM pH 8,0. Se añadió azida de sodio (0,02 %) a todos los tampones como un agente antimicrobiano.

Se concentraron soluciones madre de IgG1/k de cánido 73.2 e IgG1/k de cánido 82.3 en PBS hasta 15 mg/ml utilizando filtros de centrífuga con un corte de pesos moleculares de 30K. A continuación se dializaron frente a los tampones relacionados anteriormente durante 18 horas utilizando minidiálisis mediante tubos de diálisis con un corte de pesos moleculares de 1 kDa (GE Healthcare). Tras la diálisis, se diluyeron las muestras con los tampones respectivos hasta una concentración final de 10 mg/ml. Se distribuyeron en alícuotas 150 µl de cada muestra en crioviales que se almacenaron a continuación a 40°C o 5°C. Se analizaron las muestras a un tiempo = 0 horas (T0), a los 7 días (T7d), y a los 21 días (T21d) y se evaluó la estabilidad mediante SEC.

después de 21 días a 40°C, el ensayo de la estabilidad acelerada mostró que IgG1/k de cánido 73.2 e IgG1/k de cánido 82.3 tienen una fragmentación mucho mayor a valores de pH por debajo de 7,4 que a valores de pH por encima de 7,4. En comparación, el anticuerpo humano adalimumab, presentó menos fragmentación en el intervalo de pH 4 a 8 durante 21 días a 40°C. En particular, la fragmentación de adalimumab a pH 6 era mucho menor que la fragmentación de IgG1 /k de cánido 73.2 o IgG1 /k de cánido 82.4 a pH 6. También, adalimumab, a la condición de estrés mayor de pH 4 mostró una fragmentación igual o menor en comparación con IgG1 /k de cánido 73.2 o IgG1 /k de cánido 82.4 a la condición de estrés menor de pH 5. Los resultados de los análisis de estabilidad y los perfiles de fragmentación se muestran, respectivamente, en las Tablas 25 y 26. Estos datos sugieren que los anticuerpos monoclonales de IgG1 /k de cánido tienen un perfil de degradación diferente en comparación con el de los anticuerpos monoclonales de IgG1 /k humana. Específicamente, la fragmentación parece ser más extensa para los anticuerpos de IgG1 /k de cánido que para los anticuerpos humanos a pH 6 y por debajo.

Tabla 25: Datos de estabilidad de SEC para IgG1 /k de cánido 73.2, IgG1 /k de cánido 82.4 y el anticuerpo humano adalimumab en diferentes formulaciones a los 7 y 21 días a 5°C y a 40°C.

<b>IgG1/k de cánido 73.2 a 5°C</b>									
	<b>Porcentaje de monómero</b>			<b>Porcentaje de agregado</b>			<b>Porcentaje de fragmento</b>		
<b>Tampón</b>	<b>T0</b>	<b>T7d</b>	<b>T21d</b>	<b>T0</b>	<b>T7d</b>	<b>T21d</b>	<b>T0</b>	<b>T7d</b>	<b>T21d</b>
<b>A (pH 5)</b>	94,6	91,4	90,3	2,9	3,1	3,4	2,6	5,5	6,2
<b>B (pH 5)</b>	95,2	98,2	98,2	3,4	0,4	0,5	1,4	1,4	1,3
<b>C (pH 6)</b>	93,9	98,0	97,8	4,4	0,5	0,7	1,8	1,5	1,5
<b>D (pH 7,4)</b>	94,3	97,9	97,7	4,7	0,6	0,8	1,0	1,5	1,5
<b>E (pH 7,4)</b>	94,5	97,9	97,8	4,5	0,5	0,8	1,0	1,6	1,5
<b>F (pH 7,5)</b>	94,5	98,0	97,8	4,0	0,5	0,8	1,6	1,5	1,5
<b>G (pH 8,0)</b>	93,7	97,8	97,6	4,6	0,7	0,9	1,7	1,5	1,5
<b>IgG1/k de cánido 73.2 a 40°C</b>									
	<b>Porcentaje de monómero</b>			<b>Porcentaje de agregado</b>			<b>Porcentaje de fragmento</b>		
<b>Tampón</b>	<b>T0</b>	<b>T7d</b>	<b>T21d</b>	<b>T0</b>	<b>T7d</b>	<b>T21d</b>	<b>T0</b>	<b>T7d</b>	<b>T21d</b>
<b>A (pH 5)</b>	94,6	81,3	79,0	2,9	4,5	5,1	2,6	14,2	15,9
<b>B (pH 5)</b>	95,2	92,1	90,9	3,4	0,6	1,2	1,4	7,4	7,8
<b>C (pH 6)</b>	93,9	94,4	91,6	4,4	0,6	1,1	1,8	5,0	7,3
<b>D (pH 7,4)</b>	94,3	97,5	96,6	4,7	0,9	1,6	1,0	1,5	1,8

ES 2 665 954 T3

(continuación)

IgG1/k de cánido 73.2 a 40°C									
	Porcentaje de monómero			Porcentaje de agregado			Porcentaje de fragmento		
<b>E (pH 7,4)</b>	94,5	98,0	97,3	4,5	0,6	1,1	1,0	1,4	1,6
<b>F (pH 7,5)</b>	94,5	97,5	96,3	4,0	0,9	1,8	1,6	1,6	1,9
<b>G (pH 8,0)</b>	93,7	97,0	95,2	4,6	1,2	2,6	1,7	1,8	2,2
IgG1/k de cánido 82.4 a 5°C									
	Porcentaje de monómero			Porcentaje de agregado			Porcentaje de fragmento		
Tampón	T0	T7d	T21d	T0	T7d	T21d	T0	T7d	T21d
<b>A (pH 5)</b>	96,7	98,1	98,7	2,3	1,3	0,8	1,0	0,5	0,5
<b>B (pH 5)</b>	96,3	97,2	97,3	2,4	2,3	2,3	1,3	0,5	0,4
<b>C (pH 6)</b>	97,0	97,1	97,1	2,6	2,3	2,3	0,4	0,6	0,6
<b>D (pH 7,4)</b>	96,4	97,0	97,1	2,5	2,4	2,5	1,0	0,5	0,4
<b>E (pH 7,4)</b>	96,7	96,8	96,8	2,8	2,5	2,6	0,5	0,7	0,6
<b>F (pH 7,5)</b>	96,8	97,1	96,9	2,9	2,5	2,5	0,2	0,5	0,6
<b>G (pH 8,0)</b>	96,6	96,9	96,9	2,5	2,5	2,5	0,9	0,6	0,6
IgG1/k de cánido 82.4 a 40°C									
	Porcentaje de monómero			Porcentaje de agregado			Porcentaje de fragmento		
Tampón	T0	T7d	T21d	T0	T7d	T21d	T0	T7d	T21d
<b>A (pH 5)</b>	96,7	93,1	87,8	2,3	2,8	4,2	1,0	4,1	8,0
<b>B (pH 5)</b>	96,3	93,3	91,3	2,4	2,5	3,1	1,3	4,3	5,6
<b>C (pH 6)</b>	97,0	94,1	92,5	2,6	2,3	2,7	0,4	3,5	4,8
<b>D (pH 7,4)</b>	96,4	93,5	93,8	2,5	3,4	3,3	1,0	3,1	2,9
<b>E (pH 7,4)</b>	96,7	95,1	93,6	2,8	2,4	2,6	0,5	2,5	3,8
<b>F (pH 7,5)</b>	96,8	93,4	923,6	2,9	2,6	3,0	0,2	4,0	0,5
<b>G (pH 8,0)</b>	96,6	94,8	92,7	2,5	2,8	3,5	0,9	2,4	0,4
adalimumab a 40°C									
	Porcentaje de monómero			Porcentaje de agregado			Porcentaje de fragmento		
pH	T0	T7d	T21d	T0	T7d	T21d	T0	T7d	T21d
<b>4</b>	99	98	95	<1	<2	0,5	<1	<2	4,5

(continuación)

adalimumab a 40°C									
	Porcentaje de monómero			Porcentaje de agregado			Porcentaje de fragmento		
<b>6</b>	99	99	99	<1	<1	0,3	<1	<1	0,7
<b>8</b>	99	98	98	<1	<2	1,2	<1	<2	0,8

Tabla 26: Perfil de fragmentación de SEC para IgG1 /k de cánido 73.2, IgG1 /k de cánido 82.4 y el anticuerpo humano adalimumab en diferentes formulaciones a 21 días y a 40°C.

Anticuerpo	Tampón	Aumento en el porcentaje de fragmentación durante 21 días a 40°C
<b>IgG1/k de cánido 73.2</b>	A (pH 5)	13,3
	B (pH 5)	6,4
	C (pH 6)	5,5
	D (pH 7,4)	0,8
	E (pH 7,4)	0,6
	F (pH 7,5)	0,3
	G (pH 8,0)	0,5
<b>IgG1/k de cánido 82.4</b>	A (pH 5)	7,0
	B (pH 5)	4,3
	C (pH 6)	4,4
	D (pH 7,4)	1,9
	E (pH 7,4)	3,3
	F (pH 7,5)	0,3
	G (pH 8,0)	-0,5
<b>adalimumab</b>	pH 4	< 4,5
	pH 6	< 0,7
	pH 8	< 0,8

5 **Ejemplo 21: Estudio del PK de una monodosis de cánido y ensayo de unión a antígeno para el análisis del PK de la muestra de suero**

Se analizaron los niveles en suero de IgG1/k de cánido 73.2 e IgG1/k de cánido 82.4 tras una monodosis de 4,5 mg/kg intravenosa o subcutánea en perros sin raza. Tras la inyección, se recogieron 13 muestras de sangre venosa durante 672 horas. Se dejaron coagular las muestras de sangre y se retiró el suero para la cuantificación del anticuerpo.

- 10 Se desarrolló un ensayo de unión a NGF para cuantificar los mAb de cánido dirigidos contra NGF en suero. Se bloquearon placas de 96 pocillos revestidas de estreptavidina (MSD n.º L11SA-1) con el Bloqueante A (MSD n.º R93BA-4). El anticuerpo de cánido dirigido contra NGF presente en suero (o en PBS) se mezcló con relaciones equimolares de NGF etiquetado con biotina y NGF etiquetado con sulfo (Reactivo Sulfo MSD n.º R91AN-1) y se incubó para formar un complejo de NGF + anticuerpo. La concentración final del NGF etiquetado con biotina y el
- 15 NGF etiquetado con sulfo en el ensayo era de entre 1-2 nM. Se añadieron complejos de NGF-anticuerpo a la placa revestida de estreptavidina y se dejaron unir durante 60 minutos. Tras la incubación, se lavaron las placas con PBS más Tween-20 al 0,05% y se detectaron los complejos de NGF-anticuerpo unidos en tampón T de lectura (MSD #R92TC-1) en un equipo MSD SECTOR Imager 6000. Se cuantificaron los datos para estimar la cantidad total de anticuerpo en ug/ml de un líquido de muestra y se proporciona a continuación en las Tablas 27-30.

ES 2 665 954 T3

Tabla 27: Concentraciones en suero de IgG1/k d cáncido 82.4 tras una única dosis subcutánea

Pero n.º	1073305	1072602	1072104	1072306	1072105
<b>Horas después de la inyección</b>	<b>ug/ml</b>				
0	0,0	0,0	0	0	0,1
0,25	2,6	0,4	0,0	2,24	0,1
1	9,0	2,2	0,9	9,07	0,4
8	31,5	17,7	13,8	32,55	12,8
12	41,1	20,5	18,7	33,31	24,5
24	42,2	25,6	23,2	35,73	23,8
48	52,3	37,2	36,3	41,35	35,3
72	51,2	41,1	34,4	38,91	36,8
144	47,1	42,6	35,2	33,46	36,7
240	39,0	32,4	29,0	26,03	31,7
336	30,9	28,2	24,1	19,99	26,8
504	20,1	18,3	16,0	11,03	18,6
672	16,3	12,8	10,4	5,81	5,4

Tabla 28: Concentraciones en suero de IgG1/k de cáncido 82.4 tras una única dosis intravenosa

Pero n.º	1072705	1073804	1073303	1073903	1074502
<b>Horas después de la inyección</b>	<b>ug/ml</b>				
0	0	0	0	0	0
0,25	102,6	83,1	84,0	80,1	81,7
1	106,7	70,1	87,4	74,1	81,9
8	88,4	65,7	68,1	67,4	68,9
12	91,5	61,6	62,6	62,1	59,3
24	87,4	60,0	57,2	53,9	53,0
48	76,6	49,9	52,6	50,9	50,2
72	60,3	49,1	46,0	40,8	44,6
144	45,7	43,1	36,1	35,7	36,0
240	37,2	34,4	32,6	24,3	32,6
336	31,7	32,7	24,8	20,6	20,1
504	23,5	17,4	18,5	12,2	12,8
672	15,2	10,7	12,5	7,3	8,3

ES 2 665 954 T3

Tabla 29: Concentraciones en suero de IgG1/k d cánido 73.2 tras una única dosis subcutánea

<b>Pero n.º</b>	1072607	1074307	1072606	1074503
<b>Horas después de la inyección</b>	<b>ug/ml</b>			
0	0	0	0	0
0,25	0	0	2,1	0
1	1,0	5,9	4,7	0,0
8	18,6	31,3	18,7	7,4
12	22,7	32,5	21,3	8,7
24	26,8	33,2	24,2	12,0
48	33,7	35,9	28,4	16,2
72	35,0	37,6	30,7	19,4
144	34,9	37,4	30,2	21,8
240	31,6	31,8	26,8	22,0
336	24,4	24,7	22,6	16,5
504	15,3	14,3	13,8	10,6
672	6,8	9,2	5,1	5,4

Tabla 30: Concentraciones en suero de IgG1/k de cánido 73.2 tras una única dosis intravenosa

<b>Perro n.º</b>	1072804	1073304	1072604
<b>Horas después de la inyección</b>	<b>ug/ml</b>		
0	0	0	0
0,25	93,6	33,2	108,5
1	86,3	30,8	103,1
8	76,9	22,1	85,4
12	72,1	21,4	80,5
24	63,0	17,1	68,0
48	54,6	14,6	56,8
72	49,4	13,5	50,8
144	41,4	10,2	41,4
240	35,4	8,9	30,8
336	30,5	6,3	20,9
504	22,2	4,0	3,4
672	14,8	3,4	0,0

**Ejemplo 22: Análisis farmacocinético de los datos de concentraciones en suero**

Se calcularon los parámetros farmacocinéticos para las rutas de dosificación intravenosa (IV) y subcutánea (SC) para cada animal utilizando el software WinNonlin (Pharsight Corporation, Mountain View, CA) mediante un análisis no compartimental. Se llevaron a cabo otros cálculos, por ejemplo, la media, la desviación estándar (SD), y el porcentaje de biodisponibilidad subcutánea (F: %) usando el software Microsoft Excel (Microsoft Corporation Redmond, WA). En las tablas 31 y 32 se muestran los datos.

Tabla 31: Análisis farmacocinético de IgG1/k de cánido 73.2 tras una única dosis intravenosa

IV			SC			
T1/2 (día)	Vss (ml/kg)	Cl (ml/h/kg)	T1/2 (día)	Cmax (ug/ml)	Tmax (día)	%de F
14,8*	71	0,15	8,0*	31,3	4,8	51
*Media armónica						

Tabla 32: Análisis farmacocinético de IgG1/k de cánido 82.4 tras una única dosis intravenosa

IV			SC			
T1/2 (día)	Vss (ml/kg)	Cl (ml/h/kg)	T1/2 (día)	Cmax (ug/ml)	Tmax (día)	%de F
10,9*	73	0,19	11,6*	41,9	3,0	94
*Media armónica						

Los datos indican que los mAB de cánido 73.2 y 82.4 tienen una semivida de aproximadamente 8 a aproximadamente 15 días cuando se dosifican IV o SC, sugiriendo que estas moléculas presentan semividas similares a anticuerpos de mamíferos y parámetros de PK globales.

**Ejemplos 23: ELISA para titular anticuerpos de cánidos**

Para cuantificar anticuerpos en sobrenadantes celulares (u otros líquidos), Se revistieron placas EIA de alta unión (Costar n.º 9018) con anticuerpos policlonales de cabra dirigidos contra IgG de perro (Rockland n.º 604-1102) a 4 ug/ml en PBS. Tras el bloqueo con leche desnatada al 2% en PBS, Se añadieron anticuerpos monoclonales de cánido a las placas y se lavaron las placas con PBS más Tween-20 al 0,05%. Se detectaron los mAb de cánido unidos con anticuerpos de cabra etiquetados con HRP dirigidos contra IgG de perro Rockland n.º 604-1302) a 0,1 ug/ml. Se lavaron las placas con PBS más Twee-20 al 0,05%. Se detectaron mAb de cánidos mediante la adición de sustrato TMB (Neogen n.º 308177), y la reacción se detuvo con HCl 1N. Se cuantificaron los anticuerpos de cánido unidos mediante absorción a 450 nm para estimar la cantidad total de anticuerpo en ug/ml de un líquido de muestra.

Estas técnicas incluyen, aunque no de forma limitativa, las técnicas descritas en las siguientes publicaciones:

- Ausubel, F.M. y col. eds., Short Protocols In (Molecular Biology (4ª Ed. 1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X).
- Lu and Weiner eds., Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysis (2001) BioTechniques Press. Westborough, MA. 298 págs. (ISBN 1-881299-21-X).
- Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. Nueva York. 790 págs. (ISBN 3-540-41354-5).
- Old, R.W. & S.B. Primrose, Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V.2:409 págs. (ISBN 0-632-01318-4).
- Sambrook, J. y col. eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6).
- Winnacker, E.L. From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology (1987) VCH Publishers, NY (traducido por Horst Ibelgauf). 634 págs. (ISBN 0-89573-614-4).

Aunque se han descrito anteriormente numerosas realizaciones, aspectos y características, los expertos en la materia entenderán que se pueden realizar modificaciones y variaciones de las realizaciones y características descritas sin apartarse de la presente divulgación.

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo caninizado o fragmento de unión a antígeno del mismo capaz de reconocer NGF de cánido, que comprende:
- 5 (i) una región variable de la cadena pesada caninizada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con una secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 192,  
y  
una región variable de la cadena ligera caninizada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con una secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 193 en la que la constante de velocidad de la reacción inversa  $K_{off}$  es como mucho como mucho  $10^{-4}s^{-1}$  según se mide mediante resonancia de plasmón superficial; o
- 10 (ii) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 192,  
y  
una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 193.
- 15 2. El anticuerpo de la reivindicación 1 (i), en el que el anticuerpo comprende a) regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada que consisten en las SEQ ID NOS: 79, 80 y 81; y b) las CDR de la cadena ligera que consisten en las SEQ ID NOS: 82, 83, y 84.
- 20 3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana seleccionado entre el grupo que consiste en un dominio constante de IgM, dominio constante de IgG4, dominio constante de IgG1, dominio constante de IgE, dominio constante de IgG2, dominio constante de IgG3, y dominio constante de IgA.
- 25 4. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina de cánido seleccionado entre el grupo que consiste en un dominio constante de IgM, dominio constante de IgG4, dominio constante de IgG1, dominio constante de IgE, dominio constante de IgG2, dominio constante de IgG3, y dominio constante de IgA.
5. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una región constante que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 52 y la SEQ ID NO: 54.
6. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es capaz de modular la función biológica de NGF.
- 30 7. Un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de la reivindicación 1, 2 o 3.
8. Una composición farmacéutica o diagnóstica que comprende un anticuerpo de la reivindicación 1, 2 o 3 y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, que comprende:
- 35 una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo; y/o al menos un conservante, en la que el conservante es metilparabeno, propilparabeno, alcohol bencílico, clorobutanol o cloruro de benzalconio.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, en la que:
- el pH de la composición está entre 7,0 y 8,0; y/o la composición tiene una semivida de entre 8,0 a 15,0 días cuando se dosifica por vía intravenosa o subcutánea.
- 40 11. Un anticuerpo caninizado o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un sujeto que padece un trastorno en el que la actividad de NGF es perjudicial, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

Figura 1

**Anticuerpos de ratón dirigidos contra NGF**

SEQ ID NO:1 (secuencia de nucleótidos PR-1254972 VH)

GAAGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTTCC  
TGATACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTGAATTACATGTTTT  
GGATTCCGCCAGACTCCGGGAAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGA  
TGGTGGTAGTTACACCTACTACACAGACAATGTAAAGGGCCGATTACCATC  
TCCAGAGACAATGTCAAGAACAACCTGTACCTGCAAATGAGCCATCTGAAGT  
CTGCGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGATTGGAGTGAATCCGAGGG  
GTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

Figura 2

SEQ ID NO:2 (aminoácido PR-1254972 VH)

EVHLVESGGGLVKPGGFLILSCAASGFTFSDYYMFWIRQTPGKRLEWVATISDGG  
SYTYITDNLVKGKRFITSRDNLVKNLYLQMSHLKSADTAMYYCARDWSDSEGFA  
YWGQGLVTVSA

Figura 3

SEQ ID NO:3 (secuencia de nucleótidos PR-1254972 VH)

GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA  
AGCCTCCATCTCTGCAGATCTAGTCAGAGTATTGTACAAAGTAATGAAAC  
ACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGA  
TCTACAAAGTTTCCAACCGATTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGT  
GGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATC  
TGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCATTCACGTTCCGGCTCG  
GGGACAAAGTTGGAAATAAAACGG

Figura 4

SEQ ID NO:4 (aminoácido PR-1254972 VL)

DVLMQTQIPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVQSNQNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYK  
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPFTFGSGTKLEI  
KRC

Figura 5

SEQ ID NO:5 (secuencia de nucleótidos PR-1254972 VH)

CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTTCAG  
TGAAGCTGTCCTGTAAGGCTTCTGGCTACACCTCACCAACTACTGGATGCAC  
TGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAGGATTGATC  
CTTATGGTGGTGGTACTAAGCACAATGAGAAGTCAAGAGGAAGGCCACAGT  
GACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATCTGCTCAGCAGCCTGACA  
TCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTACAAGATCTGGTTACGACTATTACTT  
CGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

Figura 6

SEQ ID NO:6 (aminoácido PR-1254973 VH)

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMHWVKQRPQGLEWIGRIDP  
YGGGTKHNEKFKRKATVTADKSSSTAYILLSSLTSEDSAVYYCTRSGYDYYFDV  
WGTGTTVTVSS

Figura 7

SEQ ID NO:7 (secuencia de nucleótidos PR-1254973 VH)

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAAA  
CTGTCACCGTCACATGTCGAGCAAGTAAAATATTTACAGTTTTTTAGCATGG  
CATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAATGCAAATA  
CCTTAGCAGAGGGTGTGCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGCACACA  
GTTTTCTCTGAAGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAGTTATTACT  
GTCAACATCATTTTGGGACTCCATTCACGTTCCGGCTCGGGACAAAAGTTGGA  
AATAAAACGG

Figura 8

SEQ ID NO:8 (aminoácido PR-1254973 VL)

DIQMTQSPASLSASVGETVTVTCRASENIYSFLAWHQKQKSPQLLVYNANTL  
AEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYCQHHEGTPFTFGSGTKLEIKR

Figura 9

SEQ ID NO:9 (secuencia de nucleótidos PR-1254977 VH)

GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAG  
TCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACACCTATATATAC  
TGGGTGAAACAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGAT  
CCTGCGAATGGAAATACTATATATGCCTCAAAGTTCAGGGCAAGGCCTCTA  
TAACAGCAGACACATCATCCAACACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGAC  
ATCTGGGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTGGTTATGGTTACTACGCCTACT  
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

Figura 10

SEQ ID NO:10 (aminoácido PR-1254977 VH)

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIYWVKQRPEQGLEWIGRIDPAN  
GNTIYASKFQKASITADTSSNTAYMQLSSLTSGDTAVYYCAGYGYAYWGQG  
TILTVSS

Figura 11

SEQ ID NO:11 (secuencia de nucleótidos PR-1254977 VL)

GATGTTGTTCTGACCCAACTCCACTCTCTCTGCCTGTCAATATTGGAGATCA  
AGCCTCTATCTTTGCAAGTCTACTAAGAGTCTTCTGAATGGTGATGGATTCA  
CTTATTTGGACTGGTACTTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTAATA  
TATTTGGTTTCTAATCGATTTTCTGGAGTTCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGG  
GTCAGGAACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTG  
GGAGTTTATTATTGCTTCGAGAGTAACTATCTATTACGTTCCGGCTCGGGGAC  
AAAGTTGGAAATGAAACGG

Figura 12

SEQ ID NO:12 (aminoácido PR-1254977 VL)

DVVLQTPLSLPVNIGDQASISCKSTKSLLNGDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYL  
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFESNYLFTFGSGTKLEM  
KR

Figura 13

SEQ ID NO:13 (secuencia de nucleótidos PR-1254980 VH)

GAGGTTGAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAG  
TCAAGTTGCTCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACACCTATATATAT  
TGGGTGAAACAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGAAGGATTGAT  
CCTGCGAATGGAAATACTATATATGCCTCAAAGTCCAGGGCAAGGCCACTA  
TAACAGCAGACACATCATCCAACACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGAC  
ATCTGGGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTGGTTATGGTTACTACGCCTACT  
GGGGCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

Figura 14

SEQ ID NO:14 (aminoácido PR-1254980 VH)

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIYWVKQRPEQGLEWIGRIDPAN  
GNTIYASKFOGKATITADTSSNTAYMQLSSLTSGDTAVYYCAGYGYAYWGQG  
TTLTVSS

Figura 15

SEQ ID NO:15 (secuencia de nucleótidos PR-1254980 VL)

GATGTTGTTCTGACCCAAACTCCACTCTCTCTGCCTGTCAATATTGGAGATCA  
AGCCTCTATCTTTGCAAGTCTACTAAGAGTCTTCTGAATGGTGATGGATTCA  
CTTATTTGGACTGGTACTTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTAATA  
TATTTGGTTTCTAATCGATTTTCTGGAGTCCGGACAGGTTTCAGTGGCAGTGG  
GTCAGGAACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTG  
GGAGTTTATTATGCTTCGAGAGTAACTATCTATTACGTTCCGGCTCGGGGAC  
AAAGTTGGAAATGAAACGG

Figura 16

SEQ ID NO:16 (aminoácido PR-1254980 VL)

DVVLQTPLSLPVNIGDQASISCKSTKSLLNGDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYL  
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFLTKISRVEAEDLGVYYCFESNYLFTFGSGTKLEM  
KR

Figura 17

SEQ ID NO:17 (secuencia de nucleótidos PR-1254981 VH)

GAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGCAGTGAAGCCTGGAGGGTCC  
CTGACACTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACCATTACATGTA  
TTGGGTTCCGACACTCCGAAAAGAGGCTGGAGTGGGTCCGCTCCATTAGT  
GATGGTGGTGCTTACACCTTCTATCCAGACACTGTCAAGGGCCGATTCACCAT  
CTCCAGAGACAATGTCAACAACAACCTGTACCTGCAAATGCGCCATCTGAAG  
TCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTACAAGAGAGGAGAGTGCTAACAACG  
GGTTTGCTTTCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

Figura 18

SEQ ID NO:18 (aminoácido PR-1254991 VH)

EVQLVESGGGAVKPGGSLTSCAASGFTFSNHMYWVRQTPEKRLEWVVASISD  
GGAYTFYPDTVKGRFTISRDNVNNLYLQMRHLKSEDTAMYCYCTREESANNGF  
AFWGQGLLVTVSA

Figura 19

SEQ ID NO:11 (secuencia de nucleótidos PR-1254981 VL)

GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA  
AGCCTCCATCTCTTGAGATCTAGTCAGAGCATTCTACATAGTAATGGAAACA  
CCTATTTAGAAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAACCTCCTGAT  
CTACAGAGTTTCCAACCGATTTCTGGGGTCCCCGACAGGTTTCAGTGGCAGTG  
GATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCT  
GGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTGCACATGTTCCATTACGTTCCGGCTCGG  
GGACAAAGTTAGAAATAAAACGG

Figura 20

SEQ ID NO:20 (aminoácido PR-1254981 VL)

DVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSILHSNGNTYLEWYLQKPGQSPNLLIYRV  
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGAHVPFTFGSGTKLEIK  
R

Figura 21

SEQ ID NO:21 (secuencia de nucleótidos PR-1254982 VH)

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCC  
TGCCATCACATGCACCGTCTCAGGGTTCATTAACCGGTATAATATAAAC  
TGGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGG  
GTTATGGAGACACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAG  
CAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACT  
GATGACACAGCCAGGTATTATTGTGCCAGAGATCACTATGGTGGTAACGACT  
GGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

Figura 22

SEQ ID NO:22 (aminoácido PR-1254982 VH)

QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTGYNINWVRQPPGKLEWLGMIWGY  
GDTDYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQDDTARYYCARDHYGGNDWYF  
DYWGTGTTVTVSS

Figura 23

SEQ ID NO:23 (secuencia de nucleótidos PR-1254982 VL)

GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACA  
GAGTACCATCACTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTACCAATTATTTAAACTG  
GTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTACTACACATCA  
AGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAG  
ATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGATCAAGAAGATATTGCCACTTACTTT  
TGCCAACAGGGTAAAACGCTTCCTCGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGG  
AAATCAAACGG

Figura 24

SEQ ID NO:24 (aminoácido PR-12549982 VL)

DIQMTQTTSSLSASLGDRVIITCRASQDITNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLH  
SGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLDQEDIATYFCQQGKTLPRTFGGGKLEIKR

**CDR de anticuerpos de ratón anti-NGF injertados en marcos de cánidos  
(anticuerpos dirigidos contra NGF con CDR injertadas); las CDR están subrayadas**

Figura 25

SEQ ID NO:25 (aminoácido 72.1 VH)

EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSDYYMFVWRHSPGKGLQWVATISD  
GGSYTYTQDNVKGRTISRDDANNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDWSSEGF  
AYWGQGLVTVSS

Figura 26

SEQ ID NO:26 (aminoácido 72.1 VL)

DIVMTQTPPSLSVSPREPASISCRSSQSIVQSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVS  
NRFSGVSDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDTGVYYCFQGSHPFTFGAGTKVELK  
R

Figura 27

SEQ ID NO:27 (aminoácido 73.1 VH)

EVQLVQSAAEVKKPGASVKVSCKTSYIFINYWMHWVQQAPGAGLEWMGRIDP  
YGGGTKHNEKFKRRVTLTADTSTNTVYMELSNLRTEDTAVYYCARSGYDYYFD  
YWGQGLVTVSS

Figura 28

SEQ ID NO:28 (aminoácido 73.1 VL)

IIVMTQTPLSLSASPGESASISCRASENIYSFLAWFRQKPGQSPQRLLIYNANTLAEG  
VPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEDEDAGLYYCQHFGTPFTFGQGTKLEIKR

Figura 29

SEQ ID NO:29 (aminoácido 77.1 VH)

EVQLVQSAAEVKKPGASVKVSCKTSGYIFIDTYIWVQQAPGAGLEWMGR  
IDPANGNTIYASKFQGRVTLTADTSTNTVYMELSNLRTEDTAVYYCARYGYAY  
WGQGLVTVSS

Figura 30

SEQ ID NO:30 (aminoácido 77.1 VL)

DLVLTQTPRSLVSPGETASISCKSTKSLNNGDGFTYLDWFRQKPGQSPQRLLIYLV  
SNRFSGVPDRFSGSGGTDFTLRISRVEADDTGLYYCFESNYLFTFSQGTNLEMK  
R

Figura 31A

SEQ ID NO:31 (aminoácido 81.1 VH)

EVQLVESGGDLMKPGGSLRLSCVASGFTFSNHMYWVRQAPGKGLQWVGSISD  
GGAYTFYPDVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRTEDTGRVLLCEGEESANNGF  
AFWGHGTLVTVSS

Figura 31B

SEQ ID NO:177 (aminoácido 81.1 VL)

EVQLEESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNHMYWVRQSPGKGLQWVASISD  
GGAYTFYPDVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYFCVKEESANNGFA  
EWGQGLVTVSS

Figura 32

SEQ ID NO:32 (aminoácido 81.1 VL)

DVVMTQAPPSLSVSPREPASISCRSSQSILHSNGNTYLEWFRQKPGQSPQRLLIYRV  
SNRFSGVPDRFSGSGGTDFTLRISRVEADDLGVYYCFQGAHVPFTFGQGTKLEI  
KR

Figura 33

SEQ ID NO:33 (aminoácido 82.1 VH)

EVILQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGSVTGYNINWIRQRPDRGLEWMGMMIWGY  
GDTDYNSALKSRISITADGTKNHLSLQLTSTTTEDTAVYYCTRDHYGGNDWYFD  
YWGQGTLVTVSS

Figura 34

SEQ ID NO:34 (aminoácido 82.1 VL)

IIVMTQTPLSLSASPGESASISCRASQDITNYLNWFRQKPGQSPQRLIYYTSRLHSG  
VPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEDEDAGLYCOOGKTLPRTFGQGTKLEIKR

**Anticuerpos caninizados anti-NGF que contienen restos de retromutaciones (los restos de retromutaciones se muestran en negrita)**

Figura 35

SEQ ID NO:35 (aminoácido 72.2 VH)

EVHLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSDYYMFWIRHSPGKGLEWVATISDG  
GSYTYYTDNVKGRFTISRDNANNNLYLQMNSLKAEDTAVYYCAKDWSDSEGF  
AYWGQGTLVTVSS

Figura 36A

SEQ ID NO:36 (aminoácido 72.2 VL)

DVLMTQTPPSLSVSPREPASISCRSSQSIVQSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKV  
SNRFSGVPDRFSGSGTDFTLRISRVEADDTGVYYCFQGSHVPFTFGAGTKVEL  
KR

Figura 36B

SEQ ID NO:179 (aminoácido 72.3 VH)

EVHLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSDYYMFWIRQSPGKGLEWVATISDG  
GSYTYYTDNVKGRFTISRDNANNNLYLQMNSLKAEDTAVYYCAKDWSDSEGFA  
YWGQGTLVTVSS

Figura 36C

SEQ ID NO:180 (aminoácido 72.4 VH)

EVHLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSDYYMFVVRHSPGKGLEWVATISD  
GGSYTYTDDNVKGRFTISRDNANNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDWSDEGEF  
AYWGQGTLVTVSS

Figura 36D

SEQ ID NO:181 (aminoácido 72.4 VL)

DIVMTQTTPSLSVSPREPASISCRSSQSIVQSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS  
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDTGVYYCFQGSHVPFTFGAGTKVELK  
R

Figura 37

SEQ ID NO:37 (aminoácido 73.2 VH)

QVQLVQSAAEVKPKGASVKVSKKASGYTFTNYWMHWVQAPGAGLEWIGRID  
PYGGGTKHNEKFKRRATVTADKSTSTAYMELSNLRTEDTAVYYCTRSGYDYYF  
DVWGQGTLVTVSS

Figura 38A

SEQ ID NO:38 (aminoácido 73.2 VL)

DIQMTQTPLSLSASPGESASITCRASENIYSFLAWHRQKPGQSPQLLVYNANTLA  
EGVPSRFSGSGSGTQFTLRISRVEDEDAGLYYCQHHEGTPFTFGQGTKLEIKR

Figura 38B

SEQ ID NO:182 (aminoácido 73.4 VL)

EVQLVQSAAEVKPKGASVKVSKKASGYIFINYWMHWVQAPGAGLEWMGRID  
PYGGGTKHNEKFKRRVTLTADKSTSTVYMELSNLRTEDTAVYYCTRSGYDYYF  
DVWGQGTLVTVSS

Figure 38C

SEQ ID NO:183 (aminoácido 73.4 VL)

DIQMTQTPLSLSASPGESASISCRASENIYSFLAWHRQKPGQSPQLLIYNANTLAE  
GVPSRFSGSGGTQFTLRISRVEDEDAGLYYCQH~~HF~~GT~~PF~~TFGQGTKLEIKR

Figura 39

SEQ ID NO:39 (aminoácido 77.2 VH)

EVQLVQSAAEVKKPGASVKVSKASGFNIKDTYIYWVKQAPGAGLEWIGRIDPA  
NGNTIYASKFQ~~G~~KASITADTSTNTAYMELSNLRTEDTAVYYCARYGYYAYWGQ  
GTLVTVSS

Figura 40A

SEQ ID NO:40 (aminoácido 77.2 VL)

DVVLVTQTPRSLVSPGETASISCKSTKSLNNGDGFTYLDWYRQKPGQSPQLLIYL  
VSNRFS~~G~~V~~P~~DRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDTGLYYCFESNYLFTFGQGTNLEM  
KR

Figura 40B

SEQ ID NO:184 (aminoácido 77.3 VH)

EVQLVQSAAEVKKPGASVKVSKASGFNIKDTYIYWVKQAPGAGLEWIGRIDPA  
NGNTIYASKFQ~~G~~KASITADTSTNTAYMELSNLRTEDTAVYYCAGYGYAYWGQ  
GTLVTVSS

Figura 40C

SEQ ID NO:185 (aminoácido 77.4 VH)

EVQLVQSAAEVKKPGASVKVSKASGYIFIDTYIYWVKQAPGAGLEWMGRIDPA  
NGNTIYASKFQ~~G~~RVTLTADTSTNTVYMELSNLRTEDTAVYYCAGYGYAYWG  
QTLVTVSS

Figura 40D

SEQ ID NO:186 (aminoácido 77.4 VL)

DLVLTQTPRSLSVSPGETASISCKSTKSLLNGDGFTYLDWYRQKPGQSPQLLIYLV  
SNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDTGLYYCFESNYL  
ETFSQGTNLEMKR

Figura 41

SEQ ID NO:41 (aminoácido 81.2 VH)

EVQLVESGGDLMKPGGSLRLSCVASGFTFSNHMYWVRQAPGKGLEWVASISD  
GGAYTFYPDTVKGRFTISRDNAKNNLYLQMNSLKTEDTGRVLYCTGEESANNG  
FAFWGHGTLVTVSS

Figura 42

SEQ ID NO:42 (aminoácido 81.2 VL)

DVLMTQTPPSLSVSPREPASISCRSSQSILHSNGNTYLEWYRQKPGQSPQLLIYRV  
SNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGAHVPTFGQGKLEI  
KR

Figura 42B

SEQ ID NO:187 (aminoácido 81.4 VH)

EVQLVESGGDLMKPGGSLRLSCVASGFTFSNHMYWVRQAPGKGLEWVASISD  
GGAYTFYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRTEDTGRVLYCTGEESANNGF  
AFWGHGTLVTVSS

Figura 42C

SEQ ID NO:188 (aminoácido 81.4 VL)

DVLMTQAPPSLSVSPREPASISCRSSQSILHSNGNTYLEWYRQKPGQSPQLLIYRV  
SNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDLGVYYCFQGAHVPTFGQGKLEI  
KR

Figura 42D

SEQ ID NO:189 (aminoácido 81.2 VH)

EVQLEESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNHYMYWVRQSPGKGLEWVASISDG  
GAYTFYPDTVKGKRFRTISRDNKNNLYLQMNSLKKEDTAVYYCTREESANNGFA  
EWGQGTLVTVSS

Figura 42E

SEQ ID NO:190 (aminoácido 81.4B VH)

EVQLEESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNHYMYWVRQSPGKGLEWVASISD  
GGAYTFYPDTVKGKRFRTISRDNKNTLYLQMNSLRKEDTAVYYCTKEESANNGF  
AFWGQGTLVTVSS

Figura 42F

SEQ ID NO:206 (aminoácido 81.5B VH)

EVQLEESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNHYMYWVRQSPGKGLEWVASISDG  
GAYTFYPDTVKGKRFRTISRDNKNNLYLQMNSLKAEDTAVYYCTREESANNGFA  
EWGQGTLVTVSS

Figura 42G

SEQ ID NO:207 (aminoácido 81.6B VH)

EVQLEESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNHYMYWVRQSPGKGLEWVASISD  
GGAYTFYPDTVKGKRFRTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTKEESANNGF  
AFWGQGTLVTVSS

Figura 43

SEQ ID NO:43 (aminoácido 82.2 VH)

EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLTGYNINWVRQRPDRGLEWLGMIWGY  
GDTDYNSALKSRLSISKDNTKSQVFLQLTSTTTEDTAVYYCARDHYGGNDWYF  
DYWGQGTLVTVSS

Figura 44A

SEQ ID NO:44 (aminoácido 82.2 VL)

DIQMTQTPLSLSASPGESASITCRASQDITNYLNWYRQKPGQSPKLLIYYTSRLHS  
GVPSRFSGSGSGTDYSLRISRVEDEDAGLYFCQQGKTLPRTFGQGTKLEIKR

Figura 44B

SEQ ID NO:191 (aminoácido 82.3 VL)

DIQMTQTPLSLSASPGESASITCRASQDITNYLNWYRQKPGQSVKLLIYYTSRLHS  
GVPSRFSGSGSGTDYSLRISRVEDEDAGLYFCQQGKTLPRTFGQGTKLEIKR

Figura 44C

SEQ ID NO:192 (aminoácido 82.4 VH)

EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSVTGYNINWIRQRPDRGLEWMGMIWGY  
GDTDYN SALKSRISITKDNTKSQLFLQLSTTTEDTAVYYCARDHYGGNDWYFD  
YWGQGT LVTVSS

Figura 44D

SEQ ID NO:193 (aminoácido 82.4 VL)

DIQMTQTPLSLSASPGESASISCRASQDITNYLNWYRQKPGQSPKLLIYYTSRLHS  
GVPSRFSGSGSGTDYTLRISRVEDEDAGLYFCQQGKTLPRTFGQGTKLEIKR

**NGF de cánido**

Figura 45

SEQ ID NO:45 (cebador NGF-perro-S)

5'-GGC AGG GTA CCG CCG CCA CCATGT CCATGT TGT TCT ACA C-3'

Figura 46

SEQ ID NO:46 (cebador NGF-perro-AS)

5'-GGC AGT CTA GAT CAGTGA TGA TGA TGA TGATGG GCT CGT CTC CCG  
GCCTTC C-3'

Figura 47

SEQ ID NO:47 (cebador NGF-d-Ec-S)

5'-GGC AGC ATA TGG AAC CGC ATC CAG AGA GCC AT-3'

Figura 48

SEQ ID NO:48 (cebador NGF-d-Ec-AS)

5'-GGC AGC TCG AGC TAG GCT CGT CTC CCG GCC TTC CT-3'

Figura 49

SEQ ID NO:48 (secuencia de nucleótidos con fusión 6His en el extremo C de NGF de cánido)

ATGTCCATGTTGTTCTACACTCTGATCACAGCTCTTCTGATCGGCATCCGGGC  
AGAACCGCATCCAGAGAGCCATGTCCCAGCAGGACACGCCATCCCCACGCC  
CACTGGACTAAGCTTCAGCATTCCCTTGACACAGCCCTCCGCAGAGCCCGCA  
GCGCCCCGGCCGGGGCAATAGCTGCCAGGGTGACAGGGCAGACCCGCAACA  
TCACTGTGGATCCCAAACCTTTAAAAAGCGGCGACTGCGTTCGCCCCGCGT  
GCTGTTACGACACGCACCCCCACCTGTGGCTGCGGACGCTCAGGACCTGGAC  
CTGGAGCCGGCAGCACCGCTCCGTCAACAGGACTCACAGGAGCAAGCGG  
TCTTCGTCCCACCCTGTCTTCCACCGGGGGAGTTCTCGGTGTGCGACAGCGT  
CAGCGTGTGGGTGGGCGACAAGACCACAGCCACCGACATCAAGGGCAAGGA  
GGTGATGGTGCTGGGAGAGGTGAACATTAACAACAGTGTGTTCAAACAGTAC  
TTCTTTGAGACCAAGTGCCGGGACCCACCCCGTGGACAGCGGGTGCAGGG  
GCATCGACTCCAAGCACTGGAACCTACTGCACCACCACCCACACCTTCGTC  
AAGGCGCTGACCATGGACGGCAAGCAGGCTGCCTGGCGGTTTCATCCGGATCG  
ACACGGCCTGCGTGTGCGTGCTCAGCAGGAAGGCCGGGAGACGAGCCCATC  
ATCATCATCATCAC

Figura 50

SEQ ID NO:50 (secuencia de nucleótidos 6His en el extremo C de NGF de cánido)  
MSMLFYTLITALLIGIRAEPHPESHVPAGHAIPHAHWTKLQHSLDTALRRARSAP  
AGAIAARVTGQTRNITVDPKLFKRRRLRSRVLFSSTHPPPVAADAQDLBLEAGST  
ASVNRTHRKRSSSHPVFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEV  
NINNSVFKQYFFETKCRDPTPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDBGKQ  
AAWRFIRIDTACVCLSRKAGRRRAHHHHHH

Dominios constantes de la cadena ligera y pesada de cánido

Figura 51

SEQ ID NO:51 (secuencia de nucleótidos de la región constante de IgG de cánido)  
GCGTCGACCACAGCCCCGTCAGTCTCCCATTTGGCCCCAGCTGCGGGTCAA  
CTAGCGGGICTACCGTCGCTCTGGCTTGCTGGTGTCCGGCTACTTCCCTGAG  
CCTGTGACCGTCAGCTGGAACCTGGTAGCCTGACCAGCGGCGTGCATACTTT  
TCCAAGCGTCCTCAGAGCTCCGGACTCCACTCCCTTAGTTCCATGGTAACCG  
TGCCAAGTAGTCGGTGGCCATCCGAGACATTTACCTGTAACGTGGTCCATCCC  
GCTAGTAATACCAAGGTGGATAAGCCTGTCTTTAACGAGTGCCGGTGCACAG  
ACACACCACCTGTCCCCTGAGCCTCTCGGCGGCCCTCAGTCCTGATC  
TTTCTCCAAAGCCAAAAGATATCCTCCGGATTACCCGGACTCCTGAAGTGA  
CATGTGTAGTTCTGGACTTGGGCCGGGAAGACCCAGAGGTACAGATTAGCTG  
GTTTCGTAGACGGCAAAGAGGTGCACACAGCCAAAACGCAATCAAGGGAACA  
GCAGTTCAATGGTACTTATCGGGTCGTGTCAGTACTGCCGATCGAACATCAG  
GATTGGCTTACTGGCAAGGAATTCAAATGCCGCGTGAACCACATTGACCTGC  
CAAGCCCCATCGAGAGGACCATATCAAAGGCCAGGGGGCGGGCACACAAGC  
CGAGCGTTTATGTCTGCCCCCTTCCCCTAAGGAACTTAGCTCTTCAGACT  
GTGAGCATTACATGTCTGATCAAGGATTTCTATCCACCGGACATAGATGTAG  
AGTGGCAGTCCAACGGGCAACAGGAGCCTGAACGGAAACATAGAATGACTC  
CTCCACAGCTCGATGAGGATGGTTCCTTACTTTCTTTACTCCAAACTGTCAGTG  
GACAAATCACGATGGCAGCAGGGCGATCCATTCACATGTGCCGTTATGCACG  
AGACGCTTCAGAACCACTATACTGATCTGTCCCTCTCACATAGCCCCGGGCAA  
ATGA

Figura 52

SEQ ID NO:52 (secuencia de nucleótidos de la región constante de IgG de cánido)  
ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSV  
LQSSGLHSLSSMVTVPSSRWSETFTCNVVHPASNTKVDKPVFNECRCTDTPPCP  
VPEPLGGPSVLIFPPKPKDILRITRTPVTCVVDLGGREDPEVQISWFVDGKEVHT  
AKTQSREQFNGTYRVVSVLPIEQDWLTGKEFKCRVNHIDLPSPIERTISKARG  
RAHKPSVYVLPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNQQEPPERKHRMT  
PPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHETLQNHYTELSDLSHSPGK

Figura 53

SEQ ID NO:53 (secuencia de nucleótidos de la región constante kappa de cánido)  
AATGATGCCAGCCTGCAGTGTACCTGTTCCAACCTAGCCCTGACCAGCTCCA  
CACAGGCTCTGCTAGCGTCGTCTGCCTGCTCAATTCTTTCTACCCAAAGGATA  
TCAACGTGAAGTGGAAGGTCGATGGCGTGATTCAAGACACCGGCATTCAAGA  
GTCAGTGACCGAACAGGATAAAGATTCTACATATAGCTTGAGCAGCACACTG  
ACCATGAGCTCCACCGAGTATCTCAGTCATGAGCTGTATTCTGCGAGATCAC  
ACACAAGTCATTGCCAGTACGCTCATAAAAAGCTTCCAGAGGTCCGAATGC  
CAGCGCGTGGATTGA

Figura 54

SEQ ID NO:54 (secuencia de nucleótidos de la región constante kappa de cánido)  
NDAQPAVYLFQSPDQLHTGSASVVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQES  
VTEQDKDSTYLSSTLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD

CDR de dominio variable de anticuerpo caninizado

Figura 55

SEQ ID NO:55 (aminoácido 72.1 VH; CDR1)  
DY YMF

# ES 2 665 954 T3

Figura 56

SEQ ID NO:56 (aminoácido 72.1 VH; CDR2)

TISDGGSYTTYTDNVKG

Figura 57

SEQ ID NO:57 (aminoácido 72.1 VH; CDR3)

DWSDSEGFAY

Figura 58

SEQ ID NO:58 (aminoácido 72.1 VL; CDR1)

RSSQSIVQSNQNTYLE

Figura 59

SEQ ID NO:59 (aminoácido 72.1 VL; CDR2)

KVSNRFS

Figura 60

SEQ ID NO:60 (aminoácido 72.1 VL; CDR3)

FQGSHPFT

Figura 61

SEQ ID NO:61 (aminoácido 73.1 VH; CDR1)

NYWMH

Figura 62

SEQ ID NO:62 (aminoácido 73.1 VH; CDR2)

RIDPYGGGTHNEKFKR

Figura 63

SEQ ID NO:63 (aminoácido 73.1 VH; CDR3)

SGDYDFDV

Figura 64

SEQ ID NO:64 (aminoácido 73.1 VL; CDR1)

RASENIYSFLA

Figura 65

SEQ ID NO:65 (aminoácido 73.1 VL; CDR2)

NANTLAE

Figura 66

SEQ ID NO:66 (aminoácido 73.1 VL; CDR3)

QHHFGTPFT

Figura 67

SEQ ID NO:67 (aminoácido 77.1 VH; CDR1)

DTYIY

Figura 68

SEQ ID NO:68 (aminoácido 77.1 VH; CDR2)

RIDPANGNTIYASKFQG

Figura 69

SEQ ID NO:69 (aminoácido 77.1 VH; CDR3)

YGYAY

Figura 70

SEQ ID NO:70 (aminoácido 77.1 VL; CDR1)

KSTKSLNLDGFTYLD

# ES 2 665 954 T3

Figura 71

SEQ ID NO:71 (aminoácido 77.1 VL; CDR2)

LVSNRFS

Figura 72

SEQ ID NO:72 (aminoácido 77.1 VL; CDR3)

FESNYLFT

Figura 73

SEQ ID NO:73 (aminoácido 81.1 VH; CDR1)

NHYMY

Figura 74

SEQ ID NO:74 (aminoácido 81.1 VH; CDR2)

SISDGGAYTFYPDTVKG

Figura 75

SEQ ID NO:75 (aminoácido 81.1 VH; CDR3)

EESANNGFAF

Figura 76

SEQ ID NO:76 (aminoácido 81.1 VL; CDR1)

RSSQSILHSNGNTYLE

Figura 77

SEQ ID NO:77 (aminoácido 81.1 VL; CDR2)

RVSNRFS

Figura 78

SEQ ID NO:78 (aminoácido 81.1 VL; CDR3)

FQGAHVPFT

Figura 79

SEQ ID NO:79 (aminoácido 82.1 VH; CDR1)

GYNIN

Figura 80

SEQ ID NO:80 (aminoácido 82.1 VH; CDR2)

MIWGYGDTDYNSALKS

Figura 81

SEQ ID NO:81 (aminoácido 82.1 VH; CDR3)

DHYGGNDWYFDV

Figura 82

SEQ ID NO:82 (aminoácido 82.1 VL; CDR1)

RASQDITNYLN

Figura 83

SEQ ID NO:83 (aminoácido 82.1 VL; CDR2)

YTSRLHS

Figura 84

SEQ ID NO:84 (aminoácido 82.1 VL; CDR3)

QQGKTLPRT

NGF humano

Figura 85

SEQ ID NO:85 (βNGF)

SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQYFFE  
TKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFIRIDTACV  
CVLSRKAVRRA

Figura 86 - Tablas

Secuencias del dominio variable de la cadena pesada de cánido derivadas de PBMC de cánido

Tabla 12

SEQ ID NO: 178 (Ca-1005)

EVQLEESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFSIGSYGMSWVRQSPGKGLQWVAVIKY  
DGRSTFYADAVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYFCVKGPNSSWLPS  
TYFASWGQGLTVTVSS

Tabla 12

SEQ ID NO: 86 (Ca-2301)

EMQLVESGGDLVRPGGSLRLSCVASGFTFSTYGMTWVRQSPGKGLQWVATIGP  
GGRNTYYADAVKGRFTISRDDAENTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAQAFDATYYT  
SFDCWGRGSLVAVSS

Tabla 12

SEQ ID NO: 87 (Ca-2302)

MESVLSWVFLVALLQGIQGEIRLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFIFGNYDMS  
WVRQAPGKGLQWVAARYDGSSTYYSDAVKGRITISRDDPGNTVYLQLDSLRA  
EDTATYYCVRGGYYSSSFYIGGAFGHWPGTLITVSS

Tabla 12

SEQ ID NO: 88 (Ca-2303)

MECVLGWVFLVAILRGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSDYYM  
SWIRQAPGKGLQWVADISDGGDGTGYAGAVKGRFTVSRENVKNTLYLQMNDL  
RAEDTAIYYCTKAREMYGYRDFDSWGPGLTVTVSS

Tabla 12

SEQ ID NO: 89 (Ca-2304)

MESVLGLVALLTILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNYMT  
WVRQAPGKGLEWVGYIHNGGTYYADAVKGRFTISRDDAKNTLYLEMNSLR  
AEDTAVYYCGKMIFDYWGQGLTVTVSS

Tabla 12

SEQ ID NO: 90 (Ca-2305)

MESALSWVFLVTILKGVQGEVLLVESGGDLVKPGGSLRLSCLTSGFTFNITYDWG  
WVRQAPGKGLQWIAYIKKGGSDVRYADAVKGRFTISRDDAKNTLYLQMNSLRA  
EDTAVYYCARSAWDSFDYWGQGLTVTVSS

Tabla 12

SEQ ID NO: 91 (Ca-2306)

MESVFCWVFLVAILKGVQGEVQLVESGGDLVKPAGSLRLSCVASGFTFTDY  
SMNWVRQAPGKGLQWVATISNDGTSTDYTDVAVKGRFTVSRDSARNTVYLQMT  
SLRADDATYYCVSRHSYLLADYWGQGLTVTVSS

Tabla 12

SEQ ID NO: 92 (Ca-2307)

MQMPWSLLCLLAAPLGVLSEVTLQESGGLVKPSQTLSTCAVSGGSVIRNYYW  
HWIRQRPGRGLEWMGCWSETTYYSAPFRGRISITIDAATDQFSLHLNSMTTDDT  
AVYYCARALYPTSSWYDGM DYWGHGASVVVSS

Tabla 12

SEQ ID NO: 93 (Ca-2308)

EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCSSGFIFSQYAMNWVRQAPGKGLQWVAYIGG  
AGFITYHADDVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLTINDTAVYYCVRSNSRIPDYW  
GQGLVAVSS

Tabla 12

SEQ ID NO: 94 (Ca-2309)

MESVFCWVFLVAILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSSVYMS  
WVRQAPGKGLQWVARITDGTDTFYADAVKGRFTISRDNVKNMLYLEMNSLR  
AEDTAIYYCGDPWQPAYPDLWGQGMVTVSS

Tabla 12

SEQ ID NO: 95 (Ca-2310)

MESVLCWVFLVAILKGVQGEVHVESGGDLVKPGGTLRLSCVASGFTFSQYDM  
SWVRQSPGKGLQWVALSRYHGGGTYADAVKGRFTISRDNKNMLYLQMNLSL  
RAEDTAVYYCVKEGSRWDLRGDYDYWGQGLTVTVSS

Tabla 12

SEQ ID NO: 96 (Ca-2311)

MQMPWLLCLLAAPLGVLSELTLQESGGLVKPSQTLSTCVVSGGSVTSSHYW  
NWIRQRPGRGLEWGMGYWTGNVNYNPAFQGRISIIGDAAKNQFSLHLSSMTTDDT  
AVYYCARCGIVAPGFLPIGDFDFWGQGLTVTVSS

Tabla 12

SEQ ID NO: 97 (Ca-2312)

MESVFCWVFLVAILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFSSNYFMF  
WGRQAPGKGLQWVARIRSDGGSTYYADAVKGRFTISRDNARNTLYLQMNLSRA  
EDTATYYCAKADIJKLPEYRGQGLTVTVSS

Tabla 12

SEQ ID NO: 98 (Ca-2401)

ESVLGWIFLATILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVSGFTFSSSWMNW  
VRQAPGKGLQWIAEISGTGSSTNYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAED  
TAMYYCARAAYYGNYRNDLDYWGQGLTVTVSS

Tabla 12

SEQ ID NO: 99 (Ca-2402)

KPAGSLRLSCVASGFTFSSHSVTWVRQAPGKGLQFVAGITSGGNNRYTDAVRG  
RFTLSRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAMYFCALGSYEWLSGEFDYWGQGLVT  
VSS

Tabla 12

SEQ ID NO: 100 (Ca-2403)

MESVFCWVFLVAILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTLNNYFM  
YWVRQAPGKGLQWVARLNSNGDSTFYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL  
RAEDTSMYYCAKDLIYGYTLWGQGLVTVSS

Tabla 12

SEQ ID NO: 101 (Ca-2404)

MASVLSWVFLVAIVKGVQGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFIFNKYEYV  
WVRQAPGKGLEWVARILESGNPTYA EAVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA  
DDTAVYYCATPSVSSTVAIDYWGQGLVTVSS

Tabla 12

SEQ ID NO: 102 (Ca-2405)

MQMPWLLCLLATPLGVLSELTQESGPGLVKPSQTLSTCVVSRGSVTSDDYYW  
NWIRQRPRGLEWMGHWIGSTAYNPAFQGRISITADTAKNQLSLQLRSMTTEDT  
AVYFCARGSSWTPSGDSWGQGLVTVSS

Tabla 12

SEQ ID NO: 103 (Ca-2406)

MASVLKLGFSRCRYCKKVSRVRCNXVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFIFNKYEY  
YWVRQAPGKGLEWVARILESGNPTYAEEAVEGRFTISRDNAMAYLQMNSLR  
ADDTAVYYCATPSVSSTVAIDYWGQALVTVSS

Tabla 12

SEQ ID NO: 104 (Ca-2407)

MDCSWRIFLLALATGVHSEVQLVQSAAEVKPGASVKVSCKTSGYTLTDYYIH  
WVQAPGTGLHWMGWIDPEXGTTDYAQKFQGXVTLTADTSTNTAYMELSLR  
AEDTAVYYCARFPRSLDYGSFPFDYWGQGLVTVSS

Tabla 12

SEQ ID NO: 105 (Ca-2408)

MESVLCWVFLVAILKGVQGEVRLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFRNYGM  
SWVRQRPKGGLQWVAIRSDGVTTYADDLKVRFVTSRDDARNTLYLQNSLGA  
EDTAVYYCAKAPWGLYDAWGQGLVTVSS

Tabla 12

SEQ ID NO: 106 (Ca-2409)

MESVLSWVFLVAILQGVQGEVQVVESGGDLVKPAGSLRLSCVASGYSISTYTMT  
WVRQVPGKGLQLVAGINGDGSSTYYTDAVKGRFTISRDNARNTVYLQMNSLRA  
EDTAMYYCLGEYSWFYYWGQGLVTVSS

Tabla 12

SEQ ID NO: 107 (Ca-2410)

MQMPWSLLCLLAAPLGVLSLTLQESGPRLVKPSQTLSTCAVSGGSVTTTSYW  
SWIRQRPGRGLEWVGYWTGTTNYSPAFQGRISISADTAKNQFSLHLSSVTTEDTA  
LYFCASKSASTSWYFSLFESWGQGLVTVSS

Tabla 12

SEQ ID NO: 108 (Ca-2411)

MESVLGLVFLLTILKGVQGEVQLVESGGDLVKPGSLRLSCVASGFTFSSYSMS  
WVRQAPGKGLQWVGIDNGGTSTYYADAVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLR  
AEDTAVYYCGRGSYGMFYWGHTSLFVSS

Tabla 12

SEQ ID NO: 109 (Ca-2412)

MESVLGLLFLVAILKGVQGEIQLVESGGDLLKPGSLRLSCVASGFTFSGSDMN  
WIRQAPGKGLQWVAHITHEGIGTSYVGSVKGRFTISRDNANTLYLQMNDLRAE  
DTAMYYCAYSFVNYSDSWGQGLTVTVSS

Figura 87

Secuencias del dominio variable de la cadena ligera de cánido derivadas de PBMC de cánido

Tabla 13

SEQ ID NO: 110 (Ca-1001)

MTSTMAWSPLLLTLLTHCTVSWAQTVLTQSPSVSAVLGRRVTISCTGSDTNIGSH  
RDVQWYQLVPGKSPKTLIYGTDNRPSGIPVRFSGSKSGNSGTLTITGIQAEDEAD  
YYCQSYDDDLSMNVFGGGTHLTVLG

Tabla 13

SEQ ID NO: 111 (Ca-1002)

MDWVPFYILPFIFSTGFCALPVLTPQPTNASASLEESVKLTCTLSSEHSNYIVRWYQ  
QQPGKAPRYLMYVRSDGSYKRGDGIPSRFSGSSSGADRYLTISNIKSEDEDDYY  
CGADYTISGQYGSVFGGGTHLTVLG

Tabla 13

SEQ ID NO: 204 (Ca-1003)

LWISGGSALGTPTMAWTHLLL PVLTLCTGSVASSVLTQPPSVSVSLGQTATISCSG  
ESL  
SKYYAQWFQKAGQVPVLVIYKDTERPSGIPDRFSGSSSGNTHLTISRARAED  
ADYYCESEVSTGTTCVRRRHPSNRPRSAQGLPLGHTLPALL

Tabla 13

SEQ ID NO: 112 (Ca-1006)

MTSTMAWSPLLLTLLTHCTGSWAQSFLTQPASLSGSLGQRVTISCTGSSSNIGGY  
SVNWLQQLPGTGPRTHIYNNSNRPSGVPDRFSGSRSGTTATLTISGLQAEDEADYY  
CSTWDSNLRTIVFGGGTHLTVLG

Tabla 13

SEQ ID NO: 113 (Ca-1007)

MTSTMDWSPLLLTLLAHCTGSWAQSVLTPASVSGSLGQRVTISCTGSTS NLGT  
YNVGWLQQVPGTGPRTVIYTNIYRPSGVPDRFSGSESGSTATLTISDLQAEDEAE  
YYCTAWDSSLNAYVFGSGTQLTVLG

Tabla 13

SEQ ID NO: 114 (Ca-1008)

MTSNMAWCPFLLTLLAYCTGSWAQSVLTPQTSVSGSLGQRVTISCSGSTNNIGIV  
GASWYQQLPGKAPKLLVYSDGDRPSGVPDRFSGSNSGNSDTLTITGLQAEDEAD  
YYCQSFDTLDAAVFGGGTHLTVLG

Tabla 13

SEQ ID NO: 115 (Ca-1009)

MTSTMAWSPLLLTLLAHCTVSWAQAVLTQPPSVSAALGQRVTISCTGSDTNIGS  
GYEVHWYRQVPGKSPAIHIYGNSNRPSGVPVRFSGSKSGSTATLTITGIEAEDEAD  
YHCQSYDGNLDGGVFGGGTHLTVLG

Tabla 13

SEQ ID NO: 116 (Ca-1010)

MTSTMGWFPILITLLAHCAGSWAQSVLTPASVSGSLGQRVTISCTGSSPNVGY  
GDFVAWYQQVPGTSPRTLIIYNTSRPSGVPDRFSASRSGNTATLTISGLQAEDEA  
DYCYSSYDNTLIGIVFGGGTHLTVLG

Tabla 13

SEQ ID NO: 117 (Ca-1011)

MTSTMGWSPLLLTLLAHCTGSWAQSVLTPASVSGSLGQRVTITCTGSSSNIGRA  
NVAWFQQVPGTGPRTVIYTSVKRPSGVPDRFSGSKSGSTATLTISGLQAEDEADY  
YCSSWDNSLDAGVFGGGTHLTVLG

Tabla 13

SEQ ID NO: 118 (Ca-1012)

MTSTMGWFPLLLTLLAHSTGSWAQSVLTQPASVSGSLGQRVTITCTGGTSNIGRG  
FVSWFQQVPGIGPKILIFDAYRRPSGVPDRFSGSRSGNTATLTISGLQAEDEADYY  
CAVYDSRLDVGVFVFGSGSQLTVLS

Tabla 13

SEQ ID NO: 119 (Ca-1202)

MTSNMAWCPFLLTLLTYCTGSWARSVLTQPASVSGSPGQKVITYCSGTMSDIGV  
LGANWYQQLPGKAPKLLVDNDGDRPSGVPDRFSASKSGHSDTLTITGLQPEDEG  
DYQCQSFSSLDAAIFGEGTHLTVLG

Tabla 13

SEQ ID NO: 120 (Ca-1203)

SVASYVLTQSPSQNVTLRQAAHITCEGHNIGTKSVHWYQQKQGQAPVLIYDDK  
SRPSGIPERFSGANSNGNTATLTISGALAEDEADYYCLVWDSSAIWVFGEGTHLTV  
LG

Tabla 13

SEQ ID NO: 121 (Ca-1204)

MTSTMAWSPLLLTLLAHFTGSWAQSVLTQPTSVSGSLGQRVTISCTASSSNIDRD  
YVAWYQQLPGTRPRALIYANSNRPSGVPDRFSGSKSGSTATLTISGLQAEDEADYY  
YCSTWDNSLTYVFGSGTQLTVLG

Tabla 13

SEQ ID NO: 122 (Ca-1205)

SVASYVLTQVPSVSVNLGKTATITCEGDNVGEKYTHWYQQEYQGAPVLIYEDS  
RRPSGIPERFSGSNSNGNTATLTISGARAEDTDYQCQVWDDSGNVFGGGTHLTVL  
G

Tabla 13

SEQ ID NO: 123 (Ca-1206)

MTSTMGWFP LLTLLAHCAGSWAQSVLTQPASVSGSLGQRVTISCTGSDSNVGY  
GDSIAYGDSVAWYQQVPGTSPRTLIDVTSRPSGVPDRFSGSRSGTTATLTISGLQ  
AEDEADYYCSSFDKTLNGLIVGGGTHLTVLG

Tabla 13

SEQ ID NO: 124 (Ca-1207)

MTSNMAWSP LLLTLLAYCTGSWAQSALTQPTSVSGSLGQRVSISCSGGIHNIGSV  
GATWYQQLPGKAPKLLVSSDGD RPSGIPDRFSGSRSGNSVTLTITGLQAEDEAEY  
YCQSF DSTLGVHVVFGGGTHLTVLG

Tabla 13

SEQ ID NO: 205 (Ca-1208)

LCSAVGPPKTESVMTSTMGWS P LLLTLLAHCTGSWAQSVLTQPASVSGSLGQRV  
TIPCTGSSSNIDRYNVAWFQQLPGTGPKSSIVLLTDPQGLIDSLAPSQAA

Tabla 13

SEQ ID NO: 125 (Ca-1209)

MTSTMAWFP LLLTLLAHYTGSWARSDLTQPASVSGSLGQRITISCTGSSSNIGRN  
YVGWYQQLPGRGPRTVVYGINRPSGVPDRFSGSKSGSTVTLTISGLQAEDEADY  
YCSTWDDSLSVVFGGGTHLTVLG

Tabla 13

SEQ ID NO: 126 (Ca-1210)

MTSTMGWS P LLLTLTHWTGSWAQSVLSQPASMSGSLGLRITICCTGKNSNINNS  
YVDWNQPLAGTGPRTVIHDDGD RPSGVPDQFSGSKSGNTATLTISRLQAEDEAD  
YNGASFETSFNAVFGGGTHVTVLG

Figura 88

**Secuencias del dominio variable de la cadena ligera kappa de cánido derivadas de ARN de PBMC de cánido**

Tabla 14

SEQ. ID NO. 127 (Ca Ka016-A1)

LSWLRQKPGHSPQRLIHQVSSRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRVEADDGGVYY  
CGQGSQSIPTFGQGTKVEIKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 128 (Ca Ka016-A2)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSAGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLSNGNT  
YLYWFRQKPGQSPQRLIYKVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVY  
YCGQVIQDPWTFGVGKLELKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 129 (Ca Ka016-A3)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQTLLYSNGKN  
YLFWYRQKPGQSPQRLIDLASNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVY  
YCGQGMEIPWTFGAGTKVELKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 130 (Ca Ka016-A4)

MKFPSLLLGLLMLWIPGSTGEAVMTQTPLSLAVTPGEVATISCRASQSLLSHDGK  
SYLNWYLQKPGQTPRPLIYEASKRFSGVSDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDVGV  
YYCQQLHFPPTFGPGTKVELKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 131 (Ca Ka016-A5)

PDRFSGSGSGTDFTLTISRVEADDAGIYYCGQATQTPPTFGAGTKLDLKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 132 (Ca Ka016-A6)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVRPGEASISCKASQSLHSGGGT  
YLNWFRQRPQGSPQRLIYEVSKRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRITRVEADDTGIY  
YCGQNTQLPLTFGQGTKVEIKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 133 (Ca Ka016-A7)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSTGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLHNSGNT  
YLFWLRQKPGQSPQRLIYRVSNRDPGVDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVY  
YCGQVRSPWTFGAGTKVEVKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 134 (Ca Ka016-A8)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSAGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLHNSGNT  
YLYWFRQKPGQSPQRLIYKVSNRDPGVDRFSGSGSGTDFTLRISRRETDDAGVY  
YCGQVIQDPWTFGVGKLELKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 135 (Ca Ka016-A9)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDVVMMAQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLHNSGN  
TFLFWFRQKPGQSPQRLINFLSNRDPGVDRFSGSGSGTDFTLRINRVEADDAGL  
YYCGQLQAPLTFGQGTKLEIKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 136 (Ca Ka016-A10)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSNGDDVLTQTPLSLSVRPGETVSILCKASESLHSDGN  
TYLSWVRQKAGQSPQRLMYRVSDRDTGVPDRFSGSGSGTDFLTISGVEADDAG  
IYYCGQATHYPLEFGQGTRVEIKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 137 (Ca Ka016-A11)

LMLWIPGSTGEIVLTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLHPNGVTYLYWFRQKPG  
QSPQRLLYKVSNRDPGVDRFSGSGSEIDFTLIISRVEADDGGIYYCGQGIQNPFTF  
GQGTKLEIKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 138 (Ca Ka016-A12)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSIGDIVMTQTPLSLSVSPGESASISCKASQSLHNSGNT  
YLYWFRQKPGHSPQRLLHQVSSRDPGVDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGLY  
YCGQGTQFPFTFGQGTKVEIKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 139 (Ca Ka016-B1)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSIGDIVMTQTPLSLSVSPGESASISCKASQSLHNSGNT  
YLYWFRQKPGHSPQRLLHQVSSRDPGVDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGLY  
YCGQGTQFPFTFGQGTKVEIKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 140 (Ca Ka016-B2)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLHNSGNT  
YSFWFRQKPGQSPQRLLINLVSSRGPGVPDRFSGSGSGTDFTLISRVEADDAGVYY  
CGHGKEAPYTFSGQGTKLEIKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 141 (Ca Ka016-B3)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSGDIVMTQSPMSLSVGPGESASMSCKANQSLLYSYDGI  
TYLSWFLQRPQSPQRLLIYEVSKRDTGVPGRFIGSGAGTDFTLRISRVEADDAGV  
YYCGQALQFPLTFSQGAKLEIER

Tabla 14

SEQ. ID NO. 142 (Ca Ka016-B4)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDVVMQTPLSLSVRPGETASISCRASQSLHSSGIT  
KLFWYRQKPGQSPQRLVYWVSNRDPGVPDRFTGSGSGTDFTLRISRLEADDAGI  
YYCGHAIGFPLTFGQGTKVEIKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 143 (Ca Ka016-B5)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVRPGESASISCKASQSLHSGGGT  
YLNWFRQRPQSPQRLIYEVSKRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRITRVEADDTGIY  
YCGQNTQFPLTFGQGTKVEIKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 144 (Ca Ka016-B6)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGGIVMTQTPLSLSVRPGETASISCRASQSLLYSDGNT  
YLFWFRQKPGQSPQRLMYRVSDRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISGVEADDAGI  
YYCGQATHYPLEFGQGTKXVEIKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 145 (Ca Ka016-B7)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVRPGESASISCKASQSLHSGGGT  
YLNWFRQRPQSPQRLIYEVSKRDTGVPDRFIGSGAGTDFTLRISRVEADDAGVY  
YCGQGVQGPWTIGAGTKLELQR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 146 (Ca Ka016-B8)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSVSVSPGETASISCKASQSLSHDGNT  
YLHWFRQKPGQSPQRLIYKVSNRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDTGV  
YYCGQITQDPFTFGQGTKLEIKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 147 (Ca Ka016-B9)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLHNSGNT  
YLFWFRQKPGQSPQRLINWVSNRDPGVDRFGSGSGTDFTLRISRVEADDAGIY  
YCGQGIQGPYTFSGQTKLEIKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 148 (Ca Ka016-B10)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIAMTQTPLSLSVGPGETASITCKASQSLHNSGNT  
YLFWFRQKPGQSPQRLIYLVSNRDPGVDRFGSGSGTDFTLTISRVEADDAGIY  
YCGQATQTPPTFGAGTKLDLKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 149 (Ca Ka016-B11)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMAQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLHSDGRT  
CLSWFRQKSGQSPQRLIYEVSNRDTGVDRFGSGSGTDFTLRISRVEADDTGIYY  
CGQTVQFPLTFGQGTKLEIKR

Tabla 14

(SEQ. ID NO. 150) (Ca Ka016-B12)

GQSPQRLIYKVSNRDPGVDRFGSGSGTDFTLRISRVEPEDVGVYYCGQGTLP  
WTFGAGTKVELKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 151 (Ca Ka017-1)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDVVMQTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLHNSGN  
TFLWFRQ\*PGQSPQRLINLVSNRDPGVDRFGSGSGTDFTLRISRVEADDAGIY  
YCGQGLLAPPTFGQGTKVEIRR Note: \* indicates a stop codon

Tabla 14

SEQ. ID NO. 152 (Ca Ka017-2)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSGGDIVMTQTPPSLSVSPREPASISCKASQSLRSNGNT  
YLYWFRQKPGQSPGLIYRVSNRFTGVSDRFSGSGSGTDFTLRISTVEADDAGVY  
YCGQATQFPSTFSQGTKLEIKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 153 (Ca Ka017-3)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSXGDIVLTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLSNGITY  
LNWYRQRPGQSPQXLIYKVSNRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLRXSKVEADDTGIY  
YCGQDTQFPLTLGXGTHXEIKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 154 (Ca Ka017-5)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSTGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLSNGKT  
FLYWFRQKPGQSPQRLIYRVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGIY  
YCGQGIQDPTFGQGTKVEIKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 155 (Ca Ka017-6)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSGGDIVMTQTPPSLSVSPREAASISCKASQSLLSNGNT  
YFYWFRQKPGQVSEGLIYKVSSRFTGVSDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVY  
FCGQALQFPYTFSQGTKLDIKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 156 (Ca Ka017-10)

MRFPSQLLGLLMLWIPESGDVVLVTQTTPSLSLSPGETASISCKASRSLNSDGST  
YLDWYLQKPGQSPRLIYLVSNRFSGVSDRFSGSGSGTDFTLTISRVEADDAGVY  
YCGQGSRVPLTFGQGTKVEIKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 157 (Ca Ka017-11)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLHRNGIT  
YLSWFRQRPQGSPQRLINLVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDVGYY  
YCGHGLQTPYTFGQGSLEIER

Tabla 14

SEQ. ID NO. 158 (a Ka017-12)

MRFPSQLLGLLVWIPGSSGDIVMTQTPLSLSVSPGETVSISCRASQSLLYSDGNIY  
LFWFRKPGQSPQHLINLVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVYY  
CGQGTQPPYTFSGTKVEIKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 159 (Ca Ka017-13)

MRFPSQLLGLLMLWIPESGGDVVLTQTTPPSLSLSPGETASISCKASRLLNSDGST  
YLDWYLRKPGQSPRLLIYLVSNRFGVSDRFSGSGSGTDFTLTISRVEADDAGVY  
YCGQGSRVPLTFGQGTKVEIKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 160 (Ca Ka017-14)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMAQTPLSLSVSPGETASISCRASQSLHNSGIT  
YLFWYRQKPGQSPQRLISMVFNDRDPGVPDRFGSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGL  
YFCGHGTQIPYSFSQGTKLEIKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 161 (Ca Ka017-16)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSSGDIVMTQTPLSLSISPGEPASISCKASQSLHSGGDTY  
LNWFRQRPQGSPQLLINRVSSRKKGVDRFSGSGSGTEFTLRISRVEADDAGIYFC  
GQGTQFPYTFSGTKLEIKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 162 (Ca Ka017-20)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSGGDIVMTQTPPSLSVSPGEPASMSCKASQSLLSNGN  
TYLYWFRQKPGQSPEALIKVSNRFTGVSDRFSGSGSGTDFTLRINRVEADDVGV  
YYCGQGIQIPYTFSGTKLEIKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 163 (Ca Ka017-23)

MRFPSQLLGLLMLWIPGSTGEIVLTQTPLSLSVSPGESASISCKASQSLLSNGNT  
YLYWFRQKAGQSPQRVIYRVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLRISSVENDDAGV  
YYCGQGSSEDPPTFGAGTKVELKR

Tabla 14

SEQ. ID NO. 164 (Ca Ka017-24)

MRFPSQLLGLLTLWIPGSTGDIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCKASQSLLSNGNT  
YLYWFRQKPGQSPQRLLIKVSNRDPGVPXRFSGSGSGTDFTLRVSXVEADDAGV  
YYCGQGVQDPFTFGQGTKLEIKR

Figura 89

**CDR de mAb de ratón anti-NGF injertados en marcos de Ig humanas  
(anticuerpos dirigidos contra NGF con CDR injertada); CDR subrayadas**

Tabla 15

SEQ ID NO: 165 (Hu72 VH; CDR-GRAFT VH3-13/JH5)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMFWVRQATGKGLEWVSTISD  
GGSYTYITDNVKGRFTISRENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCARDWSDSEGF  
AYWGQGLTVTVSS

Tabla 15

SEQ ID NO: 166 (Hu73 VH (CDR-GRAFT VH1-18/JH6)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGRI  
DPYGGGTKHNEKFKRRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSGYDYY  
EDVWGQGLTVTVSS

Tabla 15

SEQ ID NO: 167 (HU77 VH (CDR-GRAFT VH1-69/JH6)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYIYWVRQAPGQGLEWMGRIDP  
ANGNTIYASKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYGYAYWG  
QGLTVTVSS

Tabla 15

SEQ ID NO: 168 HU80 VH (CDR-GRAFT VH1-18/JH6)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIYWVRQAPGQGLEWMGRIDP  
ANGNTIYASKFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARYGYAYWG  
QGLTVTVSS

Tabla 15

SEQ ID NO: 169 HU81 VH (CDR-GRAFT VH3-15/JH1)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNHYMYWVRQAPGKGLEWVGSISD  
GGAYTFYPDTVKG RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTEESANNGFA  
FWGQGLTVTVSS

Tabla 15

SEQ ID NO: 170 HU82 VH (CDR-GRAFT VH2-26/JH6)

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLTGYNINWIRQPPGKALEWLAMIWGY  
GDTDYN SALKSRLTISKDTSK SQVLTMTNMDPVDATYYCARDHYGGNDWY  
FDVWGQGT TVTVSS

Tabla 15

SEQ ID NO: 171 HU72 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)

DIVMTQTPLSLPVTGPGE PASISCRSSQIVQSN GNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKV  
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPPTFGQGTKLEIK  
R

Tabla 15

SEQ ID NO: 172 HU73 VL (CDR-GRAFT L22/JK2)

DIQMIQSPSFLSASVGD RVSII CRASENIYSFLAWYLQKPGKSPKLF LYNANTLAE  
GVSSRFSGRSGTDFTLTIISLKPEDFAAYYCFQGHFGTPPTFGQGTKLEIKR

Tabla 15

SEQ ID NO: 173 HU77 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)

DIVMTQTPLSLPVTGPGE PASISCKSTKSL L NGDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLV  
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFESNYLFI FQGTKLEIKR

Tabla 15

SEQ ID NO: 174 HU80 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)

DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCKSTKSLNNGDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLV  
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFESNYLFTFGQGTKLEIKR

Tabla 15

SEQ ID NO: 175 HU81 VL (CDR-GRAFT 01/JK2)

DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSILHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYRVS  
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGAHVPFIFGQGTKLEIKR

Tabla 15

SEQ ID NO: 176 HU82 VL (CDR-GRAFT 08/JK2)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSSLH  
SGVPSRFSGSGSGTDFFTISLQPEDIATYYCQQGKTLPRTFGQGTKLEIKR

Figura 90

Secuencias de anticuerpos quiméricos de ratón/cánido

Tabla 15A

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de PR-1290646 (SEQ ID:194)

DVLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVQSN GNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYK  
VSNRFSGV PDRFSGSGS GTFDLTKISREAEDLG VYYCFQGSHPFTFGSGTKLEIK  
RND AQP AVYLFQPSDQLHTGSASVVCLLSFY PKDINVKWKVDGVIQDTGIQE  
SVTEQDKDSTYLSSTLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD  
(SEQ ID NO:194)

Tabla 15A

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de PR-1290646 (SEQ ID:195)

EVHLVESGGGLV KPGGFLILSCAASGFTFSDYYMF WIRQTPGKRLEWVATISDGG  
SYTYYTDNVKGRFTISRDNVKNL YLQMSHLKSADTAMYYCARDWSDSEGFA  
YWGQGT LVTVSAASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACL VSGYFPEPVTVSWNS  
GSLTSGVHTFPSVLQSSGLHSLSSMVTVPSSR WPSETFTCNV VHPASNTKVDKPV  
FNECRCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILRITRTP EVCVVL DLGREDPEVQI  
SWFVDGKEVHTAKTQSREQQFNGTYRVVSVLPIEHQDWL TGKEFKCRVNHIDLP  
SPIERTISKARGRAHKPSVYVLPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNG  
QQEPERKHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHETLQNHY  
TDLSLSHSPGK (SEQ ID NO:195)

Tabla 15A

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de PR-1290654 (SEQ ID:196)

DIQMTQSPASLSASVGETVTVTCRA SENIYSFLA WHQKQKQKSPQLLVYNANTL  
AEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSY YCQH HFGTPFTFGSGTKLEIKRND  
AQP AVYLFQPSDQLHTGSASVVCLLSFY PKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTE  
QDKDSTYLSSTLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQR SECQRVD (SEQ  
ID NO:196)

ES 2 665 954 T3

Tabla 15A

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de PR-1290654 (SEQ ID:197)

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMHWVKQRPGQGLEWIGRIDP  
YGGGTKHNEKFKRKATVTADKSSSTAYILLSSLTSEDSAVYYCTRSGYDYYFDV  
WGTGTTVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSG  
SLTSGVHTFPSVLQSSGLHLSMVTVPSSRWPSETFTCNVHPASNTKVDKPVF  
NECRCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILRITRTPVTCVVLDLGREDPEVQIS  
WFDGKEVHTAKTQSREQQFNGTYRVVSVLPIEQDWLTGKEFKCRVNHIDLPS  
PIERTISKARGRAHKPSVYVLPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNQG  
QEPERKHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHETLQNHYT  
DLSLHSPGV (SEQ ID NO:197)

Tabla 15A

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de PR-1290656 (SEQ ID:198)

DVVLVTQTPSLPVNIGDQASISCKSTKSLNNGDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYL  
VSNRFSGVPDFRFSGSGSTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFESNYLFTFGSGTKLEM  
KRNDAPAVYLFQSPDQLHTGSASVVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQ  
ESVTEQDKDSTYLSSTLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFRSECQRVD  
(SEQ ID NO:198)

Tabla 15A

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de PR-1290656 (SEQ ID:199)

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIYWVKQRPEQGLEWIGRIDPAN  
GNTIYASKFQGKASITADTSSNTAYMQLSSLTSGDTAVYYCAGYGYAYWGQG  
TTLTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSG  
VHTFPSVLQSSGLHLSMVTVPSSRWPSETFTCNVHPASNTKVDKPVFNCR  
TDTPPCPVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILRITRTPVTCVVLDLGREDPEVQISWFD  
GKEVHTAKTQSREQQFNGTYRVVSVLPIEQDWLTGKEFKCRVNHIDLPSPIERT  
ISKARGRAHKPSVYVLPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNQQEPEP  
KHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHETLQNHYTDL  
HSPGK (SEQ ID NO:199)

Tabla 15A

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de PR-1290657 (SEQ ID:200)

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSILHSNGNTYLEWYLQKPGQSPNLLIYRV  
SNRFSGVPDRFSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYCFQGAHVPFIFGSGTKLEIK  
RNDAPAVYLFQPSDQLHTGSASVVCLLSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQE  
SVTEQDKDSTYLSSTLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLI KSFQRSECQRVD  
(SEQ ID NO:200)

Tabla 15A

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de PR-1290657 (SEQ ID:201)

EVQLVESGGGAVKPGGSLTLSCAASGFTFSNHYMYWVRQTPEKRLEWVASISD  
GGAYTFYPDTVKGRFTISRDNVNNNLYLQMRHLKSEDTAMYCTRESANNGF  
AFWGQGTLVTSAASTAPSVFLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWN  
SGSLTSGVHTFPSVLQSSGLHLSMVTVPSSRWPSETFTCNVHPASNTKVDKP  
VFNECRCTDTPPCVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILRITRTPVTCVVLDLGREDPEV  
QISWFVDGKEVHTAKTQSREQFNGTYRVVSVLPIEQDWLTGKEFKCRVNHID  
LPSPIERTISKARGRAHKPSVYVLPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSN  
GQQEPERKHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHETLQNH  
YTDLSLSHSPGV (SEQ ID NO:201)

Tabla 15A

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de PR-1290658 (SEQ ID:202)

DIQMTQTSSLSASLGDRVTITCRASQDITNYLNWYQKPDGTVKLLIYYTSRLH  
SGVPSRFSGSGTDYSLTISNLDQEDIATYFCQQGKTLPRTFGGGTKLEIKRNDA  
QPAVYLFQPSDQLHTGSASVVCLLSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQ  
DKDSTYLSSTLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD (SEQ ID  
NO:202)

Tabla 15A

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de PR-1290658 (SEQ ID:203)

QVQLKESG PGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTGYNINWVRQPPGKGLEWLGMIWGY  
GDTDYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQDDTARYYCARDHYGGNDWYF  
DVWGTGTTVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWN  
SGSLTSGVHTFPSVLQSSGLHSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVHPASNTKVDKP  
VFNECRCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFFPKPKDILRITRTPVTCVVLDLGREDPEV  
QISWFVDGKEVHTAKTQSREQFNGTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHID  
LPSPIERTISKARGRAHKPSVYVLPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSN  
GQQEPERKHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHETLQNH  
YTDLSLSHSPGK (SEQ ID NO:203)