

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 007**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2012 PCT/GB2012/051004**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2012 WO12153123**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2012 E 12723732 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2705056**

54 Título: **Anticuerpos anti-factor de crecimiento nervioso y procedimientos de preparación y uso de los mismos**

30 Prioridad:

06.05.2011 US 201161483491 P
06.09.2011 US 201161531439 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.03.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

GEARING, DAVID

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 704 007 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-factor de crecimiento nervioso y procedimientos de preparación y uso de los mismos.

Campo de la invención

5 La presente divulgación se refiere a anticuerpos y fragmentos de los mismos que actúan como antagonistas del factor de crecimiento nervioso equino. La invención se refiere a procedimientos para preparar los mismos y al uso terapéutico de estos anticuerpos y fragmentos en el tratamiento de afecciones asociadas con el factor de crecimiento nervioso, tales como dolor, trastornos relacionados con el dolor y afecciones que dan lugar a la aparición de dolor en equinos.

Antecedentes de la invención

10 El factor de crecimiento nervioso (FCN) es una proteína secretada de origen natural que consiste en una cadena polipeptídica alfa, beta y gamma. El FCN es un miembro de la familia de las neurotrofinas y está implicado en varios papeles diferentes. El FCN promueve la supervivencia y la diferenciación de las neuronas y señales sensoriales y simpáticas a través de dos receptores unidos a la membrana, p75, un receptor del FCN de baja afinidad y TrkA, una tirosina quinasa transmembrana y un receptor del FCN de alta afinidad. La unión del FCN a TrkA o p75 da como resultado una regulación positiva de neuropéptidos en neuronas sensoriales.

15 Se ha descrito la utilización de antagonistas del FCN para tratar el dolor y la sensibilidad al dolor en seres humanos (Cattaneo A., Curr. Op. Mol. Ther. 2010 12(1):94-106). Por ejemplo, la Solicitud de Patente Internacional N.º WO 2006/131951 describe una forma humanizada del anticuerpo monoclonal alfaD11 (α D11) de rata. El anticuerpo α D11 tiene especificidad de unión al FCN de ratón, pero también se sabe que se une a formas humanas y de rata del FCN. Se requiere la humanización del anticuerpo monoclonal procedente de rata alfaD11 (α D11) antes de la administración a seres humanos para minimizar la producción de anticuerpos neutralizantes que resultan de una respuesta de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA, de sus siglas en inglés) montada contra anticuerpos procedentes de roedores. Además, el reemplazo de dominios constantes de ratón con dominios constantes humanos permite seleccionar funciones efectoras cadena abajo.

20 El manejo del dolor en equinos actualmente se proporciona a través de la administración de fármacos analgésicos de varias clases, que incluyen anestésicos locales y generales, analgésicos opioides, agonistas α_2 , fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y esteroides. Cada uno de estos debe administrarse con frecuencia y también tiene limitaciones de eficacia y seguridad. Por consiguiente, existe una necesidad de un alivio del dolor para los equinos que sufren de dolor crónico, como los que tienen dolor de cáncer o artritis, y se administran de forma poco frecuente, duradera y eficaz.

25 Si bien se sabe que el FCN se expresa en tejidos equinos, no se ha descrito ningún antagonista del FCN equino, ni la utilización de bloqueo de señalización mediada por el FCN en equinos para prevenir o aliviar el dolor. La utilización en equinos de anticuerpos conocidos que actúan como antagonistas anti-FCN en otras especies no sería factible debido a la producción de anticuerpos neutralizantes contra ellos. Además, la producción de un anticuerpo quimérico que comprende dominios constantes procedentes de equinos y dominios variables procedentes de un anticuerpo anti-FCN conocido tal como alfaD11 no se puede garantizar que se una al FCN equino. Además, dicho anticuerpo puede mostrar reactividad cruzada con otros epítopos diana que pueden estar presentes en los equinos, pero no en la especie de la que procede originalmente el anticuerpo. Además, la producción de anticuerpos neutralizantes contra ellos limitaría la administración a largo plazo del anticuerpo, lo que es un requisito particularmente importante cuando se trata una afección relacionada con el dolor crónico o una afección cancerosa. Igualmente, la producción de una forma equinizada de un anticuerpo anti-FCN utilizando un injerto de CDR, o una técnica relacionada también puede dar como resultado la producción de anticuerpos neutralizantes y puede mostrar además una reducción en la afinidad y avidez de unión al antígeno. Por consiguiente, existe una necesidad seria de miembros de unión que actúen como antagonistas del FCN equino y que retengan altos niveles de afinidad y avidez de unión, mientras que evitan la producción de anticuerpos neutralizantes contra ellos, para su uso en el manejo del dolor en equinos. El documento WO2010/027488 describe anticuerpos monoclonales. El documento WO2006/131951 describe moléculas que son capaces de inhibir la unión entre el FCN y el receptor TrkA como analgésicos con efecto prolongado.

30 Williams y col. (2010) Capítulo 21 en Antibody Engineering vol. 1 (Editado por Kontermann y Dübel) describe anticuerpos humanizados mediante injertos de CDR.

Sumario de la invención

35 Después de grandes esfuerzos, el presente inventor ha producido sorprendentemente anticuerpos equinizados y fragmentos de unión procedentes de los mismos que se unen específicamente al FCN equino. Se demuestra en el presente documento, de manera bastante inesperada, que la unión de los anticuerpos y fragmentos de unión de la divulgación al FCN equino secuestra la actividad biológica del FCN equino mediante la inhibición de la unión del FCN equino al receptor TrkA de alta afinidad o al receptor p75. Esto, a su vez, evita la regulación positiva de los neuropéptidos en neuronas sensoriales con el efecto resultante de que la sensación de dolor se reducirá o eliminará.

Los anticuerpos se han producido utilizando procedimientos de ADN recombinante de modo que son sustancialmente no inmunogénicos, es decir, los anticuerpos neutralizantes no se generan contra ellos cuando se administran a un sujeto equino. Tal descubrimiento es completamente sorprendente e inesperado, ya que los anticuerpos no se produjeron utilizando metodologías estándar, como el injerto de CDR, o similares.

5 La invención proporciona un procedimiento para preparar un anticuerpo adecuado para su uso en un equino que comprende las etapas de:

- proporcionar un anticuerpo donante de una especie distinta de un equino, en el que el anticuerpo donante tiene especificidad de unión para un antígeno diana presente en equinos;
- 10 - comparar cada resto de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de las regiones marco del anticuerpo donante con cada resto de aminoácido presente en una posición correspondiente en la secuencia de aminoácidos de las regiones marco de una pluralidad de anticuerpos equinos para identificar uno o más restos de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos de las regiones marco del anticuerpo donante que difieren de uno o más restos de aminoácidos en la posición correspondiente dentro de la secuencia de aminoácidos de las regiones marco de la pluralidad de anticuerpos equinos; y
- 15 - sustituir uno o más restos de aminoácidos identificados en el anticuerpo donante con uno o más restos de aminoácidos presentes en la posición correspondiente en la pluralidad de anticuerpos equinos para producir un anticuerpo modificado,

en el que el anticuerpo modificado no contiene ningún aminoácido en cualquier posición dentro de las regiones marco que sería extraño en la posición correspondiente en equinos,

20 en el que el anticuerpo modificado es capaz de unirse específicamente al factor de crecimiento nervioso equino (FCN) e inhibir la capacidad del FCN equino para unirse al receptor del FCN equino p75 o TrkA; y en el que la sustitución de un resto de aminoácido en el anticuerpo donante se realiza utilizando el principio de sustitución conservadora.

El inventor ha identificado un proceso que modifica un anticuerpo donante para su uso en un equino de tal manera que el anticuerpo modificado no contiene ningún aminoácido en ninguna posición dentro de las regiones marco que sería extraño en esa posición en los equinos. Por lo tanto, el anticuerpo modificado conserva la especificidad y afinidad del anticuerpo donante para el antígeno diana, pero, de manera importante, se modifica de manera tal que no se creen epítopos extraños. Por lo tanto, el anticuerpo modificado no se considera extraño en equinos y, por lo tanto, no induce una respuesta inmune en equinos, lo que podría llevar a una neutralización de la eficacia del anticuerpo, especialmente después de la administración a largo plazo.

30

En determinadas realizaciones, la etapa de sustituir uno o más restos de aminoácidos identificados comprende sustituir uno o más restos de aminoácidos identificados con uno o más restos de aminoácidos presentes en la posición correspondiente que tienen la mayor homología con los uno o más restos de aminoácidos sustituidos.

En determinadas realizaciones, el procedimiento comprende además la etapa de reemplazar dominios constantes de la cadena pesada y/o cadena ligera del anticuerpo donante con dominios constantes de una cadena pesada y/o ligera procedente de un anticuerpo equino.

35

Normalmente, el dominio constante de la cadena pesada se reemplaza con un dominio constante equino de tipo HC2.

El antígeno diana es el factor de crecimiento nervioso (FCN).

40 El procedimiento de la invención no comprende el injerto de CDR. Los anticuerpos preparados de acuerdo con el procedimiento de la invención comprenden CDR del anticuerpo donante, regiones marco equinizadas preparadas de acuerdo con el procedimiento de la invención y dominios constantes equinos.

Por consiguiente, de acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un anticuerpo equinizado o fragmento de unión del mismo que se une específicamente al factor de crecimiento neuronal equino (FCN). Normalmente, el anticuerpo equinizado o fragmento de unión del mismo neutraliza la función biológica del FCN, cuando se une al mismo. Es decir, la unión del anticuerpo equinizado o fragmento de unión al FCN secuestra la capacidad del FCN para unirse al receptor TrkA o al receptor p75. En ciertos ejemplos, el anticuerpo equinizado, o fragmento de unión del mismo, se une al FCN con una afinidad de unión K_D de 1×10^{-8} o menos. Normalmente, el anticuerpo equinizado no es inmunogénico en equinos.

45

50 El anticuerpo equinizado se prepara de acuerdo con el procedimiento de preparación de un anticuerpo de la invención.

En un aspecto adicional o relacionado de la divulgación, se proporciona un anticuerpo neutralizante, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que es capaz de unirse específicamente al factor de crecimiento nervioso equino (FCN), comprendiendo en o consistiendo esencialmente el anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo en una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85, 90, 95 o 99 % con la misma. En determinados ejemplos, dicha identidad tiene una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

55

En algunos ejemplos, el anticuerpo neutralizante es un anticuerpo monoclonal. En algunos ejemplos, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En algunos ejemplos, el anticuerpo es un anticuerpo equinizado, es decir, un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que se ha desinmunizada de manera tal que no se producirán anticuerpos neutralizantes contra ellos cuando se administre a un sujeto equino. El anticuerpo equinizado se prepara de acuerdo con el procedimiento de preparación de un anticuerpo de la invención. Normalmente, los dominios constantes de cadena pesada del anticuerpo se seleccionan o modifican mediante la sustitución o eliminación de aminoácidos, de manera que los dominios constantes no median funciones efectoras cadena abajo. Normalmente, dicha cadena pesada es una cadena pesada HC2 o HC6 equina. Se ha demostrado que estos isotipos carecen de función efectora (Lewis y col., Mol Immunol. Febrero de 2008; 45(3): 818-827). Incluso más normalmente, dicha cadena pesada es una cadena pesada HC2 equina. Los presentes inventores han demostrado que este isotipo es purificable mediante la unión a la proteína A.

En ciertos ejemplos, el anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo comprende, consiste en o consiste esencialmente en una de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85, 90, 95 o 99 % de homología de secuencia con la misma. En determinados ejemplos, dicha identidad tiene una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

En un aspecto adicional o relacionado, se proporciona un anticuerpo neutralizante, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que es capaz de unirse específicamente al factor de crecimiento nervioso equino (FCN), comprendiendo, consistiendo en o consistiendo esencialmente el anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo en una región variable pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85, 90, 95 o 99 % con la misma. En determinados ejemplos, dicha identidad tiene una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

Normalmente, la región variable de la cadena pesada (VH) está unida a una secuencia de aminoácidos adicional que comprende al menos un dominio constante de inmunoglobulina. En ciertos ejemplos, el dominio constante de inmunoglobulina procede de un anticuerpo de la subclase IgG (inmunoglobulina G) para formar la cadena pesada completa del anticuerpo equinizado de la divulgación. Se conocen siete dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina gamma (IgG) equina distintos. Normalmente, dichos dominios constantes comprenden CH1, CH2 y CH3 junto con un enlace adecuado (o "bisagra") ubicado entre dichos dominios CH1 y CH2. Normalmente, el anticuerpo anti-FCN equino de la divulgación que comprende un dominio variable de cadena pesada unido a un dominio constante, en el que el dominio constante no media funciones efectoras cadena abajo tales como la fijación de complemento, ADCC, la unión al receptor Fc, o similares. Dichas cadenas pesadas pueden comprender cadenas pesadas que tienen isotipos HC2 o HC6 y pueden tener una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, 6 o 7. Incluso más normalmente, dicha cadena pesada es una cadena pesada HC2 equina.

En ciertos ejemplos, el anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo comprende, consiste en, o consiste esencialmente en una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, que se relaciona con el dominio constante equino IgG2 (HC2) o con la SEQ ID NO: 7 que se relaciona con el dominio constante equino IgG6 (HC6) o una secuencia que tiene una identidad de aminoácido de al menos 85, 90, 95 o 99 % con la misma. En determinados ejemplos, dicha identidad tiene una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

En ciertos ejemplos adicionales, el anticuerpo o fragmento de unión puede comprender una cadena pesada en la que al menos un resto en el dominio constante ha sido sustituido o eliminado para prevenir la glicosilación de ese resto. La desglucosilación de restos del dominio constante puede limitar las funciones efectoras cadena abajo al prevenir la unión del dominio constante (dominio Fc) a los receptores Fc (FcR) provistos en las células. Por consiguiente, en ciertos ejemplos adicionales, el anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo comprende, consiste en, o consiste esencialmente en una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 (versión aglicosilada de IgG2 (HC2)) o la SEQ ID NO: 9 (versión aglicosilada de IgG6 (HC6)) o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95 % de la misma. En determinados ejemplos, dicha identidad tiene una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

En un aspecto adicional o relacionado, la presente divulgación se extiende a un anticuerpo neutralizante, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que es capaz de unirse específicamente al factor de crecimiento nervioso equino (FCN), comprendiendo, consistiendo o consistiendo esencialmente el anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo en una cadena ligera y una cadena pesada en la que la región variable de la cadena ligera (VL) comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85, 90, 95 o 99 % con la misma, y en la que la región variable de la cadena pesada (VH) comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85, 90, 95 o 99 % con la misma. En determinados ejemplos, dicha identidad tiene una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20

aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

5 En ciertos ejemplos, el anticuerpo o miembro de unión comprende una cadena ligera que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene una identidad de aminoácido de al menos el 85 %, más preferentemente el 95 % y más preferentemente al menos el 98 % de identidad con la misma. En determinados ejemplos, dicha identidad tiene una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

10 En ciertos ejemplos, el anticuerpo o miembro de unión comprende una cadena pesada que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 85 %, más preferentemente el 90 % y más preferentemente al menos el 98 % de identidad con la misma. En determinados ejemplos, dicha identidad tiene una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

15 Normalmente, los dominios constantes de cadena pesada del anticuerpo se seleccionan o modifican mediante la sustitución o eliminación de aminoácidos, de manera que los dominios constantes no median funciones efectoras cadena abajo. Normalmente, dicha cadena pesada es una cadena pesada HC2 o HC6 equina. Incluso más normalmente, dicha cadena pesada es una cadena pesada HC2 equina. En ciertos ejemplos, el anticuerpo o miembro de unión comprende una cadena pesada que comprende, consiste en o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 85 %, más preferentemente el 90 % y más preferentemente al menos 98 % de identidad con la misma. En determinados ejemplos, dicha identidad tiene una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos. La SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 6 comprenden cadenas pesadas de HC2, que se ha demostrado que carecen de función efectora, pero se pueden purificar utilizando columnas de Proteína A. Esto permite que los anticuerpos que tienen cadenas pesadas HC2 se purifiquen a gran escala en la fabricación y, por lo tanto, es ventajoso.

20

25

En determinadas realizaciones, el anticuerpo puede conjugarse con al menos una molécula indicadora.

30 En determinadas realizaciones adicionales, al menos un resto en el dominio constante se puede sustituir o eliminar para evitar la glicosilación de ese resto. Por consiguiente, en ciertos ejemplos adicionales, el anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo comprende, consiste en o consiste esencialmente en una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 85 %, más preferentemente el 90 % y más preferentemente al menos el 98 % de identidad con la misma. En determinados ejemplos, dicha identidad tiene una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

35 El inventor ha definido además una serie de regiones marco (FR, de sus siglas en inglés) que se pueden combinar con regiones determinantes de complementariedad (CDR, de sus siglas en inglés) para formar dominios variables de cadena ligera y pesada equinizados. Cada uno de los dominios de cadena pesada y ligera equinos tiene 4 regiones marco, denominadas FR1, FR2, FR3 y FR4.

40 Una molécula de anticuerpo puede comprender un dominio variable de cadena pesada que comprende regiones CDR1, CDR2 y CDR3 y regiones marco interpuestas asociadas. Las CDR del dominio variable de cadena pesada (VH) se conocen como HCDR, y estas CDR se encuentran en las siguientes posiciones de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat: HCDR1 - restos de Kabat 31-35, HCDR2 - restos de Kabat 50-65, HCDR3 - restos de Kabat 95-102 (Kabat EA y col. (1991) Sequences of proteins of immunological interest, 5ª edición. Bethesda: US Department of Health and Human Services).

45 Además, un anticuerpo comprende además un dominio variable de cadena ligera que comprende regiones CDR1, CDR2 y CDR3 y regiones marco interpuestas asociadas. Las CDR del dominio variable de cadena ligera (VL) se conocen como LCDR, y estas CDR se encuentran en las siguientes posiciones de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat: LCDR1 - restos de Kabat 24-34, LCDR2 - restos de Kabat 50-56, LCDR3 - restos de Kabat 89-97.

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

En un aspecto adicional o relacionado, la presente divulgación se extiende a un anticuerpo anti-FCN, o un fragmento de unión al antígeno del FCN del mismo, comprendiendo el anticuerpo o fragmento de unión a anticuerpo una región variable de cadena ligera que comprende al menos uno de:

- 55 una región marco FR1 que consiste o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10
 una región marco FR2 que consiste o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11,
 una región marco FR3 que consiste o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y
 una región marco FR4 que consiste o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13

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

- 5 una región marco FR1 que consiste o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14,
 una región marco FR2 que consiste o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15,
 una región marco FR3 que consiste o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, y
 una región marco FR4 que consiste o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

Normalmente, las CDR de cadena ligera y pesada proceden de un anticuerpo que tiene especificidad de unión al FCN, preferentemente al FCN equino.

Normalmente, la producción del anticuerpo equinizado anti-FCN equino de la divulgación no requiere que se introduzcan mutaciones en las regiones marco de los dominios variables de la cadena ligera o pesada.

- 10 En ciertos ejemplos, el dominio variable de cadena ligera que comprende dicha al menos una región marco descrita anteriormente está unido a un dominio constante de cadena ligera procedente de equino, normalmente, un dominio constante de cadena ligera kappa, pero opcionalmente una cadena ligera lambda. En ciertos ejemplos, dicha cadena ligera comprende una región FR1 con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, una región FR2 con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, una región FR3 con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y una región FR4 con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 o una región marco con una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85, 90, 95 o 98 % a la anterior. En determinados ejemplos, dicha identidad tiene una longitud de al menos aproximadamente 5 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 10 aminoácidos.

- 20 En ciertos ejemplos adicionales, la región variable de la cadena pesada que comprende al menos una de las regiones marco descritas anteriormente está unida a un dominio constante de cadena pesada procedente de equino. En ciertos ejemplos, la secuencia de aminoácidos del dominio constante carece de cualesquiera modificaciones postraduccionales, o puede modificarse para eliminar cualquiera o todos los restos que pueden estar sujetos a glicosilación ligada a N o glicosilación ligada a O, de manera que los dominios constantes están aglicosilados. En determinados ejemplos, la cadena pesada comprende una región FR1 con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14, una región FR2 con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, una región FR3 con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, y una región FR4 con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17 o una región marco con una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85, 90, 95 o 98 % a la anterior. En determinados ejemplos, dicha identidad tiene una longitud de al menos aproximadamente 5 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 10 aminoácidos.

- 30 En determinadas realizaciones adicionales, se pueden hacer modificaciones a las regiones marco descritas en el presente documento. Es decir, el inventor ha identificado que para algunos restos en cada región marco, hay una opción de aminoácidos para una posición dada. Cabe destacar que, estas modificaciones de la región marco no dan como resultado un cambio conformacional a las regiones determinantes de complementariedad, ya que esto puede alterar la afinidad y/o la especificidad de unión del anticuerpo resultante. En determinadas realizaciones, la invención se extiende a la introducción de 2 o más sustituciones de aminoácidos a los restos de aminoácidos de las regiones marco de la región variable de la cadena ligera y/o la región variable de la cadena pesada.

- 40 Por consiguiente, en ciertos ejemplos adicionales, la divulgación se extiende a polipéptidos, como un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene una región FR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 que se ha modificado mediante una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos (en las que los aminoácidos se indican por su código de una sola letra): el resto de aminoácido I en la posición 2 (12) se reemplaza por el resto de aminoácido V, S7 es T, A9 es E, L11 es V, S12 es T o A, A13 es V, S14 es T, E17 es Q, T18 es R, T20 es E, I21 es I, L, M o V y E22 es K. Además, una o más de las siguientes sustituciones pueden proporcionarse además: D1 es G, K o V, I2 es F, N, S o T, V3 es A, G, I o M, M4 es L, Q o V, T5 es A o I, S7 es F, A9 es D, P o S, S10 es F, L o T, L11 es S, S12 es E o V, A13 es L, Q o T, S14 es A o P, L15 es P o R, G16 es R, T18 es S, G o K, V19 es A, T20 es D o V, I21 es T y E22 es L, N, Q, R, S o T.

- 50 En determinados ejemplos adicionales, la región FR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 puede modificarse mediante una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: K5 es R, Q8 es E, S9 es A, K11 es R o E, L12 es R. Además, una o más de las siguientes sustituciones pueden proporcionarse además: Y2 es F o H, Q3 es R o S, Q4 es H, K, R o V, K5 es V, P6 es I, L o S, S9 es P, R, V o T, P10 es L, K11 es I o L, L12 es A, E, G, H, Q, o W, L13 es F, I, M o V, I14 es F, T, M o V y Y15 es A, C, D, E, F, G, H, Q, R, S, T o V.

- 55 En determinados ejemplos adicionales, la región FR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 puede modificarse mediante una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: S4 es D, F6 es Y, D14 es E, Y15 es F, S16 es T, N20 es S, S24 es A, S29 es I, S o T y F31 es Y. Además, una o más de las siguientes sustituciones pueden proporcionarse además: G1 es D o F, V2 es A o F, P3 es L o S, S4 es A, E, G o L, F6 es L, S7 es C, F, G, N, R o T, G8 es A, S9 es D, E, G, K, R, T o W, G10 es A, R o V, S11 es A, F, T o Y, G12 es E o T, T13 es A, S o W, S16 es A o V, L17 es F o P, T18 es A, I, S o V, I19 es V, N20 es D, G o T, S21 es D, E, P, R o T, Q23 es E o R, S24 es E o T, E25 es A, D, G o T, D26 es N, V27 es A, L, E, G o S, A28 es G, S29 es D, E, F, L,

M, N o V, Y30 es C y F31 es H, S, T, V o W.

5 En determinados ejemplos adicionales, la región FR4 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 puede modificarse mediante la siguiente sustitución de aminoácidos: L9 es I. Además, una o más de las siguientes sustituciones pueden proporcionarse además: F1 es I o L, Q3 es L, T5 es S, K6 es M, N o R, L7 es M o V, E8 es A, D o K, L9 es F, M o V y K10 es A, E, G, I, Q, R, T o V.

10 En determinados ejemplos adicionales, la región FR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 puede modificarse mediante la siguiente sustitución de aminoácidos: N13 puede ser K. Además, una o más de las siguientes sustituciones pueden proporcionarse adicionalmente: K5 puede ser Q, G10 puede ser D, L11 puede ser Q, V12 puede ser M, N13 puede ser M o R, P14 puede ser I o S, S15 puede ser A o G, Q16 puede ser E, T17 puede ser A, S19 puede ser T, T21 puede ser S o V, T23 puede ser A, F o S, V24 puede ser I, S25 puede ser T, G26 puede ser A, F27 puede ser A, G, I, M, N Q o S, S28 puede ser D, H, I, L, N o P, L29 puede ser D, S, T o V y T30 puede ser E, I, N o R.

15 En determinados ejemplos adicionales, la región FR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15 puede modificarse mediante la siguiente sustitución de aminoácidos: W12 es F. Además, una o más de las siguientes sustituciones pueden proporcionarse adicionalmente: V2 puede ser L, A5 puede ser P, S o V, K8 puede ser W, G9 puede ser R, L10 puede ser P o W, W12 puede ser E, H, R, V o Y y G14 puede ser A, D o S.

20 En determinados ejemplos adicionales, la región FR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 puede modificarse mediante una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: T3 es S, R6 es K, F14 es Y, Q16 es T, M17 es L, R32 es G. Además, A2 puede ser C, G, I, T o V, T3 puede ser D, I, M N o R, I4 es V, T5 es I, L o S, R6 es E o S, D7 es E o N, T8 es A, E, I, P, S o Y, S9 es E, G, K o T, K10 es E, L, N, Q o R, S11 es G, K, N o R, Q12 es E, H o R, V13 es A, I, L, F o S, F14 es L, R,S, T o V, L15 es V, Q16 es I, M17 es V, N18 es D, K, R, S o T, S19 es D, E, G, K, M o T, L20 es M o V, T21 es S, S22 es D, E, G o R, E23 es D o G, T25 es A, A26 es S, V27 es D, Y29 es A, F, I o W, A31 es E, G, I, S, T o V y R32 es A, E, G, H, I, K o S.

25 En determinados ejemplos adicionales, la región FR4 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17 puede modificarse mediante la siguiente sustitución de aminoácidos: Q3 es P.

En determinados ejemplos de los aspectos anteriores de la divulgación, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Normalmente, el anticuerpo es un anticuerpo equinizado.

30 En determinados ejemplos adicionales de los aspectos anteriores de la divulgación, el anticuerpo neutralizante del FCN equinizado de la divulgación, o el fragmento de unión procedente del mismo se une específicamente al FCN equino (factor de crecimiento nervioso) con una afinidad de unión que tiene una constante de disociación de equilibrio (K_D) de 1×10^{-8} o menos. Además, se prefiere que los anticuerpos equinizados no tengan reactividad cruzada con ningún otro epítipo presente en equinos, y además que los anticuerpos neutralizantes no se generen contra los anticuerpos de la divulgación cuando se administran a un equino. Además, se prefiere que los dominios constantes de los anticuerpos no medien ninguna función efectora cadena abajo que incluya, pero no se limite a, la fijación y activación del complemento, la unión y activación del receptor Fc y ADCC.

35 En determinadas realizaciones adicionales, se pueden hacer modificaciones a la secuencia de aminoácidos de las regiones constantes de la cadena pesada a los anticuerpos de la invención. Dicha modificación puede implicar la adición, sustitución o eliminación de uno o más restos de aminoácidos. Dichos cambios de aminoácidos se realizan normalmente para modificar las características funcionales del anticuerpo. Por ejemplo, la modificación de aminoácidos se puede realizar para prevenir funciones efectoras cadena abajo mediadas por los dominios constantes de anticuerpos, por ejemplo, evitando la capacidad del anticuerpo para unirse a los receptores Fc, activar el complemento o inducir ADCC. Además, se pueden realizar modificaciones en la región bisagra del dominio constante de cadena pesada para modificar la semivida circulatoria de un anticuerpo cuando se administra a un equino.

40 Normalmente, los dominios constantes de cadena pesada del anticuerpo se seleccionan o modifican mediante la sustitución o eliminación de aminoácidos, de manera que los dominios constantes no median funciones efectoras cadena abajo. Normalmente, dicha cadena pesada es una cadena pesada HC2 o HC6 equina. Incluso más normalmente, dicha cadena pesada es una cadena pesada HC2 equina.

45 En un aspecto adicional o relacionado, la divulgación se extiende a un anticuerpo o fragmento de unión del mismo que se une específicamente a una o más proteínas solubles equinas en las que el anticuerpo no media funciones efectoras cadena abajo y en las que el anticuerpo es purificable mediante la unión a la proteína A.

50 En ciertos ejemplos, la una o más proteínas solubles se seleccionan del grupo que consiste en CSF, interleucinas, factores de crecimiento y neurotrofinas. En ciertos ejemplos, la una o más proteínas solubles es una neurotrofina. En ciertos ejemplos, la una o más proteínas solubles es el FCN.

55 En ciertos ejemplos, el anticuerpo comprende una cadena pesada que se ha seleccionado o modificado por medio de la sustitución o eliminación de aminoácidos, de manera que el anticuerpo no media en las funciones efectoras

cadena abajo.

En ciertos ejemplos, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene un isotipo HC2. Se ha demostrado que los anticuerpos que comprenden isotipos HC2 carecen de función efectora y son purificables utilizando una columna de Proteína A o cromatografía de afinidad de Proteína A.

- 5 En ciertos ejemplos, el anticuerpo es un anticuerpo que se ha obtenido después de la purificación mediante la unión a la proteína A, por ejemplo, utilizando una columna de proteína A o una cromatografía de afinidad de proteína A.

En ciertos ejemplos, el anticuerpo comprende una cadena ligera y una cadena pesada en el que la región variable de la cadena ligera (VL) comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85, 90, 95 o 99 % con la misma, y en el que la
10 región variable de la cadena pesada (VH) comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85, 90, 95 o 99 % con la misma. En determinados ejemplos, dicha identidad tiene una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

15 En ciertos ejemplos, el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene una identidad de aminoácido de al menos el 85 %, más preferentemente el 95 % y más preferentemente al menos el 98 % de identidad con la misma. En determinados ejemplos, dicha identidad tiene una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

20 En ciertos ejemplos, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende, consiste en o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 85 %, más preferentemente el 90 % y más preferentemente al menos el 98 % de identidad con la misma. En determinados ejemplos, dicha identidad tiene una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente
25 aproximadamente 25 aminoácidos.

En ciertos ejemplos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Normalmente, el anticuerpo es un anticuerpo equinizado.

En determinados ejemplos adicionales, el anticuerpo de la divulgación, o el fragmento de unión procedente del mismo se une específicamente al FCN equino (factor de crecimiento nervioso) con una afinidad de unión que tiene
30 una constante de disociación de equilibrio (K_D) de 1×10^{-8} o menos. Además, se prefiere que los anticuerpos no tengan reactividad cruzada con ningún otro epítipo presente en equinos, y además que los anticuerpos neutralizantes no se generen contra los anticuerpos de la divulgación cuando se administran a un equino.

En ciertos ejemplos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, no media funciones efectoras cadena abajo. Normalmente, el anticuerpo o fragmento de unión tiene un subtipo HC2 de cadena pesada equina.

35 El anticuerpo equinizado se prepara de acuerdo con el procedimiento de preparación de un anticuerpo de la invención.

La presente divulgación se extiende a fragmentos de anticuerpos que se unen al FCN equino y secuestran su capacidad para unirse a los receptores p75 y TrkA equinos.

40 En determinados ejemplos, el fragmento de unión a anticuerpo de cualquiera de los anticuerpos de la divulgación puede comprender una secuencia de cadena pesada y cadena ligera de la divulgación que está conectada mediante un enlazador flexible para formar un anticuerpo de cadena única.

Una sola cadena Fv (scFv) comprende un dominio VH y VL. Los dominios VH y VL se asocian para formar un sitio de unión diana. Estos 2 dominios están unidos covalentemente mediante un enlazador peptídico. Una molécula scFv puede tener la forma de VL-enlazador-VH, en los casos en los que se requiere el dominio variable de la cadena ligera en el extremo N, o como VH-enlazador-VL en los casos en los que el dominio VH se requiere en el extremo N.
45 Por consiguiente, en ciertos ejemplos adicionales, el fragmento de unión a antígeno es un fragmento de anticuerpo de cadena única Fv (scFv, de sus siglas en inglés). En determinados ejemplos adicionales, el fragmento de unión a anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en, pero no se limite a, un fragmento de anticuerpo Fab, un fragmento de anticuerpo Fab', un fragmento de anticuerpo F(ab')₂, un fragmento de anticuerpo Fv, un fragmento de anticuerpo sFv, o similares.
50

En determinados ejemplos adicionales, la divulgación proporciona anticuerpos multiespecíficos o multivalentes que comprenden un anticuerpo anti-FCN o fragmento de unión de la divulgación acoplado o unido a otros anticuerpos con diferentes especificidades de unión para su uso en terapia de combinación. Un anticuerpo multiespecífico comprende al menos un anticuerpo o fragmento de unión específico a un primer epítipo del FCN, y al menos un sitio
55 de unión específico a otro epítipo presente en el FCN equino, o a un antígeno diferente. Un anticuerpo multivalente

comprende anticuerpos o fragmentos de unión de anticuerpos que tienen especificidad de unión al mismo epítipo del FCN equino. Por consiguiente, en determinados ejemplos, la divulgación se extiende a una proteína de fusión de anticuerpos que comprende cuatro o más regiones Fv o regiones Fab de los anticuerpos equinizados de la presente divulgación. Un ejemplo adicional se extiende a una proteína de fusión de anticuerpos que comprende una o más regiones Fab procedentes de un anticuerpo descrito en el presente documento junto con una o más regiones Fab o Fv de anticuerpos específicos para el FCN equino. En determinados ejemplos adicionales, la divulgación se extiende a un anticuerpo biespecífico, en el que un anticuerpo o fragmento de unión del mismo de acuerdo con la presente divulgación se une a un anticuerpo secundario o fragmento de unión del mismo que tiene especificidad de unión para una diana secundaria, no siendo dicha diana un FCN equino. Preferiblemente, dicha diana secundaria ayuda a prevenir la señalización mediada por FCN a través de los receptores p75 o TrkA. Dichos anticuerpos multivalentes, biespecíficos o multiespecíficos se pueden producir mediante una variedad de procedimientos recombinantes que serían bien conocidos por los expertos en la materia.

En un aspecto adicional más de la divulgación, se proporciona un anticuerpo neutralizante anti-neurotrofina que comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y/o un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En ciertos ejemplos, la neurotrofina es el factor de crecimiento nervioso equino (FCN).

Un aspecto adicional más de la divulgación proporciona un procedimiento para tratar, inhibir o mejorar el dolor en un equino, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-FCN equino, o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo es un anticuerpo equinizado,
- administrar el mismo a un equino que lo necesite.

En ciertos ejemplos, el anticuerpo equinizado comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad y/o un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de homología de secuencia.

En ciertos ejemplos, el anticuerpo equinizado comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95 % con el mismo y/o una cadena pesada que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 y una secuencia que tiene una identidad de aminoácido de al menos el 95 % y más preferentemente al menos el 98 % de identidad con la anterior.

En ciertos ejemplos, el anticuerpo equinizado o fragmento de unión a antígeno del mismo es cualquiera de los proporcionados por los aspectos anteriores de la divulgación.

En ciertos ejemplos, el dolor es dolor neuropático. En particular, el dolor puede ser postoperatorio o postcirugía. Se puede producir dolor postoperatorio después de cualquier procedimiento de operación que en equinos puede incluir, aunque sin limitaciones, cirugía ortopédica, cirugía de tejidos blandos, procedimientos de ovariectomía y similares. En determinados ejemplos adicionales, el dolor es dolor crónico asociado con el cáncer o una afección cancerosa (dolor oncológico). En determinados ejemplos adicionales, el dolor está asociado con, o es resultado de, inflamación, prurito, artritis reumatoide u osteoartritis. En determinados ejemplos adicionales, el dolor está asociado con, o es resultado de, dolor en el pie palmar, hematomas subsolares, laminitis, abscesos en las pezuñas, post traumatismo, trauma post-carrera, síndrome navicular y desmitis suspensiva proximal.

De acuerdo con un aspecto adicional más de la presente divulgación, se proporciona un procedimiento para el tratamiento de la artritis en un sujeto equino, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-FCN equino de acuerdo con la divulgación o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y
- administrar el mismo a un equino que lo necesite.

En ciertos ejemplos, el anticuerpo es un anticuerpo equinizado. En ciertos ejemplos, el anticuerpo equinizado comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene al menos un 85 % de identidad y/o un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de homología de secuencia.

En ciertos ejemplos, la artritis o afección artrítica incluye las afecciones seleccionadas del grupo que consiste en poliartritis mediada inmune, artritis reumatoide, osteoartritis y afecciones relacionadas.

Normalmente, el tratamiento de la artritis o afección artrítica comprende mejorar, inhibir, reducir, suprimir o retrasar el inicio del dolor asociado con, o atribuible a, la afección artrítica.

Un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona un procedimiento para el tratamiento de una afección causada por, asociada con o que resulta en una mayor sensibilidad al factor de crecimiento nervioso (FCN) en un sujeto equino, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- 5
- proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-FCN equino de acuerdo con la divulgación o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y
 - administrar el mismo a un equino que lo necesite.

De acuerdo con un aspecto adicional más de la presente divulgación, se proporciona un procedimiento para el tratamiento de un tumor inducido para proliferar mediante el FCN en un equino y las afecciones asociadas con él, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- 10
- proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-FCN equino de acuerdo con la divulgación o fragmento de unión a antígeno del mismo, y
 - administrar el mismo a un equino que lo necesite.

En ciertos ejemplos, el tumor es un osteosarcoma. En ciertos ejemplos, se induce la proliferación del tumor mediante el FCN autocrino o paracrino.

- 15
- En ciertos ejemplos, los procedimientos anteriores de la divulgación comprenden además la etapa de coadministrar al menos un agente adicional que puede aumentar y/o complementar la eficacia del anticuerpo anti-FCN de la divulgación. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede coadministrarse junto con al menos un analgésico, AINE, opioide, corticosteroide, esteroide, ácido hialuronano o hialurónico.

- 20
- Los ejemplos de analgésicos adecuados incluyen, pero sin limitación a butorfanol, buprenorfina, fentanilo, flunixin meglumina, merpidina, morfina, nalbufina y derivados de los mismos. Los AINE adecuados incluyen, pero sin limitación a, acetaminofeno, ácido acetilsalicílico, carprofeno, etodolaco, cetoprofeno, meloxicam, firocoxib, robenacoxib, deracoxib y similares.

- 25
- En determinados ejemplos adicionales, el al menos un agente adicional puede ser un agente terapéuticamente activo que puede ser uno o más del grupo seleccionado de: un antibiótico, antifúngico, antiprotzoario, antiviral o agentes terapéuticos similares. Además, el al menos un agente adicional puede ser un inhibidor de los mediadores de la inflamación, como un antagonista del receptor de PGE, un agente inmunosupresor, como la ciclosporina, un glucocorticoide antiinflamatorio. En determinados aspectos adicionales, el al menos un agente adicional puede ser un agente que se utiliza para el tratamiento de la disfunción o deterioro cognitivo, como la pérdida de memoria o afecciones relacionadas que pueden llegar a ser cada vez más frecuentes en los equinos más viejos. Aún más, el al
- 30
- al menos un agente adicional puede ser un antihipertensivo u otro compuesto utilizado para el tratamiento de la disfunción cardiovascular, por ejemplo, para tratar hipertensión, isquemia miocárdica, insuficiencia cardíaca congestiva y similares. Aún más, el al menos un agente adicional puede ser un diurético, vasodilatador, antagonista del receptor beta-adrenérgico, inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina-II, bloqueador de canales de calcio, inhibidor de la HMG-CoA reductasa, fenilbutazona, ácido hialurónico, glicosaminoglicano polisulfatado,
- 35
- antagonista del receptor de interleucina 1, IRAP, diclofenaco y fármacos osteoartríticos modificadores de la enfermedad.

- 40
- En ciertos ejemplos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se administra al equino como parte de los procedimientos anteriores en una dosis que varía de aproximadamente 0,01 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, en particular de 0,03 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal.

En varios aspectos adicionales, la presente divulgación se extiende a una composición que comprende un anticuerpo o fragmento de unión del mismo de acuerdo con cualquier aspecto anterior de la divulgación. En ciertos ejemplos, la composición comprende además al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 45
- Un aspecto adicional más de la divulgación proporciona una composición farmacéutica para tratar el dolor, o una afección que resulta de o causada por dolor crónico en un equino, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo equinizado anti-FCN equino de acuerdo con la presente divulgación, junto con al menos un vehículo excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. En ciertos ejemplos, la composición puede comprender además al menos un analgésico, AINE, opioide, corticosteroide o esteroide.

- 50
- En varios aspectos adicionales, la presente divulgación se extiende a un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o fragmentos de unión de anticuerpo de la divulgación.

- 55
- Por consiguiente, un aspecto adicional más de la divulgación proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la divulgación. En ciertos ejemplos, el polinucleótido codifica un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo equinizado anti-FCN equino o fragmento de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

En ciertos ejemplos adicionales, el polinucleótido codifica un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo equinizado anti-FCN equino o fragmento de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9.

- 5 En ciertos ejemplos, el ácido nucleico aislado comprende además un ácido nucleico que codifica una o más secuencias reguladoras unidas operativamente al mismo.

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

Otro aspecto adicional más proporciona una célula hospedadora que incorpora el vector de expresión del aspecto anterior de la divulgación. Un aspecto adicional de la divulgación proporciona una célula hospedadora que produce el anticuerpo de cualquiera de los aspectos anteriores de la divulgación.

15 Un aspecto adicional más de la divulgación proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo neutralizante equinizado anti-FCN equino, comprendiendo el procedimiento la etapa de cultivar la célula hospedadora del aspecto anterior de la divulgación para permitir que la célula exprese el anticuerpo neutralizante equinizado anti-FCN equino.

20 Un aspecto adicional más de la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo equinizado anti-FCN equino de acuerdo con la divulgación que comprende las etapas de expresar uno o más de los polinucleótidos/ácidos nucleicos o vectores de los aspectos anteriores de la divulgación que expresan las cadenas ligeras y/o pesadas de los anticuerpos de la divulgación en una célula hospedadora adecuada, recuperar los polipéptidos expresados, que pueden expresarse juntos en una célula hospedadora, o por separado en diferentes células hospedadoras, y aislar los anticuerpos.

25 Un aspecto adicional más de la divulgación proporciona un procedimiento para tratar, mejorar o inhibir el dolor en un equino, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al equino una cantidad eficaz de un polinucleótido de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la divulgación.

30 Un aspecto adicional más de la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la divulgación, o una composición farmacéutica de acuerdo con los aspectos anteriores de la divulgación, o un ácido nucleico de acuerdo con los aspectos anteriores de la divulgación, o un vector de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la divulgación para su uso en el tratamiento, prevención o mejora del dolor en un equino.

35 En ciertos ejemplos, el dolor es dolor agudo. En ejemplos adicionales, el dolor es dolor crónico. Además, el dolor puede ser dolor postoperatorio o dolor resultante de cualquier procedimiento operativo que en los equinos puede incluir, aunque sin limitaciones, cirugía ortopédica, cirugía de tejidos blandos, procedimientos de ovariectomía y similares. En determinados ejemplos adicionales, el dolor es dolor crónico asociado con el cáncer o una afección cancerosa. En determinados ejemplos adicionales, el dolor está asociado con, o es resultado de, inflamación, prurito, artritis reumatoide u osteoartritis. El dolor se puede asociar con, o ser resultado de, dolor en el pie palmar, hematomas subsolares, laminitis, abscesos en las pezuñas, post traumatismo, trauma post-carrera, síndrome navicular y desmitis suspensiva proximal.

40 Un aspecto adicional más de la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la divulgación, o una composición farmacéutica de acuerdo con los aspectos anteriores de la divulgación, o un ácido nucleico de acuerdo con los aspectos anteriores de la divulgación, o un vector que comprende el mismo de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la divulgación para su uso en el tratamiento de osteoartritis y/o artritis reumatoide.

45 Un aspecto adicional más de la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la divulgación, o una composición farmacéutica de acuerdo con los aspectos anteriores de la divulgación, o un ácido nucleico o vector que comprende el mismo, de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la divulgación para su uso en el tratamiento de un tumor inducido para proliferar mediante el FCN en un equino y afecciones asociadas con él, en particular osteosarcoma. En ciertos ejemplos, se induce la proliferación del tumor mediante el FCN autocrino o paracrino.

50 Un aspecto adicional más de la divulgación proporciona la utilización de un anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la divulgación, o una composición farmacéutica de acuerdo con los aspectos anteriores de la divulgación, o un ácido nucleico de acuerdo con los aspectos anteriores de la divulgación, o un vector que comprende el mismo de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la divulgación en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención del dolor en un equino.

55 El dolor puede ser dolor agudo o crónico. En determinados ejemplos, el dolor es dolor crónico. Además, el dolor

5 puede ser dolor postoperatorio o dolor resultante de cualquier procedimiento operativo que en los equinos puede incluir, aunque sin limitaciones, cirugía ortopédica, cirugía de tejidos blandos y similares. En determinados ejemplos adicionales, el dolor es dolor crónico asociado con el cáncer o una afección cancerosa. En determinados ejemplos adicionales, el dolor está asociado con, o es resultado de, inflamación, prurito, artritis reumatoide u osteoartritis o además puede ser dolor asociado con, o como resultado de, dolor en el pie palmar, hematomas subsolares, laminitis, abscesos en las pezuñas, post traumatismo, trauma post-carrera, síndrome navicular y desmitis suspensiva proximal.

10 Un aspecto adicional más de la divulgación proporciona la utilización de un anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la divulgación, o una composición farmacéutica de acuerdo con los aspectos anteriores de la divulgación, o un ácido nucleico de acuerdo con los aspectos anteriores de la divulgación, o un vector que comprende el mismo de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la divulgación en la preparación de un medicamento para el tratamiento, inhibición, mejora o prevención de la artritis reumatoide u osteoartritis en un equino.

15 Un aspecto adicional más de la divulgación proporciona la utilización de un anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la divulgación, o una composición farmacéutica de acuerdo con los aspectos anteriores de la divulgación, o un ácido nucleico o vector que comprende el mismo, de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la divulgación en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un tumor inducido para proliferar mediante el FCN en un equino y afecciones asociadas con él, en particular osteosarcoma. En ciertos ejemplos, se induce la proliferación del tumor mediante el FCN autocrino o paracrino.

20 En un aspecto adicional más, se proporciona una línea celular, o un derivado o célula de progenie de la misma, que produce anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-FCN equino, o fragmentos de los mismos de acuerdo con la divulgación.

25 Un aspecto adicional más de la presente divulgación proporciona un kit para el tratamiento del dolor en equinos, o para el tratamiento de una afección asociada con el dolor, o para el tratamiento, mejora o inhibición del dolor asociado con la osteoartritis, artritis reumatoide, inflamación, prurito, dolor en el pie palmar, hematomas subsolares, laminitis, abscesos en las pezuñas, post traumatismo, trauma post-carrera, síndrome navicular y desmitis suspensiva proximal que comprende un anticuerpo anti-FCN equino de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la divulgación e instrucciones para su uso en la misma.

30 Un aspecto adicional más de la presente divulgación proporciona un kit de diagnóstico para la detección de un anticuerpo monoclonal anti-FCN equino en fluidos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, para su uso en la determinación de la concentración de dicho anticuerpo. El kit puede comprender cualquiera de los anticuerpos de la divulgación o un fragmento de unión del mismo. El kit puede incluir instrucciones para su uso.

Breve descripción de las figuras

35 La Figura 1 es una gráfica que muestra la unión de un anticuerpo equinizado producido de acuerdo con la invención al FCN murino y equino.

40 Las Figuras 2A y B muestran un gel que muestra la purificación de la proteína A de los anticuerpos equinizados preparados mediante el procedimiento de la invención como se reveló mediante transferencia de Western utilizando un anticuerpo policlonal anti equino específico para la cadena pesada (A) y un gel que muestra los resultados de la purificación de anticuerpos equinizados utilizando SDS-Page (B).

La Figura 3 muestra una gráfica que muestra la inhibición de la proliferación inducida por el FCN de células TF-1 mediante anticuerpos equinizados.

La Figura 4 muestra una gráfica que muestra la falta de deposición del complemento inducida por anticuerpos equinizados capturados por antígeno.

45 La Figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena ligera del anti-FCN equinizado (SEQ ID NO: 1). Las tres regiones CDR, identificadas de acuerdo con la numeración de Kabat, están subrayadas. Los asteriscos sobre un resto específico indican diferencias en la secuencia entre el anticuerpo monoclonal anti-FCN murino aD11 de rata.

50 La Figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena pesada del anti-FCN equinizado (SEQ ID NO: 2). Las tres regiones CDR, identificadas de acuerdo con la numeración de Kabat, están subrayadas. Los asteriscos sobre un resto específico indican diferencias en la secuencia entre el anticuerpo monoclonal anti-FCN murino aD11 de rata.

55 La Figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de un anticuerpo anti-FCN equinizado de cadena ligera kappa equina (eqN-kLC) del dominio variable de cadena ligera. Los restos del dominio variable se muestran en negra.

La Figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) de una cadena pesada de IgG-2 equina del dominio variable de cadena pesada del anti-FCN equinizado (eqN-HC2 (IgG2)). Los restos del dominio variable se muestran en negrita.

5 La Figura 9 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 7) de una cadena pesada de IgG-6 equina del dominio variable de cadena pesada del anti-FCN equinizado (eqN-HC6 (IgG2)) que tiene los dominios constantes de cadena pesada HC6. Los restos del dominio variable se muestran en negrita.

10 La Figura 10 muestra una comparación de los perfiles de cromatografía de afinidad de Proteína A de variantes de isotipo HC2 y HC6 de AcM anti-FCN equinizados. La Figura 10A y C ilustran la absorbancia UV (línea oscura) y los perfiles de conductividad (línea gris) después de cargar los sobrenadantes transfectantes con CHO de los anticuerpos Tipo 2 (HC2, Figura 10A) y tipo 6 (HC6, Figura 10C). Las Figuras 10B y D ilustran la recuperación del anticuerpo de la columna (medido por ELISA cuantitativo) y muestran que prácticamente todo el anticuerpo HC2 se unió a la columna y se recuperó mediante elución específica (Figura 10B), mientras que ningún anticuerpo HC6 se unió mediante la columna (Figura 10D).

15 La Figura 11 muestra que los anticuerpos monoclonales anti-FCN caninos preparados por un procedimiento correspondiente al procedimiento de la presente invención reducen el dolor inflamatorio en perros.

Descripción detallada de la invención

20 Tras una extensa experimentación, el inventor ha tomado la secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal (AcM) de rata anti-FCN de ratón α D11 y lo ha utilizado para producir un anticuerpo anti-FCN no inmunogénico. El anticuerpo resultante, que puede ser un anticuerpo quimérico o equinizado, no se produce utilizando técnicas estándar de injerto de CDR y se muestra sorprendentemente para exhibir una unión de alta afinidad al FCN equino. De manera incluso más sorprendente, se muestra el anticuerpo para neutralizar la función biológica del FCN equino, más específicamente mediante la inhibición de la unión del FCN a los receptores TrkA y p75 basados en células. Además, también se ha descubierto, inesperadamente, que cuando se administran a un equino, los anticuerpos neutralizantes no se producen en su contra. Por consiguiente, el anticuerpo no inmunogénico preparado mediante el

25 procedimiento de la invención es adecuado para el alivio a largo plazo del dolor crónico en caballos. El proceso de generación de los dominios variables de cadena pesada y ligera para los anticuerpos preparados mediante el procedimiento de la invención que ha sido empleado por el inventor da como resultado el reemplazo de restos de aminoácidos de rata (donante) específicos que están presentes dentro de las regiones marco de los dominios variables de cadena ligera y pesada con restos que, según el análisis del inventor, mantendrán la conformación de las regiones CDR y, por lo tanto, mantendrán la avidéz y la especificidad de unión, mientras que reducirán la presencia de epítomos inmunogénicos que pueden dar como resultado anticuerpos neutralizantes generados contra el anticuerpo, si se administrara a equinos en forma inalterada. Específicamente, el procedimiento de preparación de anticuerpos de la invención (conocido como PETización) comprende evaluar la secuencia de las regiones marco de un anticuerpo donante (por ejemplo, rata) para determinar su idoneidad para administrar a un equino mediante la

30 comparación de la secuencia de las regiones marco del anticuerpo donante con la secuencia de un anticuerpo o un conjunto de anticuerpos procedentes de equinos. Aunque la comparación puede ser entre la secuencia donante y un solo miembro de la secuencia diana, será obvio que se prefiere la comparación con un conjunto de secuencias diana porque esto expandirá el número de opciones naturales en cada posición de Kabat en la especie diana. Esto no solo aumentará la posibilidad de un "apareamiento" entre el donante y la diana, sino que también expandirá las opciones de reemplazo donde no existe un apareamiento. Como resultado, se podrá elegir un reemplazo con características lo más cerca posible del donante. Cuando la secuencia donante y la secuencia equina difieren en cualquier número de Kabat o posición correspondiente, la secuencia donante se modifica para sustituir el resto de aminoácido en cuestión con un resto de aminoácido que se sabe que es natural en esa posición en equinos.

35 Cuando se requiere la sustitución de un resto de aminoácido presente en una región marco de una inmunoglobulina donante, esto se realiza utilizando el principio de sustitución conservadora en el que un resto de aminoácido se reemplaza con un resto de aminoácido que es natural en esa posición de Kabat en un equino y está tan estrechamente relacionado como sea posible en tamaño, carga e hidrofobicidad con el aminoácido que se sustituye en la secuencia donante. La intención es elegir un reemplazo que no causaría ninguna perturbación o alteración de la estructura tridimensional del anticuerpo donante, o al menos solo la mínima. En ciertas situaciones, no habrá una opción clara y cada opción tendrá beneficios y desventajas. Una decisión final puede requerir un modelado tridimensional o incluso la expresión de varias secuencias alternativas. Sin embargo, generalmente, una clara preferencia estará disponible. Como resultado de este procedimiento, solo se realiza un cambio en la secuencia donante cuando ese resto sería extraño en la diana y el aminoácido de reemplazo está lo más relacionado posible con el que reemplaza. Por lo tanto, se evita la creación de epítomos extraños, pero la estructura tridimensional global se conserva y, como resultado, también se conservan la afinidad y la especificidad.

40

45

50

55

60 Las regiones constantes de cadena ligera y pesada proceden normalmente de anticuerpos procedentes de equinos (diana). Los dominios constantes de cadena pesada se seleccionan o modifican de manera tal que no median las funciones efectoras cadena abajo. Como se ha encontrado, bastante sorprendentemente, que no se producen anticuerpos neutralizantes o mínimos contra los anticuerpos producidos de acuerdo con la invención, se ha encontrado sorprendentemente que los anticuerpos tienen el beneficio asociado de una semivida circulatoria prolongada y la opción de repetir la dosificación. Además, como la sustitución de los restos marco se realiza de tal

manera que no afecte la conformación tridimensional de las regiones CDR, no habrá variación en la especificidad de unión.

5 Si bien se conocen anticuerpos híbridos quiméricos murinos-equinos, actualmente no hay ejemplos de anticuerpos monoclonales completamente equinizados descritos en la literatura. Por consiguiente, es altamente inesperado que dicho anticuerpo pueda producirse y demostrarse que tiene utilidad terapéutica.

Hay cuatro isotipos de IgG principales en el hombre y el ratón y, aunque la nomenclatura es similar, difieren en su comportamiento y función, incluida la afinidad por productos bacterianos como la Proteína A y la Proteína G, su capacidad para activar la citólisis dependiente del complemento (CDC) y su capacidad para inducir la muerte de células diana a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, de sus siglas en inglés). La selección de isotipos de IgG con CDC y ADCC activos o dominios constantes "armados" se considera de beneficio clínico cuando los anticuerpos están diseñados para eliminar células diana que tienen su antígeno afín, como en oncología o control de infecciones (por ejemplo, en el uso médico humano, se prefieren isotipos de IgG1 humana para los fines anteriores). Por el contrario, la activación del sistema inmune se considera indeseable en otros entornos, como en el alivio de la inflamación, el dolor o la autoinmunidad, por lo que se prefieren isotipos de IgG humana con una actividad mínima de CDC y ADCC (por ejemplo, en tales usos médicos humanos, se prefieren a menudo los isotipos de IgG4). Se han descrito siete isotipos de dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina gamma (IgG) en el sistema inmune equino junto con secuencias de dominio constante kappa y lambda individuales. Los siete dominios constantes de cadena pesada equina IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG5, IgG6 e IgG7 se han caracterizado en términos de actividad funcional mediada por ello. La selección de isotipos de IgG con dominios constantes activos para CDC y ADCC se considera beneficiosa cuando los anticuerpos están diseñados para eliminar células diana que tienen su antígeno afín, como en la oncología o el control de infecciones, por ejemplo, en uso médico humano se prefieren los isotipos de IgG1 humana. Por el contrario, la activación del sistema inmune se considera indeseable en otros entornos, como en el alivio de la inflamación, el dolor o la autoinmunidad, por lo que se prefieren los isotipos de IgG humana con actividad CDC y ADCC mínima o "desarmada", por ejemplo, en el uso médico humano, se seleccionarían los isotipos IgG4. Los isotipos de AcM equinos tienen un espectro más amplio de actividades, por lo que se presume que la selección de cadenas pesadas armadas o desarmadas tiene un valor similar.

Los anticuerpos de la divulgación comprenden dominios constantes de cadena pesada y ligera procedentes de equinos. Además, las regiones determinantes de complementariedad proceden del anticuerpo de rata anti-FCN de ratón α D11. El anticuerpo α D11 fue descrito por primera vez por Cattaneo y col. (Cattaneo A, Rapposelli B, Calissano P. (1988) "Three distinct types of monoclonal antibodies after long-term immunization of rats with mouse nerve growth factor". J Neurochem 50(4):1003-1010). El anticuerpo α D11 fue clonado posteriormente por Ruberti y col. (Ruberti, F. et al. (1993) "Cloning and Expression of an Anti-Nerve Growth Factor (FCN) Antibody for Studies Using the Neuroantibody Approach". Cellular and Molecular Neurobiology. 13(5):559-568).

35 Las regiones CDR procedentes del anticuerpo α D11 se combinan con secuencias de la región marco que el inventor ha determinado que conservan la estructura terciaria de las CDR y, por lo tanto, la especificidad de unión, al tiempo que evita que los anticuerpos neutralizantes se produzcan allí cuando se administra el anticuerpo a un equino.

Cada una de las regiones variables de la cadena ligera y pesada contiene cuatro regiones marco, denominadas FR1-FR4. Para cada una de estas regiones marco, el inventor ha identificado un resto amino preferido (denominado resto preferido) para cada posición específica, y además restos de aminoácidos alternativos que también podrían proporcionarse en esa posición. Las tablas 1 a 8 a continuación ilustran las 4 regiones marco para cada una de las cadenas pesadas y ligeras. Las tablas proporcionan la posición del aminoácido en relación con esa región marco específica y además de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat utilizado para identificar la posición de un resto particular a lo largo de la longitud del dominio variable de la cadena pesada o ligera completa. El resto o restos mostrados como restos del grupo 1 son los restos preferidos, mientras que los restos del grupo 2 son restos alternativos. Sin embargo, estos generalmente no serían preferibles a los restos que se muestran en el grupo 1 en relación con esa posición específica. Los restos de aminoácidos se identifican utilizando el sistema de nomenclatura de una sola letra.

Tabla 1 - Restos FR1 del dominio variable de cadena ligera

| Posición de FR1 en cadena ligera | Numeración de Kabat de la cadena ligera | Restos de aminoácidos del grupo 1 | Restos de aminoácidos del grupo 2 |
|----------------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 1 | D | GKV |
| 2 | 2 | IV | FNST |
| 3 | 3 | V | AGIM |
| 4 | 4 | M | LQV |

50

(continuación)

| Posición de FR1 en cadena ligera | Numeración de Kabat de la cadena ligera | Restos de aminoácidos del grupo 1 | Restos de aminoácidos del grupo 2 |
|----------------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 5 | 5 | T | AI |
| 6 | 6 | Q | |
| 7 | 7 | ST | F |
| 8 | 8 | P | |
| 9 | 9 | AE | DPS |
| 10 | 10 | S | FLT |
| 11 | 11 | LV | S |
| 12 | 12 | STA | EV |
| | | | |
| 13 | 13 | AV | LQT |
| 14 | 14 | ST | AP |
| 15 | 15 | L | PR |
| 16 | 16 | G | R |
| 17 | 17 | EQ | |
| 18 | 18 | TR | SGK |
| 19 | 19 | V | A |
| 20 | 20 | ET | DV |
| 21 | 21 | ILMV | T |
| 22 | 22 | EK | LNQRST |
| 23 | 23 | C | |

Tabla 2 - Restos FR2 del dominio variable de cadena ligera

| Posición de FR2 en cadena ligera | Numeración de Kabat de la cadena ligera | Restos de aminoácidos del grupo 1 | Restos de aminoácidos del grupo 2 |
|----------------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 35 | W | |
| 2 | 36 | Y | FH |
| 3 | 37 | Q | RS |
| 4 | 38 | Q | HKRV |
| 5 | 39 | KR | V |
| 6 | 40 | P | ILS |
| 7 | 41 | G | |
| 8 | 42 | QE | |
| 9 | 43 | AS | PRVT |
| 10 | 44 | P | L |

ES 2 704 007 T3

(continuación)

| Posición de FR2 en cadena ligera | Numeración de Kabat de la cadena ligera | Restos de aminoácidos del grupo 1 | Restos de aminoácidos del grupo 2 |
|----------------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 11 | 45 | KRE | IL |
| 12 | 46 | LR | AEGHQW |
| 13 | 47 | L | FIMV |
| 14 | 48 | I | FTMV |
| 15 | 49 | Y | ACDEFG HQRSTV |

Tabla 3 - Restos FR3 del dominio variable de cadena ligera

| Posición de FR3 en cadena ligera | Numeración de Kabat de la cadena ligera | Restos de aminoácidos del grupo 1 | Restos de aminoácidos del grupo 2 |
|----------------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 57 | G | DF |
| 2 | 58 | V | AF |
| 3 | 59 | P | LS |
| 4 | 60 | SD | AEGL |
| 5 | 61 | R | |
| 6 | 62 | FY | L |
| 7 | 63 | S | CFGNRT |
| 8 | 64 | G | A |
| 9 | 65 | S | DEGKRTW |
| 10 | 66 | G | ARV |
| 11 | 67 | S | AFTY |
| 12 | 68 | G | ET |
| 13 | 69 | T | ASW |
| 14 | 70 | DE | |
| 15 | 71 | YF | |
| 16 | 72 | ST | AV |
| 17 | 73 | L | FP |
| 18 | 74 | T | AISV |
| 19 | 75 | I | V |
| 20 | 76 | NS | DGT |
| 21 | 77 | S | DEPRT |
| 22 | 78 | L | |
| 23 | 79 | Q | ER |
| 24 | 80 | AS | ET |
| 25 | 81 | E | ADGT |

(continuación)

| Posición de FR3 en cadena ligera | Numeración de Kabat de la cadena ligera | Restos de aminoácidos del grupo 1 | Restos de aminoácidos del grupo 2 |
|----------------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 26 | 82 | D | N |
| 27 | 82A | V | ALEGS |
| 28 | 82B | A | G |
| 29 | 82C | IST | DEFLMNV |
| 30 | 83 | Y | C |
| 31 | 84 | FY | HSTVW |
| 32 | 85 | C | |

Tabla 4 - Restos FR4 del dominio variable de cadena ligera

| Posición de FR4 en cadena ligera | Numeración de Kabat de la cadena ligera | Restos de aminoácidos del grupo 1 | Restos de aminoácidos del grupo 2 |
|----------------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 95 | F | IL |
| 2 | 96 | G | |
| 3 | 97 | Q | L |
| 4 | 98 | G | |
| 5 | 99 | T | S |
| 6 | 100 | K | MNR |
| 7 | 101 | L | MV |
| 8 | 102 | E | ADK |
| 9 | 103 | IL | FMV |
| 10 | 104 | K | AEGIQRTV |

Tabla 5 - restos FR1 del dominio variable de cadena pesada

| Posición de FR1 en cadena pesada | Numeración de Kabat de la cadena pesada | Restos de aminoácidos del grupo 1 | Restos de aminoácidos del grupo 2 |
|----------------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 1 | Q | |
| 2 | 2 | V | |
| 3 | 3 | Q | |
| 4 | 4 | L | |
| 5 | 5 | K | Q |
| 6 | 6 | E | |
| 7 | 7 | S | |
| 8 | 8 | G | |
| 9 | 9 | P | |
| 10 | 10 | G | D |

ES 2 704 007 T3

(continuación)

| Posición de FR1 en cadena pesada | Numeración de Kabat de la cadena pesada | Restos de aminoácidos del grupo 1 | Restos de aminoácidos del grupo 2 |
|----------------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 11 | 11 | L | Q |
| 12 | 12 | V | M |
| 13 | 13 | NK | MR |
| 14 | 14 | P | IS |
| 15 | 15 | S | AG |
| 16 | 16 | Q | E |
| 17 | 17 | T | A |
| 18 | 18 | L | |
| 19 | 19 | S | T |
| 20 | 20 | L | |
| 21 | 21 | T | SV |
| 22 | 22 | C | |
| 23 | 23 | T | AFS |
| 24 | 24 | V | I |
| 25 | 25 | S | T |
| 26 | 26 | G | A |
| 27 | 27 | FL | AGIMNQS |
| 28 | 28 | S | DHILNP |
| 29 | 29 | L | DSTV |
| 30 | 30 | TS | EINR |

Tabla 6 - restos FR2 del dominio variable de cadena pesada

| Posición de FR2 en cadena pesada | Numeración de Kabat de la cadena pesada | Restos de aminoácidos del grupo 1 | Restos de aminoácidos del grupo 2 |
|----------------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 36 | W | |
| 2 | 37 | V | L |
| 3 | 38 | R | |
| 4 | 39 | Q | |
| 5 | 40 | A | PSV |
| 6 | 41 | P | |
| 7 | 42 | G | |
| 8 | 43 | K | W |
| 9 | 44 | G | R |
| 10 | 45 | L | PW |

ES 2 704 007 T3

(continuación)

| Posición de FR2 en cadena pesada | Numeración de Kabat de la cadena pesada | Restos de aminoácidos del grupo 1 | Restos de aminoácidos del grupo 2 |
|----------------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 11 | 46 | E | |
| 12 | 47 | WF | EHRVY |
| 13 | 48 | V | |
| 14 | 49 | G | ADS |

Tabla 7 - restos FR3 del dominio variable de cadena pesada

| Posición de FR3 en cadena pesada | Numeración de Kabat de la cadena pesada | Restos de aminoácidos del grupo 1 | Restos de aminoácidos del grupo 2 |
|----------------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 66 | R | |
| 2 | 67 | A | CGITV |
| 3 | 68 | ST | DIMNR |
| 4 | 69 | I | V |
| 5 | 70 | T | ILS |
| 6 | 71 | RK | ES |
| 7 | 72 | D | EN |
| 8 | 73 | T | AEIPSY |
| 9 | 74 | S | EGKT |
| 10 | 75 | K | ELNQR |
| 11 | 76 | S | GKNR |
| 12 | 77 | Q | EHR |
| 13 | 78 | V | AILFS |
| 14 | 79 | FY | LRSTV |
| 15 | 80 | L | V |
| 16 | 81 | QT | I |
| 17 | 82 | ML | V |
| 18 | 82A | N | DKRST |
| 19 | 82B | S | DEGKMT |
| 20 | 82C | L | MV |
| 21 | 83 | T | S |
| 22 | 84 | S | DEGR |
| 23 | 85 | E | DG |
| 24 | 86 | D | |
| 25 | 87 | T | A |
| 26 | 88 | A | S |

(continuación)

| Posición de FR3 en cadena pesada | Numeración de Kabat de la cadena pesada | Restos de aminoácidos del grupo 1 | Restos de aminoácidos del grupo 2 |
|----------------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 27 | 89 | V | D |
| 28 | 90 | Y | |
| 29 | 91 | Y | AFIW |
| 30 | 92 | C | |
| 31 | 93 | A | EGISTV |
| 32 | 94 | RG | AEGHIKS |

Tabla 8 - restos FR4 del dominio variable de cadena pesada

| Posición de FR4 en cadena pesada | Numeración de Kabat de la cadena pesada | Restos de aminoácidos del grupo 1 | Restos de aminoácidos del grupo 2 |
|----------------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 103 | W | |
| 2 | 104 | G | |
| 3 | 105 | Q | P |
| 4 | 106 | G | |
| 5 | 107 | I | |
| 6 | 108 | L | |
| 7 | 109 | V | |
| 8 | 110 | T | |
| 9 | 111 | V | |
| 10 | 112 | S | |
| 11 | 113 | - | |

5 El anticuerpo equinizado de la divulgación, por lo tanto, difiere de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal quimérico que consiste en una región variable completa procedente de una primera especie y dominios constantes procedentes de una segunda especie, o de un anticuerpo equinizado injertado con CDR, en el que las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las regiones variables de cadena pesada y ligera comprenden restos de aminoácidos procedentes de un anticuerpo donante e introducidos en regiones marco (FR) y regiones constantes (CR, de sus siglas en inglés) procedentes de un anticuerpo diana o de secuencias de la línea germinal equina.

10 Se prefiere que el anticuerpo equinizado retenga sustancialmente las propiedades de unión del anticuerpo parental (donante) del que proceden las CDR. Eso significa que el anticuerpo equinizado exhibirá la misma o sustancialmente la misma afinidad y avidéz de unión al antígeno que el anticuerpo donante del que proceden las CDR. Idealmente, la afinidad del anticuerpo equinizado no será inferior al 10 % de la afinidad del anticuerpo donante por el epítipo diana, más preferentemente no inferior a aproximadamente el 30 %, y lo más preferentemente la afinidad no será inferior al 50 % del anticuerpo parental (donante). Los procedimientos para ensayar la afinidad de unión a antígeno son bien conocidos en la materia e incluyen ensayos de unión semimáximos, ensayos de competición y análisis de Scatchard.

20 Como se define en el presente documento anteriormente, la presente divulgación se extiende a miembros de unión o fragmentos de unión a antígeno procedentes de los anticuerpos equinizados de la divulgación. Dichos fragmentos de unión a antígeno se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente al FCN equino. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. En ciertos ejemplos, los miembros de unión o fragmentos de unión a antígeno pueden ser miembros de unión aislados. Un miembro de unión o fragmento de unión a antígeno de la divulgación puede comprender un fragmento de los anticuerpos de la presente divulgación, por

ejemplo, un fragmento de una molécula de anticuerpo completamente equinizado, como solo la cadena pesada o ligera, o, por ejemplo, el dominio variable de la cadena pesada y/o ligera. En ciertos ejemplos, un miembro de unión normalmente puede comprender, consistir, o consistir esencialmente en un dominio VH y/o VL de anticuerpo. Los dominios VH de los miembros de unión también se proporcionan como parte de la divulgación. Dentro de cada uno de los dominios VH y VL hay 3 regiones determinantes de complementariedad ("CDR"), junto con 4 regiones marco asociadas ("FR"). Un dominio VH comprende normalmente 3 HCDR (regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada), y un dominio VL comprende normalmente 3 LCDR (regiones de complementariedad de cadena ligera). Por consiguiente, un miembro de unión puede comprender un dominio VH que comprende, en secuencia, regiones VH CDR1 (o HCDR1), CDR2 (HCDR2) y CDR3 (HCDR3) junto con una pluralidad de regiones marco asociadas. Un miembro de unión puede comprender adicional o alternativamente un dominio VL que comprende los dominios VL CDR1, CDR2 y CDR3 junto con las regiones marco asociadas. Los dominios VH o VL normalmente comprenden cuatro regiones marco, FR1, FR2, FR3 y FR4, intercaladas con las 3 regiones determinantes de complementariedad en la siguiente disposición: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

La Figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-FCN preparado de acuerdo con la invención. Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están subrayadas. Además, La Figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-FCN preparado de acuerdo con la invención. Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están subrayadas.

En las Figuras 5 y 6, los restos del dominio variable de la cadena ligera (Figura 5) y el dominio variable de la cadena pesada (Figura 6) pueden numerarse convencionalmente de acuerdo con el sistema de numeración ideado por Kabat y col. (Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H., Gottesman, K. y Foeller, C. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, decimoquinta edición. Publicación NIH N.º 91-3242, Kabat y col. (1971) *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-391). El sistema de numeración de Kabat se refiere a un sistema de numeración de restos de aminoácidos que es más variable (es decir, hipervariable) que otros restos de aminoácidos en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo. El sistema de numeración de Kabat se utiliza generalmente cuando se hace referencia a un resto en el dominio variable (aproximadamente los restos 1-104 de la cadena ligera y los restos 1-113 de la cadena pesada). Este sistema de numeración solo se utiliza en la presente especificación donde se indica específicamente. Esto se debe a que las designaciones de restos de Kabat no siempre se corresponden directamente con la numeración lineal de los restos de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera de la presente divulgación proporcionada en las secuencias relevantes enumeradas en el presente documento. En particular, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o adicionales que en la numeración de Kabat estricta correspondiente a un acortamiento en, o inserción en, un componente estructural, ya sea una región marco o una región determinante de complementariedad (CDR), de la estructura básica del dominio variable de la cadena pesada o ligera. La numeración correcta de Kabat de los restos puede determinarse para cualquier anticuerpo dado mediante la alineación de los restos en la secuencia del anticuerpo con una secuencia estándar a la que se ha aplicado la numeración de Kabat.

La figura 6 muestra una secuencia amino de dominio variable de cadena pesada. También se muestra en la SEQ ID NO: 2. Sin embargo, en la Figura 6, la numeración tiene en cuenta los restos de aminoácidos 80, 80A, 80B y 80C, siendo estas disposiciones de numeración de Kabat, mientras que en la SEQ ID NO: 2, la numeración lineal continúa secuencialmente, los restos 80, 80A, 80B y 80C se enumeran secuencialmente como 80, 81, 82 y 83. Lo mismo es cierto para los restos de Kabat 100, 100A, 100B, 100C, 100D, 100E y 100F en la Figura 7.

Como se describe en el presente documento anteriormente, un fragmento de unión a anticuerpo puede seleccionarse del grupo que comprende, pero no se limite a, un fragmento Fab, un fragmento Fab' y un scFv (fragmento variable de cadena única), o de un peptidomimético, un diacuerpo o un derivado multivalente relacionado.

En ciertos ejemplos, el fragmento de unión al anticuerpo es un fragmento Fab o F(ab')₂, que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1 de un anticuerpo heterotetramérico. En ciertos ejemplos, el dominio VL tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y el dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En ciertos ejemplos, los dominios CL y CH1 se basan en la secuencia de aminoácidos de un dominio CL y CH1 de una inmunoglobulina equina, en particular un dominio constante procedente de IgG2 (HC2) o IgG6 (HC6) equinas.

Las técnicas utilizadas para la producción recombinante de fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen las desveladas en la publicación de patente internacional PCT WO 92/22324, y en Sawai y col., "Direct Production of the Fab Fragment Derived From the Sperm Immobilizing Antibody Using Polymerase Chain Reaction and cDNA Expression Vectors", 1995, *AJRI* 34:26-34. Ejemplos de técnicas que se pueden utilizar para producir scFv (fragmentos Fv de cadena única) se describen en Huston y col., "Protein Engineering of Single-Chain Fv Analogs and Fusion Proteins", *Methods in Enzymology*, vol. 203:46-88 (1991).

En ciertos ejemplos, los fragmentos de anticuerpos pueden proceder de anticuerpos de longitud completa mediante digestión proteolítica de acuerdo con el procedimiento de Morimoto (Morimoto y col., "Single-step purification of F(ab')₂ fragments of mouse monoclonal antibodies (immunoglobulins G1) by hydrophobic interaction high performance liquid chromatography using TSKgel Phenyl-5PW" *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*

24:107-117 (1992)). Los fragmentos de anticuerpos también pueden producirse directamente mediante células hospedadoras (Carter y col., "High level Escherichia coli expression and production of a bivalent humanized antibody fragment" Bio/Technology 10:163-167 (1992)).

5 Además de proporcionar un anticuerpo monoclonal equinizado que tiene especificidad de unión al FCN equino y que antagoniza la función del FCN equino, la presente divulgación se extiende además a miembros de unión distintos a los anticuerpos que comprenden un par de dominios de unión basados en la secuencia de aminoácidos de una región VL (variable de cadena ligera) como se define en la SEQ ID NO: 1 y una secuencia de aminoácidos de una región VH (variable de cadena pesada) como se define en la SEQ ID NO: 2. En particular, la divulgación se extiende a dominios de unión únicos que se basan en la región VL o VH de los anticuerpos equinizados de los anticuerpos de la divulgación.

10 Por consiguiente, en ciertos ejemplos adicionales de la presente divulgación, se proporciona un miembro de unión que comprende, que consiste o consiste esencialmente en un único dominio de unión procedente del anticuerpo humanizado de la divulgación. En ciertos ejemplos, el dominio de unión único procede de la secuencia de aminoácidos del VH (dominio variable de cadena pesada) como se define en la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4. Tal dominio de unión puede utilizarse como un agente de direccionamiento para el FCN equino.

15 En determinadas realizaciones, se pueden utilizar técnicas de ingeniería adicionales para modificar los anticuerpos de la presente divulgación, por ejemplo, incluyendo modificaciones de la región Fc que pueden alterar la semivida en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor de Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, en determinadas realizaciones, pueden producirse anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que tienen patrones de glicosilación alterados. En determinadas realizaciones, un anticuerpo se altera para aumentar o disminuir el grado en que el anticuerpo está glicosilado. La glicosilación de polipéptidos está normalmente unida a N o unida a O. Unida a N se refiere a la unión de una fracción de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la fracción de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio potencial de glicosilación. La glicosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-aceilgalactosamina, galactosa o xilosa a un ácido hidroxiamino, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede utilizar 5-hidroxi prolina o 5-hidroxi lisina. El inventor ha proporcionado dominios de constantes equinos aglicosilados, que se definen en el presente documento como la SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9.

20 En determinados ejemplos adicionales, los anticuerpos anti-FCN equinos de la divulgación pueden PEGilarse mediante la reacción del anticuerpo con un derivado de glicol plietileno (PEG). En ciertos ejemplos, el anticuerpo está defucosilado y, por lo tanto, carece de restos de fucosa.

25 En determinadas realizaciones, las modificaciones en las propiedades biológicas de un anticuerpo pueden lograrse mediante la selección de sustituciones que afectan a (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, como una hoja o conformación helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con las similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (A. L. Lehninger, en Biochemistry, 2ª ed., 73-75, Worth Publishers, New York (1975)): (1) no polar: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M); (2) polar sin carga: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q); (3) ácido: Asp (D), Glu (E); (4) básico: Lys (K), Arg (R), His (H). Como alternativa, los restos de origen natural pueden dividirse en grupos según las propiedades comunes de la cadena lateral: (1) hidrófobo: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) hidrófilo neutro: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) ácido: Asp, Glu; (4) básico: His, Lys, Arg; (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; (6) aromático: Trp, Tyr, Phe. Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos restos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservadores o, en los sitios restantes (por ejemplo, no conservados).

30 En varios aspectos adicionales, la presente divulgación se extiende a un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti-FCN equino de la divulgación, o una porción de unión a antígeno del mismo unida a una molécula asociada. En ciertos ejemplos, dicho conjugado de anticuerpo-molécula asociada se conjuga por medio de un enlazador químico, tal como un enlazador peptídico, un enlazador de hidrazina o un enlazador disulfuro. En ciertos ejemplos, la pareja de acoplamiento es una molécula efectora, marcador, fármaco o molécula portadora. Los expertos en la materia conocerán bien las técnicas adecuadas para acoplar los anticuerpos de la divulgación tanto a parejas de acoplamiento peptídicos como no peptídicos. Los ejemplos de marcadores adecuados incluyen marcadores detectables, tales como un radiomarcador, o un marcador enzimático, como la peroxidasa de rábano picante, o fracciones químicas, como la biotina. Como alternativa, el marcador puede ser un marcador funcional, por ejemplo, ricina, o profármacos que son capaces de convertir profármacos en fármacos activos en el sitio de unión del anticuerpo.

35 En varios aspectos adicionales, la presente divulgación se extiende a polinucleótidos, y en particular a polinucleótidos aislados, que codifican los anticuerpos equinizados, fragmentos de anticuerpos y miembros de unión de la presente divulgación. Tal como se define en el presente documento, un "polinucleótido" incluye cualquier

5 polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado, o ARN o ADN modificados, incluidos, sin limitación, ARN de cadena simple y doble, y ARN que es una mezcla de regiones de cadena simple y doble. Un polinucleótido de la divulgación, por ejemplo, un polinucleótido que codifica un polipéptido o polipéptidos de la divulgación incluye variantes alélicas del mismo y/o sus complementos que incluyen un polinucleótido que se hibrida con dichas secuencias de nucleótidos en condiciones de rigurosidad moderada o alta.

10 La presente divulgación se extiende además a los miméticos de anticuerpos, tales como anticuerpos de dominio, nanocuerpos, unicuerpos, versacuerpos y duocalinas que se basan en los anticuerpos del FCN equino de la presente divulgación. El experto en la materia conoce una amplia variedad de tecnologías miméticas de anticuerpos. Por ejemplo, los llamados, anticuerpos de dominio (Domantis, Reino Unido) son pequeñas unidades funcionales de
 15 unión de anticuerpos que corresponden a las regiones variables de las cadenas ligeras o pesadas de anticuerpos humanos. Las instrucciones para la producción de dichos anticuerpos de dominio se pueden encontrar en la Patente de EE.UU. N.º 6.291.158, Patente de EE.UU. N.º 6.582.915 y Patente de EE.UU. N.º 6.593.081. Los nanocuerpos son proteínas terapéuticas procedentes de anticuerpos que contienen propiedades estructurales y funcionales únicas de los anticuerpos de cadena pesada de origen natural que se encuentran en los camélidos. Los unicuerpos son una tecnología adicional de fragmentos de anticuerpos, basada en la eliminación de la región bisagra de los anticuerpos IgG4. La eliminación de la región bisagra da como resultado una molécula que tiene aproximadamente la mitad del tamaño de un anticuerpo IgG4 tradicional y que tiene una región de unión univalente. Los unicuerpos conservan la propiedad de los anticuerpos IgG4 de ser inertes y, por lo tanto, no inducir respuestas inmunes.

20 Las moléculas de unión adicionales incluyen moléculas de anticuerpos (Patente de EE.UU. 5.831.012), DARPin (proteínas de repetición de anquirina diseñadas) (Publicación de Solicitud de Patente PCT Internacional WO 02/20565) y anticalinas (Patente de EE.UU. No.º 7.250.297 y WO 99/16873). Los versacuerpos son una tecnología adicional de miméticos de anticuerpos. Los versacuerpos (Amunix, Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2007/0191272) son proteínas pequeñas, denominadas microproteínas, de 3-5 kDa con más del 15 % de restos de cisteína, que forman un almacén de alta densidad de enlaces de disulfuro que reemplaza al núcleo hidrófobo
 25 cuya proteína normalmente exhibe.

Los avímeros son otro tipo de anticuerpo mimético. Los avímeros se originan a partir de la recombinación de familias de proteínas séricas humanas. Son cadenas de proteínas únicas compuestas de dominios de unión modulares, cada uno de los cuales está diseñado para unirse a un sitio diana en particular. Los avímeros pueden unirse
 30 simultáneamente a sitios en una única proteína diana y/o sitios en múltiples proteínas diana. Conocido como unión o avidez multipunto, este mecanismo de unión imita la forma en que las células y las moléculas interactúan en el cuerpo, apoya la generación de antagonistas y agonistas, y produce fármacos con múltiples funciones y una potente actividad. Las bibliotecas de avímeros se pueden producir de acuerdo con el documento WO 2004/044011 y, por ejemplo, el documento US 2005/0053973. Las bibliotecas de avímeros también están disponibles comercialmente en Avidia Inc, Mountain View, California, USA.

35 *Producción de anticuerpos*

Los anticuerpos y miembros de unión preparados mediante el procedimiento de la invención pueden producirse total o parcialmente mediante síntesis química. Por ejemplo, los anticuerpos y los miembros de unión se pueden preparar mediante técnicas que son bien conocidas por los expertos en la materia, tales como la síntesis de péptidos líquida estándar, o mediante procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida. Como alternativa, los anticuerpos y los
 40 miembros de unión pueden prepararse en solución utilizando técnicas de síntesis de péptidos en fase líquida, o además mediante una combinación de fase sólida, fase líquida y química de la solución.

La presente invención se extiende además a la producción de los anticuerpos o miembros de unión preparados mediante el procedimiento de la invención mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica al menos un aminoácido que comprende un anticuerpo preparado mediante el procedimiento de la invención en un sistema de
 45 expresión adecuado, de tal manera que pueda codificarse un péptido o polipéptido deseado. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica la cadena ligera del aminoácido y un segundo ácido nucleico que codifica una cadena pesada de aminoácido se pueden expresar para proporcionar un anticuerpo preparado mediante el procedimiento de la presente invención.

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

Normalmente, los ácidos nucleicos que codifican las secuencias de aminoácidos que forman anticuerpos o miembros de unión preparados mediante el procedimiento de la presente invención pueden proporcionarse en forma aislada o purificada, o proporcionarse en una forma que estén sustancialmente libres de material que pueda asociarse naturalmente con él, con la excepción de una o más secuencias reguladoras. El ácido nucleico que
 55 expresa un anticuerpo o miembro de unión preparado mediante el procedimiento de la invención puede ser total o parcialmente sintético y puede incluir, pero no se limita a, ADN, ADNc y ARN.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican los anticuerpos o miembros de unión preparados mediante el procedimiento de la invención se pueden preparar fácilmente por el experto utilizando técnicas que son bien

conocidas por los expertos en la materia, tales como las descritas en Sambrook y col. "Molecular Cloning", A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Volúmenes 1-3, 2001 (ISBN-0879695773), y Ausubel y col. "Short Protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 4ª edición, 1999 (ISBN - 0471250929). Dichas técnicas incluyen (i) la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar muestras de ácido nucleico, (ii) síntesis química o (iii) preparación de secuencias de ADNc. El ADN que codifica los anticuerpos o miembros de unión preparados mediante el procedimiento de la invención puede generarse y utilizarse de cualquier manera adecuada conocida por los expertos en la materia, que incluye tomar ADN codificante, identificar los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción adecuados a cada lado de la porción a expresar y cortar dicha porción del ADN. La porción extirpada puede entonces unirse operativamente a un promotor adecuado y expresarse en un sistema de expresión adecuado, tal como un sistema de expresión disponible comercialmente. Como alternativa, las porciones relevantes de ADN pueden amplificarse utilizando cebadores de PCR adecuados. Se pueden hacer modificaciones a las secuencias de ADN mediante la utilización de la mutagénesis dirigida al sitio.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican los anticuerpos o miembros de unión preparados mediante el procedimiento de la invención pueden proporcionarse como constructos en forma de un plásmido, vector, transcrito o casete de expresión que comprende al menos un ácido nucleico como se describe anteriormente. La construcción puede estar comprendida dentro de una célula hospedadora recombinante que comprende una o más construcciones como anteriormente. La expresión puede lograrse convenientemente mediante el cultivo, bajo condiciones apropiadas, de células hospedadoras recombinantes que contienen secuencias de ácido nucleico adecuadas. Después de la expresión, el anticuerpo o fragmentos de anticuerpo pueden aislarse y/o purificarse utilizando cualquier técnica adecuada, y luego utilizarse según sea apropiado.

Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de diferentes células hospedadoras son bien conocidos. Las células hospedadoras adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, levadura, insectos y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la materia para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino (CHO, de sus siglas en inglés), células HeLa, células de riñón de hámster bebé y células de mieloma de ratón NS0. Un hospedador bacteriano preferido común es *E. coli*. La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en células procariontas tales como *E. coli* está bien establecida en la materia. La expresión en células eucariotas en cultivo también está disponible para los expertos en la materia como una opción para la producción de un miembro de unión.

Las técnicas generales para la producción de anticuerpos son bien conocidas por las personas expertas en el campo, y dichos procedimientos se analizan, por ejemplo, en Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495-497; la Patente de EE.UU. N.º 4.376.110; Harlow y Lane, Antibodies: a Laboratory Manual, (1988) Cold Spring Harbor. Las técnicas para la preparación de moléculas de anticuerpos recombinantes se describen en las referencias anteriores y también en, por ejemplo, el número de patente europea 0.368.684.

En determinadas realizaciones de la invención, se emplean ácidos nucleicos recombinantes que comprenden un inserto que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o un dominio variable de cadena ligera de anticuerpos o miembros de unión. Por definición, dichos ácidos nucleicos comprenden codificar ácidos nucleicos monocatenarios, ácidos nucleicos bicatenarios que consisten en dichos ácidos nucleicos codificantes y ácidos nucleicos complementarios a los mismos, o estos ácidos nucleicos complementarios (monocatenarios) en sí mismos.

Además, los ácidos nucleicos que codifican un dominio variable de cadena pesada y/o un dominio variable de cadena ligera de anticuerpos pueden ser ácidos nucleicos sintetizados enzimáticamente o químicamente que tienen la secuencia auténtica que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o el dominio variable de cadena ligera de origen natural o un mutante de los mismos.

Un anticuerpo preparado mediante el procedimiento de la invención puede producirse por medios recombinantes, no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal, del polipéptido o proteína madura. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. Para las células hospedadoras procariontas que no reconocen y procesan una secuencia señal de anticuerpo nativa, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procarionta seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o enterotoxina II estable al calor.

El término "aislado", cuando se utiliza en referencia a los anticuerpos equinizados preparados mediante el procedimiento de la invención, o a miembros de unión procedentes de ellos, o polipéptidos que los codifican, se refiere al estado en que dichos anticuerpos, miembros de unión o ácidos nucleicos (polinucleótidos) se proporcionan en una forma aislada y/o purificada, es decir, se han separado, aislado o purificado de su entorno natural, y se proporcionan en una forma sustancialmente pura u homogénea, o, en el caso de ácido nucleico, libre o sustancialmente libre de ácido nucleico o genes de origen distintos de la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida. Por consiguiente, dichos anticuerpos aislados, miembros de unión y ácidos nucleicos aislados estarán libres o sustancialmente libres de material con el que están asociados de forma natural, como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su entorno natural, o el entorno en el que se preparan (por ejemplo, cultivos celulares) cuando dicha preparación es mediante tecnología de ADN recombinante practicada

in vitro o *in vivo*.

- Los anticuerpos, los miembros de unión y los ácidos nucleicos pueden formularse con diluyentes o adyuvantes y aún, para fines prácticos, pueden considerarse como proporcionados en una forma aislada. Por ejemplo, los anticuerpos y los miembros de unión se pueden mezclar con gelatina u otros vehículos si se utilizan para recubrir placas de microtitulación para su uso en inmunoensayos, o se mezclarán con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se usen en diagnóstico o terapia. Los anticuerpos o miembros de unión pueden estar glicosilados, ya sea de forma natural o por sistemas de células eucariotas heterólogas (por ejemplo, células CHO o NSO), o pueden estar (por ejemplo, si se producen mediante expresión en una célula procariota) sin glicosilar (aglicosilados).
- 10 Las preparaciones heterogéneas que comprenden moléculas de anticuerpo equinizadas anti-FCN equino también forman parte de la divulgación. Por ejemplo, dichas preparaciones pueden ser mezclas de anticuerpos con cadenas pesadas de longitud completa y cadenas pesadas que carecen de la lisina C-terminal, con diversos grados de glicosilación y/o con aminoácidos derivados, como la ciclación de un ácido glutámico N-terminal para formar un resto de ácido piroglutámico.

15 *Composiciones farmacéuticas*

- Normalmente, las composiciones farmacéuticas de la divulgación se formulan en una formulación líquida, una formulación liofilizada, una formulación liofilizada que se reconstituye como un líquido, o como una formulación en aerosol. En ciertos ejemplos, el anticuerpo en la formulación está en una concentración de: aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 45 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml o aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml.

- En ciertos ejemplos, la formulación comprende además un tampón. Normalmente, el pH de la formulación es de aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente pH 6,5. En ciertos ejemplos, el tampón puede comprender de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 60 mM de tampón de histidina, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM de tampón de succinato, o de aproximadamente 5 mM a 25 mM de tampón de acetato. En ciertos ejemplos, el tampón comprende cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 10 mM a 300 mM, normalmente a aproximadamente una concentración de 125 mM y citrato de sodio a una concentración de aproximadamente 5 mM a 50 mM, normalmente 25 mM. En ciertos ejemplos, la formulación puede comprender además un tensioactivo a una concentración de poco más del 0 % a aproximadamente el 0,2 %. En ciertos ejemplos, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en, pero no se limita a: polisorbato-20, polisorbato-40, polisorbato-60, polisorbato-65, polisorbato-80, polisorbato-85, y una combinación de los mismos. En un ejemplo preferido, el tensioactivo es polisorbato-20 y puede comprender además cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 125 mM y citrato de sodio a una concentración de aproximadamente 25 mM.

Administración

- 35 Los anticuerpos o miembros de unión de la presente divulgación pueden administrarse solos, pero preferentemente se administrarán como una composición farmacéutica que generalmente comprenderá un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado seleccionado, que depende de la vía de administración prevista. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados incluyen; agua, glicerol, etanol y similares.

- 40 El anticuerpo monoclonal o miembro de unión de la presente divulgación puede administrarse a un paciente equino que necesite tratamiento por cualquier vía adecuada. Normalmente, la composición se puede administrar parenteralmente mediante inyección o infusión. Los ejemplos de rutas preferidas para la administración parenteral incluyen, pero sin limitación a; intravenosa, intracardial, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, intracavidad, subcutánea, transmucosal, inhalación o transdermal. Las vías de administración pueden incluir además tópicas y enterales, por ejemplo, mucosa (incluyendo la pulmonar), oral, nasal, rectal.

- 45 En los ejemplos en que la composición se suministra como una composición inyectable, por ejemplo en aplicación intravenosa, intradérmica o subcutánea, el principio activo puede estar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la materia pueden preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como la inyección de cloruro de sodio, la inyección de Ringer o, la inyección de Ringer lactato. Se pueden incluir conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y / u otros aditivos, según se requiera.

La composición también puede administrarse a través de microesferas, liposomas, otros sistemas de suministro de micropartículas o formulaciones de liberación sostenida colocadas en ciertos tejidos, incluida la sangre.

- Los ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente y otras técnicas y protocolos que pueden utilizarse de acuerdo con la invención se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, Gennaro, A.R., Lippincott Williams & Wilkins; 20ª edición ISBN 0-912734-04-3 y Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems; Ansel, H.C. y col. 7ª Edición ISBN 0-683305-72-7.

Los anticuerpos y composiciones de la divulgación se administran normalmente a un sujeto en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esta una cantidad suficiente para mostrar un beneficio para el sujeto al que se administra la composición. La dosis real administrada, y la tasa y el tiempo de administración, dependerán, y pueden determinarse con la debida referencia a, la naturaleza y la gravedad de la afección que se está tratando, así como factores como la edad, el sexo y el peso del sujeto a tratar, así como la vía de administración. Se debe prestar más atención a las propiedades de la composición, por ejemplo, su actividad de unión y la vida del plasma in vivo, la concentración del anticuerpo o miembro de unión en la formulación, así como la ruta, el sitio y la velocidad de administración.

Los regímenes de dosificación pueden incluir una administración única del anticuerpo o composición de la divulgación, o múltiples dosis administrativas del anticuerpo o composición. El anticuerpo o las composiciones que contienen anticuerpos se pueden administrar además secuencialmente o por separado con otros agentes terapéuticos y medicamentos que se utilizan para el tratamiento de la afección para la cual se está administrando el anticuerpo o miembro de unión de la presente divulgación.

Los ejemplos de regímenes de dosificación que se pueden administrar a un sujeto se pueden seleccionar del grupo que comprende, pero no se limita a; 1 µg/kg/día hasta 20 mg/kg/día, 1 µg/kg/día hasta 10 mg/kg/día, 10 µg/kg/día hasta 1 mg/kg/día. En ciertos ejemplos, la dosis será tal que se obtenga una concentración en plasma de 1 µg/ml a 100 µg/ml del anticuerpo. Sin embargo, la dosis real de la composición administrada y, la velocidad y el tiempo de administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de la afección que se esté tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la dosificación, etc., en última instancia, es responsabilidad y a discreción de los veterinarios y otros médicos veterinarios, y normalmente toma en cuenta el trastorno a tratar, la condición del paciente individual, el lugar de suministro, el procedimiento de administración y otros factores conocidos por los practicantes.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el significado comúnmente entendido por una persona experta en la materia en el campo de la presente invención. El significado y el ámbito de los términos deben ser claros, sin embargo, en caso de cualquier ambigüedad, las definiciones proporcionadas en el presente documento tienen prioridad sobre cualquier diccionario o definición extrínseca.

A lo largo de la especificación, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que los términos "comprenden" o "incluyen", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", "incluye" o "que incluye" implican la inclusión de un número entero indicado o grupo de números enteros, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

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

Como se define en el presente documento, el término "dolor" significa una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño tisular real o potencial, o que se describe en términos de dicho daño.

En relación con el dolor operatorio o postoperatorio, la Ley de Bienestar Animal de los Estados Unidos (Animal Welfare Act 2002. AWA regulations, CFR, Title 9 (Animals and Animal Products), Capítulo 1 (Animal and Plant Health Inspection Service, Department of Agriculture). Subcapítulo A (Animal Welfare), Partes 1-4) define un procedimiento doloroso como cualquier procedimiento que se esperaría razonablemente que causara más que dolor leve o momentáneo o angustia en un ser humano al que se le aplica ese procedimiento, es decir, dolor en exceso al provocado por inyecciones u otros procedimientos menores. Por lo tanto, si un equino se somete a un procedimiento quirúrgico doloroso, el animal debe recibir analgésicos postoperatorios.

En otro ejemplo, un equino puede estar experimentando un dolor crónico o significativo como resultado de una afección médica asociada, como una artritis, por ejemplo, poliartritis, artritis reumatoide, inflamación, prurito, osteoartritis o una afección cancerosa o maligna.

El término "nocicepción" se refiere a la percepción de estímulos nocivos. Como se define en el presente documento, el "dolor neuropático" (también conocido como "neuralgia") es un dolor que proviene de problemas con las señales de los nervios. Puede surgir como consecuencia de una lesión o enfermedad que afecte el sistema somatosensorial. Existen causas de dolor neuropático y puede asociarse con sensaciones anormales llamadas disestesia, que ocurren espontáneamente. Como alternativa, puede asociarse con la alodinia, que se produce cuando el dolor aparece o empeora, con un toque o un estímulo que normalmente no causaría dolor. Por ejemplo, un ligero toque en la cara puede provocar dolor si tiene neuralgia del trigémino, o la presión de la ropa de cama puede provocar dolor si tiene neuropatía diabética. El dolor neuropático también puede deberse a alodinia, en el que el dolor aparece o

empeora, con un toque o un estímulo que normalmente no causaría dolor. Por ejemplo, un ligero toque en la cara puede provocar dolor si un sujeto tiene neuralgia del trigémino. El dolor neuropático relacionado con la hiperalgesia significa que el dolor intenso se debe a un estímulo o contacto que normalmente solo causaría una ligera molestia, mientras que la parestesia significa que se producen sentimientos de incomodidad o dolor incluso cuando no hay nada en contacto con el área que causa el dolor, por ejemplo, alfileres y agujas. Otras formas de dolor neuropático implican prurito o picazón que se puede asociar con respuestas alérgicas o inflamatorias en la piel y dolor inflamatorio que resulta de daños en los tejidos y procesos de reparación.

Tal como se define en el presente documento, la expresión "anticuerpo neutralizante del FCN" o similar describe un anticuerpo que es capaz de neutralizar la activación biológica y la señalización del FCN. El anticuerpo neutralizante, que también puede denominarse un anticuerpo antagonista, o un anticuerpo bloqueante, se une, específicamente y preferentemente selectivamente, al FCN e inhibe una o más actividades biológicas del FCN. Por ejemplo, el anticuerpo neutralizante puede inhibir la unión de un FCN a su ligando diana, como los receptores TrkA o p75 unidos a la membrana celular.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "actividad biológica" se refiere a una o más propiedades biológicas inherentes de una molécula (ya sea que se presente de forma natural como se encuentra *in vivo*, o se proporciona o habilita por medios recombinantes). Las propiedades biológicas incluyen, pero no se limitan a, la unión y/o activación del receptor; la inducción de la señalización celular o proliferación celular, la inhibición del crecimiento celular, la inducción de la producción de citoquinas, la inducción de la apoptosis y actividad enzimática.

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

La expresión "región constante (CR)" como se utiliza en el presente documento, se refiere a la porción de la molécula de anticuerpo que confiere funciones efectoras. En la presente invención, las regiones constantes normalmente significan regiones constantes equinas, es decir, que las regiones constantes de los anticuerpos equinizados del sujeto proceden de inmunoglobulinas equinas. La región constante de cadena pesada se puede seleccionar de cualquier isotipo de cadena pesada equina.

La expresión "anticuerpo quimérico" como se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo que contiene secuencias procedentes de dos anticuerpos diferentes, que normalmente son de diferentes especies. Los anticuerpos más normalmente quiméricos comprenden dominios variables procedentes de un donante específico que se une específicamente a un epítipo diana y dominios constantes procedentes de anticuerpos obtenidos de la especie diana a la que se va a administrar el anticuerpo.

El término "inmunogenicidad", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una medida de la capacidad de una proteína o una fracción terapéutica de direccionamiento para provocar una respuesta inmune (humoral o celular) cuando se administra a un receptor. La presente invención se refiere a la inmunogenicidad de los anticuerpos equinizados del sujeto. Preferiblemente, los anticuerpos preparados por el procedimiento de la presente invención no tienen inmunogenicidad, es decir, no se producirán anticuerpos neutralizantes contra ellos cuando se administren a un equino, y además, no hay funciones efectoras mediadas por las regiones Fc del anticuerpo.

El término "identidad" o "identidad de secuencia" como se utiliza en el presente documento, significa que en cualquier posición de resto de aminoácido particular en una secuencia alineada, el resto de aminoácido es idéntico entre las secuencias alineadas. El término "similitud" o "similitud de secuencia" como se utiliza en el presente documento, indica que, en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el resto de aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, la leucina puede ser sustituida por un resto de isoleucina o valina. Esto puede ser referido como sustitución conservadora. Preferiblemente, cuando las secuencias de aminoácidos de la divulgación se modifican mediante una sustitución conservadora de cualquiera de los restos de aminoácidos contenidos en ellas, estos cambios no tienen efecto sobre la especificidad de unión o la actividad funcional del anticuerpo resultante cuando se compara con el anticuerpo no modificado.

La identidad de la secuencia con respecto a un polipéptido (nativo) de la divulgación y su derivado funcional se relaciona con el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los restos del polipéptido nativo correspondiente, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de homología, y no considerar las sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencia. Ni las extensiones N o C-terminal, ni las inserciones deben interpretarse como una reducción de la identidad u homología de secuencia. El experto en la materia conoce bien los procedimientos y programas informáticos para realizar una alineación de dos o más secuencias de aminoácidos y determinar su identidad u homología de secuencia. Por ejemplo, el porcentaje de identidad o similitud de 2 secuencias de aminoácidos se puede calcular fácilmente utilizando algoritmos, por ejemplo, BLAST (Altschul y col. 1990), FASTA

(Pearson & Lipman 1988), o el algoritmo de Smith-Waterman (Smith & Waterman 1981).

Tal como se utiliza en el presente documento, la referencia a un resto de aminoácido que tiene la "mayor homología" con un segundo resto de aminoácido se refiere al resto de aminoácido que tiene la mayoría de las características o propiedades en común con el segundo resto de aminoácido. Al determinar si un resto de aminoácido tiene la mayor homología con un segundo resto de aminoácido, puede realizarse, normalmente, una evaluación de factores tales como, pero sin limitación, carga, polaridad, hidrofobicidad, masa del brazo lateral y dimensión del brazo lateral.

La expresión "posición correspondiente" como se utiliza en el presente documento para referirse a un resto de aminoácido que está presente en una segunda secuencia en una posición correspondiente a un resto de aminoácido especificado en una primera secuencia, pretende referirse a la posición en la segunda secuencia que es la misma posición que la posición en la primera secuencia cuando las dos secuencias están alineadas para permitir la máxima identidad de secuencia entre las dos secuencias. Los restos de aminoácidos en las posiciones correspondientes tienen la misma numeración de Kabat.

La expresión "consiste esencialmente en" o "que consiste esencialmente en" como se utiliza en el presente documento significa que un polipéptido puede tener características o elementos adicionales más allá de los descritos, siempre que tales características o elementos adicionales no afecten materialmente a la capacidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo para tener especificidad de unión al FCN equino. Es decir, el anticuerpo o fragmentos de anticuerpo que comprenden los polipéptidos pueden tener características o elementos adicionales que no interfieren con la capacidad del anticuerpo o fragmentos de anticuerpo para unirse al FCN equino y antagonizar la actividad funcional del FCN equino. Dichas modificaciones pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un polipéptido que consiste esencialmente en una secuencia específica puede contener uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos adicionales, eliminados o sustituidos, en cualquiera de los extremos o en ambos extremos de la secuencia, siempre que estos aminoácidos no interfieran con, inhiban, bloqueen o interrumpen el papel del anticuerpo o fragmento en la unión al FCN equino y secuestren su función biológica. De forma similar, una molécula polipeptídica que contribuye a los anticuerpos antagonistas del FCN equino preparados mediante el procedimiento de la invención puede modificarse químicamente con uno o más grupos funcionales siempre que dichos grupos funcionales no interfieran con la capacidad del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo para unirse al FCN equino y antagonicen su función.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de un agente, compuesto de unión, molécula pequeña, proteína de fusión o peptidomimético de la divulgación que se requiere para suprimir la unión del FCN equino a los receptores p75 y/o TrkA.

Los términos "polipéptido", "péptido" o "proteína" se utilizan de manera intercambiable en el presente documento para designar una serie lineal de restos de aminoácidos conectados entre sí mediante enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carboxi de restos adyacentes. Los restos de aminoácidos están usualmente en la forma isomérica "L" natural. Sin embargo, los restos en la forma isomérica "D" se pueden sustituir por cualquier resto de L-aminoácido, siempre que la propiedad funcional deseada sea retenida por el polipéptido.

Como se define en el presente documento, un "anticuerpo" abarca proteínas de unión a antígeno que se unen específicamente a un antígeno diana de interés, en este caso el factor de crecimiento nervioso equino, que tiene uno o más polipéptidos que se pueden preparar de forma recombinante o que son codificables genéticamente por genes de inmunoglobulina, o fragmentos de genes de inmunoglobulina. El término "anticuerpo" abarca anticuerpos monoclonales y quiméricos, en particular anticuerpos equinizados, y abarca además anticuerpos policlonales o anticuerpos de cualquier clase o subtipo. Un "anticuerpo" se extiende además a anticuerpos híbridos, anticuerpos biespecíficos, heteroanticuerpos y a fragmentos funcionales de los mismos que retienen la unión al antígeno.

La frase "se une específicamente a" se refiere a la unión de un anticuerpo a una proteína o diana específica que está presente entre una población heterogénea de proteínas. Por lo tanto, cuando están presentes en condiciones de inmunoensayo específicas, los anticuerpos se unen a una proteína particular, en este caso el FCN equino, y no se unen en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra.

Tal como se define en el presente documento, un "equino" también puede ser referido como un caballo. Los equinos pertenecen a la subespecie con el nombre trinomial de *Equus ferus caballus*, siendo estos mamíferos de pezuña (ungulados). Los equinos son una subespecie de la familia *Equidae* e incluyen cualquier especie clasificada en ella y se extiende a las más de 300 razas de caballos conocidas.

La presente invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan con el fin de ilustrar y no se pretende que se consideren como limitantes de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Producción de anticuerpos

Se produjeron secuencias de anticuerpos completas mediante la combinación de dominios variables de cadena ligera y cadena pesada equinizados de la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, respectivamente, con dominios de

cadena pesada constante o de cadena ligera constante equinos C-terminales. El dominio VH del α D11 equinizado se combinó con dos dominios constantes de cadena pesada equinos diferentes; HC2 (IgG2) y HC6 (IgG6) y el dominio VL del α D11 equinizado con el dominio constante de cadena ligera kappa equino. Las secuencias de las cadenas de anticuerpos maduras de longitud completa se muestran en la SEQ ID 4 (cadena ligera con dominio constante kappa) y 6 (cadena pesada con dominio constante HC2).

Las secuencias de aminoácidos combinadas se convirtieron en forma expresable en células de mamíferos mediante la selección óptima de codones y la síntesis génica química completa y la clonación en un vector de expresión de células de mamíferos pcDNA3.1 +. Los ADNc resultantes se transfectaron en células CHO y se analizaron los sobrenadantes como se detalla en los Ejemplos 2 a 5.

10 **Ejemplo 2 - Determinación de la unión de anticuerpos al FCN murino y equino**

Los ADNc de cadenas pesadas y ligeras equinizados se transfectaron en células CHO, se recolectaron y reaccionaron los sobrenadantes en formato ELISA con el FCN equino o murino. Después de las etapas de incubación y lavado, se detectó el anticuerpo equino unido mediante reactividad con un anticuerpo policlonal de cabra específico anti-IgG equina unido a peroxidasa de rábano picante (HRP, de sus siglas en inglés) y se desarrolló utilizando TMB. La densidad óptica del producto resultante se midió a 450 nm y se comparó con la del sobrenadante transfectado con vector vacío simulado (indicado como "Simulado" en la Figura 1).

Los resultados se muestran en la gráfica de la Figura 1. La unión al FCN de ratón se muestra para el anticuerpo equinizado HC2 (dominio constante IgG2) (denominado eqN-HC2+eqN-kLC-1). En la segunda parte de la gráfica, se muestra la unión del anticuerpo eqN-HC2+eqN-kLC-1 que comprende la cadena ligera eqN-kLC-1 y la cadena constante eqN-HC2 (IgG2) al FCN equino.

20 **Ejemplo 3 - Purificación de anticuerpos equinizados**

Los sobrenadantes obtenidos del Ejemplo 2 se purificaron utilizando una columna de Proteína A, se separaron mediante SDS-PAGE y se probaron para determinar la reactividad frente al anticuerpo policlonal anti-IgG equino HRP. El gel SDS-PAGE también se tiñó con azul de Coomassie para detectar cadenas pesadas y ligeras. La preparación del anticuerpo policlonal anti-IgG equino reconoce predominantemente las cadenas pesadas equinas. Los resultados se muestran en la Figura 2A y B.

Los resultados muestran la purificación del anti-FCN equino con la cadena pesada tipo 2 mediante la Proteína A, como se ilustra mediante una transferencia Western desarrollada con el anticuerpo policlonal anti-equino HRP. La fracción pico se analizó mediante SDS-PAGE teñida con Coomassie. Alguna degradación de la cadena pesada y ligera es evidente mediante SDS-PAGE. El gel teñido con azul de Coomassie (figura 2B, muestra la presencia de cadenas pesadas y ligeras, así como un anticuerpo completo (MW de 70).

30 **Ejemplo 4 - Inhibición de la proliferación inducida por el FCN de células TF-1 mediante anticuerpos equinizados**

Se incubaron las diluciones en serie de los sobrenadantes transfectantes de células CHO del Ejemplo 2 ("antagonista") con células TF-1 en presencia de FCN 1,0 ng/ml. La proliferación resultante se midió mediante la incorporación de timidina.

Los resultados se muestran en la Figura 3. Se observó una inhibición del 50 % en un anticuerpo monoclonal (AcM) calculado de 3-8 ng/ml (anticuerpo que comprende la cadena ligera eqN-kLC-1 y la cadena constante eqN-HC2 (IgG2)).

40 **Ejemplo 5 - Depósito de complemento inducido mediante anticuerpos equinizados capturados por antígeno**

Se incubaron los sobrenadantes transfectantes purificados de la proteína A del Ejemplo 2 con placas recubiertas con FCN 0,1 ng/ml para capturar los anticuerpos. Las placas se lavaron y se recubrieron con FCN 0,1 ng/ml para capturar los anticuerpos. Se lavaron las placas y luego se incubaron con suero humano y el complemento unido C1q se midió mediante la unión del anticuerpo policlonal anti-C1q humano HRP y se desarrolló como anteriormente. La unión de C1q a "eqN-HC2 + eqN-kLC-1" capturado por el antígeno se comparó con un AcM anti-FCN humano con el dominio Fc IgG1 humano como control positivo y una variante IgG4 como control negativo.

Procedimiento de unión del complemento:

Las placas se recubrieron con 100 μ l/pocillo de FCN de ratón 5 μ g/ml y se bloquearon con BSA/PBS al 5 %. Los pocillos recubiertos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con sobrenadantes de cultivo celular, que contenían IgG anti-FCN equina recombinante, diluidos en PBS/BSA al 1 % (100 μ l/pocillo). Las placas se lavaron e incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con 100 μ l/pocillo de suero humano diluido 1/100 en solución salina tamponada veronal que contenía MgCl₂ 0,5 2 mM, CaCl₂, Tween-20 al 0,05 %, gelatina al 0,1 % y BSA al 0,5 %. Después del lavado, se incubaron las placas con 100 μ l de una dilución 1/800 de anti-C1q-HRP de oveja (Serotec) en PBS/BSA al 1 %. Después del lavado, se desarrollaron las placas mediante la adición de 100 μ l de

sustrato TMB (Thermo Scientific). El desarrollo se detuvo mediante la adición de 100 µl de H₂SO₄ 2N y se leyó la absorbancia a 450 nm.

Los resultados se muestran en la gráfica de la Figura 4. Estos resultados muestran sorprendentemente que no hay unión de C1q a anticuerpos HC2 equinizados (anticuerpo que comprende la cadena ligera eqN-kLC-1 y la cadena pesada eqN-HC2 (cadena pesada del dominio constante de cadena pesada de tipo HC2 (dominio constante procedente de IgG2 equina) serían adecuados para utilizar en antagonizar el FCN, ya que el FCN es un mediador soluble.

Por consiguiente, se demuestra en el presente documento, bastante sorprendentemente, que cuando un anticuerpo preparado mediante el procedimiento de la invención tiene una cadena pesada procedente de equino del HC2 (subtipo de dominio constante de cadena pesada de equino IgG2), la unión del anticuerpo al FCN equino no da como resultado la activación del complemento u otras funciones efectoras cadena abajo, tales como ADCC. Por lo tanto, dichos anticuerpos, al antagonizar la actividad funcional biológica del FCN equino mediante la prevención de la unión del FCN equino a los receptores TrkA o p75 unidos a la membrana, inhiben la cascada de señalización intracelular asociada cadena abajo. Además, como la expresión del FCN se produce con frecuencia en la proximidad de los nervios y similares, los anticuerpos antagonistas o neutralizantes del FCN preparados mediante el procedimiento de la invención, que tienen una cadena pesada derivada equina del subtipo HC2 (IgG2), pueden secuestrar la actividad biológica del FCN equino sin reclutar una respuesta inmune más amplia. Dichas propiedades funcionales son inesperadas, pero altamente deseables.

Ejemplo 6 - Purificación preferencial de IgG equina isotipo HC2, pero no HC6, utilizando cromatografía de afinidad de proteína A

Los sobrenadantes de células CHO resultantes de la transfección de las variantes HC2 y HC6 de αD11 equinado se cargaron en una columna de afinidad de Proteína A (como en la Figura 2) y las fracciones eluidas que contienen anticuerpos se cuantificaron mediante la unión al FCN mediante ELISA. Como se puede ver en la Figura 10, el isotipo HC2, pero no el isotipo HC6, se recuperó mediante cromatografía de proteína A. Estos datos sugieren que la cromatografía de proteína A puede ser una herramienta útil en la purificación de los isotipos HC2, pero no HC6, de las inmunoglobulinas equinas anti-FCN.

Ejemplo 7 - Anticuerpos monoclonales anti-FCN equino - seguridad y pirexia

Los anticuerpos monoclonales anti-FCN equino preparados mediante el procedimiento de la presente invención se expresan en células CHO y se purifican mediante una combinación de cromatografía de Proteína A y/o cromatografía de exclusión por tamaño y se intercambian en tampón en solución salina tamponada con fosfato. Los anticuerpos se inyectan por vía intravenosa en caballos a 0,01-10 mg/kg de peso corporal y se evalúan para detectar signos de toxicidad mediante inspección visual realizada por un veterinario, cambios en el peso corporal, temperatura corporal y bioquímica plasmática. No se espera que se observen cambios en estos o en ningún analito de bioquímica de plasma.

Ejemplo 8 - Farmacocinética plasmática de anticuerpos monoclonales anti-FCN equino *in vivo* - semivida en suero e inmunogenicidad

Los anticuerpos monoclonales anti-FCN equino preparados mediante el procedimiento de la presente invención se expresan en células CHO y se purifican mediante una combinación de cromatografía de Proteína A y/o cromatografía de exclusión por tamaño y se intercambian en tampón en solución salina tamponada con fosfato. Los anticuerpos se inyectan por vía intravenosa en caballos en el intervalo de 0,01 - 10 mg/kg de peso corporal y se toman muestras de plasma en varias ocasiones durante las próximas 2 semanas. Se evalúan las muestras de plasma diluido para determinar la concentración de anticuerpo anti-FCN equino mediante ELISA utilizando el FCN como la diana y el anticuerpo policlonal anti-equino y el reactivo secundario de peroxidasa de rábano picante. Las concentraciones plasmáticas medidas coinciden con la cinética de dos fases, con una fase de distribución tisular (alfa) y una fase de eliminación (beta) de varios días.

Se espera la ausencia de una disminución brusca en la concentración plasmática de la concentración de anticuerpo anti-FCN equino entre 100 y 300 horas. Esto demostraría que no hay anticuerpos neutralizantes preexistentes contra anticuerpos monoclonales anti-FCN recombinantes en la sangre de caballo, ni se generan dichos anticuerpos neutralizantes después de la infusión.

Ejemplo 9 - Los anticuerpos monoclonales anti-FCN equino reducen el dolor inflamatorio debido a la osteoartritis *in vivo*

Los grupos de caballos osteoártríticos se inyectan por vía intravenosa o intraarticular con anticuerpos monoclonales anti-FCN equino de esta patente a 0,01-10 mg/kg de peso corporal o solución salina tamponada con fosfato como control del vehículo (= día 0). Se evaluaron los caballos para la cojera durante 4-14 días mediante un procedimiento de puntuación visual (por ejemplo, puntuación 0, sin cojera (carga de peso total); puntuación 1, cojera leve (no soporta el peso pero camina bien); puntuación 2, cojera moderada (un poco de peso y no camina bien), puntuación 3, cojera severa (no carga de peso)). Los observadores están cegados a qué caballos reciben cada inyección.

Se espera que las puntuaciones de cojera se reduzcan en los caballos que reciben anticuerpos monoclonales anti-FCN equino en el tiempo posterior a la inyección en comparación con el control del vehículo, lo que indica que los anticuerpos monoclonales anti-FCN equino tendrán un efecto en la reducción del dolor en los caballos durante el período visto vehículo solo.

5 **Ejemplo 10 - Ejemplo de comparación que muestra el efecto de los anticuerpos monoclonales anti-FCN canino en la reducción del dolor inflamatorio *in vivo***

Terapia de anticuerpos:

10 El procedimiento de preparación de anticuerpos de la presente invención se aplicó para producir un anticuerpo caninizado adecuado para su uso en caninos. Un dominio VL α D11 caninizado se combinó con un dominio constante de cadena ligera kappa canina y un dominio VH α D11 caninizado se combinó con un isotipo de cadena pesada canina. Los anticuerpos monoclonales anti-FCN canino procedentes de vectores de expresión que expresan las cadenas pesadas y ligeras se expresaron en células CHO y se purificaron mediante una combinación de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de exclusión de tamaño y se intercambiaron el tampón en solución salina tamponada con fosfato.

15 *Modelo canino de inflamación:*

Todos los experimentos se llevaron a cabo con la aprobación previa del Comité de Ética Institucional (CRL, Irlanda). A los perros Beagle se les inyectó caolín (= día -1) en la almohadilla de la pata de una pata trasera para generar una inflamación de auto-resolución que comenzó aproximadamente 24 horas después y que hace que los perros se vuelvan temporalmente cojos. En este modelo, una vez que la respuesta de la inflamación inicial al caolín retrocede, 20 los perros se vuelven cada vez menos cojos durante el período de aproximadamente 1-2 semanas y luego se recuperan por completo.

Se inyectaron grupos de 3 perros por vía intravenosa con anticuerpos monoclonales anti-FCN canino a 200 μ g/kg de peso corporal o solución salina tamponada con fosfato como control del vehículo (= día 0). Se evaluaron los perros para la cojera durante 7 días mediante un procedimiento de puntuación visual (puntuación 0, sin cojera (carga de peso total); puntuación 1, cojera leve (no soporta el peso pero camina bien); puntuación 2, cojera moderada (un poco de peso y no camina bien), puntuación 3, cojera severa (no carga de peso)). Los observadores estaban cegados a qué perros recibieron cada inyección. 25

Los resultados se muestran en la Figura 11. Las puntuaciones de cojera se redujeron en los perros que recibieron anticuerpos monoclonales anti-FCN en el día 3 posterior a la inyección en comparación con el control del vehículo, lo que indica que los anticuerpos monoclonales anti-FCN tuvieron un efecto en la reducción del dolor en los perros en comparación con el vehículo solo. La actividad retardada es consistente con la farmacocinética plasmática de anticuerpos monoclonales anti-FCN canino que demostraron una fase de distribución tisular lenta (alfa) de aproximadamente 30 horas y la vascularización relativamente deficiente del área de la almohadilla de la pata. Los resultados mostrados en la Figura 11 muestran que los anticuerpos anti-FCN canino preparados mediante un procedimiento correspondiente al procedimiento de la presente invención reducen el dolor inflamatorio en perros con una consiguiente reducción de la cojera. 30 35

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NVIP Pty Ltd

40 <120> ANTICUERPOS ANTIFACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO Y PROCEDIMIENTOS PARA PREPARAR Y UTILIZAR LOS MISMOS

<130> P119713.WO.02

<150> US61/483491

<151> 06/05/2011

45 <150> US61/531439

<151> 06/09/2011

<160> 17

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 107

50 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 704 007 T3

<223> cadena ligera variable (VL)

<400> 1

```

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

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

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

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

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

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

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

```

<210> 2

5 <211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada variable (VH)

10 <400> 2

ES 2 704 007 T3

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3

<211> 234

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera completa - dominio constante de cadena ligera VL y Kappa con secuencia líder y 2 codones de parada

<400> 3

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

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

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

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

10

ES 2 704 007 T3

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

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

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

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

Asp Asp Ala Lys Pro Ser Ala Phe Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
130 135 140

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

Pro Ser Gly Ala Thr Ile Asn Trp Lys Val Asp Gly Leu Ala Lys Thr
165 170 175

Ser Ser Phe His Ser Ser Leu Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Asn Thr
180 185 190

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

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

Leu Val Lys Ser Phe Lys Arg Gln Asp Cys
225 230

<210> 4
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> cadena ligera - dominios variables y constantes

<400> 4

ES 2 704 007 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Lys Arg Gln Asp Cys
 210

<210> 5

<211> 483

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada completa - VH y HC2 (eqIqG2) con líder y codón de parada

<400> 5

ES 2 704 007 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ala Pro Lys Tyr Phe Gln Leu Thr Pro Ser Cys Gly Ile Thr Ser
145 150 155 160

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

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

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

Met Val Thr Val Pro Ala Ser Thr Trp Thr Ser Glu Thr Tyr Ile Cys
210 215 220

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

Pro Cys Val Leu Ser Ala Glu Gly Val Ile Pro Ile Pro Ser Val Pro
245 250 255

Lys Pro Gln Cys Pro Pro Tyr Thr His Ser Lys Phe Leu Gly Gly Pro
260 265 270

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Pro Lys Asp Ala Leu Met Ile Ser

ES 2 704 007 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Pro Pro Tyr Thr His Ser Lys Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

ES 2 704 007 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | | |
| Ile | Phe | Pro | Pro | Asn | Pro | Lys | Asp | Ala | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | | |
| Val | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asn | Leu | Ser | Asp | Gln | Tyr | Pro | Asp | Val | | |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | | |
| Gln | Phe | Ser | Trp | Tyr | Val | Asp | Asn | Thr | Glu | Val | His | Ser | Ala | Ile | Thr | | |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | | |
| Lys | Gln | Arg | Glu | Ala | Gln | Phe | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | | |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | | |
| Leu | Pro | Ile | Gln | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Ser | Gly | Lys | Glu | Phe | Lys | Cys | | |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | | |
| Ser | Val | Thr | Asn | Val | Gly | Val | Pro | Gln | Pro | Ile | Ser | Arg | Ala | Ile | Ser | | |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | | |
| Arg | Gly | Lys | Gly | Pro | Ser | Arg | Val | Pro | Gln | Val | Tyr | Val | Leu | Pro | Pro | | |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | | |
| His | Pro | Asp | Glu | Leu | Ala | Lys | Ser | Lys | Val | Ser | Val | Thr | Cys | Leu | Val | | |
| | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | | | |
| Lys | Asp | Phe | Tyr | Pro | Pro | Asp | Ile | Ser | Val | Glu | Trp | Gln | Ser | Asn | Arg | | |
| 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | 400 | | | |
| Trp | Pro | Glu | Leu | Glu | Gly | Lys | Tyr | Ser | Thr | Thr | Pro | Ala | Gln | Leu | Asp | | |
| | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | | | |
| Gly | Asp | Gly | Ser | Tyr | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Ser | Leu | Glu | Thr | Ser | | |
| | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | | | |
| Arg | Trp | Gln | Gln | Val | Glu | Ser | Phe | Thr | Cys | Ala | Val | Met | His | Glu | Ala | | |
| | | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | | | |
| Leu | His | Asn | His | Phe | Thr | Lys | Thr | Asp | Ile | Ser | Glu | Ser | Leu | Gly | Lys | | |
| | 450 | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | | | |

<210> 7

<211> 446

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada completa - VH y HC6 (eqlgG6) (sin secuencia líder y codón de parada)

<400> 7

ES 2 704 007 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Val Phe Gln Leu Ala Ser His Ser Ala Gly Thr Ser Asp Ser Thr
130 135 140

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

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

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

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

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

Pro Cys Cys Cys Pro Lys Cys Pro Gly Arg Pro Ser Val Phe Ile Phe
225 230 235 240

ES 2 704 007 T3

Pro Pro Asn Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asn Pro Asp Val Lys Phe
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Ala His Thr Ala Thr Thr Lys Ala
 275 280 285

Lys Glu Lys Gln Asp Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro
 290 295 300

Ile Gln His Gln Asp Trp Arg Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320

Asn Asn Arg Ala Leu Pro Ala Pro Val Glu Arg Thr Ile Thr Lys Ala
 325 330 335

Lys Gly Glu Leu Gln Asp Pro Lys Val Tyr Ile Leu Ala Pro His Arg
 340 345 350

Glu Glu Val Thr Lys Asn Thr Val Ser Val Thr Cys Leu Val Lys Asp
 355 360 365

Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asn Val Glu Trp Gln Ser Asn Glu Glu Pro
 370 375 380

Glu Pro Glu Val Lys Tyr Ser Thr Thr Pro Ala Gln Leu Asp Gly Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Glu Thr Asp Arg Trp
 405 410 415

Glu Gln Gly Glu Ser Phe Thr Cys Val Val Met His Glu Ala Ile Arg
 420 425 430

His Thr Tyr Arg Gln Lys Ser Ile Thr Asn Phe Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 8

<211> 464

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH y HC2 aglicosilada (sin secuencia líder y codón de parada)

<400> 8

ES 2 704 007 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 704 007 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9

<211> 446

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH y HC6 aglicosilada (sin secuencia líder y codón de parada)

<400> 9

ES 2 704 007 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Val Phe Gln Leu Ala Ser His Ser Ala Gly Thr Ser Asp Ser Thr
130 135 140

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

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

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

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

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

Pro Cys Cys Cys Pro Lys Cys Pro Gly Arg Pro Ser Val Phe Ile Phe
225 230 235 240

Pro Pro Asn Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

ES 2 704 007 T3

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asn Pro Asp Val Lys Phe
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Ala His Thr Ala Thr Thr Lys Ala
 275 280 285

Lys Glu Lys Gln Asp Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro
 290 295 300

Ile Gln His Gln Asp Trp Arg Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320

Asn Asn Arg Ala Leu Pro Ala Pro Val Glu Arg Thr Ile Thr Lys Ala
 325 330 335

Lys Gly Glu Leu Gln Asp Pro Lys Val Tyr Ile Leu Ala Pro His Arg
 340 345 350

Glu Glu Val Thr Lys Asn Thr Val Ser Val Thr Cys Leu Val Lys Asp
 355 360 365

Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asn Val Glu Trp Gln Ser Asn Glu Glu Pro
 370 375 380

Glu Pro Glu Val Lys Tyr Ser Thr Thr Pro Ala Gln Leu Asp Gly Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Glu Thr Asp Arg Trp
 405 410 415

Glu Gln Gly Glu Ser Phe Thr Cys Val Val Met His Glu Ala Ile Arg
 420 425 430

His Thr Tyr Arg Gln Lys Ser Ile Thr Asn Phe Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 10
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> VL - FR1

<400> 10

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

Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys
 20

10

<210> 11

ES 2 704 007 T3

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

 <220>
 5 <223> VL - FR2

 <400> 11
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

 <210> 12
 <211> 32
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> VL - FR3

 <400> 12
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser
 1 5 10 15

 Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Ser Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys
 15 20 25 30

 <210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> VL - FR4

 <400> 13
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 1 5 10

 <210> 14
 <211> 25
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> VH - FR1

 30 <400> 14
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Asn Pro Ser Gln
 1 5 10 15

 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
 20 25

 <210> 15
 <211> 13
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> VH - FR2

 <400> 15

ES 2 704 007 T3

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

5 <210> 16
<211> 33
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH - FR3

<400> 16

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

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

Arg

10 <210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> VH - FR4

<400> 17

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

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de un anticuerpo adecuado para su uso en un equino que comprende las etapas de:

- 5 - proporcionar un anticuerpo donante de una especie distinta de un equino, en el que el anticuerpo donante tiene especificidad de unión para un antígeno diana presente en equinos;
- 10 - comparar cada resto de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de las regiones marco del anticuerpo donante con cada resto de aminoácido presente en una posición correspondiente en la secuencia de aminoácidos de las regiones marco de una pluralidad de anticuerpos equinos para identificar uno o más restos de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos de las regiones marco del anticuerpo donante que difieren de uno o más restos de aminoácidos en la posición correspondiente dentro de la secuencia de aminoácidos de las regiones marco de la pluralidad de anticuerpos equinos; y
- 15 - sustituir los uno o más restos de aminoácidos identificados en el anticuerpo donante con uno o más restos de aminoácidos presentes en la posición correspondiente en la pluralidad de anticuerpos equinos para producir un anticuerpo modificado,

en el que el anticuerpo modificado no contiene ningún aminoácido en ninguna posición dentro de las regiones marco que sería extraño en la posición correspondiente en equinos,

en el que el anticuerpo modificado es capaz de unirse específicamente al factor de crecimiento nervioso equino (FCN) e inhibir la capacidad del FCN equino para unirse al receptor del FCN equino p75 o TrkA; y

- 20 en el que la sustitución de un resto de aminoácido en el anticuerpo donante se realiza utilizando el principio de sustitución conservadora.

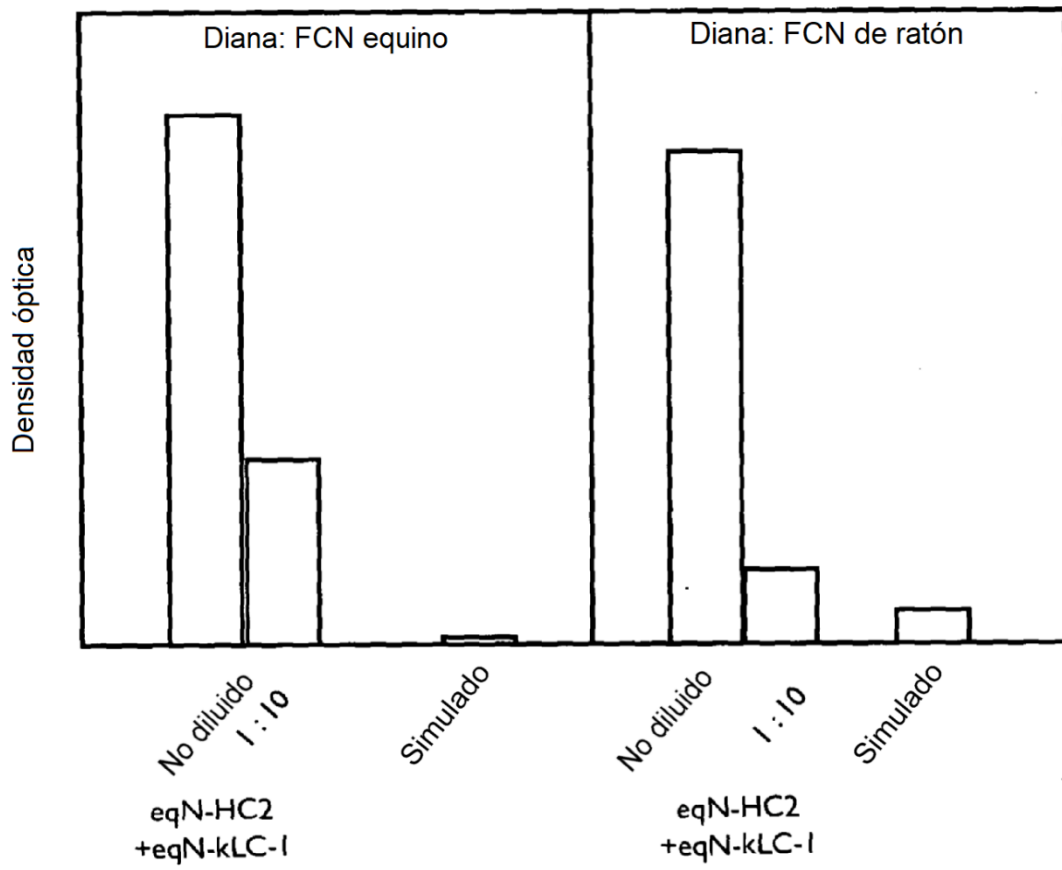


Figura 1

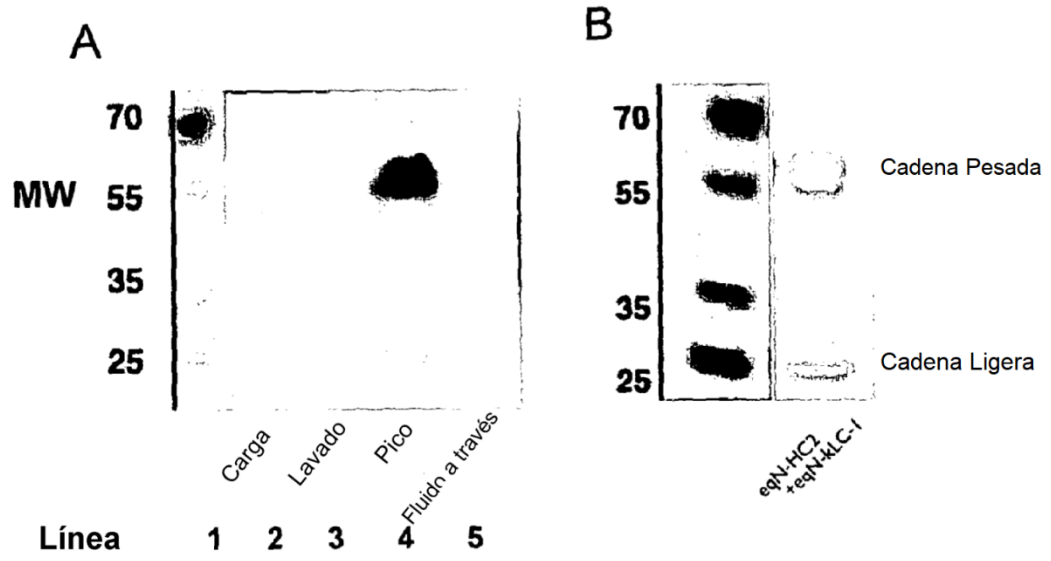


Figura 2

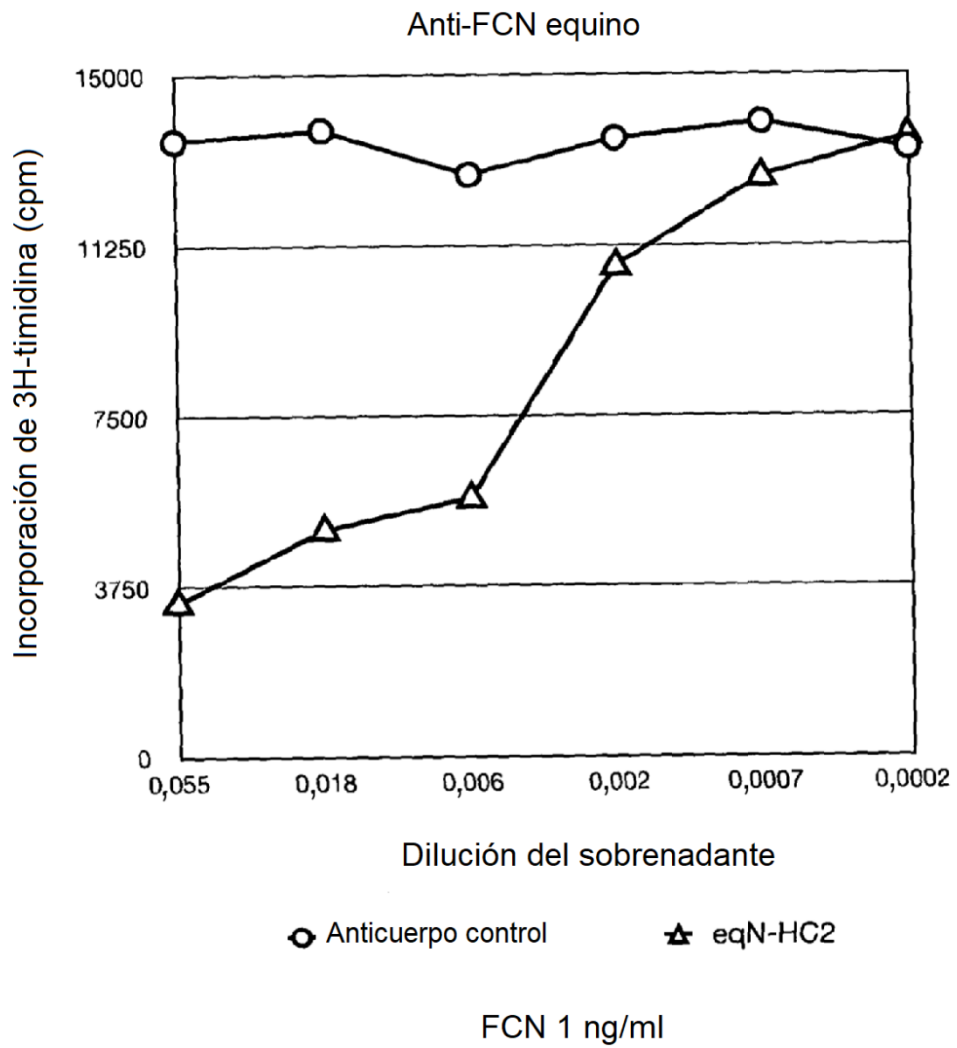


Figura 3

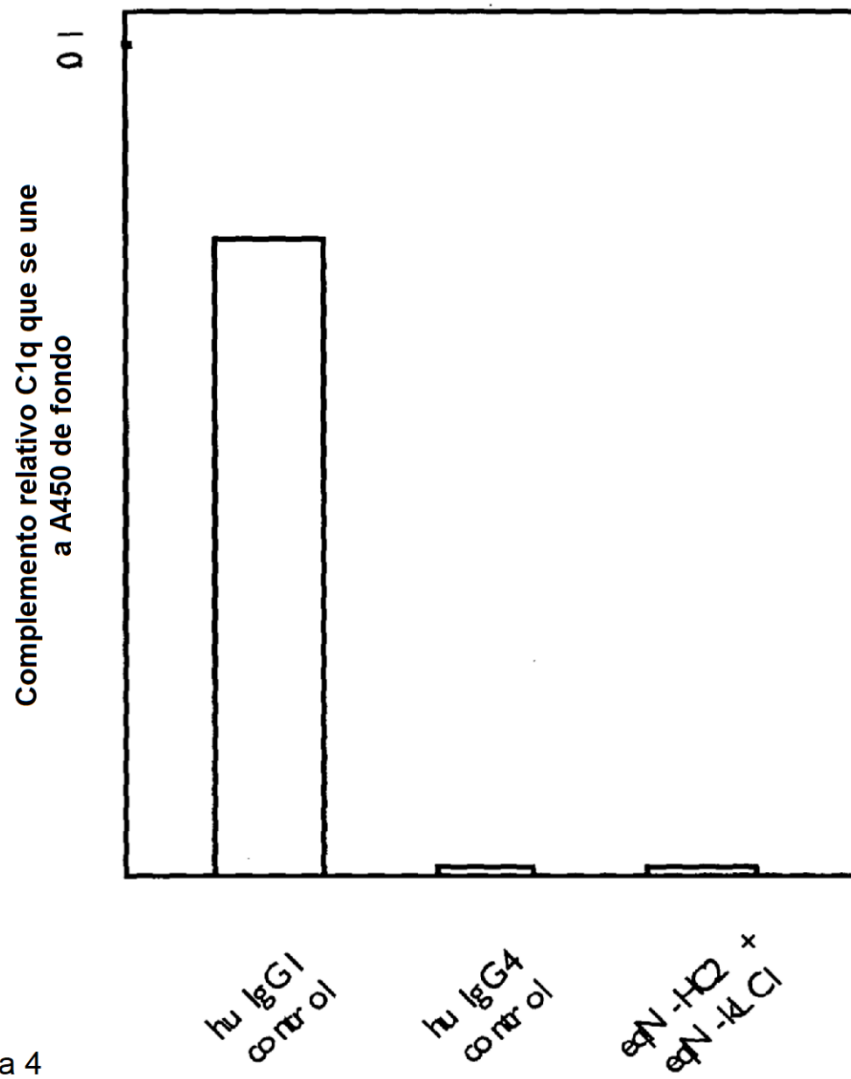


Figura 4

* * * * *
QVQLKESGPGLVNPSQTLSLTCTVSGFSLTNNNVNWVRQA40
* * * * *
PGKGLEWVGGVWAGGATDYNSALKSRATITRDTSKSQVFL80
* * *
QMNSLTSEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQILVTVSS

Figura 6 – Dominio variable de cadena pesada

**DIVMTQSPASLSASLGETVTIECRASEDIYNALAWYQQKPGQS
PKLLIYNTDTLHTGVPSRFRSGSGSGTDYSLTINSLQSEDVASYF
CQHYPHYPRTFGQGTKLELKRDDAKPSAFIFPPSSEELSSGSA
SVVCLVYGFYPSGATINWKVDGLAKTSSFHSSLTEQDSKDNTYS
LSSTLTLPKADYEAHNVYACEVSHKTLSSPLVKSFKRQDC**

Figura 7 – Cadena ligera kappa del VL del anti-FCN equinizado

**QVQLKESGPGLVNPSQTLSTCTVSGFSLTNNNVNWVRQAPGKG
LEWVGGVWAGGATDYNALKSRATITRDTSKSQVFLQMNSLTSE
DTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGILVTVSSASTTAPKYFQL
TPSCGITSDATVALGCLVSDYYPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPSVL
QSSGLYALSSMVTVPASTWTSETYICNVAHPASSTKVDKRIPPCVL
SAEGVIPIPSVPPKQCPPYTHSKFLGGPSVFIFPPNPKDALMISRTPV
VTCVVNLSAQYPDVQFSWYVDNTEVHSAITKQREAQFNSTYRVV
SVLPIQHQQDWLSGKEFKCSVTNNGVPPQIPISRAISRGKGPSRVPPQVY
VLPHPDELAKSKVSVTCLVKDFYPPDISVEWQSNRWPELEGKYST
TPAQLDGDGSYFLYSKLSLETSRWQQVESFTCAVMHEALHNHFTK
TDISESLGK**

Figura 8 – Cadena pesada de la IgG HC2 del VH del anti-FCN equinizado

**QVQLKESGPGLVNPSQTLSTCTVSGFSLTNNNVNWVRQAPGKG
LEWVGGVWAGGATDYNALKSRATITRDTSKSQVFLQMNSLTSE
DTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGILVTVSSASTTAPKVFQL
ASHSAGTSDSTVALGCLVSSYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPSV
RQSSGLYSLSSMVTVPASSLKSQTYICNVAHPASSTKVDKRIVIKP
CCCPKCPGRPSVFIFPPNPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQENPDVK
FNWYVDGVEAHTATTKAKEKQDNSTYRVVSVLPIQHQDWRRGKEF
KCKVNNRALPAPVERTITKAKGELQDPKVYILAPHREEVTKNTVSVT
CLVKDFYPPDINVEWQSNEEPEPEVKYSTTPAQLDGDGSYFLYSKL
TVETDRWEQGESFTCVVMHEAIRHTYRQKSITNFPKG**

Figura 9 – Cadena pesada de la IgG HC6 del VH del anti-FCN equinizado

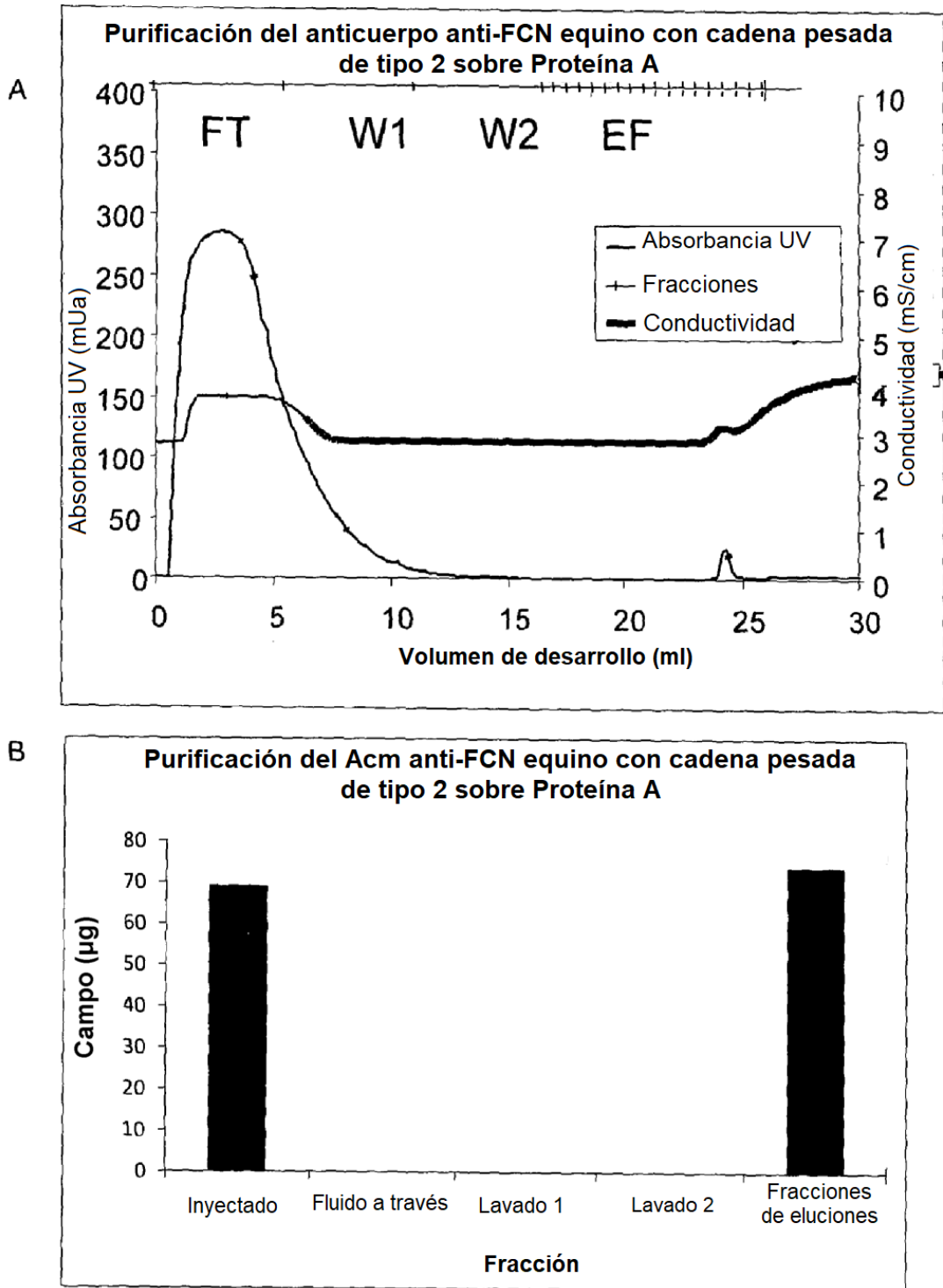


Figura 10

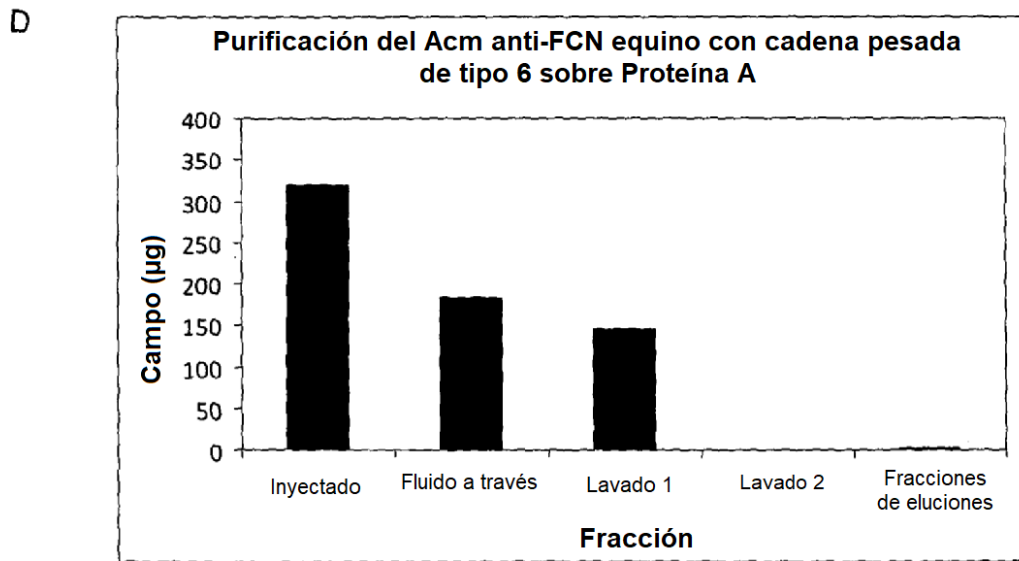
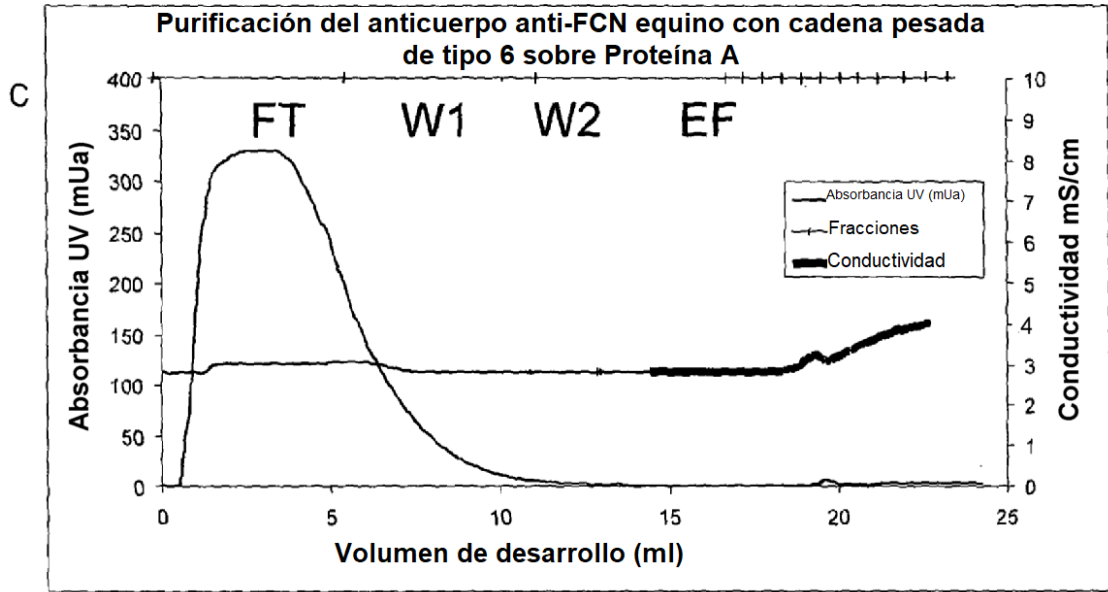


Figura 10

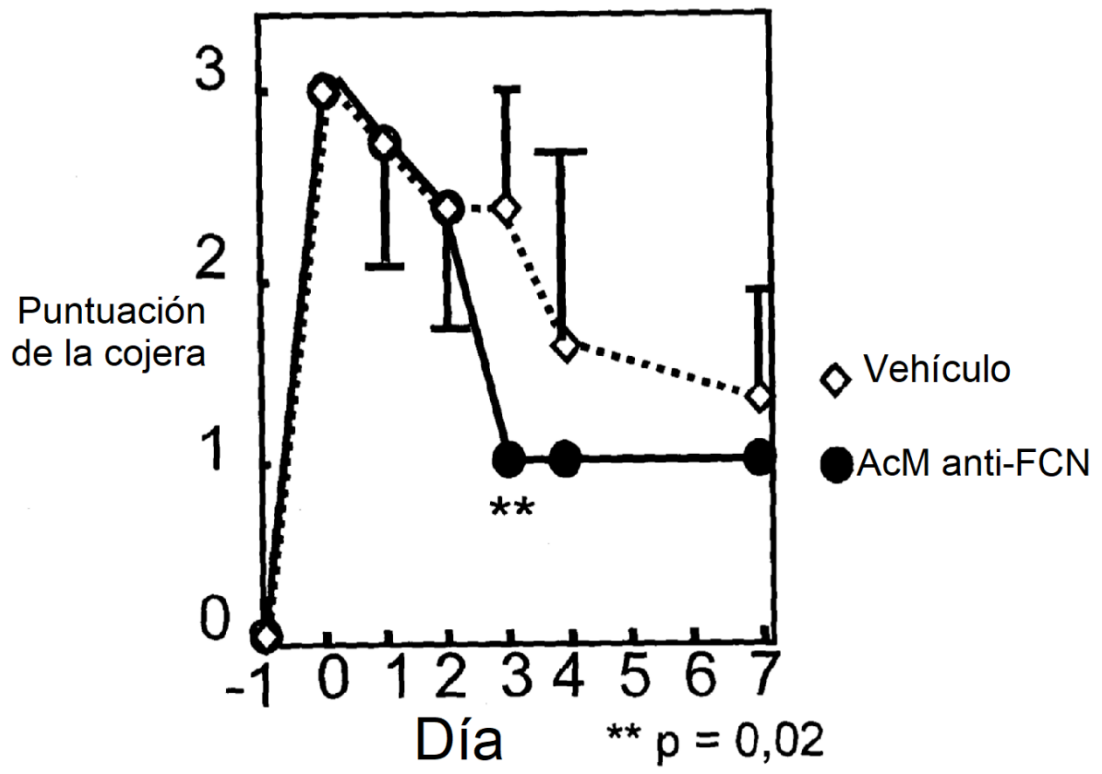


Figura 11