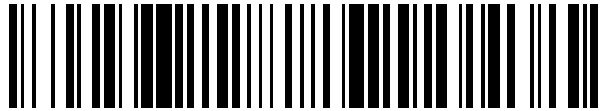


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 036**

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/GB2012/051002**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2012 WO12153121**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2012 E 12723730 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2705054**

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

30 Prioridad:

06.05.2011 US 201161483481 P

29.08.2011 GB 201114858

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 2 704 036 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 divulgación

5 La presente divulgación se refiere a anticuerpos, y fragmentos de los mismos, que actúan como antagonistas del factor de crecimiento de nervios canino. La divulgación se extiende a los procedimientos de preparación de los mismos y al uso terapéutico de estos anticuerpos y fragmentos en el tratamiento de afecciones asociadas con el factor de crecimiento de nervios tal como el dolor, trastornos relacionados con el dolor y afecciones que dan como resultado la existencia de dolor crónico en caninos.

Antecedentes de la divulgación

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

El uso de antagonistas del NGF para tratar el dolor y la sensibilidad dolorosa en seres humanos se había descrito (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 de rata alfaD11 (α D11, aD11). El anticuerpo α D11 tiene una especificidad de unión por el NGF de ratón, pero también se sabe que se une a las
20 formas humana y de rata del NGF. La humanización del anticuerpo monoclonal α D11 derivado de rata es necesaria antes de la administración a seres humanos con el fin de minimizar la producción de anticuerpos neutralizantes que resultan de una respuesta de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA) que se monta contra los anticuerpos derivados de roedores. Además, la sustitución de los dominios constantes de ratón por dominios constantes humanos permite las funciones efectoras corriente abajo por las que se va a seleccionar.

25 El manejo del dolor en caninos se proporciona actualmente mediante la administración de fármacos analgésicos de varias clases, incluyendo los anestésicos locales y generales, analgésicos opiáceos, agonistas α_2 , fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y esteroides. Cada uno de estos necesitan ser administrados frecuentemente y también tienen limitaciones de eficacia y seguridad. Hay en consecuencia una necesidad de una forma de alivio del dolor de larga duración y dosificación no tan frecuente en caninos que padecen dolor crónico, tal
30 como el dolor por cáncer o artritis.

Aunque el NGF se expresa en tejidos caninos y la molécula del NGF canino se había caracterizado (Eisele I. Wood IS. German AJ. Hunter L. Trayhurn P." Adipokine gene expression in dog adipose tissues and dog white adipocytes differentiated in primary culture" Hormone & Metabolic Research. 37(8):474-81, 2005 Genbank XP_540250), no se había descrito ningún antagonista para el NGF canino, ni se ha utilizado el bloqueo de la señalización mediada por
35 NGF en caninos para evitar o aliviar el dolor. El uso en caninos de anticuerpos conocidos que actúan como antagonistas anti-NGF en otras especies no era factible debido a la producción de anticuerpos neutralizantes. Además, la producción de un anticuerpo quimérico que comprenda dominios constantes derivados de caninos y dominios variables derivados de un anticuerpo anti-NGF conocido tal como el alfaD11 no se podía garantizar que se uniera al NGF canino. Además, dicho anticuerpo puede presentar una reactividad cruzada con otros epítomos diana que pueden estar presentes en los caninos, pero no presentes en las especies de las que se derivaba el anticuerpo
40 originalmente. Además, la producción de anticuerpos neutralizantes limitaría la administración terapéutica a largo plazo del anticuerpo, siendo este un requisito particularmente importante cuando se trata una afección relacionada con el dolor crónico o una afección cancerosa. De la misma manera, la producción de una forma caninizada del anticuerpo anti-NGF utilizando injertos de CDR, o una técnica relacionada puede dar como resultado también la
45 producción de anticuerpos neutralizantes y puede presentar adicionalmente una reducción de la afinidad y avidez de unión al antígeno. En consecuencia, existe una necesidad imperiosa de miembros de unión que actúen como antagonistas del NGF canino para su uso en el manejo del dolor en caninos, en el que los miembros de unión mantengan altos niveles de afinidad y avidez de unión mientras se evita la producción de anticuerpos neutralizantes contra ellos. El documento WO 03/060080 escribe los dominios variables de inmunoglobulina canina, anticuerpos
50 caninizados, y procedimientos para producirlos y utilizarlos.

Williams y col. (2010) Capítulo 21 en Antibody Engineering Vol. 1 (Editado por Kontermann & Dübel) describen la humanización de anticuerpos por injerto de CDR. El documento WO 2010/027488 describe anticuerpos monoclonales.

Sumario de la invención

55 La invención se define por las reivindicaciones. Los aspectos/casos de la presente divulgación que constituyen la invención se define por las reivindicaciones.

Sumario de la divulgación

Después de esfuerzos extensos, el presente inventor ha identificado sorprendentemente un procedimiento para preparar anticuerpos que produce anticuerpos no inmunogénicos y fragmentos de unión que se unen específicamente al NGF canino y que neutraliza la actividad biológica del NGF canino. En particular, se demuestra en el presente documento, bastante inesperadamente, que la unión de los anticuerpos y fragmentos de unión de la divulgación al NGF canino secuestra la actividad biológica del NGF canino inhibiendo la unión del NGF canino al receptor TrkA de alta afinidad o al receptor p75. Este, a su vez, evita la regulación positiva de neuropéptidos en las neuronas sensoriales con el resultante efecto de que se reducirá o eliminará la sensación de dolor. Los anticuerpos que se producen utilizando procedimientos de ADN recombinante y son inesperadamente no inmunogénicos, es decir, no se originan anticuerpos neutralizantes contra ellos después de la administración a un sujeto canino. Dicho hallazgo es completamente sorprendente e inesperado, ya que los anticuerpos no se producían utilizando las metodologías convencionales, tales como el injerto de CDR, o similares.

De acuerdo con un primer aspecto de la divulgación se proporciona un procedimiento de preparación de un anticuerpo adecuado para su uso en caninos que comprenden o consisten esencialmente de las etapas de:

- proporcionar un anticuerpo donante de una especie distinta de la canina, en el que el anticuerpo donante tiene una especificidad de antígeno diana presente en los caninos;
- comparar cada resto de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de las regiones marco conservadas del anticuerpo donante con cada resto de aminoácidos presente en una posición correspondiente de la secuencia de aminoácido de las regiones marco conservadas de uno o más anticuerpos caninos para identificar uno o más estos de aminoácidos en la secuencia de las regiones marco conservadas del anticuerpo donante que se diferencian de uno o más restos de aminoácidos en la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de las regiones marco conservadas del uno o más anticuerpos caninos; y
- sustituir el uno o más restos de aminoácidos identificados en el anticuerpo donante con el uno o más restos de aminoácidos presentes en la posición correspondiente en el uno o más anticuerpos caninos.

El procedimiento de la presente divulgación modifica un anticuerpo donante para su uso en un canino de tal manera que el anticuerpo modificado no contenga ningún aminoácido en cualquier posición de las regiones marco conservadas que sea ajeno en esa posición en los caninos. El anticuerpo modificado mantiene por lo tanto la especificidad y afinidad del anticuerpo donante por el antígeno diana, pero es importante que se modifica de manera que no se crean epítomos potencialmente ajenos. El anticuerpo modificado por lo tanto no se ve como ajeno en los caninos y por lo tanto no induce una respuesta inmunitaria en caninos que podría dar lugar a la neutralización de la eficacia del anticuerpo, especialmente después de una administración a largo plazo.

En ciertos casos, la etapa de sustitución del uno o más restos de aminoácidos identificados comprende la sustitución del uno más restos de aminoácido identificados con el uno o más restos de aminoácidos presentes en la posición correspondiente que tiene la homología más alta con el uno o más restos de aminoácidos sustituidos.

En ciertos casos, el procedimiento comprende adicionalmente la etapa de sustitución de dominios constantes de la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo donante con dominios constantes de la cadena pesada y/o la cadena ligera derivados de un anticuerpo canino. Normalmente, el dominio constante de la cadena pesada se sustituye con un dominio constante canino tipo HCA o HCD.

En ciertos casos, el antígeno diana es el factor de crecimiento de nervios (NGF).

El procedimiento del primer aspecto de la divulgación no comprende el injerto de CDR. Los anticuerpos preparados de acuerdo con el procedimiento del primer aspecto de la divulgación comprenden las CDR del anticuerpo donante, las regiones marco conservadas caninizadas preparadas de acuerdo con el procedimiento del primer aspecto de la divulgación y dominios constantes caninos.

La presente divulgación se extiende a los anticuerpos preparados de acuerdo con el primer aspecto de la presente divulgación tal como los que se describen posteriormente.

En consecuencia, de acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación se proporciona un anticuerpo caninizado o fragmento de unión del mismo que es unido específicamente al factor de crecimiento neuronal (NGF) canino. Normalmente, el anticuerpo caninizado o fragmento de unión del mismo neutraliza la función biológica del NGF, cuando se une al este. Es decir, la unión del anticuerpo caninizado o fragmento de unión a NGF secuestra la capacidad del NGF para unirse al receptor TrkA o al receptor p75. En ciertos casos, el anticuerpo caninizado o fragmento de unión del mismo, se une al NGF con una K_D de afinidad de 1×10^{-8} o menos.

En un aspecto adicional o relacionado de la divulgación se proporciona un anticuerpo neutralizante, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que es capaz de unirse específicamente al factor de crecimiento de nervios (NGF) canino, comprendiendo, consistiendo o consistiendo esencialmente el anticuerpo a fragmento de unión del anticuerpo una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 85, 90, 95 o 99 % de estas. En ciertos casos dicha identidad es sobre una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos,

preferentemente 20 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

En algunos casos el anticuerpo neutralizante es un anticuerpo monoclonal. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo caninizado, es decir, un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que se ha des-inmunizado de manera que no se producirán anticuerpos neutralizantes contra este cuando se administre a un sujeto canino. En ciertos casos, el anticuerpo caninizado se prepara de acuerdo con el procedimiento de preparación de un anticuerpo del primer aspecto de la divulgación. Normalmente los dominios constantes de la cadena pesada del anticuerpo se seleccionan o modifican por medio de sustitución o eliminación de aminoácidos de manera que los dominios constantes no medien en las funciones efectoras corriente abajo.

5 En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo comprende, consiste, o consiste esencialmente en una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 10, o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 85, 90, 95 o 99 % de homología de secuencias con estas. En ciertos casos, dicha identidad es sobre una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente, aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

15 En un aspecto adicional o relacionado de la divulgación se proporciona un anticuerpo neutralizante, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que es capaz de unirse específicamente al factor de crecimiento de nervios (NGF) canino, comprendiendo, consistiendo o consistiendo esencialmente el anticuerpo un fragmento de unión del anticuerpo una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 85, 90, 95 o 99 % de estas.
 20 En ciertos casos dicha identidad es sobre una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente 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 casos, el dominio constante de inmunoglobulina se deriva de un anticuerpo de la subclase IgG (inmunoglobulina G) para formar la cadena pesada completa del anticuerpo caninizado de la divulgación. Se conocen cuatro dominios constantes caninos diferentes. Normalmente, dichos dominios constantes comprenden una CH1, CH2 y CH3 junto con un engarce adecuado (o "bisagra") localizado entre los dominios CH1 y CH2. Normalmente, el anticuerpo anti-NGF canino de la divulgación comprende un dominio variable de cadena pesada unido a un dominio constante, en el que el dominio constante no media en las funciones efectoras corriente abajo tal como la fijación de complemento, ADCC, unión al receptor de Fc, o similares. Normalmente, dicha cadena pesada tiene una cadena pesada canina de isotipo A o D.

30 En ciertos casos, el anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo comprende, consiste, o consiste esencialmente en una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80, 90, 95 o 99 % con estas. En ciertos casos dicha identidad es sobre una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

40 En ciertos casos adicionales, el anticuerpo o fragmento de unión puede comprender una cadena pesada en la que al menos un resto de aminoácido en el dominio constante se ha sustituido o eliminado con el fin de evitar la glicosilación de ese resto de aminoácido. En consecuencia, en ciertos casos adicionales, el anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo, consiste, o consiste esencialmente en una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80, 90, 95 o 99 % con estas. En ciertos casos dicha identidad es sobre una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

50 En algunos casos, se prefieren los anticuerpos o fragmentos que tiene un dominio constante de cadena pesada que no median en las funciones efectoras corriente abajo tal como fijación del complemento, ADCC, unión al receptor de Fc, o similares. Dichas cadenas pesadas pueden comprender cadenas pesadas del subtipo canino derivado de IgG-A y pueden tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 11, 15 o 19. Adicionalmente, dichas cadenas pesadas pueden comprender cadenas pesadas del subtipo canino derivado de IgG-D y puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 14, 18 y 22.

55 En un aspecto adicional o relacionado, la presente divulgación se extiende a un anticuerpo neutralizante, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que es capaz de unirse específicamente al factor de crecimiento de nervios (NGF) canino, el anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo que comprende, consiste, o consiste esencialmente en una cadena ligera y una cadena pesada en el que la región variable de la cadena ligera (VL) comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80, 90, 95 o 99 % con estas, y en el 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 SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 85, 90, 95 o 98 % con estas. En ciertos casos dicha identidad es sobre una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

5 En ciertos casos, el anticuerpo o miembro de unión comprende una cadena ligera que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 10, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 85 %, más preferentemente un 95 % y más preferentemente un 98 % con estas. En ciertos casos dicha identidad es sobre una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

10 En ciertos casos, el anticuerpo o miembro de unión comprende una cadena pesada que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 85 %, más preferentemente un 95 % y más preferentemente un 98 % con estas. En ciertos casos dicha identidad es sobre una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

En ciertos casos, el anticuerpo se puede conjugar con al menos una molécula indicadora.

20 En ciertos casos adicionales al menos un resto del dominio constante se puede sustituir o eliminar con el fin de evitar la glicosilación de ese resto. En consecuencia, en ciertos casos adicionales, el anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo comprende, consiste, o consiste esencialmente en una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 85 %, más preferentemente un 95 % y más preferentemente un 98 % con estas. En ciertos casos dicha identidad es sobre una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 25 aminoácidos.

25 El inventor ha definido adicionalmente una serie de regiones marco conservadas (FR) que se pueden combinar con regiones determinantes de complementariedad (CDR) para formar dominios variables de cadena pesada y ligera caninizados. Cada uno de los dominios de cadena pesada y ligera tiene 4 regiones marco conservadas, denominadas FR1, FR2, FR3 y FR4.

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

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

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

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

50 una región marco conservada FR1 que consiste o comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24.
 una región marco conservada FR2 que consiste o comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.
 una región marco conservada FR3 que consiste o comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 27.
 una región marco conservada FR4 que consiste o comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28.

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

55 una región marco conservada FR1 que consiste o comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29.
 una región marco conservada FR2 que consiste o comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30.

una región marco conservada FR3 que consiste o comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32.

una región marco conservada FR4 que consiste o comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33.

5 Normalmente, las CDR de cadena ligera y pesada se derivan de un anticuerpo que tiene especificidad de unión para el NGF canino.

Normalmente, la producción del anticuerpo caninizado anti-NGF canino de la divulgación no necesita que se introduzcan retromutaciones en las regiones marco conservadas de los dominios variables de cadena ligera o pesada.

10 En ciertos casos, el dominio variable de cadena ligera que comprende dicha al menos una región marco conservada que se ha descrito anteriormente se une a un dominio constante de cadena ligera derivado de un canino, normalmente un dominio constante kappa de cadena ligera, pero opcionalmente a una cadena ligera lambda. En ciertos casos, dicha cadena ligera comprende una región FR1 con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24, una región FR2 con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, y una región FR3 con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 SEQ ID NO: 27, y una región FR4 con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 o una región marco conservada con una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 85, 90, 95 o 98 % con las anteriores. En ciertos casos, dicha identidad es sobre una longitud de al menos aproximadamente 5 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 10 aminoácidos.

20 En ciertos casos adicionales, la región variable de cadena pesada comprende al menos una de las regiones marco conservadas descritas anteriormente se unen a un dominio constante de cadena pesada derivado de un canino. En ciertos casos, la secuencia de aminoácidos del dominio constante carece de modificaciones tras la traducción, o se puede modificar para retirar cualquiera o todos los restos que se puedan someter a glicosilación unida a N o unida a O, de manera que los dominios constantes están aglicosados. En ciertos casos la cadena pesada comprende una región FR1 con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, una región FR2 con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, una región FR3 con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32 y una región FR4 con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 o una región marco conservada con una secuencia de aminoácidos que tiene una secuencia de identidad de al menos un 85, 90, 95 o 98 % con las anteriores. En ciertos casos, dicha identidad es sobre una longitud de al menos aproximadamente 5 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 10 aminoácidos.

30 En ciertos casos adicionales, se pueden hacer modificaciones en las regiones marco conservadas descritas en el presente documento. Es decir, el inventor ha identificado que para algunos restos en cada región marco conservada, hay una elección de restos de aminoácidos que pueden estar presentes en una posición determinada. ES importante, que estas modificaciones de regiones marco conservadas no den como resultado un cambio conformacional de las regiones determinantes de complementariedad, ya que esto puede alterar la especificidad y/o afinidad de unión del anticuerpo resultante. En ciertos casos, la divulgación se extiende a la introducción de 2 o más sustituciones de aminoácidos en los restos de aminoácidos de las regiones marco conservadas de la región variable de la cadena ligera y/o la región variable de la cadena pesada.

40 En consecuencia, en ciertos casos adicionales, la divulgación se extiende a polipéptidos, tales como un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene una región FR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 que se ha modificado por una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos (en los que los aminoácidos se denotan por su código de única letra). El resto de aminoácido Q en la posición 3 (Q3) se sustituye por el resto de aminoácido V, T5 es M, S7 es T, A9 es L, L13 es V, Q15 es P o R, E16 es G, K18 es T o P, V19 es A, T20 es S, y T22 es S. Además, se puede proporcionar adicionalmente una o más de las siguientes sustituciones: T5 es I, A9 es P, S12 es A, S14 es R o T, E16 es D, E17 es D, K18 es A, E o L, T22 es Y y C23 es Y.

45 En ciertos casos adicionales, cuando el dominio variable de la cadena ligera tiene un región FR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, se puede modificar mediante una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: el resto de aminoácido V de la posición 3 (V3) se sustituye por el resto de aminoácido Q, T5 es M, S7 es T, A9 es L, L13 es V, Q15 es P o R, E16 es G, K18 es T o P, V19 es A, T20 es S, y T22 es S. Además, se puede proporcionar adicionalmente una o más de las siguientes sustituciones: T5 es I, A9 es P, S12 es A, S14 es R o T, E16 es D, E17 es D, K18 es A, E o L, T22 es Y y C23 es Y.

50 En ciertos casos adicionales, la región FR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 se puede modificar mediante una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: Y2 es F, Q3 es R, A9 es S, K11 es Q, y L12 es R. Además, Y2 puede ser I o L, Q3 puede ser I o L, Q4 puede ser H, K5 puede ser R, P6 puede ser A o S, G7 puede ser D, A9 puede ser P o T, K11 puede ser E o R, L12 puede ser A, G, P o S, I14 puede ser L, y Y15 puede ser E, F, N, S o V.

55 En ciertos casos adicionales, la región FR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 puede modificarse por una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: S4 es D, E14 es D, Y15 es F, S16 es T, L17 es F, T18 es K, N20 es S, L22 es V, S24 es P, V27 es A, F31 es Y. Además, G1 puede ser A, V2

puede ser A, P3 puede ser S, F6 puede ser L o V, S7 puede ser I, G8 puede ser A, T13 puede ser A, S16 puede ser R, T18 puede ser R, S24 puede ser A, E25 puede ser D, G, I o N, V27 puede ser G, S o T, A28 puede ser G, y V29 puede ser I o L.

5 En ciertos casos adicionales, cuando el dominio variable de cadena ligera tiene la región FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27, puede modificarse por una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: S4 es D, E14 es D, F15 es Y, S16 es T, L17 es F, T18 es K, S20 es N, L22 es V, P24 es S, V27 es A, Y31 es F. Además, G1 puede ser A, V2 puede ser A, P3 puede ser S, F6 puede ser L o V, S7 puede ser I, G8 puede ser A, T13 puede ser A, S16 puede ser R, T18 puede ser R, S24 puede ser A, E25 puede ser D, G, I o N, V27 puede ser G, S o T, A28 puede ser G, y V29 puede ser I o L.

10 En ciertos casos adicionales, la región FR4 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 se puede modificar mediante una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: E8 es D. Además, G2 puede ser S, A3 puede ser P, Q o T, G4 puede ser E, T5 puede ser P, K6 puede ser Q o S, V7 puede ser L o W, E8 puede ser R, o L9 puede ser I.

15 En ciertos casos adicionales, la región FR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 puede modificarse mediante una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: D10 es G, N13 es Q, G15 es T, G16 es E, T17 es S, T19 es R, V24 es A, S28 es T, L29 es F, T30 es S. Además, E1 puede ser D o G, V2 puede ser E, G, I, L o M, Q3 puede ser A, E, H, K, L, P, R, S o V, L4 puede ser P o V, V5 puede ser A, E, L o M, E6 puede ser A o Q, S7 puede ser F, L o T, G9 puede ser E, D10 puede ser A, E, N o T, L11 puede ser Q, R, V o W, V12 puede ser A, I o M, N13 puede ser K o R, P14 puede ser F o T, G15 puede ser A o E, G16 puede ser A, T17 puede ser P, L18 puede ser R, T19 puede ser G, K o V, L20 puede ser I o V, S21 puede ser Y, V23 puede ser A, E, I o L, V24 puede ser G, I, S o T, S25 puede ser G, P o T, G26 puede ser D, R o T, F27 puede ser D, I, L, S, T o V, S28 puede ser A, D, I, L, M, N, P o R, L29 puede ser I, M o V, T30 puede ser D, G, H, I, K, N, R, V.

25 En ciertos casos adicionales, la región FR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 puede modificarse mediante una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: L6 es P, R8 es K, E11 es Q, G14 es A. Además, W1 puede ser C, V2 puede ser A, F, I o L, Q4 puede ser H o L, A5 puede ser D, G, P, S, T o V, G7 puede ser E, L o R, R8 puede ser A, E, G, M o Q, G9 puede ser D, E, R, T o V, L10 puede ser F, M o P, E11 puede ser D, H, L, P o R, W12 puede ser C, F, L, M, S o Y, V13 puede ser F, I o L, G14 puede ser L, S o T.

30 En ciertos casos adicionales, la región FR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 puede modificarse mediante una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: L2 es F, T5 es S, T8 es N, S9 es A, S11 es N, V13 es L, F14 es Y, K16 es Q, H18 es N, Q21 es R, S22 es A, T27 es V, R32 es K. Además, R1 puede ser Q, L2 puede ser V, T3 puede ser A, I o S, I4 puede ser L, M, T o V, T5 puede ser A o F, R6 puede ser K, D7 puede ser E o N, T8 puede ser D, G, I o S, S9 puede ser D, G, P, T o V, K10 puede ser E, G, M, N, Q o R, S11 puede ser D, H, K o R, T12 puede ser A, I, M o S, V13 puede ser A, I o M, F14 puede ser H, S o T, L15 puede ser I, K16 puede ser A, D, E, H o R, M17 puede ser L, H18 puede ser D, K, P, R, S o T, S19 puede ser D, G, N, R o T, L20 puede ser V, Q21 puede ser G, I, K, S o T, S22 puede ser D, G, P, T o V, E23 puede ser A, D o V, T25 puede ser A, M o S, A26 puede ser G o V, T27 puede ser F, I, K, L, M o Q, Y28 puede ser H, Y29 puede ser F o H, A31 puede ser C, G, L, M, R, S, T o V, R32 es A, D, E, G, I, L, M, N, P, Q, S, T o V.

40 En ciertos casos adicionales, en los que el dominio variable de cadena pesada tiene la región FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, se puede modificar mediante una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: L2 es F, T5 es S, T8 es N, S9 es A, S11 es N, V13 es L, F14 es Y, Q16 es K, H18 es N, R21 es Q, S22 es A, T27 es V, R32 es K. Además, R1 puede ser Q, L2 puede ser V, T3 puede ser A, I o S, I4 puede ser L, M, T o V, T5 puede ser A o F, R6 puede ser K, D7 puede ser E o N, T8 puede ser D, G, I o S, S9 puede ser D, G, P, T o V, K10 puede ser E, G, M, N, Q o R, S11 puede ser D, H, K o R, T12 puede ser A, I, M o S, V13 puede ser A, I o M, F14 puede ser H, S o T, L15 puede ser I, K16 puede ser A, D, E, H o R, M17 puede ser L, H18 puede ser D, K, P, R, S o T, S19 puede ser D, G, N, R o T, L20 puede ser V, Q21 puede ser G, I, K, S o T, S22 puede ser D, G, P, T o V, E23 puede ser A, D o V, T25 puede ser A, M o S, A26 puede ser G o V, T27 puede ser F, I, K, L, M o Q, Y28 puede ser H, Y29 puede ser F o H, A31 puede ser C, G, L, M, R, S, T o V, R32 es A, D, E, G, I, L, M, N, P, Q, S, T o V.

50 En ciertos casos adicionales, la región FR4 de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 se puede modificar mediante una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: L6 es S. Además, W1 puede ser L, G2 puede ser A o S, Q3 puede ser D, H, P o R, T5 puede ser A, I, N o S, L6 puede ser P, Q o R, V7 puede ser I, L o P, T8 puede ser A, F, I, L, P, S o Y, V9 puede ser A, S10 puede ser A, C, P o T, S11 puede ser A, L o P.

55 En ciertos casos de los aspectos anteriores de la divulgación, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Normalmente, el anticuerpo es un anticuerpo caninizado.

En ciertos casos de los aspectos anteriores, el anticuerpo neutralizante del NGF caninizado de la divulgación, o el fragmento de unión derivado del mismo se une específicamente al NGF canino (factor de crecimiento de nervios) con una afinidad de unión que tiene una constante de equilibrio de disociación (K_D) de 1×10^{-8} o menos. Además, se

prefiere que los anticuerpos caninizados no reaccionen de manera cruzada con ningún otro epítipo presente en los caninos, y adicionalmente que no se generen anticuerpos neutralizantes contra los anticuerpos de la divulgación cuando se administran a un canino.

5 Además, se prefiere que los dominios constantes de los anticuerpos no medien ninguna de las funciones efectoras corriente abajo, incluyendo, pero sin limitarse a, fijación de complemento, ADCC y unión y activación del receptor de Fc.

En ciertos casos de los aspectos anteriores de la divulgación, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, tiene una semivida sérica en caninos de al menos una semana. Normalmente, la semivida sérica es al menos de 8 días. Normalmente, el anticuerpo no es inmunogénico en caninos.

10 En ciertos casos de los aspectos anteriores de la divulgación, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, se puede purificar o purifica mediante un procedimiento que comprende la cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de exclusión por tamaño. En casos alternativos, al anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, se puede purificar o purificarse por un procedimiento que comprende cromatografía de afinidad Captoadhere seguido por una cromatografía de intercambio aniónico.

15 En ciertos casos, el anticuerpo, o fragmentos de unión al antígeno, no media en las funciones efectoras corriente abajo. Normalmente el anticuerpo o fragmento de unión tiene una cadena pesada de isotipos A o D caninos.

En ciertos casos, el anticuerpo caninizado se prepara de acuerdo con el procedimiento de preparación de un anticuerpo del primer aspecto de la divulgación. En ciertos casos adicionales, se pueden hacer modificaciones de la secuencia de aminoácidos de las regiones constantes de la cadena pesada en los anticuerpos de la divulgación.

20 Dicha modificación puede implicar la adición, sustitución o eliminación de uno o más restos de aminoácidos. Dichos cambios de aminoácidos se llevan a cabo normalmente con el fin de modificar las características funcionales del anticuerpo. Por ejemplo, se puede llevar a cabo la modificación de aminoácidos para evitar las funciones efectoras corriente abajo mediadas por los dominios constantes del anticuerpo, por ejemplo, evitando la capacidad del anticuerpo para unirse a los receptores Fc, activar el complemento o inducir ADCC. Además, se pueden hacer modificaciones a los restos de aminoácidos de la región bisagra del dominio constante de la cadena pesada con el fin de modificar la semivida circulatoria de un anticuerpo cuando se administra a un canino.

La presente divulgación se extiende a fragmentos de anticuerpo que se unen al NGF canino y secuestran su capacidad para unirse a los receptores p75 o TrkA.

30 En ciertos casos, el fragmento de unión al anticuerpo puede comprender una secuencia de cadena pesada y cadena ligera de la divulgación que se conecta mediante un engarce flexible para formar un anticuerpo de cadena sencilla.

Un Fv de cadena sencilla (scFv) comprende un dominio VH y VL. Los dominios VH y VL se asocian para formar un sitio de unión a la diana. Estos 2 dominios se unen covalentemente por un engarce peptídico. Una molécula de scFv puede tener la forma de VL-engarce-VH, en los casos en los que se necesita el dominio variable de cadena ligera en el extremo N, o VH-engarce-VL en los casos en los que se necesita un dominio VH en el extremo N. En consecuencia, en ciertos casos adicionales, el fragmento de unión del anticuerpo se selecciona de entre el grupo que consiste en, pero no se limita a, un fragmento de anticuerpo Fab, un fragmento de anticuerpo F(ab')₂, un fragmento de anticuerpo Fv, un fragmento de anticuerpo scFv, y similares.

40 En algunos casos, la divulgación proporciona anticuerpos multiespecíficos o multivalentes que comprenden un anticuerpo anti-NGF o un fragmento de unión de la divulgación acoplado o en conjunto con otros anticuerpos con diferentes especificidades de unión para su uso en una terapia de combinación. Un anticuerpo multiespecífico comprende al menos un anticuerpo o fragmento de unión específico contra un primer epítipo del NGF, y al menos un sitio de unión específico para otro epítipo presente en el NGF, o un antígeno diferente. Un anticuerpo multivalente comprende anticuerpos o fragmentos de unión de anticuerpo que tiene especificidad de unión para el mismo epítipo del NGF. En consecuencia, en ciertos casos, la divulgación se extiende a una proteína de fusión anticuerpo que comprende una o más regiones Fab derivadas de un anticuerpo descrito en el presente documento junto con una o más regiones Fab o Fv de los anticuerpos específicos del NGF. En ciertos casos adicionales, la divulgación se extiende a un anticuerpo biespecífico, en el que el 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 por una diana secundaria, no siendo dicha diana el NGF. Preferentemente dicha diana secundaria ayuda a prevenir la señalización mediada por NGF mediante los receptores p75 y TrkA. Dichos anticuerpos multivalentes, biespecíficos o multiespecíficos se pueden fabricar mediante una variedad de procedimientos recombinantes que es bien conocida por el experto habituado en la técnica.

55 Un aspecto adicional más de la divulgación proporciona un anticuerpo neutralizante anti-neurotrofina que comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 y/o un dominio variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4. En ciertos casos la neurotrofina es el factor de crecimiento de nervios (NGF) canino.

Un aspecto adicional más de la divulgación proporciona un procedimiento para el tratamiento, inhibición o mejora del dolor en un canino, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-NGF canino, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y
- 5 - administrar el mismo a un canino que lo necesite.

En ciertos casos, el anticuerpo es un anticuerpo caninizado.

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

En ciertos casos, el anticuerpo comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 10 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 85 % con estas y/o una cadena pesada que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14, o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos un 85 % y más preferentemente al menos un 98 % de identidad con estas.

En ciertos casos, el anticuerpo anti-NGF canino o el fragmento de unión al antígeno del mismo es cualquiera de los proporcionados en los aspectos anteriores de la divulgación.

En ciertos casos, el dolor es un dolor neuropático. En particular, el dolor puede ser un dolor perioperatorio, postoperatorio o posquirúrgico. El dolor postoperatorio puede resultar después de cualquier procedimiento operatorio que en caninos puede incluir, pero no se limita a, cirugía ortopédica, cirugía de tejidos blandos, procedimientos de ovariectomía, procedimientos de castración, y similares. En ciertos casos adicionales, el dolor es un dolor crónico asociado con el cáncer o una afección cancerosa (dolor oncológico). En ciertos casos adicionales, el dolor se asocia con, o resulta de, artritis reumatoide u osteoartritis. En ciertos casos, el dolor es un dolor inflamatorio o dolor prurítico.

De acuerdo con otro aspecto adicional más de la presente divulgación se proporciona un procedimiento para el tratamiento de artritis o una afección artrítica en un sujeto canino, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-NGF canino de acuerdo con la divulgación o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y
- 30 - administrar el mismo a un canino que lo necesita.

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

En ciertos casos, la artritis o afección artrítica incluye las condiciones seleccionadas de entre el grupo que consiste en poliartritis inmunomediada, artritis reumatoide, osteoartritis y afecciones relacionadas.

Normalmente, el tratamiento de la artritis o afección artrítica comprende la mejora, inhibición, reducción, supresión o retraso de la aparición del dolor asociado con, o que se puede atribuir a, la afección artrítica.

En un aspecto adicional de la presente divulgación se proporciona un procedimiento para el tratamiento de una afección causada por, asociada con lo que resulta en un aumento de la expresión del NGF canino o un aumento de la sensibilidad al NGF en un sujeto canino, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo caninizado anti-NGF canino de acuerdo con la divulgación o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y
- 45 - administrar el mismo a un canino que lo necesita.

De acuerdo con otro aspecto adicional más de la presente divulgación se proporciona un procedimiento para el tratamiento de un tumor cuya proliferación está inducida por el NGF en un canino y las afecciones asociadas con este, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-NGF canino de acuerdo con la divulgación o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y
- 50 - administrar el mismo a un canino que lo necesita.

En ciertos casos, el tumor es un osteosarcoma. En ciertos casos, la proliferación del tumor está inducida por un NGF autocrino o paracrino.

En ciertos casos, los procedimientos anteriores de la divulgación comprenden adicionalmente la etapa de la coadministración de al menos un agente adicional que puede aumentar y/o complementar la eficacia del anticuerpo anti-NGF de la divulgación. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se puede coadministrar junto con al menos un analgésico, AINE, opiáceo, corticosteroide o esteroide.

5 Ejemplos de analgésicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, butorfanol, buprenorfina, fentanilo, flunixin meglumina, meperidina, morfina, nalbufina, y derivados de los mismos. Los AINE adecuados incluyen, pero no se limitan a, acetaminofeno, ácido acetil salicílico, carprofeno, etodolaco, ketoprofeno, meloxicam, firocoxib, robenacoxib, deracoxib, y similares.

10 En ciertos casos adicionales, el al menos un agente adicional puede ser un agente terapéuticamente activo que puede ser uno o más de entre el grupo seleccionado de entre un antibiótico, un agente terapéutico antifúngico, un agente terapéutico antiprotozoario, un agente terapéutico antivirico o agentes terapéuticos similares. Además, el al menos un agente adicional puede ser un inhibidor de los mediadores de la inflamación tal como un antagonista del receptor de PGE, un agente inmunosupresor, tal como la ciclosporina, o un glucocorticoide antiinflamatorio. En ciertos casos adicionales el al menos un agente adicional puede ser un agente que se utiliza para el tratamiento de la disfunción o discapacidad cognitiva, tal como pérdida de memoria o afecciones relacionadas que pueden convertirse en cada vez más prevalentes en caninos ancianos. Más adicionalmente, el al menos un agente adicional puede ser un antihipertensivo u otro compuesto utilizado para el tratamiento de una disfunción cardiovascular, por ejemplo, para tratar la hipertensión, isquemia de miocardio, fallo cardíaco congestivo, y similares. Más adicionalmente, el al menos un agente adicional puede ser un diurético, un vasodilatador, un antagonista del receptor beta-adrenérgico, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina II, un bloqueante del canal del calcio o un inhibidor de la HMG-CoA reductasa.

15 En ciertos casos, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno se administra al canino como parte de los procedimientos anteriores en un intervalo de dosis desde aproximadamente 0,01 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, en particular desde 0,03 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal.

En distintos 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 casos, la composición comprende adicionalmente al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 En un aspecto adicional más de la divulgación proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento del dolor o una afección que resulta en o produce un dolor crónico en un canino o un tumor que prolifera inducido por el NGF, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación, junto con al menos un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En ciertos casos, la composición puede comprender adicionalmente al menos un analgésico, un AINE, un opiáceo, corticosteroide o esteroide.

35 En ciertos casos, la presente divulgación se extiende a un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o fragmentos de unión del anticuerpo de la divulgación.

En consecuencia, un aspecto adicional más de la divulgación proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la divulgación.

40 En ciertos casos, el polinucleótido codifica un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-NGF canino o un fragmento de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, o una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o 10.

45 En ciertos casos adicionales el polinucleótido codifica un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-NGF canino o fragmento de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 o una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 6- SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11- SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15- SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19- SEQ ID NO: 22.

En ciertos casos, el ácido nucleico aislado codifica adicionalmente una o más secuencias reguladoras unidas operativamente a este.

50 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 ligera y/o pesada o un dominio constante de cadena ligera y/o pesada de la divulgación. En ciertos casos, el vector de expresión comprende adicionalmente una o más secuencias reguladoras. En ciertos casos, el vector es un plásmido o un vector retroviral.

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

Un aspecto adicional más de la divulgación proporciona un procedimiento para la producción de un anticuerpo neutralizante anti-NGF canino, comprendiendo el procedimiento la etapa de cultivar la célula del aspecto anterior de la divulgación para permitir que la célula exprese el anticuerpo neutralizante anti-NGF canino.

5 Un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona un procedimiento de purificación de un anticuerpo anti-NGF canino de acuerdo con la divulgación que comprende las etapas de:

- (i) cromatografía de intercambio iónico
- (ii) cromatografía de interacción hidrófoba; y
- (iii) cromatografía de exclusión por tamaño.

10 Un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona un procedimiento de purificación de un anticuerpo anti-NGF canino de acuerdo con la divulgación que comprende las etapas de:

- (i) cromatografía de afinidad Captodhere; y
- (ii) cromatografía de intercambio aniónico.

15 Un aspecto adicional más de la presente divulgación proporciona un procedimiento de producción de un anticuerpo caninizado anti-NGF canino 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 expresa las cadenas ligera y/o pesada de los anticuerpos de la divulgación en una célula huésped adecuada, recuperar los polipéptidos expresados, que se pueden expresar juntos en una célula huésped o por separado en diferentes células huésped, y aislar los anticuerpos.

20 Un aspecto adicional más de la divulgación proporciona un procedimiento para el tratamiento, mejora o inhibición del dolor en un canino o para tratar un tumor cuya proliferación está inducida por el NGF, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al canino una cantidad eficaz de un polinucleótido de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la divulgación.

25 Un aspecto adicional de la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la divulgación, o una composición farmacéutica de acuerdo con 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 o prevención del dolor en un canino.

30 En ciertos casos el dolor es un dolor agudo. En ciertos casos adicionales, el dolor es un dolor crónico. Además, el dolor puede ser un dolor postoperatorio, o un dolor resultante de cualquier procedimiento operacional que en caninos puede incluir, pero no se limita a, cirugía ortopédica, cirugía de tejidos blandos, procedimientos de ovariectomía, procedimientos de castración y similares. En ciertos casos adicionales, el dolor es un dolor crónico asociado con el cáncer o una afección cancerosa. En ciertos casos adicionales, el dolor se asocia con, o resultan de, artritis reumatoide u osteoartritis. En ciertos casos, el dolor es un dolor inflamatorio o dolor prurítico.

35 Un aspecto adicional más de la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento de unión del 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 la artritis, en particular la osteoartritis y/o la artritis reumatoide.

40 Un aspecto adicional más de la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento de unión del 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 cuya proliferación está inducida por el NGF en un sujeto canino y las afecciones asociadas con estos, en particular osteosarcoma. En ciertos casos la proliferación del tumor esta inducida por un NGF autocrino o paracrino.

45 Un aspecto adicional más de la divulgación proporciona el uso de un anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la divulgación, o una composición 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 o prevención del dolor en caninos.

50 Normalmente, el dolor es un dolor crónico. Además, el dolor puede ser un dolor postoperatorio, o un dolor resultante de cualquier procedimiento operatorio que en caninos puede incluir, pero no se limita a, cirugía ortopédica, cirugía de tejidos blandos, procedimientos de ovariectomía, procedimientos de castración y similares. En ciertos casos adicionales, el dolor es un dolor crónico asociado con el cáncer o una afección cancerosa. En ciertos casos adicionales, el dolor se asocia con, o resulta de, artritis reumatoide u osteoartritis. En ciertos casos, el dolor es un dolor inflamatorio o un dolor prurítico.

55

5 Un aspecto adicional más de la divulgación desvela el uso de un anticuerpo o fragmento de unión del 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, inhibición, mejora o prevención de la artritis reumatoide u osteoartritis en caninos.

10 Un aspecto adicional más de la divulgación proporciona el uso de un anticuerpo o fragmento de unión del 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 cuya proliferación está inducida por el NGF en un canino y afecciones asociados con este, en particular el osteosarcoma. En ciertos casos, la proliferación del tumor está inducida por el NGF autocrino o paracrino.

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

15 En un aspecto adicional más de la presente divulgación proporciona un kit para el tratamiento del dolor en caninos, o para el tratamiento de una afección asociada con el dolor, o para el tratamiento, mejora o inhibición del dolor asociado con osteoartritis o artritis reumatoide que comprende un anticuerpo anti-NGF canino o un fragmento de unión de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la divulgación e instrucciones para el uso del mismo.

20 Un aspecto adicional más de la presente divulgación proporciona un kit de diagnóstico para la detección de un anticuerpo monoclonal anti-NGF canino en los 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 comprender instrucciones para el uso del mismo.

Breve descripción de las Figuras

25 La Figura 1 es un gráfico que muestra la unión de los anticuerpos caninizados producidos de acuerdo con la divulgación contra NGF murino y NGF canino.

Las Figuras 2A-D presentan una serie de geles que muestran la purificación con proteína A de los anticuerpos caninizados de la divulgación.

La Figura 3 presenta un gen que muestra los resultados de la purificación de anticuerpos caninizados utilizado SDS-Page.

30 La Figura 4 presenta un gráfico que muestra la inhibición de la proliferación de células TF-1 inducida por NGF por los anticuerpos caninizados.

La Figura 5 presenta un gráfico que muestra el depósito de complemento inducido por los antígenos capturados por los anticuerpos caninizados.

35 La Figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena ligera del anti-NGF caninizado (SEQ ID NO: 1). Las tres regiones CDR, identificadas de acuerdo con la numeración de Kabat, están subrayadas. Los asteriscos encima de restos específicos indican las diferencias de secuencia entre la secuencia caninizada y la secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal alfaD11 anti-NGF murino de rata.

40 La Figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena pesada del anti-NGF caninizado (SEQ ID NO: 2). Las tres regiones CDR, identificadas de acuerdo con la numeración de Kabat, están subrayadas. Los asteriscos encima de restos específicos indican las diferencias de secuencia con la secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal aD11 anti-NGF murino de rata.

La Figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) de un dominio variable de cadena ligera de una cadena ligera kappa canina (CaN-kLC) de un anticuerpo anti-NGF caninizado. Los restos del dominio variable se muestran en negrita.

45 La Figura 9 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) de un dominio variable de cadena pesada de una cadena pesada canina (CaN-HCA) de IgG-A anti-NGF caninizada. Los restos del dominio variable se muestran en negrita.

50 La Figura 10 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 7) de un dominio variable de cadena pesada de una cadena pesada canina (CaN-HCB) de IgG-B anti-NGF caninizada. Los restos del dominio variable se muestran en negrita.

La Figura 11 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8) de un dominio variable de cadena pesada de una cadena pesada canina (CaN-HCC) de IgG-C anti-NGF caninizada. Los restos del dominio variable se muestran en negrita.

La Figura 12 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 9) de un dominio variable de cadena pesada de una cadena pesada canina (CaN-HCD) de IgG-D anti-NGF caninizada. Los restos del dominio variable se muestran en negrita.

5 La Figura 13A presenta un gráfico que muestra la comparación de unión al NGF de anticuerpos monoclonales anti-NGF canino utilizando diluciones variables de las SEQ ID NO: 5 y 7 y SEQ ID NO: 10 y 11. La Figura 13B muestra un gráfico que muestra el depósito del complemento de los sobrenadantes de la Fig. 13A.

La Figura 14A presenta un gráfico que muestra la comparación de unión al NGF de variantes N-glicosiladas y aglicosiladas de anticuerpos monoclonales anti-NGF canino con isotipos de cadena pesada HCB y HCC. La Figura 14B presenta un gráfico que muestra la deposición del complemento de los sobrenadantes de la Fig. 14A.

10 Las Figuras 15A y B muestran la purificación cuantitativa de los anticuerpos anti-NGF caninos de la presente divulgación que utilizan un procedimiento de tres etapas (Procedimiento I) que comprende (1) cromatografía de intercambio aniónico, (2) cromatografía de interacción hidrófoba y (3) cromatografía de exclusión por tamaño. La Figura 15A muestra los resultados del fraccionamiento por HPLC de exclusión por tamaño. La Figura 15 B muestra un gel de SDS-PAGE reductora de fracciones siguiendo cada etapa. La Figura 15C y D muestran la purificación cuantitativa de los anticuerpos anti-NGF canino de la presente divulgación utilizando un procedimiento de dos etapas (Procedimiento II) que comprende cromatografía Cpto adhere y cromatografía de intercambio aniónico. Figura 15C: análisis SDS-PAGE en condiciones no reductoras y reductoras. La calle 1 es MWS, la calle 2 es la muestra 3450 2 µg/ml y 0 µl de agente reductor, la calle 3 es la muestra 3450 4 µg/ml, y 0 µl de agente reductor, la calle 4 es la muestra 3450 6 µg/ml y 0 µl de agente reductor, la calle 5 es MWS, la calle 6 es la muestra 3450 2 µg/ml y 3 µl de agente reductor, la calle 7 es la muestra 3450 4 µg/ml y 3 µl de agente reductor, la calle 8 es la muestra 3450 6 µg/ml y 3 µl de agente reductor y la calle 9 es MWS. Figura 15D: cromatografía de exclusión por tamaño.

25 La Figura 16 muestra una comparación del anticuerpo monoclonal anti-NGF purificado por los Procedimientos I y II. Figura 16A: comparación de la SDS-PAGE reductora y no reductora. Figura 16B: comparación por ELISA anti-NGF.

La Figura 17 muestra que el peso corporal (panel superior) y temperatura (panel inferior) son estables después de la administración intravenosa de anticuerpos anti-NGF canino en perros.

30 La Figura 18 muestra el análisis cinético de la concentración de anticuerpo monoclonal anti-NGF canino en el plasma después de la inyección intravenosa a un perro. Se le inyectó a un perro Beagle por vía intravenosa un anticuerpo anti-NGF a 2 mg/kg, se tomaron muestras de plasma en los momentos indicados y se detectó el anticuerpo monoclonal anti-NGF por ELISA NGF. El anticuerpo monoclonal anti-NGF canino tenía una fase de eliminación (beta) de semivida sorprendentemente larga de aproximadamente 9 días.

35 La Figura 19 muestra que los anticuerpos monoclonales anti-NGF canino reducen el dolor inflamatorio en perros. Se inyectó caolín en la almohadilla plantar de perros Beagle el Día -1, anticuerpo o vehículo de control el Día 0 y se midió la cojera mediante una escala de puntuación visual.

Descripción detallada de la divulgación

40 Después de una experimentación extensa, el inventor ha tomado la secuencia del anticuerpo monoclonal (MAb) αD11 de rata anti-NGF de ratón y sorprendentemente la utilizó para producir un anticuerpo anti-NGF canino no inmunogénico. El anticuerpo no inmunogénico resultante, que no se produce utilizando técnicas de injerto de CDR convencionales, ha demostrado que presenta alta afinidad de unión al NGF canino. El anticuerpo neutraliza la función biológica del NGF canino, más específicamente inhibiendo la unión del NGF a los receptores radicados en las células TrkA y p75. Además, se ha descubierto también, inesperadamente, que cuando se administran a un canino, no se producen anticuerpos neutralizantes en contra. En consecuencia, el anticuerpo caninizado de la divulgación es adecuado para el alivio del dolor crónico a largo plazo en perros.

45 El procedimiento de generación de los dominios variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos de la divulgación que se han empleado por el inventor da como resultado la sustitución de restos de aminoácidos específicos de la rata (donante) que están presentes en las regiones marco conservadas de los dominios variables de las cadenas ligera y pesada por restos que, basándose en el análisis del inventor, mantendrán la conformación de las regiones CDR y por lo tanto mantienen la especificidad y avidéz de unión, a la vez que se reduce la presencia de epítopos inmunogénicos que pueden dar como resultado anticuerpos neutralizantes que se generan contra el anticuerpo, si se administrara a los caninos de forma no alterada. Específicamente, el procedimiento de preparación de anticuerpo de la divulgación (conocido como PETización) comprende la evaluación de la secuencia de las regiones marco conservadas de un anticuerpo donante (por ejemplo, de rata) para la administración adecuadamente a un canino comparando la secuencia de las regiones marco conservadas del anticuerpo donante con la secuencia de un anticuerpo o un agrupamiento de anticuerpos derivados de caninos. Aunque la comparación puede ser entre la secuencia donante y un único miembro de la secuencia diana, será obvio que se prefiere la comparación con un agrupamiento de secuencias diana debido a que se expandirá el número de opciones naturales en cada posición Kabat de las especies diana. Esto no solo aumentará la probabilidad de un "coincidencia" entre el donante y la

diana, sino que también expandirá las opciones para la sustitución cuando no exista una coincidencia. Como resultado, una sustitución con características lo más cercanas posible a las del donante serán las que se van a escoger. Cuando la secuencia donante y la secuencia canina se diferencian en cualquier número Kabat o posición correspondiente, la secuencia donante se modifica para sustituir el resto de aminoácido en cuestión por un resto de aminoácido que se sabe que es natural en los caninos.

Cuando la sustitución de un resto de aminoácido presente en una región marco conservada de una inmunoglobulina donante es necesaria, normalmente se lleva a cabo utilizando el principio de una sustitución conservadora en la que un resto de aminoácido se sustituye por un resto de aminoácido que es natural en esa posición Kabat en un canino y está relacionada lo más cercanamente posible en tamaño, carga e hidrofobia respecto al aminoácido que sustituye en la secuencia donante. La intención es escoger una sustitución que no cause, o al menos solo mínimamente, una perturbación o alteración de la estructura tridimensional del anticuerpo donante. En ciertas situaciones, no habrá una opción clara y cada elección tendrá beneficios e inconvenientes. La decisión final puede necesitar el modelado tridimensional o incluso la expresión de distintas secuencias alternativas. Sin embargo, en general, estará disponible una clara preferencia. Como resultado de este procedimiento, solo se hace un cambio en la secuencia donante cuando el resto sea ajeno en la diana y la sustitución esté tan próximamente relacionada como sea posible a la que sustituye. Por lo tanto, se evita la creación de epítopos ajenos, pero se conserva la estructura tridimensional completa y como resultado, también se conserva la afinidad y especificidad.

Las regiones constantes de cadena ligera y pesada se derivan normalmente de anticuerpos derivados del canino (diana). Los dominios constantes de cadena pesada se seleccionan o modifican de manera que no medien en funciones efectoras corriente abajo. Como se ha descubierto, bastante sorprendentemente, que no se producen o mínimamente anticuerpos neutralizantes contra los anticuerpos producidos de acuerdo con la divulgación, se ha descubierto que los anticuerpos tienen sorprendentemente una larga semivida circulatoria y la opción de repetir la dosificación. Además, como la sustitución de los restos de la región marco conservada se lleva a cabo de una manera que no afecta la conformación tridimensional de las regiones CDR, no habrá variación en la especificidad de la diana deseada.

Existen cuatro isotipos principales de IgG en el ser humano y aunque la nomenclatura es similar se diferencian en el comportamiento y función incluyendo la afinidad por los productos bacterianos tales como la Proteína A y la Proteína G, su capacidad de activar la citólisis dependiente de complemento (CDC) y su capacidad para inducir la destrucción de las células diana mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). La selección de los isotipos de IgG con dominios constantes activos o "armados" con CDC y ADCC se considera que tiene beneficios clínicos cuando se diseñan los anticuerpos para eliminar las células diana que tienen su antígeno equivalente, tal como en oncología o control de infecciones (por ejemplo, en medicina humana se prefiere el uso de los isotipos IgG1 humanos para los fines anteriores). Por el contrario, la activación del sistema inmunitario se considera no deseable en otros cuadros tales como en el alivio de la inflamación, dolor o autoinmunidad y por lo tanto se prefieren los isotipos de IgG humana con mínima actividad CDC y ADCC (por ejemplo, en dicho uso en medicina humana, a menudo se prefieren los isotipos IgG4). Se han descrito cuatro isotipos distintos de dominio constante de cadena pesada inmunoglobulinas gamma (IgG) en el sistema inmunitario canino (Patente de EE. UU. N.º 5.852.183, Tang L. y col. 2001. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 80. 259-270) junto con secuencias de dominios constantes sencillos kappa y lambda. Los cuatro dominios constantes de cadena pesada A, B, C y D caninos no se habían caracterizado en términos de actividad funcional mediados de por estos. A pesar de la homología total de la familia de IgG, las proteínas que codifican la IgG canina están más relacionadas entre ellas que los miembros de la familia de otras especies, de manera que no se podía definir solo por homología cuál de las funciones anteriores, si había alguna, se podía adscribir a cada uno de los cuatro isotipos caninos. La selección isotipos de IgG con dominios constantes activos en CDC y ADCC se considera beneficiosa cuando los anticuerpos se diseñan para eliminar células diana que tienen el antígeno equivalente, tal como en oncología y control de infecciones, ro ejemplo en medicina humana se prefiere el uso de isotipos IgG1. Por el contrario, la activación del sistema inmunitario se considera no deseable en otros cuadros tales como en el alivio de la inflamación, dolor o autoinmunidad y por tanto se prefieren isotipos de IgG humana con una actividad CDC y ADCC mínima o "desarmados", por ejemplo, en uso médico en humanos, se seleccionarían los isotipos IgG4.

Los anticuerpos de la divulgación comprenden dominios constantes de cadena ligera y pesada derivados de caninos. Además, las regiones determinantes de complementariedad se derivan del anticuerpo de rata alfaD11 anti-NGF de ratón. El anticuerpo α D11 se describió 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). Posteriormente se clonó el anticuerpo alfaD11 por Ruberti y col. (Ruberti, F. y col. (1993) "Cloning and Expression of an Anti-Nerve Growth Factor (NGF) Antibody for Studies Using the Neuroantibody Approach". *Cellular and Molecular Neurobiology*. 13(5):559-568).

Las regiones CDR derivadas del anticuerpo α D11 se combinan con las secuencias de regiones marco conservadas que el inventor ha determinado que conservan la estructura terciaria de las CDR, y por lo tanto la especificidad de unión, a la vez que se evita que aparezcan anticuerpos neutralizantes contra ellos, cuando el anticuerpo se administra a caninos.

Se hace referencia a cada una de las cuatro regiones marco conservadas de regiones variables de cadenas ligera y

5 pesada como FR1-FR4. Para cada una de estas regiones marco conservada, el inventor a identificado un resto de aminoácido preferido (un denominado resto preferido) para cada posición específica, y también se han podido proporcionar restos de aminoácidos alternativos en esa posición. Las Tablas 1 a 8 posteriores ilustran las 4 regiones marco conservadas para cada una de las cadenas pesada y ligera. Las tablas proporcionan la posición de un aminoácido con respecto a esa región marco conservada específica y además de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat que se utiliza para identificar la posición de un resto en particular a lo largo de la longitud del dominio variable completo de la cadena pesada o ligera. El resto o restos que se muestran como restos del grupo 1 son los restos preferidos, mientras que los restos del grupo 2 son restos alternativos. Sin embargo, estos se preferirán en general sobre los restos que se muestran en el grupo 1 en relación a esa posición específica. Los restos de aminoácido se identifican utilizando el sistema de letra única.

10 Tabla 1 – Restos de la FR1 del dominio variable de cadena ligera

| Posición de FR1 en la cadena ligera | Posición por numeración de Kabat en la cadena ligera | Restos de aminoácidos del Grupo 1 | Restos de aminoácidos del Grupo 2 |
|-------------------------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 1 | D | |
| 2 | 2 | I | |
| 3 | 3 | QV | |
| 4 | 4 | M | |
| 5 | 5 | TM | I |
| 6 | 6 | Q | |
| 7 | 7 | ST | |
| 8 | 8 | P | |
| 9 | 9 | AL | P |
| 10 | 10 | S | |
| 11 | 11 | L | |
| 12 | 12 | S | A |
| 13 | 13 | LV | |
| 14 | 14 | S | RT |
| 15 | 15 | QPR | |
| 16 | 16 | GE | D |
| 17 | 17 | E | D |
| 18 | 18 | TKP | AEL |
| 19 | 19 | VA | |
| 20 | 20 | TS | |
| 21 | 21 | I | |
| 22 | 22 | ST | Y |
| 23 | 23 | C | Y |

Tabla 2 – Restos de la FR2 del dominio variable de cadena ligera

| Posición de FR2 en la cadena ligera | Posición por numeración de Kabat en la cadena ligera | Restos de aminoácidos del Grupo 1 | Restos de aminoácidos del Grupo 2 |
|-------------------------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 35 | W | |
| 2 | 36 | YF | IL |
| 3 | 37 | QR | IL |
| 4 | 38 | Q | H |
| 5 | 39 | K | R |
| 6 | 40 | P | AS |
| 7 | 41 | G | D |
| 8 | 42 | Q | |
| 9 | 43 | SA | PT |
| 10 | 44 | P | |
| 11 | 45 | KQ | ER |
| 12 | 46 | LR | AGPS |
| 13 | 47 | L | |
| 14 | 48 | I | L |
| 15 | 49 | Y | EFNSV |

ES 2 704 036 T3

Tabla 3 – Restos de la FR3 del dominio variable de cadena ligera

| Posición de FR3 en la cadena ligera | Posición por numeración de Kabat en la cadena ligera | Restos de aminoácidos del Grupo 1 | Restos de aminoácidos del Grupo 2 |
|-------------------------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 57 | G | A |
| 2 | 58 | V | A |
| 3 | 59 | P | S |
| 4 | 60 | SD | |
| 5 | 61 | R | |
| 6 | 62 | F | LV |
| 7 | 63 | S | I |
| 8 | 64 | G | A |
| 9 | 65 | S | |
| 10 | 66 | G | |
| 11 | 67 | S | |
| 12 | 68 | G | |
| 13 | 69 | T | A |
| 14 | 70 | DE | |
| 15 | 71 | FY | |
| 16 | 72 | ST | R |
| 17 | 73 | FL | |
| 18 | 74 | KT | R |
| 19 | 75 | I | |
| 20 | 76 | SN | |
| 21 | 77 | S | |
| 22 | 78 | LV | |
| 23 | 79 | E | |
| 24 | 80 | PS | A |
| 25 | 81 | E | DGIN |
| 26 | 82 | D | |
| 27 | 82A | VA | GST |
| 28 | 82B | A | G |
| 29 | 82C | V | IL |
| 30 | 83 | Y | |
| 31 | 84 | YF | |
| 32 | 85 | C | |

Tabla 4 – Restos de la FR4 del dominio variable de cadena ligera

| Posición de FR4 en la cadena ligera | Posición por numeración de Kabat en la cadena ligera | Restos de aminoácidos del Grupo 1 | Restos de aminoácidos del Grupo 2 |
|-------------------------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 95 | F | |
| 2 | 96 | G | S |
| 3 | 97 | A | PQT |
| 4 | 98 | G | E |
| 5 | 99 | T | P |
| 6 | 100 | K | QS |
| 7 | 101 | V | LW |
| 8 | 102 | ED | R |
| 9 | 103 | L | I |
| 10 | 104 | K | |

ES 2 704 036 T3

Tabla 5 – Restos de la FR1 del dominio variable de cadena pesada

| Posición de FR1 en la cadena pesada | Posición por numeración de Kabat en la cadena pesada | Restos de aminoácidos del Grupo 1 | Restos de aminoácidos del Grupo 2 |
|-------------------------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 1 | E | DG |
| 2 | 2 | V | EGILM |
| 3 | 3 | Q | AEHKLP RSV |
| 4 | 4 | L | PV |
| 5 | 5 | V | AELM |
| 6 | 6 | E | AQ |
| 7 | 7 | S | FLT |
| 8 | 8 | G | |
| 9 | 9 | G | E |
| 10 | 10 | GD | AENT |
| 11 | 11 | L | QRVW |
| 12 | 12 | V | AIM |
| 13 | 13 | QN | KR |
| 14 | 14 | P | FT |
| 15 | 15 | GT | AE |
| 16 | 16 | GE | A |
| 17 | 17 | ST | P |
| 18 | 18 | L | R |
| 19 | 19 | RT | GKV |
| 20 | 20 | L | IV |
| 21 | 21 | S | Y |
| 22 | 22 | C | |
| 23 | 23 | V | AEIL |
| 24 | 24 | AIV | GST |
| 25 | 25 | S | GPT |
| 26 | 26 | G | DRT |
| 27 | 27 | F | DILSTV |
| 28 | 28 | ST | ADILMN PR |
| 29 | 29 | LF | IMV |
| 30 | 30 | ST | DGHIKN RV |

Tabla 6 – Restos de la FR2 del dominio variable de la cadena pesada

| Posición de FR2 en la cadena pesada | Posición por numeración de Kabat en la cadena pesada | Restos de aminoácidos del Grupo 1 | Restos de aminoácidos del Grupo 2 |
|-------------------------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 36 | W | C |
| 2 | 37 | V | AFIL |
| 3 | 38 | R | |
| 4 | 39 | Q | HL |
| 5 | 40 | A | DGPSTV |
| 6 | 41 | LP | |
| 7 | 42 | G | ELR |
| 8 | 43 | RK | AEGMQ |
| 9 | 44 | G | DERTV |
| 10 | 45 | L | FMP |
| 11 | 46 | EQ | DHLPR |
| 12 | 47 | W | CFLMSY |
| 13 | 48 | V | FIL |
| 14 | 49 | GA | LST |

ES 2 704 036 T3

Tabla 7 – Restos de la FR3 del dominio variable de cadena pesada

| Posición de FR3 en la cadena pesada | Posición por numeración de Kabat en la cadena pesada | Restos de aminoácidos del Grupo 1 | Restos de aminoácidos del Grupo 2 |
|-------------------------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 66 | R | Q |
| 2 | 67 | LF | V |
| 3 | 68 | T | AIS |
| 4 | 69 | I | LMTV |
| 5 | 70 | ST | AF |
| 6 | 71 | R | K |
| 7 | 72 | D | EN |
| 8 | 73 | TN | DGIS |
| 9 | 74 | AS | DGPTV |
| 10 | 75 | K | EGMNQ R |
| 11 | 76 | SN | DHKR |
| 12 | 77 | T | AIMS |
| 13 | 78 | VL | AIM |
| 14 | 79 | FY | HST |
| 15 | 80 | L | I |
| 16 | 81 | KQ | ADEHR |
| 17 | 82 | M | L |
| 18 | 82A | HN | DKPRST |
| 19 | 82B | S | DGNRT |
| 20 | 82C | L | V |
| 21 | 83 | QR | GIKST |
| 22 | 84 | SA | DGPTV |
| 23 | 85 | E | ADV |
| 24 | 86 | D | |
| 25 | 87 | T | AMS |
| 26 | 88 | A | GV |
| 27 | 89 | TV | FIKLMQ |
| 28 | 90 | Y | H |
| 29 | 91 | Y | FH |
| 30 | 92 | C | |
| 31 | 93 | A | CGLMRS TV |
| 32 | 94 | RK | ADEGIL MNPQST V |

Tabla 8 – Restos de la FR4 del dominio variable de cadena pesada

| Posición de FR4 en la cadena pesada | Posición por numeración de Kabat en la cadena pesada | Restos de aminoácidos del Grupo 1 | Restos de aminoácidos del Grupo 2 |
|-------------------------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 103 | W | L |
| 2 | 104 | G | AS |

(continuación)

| Posición de FR4 en la cadena pesada | Posición por numeración de Kabat en la cadena pesada | Restos de aminoácidos del Grupo 1 | Restos de aminoácidos del Grupo 2 |
|-------------------------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 3 | 105 | Q | DHPR |
| 4 | 106 | G | |
| 5 | 107 | T | AINS |
| 6 | 108 | SL | PQR |
| 7 | 109 | V | ILP |
| 8 | 110 | T | AFILPSY |
| 9 | 111 | V | A |
| 10 | 112 | S | ACPT |
| 11 | 113 | S | ALP |

El anticuerpo caninizado de la divulgación por lo tanto, se diferencia de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal quimérico que consiste en una región variable completa derivada de una primera especie y los dominios constantes derivados de una segunda especie, o del anticuerpo caninizado con injerto de CDR, en que las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las regiones variables de cadena pesada y ligera comprenden restos de aminoácido derivados de un anticuerpo donante y se introducen en regiones marco conservadas (FR) y regiones constantes (CR) derivadas de un anticuerpo diana o de secuencia de la línea germinal caninas.

Se prefiere que el anticuerpo caninizado retenga sustancialmente las propiedades de unión del anticuerpo parental (donante) del que se derivan las CDR. Esto significa que el anticuerpo caninizado presentará la misma o sustancialmente la misma afinidad y avidéz de unión al antígeno que el anticuerpo donante del que se derivan las CDR. De manera ideal, la afinidad del anticuerpo caninizado no será menos de un 10 % de la afinidad del anticuerpo donante para el epítipo diana, más preferentemente no menos de aproximadamente un 30 %, y más preferentemente la afinidad no será menos de un 50 % de la del anticuerpo parental (donante). Los procedimientos para ensayar la afinidad de unión al antígeno son bien conocidos en la técnica e incluyen ensayos de unión máxima-media, ensayos de competición y análisis de Scatchard.

Como se ha definido anteriormente en el presente documento, la presente divulgación se extiende a miembros de unión o fragmentos de unión al antígeno derivados de los anticuerpos caninizados de la divulgación.

Dichos fragmentos de unión se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente al NGF canino. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo se puede llevar a cabo mediante un fragmento del anticuerpo de longitud completa. En ciertos casos, los miembros de unión o fragmentos de unión al antígeno pueden ser miembros de unión aislados. Un miembro de unión o fragmento de unión al antígeno de la divulgación puede comprender un fragmento de los anticuerpos de la presente divulgación, por ejemplo, un fragmento de una molécula completa de anticuerpo caninizado, tal como solo la cadena pesada o ligera, o, por ejemplo, el dominio variable de la cadena pesada y/o ligera. En ciertos casos un miembro de unión puede comprender, consistir, o consistir en esencia normalmente 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. En cada uno de los dominios VH y VL hay 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR), junto con 4 regiones marco conservadas (FR) asociadas. Un dominio VH normalmente comprende 3 HCDR (regiones de complementariedad de cadena pesada), y un dominio VL comprende normalmente 3 LCDR (regiones de complementariedad de cadena ligera). En consecuencia, un miembro de unión puede comprender un dominio VH que comprende, en la secuencia, regiones VH CDR1 (or HCDR1), CDR2 (HCDR2) y CDR3 (HCDR3) junto con una pluralidad de regiones marco conservadas asociadas. Un miembro de unión puede comprender adicional o alternativamente un dominio VL que comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de VL junto con regiones marco conservadas asociadas. Los dominios VH o VL comprenden normalmente cuatro regiones marco conservadas, FR1, FR2, FR3 y FR4. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "región marco conservada" o "secuencia marco conservada" se refiere a secuencias restantes de la región variable menos las CDR. Debido a que la definición exacta de una secuencia CDR se puede determinar por sistemas diferentes (Kabat, Chothia, etc.), el significado de una secuencia marco conservada está sometido a las correspondientes interpretaciones diferentes. Las seis CDR (VL-CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera y VH-CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada) dividen las regiones marco conservadas de la cadena ligera y la cadena pesada en cuatro subregiones conocidas como FR1, FR2, FR3 y FR4 en cada cadena.

La Figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-NGF de acuerdo con la divulgación. Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están subrayadas. Como tal, y como se muestra en la Figura 6 la VL-CDR1 se posiciona entre las regiones marco conservadas FR1 y FR2, la VL-CDR2 se posiciona entre las regiones marco conservadas FR2 y FR3, y la VL-CDR3 se posiciona entre las regiones marco conservadas FR3 y FR4. La figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-NGF de acuerdo con la divulgación. Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están subrayadas. Como en la región variable de cadena ligera que se muestra en la Figura 6, la VH-CDR1 está posicionada entre las

regiones marco conservadas FR1 y FR2, la VH-CDR2 está posicionada entre las regiones marco conservadas FR2 y FR3 y la VH-CDR3 está posicionada entre las regiones marco conservadas FR3 y FR4.

En las Figuras 6 y 7, los restos del dominio variable de cadena ligera (Figura 6) y dominio variable de cadena pesada (Figura 7) se numeran 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, Quinta Edición. NIH Publicación N.º 91-3242, Kabat y col. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391). El sistema de numeración Kabat se refiere a un sistema de numeración de restos de aminoácido que son más variables (es decir, hipervariables) que otros restos de aminoácidos en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una parte de unión al antígeno del mismo. El sistema de numeración Kabat se utiliza en general, por lo tanto, cuando se hace referencia a un resto del dominio variable (aproximadamente los restos 1-104 de la cadena ligera y los restos 1-113 de la cadena pesada). Este sistema de numeración se puede utilizar en la presente memoria descriptiva, cuando se establezca. 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 que se proporcionan en las secuencias relevantes enumeradas en el presente documento. En particular, la secuencia de aminoácidos lineal actual puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que en la estricta numeración Kabat que se corresponden con un acortamiento de, o una inserción en, un componente estructural, sea una región marco conservada o región determinante de complementariedad (CDR), de la estructura del dominio variable básico de la cadena pesada o ligera. La numeración correcta de Kabat de restos puede determinarse para cualquier anticuerpo alineando los restos de la secuencia del anticuerpo con una secuencia de referencia a la que se ha aplicado la numeración de Kabat.

Además, la Figura 7 muestra una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada. Esto se muestra también en la SEQ ID NO: 2. Sin embargo, en la Figura 7, la numeración tiene en cuenta los restos de aminoácidos 80, 80A, 80B, y 80C, mientras que en la SEQ ID NO: 2, la numeración continúa secuencialmente, es decir, 80, 81, 82 y 83. Lo mismo pasa con los restos según Kabat 100, 100A, 100B, 100C, 100D, 100E y 100F en la Figura 7.

Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, se puede seleccionar un fragmento de unión del anticuerpo a partir de un grupo que comprende, pero no se limita a, un fragmento Fab, un fragmento Fab' y un scFv (fragmento variable de cadena sencilla), o a partir de un peptidomimético, un diacuerpo, o un derivado multivalente relacionado.

En ciertos casos, el fragmento de unión del anticuerpo es un fragmento Fab, o F(ab')₂, que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1 de un anticuerpo. En ciertos casos el dominio VL tiene la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, y el dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4. En ciertos casos, los dominios CL y CH1 se basan en la secuencia de aminoácidos de un dominio CL y CH1 de una inmunoglobulina canina.

Las técnicas para la producción recombinante de fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ son bien conocidas por el experto en la técnica 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. Unos ejemplos de técnicas que se pueden utilizar para producir scFv (fragmentos Fv de cadena sencilla) se desvelan en Huston y col., "Protein Engineering of Single-Chain Fv Analogs and Fusion Proteins", Methods in Enzymology, vol. 203:46-88 (1991).

En ciertos casos, los fragmentos de anticuerpo se pueden derivar 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 se pueden producir directamente por células huésped (Carter et al., "High level Escherichia coli expression and production of a bivalent humanized antibody fragment" Bio/Technology 10:163-167 (1992)).

Además de proporcionar un anticuerpo monoclonal caninizado que tiene especificidad de unión con el NGF canino y que antagoniza la función del NGF canino, la presente divulgación se extiende adicionalmente a los miembros de unión distintos de anticuerpo que comprenden un par de dominios de unión basándose en la secuencia de aminoácidos de una región VL (variable de cadena ligera) como se define en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 y una secuencia de aminoácidos de una región VH (variable de cadena pesada) como se define en las SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4. En particular, la divulgación se extiende a dominios de unión sencillos que se basan en el región VL o VH de los anticuerpos caninizados de los anticuerpos de la divulgación.

En consecuencia, en ciertos casos adicionales de la presente divulgación, se proporciona un miembro de unión que comprende, consiste o consiste esencialmente en un dominio de unión sencillo derivado del anticuerpo humanizado de la divulgación. En ciertos casos, el dominio de unión sencillo se deriva de la secuencia de aminoácidos de la VH (dominio variable de cadena pesada) como se define en la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4. Dicho dominio de unión se puede utilizar como un agente de direccionamiento contra el NGF canino.

En ciertos casos, se pueden utilizar técnicas de modificación adicionales para modificar los anticuerpos de la presente divulgación, por ejemplo, incluyendo modificaciones de la región Fc que pueden alterar la semivida sérica, la fijación de complemento, la unión al receptor de Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, en ciertos casos, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo se pueden producir con patrones de glicosilación alterados. En ciertos casos, un anticuerpo de la divulgación se altera para que aumente o disminuya la extensión de glicosilación del anticuerpo. La glicosilación de polipéptidos es normalmente o unida a N o unida a O. Unida a N se refiere a la unión de un resto de carbohidrato en la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de un resto de carbohidrato a la cadena lateral de una asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio potencial de glicosilación. La glicosilación O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa en un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se pueden utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. El inventor ha proporcionado dominios caninos constantes aglicosilados que se han definido en el presente documento como las SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, y 22.

En ciertos casos adicionales, los anticuerpos anti-NGF canino de la divulgación pueden estar PEGilados haciendo reaccionar el anticuerpo con un derivado del polietilenglicol (PEG). En ciertos casos, el anticuerpo está defucosilado y por lo tanto carece de restos de fucosa.

En ciertos casos, las modificaciones de las propiedades biológicas de un anticuerpo se pueden conseguir seleccionando las sustituciones que afectan a (a) la estructura del armazón polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación laminar o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con similitudes de las propiedades de sus cadenas laterales (A. L. Lehninger, en *Biochemistry*, 2ª Ed., 73-75, Worth Publishers, New York (1975)) en: (1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M); (2) sin carga polar: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q); (3) ácidos: Asp (D), Glu (E); (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His(H). De manera alternativa, los restos de origen natural se pueden dividir en grupos basándose en las propiedades comunes de la cadena lateral (1) hidrófoba: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) hidrófila neutra: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) ácida: Asp, Glu; (4) básica: His, Lys, Arg; (5) restos que tienen influencia en la orientación de la cadena: Gly, Pro; (6) aromática: Trp, Tyr, Phe. Las sustituciones no conservadoras darán lugar al intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos restos sustituidos también se pueden introducir en sitios de sustitución conservadora o en los sitios restantes (por ejemplo, no conservados).

En distintos aspectos adicionales, la presente divulgación se extiende a un inmunocombinado que comprende un anticuerpo anti-NGF canino de la divulgación, o una parte de unión al antígeno del mismo unido a una molécula auxiliar. En ciertos casos, dicho combinado anticuerpo-molécula auxiliar se conjuga mediante un engarce químico, tal como en engarce peptídico, un enlace hidracina, o un enlace disulfuro. En ciertos casos el auxiliar acoplado es una molécula efectora, marcador, fármaco o una molécula de vehículo. Las técnicas adecuadas para el acoplamiento de anticuerpos de la divulgación con auxiliares de acoplamiento peptídico y no peptídico son bien conocidas por los expertos en la técnica. Ejemplos de marcadores adecuados incluyen los marcadores detectables, tales como un radiomarcador, o un marcador enzimático, tal como la peroxidasa de rábano rusticano, o restos químicos tales como la biotina. De manera alternativa un marcador puede ser un marcador funcional, por ejemplo, el ricino, o profármacos que son capaces de convertir profármacos en fármacos activos en el sitio de unión del anticuerpo.

En distintos aspectos, la presente divulgación se extiende a polinucleótidos, y en particular a polinucleótidos aislados, que codifican los anticuerpos caninizados, fragmentos de anticuerpos y miembros de unión de la presente divulgación. Como se define en el presente documento, un "polinucleótido" incluye cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que se puede ser una ARN o ADN no modificado o un ARN o ADN modificado, que incluye sin limitación, ARN de cadena sencilla y doble, y ARN que es una mezcla de regiones con cadena sencilla y doble. Un polinucleótido de la divulgación, por ejemplo, un polinucleótido que codifica un polipéptido o polipéptidos de la divulgación incluye las variantes alélicas de los mismos y/o sus complementos que incluyen un polinucleótido que se hibrida con dichas secuencias de nucleótidos en condiciones de moderada o alta rigurosidad.

La presente divulgación se extiende adicionalmente a miméticos de anticuerpo, tal como dominios de anticuerpos, nanocuerpos, unicuerpos, versacuerpos, y duocalinas que se basan en los anticuerpos anti-NGF canino de la presente divulgación. Se conocen una amplia variedad de tecnologías de miméticos de anticuerpo por el experto en la técnica. Por ejemplo, los denominados, dominios de anticuerpo (Domantis, RU) son pequeñas unidades de unión funcionales de anticuerpos que se corresponden con las regiones variables de las cadenas ligera o pesada de anticuerpos humanos. Las directrices para la producción de dichos dominios de anticuerpo 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 derivadas de anticuerpos que contienen propiedades estructurales y funcionales únicas de cadenas pesadas de anticuerpos de origen natural que se producen en camélidos. Los unicuerpos son una tecnología adicional de fragmentos de anticuerpos, que se basan en la retirada de la región de la bisagra de anticuerpos IgG4. La eliminación de la región de bisagra da lugar a una molécula que es aproximadamente de la mitad de tamaño que 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 inducen respuestas inmunitarias.

Entre las moléculas de unión adicionales se incluyen las moléculas de anticuerpos (Patente de EE. UU. 5.831.012), DARPines (proteínas diseñadas con repeticiones de ankirina) (Publicación de Solicitud de Patente Internacional PCR WO 02/20565) y anticalinas (Patente de EE. UU. N.º 7.250.297 y WO 99/16873). Los Veracuerpos son otra tecnología de miméticos de anticuerpos. Los Versacuerpos (Amunix, Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º 2007/0191272) son proteínas pequeñas, a las que se hace referencia como microproteínas, de 3-5 kDa con más del 15 % de restos de cisteína, que forman un armazón de alta densidad de enlaces disulfuro que sustituye el centro hidrófobo que presentan normalmente las proteínas.

Los Avímeros son otro tipo de miméticos de anticuerpo. Los Avímeros se originan de la recombinación de familias de proteínas séricas humanas. Son cadenas proteicas sencillas compuestas de dominios de unión modulares, cada uno de los cuales se diseña para unirse a un sitio diana particular. Los avímeros se pueden unir simultáneamente a sitios en una única proteína diana y/o sitios en múltiples proteínas diana. Conocido como unión o avidéz multi-punto, este mecanismo de unión imita la forma en que las células y moléculas interactúan en el cuerpo, soporta la generación de antagonistas y agonistas, y da como resultado fármacos con múltiples funciones y potente actividad. Las bibliotecas de avímeros se pueden producir según el documento WO 2004/044011 y, por ejemplo, el documento US 2005/0053973. Las bibliotecas de avímeros también están disponibles en el mercado en Avidia Inc., Mountain View, California, USA.

Producción de anticuerpos

Los anticuerpos y miembros de unión de la divulgación se pueden producir completa o parcialmente mediante síntesis química. Por ejemplo, los anticuerpos y miembros de unión de la divulgación se pueden preparar por técnicas que son bien conocidas para el experto en la técnica, tal como síntesis peptídica líquida convencional, o procedimientos de síntesis peptídica en fase sólida. De manera alternativa, los anticuerpos y miembros de unión se pueden preparar en solución utilizando técnicas de síntesis peptídica en fase líquida, o adicionalmente por una combinación de fase sólida, fase líquida y química de soluciones.

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

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

Normalmente, los ácidos nucleicos que codifican las secuencias de aminoácidos que forman anticuerpos o miembros de unión de la presente divulgación se pueden proporcionar en una forma aislada o purificada, o se proporcionar en una forma que está sustancialmente libre del material con el que pueden estar asociados naturalmente, con la excepción de una o más secuencias reguladoras. El ácido nucleico que expresa un anticuerpo o miembro de unión de la divulgación puede ser completa 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 de la divulgación se pueden preparar fácilmente por el experto en la técnica utilizando técnicas que son bien conocidas por los expertos en la técnica, tal como los descritos 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) el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar muestras de ácido nucleico, (ii) síntesis química, o (iii) preparación de secuencias de ADNc. El ADN que codifica los anticuerpos o miembros de unión de la divulgación se pueden generar y utiliza de cualquier manera conocida por los expertos en la técnica tomando un ADN codificante, identificando los sitios de reconocimiento de una enzima de restricción de cada lado de la parte que se va a expresar, y cortando dicha parte del ADN. La parte escindida puede unirse entonces operativamente a un promotor adecuado u expresarse en un sistema de expresión adecuado, tal como un sistema de expresión disponible en el mercado. De manera alternativa, las partes de ADN relevantes se pueden amplificar utilizando cebadores de la PCR adecuados. Las modificaciones de las secuencias de ADN se pueden hacer utilizando la mutagénesis dirigida al sitio.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican los anticuerpos o miembros de unión de la divulgación pueden proporcionarse como construcciones den forma de un plásmido, un vector, un casete de transcripción o expresión que comprende al menos un ácido nucleico como se ha descrito anteriormente. La construcción puede estar comprendido en una célula huésped recombinante que comprende una o más de las construcciones anteriores. La expresión se puede conseguir convenientemente cultivando, en condiciones apropiadas, células huésped recombinantes que contienen secuencias de ácido nucleico adecuadas. Después de la expresión, el anticuerpo o fragmentos de anticuerpo se pueden aislar y/o purificar utilizando cualquier técnica adecuada, después se utiliza según sea apropiado.

Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de diferentes células huésped son bien conocidos. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, levaduras, insectos y sistemas de baculovirus. Las líneas células de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster recién nacido y células de mieloma de ratón NS0. Una bacteria huésped preferida común es la *E. coli*. La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en células procariontas tales como *E. coli* está bien establecida en la técnica. La expresión en células eucariotas en cultivo también está disponible para el experto en la técnica como una opción para la producción de un miembro de unión.

Las técnicas generales para la producción de los anticuerpos son bien conocidas por el experto en el campo, cuyos procedimientos se exponen, por ejemplo, en Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495-497; 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 anticuerpo recombinantes se describen en las referencias anteriores y también, por ejemplo, en la Patente Europea Número 0.368.684.

En ciertos casos de la divulgación, se emplean ácidos nucleicos recombinantes que comprenden una inserción que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo o miembros de unión. Por definición, dichos ácidos nucleicos comprenden ácidos nucleicos codificantes de cadena sencilla, ácidos nucleicos de doble cadena que consisten en dichos ácidos nucleicos codificantes y ácidos nucleicos complementarios de estos, o estos ácidos nucleicos (de cadena sencilla) complementarios.

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

Un anticuerpo de la divulgación se puede producir por medios recombinantes, no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia de señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína madura o polipéptido. La secuencia de señal heteróloga seleccionada preferentemente es la que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa de señal) por la célula huésped. Para las células huésped procarionta que no reconocen y procesan una secuencia de señal de anticuerpo nativo, la secuencia de señal se sustituye por una secuencia de señal de procarionta seleccionada, por ejemplo, de entre el grupo de líderes de la fosfatasa alcalina, penicilinas, Ipp, o de enterotoxina II termoestable.

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

Los anticuerpos, miembros de unión y ácidos nucleicos se pueden formular con diluyentes o adyuvantes y aún, con fines prácticos, considerarse como que se proporcionan en forma aislada. Por ejemplo, los anticuerpos y miembros de unión se pueden mezclar con gelatina u otros vehículos si se utilizan para revestir placas de microtitulación para su uso en inmunoensayos, o se mezclan con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se utilizan en diagnóstico o terapia. Los anticuerpos o miembros de unión pueden estar glicosilados, sea naturalmente o por sistemas de células eucariotas heterólogas (por ejemplo, células CHO o NS0, o pueden estar (por ejemplo, si se producen por expresión en una célula procarionta) no glicosilados.

Las preparaciones heterogéneas que comprenden moléculas de anticuerpo caninizado anti-NGF canino 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 del extremo C, con varios grados de glicosilación y/o con derivados de aminoácidos, tales como por ciclado de un ácido glutámico del extremo N para formar un resto de ácido piroglutámico.

Purificación de anticuerpos

Los isotipos A, B, C y D de los MAb anti-NGF canino son equipotentes. Los isotipos de IgG A y D caninos pueden preferirse para su uso en la presente divulgación ya que estos isotipos tienen una carencia deseable de unión al complemento. Sin embargo, estos isotipos no se unen a la Proteína A de *Staphylococcus* o Proteína G estreptocócica y no se pueden purificar utilizando estas herramientas comunes. Los inventores de la presente divulgación han identificado dos procedimientos alternativos que se pueden utilizar para purificar los isotipos A y/o D

El primer procedimiento comprende una combinación de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de exclusión por tamaño. El segundo procedimiento comprende una combinación de afinidad captoadhere y una cromatografía de intercambio aniónico.

Composiciones farmacéuticas

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

10 En ciertos casos, la formulación comprende adicionalmente un tampón. Normalmente, el pH de la formulación es desde aproximadamente un pH 5,5 a aproximadamente un pH 6,5. En ciertos casos, el tampón puede comprender desde aproximadamente 4 mM a aproximadamente 60 mM de tampón de histidina, aproximadamente de 5 mM a aproximadamente 25 mM de tampón de succinato, o aproximadamente de 5 mM a 25 mM de tampón de acetato. En ciertos casos, el tampón comprende cloruro sódico a una concentración de desde aproximadamente 5 mM a 50 mM, normalmente 25 mM. En ciertos casos, la formulación puede comprender adicionalmente un tensioactivo a una concentración de desde justo por encima de un 0 % a aproximadamente un 0,2 %. En ciertos casos, el tensioactivo se selecciona de entre el grupo que consiste en, pero no se limita a: polisorbato-20, polisorbato-40, polisorbato-60, polisorbato-65, polisorbato-85, y combinaciones de los mismos. En un caso preferido, el tensioactivo es polisorbato-20 y puede comprender adicionalmente cloruro sódico a una concentración de aproximadamente 125 mM y citrato sódico a una concentración de aproximadamente 25 mM.

Administración

15 Los anticuerpos o miembros de unión de la presente divulgación se pueden administrar solos, pero preferentemente se administrarán como una composición farmacéutica que en general comprenderá un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente adecuado seleccionado dependiendo de la vía de administración que se pretende. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente adecuados incluyen; agua, glicerol, etanol y similares.

20 El anticuerpo monoclonal o miembro de unión de la presente divulgación puede administrarse a un paciente canino que necesita el tratamiento mediante cualquier vía adecuada. Normalmente, la composición se puede administrar por vía parenteral mediante inyección o infusión. Ejemplos de vías preferidas para la administración parenteral incluyen, pero no se limitan a; la intravenosa, intracardíaca, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, intracavitaria, subcutánea, transmucosa, por inhalación o transdérmica. Las vías de administración pueden incluir adicionalmente la tópica y enteral, por ejemplo, mucosa (incluyendo la pulmonar), oral, nasal, rectal.

25 En casos en los que la composición se suministra como una composición inyectable, por ejemplo, en una aplicación intravenosa, intradérmica o subcutánea, el principio activo puede estar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que esté libre de pirógenos y tenga un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica serán bien capaces de preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como solución de cloruro sódico para inyección, Ringer para inyección, Lactato de Ringer para inyección. Se pueden incluir conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según se necesite.

30 La composición también se puede administrar mediante microesferas, liposomas, otros sistemas de suministro microparticulados o formulaciones de liberación sostenida colocados en ciertos tejidos incluyendo la sangre.

35 Ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente y otras técnicas y protocolos que se pueden utilizar de acuerdo con la divulgación 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.

40 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 actual administrada, y la tasa y transcurso de la administración dependerá de, y se puede determinar en referencia a, la naturaleza y gravedad de la afección que se va a tratar, así como factores tales como la edad, sexo, y peso del sujeto que se va a tratar, así como la vía de administración. Se debería tener además en consideración a las propiedades de la composición, por ejemplo, su actividad de unión y la vida plasmática *in vivo*, la concentración del anticuerpo o el miembro de unión en la formulación, así como la vía, sitio y tasa de suministro.

45 Los regímenes de dosificación pueden incluir una administración única del anticuerpo o composición de la divulgación, o la administración de múltiples dosis del anticuerpo o composición. El anticuerpo o composiciones que contienen el anticuerpo se pueden administrar adicionalmente secuencialmente o por separado con otros agentes terapéuticos y medicamentos que se utilizan para el tratamiento de la afección para la que se administra el

anticuerpo o miembro de unión de la presente divulgación como tratamiento.

Ejemplos de regímenes de dosificación que se pueden administrar a un sujeto se pueden seleccionar de entre el grupo que comprende, pero no se limita a; 1 mg/kg/día hasta 20 mg/kg/día, 1 mg/kg/día hasta 10 mg/kg/día, 10 mg/kg/día hasta 1 mg/kg/día. En ciertos casos, la dosificación será de manera que se obtenga una concentración en el plasma de desde 1 mg/ml a 100 mg/ml del anticuerpo. Sin embargo, la dosis actual de la composición que se administra y la tasa y transcurso de la administración, dependerá de la naturaleza y gravedad de la afección que se va a tratar. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la dosificación, etc., será en último término responsabilidad y a discreción del facultativo veterinario y otros doctores veterinarios y normalmente tienen en cuenta el trastorno que se va a tratar, la afección del paciente individual, el sitio de suministro, el procedimiento de administración y otros factores conocidos por los facultativos.

Definiciones

A menos de que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen el significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica del campo de la presente divulgación. El significado y ámbito de los términos debería estar claro, sin embargo, en el caso de cualquier ambigüedad, las definiciones proporcionadas en el presente documento tienen el precedente sobre cualquier definición del diccionario o extrínseca.

A lo largo de la memoria descriptiva, a menos de que el contexto demande otra cosa, los términos “comprender” o “incluir”, o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, “incluye” o “que incluye” se entenderá que implican la inclusión de un número entero o grupo de enteros establecidos, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de enteros.

Como se utiliza en el presente documento, los términos tales como “un”, “una” y “el” incluyen los referentes singulares y plurales a menos de que el contexto claramente demande otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “un agente activo” o “un agente farmacológicamente activo” incluye un único agente activo, así como dos o más agentes activos diferentes en combinación, mientras que la referencia a “un vehículo” incluye mezclas de dos o más vehículos, así como un único vehículo, y similares. Adicionalmente, a menos de que se necesite otra cosa por el contexto, los términos singulares incluirán los plurales 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 que un daño tisular actual o potencial, o descrito en términos de dicho daño.

En relación con el dolor operatorio o postoperatorio, el Acta de bienestar animal de EE. UU. (Animal Welfare Act 2002. AWA regulations, CFR, Título 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 del que se esperaría razonablemente que causara más de un dolor o malestar ligero o momentáneo en un ser humano al que se aplica el procedimiento, es decir, el dolor en exceso del que se produce por inyecciones u otros procedimientos menores. Por lo tanto, si un canino se somete a un procedimiento quirúrgico doloroso, el animal debería recibir analgesia postoperatoria.

En un caso adicional, un canino puede experimentar un dolor crónico o significativo como resultado de una afección médica asociada tal como la artritis reumatoide, osteoartritis, inflamación o una afección cancerosa o maligna.

El término “nocicepción” se refiere a la percepción de estímulos nocivos. Como se define en el presente documento “dolor neuropático” (también conocido como neuralgia) es un dolor que proviene de problemas con las señales de los nervios. Puede aparecer como consecuencia de una lesión o enfermedad que afecte al sistema somatosensorial. Existen causas del dolor neuropático y se pueden asociar con sensaciones anormales llamadas disestesia, que se producen espontáneamente. De manera alternativa, se puede asociar con alodinia que resulta cuando el dolor comienza o empeora, con un toque o estímulo que normalmente no causaría dolor. Por ejemplo, un ligero roce en la cara puede desencadenar un dolor si se tiene una neuralgia del trigémino, o la presión de las sábanas puede desencadenar dolor si se tiene una neuropatía diabética. El dolor neuropático también puede resultar por alodinia, en la que el dolor continúa o empeora con un roce o estímulo que normalmente no produciría dolor. Por ejemplo, un ligero roce en la cara puede desencadenar dolor si un sujeto tiene neuralgia del trigémino. El dolor neuropático relacionado con hiperalgesia significa que se produce un dolor fuerte con un estímulo o toque que normalmente causaría solo una ligera molestia, mientras que la parestesia significa que se producen molestias o sensaciones muy dolorosas incluso cuando no hay contacto con el área que causa el dolor, por ejemplo, con pichos y agujas. Otras formas de dolor neuropático implican el prurito y los picores, que se pueden asociar con respuestas alérgicas o inflamatorias de la piel y el dolor inflamatorio que resulta del daño tisular y los procesos de reparación.

Como se define en el presente documento, la expresión “anticuerpo neutralizante del NGF” o similares, describe un anticuerpo que es capaz de neutralizar la activación biológica y señalización del NGF. El anticuerpo neutralizante, al que también se hace referencia como anticuerpo antagonista, o anticuerpo bloqueante, se une específica y de manera preferente selectivamente, al NGF e inhibe una o más actividades biológicas del NGF. Por ejemplo, el anticuerpo neutralizante puede inhibir la unión de un NGF a su ligando diana, tal como los receptores TrkA o p75 unidos a la membrana.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “actividad biológica” se refiere a una o más propiedades biológicas inherentes de una molécula (sea natural como se encuentra *in vivo*, o proporcionada o capacitada por medios recombinantes). Las propiedades biológicas incluyen, pero no se limitan a unión y/o activación del receptor; inducción de señalización celular o proliferación celular, inhibición del crecimiento celular, inducción de producción de citocinas, inducción de apoptosis, y actividad enzimática.

La expresión “región determinante de complementariedad (CDR)”, 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 nativo como perfiló Kabat y col. (Kabat, E. A., Wu, T.T., Perry, H., Gottesman, K. y Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición. Publicación NIH N.º 91-3242). La expresión “región marco conservada (FR)”, como se utiliza en el presente documento se refiere a secuencias de aminoácidos intercaladas entre las CDR. Estas partes del anticuerpo sirven para mantener las CDR en una orientación apropiada (permitiendo que las CDR se unan al antígeno).

La expresión “región constante (CR)” como se utiliza en el presente documento, se refiere a la parte de la molécula de anticuerpo que confiere las funciones efectoras. En la presente divulgación, las regiones constantes significan normalmente regiones constantes caninas, es decir que las regiones constantes de los anticuerpos caninizados objeto se derivan de inmunoglobulinas caninas. La región constante de cadena pesada se puede seleccionar de cualquiera de los cuatro isotipos: A, B, C o D.

La expresión “anticuerpo quimérico” como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que contiene secuencias derivadas de dos anticuerpos diferentes, que normalmente son de diferentes especies. Más normalmente, los anticuerpos quiméricos comprenden dominios variables de una especie donante que se unen específicamente a un epítipo diana y los dominios constantes se derivan 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 de direccionamiento o reto terapéutico para desencadenar una respuesta inmunitaria (humoral o celular) cuando se administra a un receptor. La presente divulgación se refiere a la inmunogenicidad de los anticuerpos caninizados objeto. Preferentemente los anticuerpos de la presente divulgación no tienen inmunogenicidad, es decir, que no se producirán anticuerpos neutralizantes contra ellos cuando se administran a un canino, y adicionalmente, las funciones efectoras no estarán mediadas por las regiones Fc del anticuerpo.

El término “identidad” o “identidad de secuencia” como se utiliza en el presente documento, significa que 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 una posición particular de las secuencias alineadas, el resto de aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, la leucina se puede sustituir por un resto de isoleucina o valina. Se puede hacer referencia a esto como sustitución conservadora. Preferentemente cuando las secuencias de aminoácido de la divulgación se modifican por medio de sustitución conservadora de cualquiera de los restos de aminoácidos contenidos en ellas, estos cambios no tienen efecto en la especificidad de unión o actividad funcional del anticuerpo resultante cuando se comparan con el anticuerpo sin modificar.

Identidad de secuencia con respecto a un polipéptido (nativo) de la divulgación y su derivado funcional se refiere al porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los restos del correspondiente polipéptido nativo, después del alineamiento de las secuencias y la introducción de huecos, si fuera necesario, para alcanzar el máximo porcentaje de homología, y no se considera ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. No se considerará que las extensiones del extremo C ni las inserciones como que reduzcan el porcentaje máximo de homología. Los procedimientos y programas de computadora para llevar a cabo un alineamiento de dos o más secuencias de aminoácidos y la determinación de su identidad u homología de secuencia son bien conocidos por el experto en la técnica. Por ejemplo, el porcentaje de identidad o similitud de dos 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).

Como se utiliza en el presente documento, en referencia a un resto de aminoácidos que tiene la “homología más alta” respecto a un segundo resto de aminoácidos se refiere al resto de aminoácido que tiene el máximo de características o propiedades en común con el segundo resto de aminoácido. En la determinación de si un resto de aminoácido tiene la homología más alta con respecto a un segundo resto de aminoácido, se puede hacer normalmente una evaluación de factores tales como, pero sin limitarse a, carga, polaridad, hidrofobia, volumen de brazo lateral y dimensión de 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 al resto de aminoácido especificado en una primera secuencia, pretende referirse a que la posición en la segunda secuencia es la misma posición que la posición en la primera secuencia cuando las dos secuencias se alinean 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 a condici⁵ona de que dichas características o elementos adicionales no afecten materialmente la capacidad del anticuerpo o el fragmento de anticuerpo para que tenga especificidad de unión por el NGF canino. Es decir, el anticuerpo o fragmentos de anticuerpo que comprenden los polipéptidos pueden tener características o elementos adicionales que no interfieran la capacidad del anticuerpo o fragmentos de anticuerpo para unirse al NGF canino y antagonizar la actividad funcional del NGF canino. Dichas modificaciones se pueden introducir en la secuencia de aminoácidos con el fin de reducir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un polipéptido que consiste esencialmente en una secuencia especificada puede contener uno, do, tres, cuatro, cinco, o más aminoácidos adicionales, eliminados o sustituidos, en cualquier extremo o en ambos extremos de la secuencia a condición de que estos aminoácidos no interfieran, inhiban, bloqueen o interrumpan el papel del anticuerpo o fragmento de anticuerpo en la unión al NGF canino y el secuestro de su función biológica. De manera similar, una molécula de polipéptido que contribuye a los anticuerpos antagonistas del NGF canino de la divulgación puede modificarse químicamente con uno o más grupos funcionales a condición de que dichos grupos funcionales no interfieran en la capacidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo para unirse al NGF canino y antagonizar su función.

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 es necesaria para suprimir la unión del NGF canino a los receptores p75 y/o TrkA.

Los términos “polipéptido”, “péptido” o “proteína” se utiliza en el presente documento de manera intercambiable para designar una serie lineal de restos de aminoácido conectados entre ellos por enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carboxilo de restos adyacentes. Los restos de aminoácidos están habitualmente en su forma isomérica natural “L”. Sin embargo, se pueden sustituir restos con forma isomérica “D” por cualquier resto de L-aminoácido, a condición de que se mantenga la propiedad funcional deseada por el polipéptido.

Como se define en el presente documento un “anticuerpo” engloba proteínas de unión al antígeno que se unen específicamente a un antígeno diana de interés, en este caso el factor de crecimiento de nervios canino, que tiene uno o más polipéptidos que se pueden preparar recombinantemente o que son codificables genéticamente por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. El término “anticuerpo” engloba anticuerpos monoclonales y anticuerpos quiméricos, en particular anticuerpos caninizados, y engloba adicionalmente anticuerpos policlonales o anticuerpos de cualquier clase o subtipo. Un “anticuerpo” se extiende adicionalmente a anticuerpo híbridos, anticuerpos biespecíficos, heteroanticuerpos y fragmentos funcionales de los mismos que mantengan la unión al antígeno.

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

Como se define en el presente documento, también se puede hacer referencia a un “canino” como un “perro”. Los caninos se pueden categorizar como que pertenecen a las subespecies con el nombre trinómico *Canis lupus familiaris* (*Canis familiaris domesticus*) o *Canis lupus dingo*. Los caninos incluyen cualquier especie de perro e incluyen las variedades silvestres y domésticas, haciéndose también referencia a estos últimos como animales de compañía.

La presente divulgación se describirá ahora en referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan con fines de ilustración y no se pretende que se consideren como limitantes de la presente divulgación. Los procedimientos y técnicas de la presente divulgación se llevan a cabo en general de acuerdo con procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describen en distintas referencias generales y más específicas que se citan y exponen a lo largo de la presente memoria descriptiva a menos de que se indique otra cosa.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Producción de anticuerpos

Se produjeron secuencias de anticuerpo completas combinando secuencias de dominios variables caninizados con secuencias constantes caninas de cadena pesada o constantes de cadena ligera del extremo C. Se habían descrito cuatro isotipos distintos del dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina gamma (IgG) en el sistema inmunitario canino (Tang L. y col. 2001. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 80. 259-270) junto con secuencias de dominio constantes kappa y lambda sencillas.

El dominio VH α D11 caninizado se combinó con cada uno de los cuatro isotipos A, B, C y D de cadena pesada de IgG y el dominio VL α D11 caninizado con el dominio constante de cadena ligera kappa canina. Las secuencias de las cadenas de anticuerpo maduro de longitud completa (caN) se muestran en la SEQ ID NO: 5 (VL1 y dominio constante kappa canino), 6 (VH1 y cadena pesada de isotipo A), 7 (VH1 y cadena pesada de isotipo B), 8 (VH1 y cadena pesada de isotipo C) y 9 (VH1 y cadena pesada de isotipo D). La secuencia de una cadena ligera de una variante de anticuerpo (caN2) se muestra en la SEQ ID NO: 10 (variante de cadena ligera (VL2) y dominio constante

kappa canino). Las secuencias de aminoácido para las cadenas pesadas de una variante de anticuerpo (caN2) se proporcionan en la SEQ ID NO: 11 (variante HCA – VH2 y cadena pesada de isotipo A), SEQ ID NO: 12 (variante HCB – VH2 y cadena pesada de isotipo B), SEQ ID NO: 13 (variante HCC – VH2 y cadena pesada de isotipos C) y SEQ ID NO: 14 (variante HCD – VH2 y cadena pesada del isotipo D).

- 5 Las secuencias de aminoácido combinadas se convirtieron en la forma expresable en células de mamífero por la selección óptima de codones y síntesis genética química completa y clonación en un vector de expresión en célula de mamífero pcDNA3.1+.

Los ADNc resultantes se transfectaron en células CHO y los sobrenadantes de las cadenas pesadas que tenían las secuencias de SEQ ID NO: 6-9 se analizaron en el Ejemplo 2. Los anticuerpos que tienen la secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 10 y la secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 11 se purificaron en el Ejemplo 11.

Ejemplo 2 – Determinación de la unión de anticuerpos al NGF murino y canino

15 Las combinaciones de los ADNc de cadena ligera y pesada caninizadas se transfectaron en células CHO, se recolectaron los sobrenadantes y se hicieron reaccionar en un formato ELISA con los NGF canino o murino. Después de la incubación y las etapas de lavado, el anticuerpo canino unido se detectó por reactividad con un anticuerpo policlonal específico de cabra anti-IgG canina unido a una peroxidasa de rábano rústico (HRP) y se desarrolla utilizando TMB. La densidad óptica del producto resultante se midió a 450 nm y se comparó con la del sobrenadante de transfectadas con el falso vector vacío (denotado como "Falso" en la Figura 1).

20 Los resultados se muestran en el gráfico de la Figura 1. La unión al NGF de ratón se muestra para los 4 anticuerpos caninizados. Cada uno de estos anticuerpos tiene la misma cadena ligera (CaN-kLC-1), que es una cadena ligera que comprende un dominio constante kappa canino. Cada anticuerpo tiene un dominio constante de cadena pesada diferente. En consecuencia, un dominio variable de cadena pesada específico se combina con uno de los 4 dominios constantes diferentes (caN-HCA, caN-HCB, caN-HCC o caN-HCD). En la segunda parte del gráfico, se muestra la unión de un único anticuerpo que comprende la cadena ligera caN-kLC-1 y la cadena constante caN-HCB contra el NGF canino.

Ejemplo 3 - Purificación de anticuerpos caninizados

Los sobrenadantes obtenidos del Ejemplo 2 se purificaron utilizando una columna de Proteína A, separada por SDS-PAGE y se ensayó en cuanto a la reactividad con el anticuerpo policlonal anti-IgG canina HRP. Este anticuerpo policlonal reconoce preferentemente las cadenas pesadas.

30 Los resultados se muestran en las Figuras 2A-D. Leyenda: A - HCA es un anticuerpo caninizado que comprende la cadena pesada caN-HCA y la cadena ligera caN-kLC, HCB es un anticuerpo caninizado que comprende la cadena pesada caN-HCB y la cadena ligera caN-kLC, C - HCC es un anticuerpo caninizado que comprende la cadena pesada caN-HCC y la cadena ligera caN-kLC, D - HCD es un anticuerpo caninizado que comprende la cadena pesada caN-HCD y la cadena ligera caN-kLC. En cada una de las

35 Se puede ver que la proteína A se unen preferentemente al isotipo HCB (es decir, un anticuerpo caninizado que comprende la cadena pesada caN-HCB), mientras que no se retiene material significativo y se lava fácilmente de la Proteína A por los isotipos HCA, HCC y HCD.

Ejemplo 4 – Análisis de anticuerpos caninizados purificados utilizando SDS-PAGE

Las fracciones representativas de los geles que se muestran en el Ejemplo 2 (Figuras 2A-D) se separaron por SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie.

40 Los resultados se presentan en el gel que se muestra en la Figura 3. Este gel muestra que las cadenas pesada y ligera son claramente visibles. Orden de las calles desde la izquierda: Calle 1 – tamaños de referencia, Calle 2 - HCA caN-HCA + caN-kLC1, Calle 3 - HCB caN-HCB + caN-kLC1, Calle 4 - HCC caN-HCC + caN-kLC1, Calle 5 - HCD caN-HCA + caN-kLC.

Ejemplo 5 – Inhibición de la proliferación inducida por NGF de las células TF-1 por los anticuerpos caninizados

Las diluciones en serie de los sobrenadantes de las células CHO transfectantes del Ejemplo 2 ("antagonista") se incubaron con células TF-1 en presencia de 0,3 ng/ml de NGF. La proliferación resultante se midió por incorporación de timidina.

50 Los resultados se muestran en la Figura 4. Se observó una inhibición del 50 % con el anticuerpo monoclonal (MAb) calculado a 0,75 – 1,5 ng/ml.

Ejemplo 6 – Depósito de complemento inducido por anticuerpos caninizados capturados por el antígeno

Los sobrenadantes de las células CHO transfectantes del Ejemplo 2 se incubaron en placas revestidas con 0,1 ng/ml

de NGF para capturar los anticuerpos. Las placas se lavaron y entonces se incubaron con suero humano y el complemento C1q unido se midió por la unión de anticuerpo policlonal HRP anti-C1q humano y se desarrolló como anteriormente.

Procedimiento de unión del complemento

5 Las placas se revistieron con 100 µl/pocillo de 5 µg/ml de NGF de ratón y se bloquearon con un 5 % de BSA/PBS. Los pocillos revestidos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con los sobrenadantes del cultivo, que contenía la IgG anti-NGF caninizada recombinante, diluida en PBS/un 1 % de BSA (100 µl/pocillo). Las placas se lavaron y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con 100 µl/pocillo de suero humano diluido 1/100 en solución salina de tampón veronal que contenía 0,5 mM de MgCl₂, 2 mM de CaCl₂, un 0,05 % de Tween-20, un 10 0,1 % de gelatina y un 0,5 % de BSA. Después del lavado, las placas se incubaron con 100 µl de una dilución 1/800 de anticuerpo de oveja anti-C1q-HRP (Serotec) en PBS/un 1 % de BSA. Después del lavado, las placas se desarrollaron mediante la adición de 100 µl de sustrato TMB (Thermo Scientific). El desarrollo se paró por la adición de 100 µl de H₂SO₄ 2 N y se leyó la absorbancia a 450 nm.

15 Los resultados se muestran en el gráfico de la Figura 5. Estos resultados muestran la unión del C1q a anticuerpos tipo HCB y HCC caninizados inmovilizados y la no unión del C1q a los anticuerpos tipo HCA y HCD caninizados. Por lo tanto, los resultados indican sorprendentemente que las diferentes cadenas pesadas derivadas de caninos presentan diferentes características de unión y activación del complemento y que los anticuerpos caninizados con cadenas pesadas de tipo HCA y HCD han demostrado ser preferibles para su uso para antagonizar el NGF canino. La identificación de cadenas pesadas derivadas de caninos que no median en la fijación de complemento es un 20 hallazgo particularmente ventajoso ya que el NGF es un mediador soluble.

Ejemplo 7 – Comparación de la unión de anticuerpos monoclonales anti-NGF canino al NGF

25 Se llevó a cabo una comparación de la unión de anticuerpos monoclonales anti-NGF canino al NGF utilizando armazones de VL1 y VH1 (SEQ ID NO: 1 y 2) frente a armazones alternativos VL2 y VH2 (SEQ ID NO: 3 y 4). Los ADN que codifican las cadenas ligera y pesada descritos por las SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 se sintetizaron y clonaron en un pcDNA3.1 + corriente abajo de los péptidos de secuencia de señal secretora. Los ADN se co-transfectaron en células CHO y el sobrenadante se comparó mediante un ELISA de unión con respecto al NGF de ratón con el sobrenadante de cho de la co-expresión de la SEQ ID NO: 5 más la SEQ ID NO: 7.

30 Los resultados se muestran en la Figura 13A. Las calles A-D muestran el sobrenadante (sin diluir, 1/10, 1/100, 1/1000, respectivamente) de las SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7. Las calles E-H muestran el sobrenadante (sin diluir, 1/10, 1/100, 1/1000, respectivamente) de las SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11. La calle I muestra un sobrenadante de control negativo no diluido.

Ejemplo 8 – Depósito de complemento inducido por anticuerpos caninizados capturados por NGF

Los sobrenadantes de células CHO del Ejemplo 7 se ensayaron en cuanto a su capacidad para reclutar el complemento utilizando un ensayo ELISA C1q (utilizando el procedimiento descrito en la Figura 5).

35 Los resultados se muestran en la Figura 13B. La combinación del armazón VL2 (en la SEQ ID NO: 10) y VH2 más dominios constantes tipo HCA (SEQ ID NO: 11) era inactiva reclutando el complemento a pesar de que en el Panel A se observaba una unión a NGF equivalente respecto a la de la cadena pesada tipo HCB en el MAb (SEQ ID NO: 5+7). Los MAb se ensayaron en una dilución en serie de 4, 2 y 1 µg/ml. C era un control negativo.

Ejemplo 9 – Comparación de unión a NGF de variantes glicosiladas y no glicosiladas de los anticuerpos monoclonales anti-NGF canino con isotipos de cadena pesada HCB y HCC

40 Se llevó a cabo una comparación de la unión de variantes N-glicosiladas y aglicosiladas de los anticuerpos monoclonales anti-NGF canino al NGF con isotipos de cadena pesada HCB y HCC. Los vectores de expresión que codificaban los pares de cadena pesada y ligera descritos por SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7 (HCB), SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 16 (HCB*), SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 8 (HCC), o SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 17 (HCC*) se co-transfectaron en las células CHO y se compararon los sobrenadantes por ELISA de unión al NGF de ratón. 45

Los resultados se muestran en la Figura 14A. Los cuadros blancos muestran el sobrenadante sin diluir, los cuadros sombreados muestran una dilución de 1/100 y C muestra un sobrenadante de control negativo sin diluir. Se observaba una unión equivalente a NGF.

Ejemplo 10 – Depósito de complemento inducido por anticuerpos caninizados capturados por NGF

50 Los sobrenadantes de células CHO transfectantes del Ejemplo 9 se ensayaron en cuanto a su capacidad para reclutar el complemento utilizando un ensayo ELISA C1q (utilizando el procedimiento descrito en la Figura 5).

Los resultados se muestran en la Figura 14B. La capacidad para reclutar el complemento C1q se anulaba retirando el sitio de glicosilación unido a N en la cadena pesada tipo B (HCB*) y disminuía por una mutación similar en la cadena pesada tipo C (HCC*).

En consecuencia, se demuestra en el presente documento, bastante sorprendentemente, que cuando un anticuerpo de la divulgación tiene una cadena pesada derivada de caninos del subtipo HCA o HCD, la unión del anticuerpo al NGF canino no da como resultado la activación del complemento u otras funciones efectoras corriente abajo, tal como la ADCC. Por tanto, dichos anticuerpos, antagonizan la actividad funcional biológica del NGF canino impidiendo la unión del NGF canino a los receptores TrkA o p75 unidos a la membrana, inhibiendo la cascada de señalización intracelular corriente abajo asociada. Además, como la expresión del NGF se produce frecuentemente en la proximidad de los nervios y similares, los anticuerpos de la divulgación que antagonizan o neutralizan el NGF, que tiene una cadena pesada derivada de caninos del subtipo HCA o HCD, pueden secuestrar la actividad biológica del NGF canino sin reclutar una respuesta inmunitaria más amplia. Dichas propiedades funcionales son inesperadas, así como altamente deseables.

Ejemplo 11 – Purificación de los anticuerpos monoclonales anti-NGF después de su expresión en células CHO

Como los anticuerpos monoclonales anti-NGF canino de los isotipos HCA y HCD tienen la falta deseable de unión al complemento (Figura 5), pero se unen débilmente a la Proteína A de *Staphylococcus* (Figura 2), se desarrollaron procedimientos alternativos de purificación. Los anticuerpos monoclonales anti-NGF canino derivados de los vectores de expresión que expresan la SEQ ID NO: 10 (variante de cadena ligera (VL2) y dominio constante kappa canino) y la SEQ ID NO: 11 (variante HCA – VH2 e isotipo A de cadena pesada) se expresaron en células CHO y después de una extensa experimentación se descubrió que el anticuerpo anti-NGF canino se podía fraccionar a alta pureza por dos procedimientos de purificación alternativos.

En el primer procedimiento, se purificó el anticuerpo monoclonal anti-NGF canino por cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de exclusión por tamaño (Procedimiento I – Figura 15A y B). En el segundo procedimiento, el anticuerpo anti-NGF se puede purificar por cromatografía de afinidad Captodhere seguida por cromatografía de intercambio aniónico (Procedimiento II – Figura 15C y D).

El pico principal del anticuerpo monoclonal anti-NGF purificado por cualquier procedimiento se corresponde con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa. La comparación por SDS-PAGE y ELISA (Figura 16) ilustra que los procedimientos I y II producen preparaciones de anticuerpos con pureza y bioactividad similar. Los anticuerpos monoclonales anti-NGF purificados producidos por estos procedimientos se ensayaron en el ensayo de neutralización del NGF TF-1 (descrito en la Figura 4) y muestran que tiene alta potencia (CI50 13 pM, 37 pM NGF neutralizado; no mostrado).

Ejemplo 12: Los anticuerpos monoclonales anti-NGF canino se pueden administrar por vía intravenosa a caninos y no producen pirexia

Los anticuerpos monoclonales anti-NGF canino derivados de los vectores de expresión que expresan la SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 (cadena pesada tipo HCA canina) se expresaron en células CHO y se purificaron por una combinación de cromatografía de intercambio aniónico cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de exclusión por tamaño (Procedimiento I, Figura 15A y B) y se intercambió el tampón en solución salina tampón de fosfato. Los anticuerpos se inyectaron por vía intravenosa en perros Beagle a 2 mg/kg de peso corporal y se evaluaron en cuanto los signos de toxicidad por inspección visual por un veterinario, el cambio de peso corporal, la temperatura corporal y la bioquímica plasmática. La Figura 17 ilustra las mediciones del peso corporal y temperatura. No se observaron cambios en estos ni en ningún analito medido de la bioquímica del plasma (incluyendo sodio, potasio, cloro, calcio, fosfato, urea, creatinina, glucosa, colesterol, bilirrubina, alanina transaminasa, fosfatasa alcalina, amilasa, lipasa, proteínas totales o albúmina: no se muestra).

Ejemplo 13. La farmacocinética plasmática de anticuerpos monoclonales anti-NGF canino *in vivo* demuestra la larga semivida sérica y la falta de inmunogenicidad

Los anticuerpos monoclonales anti-NGF canino derivados de los vectores de expresión que expresan la SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 (cadena pesada tipo HCA canina) se expresaron en células CHO y se purificaron por una combinación de cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de exclusión por tamaño y se intercambió en tampón en solución salina tampón de fosfato (Procedimiento 1, Figura 15A y B). Los anticuerpos se inyectaron por vía intravenosa en perros Beagle a 2 mg/kg de peso corporal y se tomaron muestras de plasma en distintos momentos durante las siguientes 2 semanas. Las muestras de plasmas se evaluaron en cuanto a la concentración de anticuerpos anti-NGF canino por ELISA utilizando el NGF como diana y el segundo reactivo de anticuerpos policlonal anti-canino-peroxidasa de rábano rusticano y se desarrolló como en la Figura 1. Los resultados se muestran en la Figura 18. Las concentraciones plasmáticas medidas eran consistentes con cinéticas de dos fases, con una semivida de distribución tisular fase (alfa) de 33 horas y sorprendentemente una eliminación larga de fase beta de aproximadamente 9 días.

La ausencia de un declive inclinado en la concentración plasmática de la concentración de anticuerpos anti-NGF canino entre 100 y 300 horas demuestra que no hay anticuerpos neutralizantes pre-existentes contra los anticuerpos monoclonales anti-NGF recombinantes en la sangre del perro ni se generaban dichos anticuerpos neutralizantes después de la infusión. Por comparación, las proteínas basadas en inmunoglobulinas humanas recombinantes son

neutralizadas por anticuerpos en la sangre del perro aproximadamente a las 200 horas post infusión (Richter y col, Drug Metabolism and Disposition 27: 21, 1998). Estos resultados por lo tanto demuestran que los anticuerpos anti-NGF canino de la presente divulgación tienen una larga semivida sérica (9 días) *in vivo* después de la inyección intravenosa y no hay anticuerpos pre-existentes ni anticuerpos generados de nuevo que neutralicen los anticuerpos anti-NGF inyectados a lo largo del tiempo.

Ejemplo 14 – Efecto de anticuerpos monoclonales anti-NGF canino en la reducción del dolor inflamatorio *in vivo*

Terapia con anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales anti-NGF canino derivados de los vectores de expresión que expresan la SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 (cadena pesada tipo HCA canina) se expresaron en células CHO y se purificaron por una combinación de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de exclusión por tamaño (Procedimiento I) y el tampón se intercambió en solución salina tampón de fosfato.

Modelo canino de inflamación

Todos los experimentos se llevaron a cabo con la previa aprobación del Comité de Ética Institucional (CRL, Irlanda). Se inyectaron los perros Beagle (= día-1) con caolín en la almohadilla plantar de una pata trasera con el fin de generar una inflamación que se resolvía sola que comenzaba aproximadamente 24 horas más tarde y que hace que los perros se volvieran temporalmente cojos. En este modelo, una vez que la respuesta inflamatoria inicial al caolín remite, los perros se volvían menos cojos gradualmente durante un periodo de aproximadamente 1-2 semanas y entonces se recuperaron completamente.

Se inyectaron por vía intravenosa grupos de 3 perros con anticuerpos monoclonales anti-NGF canino a 200 µg/kg de peso corporal o solución salina tampón de fosfato como vehículo de control (= día 0). Los perros se evaluaron en cuanto a la cojera durante 7 días por un procedimiento de puntuación visual (puntuación 0, sin cojera (apoya todo el peso); puntuación 1, ligera cojera (no apoya todo el peso por camina bien); puntuación 2, cojera moderada (apoya el peso ligeramente y no camina bien), puntuación 3, cojera grave (no apoya el peso)). Se ocultaba a los observadores los perros que recibían inyección.

Los resultados se muestran en la Figura 19. Las puntuaciones de cojera se reducían en los perros que recibían anticuerpos monoclonales anti-NGF el día 3 después de la invención en comparación con el vehículo de control, indicando que los anticuerpos monoclonales anti-NGF tenían un efecto en la reducción del dolor en perros sobre el que se veía con el vehículo solo. El aumento de duración de la actividad es consistente con la farmacocinética plasmática de los anticuerpos monoclonales anti-NGF canino que demostraba una fase lenta (alfa) de distribución tisular de aproximadamente 30 horas y la relativamente pobre vascularización del área de la almohadilla plantar. Los resultados que se presentan en la Figura 19 muestra que los anticuerpos anti-NGF canino reducen el dolor inflamatorio en perros con una reducción consecuente en la cojera.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NVIP Pty Ltd

<120> ANTICUERPOS ANTI-FACTOR DE CRECIMIENTO DE NERVIOS Y PROCEDIMIENTOS DE PREPARACIÓN Y UTILIZACIÓN DE LOS MISMOS

<130> P119711.WO.02

<150> GB1114858.2
<151> 29-08-2011

<150> US61/483481
<151> 06-05-2011

<150> US61/531439
<151> 06-09-2011

<160> 33

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 704 036 T3

<220>

<223> Cadena variable ligera con marca1 (VL1)

5 <400> 1

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2

10 <211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cadena variable pesada con marca1 (VH1)

<400> 2

ES 2 704 036 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

- <210> 3
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Cadena variable ligera con marca 2 (VL2)
- <400> 3

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

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

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

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

ES 2 704 036 T3

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

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

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

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

<220>
<223> Cadena variable pesada con marca 2 (VH2)

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5
<211> 217
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera completa - VL1 y dominio constante kappa de cadena ligera

<400> 5

ES 2 704 036 T3

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

5 <210> 6
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 704 036 T3

<223> cadena pesada completa - VH1 y HCA

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Cys Thr Asp Thr Pro Pro Cys Pro Val Pro Glu Pro Leu Gly Gly

ES 2 704 036 T3

<220>

<223> cadena pesada completa - VH1 y HCB

5

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro

ES 2 704 036 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada completa - VH1 y HCC

5

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Cys Lys Cys Asn Cys Asn Asn Cys Pro Cys Pro Gly Cys Gly Leu

ES 2 704 036 T3

<220>

<223> cadena pesada completa - VH1 y HCD

5

<400> 9

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Asn Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
 20 25 30
 Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met His Ser Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr
 130 135 140
 Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Val
 195 200 205
 His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Pro Lys Glu Ser
 210 215 220
 Thr Cys Lys Cys Ile Ser Pro Cys Pro Val Pro Glu Ser Leu Gly Gly

ES 2 704 036 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL2 y dominio constante kappa de cadena ligera

5

<400> 10

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Arg Ser Glu Cys Gln Arg Val Asp
          210          215
    
```

ES 2 704 036 T3

<210> 11
 <211> 453
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cadena pesada completa - VH2 y HCA

 10 <400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 704 036 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

 His Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 12
 <211> 457

ES 2 704 036 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> cadena pesada completa - VH2 y HCB

<400> 12

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 704 036 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 13
 <211> 455

ES 2 704 036 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> cadena pesada completa - VH2 y HCC

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 704 036 T3

Glu Cys Lys Cys Asn Cys Asn Asn Cys Pro Cys Pro Gly Cys Gly Leu
 225 230 235 240

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

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

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

Gln Val Gln Thr Ala Asn Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Ser Asn Gly
 290 295 300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 14
 <211> 453

ES 2 704 036 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> cadena pesada completa - VH2 y HCD

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 704 036 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 15
 <211> 453
 <212> PRT

ES 2 704 036 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH1 y HCA aglicosado

5

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 704 036 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

 His Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 16
 <211> 457

ES 2 704 036 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> VH1 y HCB aglicosado

<400> 16

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 704 036 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 17
 <211> 455

ES 2 704 036 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> VH1 y HCC aglicosado

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 704 036 T3

Glu Cys Lys Cys Asn Cys Asn Asn Cys Pro Cys Pro Gly Cys Gly Leu
 225 230 235 240

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

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

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

Gln Val Gln Thr Ala Asn Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Ser Ala Gly
 290 295 300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 18
 <211> 453
 <212> PRT

ES 2 704 036 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH1 y HCD aglicosado

5

<400> 18

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Asn Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
 20 25 30
 Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met His Ser Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr
 130 135 140
 Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Val
 195 200 205
 His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Pro Lys Glu Ser
 210 215 220

ES 2 704 036 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 19
 <211> 453
 <212> PRT

ES 2 704 036 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH2 y HCA aglicosado

5

<400> 19

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Asn Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
 20 25 30
 Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Gln Met His Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr
 130 135 140
 Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu His Ser Leu Ser Ser Met Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Val
 195 200 205
 His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Phe Asn Glu Cys
 210 215 220

ES 2 704 036 T3

Arg Cys Thr Asp Thr Pro Pro Cys Pro Val Pro Glu Pro Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Leu Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Arg Ile
 245 250 255
 Thr Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Leu Asp Leu Gly Arg Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Glu Val His
 275 280 285
 Thr Ala Lys Thr Gln Ser Arg Glu Gln Gln Phe Ala Gly Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln Asp Trp Leu Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu
 325 330 335
 Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Arg Ala His Lys Pro Ser Val Tyr
 340 345 350
 Val Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser Ser Ser Asp Thr Val Ser
 355 360 365
 Ile Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu
 370 375 380
 Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Arg Lys His Arg Met Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asp Pro Phe Thr Cys Ala
 420 425 430
 Val Met His Glu Thr Leu Gln Asn His Tyr Thr Asp Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 His Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 20
 <211> 457

ES 2 704 036 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> VH2 y HCB aglicosado

<400> 20

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 704 036 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

 Glu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 21
<211> 455

ES 2 704 036 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> VH2 y HCC aglicosado

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 704 036 T3

Glu Cys Lys Cys Asn Cys Asn Asn Cys Pro Cys Pro Gly Cys Gly Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile
 245 250 255
 Leu Val Thr Ala Arg Thr Pro Thr Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Asn Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Ser Lys
 275 280 285
 Gln Val Gln Thr Ala Asn Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Ser Ala Gly
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Ser Gly Lys Gln Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser
 325 330 335
 Pro Ile Glu Glu Ile Ile Ser Lys Thr Pro Gly Gln Ala His Gln Pro
 340 345 350
 Asn Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Met Ser Lys Asn Thr
 355 360 365
 Val Thr Leu Thr Cys Leu Val Lys Asp Phe Phe Pro Pro Glu Ile Asp
 370 375 380
 Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg
 385 390 395 400
 Met Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415
 Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile
 420 425 430
 Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Ile Ser
 435 440 445
 Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 22
 <211> 453

ES 2 704 036 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> VH2 y HCD aglicosado

<400> 22

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Asn Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
 20 25 30
 Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Gln Met His Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr
 130 135 140
 Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Val
 195 200 205
 His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Pro Lys Glu Ser
 210 215 220

ES 2 704 036 T3

Thr Cys Lys Cys Ile Ser Pro Cys Pro Val Pro Glu Ser Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Arg Ile
 245 250
 Thr Arg Thr Pro Glu Ile Thr Cys Val Val Leu Asp Leu Gly Arg Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Glu Val His
 275 280 285
 Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Gln Gln Phe Ala Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln Asp Trp Leu Thr Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Gly Leu Pro Ser Pro Ile Glu
 325 330 335
 Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala His Gln Pro Ser Val Tyr
 340 345 350
 Val Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser Ser Ser Asp Thr Val Thr
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Glu Ile Asp Val Glu
 370 375 380
 Trp Gln Ser Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Ser Lys Tyr His Thr Thr
 385 390 395 400
 Ala Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asp Thr Phe Thr Cys Ala
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu Gln Asn His Tyr Thr Asp Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 His Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 23
 <211> 23
 <212> PRT

ES 2 704 036 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL - FR1

5

<400> 23

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys
20

10

<210> 24

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> VL2 - FR1

<400> 24

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys
20

20

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL - FR2

30

<400> 25

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

35

<210> 26

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> VL - FR3

<400> 26

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

45

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

<210> 27

ES 2 704 036 T3

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

5 <220>
 <223> VL2 - FR3
 <400> 27

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

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

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

15 <220>
 <223> VL - FR4

20 <400> 28

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

25 <210> 29
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> VH - FR1

<400> 29

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

35 **Thr Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr**
20 25 30

<210> 30
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> VH - FR2

45 <400> 30

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

50 <210> 31
 <211> 32
 <212> PRT

REIVINDICACIONES

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

5 -proporcionar un anticuerpo donante de una especie distinta de un canino, en el que el anticuerpo donante tiene especificidad de unión por un antígeno diana presente en caninos;

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 de la secuencia de aminoácidos de regiones marco de una pluralidad de anticuerpos caninos para identificar uno o más restos de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de las regiones marco del anticuerpo donante que se diferencien de uno o más restos de aminoácido en la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de las regiones marco de la pluralidad de anticuerpos caninos;

y

15 - sustituir el uno o más restos de aminoácido identificados en el anticuerpo donante con el uno o más restos de aminoácido presentes en la posición correspondiente de la pluralidad de anticuerpos caninos para producir un anticuerpo modificado,

en el que el anticuerpo modificado no contiene ningún aminoácido en ninguna posición de las regiones marco que sean ajenas en la posición de los caninos;

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

20 en el que la sustitución de un resto de aminoácido del anticuerpo donante se lleva a cabo utilizando el principio de la sustitución conservadora.

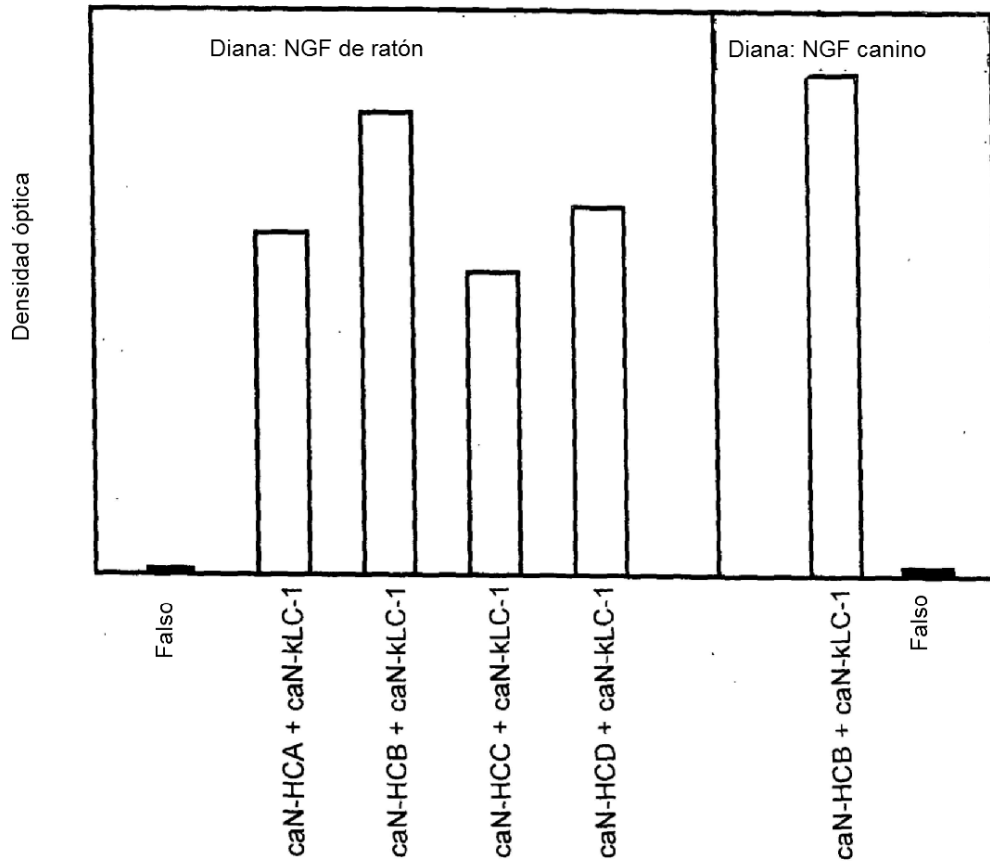


Figura 1

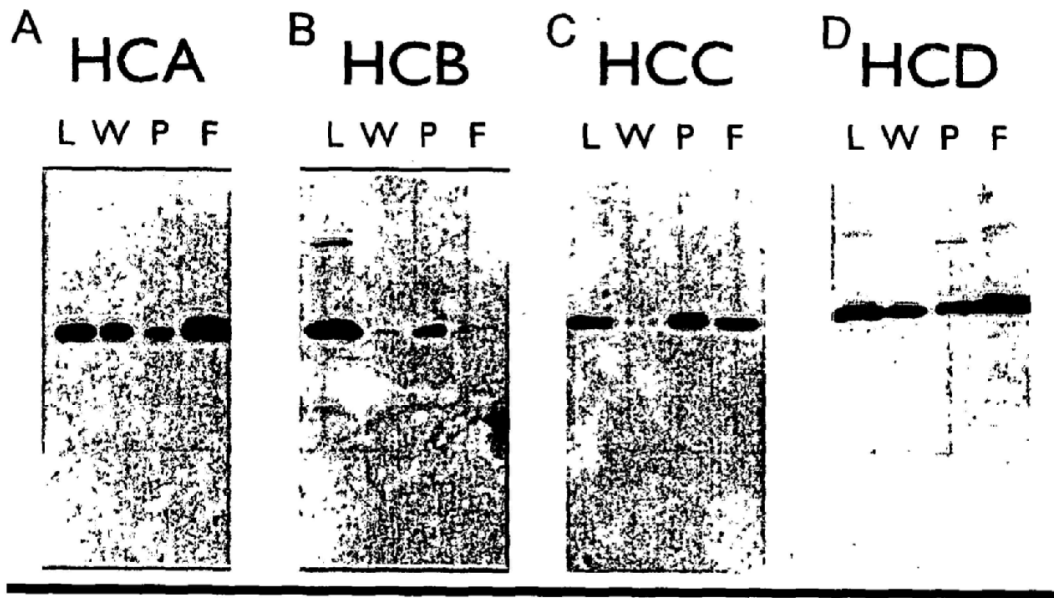


Figura 2

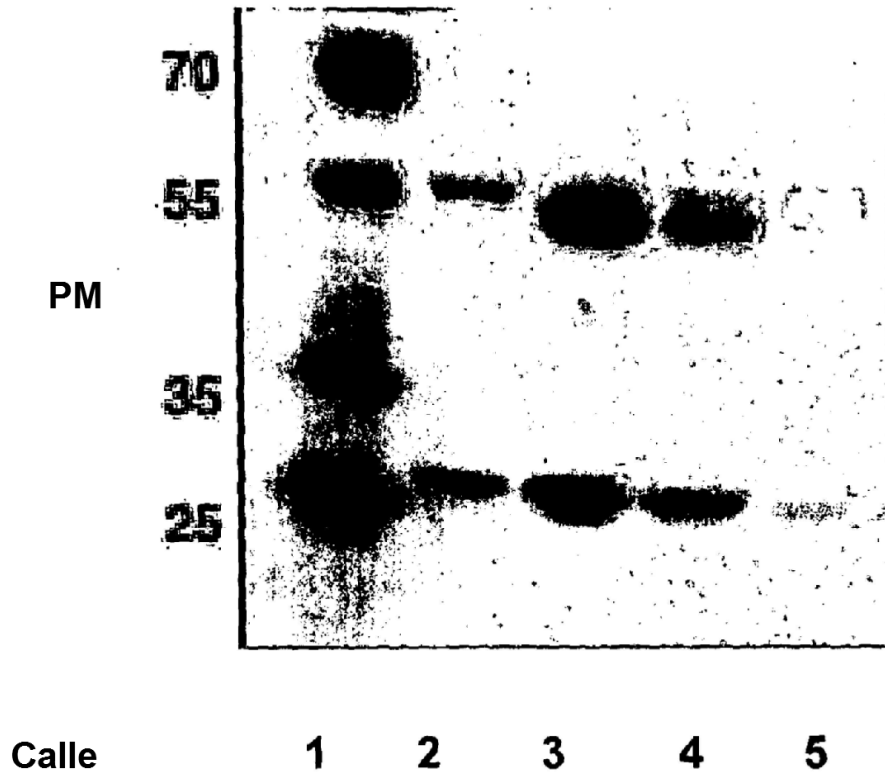


Figura 3

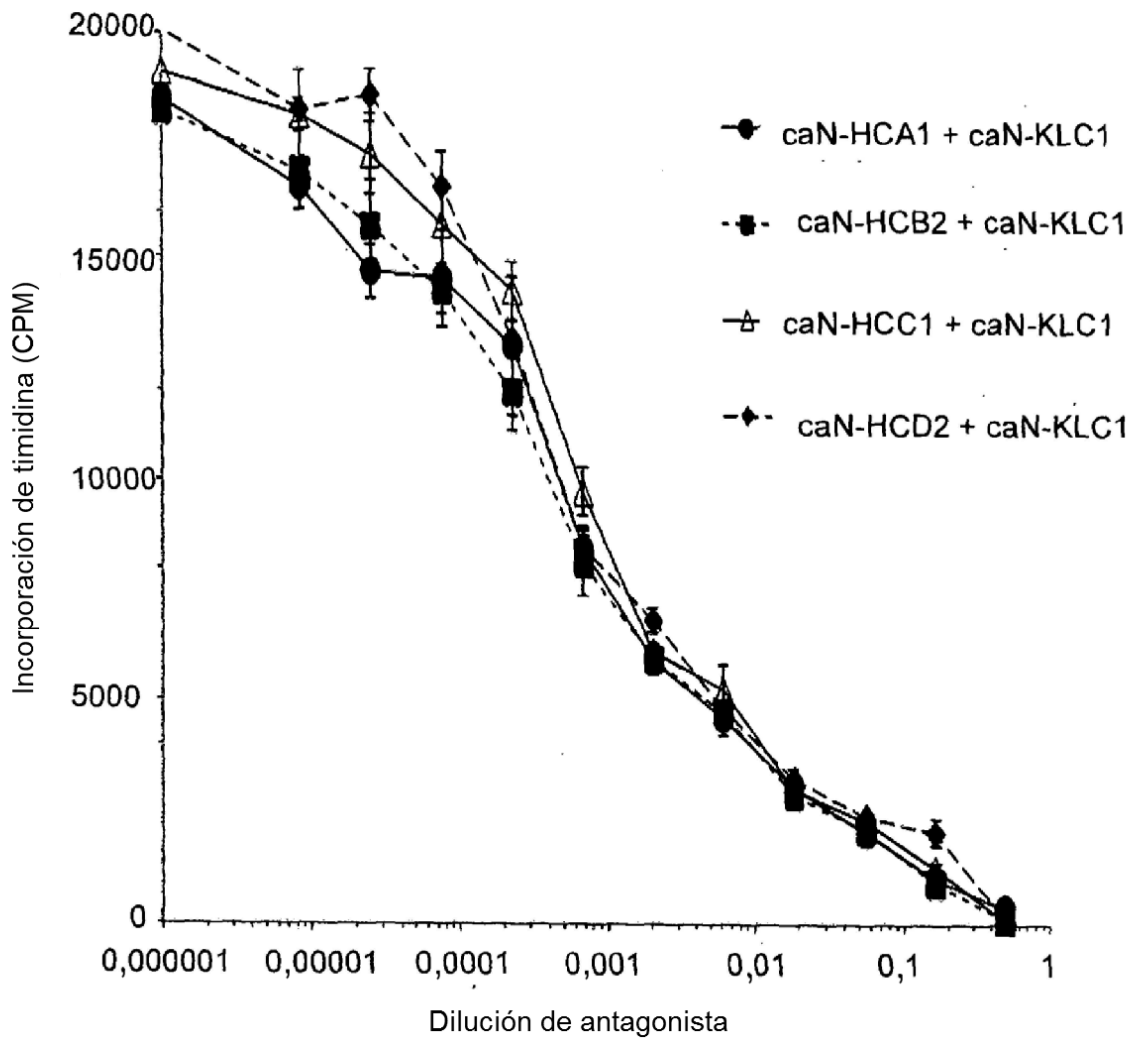


Figura 4

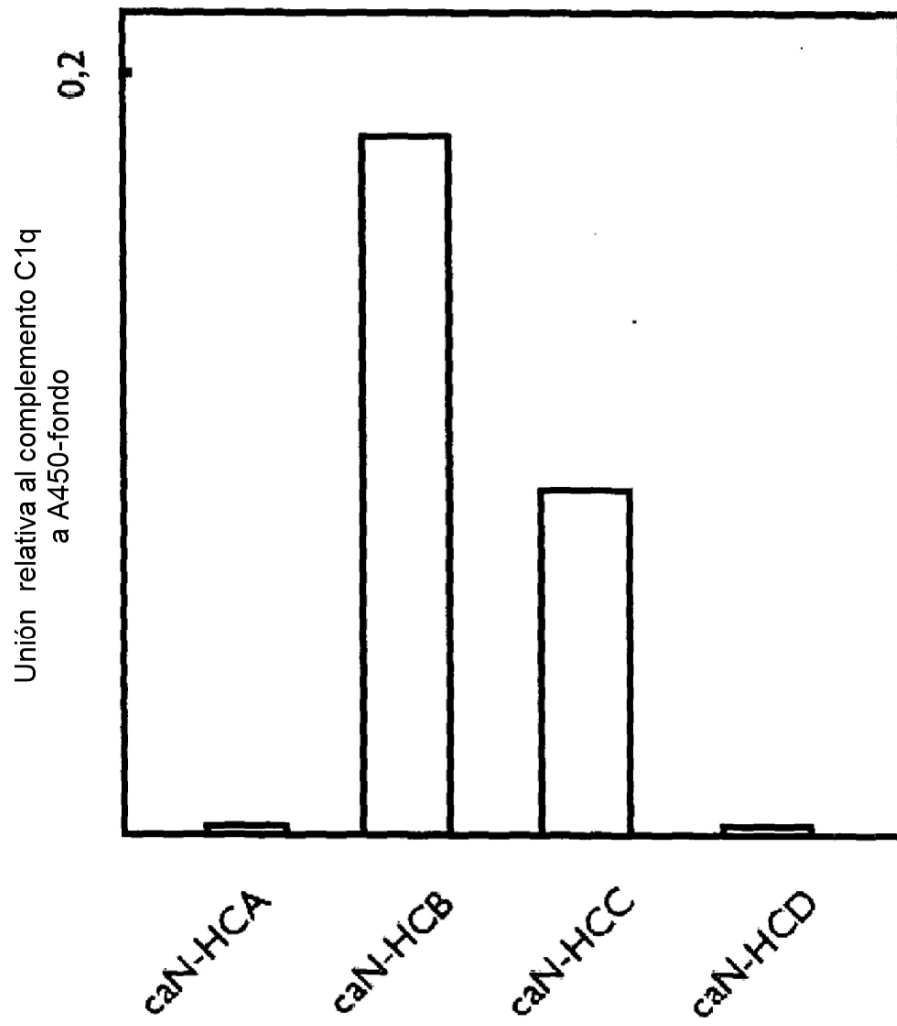


Figura 5

| | |
|---------------------|---|
| VL caninizada 40 | * * * * * DIQMTQSPASLSLSQEEKVTITCRASEDIYNALAWYQOKP |
| VL caninizada 80 | * * * * * GQAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSGTEYSLTINSLES |
| VL caninizada | * * * * * EDVAVYFCQHYFHYPRTEFGAGTKVELK 107 |

Figura 6 - Dominio variable de cadena ligera

ES 2 704 036 T3

| | |
|----------------------|---|
| VH caninizada 40 | * * ** * ** * * * EVQLVESGGDLVNPGGTLTLSCVVSGFSLT <u>NNNVNWRQA</u> |
| VH caninizada 80 | * * * LGRGLEWVGGVWAGGATDYN <u>SALKSRLTITRDT</u> SKSTVFL |
| VH caninizada 113 | 82ABC 100ABCDEF * KMHS <u>LQSEDTATYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQ</u> GLVTVSS |

Figura 7 - Dominio variable de cadena pesada

**DIQMTQSPASLSLSQEEKVTITCRASEDIYNALAWYQ
QKPGQAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSGTEYSLTI
NSLESEDVAVYFCQHYPRTFGAGTKVELKRNDA
QPAVYLFQPSPDQLHTGSASVVCLLNSFYPKDINVKW
KVDGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYLSSTLTMSSTEYL
SHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD**

Figura 8 - VL de la cadena ligera kappa canina (caN-kLC)
del anticuerpo caninizado anti-NGF

**EVQLVESGGDLVNPGGTLTLSCVVSGFSLTNNNVNWVR
QALGRGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRLTITRDT SKS
TVFLKMHSLQSEDTATYYCARDGGYSSSTLYAMDAWG
QGTLVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVS
GYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLHSLSSMV
TVPSSRWPSETFTCNVWHPASNTKVDKPVFNECRCTDTP
PCPVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILRITRTPEVTCVLDLGR
EDPEVQISWFVDGKEVHTAKTQSREQQFNGTYRVVSVL
PIEQDWLTGKEFKCRVNHIDLPSP IERTISKARGRAHKP
SVYVLPPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNG
QQEPERKHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQG
DPFTCAVMHETLQNHYTDL SLSHSPGK**

Figura 9 - VH de la cadena pesada de IgG-A canina caninizada anti-NGF (caN-HCA)

**EVQLVESGGDLVNPGGTLTLSCVVSGFSLTNNNVNWVR
QALGRGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRLTITRDTSKS
TVFLKMHSLQSEDTATYYCARDGGYSSSTLYAMDAWG
QGT LVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVS
GYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMV
TVPSSRWPSETFTCNVAHPASKTKVDKPVPKRENGRVP
RPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTC
VVVDLDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFNGT
YRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKA
RGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFYPPDIDV
EWQSNGQQEPESKYRTTPQLDEDGSYFLYSKLSVDKS
RWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLSHSPGK**

Figura 10 - VH de la cadena pesada de IgG-B canina caninizada anti-NGF (caN-HCB)

**EVQLVESGGDLVNPGGTLTLCVVSQSGFSLTNNNVNWVR
QALGRGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRLTITRDTSKS
TVFLKMHS LQSEDTATYYCARDGGYSSSTLYAMDAWG
QGT LVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSQSGSTVALACLVS
GYIPEPVTVSWNSVSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMV
TVPSSRWPSETFTCNVAHPATNTKVDKPVAKECECKCN
CNNCPCPGCGLLGGPSVFIFPPKPKDILVTARTPTVTCVV
VDLDPENPEVQISWFVDSKQVQTANTQPREEQSNGTYR
VSVLPIGHQDWLSGKQFKCKVNNKALPSPIEEIISKTPG
QAHQPNVYVLPPSRDEM SKNTVTLTCLVKDFPPEIDVE
WQSNGQQEPESKYRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSR
WQRGDTFICAVMHEALHNHYTQISLSHSPGK**

Figura 11 - VH de la cadena pesada de IgG-C canina caninizada anti-NGF (caN-HCC)

**EVQLVESGGDLVNPGGTLTLSCVVSGFSLTNNNVNWVR
QALGRGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRLTITRDTSKS
TVFLKMHSLQSEDTATYYCARDGGYSSSTLYAMDAWG
QGTLVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVS
GYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSTV
TVPSSRWPSETFTCNVHPASNTKVDKVPKESTCKCIS
PCVPESLGGPSVFIFPPKPKDILRITRTPEITCVLDLGRE
DPEVQISWFVDGKEVHTAKTQPREQQFNSTYRVVSVLPI
EHQDWLTGKEFKCRVNHIGLPSPIERTISKARGQAHQPS
VYVLPSPKELSSSDTVTLTCLIKDFYPPEIDVEWQSNQ
PEPESKYHTTAPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDT
FTCAVMHEALQNHYTDLSLSHSPGK**

Figura 12 - VH de la cadena pesada de IgG-D canina caninizada anti-NGF (caN-HCD)

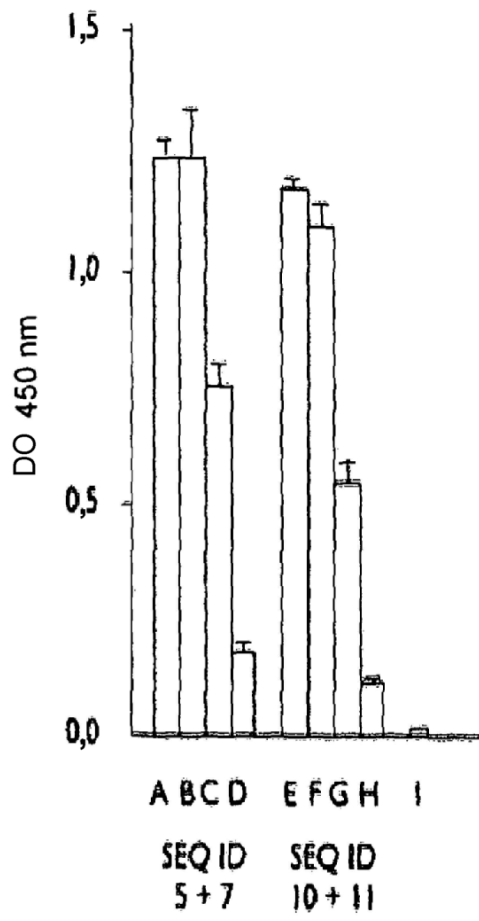


Figura 13A

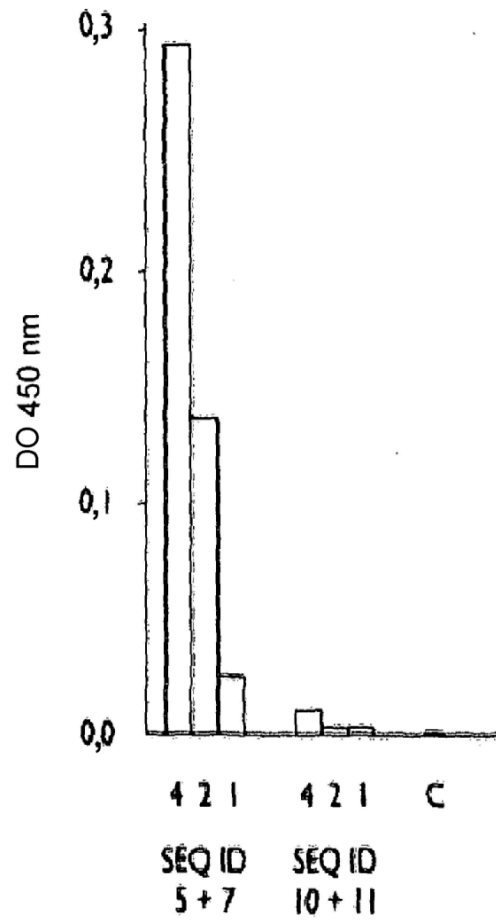


Figura 13B

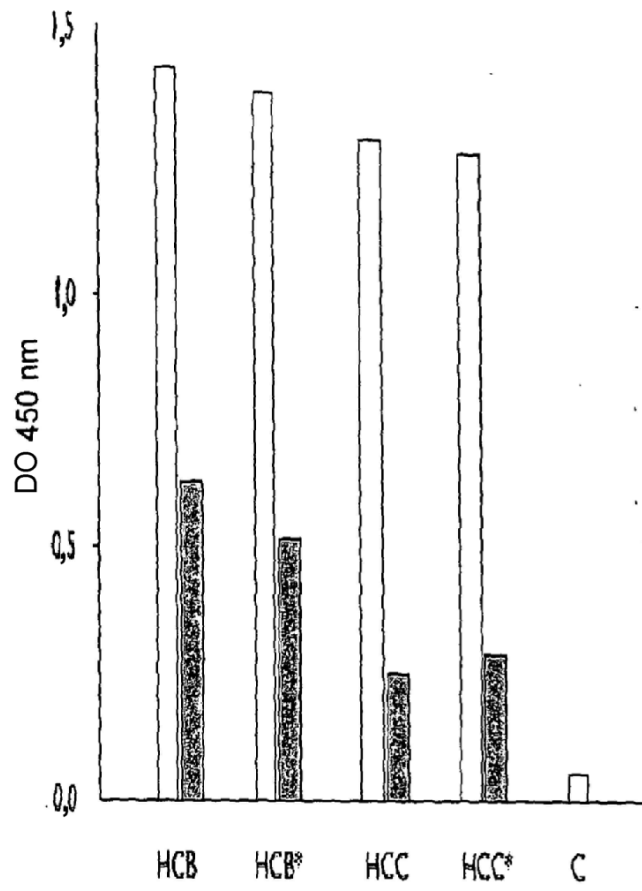


Figura 14A

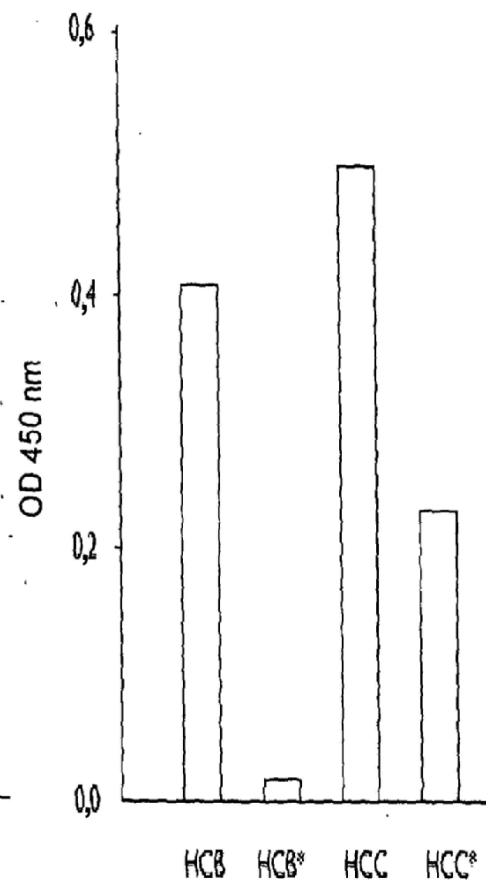


Figura 14B

Análisis de cromatografía después de la de intercambio aniónico

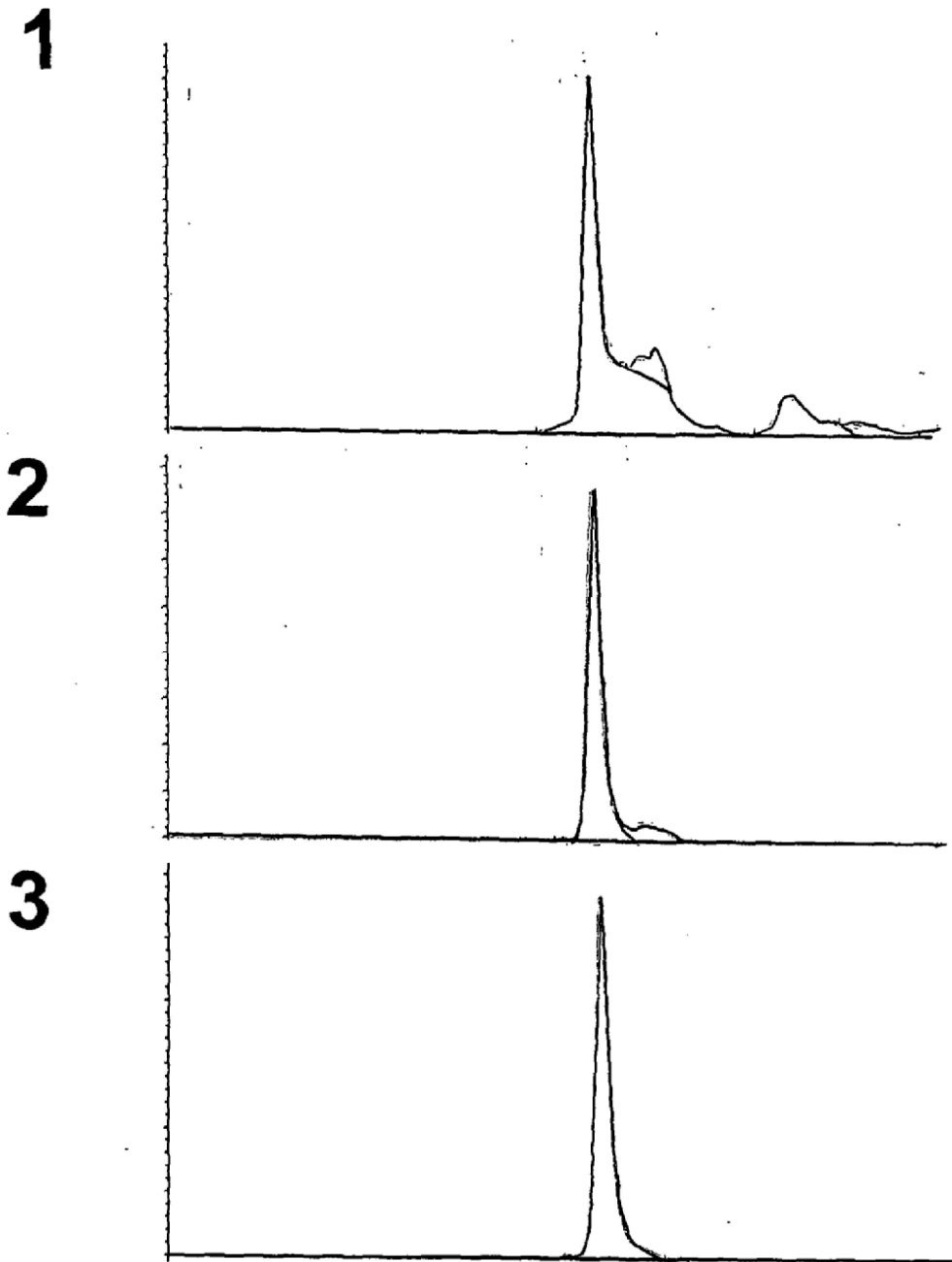


Figura 15A

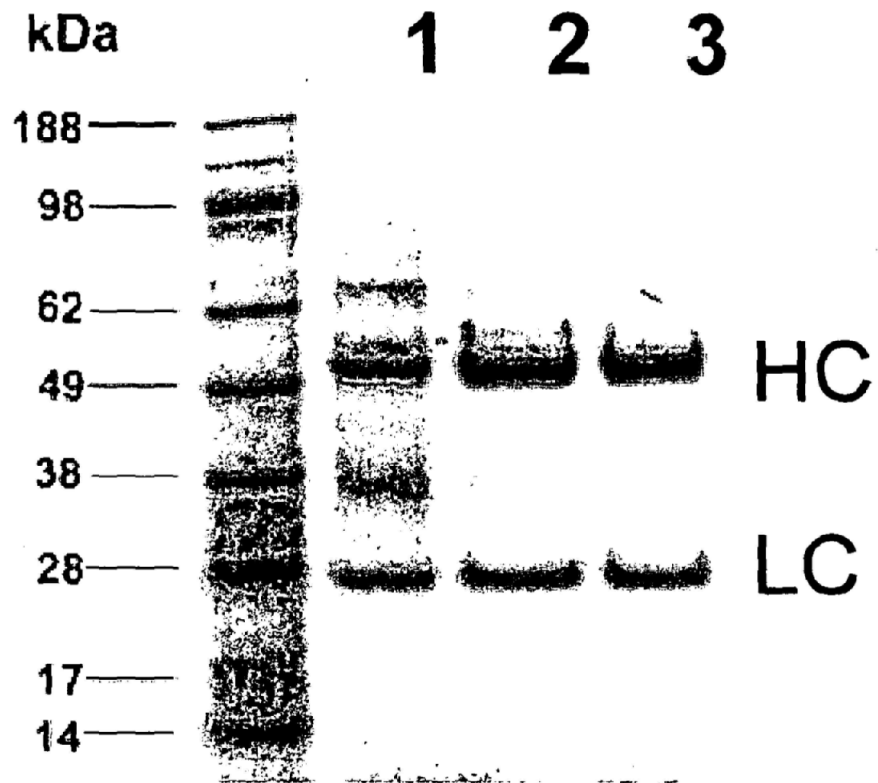


Figura 15B

SDS-PAGE

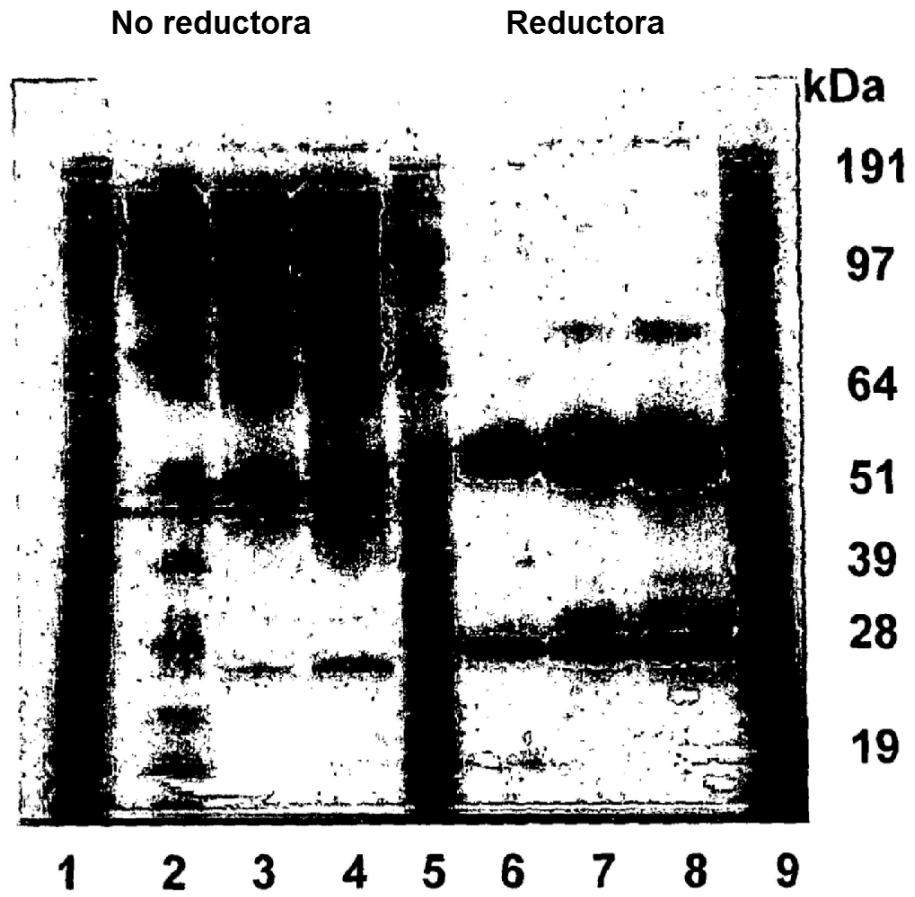
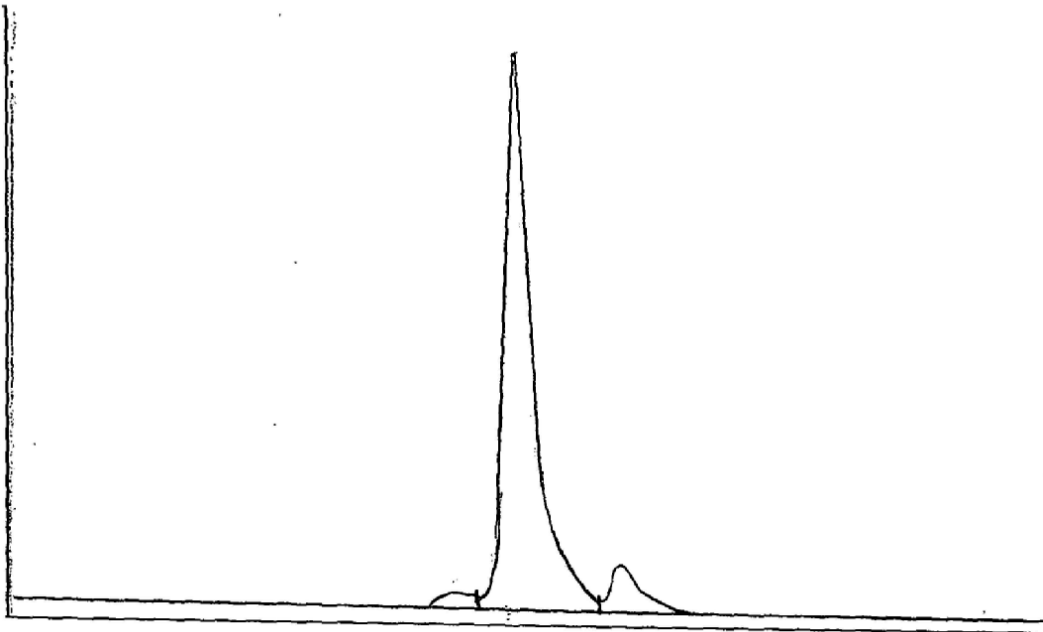


Figura 15C



| Pico del tiempo de retención (Min) | Pm aproximado (KDa) | % del área total del pico |
|------------------------------------|---------------------|---------------------------|
| 8,05 | 353 | 2,6 |
| 9,17 | 156 | 89,7 |
| 11,18 | 36 | 7,7 |

Figura 15D

SDS-PAGE

No reductora

Reductora

MAb de ratón

MAb de ratón

NV-01

NV-01

I II

I II

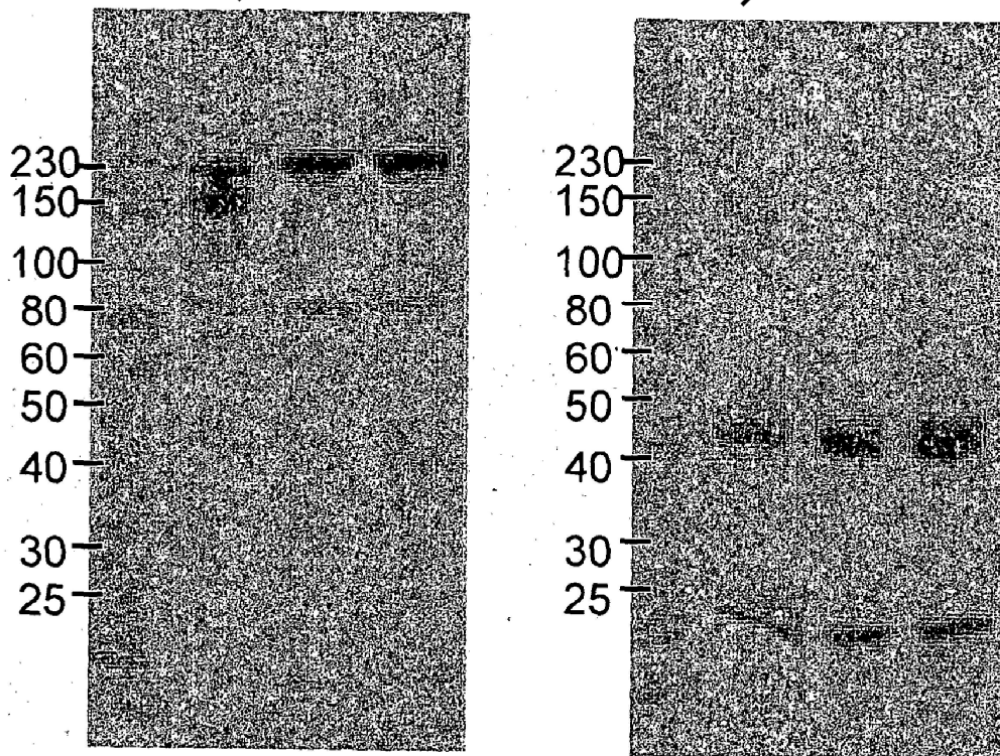


Figura 16A

NGF ELISA

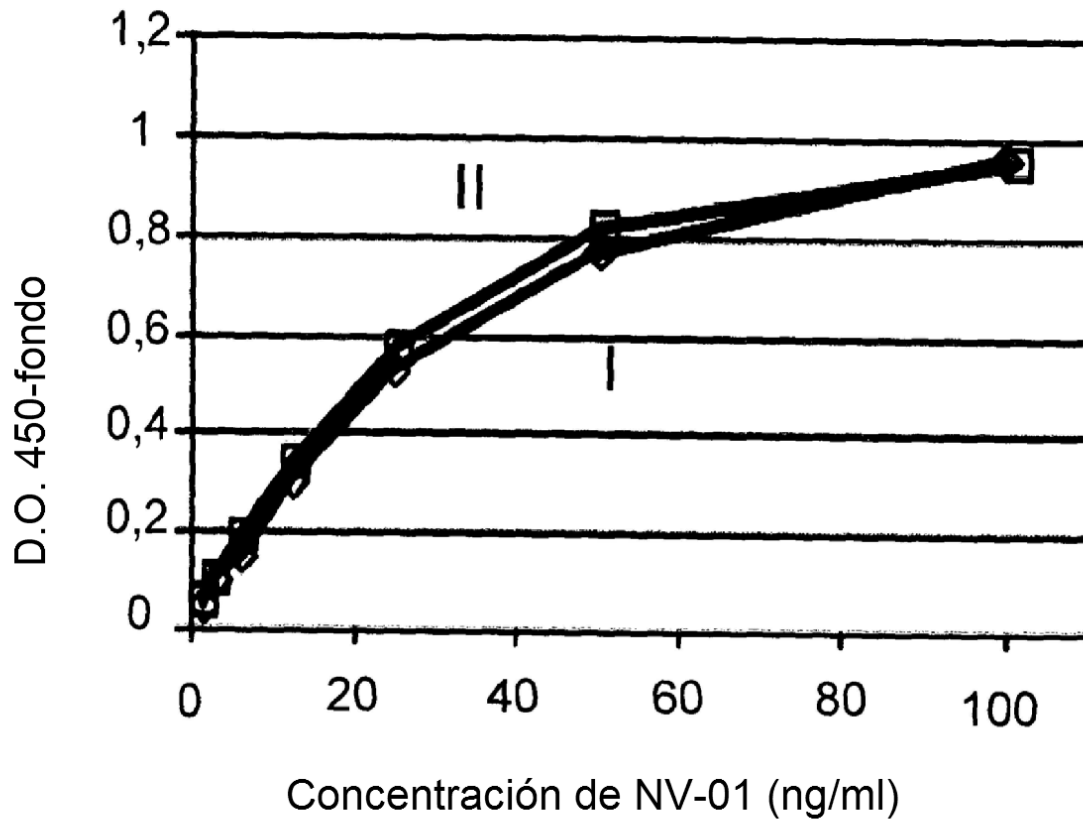


Figura 16B

| Día del estudio | | | -1 | 1 | 3 | 7 |
|-----------------|------|-----------------------------------|-----|------|-----|------|
| ID del animal | Sexo | Edad el día 0 del estudio (meses) | | | | |
| 68305 | M | 11 | 9,6 | 10,0 | 9,9 | 10,0 |
| 26885 | F | 19 | 9,2 | 9,9 | 9,5 | 9,8 |
| 32886 | F | 11 | 9,4 | 9,9 | 9,7 | 10,0 |

| Día del estudio | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| ID del animal | | | | | | | | | | | | | | | |
| 68305 | 38,2 | 38,6 | 38,6 | 38,5 | 38,4 | 38,5 | 38,4 | 38,3 | 38,7 | 38,2 | 38,3 | 38,9 | 38,4 | 38,6 | 38,5 |
| 26886 | 37,8 | 38,2 | 38,0 | 38,2 | 38,4 | 37,7 | 38,1 | 38,2 | 38,4 | 38,2 | 38,4 | 38,6 | 38,5 | 38,4 | 38,6 |
| 32886 | 36,8 | 38,7 | 38,9 | 38,8 | 38,7 | 38,8 | 38,7 | 38,5 | 38,8 | 38,7 | 38,3 | 39,2 | 38,7 | 38,7 | 38,8 |

Figura 17

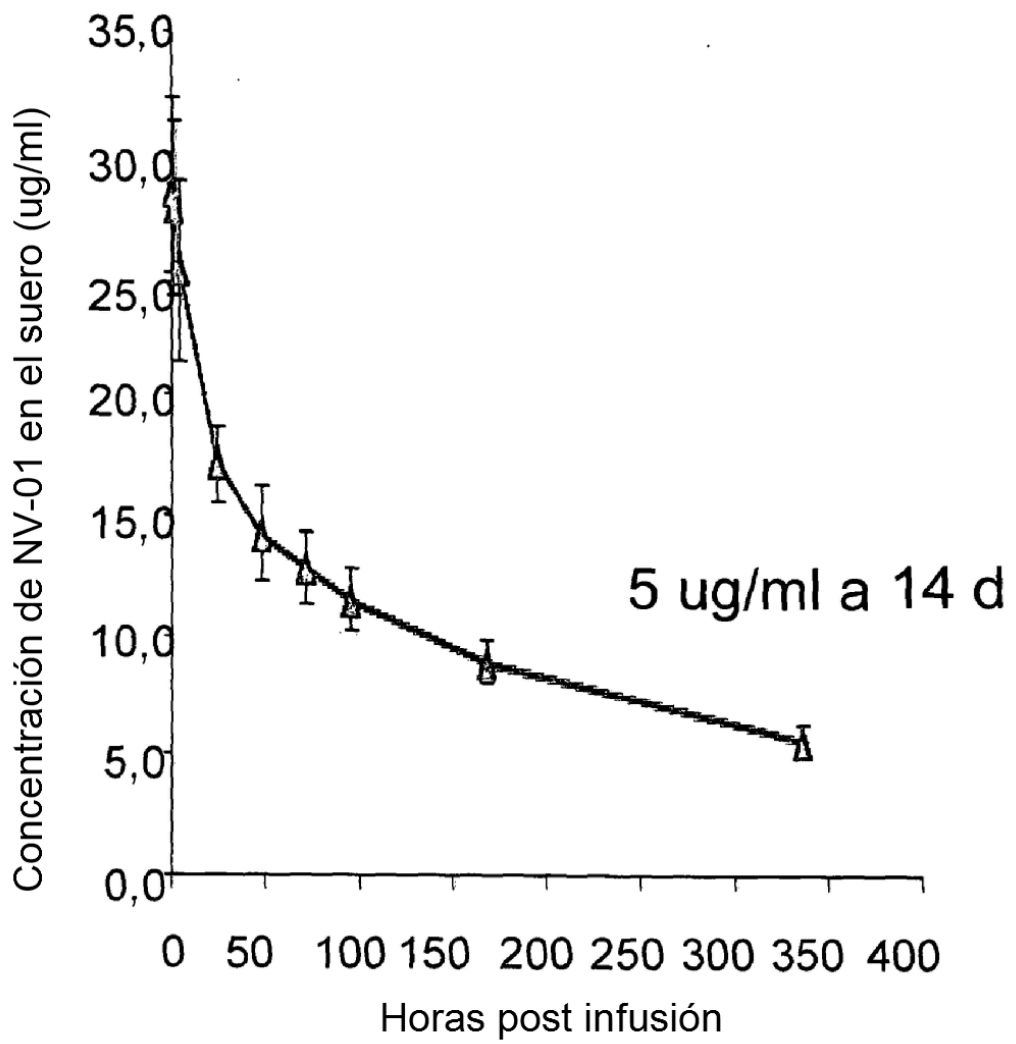


Figura 18

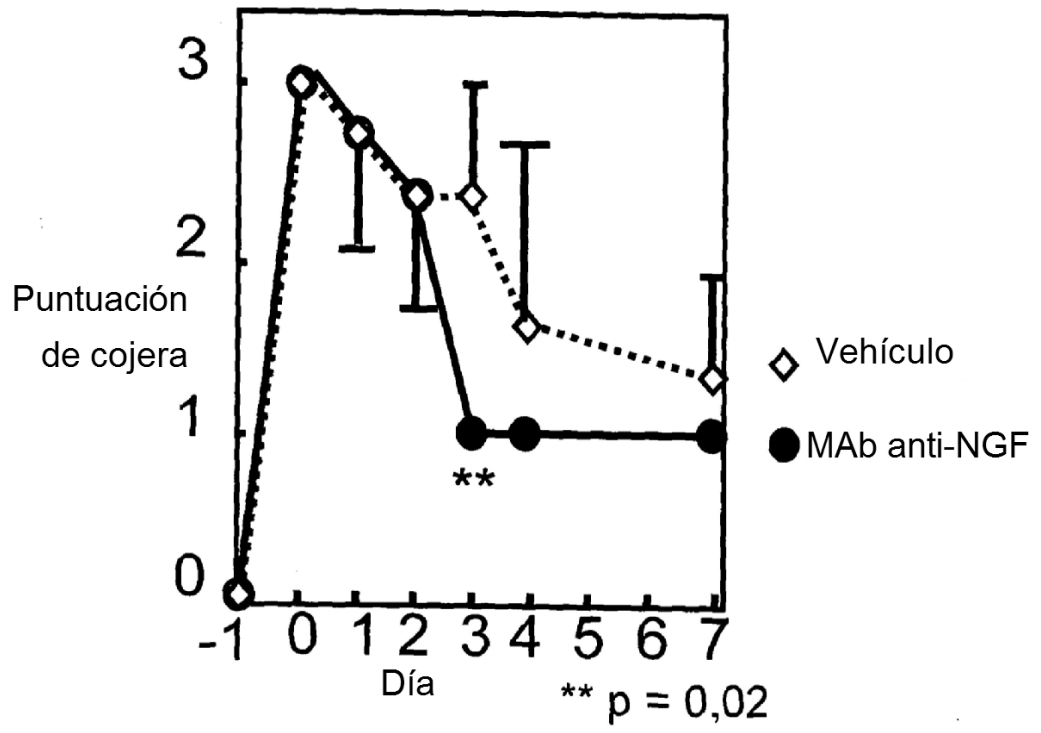


Figura 19