



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 326 080**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03814397 .0**
96 Fecha de presentación : **23.12.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1581759**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.10.2005**

54 Título: **Métodos para tratar neuropatía sensorial inducida por taxol.**

30 Prioridad: **23.12.2002 US 436147 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.09.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.09.2009

73 Titular/es: **Rinat Neuroscience Corp.**
230 E. Grand Ave
South San Francisco, California 94080, US

72 Inventor/es: **Shelton, David, L.**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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

Métodos para tratar neuropatía sensorial inducida por taxol.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere al campo de neuropatía inducida por taxol. Más específicamente, la invención se refiere a métodos para tratar neuropatía sensorial inducida por taxol que comprenden administración de anticuerpo anti-trkC agonista para el tratamiento, prevención y/o mejora de un síntoma de neuropatía sensorial inducida por taxol.

10 **Antecedentes de la invención**

Agentes quimioterapéuticos, tales como taxol y otros taxanos, se han utilizado satisfactoriamente para tratar cáncer. Aproximadamente 300.000 personas sólo en los Estados Unidos recibirán tratamiento quimioterapéutico cada año para cánceres de mama, pulmón y colon. Sin embargo, del 60-90% de pacientes tratados con taxol experimentan síntomas de neuropatía, que incluyen neuropatía sensorial y disfunción neuronal. Los síntomas observados frecuentemente en pacientes tratados con taxol incluyen parestesia simétrica distal, palhiopoesia, pérdida de sentido de posición articular, disestesia dolorosa, signo de Lhermitte y dolor. Otros síntomas menos frecuentes son paresia distal y/o proximal progresiva, neuropatía motora, mialgia, casos raros de miopatía, íleo paralítico, hipotensión ortostática y arritmia. (Quasthoff *et al.*, *J. Neurol.* 249: 9-17 (2002)). Síntomas graves de neuropatía sensorial exigen una reducción en la dosis de quimioterapia y retrasos en el tratamiento, limitando de este modo, la eficacia de la terapia anti-cáncer.

Las neurotrofinas son una familia de proteínas homodiméricas pequeñas, que juegan un papel crucial en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso. Los miembros de la familia de las neurotrofinas incluyen el factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4/5 (NT-4/5), neurotrofina-6 (NT-6) y neurotrofina 7 (NT-7). Las neurotrofinas, de manera similar a otros factores de crecimiento polipeptídicos, influyen en sus células diana a través de interacciones con receptores de superficie celular. De acuerdo con el conocimiento actual, dos tipos de glicoproteínas transmembrana sirven como receptores para neurotrofinas. Las neuronas sensibles a neurotrofinas poseen un receptor de baja afinidad (LNGFR) de bajo peso molecular (65-80 kDa) común, también denominado p75NTR o p75, que une NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5 con un KD de 2×10^{-9} M y receptores de alta afinidad (KD en el intervalo de 10^{-11} M) de alto peso molecular (130-150 kDa), que son miembros de la familia trk de receptores tirosina quinasas. Los miembros de la familia de receptores trk identificados son trkA, trkB y trkC.

TrkC se expresa de forma generalizada en el sistema nervioso central y en un subconjunto de neuronas en el sistema nervioso periférico. Se expresa en neuronas simpáticas y en un subconjunto de neuronas sensoriales primarias del ganglio de la raíz dorsal (DRG), las neuronas sensoriales de fibras gruesas del DRG. Las neuronas sensoriales de fibras gruesas tienen axones mielinizados largos que se prolongan hacia la periferia, donde transmiten información con respecto a propiocepción, tacto fino y sentido vibracional.

Los dominios extracelulares de longitud completa de los receptores nativos trkA, trkB y trkC tienen cinco dominios estructurales que se han identificado con referencia a estructuras homólogas o, de lo contrario, estructuras similares en diversas proteínas diferentes. Los dominios se han denominado empezando en el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácido de los receptores trk maduros como 1) un primer dominio rico en cisteína; 2) un dominio rico en leucina; 3) un segundo dominio rico en cisteína; 4) un primer dominio similar a inmunoglobulina y 5) un segundo dominio similar a inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, el documento WO 0198361: *Urfer et al. J. Biol. Chem.* 273: 5829-5840 (1998).

Las neurotrofinas tienen interés como potenciales agentes terapéuticos para una diversidad de enfermedades neurodegenerativas y neurológicas. Las neurotrofinas, tales como NGF y NT-3, se ensayaron en modelos animales para tratar neuropatía sensorial asociada con tratamiento de piridoxina o cis-platino. Patente de EE.UU. N° 5.604.202; documento WO 0198361. Campana *et al. Neurotoxicology* 19 (2): 237-244 (1998) describe el uso de péptidos de la secuencia neurotrófica de H saposina C para el tratamiento de neurotoxicidad inducida por paclitaxel. El uso de neurotrofinas en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y neurológicas tiene diversos defectos. Un defecto significativo es la falta de especificidad. La mayoría de las neurotrofinas reaccionan de manera cruzada con más de un receptor. Por ejemplo, NT-3, el ligando preferido del receptor trkC tirosina quinasa, también se une y activa trkA y trkB (Barbacid, *J. Neurobiol.* 25: 1386-1403 (1994)); Barbacid, *Ann. Nueva York Acad. Sci.* 766: 442-458 (1995); Ryden e Ibanez, *J. Biol. Chem.* 271: 5623-5627 (1996), Belliveau *et al.*, *J. Cell. Biol.* 136: 375-388 (1997); Farinas *et al., Neuron* 21: 325-334 (1998)). Como resultado, es difícil idear terapias que se dirijan a una población específica de neuronas. Otra limitación de la terapia con neurotrofinas es que las neurotrofinas, incluyendo NT-3, se conoce que provocan hiperalgia (Chaudhry *et al., Muscle and Nerve* 23: 189-192 (2000)). Además, algunas neurotrofinas tales como NT-3 tienen propiedades farmacocinéticas y de biodisponibilidad de mala calidad en roedores, lo cual plantea serias dudas sobre sus aplicaciones clínicas en seres humanos (Haase *et al., J. Neurol. Sci.* 160: S97-S105 (1998), dosis usadas en Helgren *et al., J. Neurosci.* 17(1): 372-82 (1997)).

El tratamiento del cáncer con agentes quimioterapéuticos puede asociarse con el daño y disfunción del sistema nervioso. Se ha descrito el uso anticuerpos monoclonales anti-trkC agonistas en modelos animales para neuropatía

sensorial inducida por cisplatino y piridoxina. Patente de EE.UU. N° 5.910.574; Publicación PCT N° WO 01/98361 y Poulsen *et al.*, *J. Soc. Neuroscience, Abstracts* 27, 1, 2001, 356. Sin embargo, la patología o los síntomas de las neuropatías inducidas por quimioterapia varían con respecto al agente quimioterapéutico usado en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, el cisplatino y la piridoxina tienen síntomas diferentes y, probablemente, mecanismo de

5 daño nervioso diferente al del taxol, aunque los tres agentes inducen neuropatías. Por ejemplo, el cis-platino es un agente de formación de aductos de ADN, que causa entrecruzamientos mono- y bicatenarios en el ADN. Quasthoff (2002) *J. Neurology* 249: 9-17. Por el contrario, el taxol funciona para evitar la despolimerización de microtúbulos, dando como resultado agregación de microtúbulos intracelulares. Por ejemplo, la neuropatía en individuos tratados con taxol se asocia con debilidad y otros síntomas agudos y el tratamiento con taxol afecta todas las modalidades

10 sensoriales, incluyendo fibras mielinizadas gruesas que conducen la vibración y confieren percepción y sentido de la posición. La caracterización electrofisiológica en modelos humanos y animales que tienen neuropatía inducida por taxol revelan un efecto agudo sobre la función sensorial (por ejemplo, amplitud del potencial de acción del compuesto disminuida) y velocidad de conducción sensorial nerviosa disminuida. Véase Quasthoff, anteriormente; Cliffer *et al.*, *Ann. Neurol.* (1998) 43: 46-55. Por el contrario, raramente se observa debilidad en las neuropatías inducidas por

15 cis-platino y piridoxina. La neuropatía inducida por cis-platino da como resultado velocidad de conducción nerviosa sensorial disminuida, pero la amplitud del potencial de acción sensorial del compuesto cambia poco. El tratamiento con piridoxina tiene como resultado una amplitud del potencial de acción sensorial del compuesto disminuida. Véase Quasthoff, anteriormente; Publicación PCT N° WO 01/98361. Por tanto, las neuropatías causadas por piridoxina y cis-platino presentan síntomas diferentes a los causados por taxol.

20 Existe una gran necesidad de tratamiento terapéutico nuevo para neuropatía sensorial inducida por taxol.

Descripción de la invención

25 La presente invención se basa en el descubrimiento de que los anticuerpos anti-trkC agonistas tratan neuropatía sensorial presente en individuos tratados con taxol. La neuropatía sensorial inducida por taxol se refiere a un trastorno neurológico asociado con o presente en un individuo a continuación de la administración del agente, taxol o taxanos relacionados. Una neuropatía sensorial inducida por taxol afecta a los nervios periféricos y se manifiesta más frecuentemente como una disfunción o una combinación de disfunciones sensoriales, sensoriomotoras o autonómicas,

30 que incluyen degeneración u otras disfunciones de las neuronas sensoriales periféricas de fibras gruesas. Por tanto, la presente invención abarca métodos para tratar, prevenir, retrasar el desarrollo de un síntoma de, aumentar la velocidad de recuperación a partir de y/o paliar neuropatía sensorial inducida por taxol usando anticuerpos anti-trkC agonistas.

35 Por consiguiente, la invención proporciona un anticuerpo agonista anti-trkC, para tratar una neuropatía sensorial inducida por taxano en un individuo. Un anticuerpo agonista anti-trkC se puede usar para retrasar el desarrollo de un síntoma asociado con una neuropatía sensorial inducida por taxol en un individuo. Un anticuerpo agonista anti-trkC se puede usar para aliviar un síntoma de una neuropatía sensorial inducida por taxol en un individuo. Un anticuerpo agonista anti-trkC se puede usar para revertir una neuropatía sensorial inducida por taxol preexistente y/o aumentar la

40 velocidad de recuperación de una neuropatía sensorial inducida por taxol preexistente. Un anticuerpo agonista anti-trkC se puede usar para mejorar el mantenimiento y/o regeneración de neuronas periféricas en un individuo que tenga una neuropatía sensorial inducida por taxol.

45 Un anticuerpo agonista anti-trkC se puede usar también para tratar a un individuo con cáncer junto con taxol. El cáncer puede ser uno cualquiera o más de: cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, sarcoma de Kaposi, cáncer de próstata, cánceres de cabeza y cuello y malignidades hematológicas.

Los anticuerpos anti-trkC agonistas se conocen en la técnica. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-trkC agonista se une a trkC humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-trkC agonista se une específicamente a

50 trkC humano. El anticuerpo anti-trkC agonista se puede unir también a trkC humano y de roedor. El anticuerpo anti-trkC agonista puede ser un anticuerpo humano (tal como anticuerpo 6,4,1 (Publicación PCT N° WO 01/98361)) o puede ser un anticuerpo humanizado (incluyendo el anticuerpo monoclonal humanizado 2256). En otra realización, el anticuerpo anti-trkC agonista es el anticuerpo humanizado A5, como se describe en este documento. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-trkC agonista comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena

55 pesada mostrada en la Tabla 1 (SEC. ID. N°:1) y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera mostrada en la Tabla 2 (SEC. ID. N°:2). En otras realizaciones, el anticuerpo agonista anti-trkC comprende una o más CDR del anticuerpo A5 (tales como una, dos, tres, cuatro cinco o, en algunas realizaciones, las seis CDR de A5). La identificación de CDR se encuentra dentro de la especialidad de la técnica. En algunas realizaciones, las CDR comprenden las CDR Kabat. En otras realizaciones, las CDR son las CDR Chotia. En otras realizaciones, las CDR

60 comprenden las CDR, tanto Kabat como Chotia. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena ligera que está codificada por un polinucleótido que se produce por una célula hospedadora con un número de depósito de ATCC N° PTA-5682. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada que está codificada por un polinucleótido que se produce por una célula hospedadora con un número de depósito ATCC N° PTA-5683. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende (a) una cadena ligera que está codificada por un polinucleótido que se produce por una célula hospedadora con un número de depósito de ATCC N° PTA-5682 y (b) una cadena pesada que está codificada por un polinucleótido que se produce por una célula hospedadora con un número de depósito ATCC N°

65 PTA-5683. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una o más CDR codificadas por (a) un polinucleótido que se produce por una célula hospedadora con un número de depósito ATCC N° PTA-5682 y/o (b) una cadena pesada

que está codificada por un polinucleótido que se produce por una célula hospedadora con un número de depósito de ATCC N° PTA-5683.

El anticuerpo puede unir esencialmente el mismo epítipo trkC que un anticuerpo seleccionado de uno cualquiera o más de los siguientes: 6,1,2, 6,4,1, 2345, 2349, 2,5,1, 2344, 2248, 2250, 2253 y 2256. Véase la Publicación PCT N° WO01/98361. El anticuerpo puede comprender una región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte, por ejemplo, que no desencadena una lisis mediada por complemento o que no estimula citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC). En otras realizaciones, la región constante se modifica como se describe en Eur. J. Immunol. (1999) 29: 2613-2624; Solicitud PCT N° PCT/GB99/01441 y/o en la Solicitud de Patente de RU N° 9809951,8.

El anticuerpo también puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento de anticuerpo seleccionado de uno o más de los siguientes: Fab, Fab', F(ab')₂, fragmentos F_v, diacuerpos, moléculas de anticuerpo de cadena única y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo y una molécula F_v de cadena única (scF_v). El anticuerpo también puede ser quimérico y puede ser biespecífico.

El anticuerpo anti-trkC agonista se puede administrar antes de, durante o después de la administración de taxol y/o se puede administrar antes de iniciar el ciclo de terapia con taxol; durante un ciclo de terapia con taxol y/o después del cese de un ciclo de terapia con taxol. Se puede administrar antes de la aparición de neuropatía.

La administración de un anticuerpo anti-trkC agonista puede ser por cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo uno o más de los siguientes medios: por vía intravenosa, subcutánea, vía inhalación, por vía intraarterial, intramuscular, intracardiaca, intraventricular, intratecal, intraespinal e intraperitoneal. La administración puede ser sistémica (por ejemplo, por vía intravenosa) o localizada. La administración puede ser aguda y/o crónica.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden un anticuerpo anti-trkC agonista para uso en el tratamiento de neuropatía sensorial inducida por taxano.

Cualquiera de estas composiciones y equipos descritos pueden servir para cualquier uso descrito en este documento en el contexto de uso como medicamento y/o para preparación de un medicamento.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: es un gráfico que muestra que NT3, pero no anticuerpos anti-trkC agonistas, causó extensión axónica de neuronas sensoriales adultas. Cultivos de neuronas de ganglio de la raíz dorsal (DRG) de rata adulta se cultivaron en presencia o ausencia de diversas concentraciones de NT-3 o anticuerpo monoclonal de ratón agonista anti-trkC 2256. Véase la Publicación PCT N° WO 01/98361. Después de cultivo durante 48 horas, los cultivos se fijaron y tiñeron con anticuerpos RT97 y la extensión neurítica se evaluó en neuronas RT97+. El tratamiento con NT-3 causó un aumento espectacular en la extensión neurítica, mientras que el tratamiento con anticuerpo agonista anti-trkC no dio lugar a extensión significativa.

Figura 2: es un gráfico que muestra supervivencia de neuronas sensoriales trigéminas de rata E12 en presencia de NT3 o de anticuerpo anti-trkC agonista 2256. Para cuantificar el número de neuronas supervivientes en diferentes condiciones experimentales se realizó el recuento del número total de neuronas 4-6 horas después de sembrar y de nuevo después de 24 y 48 horas. El número de neuronas a 24 y 48 horas se expresa como un porcentaje del recuento a las 6 horas.

Figuras 3A-3C: son gráficos que muestran el desarrollo y la dependencia de dosis de neuropatía sensorial inducida por taxol, medidos por registro electrofisiológico en el nervio caudal de rata. Las ratas se trataron mediante infusión lenta IV con taxol a 12 ó 18 mg/kg o con control (vehículo) los días 1 y 4. El registro electrofisiológico se realizó los días 0, 14 y 28 como se describe en este documento.

Figuras 4A-4C: son gráficos que muestran desarrollo y dependencia de dosis de neuropatía sensorial inducida por taxol, medidos por registro electrofisiológico en el nervio ciático de rata. Las ratas se trataron mediante infusión lenta IV con taxol a 12 ó 18 mg/kg o con vehículo los días 1 y 4. El registro electrofisiológico se realizó los días 0, 14 y 28 como se describe en este documento.

Figura 5: es un gráfico que muestra que el tratamiento con un anticuerpo agonista anti-trkC mejoraba la neuropatía sensorial inducida por tratamiento con taxol en un modelo de rata. Las ratas se trataron con anticuerpo monoclonal de ratón 2256 intravenoso (IV) a 5 mg/kg los días 0 y día 7. El taxol se administró por infusión lenta IV dos veces, los días 1 y 4, a una dosis de 15 mg/kg. El registro electrofisiológico se llevó a cabo sobre el nervio caudal el día 14. Los datos se expresan como la proporción de la amplitud de potencial de acción sensorial del compuesto a la amplitud de potencial de acción motor del compuesto.

Figura 6: es un gráfico que muestra que el tratamiento con un anticuerpo agonista anti-trkC mejoraba la neuropatía sensorial inducida por el tratamiento con taxol en un modelo de ratón. Los ratones se trataron con anticuerpo monoclonal de ratón 2256 por vía subcutánea (administrado bajo la nuca) a 2 mg/kg los días 0 y día 7. El taxol se administró

por vía intraperitoneal (IP) los días 1, 3 y 5, a una dosis total de 300 mg/m², dividida uniformemente en las tres dosis. La función sensorial del nervio caudal se evaluó por registro electrofisiológico realizado el día 14 como se describe en este documento. Los resultados se muestran como la proporción de amplitud del potencial de acción sensorial del compuesto a la amplitud del potencial de acción motor del compuesto.

Figura 7: es un gráfico que muestra dolor neuropático (alodinia mecánica) en respuesta a estimulación mecánica evaluado en diversos momentos antes y después del tratamiento con taxol. La alodinia mecánica se desarrolló en animales tratados con taxol. Las ratas tratadas únicamente con taxol desarrollaron un descenso significativo y duradero en el umbral de respuesta de los animales, indicando alodinia ($p < 0,0001$ usando análisis de 2 vías ANOVA). El cotratamiento de animales con taxol y anticuerpo anti-trkC agonista disminuyó la profundidad de alodinia observada con animales tratados con taxol y aumentó espectacularmente la velocidad de recuperación de la alodinia ($p < 0,05$ usando análisis de 2 vías ANOVA).

Modos de realizar la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que los anticuerpos anti-trkC agonistas tratan la neuropatía sensorial presente en individuos tratados con taxol. La neuropatía sensorial inducida por taxol se refiere a un trastorno neurológico que afecta a las neuronas sensoriales asociado con o presente en un individuo (incluyendo un mamífero, tanto humano como no humano) después de la administración del agente taxol o taxanos relacionados. La presente invención abarca métodos y composiciones útiles para tratar, prevenir o retrasar el desarrollo de un síntoma, aumentar la velocidad de recuperación y/o paliar la neuropatía sensorial inducida por taxol usando anticuerpos anti-trkC agonistas.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención se refiere a tratar una neuropatía sensorial inducida por taxol en un individuo que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-trkC agonista. Los métodos para retrasar el desarrollo de un síntoma asociado con una neuropatía sensorial inducida por taxol en un individuo pueden comprender el tratamiento de ese individuo con una cantidad eficaz de anticuerpo anti-trkC agonista. Los métodos para aliviar un síntoma de una neuropatía sensorial inducida por taxol en un individuo pueden comprender administrar una cantidad eficaz de anticuerpo anti-trkC agonista. Los métodos para revertir y/o aumentar la velocidad de recuperación de una neuropatía sensorial inducida por taxol preexistente puede ser por tratamiento con una cantidad eficaz de anticuerpo anti-trkC agonista. El mantenimiento y/o regeneración de neuronas periféricas en un individuo que tenga neuropatía sensorial inducida por taxol se pueden potenciar. El tratamiento de cáncer con taxol se puede potenciar como se describe en este documento, por administración de taxol junto con un anticuerpo anti-trkC agonista.

El anticuerpo anti-trkC agonista se puede administrar antes, durante y/o después de la administración de taxol. Alternativamente, el anticuerpo se puede administrar junto con taxol. El anticuerpo anti-trkC agonista se puede administrar antes, durante y/o después de la administración de cualquier otra modalidad terapéutica para la neuropatía sensorial. El anticuerpo se puede administrar junto con cualquier otra modalidad terapéutica para la neuropatía sensorial.

La administración de un anticuerpo anti-trkC agonista puede ser por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo uno o más de los siguientes medios: por vía intravenosa, subcutánea, vía inhalación, por vía intraarterial, intramuscular, intracardiaca, intraventricular, intratecal e intraperitoneal. La administración puede ser sistémica (por ejemplo, por vía intravenosa) o localizada. La administración puede ser aguda o crónica.

En otro aspecto, las composiciones y equipos que comprenden un anticuerpo anti-trkC agonista se pueden usar en cualquiera de los métodos descritos en este documento.

Cualquiera de las composiciones descritas se puede usar como se describe en este documento en el contexto de uso como medicamento y/o de uso para preparar un medicamento.

Técnicas Generales

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que se encuentran dentro de la especialidad de la técnica. Tales técnicas se explican con todo detalle en la bibliografía, tales como, *Molecular: Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (Sambrook *et al.*, 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture*: (J. P. Mather y P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths y D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller y M. P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel *et al.*, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction* (Mullis *et al.*, eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan *et al.*, eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway y P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practical approach* (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: a practical approach* (P. Sheperd y

C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow y D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995) y *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V. T. DeVita *et al.*, eds., J. B. Lippincott Company 1993).

Definiciones

Un “anticuerpo” (usado de manera intercambiable en la forma plural) es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en este documento, el término abarca no sólo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), de cadena única (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos lineales diacuerpos, anticuerpos de cadena única, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad necesaria. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM y el anticuerpo no necesita ser de ninguna clase particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden atribuirse a clases distintas. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgG, IgD, IgE, e IgM y varias de estas pueden dividirse, a su vez, en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, gamma, delta, épsilon y mu, respectivamente. También hay dos clases de cadena ligera, designadas kappa y lambda. Se conocen las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas.

Un “anticuerpo monoclonal” se refiere a una población de anticuerpos homogénea en la que el anticuerpo monoclonal está comprendido de aminoácidos (de origen natural y de origen artificial) que están implicados en la unión selectiva de un antígeno. Una población de anticuerpos monoclonales es altamente específica, dirigiéndose a un sitio antigénico único. La expresión “anticuerpo monoclonal” abarca no sólo anticuerpos monoclonales intactos y anticuerpos monoclonales de longitud completa, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), de cadena única (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales quiméricos y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad necesaria y la capacidad de unirse a un antígeno. No se tiene por objeto limitarse en lo que respecta a la fuente del anticuerpo o a la manera en que se fabrica (por ejemplo, por hibridoma, selección de fago, expresión recombinante, animales transgénicos, etc.).

Anticuerpos “humanizados” se refiere a una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno que se obtiene, básicamente a partir de una inmunoglobulina de especies no-humanas y la estructura de inmunoglobulina restante de la molécula sobre la base de la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión del antígeno puede comprender o dominios variables completos fusionados con dominios constantes o sólo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) insertadas en regiones flanqueantes apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión de antígeno pueden ser de tipo silvestre o modificados por una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, modificados para parecerse a inmunoglobulinas humanas más estrechamente. Algunas formas de anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR de los anticuerpos de ratón). Otras formas de anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) que están alteradas con respecto al anticuerpo original.

Como se usa en este documento, “anticuerpo humano” se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha fabricado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos conocidas en la técnica o descritas en este documento. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de cadena pesada humano o al menos un polipéptido de cadena ligera humano. Un ejemplo de esto es un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena ligera murinos y de cadena pesada humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en el campo. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona de una biblioteca de fagos, donde esa biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan *et al.*, 1996, *Nature Biotechnology* 14: 309-314; Sheets *et al.*, 1998, *PNAS*, (USA) 95: 6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227: 381; Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.*, 222: 581). Los anticuerpos humanos se pueden preparar también introduciendo un loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcialmente o completamente. Esta aproximación se describe en las Patentes de EE.UU. N° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425 y 5.661.016. Alternativamente, el anticuerpo humano se puede preparar inmortalizando linfocitos B humanos que producen un anticuerpo que se dirige directamente contra un antígeno diana (tales linfocitos B se pueden recuperar de un individuo o se pueden haber inmunizado *in vitro*). Véase, por ejemplo, Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, 1991, *J. Immunol.*, 147 (1): 86-95 y la Patente de EE.UU. N° 5.750.373.

“Anticuerpos quiméricos” se refiere a los anticuerpos en los que una parte de cada una de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera es homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos a partir

de una especie particular o que pertenecen a una clase particular, mientras que el segmento restante de las cadenas es homólogo a secuencias correspondientes en otro. Típicamente, en estos anticuerpos quiméricos, la región variable de las cadenas tanto ligera como pesada mimetiza las regiones variables de anticuerpos obtenidos a partir de una especie de mamíferos, mientras que las partes constantes son homólogas a las secuencias en anticuerpos obtenidos a partir de otra. Una ventaja clara de dichas formas quiméricas es que, por ejemplo, las regiones variables se pueden obtener de manera práctica a partir de fuentes conocidas actualmente que usan hibridomas o células B de organismos hospedadores no humanos disponibles fácilmente en combinación con regiones constantes obtenidas a partir de, por ejemplo, preparaciones celulares humanas. Mientras que la región variable tiene la ventaja de prepararse fácilmente y la especificidad no se ve afectada por su fuente, siendo la región constante humana, es menos probable que provoque una respuesta inmune en un sujeto humano cuando se inyecten los anticuerpos que si la región constante fuese de una fuente no-humana. Sin embargo, la definición no se limita a este ejemplo particular.

Un epítipo que “se une específicamente” o “se une preferiblemente” (usado de manera intercambiable en este documento) a un anticuerpo o un polipéptido es una expresión bien entendida en la técnica y los métodos para determinar tal unión específica o preferencial también se conocen en la técnica. Se dice que una molécula muestra “unión específica” o “unión preferencial” si reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad a una célula o sustancia particular que como lo hace con células o sustancias alternativas. Un anticuerpo “se une específicamente” o “se une preferiblemente” a una diana si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que como se une a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente o preferiblemente a un epítipo trkC es un anticuerpo que se une a este epítipo trkC con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que como se une a otros epítopos trkC o epítopos no trkC. También se aprecia leyendo esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o resto o epítipo) que se une específicamente o preferiblemente a una primera diana puede o no unirse específicamente o preferiblemente a una segunda diana. Como tal, “unión específica” o “unión preferencial” no requiere necesariamente (aunque puede incluirla) unión exclusiva. Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a unión significa unión preferencial.

Una “región Fc funcional” posee al menos una función efectora de una región Fc de secuencia nativa. Las “funciones efectoras” ilustrativas incluyen unión C1q; citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); unión de receptor Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación a la baja de los receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR), etc. Tales funciones efectoras requieren, generalmente, que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y se pueden evaluar usando diversos ensayos conocidos en la técnica para evaluar dichas funciones efectoras de anticuerpos.

Una “región Fc de secuencia nativa” comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Una “región Fc variante” comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa debido a, al menos, una modificación de aminoácido y, sin embargo, conserva al menos una función efectora de la región Fc de secuencia nativa. Preferiblemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia nativa o la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos y preferiblemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante en este documento tendrá, preferiblemente, una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 80% con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental y más preferiblemente, una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 90% con las mismas y más preferiblemente, una identidad de secuencia de al menos el 95% con las mismas.

Como se usa en este documento “citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo” y “ADCC” se refieren a una reacción mediada por célula en la que células citotóxicas inespecíficas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen anticuerpo unido sobre una célula diana y posteriormente causan lisis de la célula diana. La actividad ADCC de una molécula de interés se puede evaluar usando un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el que se describe en la Patente de EE.UU. N° 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares (PBMC) y células NK de sangre periférica. Alternativamente o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el que se describe en Clynes *et al.*, 1998, *PNAS*, (USA) 95: 652-656.

Un “anticuerpo anti-trkC agonista” (denominado de manera intercambiable “anticuerpo agonista anti-trkC”) se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse y activar a un receptor trkC y/o ruta o rutas cadena abajo mediadas por la función de señalización de trkC. Por ejemplo, el anticuerpo agonista se puede unir al dominio extracelular de un receptor trkC y causar de ese modo dimerización del receptor, lo que da como resultado la activación del dominio quinasa catalítico intracelular. Por consiguiente, esto puede dar como resultado estimulación del crecimiento y/o diferenciación de células que expresan el receptor *in vitro* y/o *in vivo*. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-trkC agonista se une a trkC y activa una actividad biológica de trkC. En algunas realizaciones, un anticuerpo agonista útil en los métodos de la invención reconoce el dominio V y/o el dominio IV de trkC. Véase Urfer *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273: 5829-5840 (1998).

Una “región variable” de un anticuerpo se refiere a la región variable de una cadena ligera del anticuerpo o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, sola o en combinación. Las regiones variables de la cadena pesada y ligera consisten cada una en cuatro regiones flanqueantes (FR) conectadas por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por las FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación de sitios de unión de antígeno de anticuerpos. Existen al menos dos técnicas para determinar CDR: (1) un enfoque basado en variabilidad de secuencia de especies cruzadas (es decir, Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (5ª ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)) y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani *et al* (1997) *J. Molec. Biol.* 273: 927-948)). Como se usa en este documento, una CDR puede referirse a CDR definidas por cualquiera de los enfoques o por una combinación de ambos enfoques.

Una “región constante” de un anticuerpo se refiere a la región constante de la cadena ligera del anticuerpo o la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, sola o en combinación.

Como se usa en este documento, “receptor Fc” y “FcR” describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, que incluyen variantes alélicas y formas alternativamente empalmadas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor activador”) y FcγRIIB (un “receptor inhibidor”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de las mismas. En Ravetch y Kinet, 1991, *Ann. Rev. Immunol.*, 9: 457-92; Capel *et al.*, 1994, *Immunomethods*, 4: 25-34 y de Haas *et al.*, 1995, *J. Lab. Clin. Med.*, 126: 330-41 existe una revisión de FcR. “FcR” también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, 1976, *J. Immunol.*, 117: 587 y Kim *et al.*, 1994, *J. Immunol.*, 24: 249).

“Citotoxicidad dependiente de complemento” y “CDC” se refieren a la lisis de una diana en presencia del complemento. La ruta de activación del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) en complejo con un anticuerpo afín. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 202: 163 (1996).

Como se usa en este documento, anticuerpo “de afinidad madurada” significa un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno en comparación con un anticuerpo parental que no posee la alteración o alteraciones. En algunas realizaciones, anticuerpos de afinidad madurada tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos de afinidad madurada se producen por procedimientos conocidos en la técnica (Marks *et al.*, 1992, *BioTechnology* 10: 779-783; Barbas *et al.*, 1994, *Proc Nat. Acad. Sci.*, USA 91: 3809-3813; Schier *et al.*, 1995, *Gene*, 169: 147-155; Yelton *et al.*, 1995, *J. Immunol.*, 155: 1994-2004; Jackson *et al.*, 1995, *J. Immunol.*, 154(7): 3310-9; Hawkins *et al.*, 1992, *J. Mol. Biol.* 226: 889-896).

Como se usa en este documento, “trkC” se refiere al polipéptido receptor trkC, un miembro de la superfamilia tirosina quinasa. TrkC abarca el receptor trkC nativo de cualquier especie de mamífero, que incluye, aunque sin limitación, seres humanos, caninos, felinos, bovinos, equinos, primates y roedores (incluyendo ratón y rata). El dominio extracelular de trkC nativo de longitud completa se ha definido con referencia a estructuras homólogas o de otra manera similares identificadas en diversas proteínas diferentes. Los dominios se han denominado comenzando por el extremo N-terminal del receptor trkC maduro como: 1) un primer dominio rico en cisteína que se prolonga desde el aminoácido 1 hasta el aminoácido 48; 2) un dominio rico en leucina que se prolonga desde el aminoácido 49 hasta el aminoácido 120; 3) un segundo dominio rico en cisteína que se prolonga desde el aminoácido 121 hasta el aminoácido 177; 4) un primer dominio similar a inmunoglobulina que se prolonga desde el aminoácido 196 hasta el aminoácido 257 y 5) un segundo dominio similar a inmunoglobulina que se prolonga desde el aminoácido 288 hasta el aminoácido 351. Véase, por ejemplo, Publicación PCT N° WO 0198361. La estructura del dominio del receptor trkC humano se ha denominado también como referencia a una estructura cristalina como sigue: dominio 1 desde el aminoácido 1 al aminoácido 47; dominio 2 desde el aminoácido 48 al aminoácido 130; dominio 3 desde el aminoácido 131 al aminoácido 177; dominio 4 desde el aminoácido 178 al aminoácido 165 y dominio 5 desde el aminoácido 166 al aminoácido 381. Véase, por ejemplo, la Publicación PCT N° WO 0198361; Urfer *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273: 5829-5840 (1998). También se incluyen las variantes de trkC, cuyos ejemplos incluyen, aunque sin limitación, variantes sin un dominio quinasa (Shelton, *et al.*, *J. Neurosci.* 15(1): 477-491 (1995)) y variantes con un dominio quinasa modificado (Shelton, *et al.*, *J. Neurosci.* 15(1): 477-491 (1995)).

“Actividad biológica”, cuando se usa junto con los anticuerpos anti-trkC agonistas de la presente invención, se refiere en general a que tiene la capacidad de unirse y activar al receptor trkC tirosina quinasa y/o una ruta cadena abajo mediada por la función de señalización de trkC. Como se usa en este documento, “actividad biológica” abarca una o más funciones efectoras en común con las inducidas por acción de NT-3, el ligando nativo de trkC, sobre una célula que expresa trkC. Una “actividad biológica” de trkC puede abarcar también ruta o rutas de señalización cadena abajo o funciones efectoras que son diferentes a las inducidas por acción de NT-3. Sin limitación, las actividades biológicas incluyen una cualquiera o más de las siguientes: capacidad de unir y activar trkC; la capacidad de promover la dimerización del receptor trkC; la capacidad de promover el desarrollo, supervivencia, función, mantenimiento y/o regeneración de células (incluyendo células dañadas), en particular neuronas *in vitro* o *in vivo*, incluyendo neuronas

periféricas (simpáticas, sensoriales y entéricas) y centrales (cerebrales y de médula espinal) y células no neuronales, por ejemplo, leucocitos de sangre periférica. Una actividad biológica preferida particular es la capacidad de tratar (incluyendo la prevención de) uno o más síntomas de neuropatía sensorial inducida por taxol y/o reparar y/o mejorar la función de una célula nerviosa sensorial dañada por taxol. Las neuronas dañadas ilustrativas incluyen cualquiera de las neuronas sensoriales (que incluyen neuronas sensoriales de fibras gruesas), simpáticas o entéricas, por ejemplo, neuronas del ganglio de la raíz dorsal, neuronas del ganglio craneal y neuronas centrales, por ejemplo, neuronas de la médula espinal.

Una “neuropatía sensorial inducida por taxol” es un trastorno neurológico que se produce a partir del tratamiento con el agente quimioterapéutico taxol u otros taxanos. Como se usa en este documento, una “neuropatía sensorial inducida por taxol” se refiere e incluye uno cualquiera o más de los síntomas asociados con este trastorno neurológico. La neuropatía sensorial inducida por taxol puede afectar a neuronas sensoriales primarias de diversos tipos, neuronas autonómicas que comprenden neuronas simpáticas y neuronas de sensación especializada, tales como gustativas, olfativas, acústicas y vestibulares. Como se usa en este documento, una “neuropatía sensorial inducida por taxol” se refiere a un trastorno neurológico que afecta a las neuronas sensoriales asociado con o presente en un individuo durante o seguido de la administración del agente taxol o taxanos relacionados. En algunas realizaciones, “neuropatía sensorial inducida por taxol” se caracteriza por degeneración de neuronas sensoriales periféricas (que incluyen neuronas sensoriales de fibras gruesas). En algunas realizaciones, “neuropatía sensorial inducida por taxol” se caracteriza por cualquiera de los siguientes: parestesia simétrica distal, palhipoestesia, pérdida del sentido de la posición articular, disestesia dolorosa, signo de Lhermitte, dolor, parestia distal y/o proximal progresiva, mialgia, íleo paralítico, hipotensión ortostática y arritmia y degeneración de neuronas sensoriales periféricas (incluyendo neuronas sensoriales de fibras gruesas). Esto se puede determinar mediante un examen neurológico convencional, una entrevista con el paciente o un ensayo cuantitativo más especializado. Estos ensayos cuantitativos más especializados pueden incluir, aunque sin limitación, determinación de la velocidad de conducción de las neuronas afectadas por, por ejemplo, uso de microneurografía u otro ensayo electrofisiológico; determinación cuantitativa y/o cualitativa de la capacidad de sentir estimulación cutánea, que incluye, aunque sin limitación, calor, tacto suave, vibración o discriminación entre dos puntos; ensayos de audición; ensayos especializados de equilibrio; ensayos especializados de propiocepción o sentido cinestésico; ensayos de función autonómica, que incluyen, aunque sin limitación, ensayo de control de presión sanguínea y ensayos de respuesta de frecuencia cardíaca a diversos estímulos fisiológicos y farmacológicos. Estos ensayos pueden incluir también ensayos de habilidad motriz.

Como se usa en este documento, “taxol” se refiere a paclitaxel (TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), docetaxel (TAXOTERE[®], Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia) y otros taxanos. El taxol (incluyendo otros taxanos) se puede administrar o solo o en combinación con otros fármacos. El taxol se aprueba y se usa comúnmente para tratar diversas malignidades, que incluyen sarcoma de Kaposi y las de mama, ovario y pulmón. El taxol también se usa para tratar otras malignidades de la próstata, cabeza y cuello, así como diversas malignidades hematológicas. El taxol también se administra durante trasplantes de médula ósea.

Como se usa en este documento, “tratamiento” es un planteamiento para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los propósitos de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, aunque sin limitación, uno o más de los siguientes: alivio de uno o más síntomas asociados con neuropatía sensorial inducida por taxol (por ejemplo, cualquiera de parestesia simétrica distal, palhipoestesia, pérdida del sentido de la posición articular, pérdida del sentido de vibración, pérdida de discriminación entre dos puntos, pérdida de tacto fino, disestesia incómoda, signo de Lhermitte, dolor (incluyendo alodinia y/o hiperalgia), degeneración de nervio periférico (incluyendo neurona sensorial); disminución de alcance de una neuropatía sensorial inducida por taxol; estado estabilizado (es decir, que no empeora) de una neuropatía sensorial inducida por taxol; prevención de aparición o reaparición de una neuropatía sensorial inducida por taxol; retraso del desarrollo de una neuropatía sensorial inducida por taxol; retraso o ralentización de progresión de una neuropatía sensorial inducida por taxol; mejora de una neuropatía sensorial inducida por taxol y remisión (parcial o total) de una neuropatía sensorial inducida por taxol; aumento de la tasa de recuperación de una neuropatía sensorial inducida por taxol; reducción de frecuencia de una neuropatía sensorial inducida por taxol y/o síntomas asociados con una neuropatía sensorial inducida por taxol.

“Paliar” una neuropatía sensorial inducida por taxol o uno o más síntomas de una neuropatía sensorial inducida por taxol se refiere a disminuir el alcance y/o curso de tiempo de manifestaciones clínicas indeseadas de una neuropatía sensorial inducida por taxol en un individuo o población de individuos tratados con un anticuerpo anti-trkC agonista de acuerdo con la invención.

“Reducir la gravedad de un síntoma” o “mejorar un síntoma” de una neuropatía sensorial inducida por taxol se refiere a una disminución y/o mejora de uno o más síntomas de una neuropatía sensorial inducida por taxol en comparación con no administrar un anticuerpo anti-trkC agonista. “Reducir la gravedad” también incluye acortar o reducir la duración de un síntoma. Anteriormente se han descrito síntomas de una neuropatía sensorial inducida por taxol tales como parestesia simétrica distal, palhipoestesia, pérdida del sentido de la posición articular, pérdida del sentido de la vibración, pérdida de la discriminación entre dos puntos, pérdida de tacto fino, pérdida de equilibrio, pérdida u otra disfunción de la audición, disestesia incómoda, signo de Lhermitte y/o dolor (incluyendo alodinia y/o hiperalgia).

Como se usa en este documento “retrasar” el desarrollo de una neuropatía sensorial inducida por taxol se refiere a aplazar, obstaculizar, ralentizar, retardar, estabilizar y/o posponer el desarrollo de la neuropatía sensorial inducida

por taxol. Este retraso puede ser de períodos de tiempo variables, dependiendo de la historia de la neuropatía sensorial inducida por taxol y/o del individuo que se esté tratando. Como es evidente para un especialista en la técnica, un retraso suficiente o significativo puede, en efecto, abarcar prevención, en lo referente a que el individuo no desarrolle la neuropatía sensorial inducida por taxol. Un método que “retrasa” el desarrollo de una neuropatía sensorial inducida por taxol es un método que reduce la probabilidad de desarrollo de la neuropatía sensorial en un periodo de tiempo dado y/o reduce el alcance de la neuropatía sensorial en un periodo de tiempo dado, cuando se compara con no utilizar el método. Dichas comparaciones se basan típicamente en estudios clínicos, usando un número de sujetos estadísticamente significativo.

El “desarrollo” de una neuropatía sensorial inducida por taxol se refiere a la aparición y/o progresión de una neuropatía sensorial inducida por taxol en un individuo. El desarrollo de una neuropatía sensorial inducida por taxol se puede detectar usando técnicas clínicas convencionales como se ha descrito en este documento. Sin embargo, desarrollo también se refiere a progresión de la enfermedad que puede ser inicialmente indetectable. Para los propósitos de esta invención, progresión se refiere al curso biológico de la patología, en este caso, determinada mediante examen neurológico convencional o entrevista del paciente o se puede determinar mediante ensayos cuantitativos más especializados. Estos ensayos cuantitativos más especializados pueden incluir, aunque sin limitación, determinación de la velocidad de conducción de las neuronas afectadas por medios que incluyen microneurografía, determinación cuantitativa de la capacidad de sentir estimulación cutánea, incluyendo, aunque sin limitación, calor, tacto suave, vibración o discriminación entre dos puntos, ensayos de audición, ensayos especializados de equilibrio, ensayos de reflejos, ensayos especializados de propiocepción o sentido cinestésico, ensayos de función autonómica, que incluyen, aunque sin limitación, ensayo de control de presión sanguínea, ensayos de respuesta de frecuencia cardíaca a diversos estímulos fisiológicos y farmacológicos. Estos ensayos pueden incluir también ensayos de habilidad motriz. “Desarrollo” incluye aparición, reaparición y comienzo. Como se usa en este documento, “comienzo” o “aparición” de una neuropatía sensorial inducida por taxol incluye comienzo inicial y/o reaparición.

Como se usa en este documento, un individuo “en situación de riesgo” es un individuo que está en situación de riesgo del desarrollo de neuropatía sensorial inducida por taxol. Un individuo “en situación de riesgo” puede o no tener la enfermedad detectable y puede o no haber presentado enfermedad detectable antes de los métodos de tratamiento descritos en este documento. “En situación de riesgo” indica que un individuo tiene uno o más de los denominados factores de riesgo, que son parámetros medibles que se correlacionan con el desarrollo de neuropatía sensorial inducida por taxol. Un individuo que tenga uno o más de estos factores de riesgo tiene una probabilidad más alta de desarrollar neuropatía sensorial inducida por taxol que un individuo sin este factor o estos factores de riesgo.

Una “cantidad eficaz” (en el contexto de neuropatía sensorial inducida por taxol) es una cantidad suficiente para lograr resultados clínicos beneficiosos o deseados que incluyen resultados clínicos o retrasar el comienzo de la enfermedad. Se puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones. Para los propósitos de esta invención, una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-trkC agonista descrita en este documento es una cantidad suficiente para mejorar, estabilizar, revertir, ralentizar y/o retrasar la progresión de o prevenir neuropatía sensorial inducida por taxol. Una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-trkC agonista también abarca una cantidad de un anticuerpo anti-trkC agonista suficiente para potenciar el tratamiento con taxol (efecto terapéutico) de cáncer (que puede, a su vez, significar que la dosis de taxol se aumente y/o se observe algún otro efecto beneficioso tal como reducción de los efectos secundarios del tratamiento con taxol), como se ha descrito en este documento. Como se aprecia en la técnica, una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-trkC agonista puede variar, dependiendo de, entre otros, la historia del paciente así como otros factores tales como el tipo (y/o dosis) de un anticuerpo anti-trkC agonista usado.

Como se usa en este documento, administración “en conjunto” incluye administración simultánea y/o administración en momentos diferentes. Administración en conjunto abarca también administración como una coformulación (por ejemplo, un anticuerpo anti-trkC agonista y taxol están presentes en la misma composición) o administración como composiciones separadas. Como se usa en este documento, administración en conjunto pretende abarcar cualquier circunstancia en la que un anticuerpo anti-trkC agonista y taxol se administren a un individuo, lo que puede ocurrir simultáneamente y/o por separado. Como se ha tratado adicionalmente en este documento, se entiende que un anticuerpo anti-trkC agonista y taxol se pueden administrar en frecuencias de dosis o intervalos diferentes. Por ejemplo, un anticuerpo anti-trkC agonista se puede administrar semanalmente, mientras que el taxol se puede administrar menos frecuentemente. Se entiende que el anticuerpo anti-trkC agonista y el taxol se pueden administrar usando la misma vía de administración o vías de administración diferentes.

El tratamiento con taxol se “potencia” cuando un aspecto del tratamiento con taxol se mejora (en comparación con administrar taxol sin administrar el anticuerpo anti-trkC agonista). Por ejemplo, la presencia y/o intensidad de efectos secundarios indeseados (tales como neuropatía sensorial) se puede reducir y/o eliminar en presencia de un anticuerpo anti-trkC agonista en relación con la presencia y/o intensidad de tales efectos secundarios en ausencia de un anticuerpo anti-trkC agonista. Esta potenciación se indica por administración de un anticuerpo agonista anti-trkC y no pretende transmitir que una comparación de este tipo (administración de un anticuerpo agonista anti-trkC frente a la no administración) debe conducirse y probarse con respecto a cualquier individuo dado.

Un “individuo” es un vertebrado, preferiblemente un mamífero y más preferiblemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, aunque sin limitación, animales de granja, animales de deporte, mascotas, primates, caballos, vacas, gatos, perros y roedores (tales como ratones y ratas).

Como se usa en este documento, la forma singular de “uno” y “el” incluye referencias en plural a menos que se indique de otra manera. Por ejemplo, “un” anticuerpo incluye uno o más anticuerpos y “un síntoma” se refiere a uno o más síntomas.

Como se usa en este documento, “vector” significa una construcción, que es capaz de transferir y preferiblemente expresar, uno o más genes o secuencias de interés en una célula hospedadora. Los ejemplos de vectores incluyen, aunque sin limitación, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudo, plásmidos, cósmidos o vectores de fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónica, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas y determinadas células eucariotas, tales como células productoras.

Como se usa en este documento, “secuencia de control de expresión” se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Una secuencia de control de expresión puede ser un promotor, tal como un promotor constitutivo o inducible o un potenciador. La secuencia de control de expresión se encuentra unida operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos que se tiene que transcribir.

Como se usa en este documento, “ácido nucleico” o “polinucleótido” se refiere a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en una forma mono- o bicatenaria y a menos que se limite de otra manera, abarca análogos conocidos de nucleótidos naturales que hibridan a ácidos nucleicos de una forma similar a los nucleótidos de origen natural.

Como se usa en este documento, “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye cualquier material que, cuando se combina con un ingrediente activo, permite que el ingrediente conserve actividad biológica y no reaccione con el sistema inmune del sujeto. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitación, cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión aceite/agua y diversos tipos de agentes humectantes. Los diluyentes preferidos para administración por aerosol o parenteral son solución salina tamponada con fosfato o solución salina normal (0,9%).

Las composiciones que comprenden tales vehículos se formulan por métodos convencionales conocidos (Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª edición, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990 y *Remington, The Science and Practice of Pharmacy* 20ª Ed. Mack Publishing, 2000).

Como se usa en este documento, “adyuvante” incluye los adyuvantes usados comúnmente en la técnica para facilitar una respuesta inmune. Los ejemplos de adyuvantes incluyen, aunque sin limitación, péptido auxiliar; sales de aluminio tales como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio; Adyuvante Incompleto y Adyuvante Completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, MI); Adyuvante 65 Merck (Merck and Company, Inc., Rahway NJ); AS-2 (Smith-Kline Beecham); QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals); MPL o 3d-MPL (Corixa Corporation, Hamilton, MT); LEIF; sales de calcio, hierro o cinc; una suspensión insoluble de tirosina acilada; azúcares acilados; polisacáridos derivatizados catiónicamente o aniónicamente; polifosfacenos; microesferas biodegradables; lípido A monofosforilo y quil A; muramil tripéptido fosfatidil etanolamina o un complejo inmunoestimulante, incluyendo citoquinas (por ejemplo, GM-CSF o interleuquina-2, -7 o -12) y secuencias inmunoestimuladoras de ADN. En algunas realizaciones, tales como con el uso de una vacuna polinucleotídica, se puede proporcionar un adyuvante tal como un péptido auxiliar o citoquina vía un polinucleótido que codifique el adyuvante.

Usos de la invención

Con respecto a todos los métodos y usos descritos en este documento, la referencia a anticuerpos anti-trkC agonistas incluye también composiciones que comprenden uno o más de estos anticuerpos. Estas composiciones pueden comprender además excipientes adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyen tampones, que se conocen en la técnica.

Métodos para tratar neuropatía sensorial inducida por taxol usando anticuerpos anti-trkC agonistas

La presente invención abarca tratar, prevenir y retrasar el desarrollo de un síntoma de y/o paliar neuropatía sensorial inducida por taxol usando anticuerpos anti-trkC agonistas. Los métodos suponen administrar una cantidad eficaz de estos anticuerpos a un individuo que tenga la necesidad de los mismos (en este documento se describen diversas indicaciones y aspectos). Se puede administrar una cantidad eficaz de anticuerpo anti-trkC agonista con o sin otros agentes terapéuticos. En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano. Sin embargo, los métodos descritos son también se pueden aplicar al contexto veterinario (por ejemplo, mamíferos no humanos, tales como perros, gatos, vacas, caballos).

Los métodos de evaluación de neuropatía sensorial inducida por taxol y tratamiento de la misma se conocen en la técnica y se describen en este documento.

En un aspecto, la invención se refiere al tratamiento de una neuropatía sensorial inducida por taxol en un individuo que comprende administrar una cantidad eficaz de anticuerpo anti-trkC agonista. En otro aspecto, la invención se refiere a potenciar el mantenimiento y/o regeneración de neuronas periféricas en un individuo que tiene neuropatía sensorial inducida por taxol. El tratamiento del cáncer con taxol se puede potenciar como se describe en este documento, mediante administración de taxol junto con un anticuerpo anti-trkC agonista. El trasplante de médula ósea se puede

potenciar como se describe en este documento, por administración de taxol junto con un anticuerpo anti-trkC agonista. En algunas realizaciones, el individuo es un individuo en situación de riesgo para neuropatía sensorial inducida por taxol.

Como es evidente, se puede administrar anticuerpo anti-trkC agonista antes, durante o después de tratamiento con taxol o se puede administrar antes de empezar el ciclo de terapia con taxol; durante un ciclo de terapia con taxol y/o después del cese de un ciclo de terapia con taxol. La administración puede ser antes del inicio de la neuropatía. En algunas realizaciones, el individuo se está sometiendo a tratamiento con taxol. En otras realizaciones, el individuo se está sometiendo a tratamiento con taxol y otro agente (tal como cis-platino). En otras realizaciones, el individuo ha tenido tratamiento previo con taxol.

El taxol se aprueba y se usa comúnmente para tratar diversas malignidades, que incluyen sarcoma de Kaposi y las de mama, ovario y pulmón. El taxol también se usa para tratar otras malignidades, que incluyen las de próstata, cabeza y cuello y diversas malignidades hematológicas. El taxol también se administra durante trasplantes de médula ósea. Por consiguiente, en una realización de la invención, el individuo tratado con anticuerpo anti-trkC agonista tiene uno o más de: cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, sarcoma de Kaposi, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y/o cuello y malignidades hematológicas. En otra realización, el individuo tratado con anticuerpo anti-trkC agonista requiere o ha recibido un trasplante de médula ósea. En otra realización, el individuo tiene un indicio (tal como cáncer) que es tratable con taxol o se ha tratado con taxol.

Anticuerpos anti-trkC agonistas

Los usos de la invención implican usar anticuerpos anti-trkC agonistas que interaccionan con trkC de una manera que activan trkC. Un anticuerpo anti-trkC agonista debería mostrar una cualquiera o más de las siguientes características: (a) unirse al receptor trkC; (b) unirse a uno o más epítopos del receptor trkC; (c) unirse al receptor trkC y activar la actividad o actividades biológicas de una o más rutas cadena abajo mediada por la función o funciones señalizadoras de trkC; (d) unirse al receptor trkC y tratar, prevenir, revertir o mejorar uno o más síntomas de neuropatía sensorial inducida por taxol; (e) promover dimerización del receptor trkC; (f) unirse al receptor trkC y tratar, prevenir, revertir o mejorar el dolor (incluyendo alodinia y/o hiperalgia) asociado con neuropatía sensorial inducida por taxol; (g) aumentar la activación del receptor trkC; (h) mostrar propiedades de biodisponibilidad y farmacocinética favorables; (i) promover el desarrollo, supervivencia, función, mantenimiento y/o regeneración de las células; (j) mejorar el tratamiento de cáncer con taxol; (k) mejorar el tratamiento con taxol del trasplante de médula ósea.

Los anticuerpos anti-trkC agonistas se conocen en la técnica. Véase la Publicación PCT N° WO 01/98361; Urfer *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1998) 273: 5829-5840. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-trkC agonista es un anticuerpo agonista anti-trkC de ratón humanizado denominado anticuerpo "A5", que comprende la región constante IgG2a de la cadena pesada humana que contiene las siguientes mutaciones: A330P331 a A330S331 (numeración de aminoácidos con referencia a la secuencia IgG2a de tipo silvestre; Véase Eur. J. Immunol. (1999) 29: 2613-2624); la región constante kappa de la cadena ligera humana y las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera mostradas en las Tablas 1 y 2.

TABLA 1

Región variable de cadena pesada A5

Las CDR Kabat se muestran en *cursiva subrayada*; las CDR Chotia se muestra en **negrita**.

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC**KASGYTFTSYRIHWVRQAPGQGLEWMGEIYPSNA**
RTNYNEKFKSRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYY**CARKYYYGNTRRSWYFDVWGQG**
TTVTVS (SEC ID N° :1)

TABLA 2

Región variable de cadena ligera A5

Las CDR Kabat se muestran en *cursiva subrayada*; las CDR Chotia se muestra en **negrita**.

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESIDNYGISFLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
NRSGVPSRFSGSGSGTDFTFTTISLQPEDATYYC**QQSKTVPRTFGQGTKLEIKRT**
(SEC ID N° :2)

Los siguientes polinucleótidos que codifican la región variable de cadena pesada o de cadena ligera de A5 se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia, EE.UU. (ATCC):

Material	Nº de entrada de ATTC	Fecha de depósito
Eb.pur.2256.A5	Cadena ligera A5	PTA-5682
Db.2256.A5	Cadena pesada A5	PTA-5683
		5 de diciembre del 2003 5 de diciembre del 2003

El vector Eb.pur.2256.A5 es un polinucleótido que codifica la región variable de cadena ligera de A5 y el vector Db.2256.A5 es un polinucleótido que codifica la región variable de cadena pesada de A5.

En otras realizaciones, el anticuerpo agonista anti-trkC comprende una o más CDR del anticuerpo A5 (tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o, en algunas realizaciones, las seis CDR de A5). La determinación de las regiones CDR está dentro de la especialidad de la técnica. Existen varias técnicas para determinar CDR: (1) un enfoque basado en la variabilidad de secuencia en especies cruzadas (es decir, Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (5ª ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani *et al* (1997) *J. Molec. Biol.* 273: 927-948)). La identificación de CDR está dentro de la especialidad de la técnica. En algunas realizaciones, las CDR comprenden la CDR Kabat. En otras realizaciones, las CDR son la CDR Chotia. En otras realizaciones, la CDR comprende las CDR tanto Kabat como Chotia.

Los anticuerpos pueden abarcar anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc), anticuerpos quiméricos, de cadena única (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad necesaria. Los anticuerpos pueden ser murinos, de rata, humanos o de cualquier otro origen (incluyendo anticuerpos humanizados). Por tanto, el anticuerpo anti-trkC agonista puede ser un anticuerpo humano (tal como anticuerpo 6,4,1 (Publicación PCT N° WO 01/98361)) o puede ser un anticuerpo humanizado (incluyendo anticuerpo monoclonal humanizado A5).

El anticuerpo anti-trkC agonista se puede unir a trkC humano. El anticuerpo anti-trkC agonista se puede unir también a trkC humano y de roedor. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-trkC agonista se puede unir a trkC humano y de rata. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-trkC se puede unir a trkC humano y de ratón. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo que reconoce uno o más epítopos en el dominio extracelular de trkC humano. En otra realización, al anticuerpo es un anticuerpo de ratón o rata que reconoce uno o más epítopos en el dominio extracelular de trkC humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a trkC humano y no se une significativamente a trkC de otras especies de mamífero (en algunas realizaciones, especies de vertebrados). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a trkC humano así como a uno o más trkC de otras especies de mamífero (en algunas realizaciones, especies de vertebrados). En otra realización, el anticuerpo reconoce uno o más epítopos en un trkC seleccionado de uno o más de: primates, caninos, felinos, equinos y bovinos. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a trkC y no reacciona de forma cruzada (se une) significativamente con otros receptores de neurotrofina (tales como los receptores de neurotrofina relacionados, trkA y/o trkB). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a trkC y además se une a trkA y/o trkB.

El epítipo o los epítipos reconocidos por el anticuerpo agonista anti-trkC pueden ser continuos o discontinuos. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une básicamente al mismo epítipo trkC que un anticuerpo seleccionado de uno cualquiera o más de los siguientes: 6,1,2, 6,4,1, 2345, 2349, 2,5,1, 2344, 2248, 2250, 2253 y 2256. Véase la Publicación PCT N° WO 01/98361. Los ejemplos de epítipos a los que se puede dirigir un anticuerpo incluyen, aunque sin limitación, dominio V y/o dominio IV de trkC. En otra realización, el epítipo incluye uno o más de los siguientes residuos: L284, E287 y N335 de trkC humano. Véase Urfer *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1998) 273: 5829-5840). En otras realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte, por ejemplo, que no desencadena una lisis mediada por complemento o que no estimula citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC). En otras realizaciones, la región constante se modifica como se describe en *Eur. J. Immunol.* (1999) 29: 2613-2624; Solicitud PCT N° PCT/GB99/01441 y/o solicitud de Patente de RU N° 9809951.8. En algunas realizaciones, la región constante comprende la región constante de cadena pesada humana IgG2a que contiene las siguientes mutaciones: A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos con referencia a la secuencia IgG2a de tipo silvestre; véase *Eur. J. Immunol.* (1999) 29: 2613-2624).

La afinidad de unión de un anticuerpo agonista anti-trkC a trkC puede ser cualquiera de aproximadamente 500 nM, 400 nM, 300 nM, 200 nM, 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1

nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM o aproximadamente 50 pM a cualquiera de aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM o aproximadamente 40 pM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es cualquiera de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM o aproximadamente 50 pM o menor de aproximadamente 50 pM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es menor que cualquiera de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM o aproximadamente 50 pM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 40 pM o mayor de 40 pM. Como se conoce en la técnica, la afinidad de unión se puede expresar como K_D o constante de disociación y una afinidad de unión aumentada corresponde a una K_D disminuida. La afinidad de unión de anticuerpo monoclonal agonista anti-trkC 2256 a trkC humano es de aproximadamente 40 nM, evaluada usando análisis BIAcore y la afinidad de unión del anticuerpo agonista anti-trkC humanizado A5 (descrito en este documento) a trkC humano es aproximadamente 0,28 nM, evaluada usando análisis BIAcore.

Una forma de determinar la afinidad de unión de anticuerpos a trkC es midiendo la afinidad de unión de fragmentos Fab monofuncionales del anticuerpo. Para obtener fragmentos Fab monofuncionales, un anticuerpo (por ejemplo, IgG) se puede escindir con papaína o expresar de manera recombinante. La afinidad de un fragmento Fab anti-trkC de un anticuerpo se puede determinar por resonancia de plasmón de superficie (sistema de resonancia de plasmón de superficie (RPS) BIAcore3000™, BIAcore, INC, Piscaway NJ). Se pueden activar chips CM5 con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La proteína de fusión humana trkC-Fc ("htrkC") (o cualquier otro trkC, tal como trkC de rata) se puede diluir en acetato de sodio 10 mM pH 5,0 e inyectar sobre el chip activado a una concentración de 0,0005 mg/ml. Usando flujo de tiempo variable a lo largo de los canales individuales del chip, se pueden conseguir dos intervalos de densidad de antígeno: 200-400 unidades de respuesta (RU) para estudios cinéticos detallados y 500-1000 RU para ensayos de detección. El chip se puede bloquear con etanolamina. Los estudios de regeneración han mostrado que una mezcla de tampón de elución Pierce (Producto Nº 21004, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) y NaCl 4 M (2:1) retiran eficazmente el Fab unido mientras que mantienen la actividad de htrkC sobre el chip durante más de 200 inyecciones. Se usa tampón HBS-EP (HEPES 0,01M, pH 7,4, NaCl 0,15, EDTA 3 mM, Tensioactivo P29 al 0,005%) como tampón de desarrollo para los ensayos BIAcore. Se inyectan diluciones en serie (K_D estimada 0,1-10x) de muestras de Fab purificado durante 1 min a 100 μ l/min y se permiten tiempos de disociación de hasta 2 h. Las concentraciones de las proteínas Fab se determinan por ELISA y/o electroforesis SDS-PAGE usando un Fab de concentración conocida (determinada por análisis de aminoácidos) como un patrón. Los índices de asociación cinética (k_{on}) e índices de disociación (k_{off}) se obtienen simultáneamente ajustando los datos a un modelo de unión de Langmuir 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6: 99-110) usando el programa BIAevaluation. Los valores de la constante de equilibrio de disociación (K_D) se calculan como K_{off}/K_{on} .

En otro aspecto, los anticuerpos (por ejemplo, humanos, humanizados, de ratón o quiméricos) que pueden activar el receptor trkC humano se pueden fabricar usando inmunógenos que expresen uno o más dominios extracelulares de trkC. Un ejemplo de un inmunógeno es células con expresión alta de trkC, que se pueden obtener como se describe en este documento. Otro ejemplo de un inmunógeno que se puede usar es una proteína soluble (tal como una inmunoadhesina trkC) que contiene el dominio extracelular o una parte del dominio extracelular del receptor trkC.

La vía y programa de inmunización del animal hospedador consisten en, generalmente, mantener la estimulación y producción de anticuerpos mediante técnicas establecidas y convencionales, como se describe adicionalmente en este documento. Las técnicas generales para producción de anticuerpos humanos y de ratón se conocen en la técnica y se describen en este documento.

Se contempla que cualquier sujeto mamífero incluyendo humanos o células productoras de anticuerpos de los mismos se pueden manipular para servir como la base para producir líneas celulares de hibridoma de mamífero, incluyendo humanos. Típicamente, se inocula por vía intraperitoneal al animal hospedador con una cantidad de inmunógeno, incluyendo como se describe en este documento.

Los hibridomas se pueden preparar a partir de los linfocitos y células de mieloma inmortalizadas usando la técnica general de hibridación de células somáticas de Kohler, B. y Milstein, C. (1975) *Nature* 256: 495-497 o la modificada por Buck, D. W. *et al.*, (1982) *In vitro*, 18: 377-381. En la hibridación se pueden usar líneas de mieloma disponibles que incluyen, aunque sin limitación, X63-Ag8,653 y las de Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., EE.UU. Generalmente, la técnica implica fusionar células de mieloma y células linfoides usando un fusógeno tal como polietilén glicol o por medios eléctricos conocidos por los especialistas en la técnica. Después de la fusión, las células se separan del medio de fusión y se cultivan en un medio de cultivo selectivo, tal como medio hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), para eliminar células parentales no hibridadas. Cualquiera de los medios descritos en este documento, complementados o no con suero, se pueden usar para cultivar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales. Como otra alternativa a la técnica de fusión celular, se pueden usar células B inmortalizadas EBV para producir los anticuerpos monoclonales anti-trkC de la presente invención. Los hibridomas se expanden y se subclonan, si se desea y se ensayan los sobrenadantes para determinar la actividad anti-inmunogénica mediante procedimientos de inmunoensayo convencionales (por ejemplo, radioinmunoensayo, inmunoensayo enzimático o inmunoensayo de fluorescencia).

Los hibridomas que se pueden usar como fuente de anticuerpos abarcan todos los derivados, células progenitoras de los hibridomas parentales que producen anticuerpos monoclonales específicos para trkC o una parte de los mismos.

- 5 Los hibridomas que producen tales anticuerpos se pueden cultivar *in vitro* o *in vivo* usando procedimientos conocidos. Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar a partir del medio de cultivo o fluidos corporales, por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como precipitación con sulfato de amonio, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía y ultrafiltración, si se desea. Si se presenta actividad indeseada, se pueden retirar, por ejemplo, haciendo correr la preparación sobre adsorbentes hechos del inmunógeno unido a una fase sólida y eluyendo
10 o liberando los anticuerpos deseados del inmunógeno. La inmunización de un animal hospedador con un receptor trkC humano o de otra especie o con un fragmento del receptor trkC humano o de otras especies o con un receptor trkC humano o de otras especies o un fragmento que contenga la secuencia de aminoácidos diana conjugada a una proteína que es inmunogénica en las especies que se tienen que inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o derivatizante, por
15 ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl₂ o R₁N=C=NR, donde R y R₁ son grupos alquilo diferentes que pueden producir una población de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales). Otro ejemplo de un inmunógeno son células con expresión elevada de trkC, que se pueden obtener a partir de medios recombinantes o aislando o enriqueciendo las células de una fuente natural que expresan un nivel elevado de trkC.
20 Estas células pueden ser de origen humano u otro origen animal y se pueden usar como un inmunógeno directamente aisladas o se pueden procesar de modo que la inmunogenicidad se aumente o que la expresión de trkC (de un fragmento de trkC) se aumente o enriquezca. Tal procesamiento incluye, aunque sin limitación, tratamiento de las células o fragmentos de las mismas con agentes diseñados para aumentar su estabilidad o inmunogenicidad, tales como, por ejemplo, formaldehído, glutaraldehído, etanol, acetona y/o diversos ácidos. Además, antes o después de tal tratamiento
25 las células se pueden procesar para enriquecer el inmunógeno deseado, en este caso trkC o fragmento del mismo. Estas etapas de procesamiento pueden incluir técnicas de fraccionamiento de membrana, que se conocen en la técnica.

- Si se desea, el anticuerpo anti-trkC (monoclonal o policlonal) de interés se puede secuenciar y después la secuencia polinucleotídica puede clonarse en un vector para expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de
30 interés se puede mantener en un vector en una célula hospedadora y después la célula hospedadora puede expandirse y congelarse para uso posterior. Como una alternativa, la secuencia polinucleotídica se puede usar para manipulación genética para "humanizar" el anticuerpo o mejorar la afinidad u otras características del anticuerpo. Por ejemplo, la región constante se puede modificar con ingeniería genética para parecerse más a regiones constantes humanas para evitar una respuesta inmune si el anticuerpo se usa en ensayos clínicos y tratamientos en seres humanos. Se puede
35 desear manipular genéticamente la secuencia de anticuerpo para obtener mayor afinidad al receptor trkC y mayor eficacia en la activación del receptor trkC. Para un especialista en la técnica será evidente que se pueden hacer uno o más cambios de polinucleótidos al anticuerpo anti-trkC y que siga manteniendo su capacidad de unión al dominio extracelular trkC o epítops de trkC.

- 40 Existen cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estas son: (1) determinar el nucleótido y secuencia de aminoácidos pronosticada de los dominios variables ligeros y pesados del anticuerpo de partida (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región flanqueante de anticuerpo usar durante el proceso de humanización (3) las metodologías/técnicas de humanización propiamente dichas y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N° 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; 6.331.415;
45 5.530.101; 5.693.761; 5.693.762; 5.585.089; 6.180.370 y 6.548.640. Por ejemplo, la región constante se puede modificar con ingeniería genética para que se parezca más a regiones constantes humanas para evitar respuesta inmune si el anticuerpo se usa en ensayos clínicos y tratamientos en seres humanos. Véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N° 5.997.867 y 5.866.692.

- 50 En los anticuerpos humanizados recombinantes, la parte Fc γ se puede modificar para evitar interacción con el receptor Fc γ y el sistema inmune del complemento. Este tipo de modificación fue diseñado por Dr. Mike Clark del Departamento de Patología de la Universidad de Cambridge y las técnicas para la preparación de tales anticuerpos se describen en la Publicación PCT N° WO 99/58572, publicada el 18 de noviembre de 1999.

- 55 Se han descrito varias moléculas de anticuerpo "humanizadas" que comprenden un sitio de unión de antígeno obtenido de una inmunoglobulina no humana, incluyendo anticuerpos quiméricos que tienen regiones V de roedor o de roedor modificadas y sus regiones determinantes de complementariedad (CDR) asociadas fusionadas a dominios constantes humanos. Véase, por ejemplo, Winter *et al. Nature* 349: 293-299 (1991), Lobuglio *et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86: 4220-4224 (1989), Shaw *et al. J Immunol.* 138: 4534-4538 (1987) y Brown *et al., Cancer Res.* 47: 3577-
60 3583 (1987). Otras referencias describen CDR de roedor insertadas en una región flanqueante de soporte humana (FR) antes de la fusión con un dominio constante de anticuerpo humano apropiado. Véase, por ejemplo, Riechmann *et al. Nature* 332: 323-327 (1988), Verhoeven *et al. Science* 239: 1534-1536 (1988) y Jones *et al. Nature* 321: 522-525 (1986). Otra referencia describe CDR de roedor sostenidas por regiones flanqueantes de roedor de apariencia recombinante. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente Europea N° 519.596. Estas moléculas "humanizadas" se
65 diseñan para minimizar respuesta inmunológica indeseada hacia moléculas de anticuerpo de roedor anti-humano que limita la duración y eficacia de aplicaciones terapéuticas de estos restos en receptores humanos. La región constante del anticuerpo se puede modificar con ingeniería genética de manera que sea inmunológicamente inerte, por ejemplo, que no desencadene una lisis mediada por complemento o que no estimule citotoxicidad mediada por célula dependiente

de anticuerpo (ADCC). En otras realizaciones, la región constante se modifica como se describe en *Eur. J. Immunol.* (1999) 29: 2613-2624; Solicitud PCT N° PCT/GB99/01441 y/o Solicitud de Patente de RU N° 9809951,8.

Véase, por ejemplo, PCT/GB99/01441; Solicitud de Patente de RU N° 9809951,8. Otros métodos de humanización de anticuerpos que se pueden utilizar también se describen en Daugherty *et al.*, *Nucl. Acid. Res.* 19: 2471-2476 (1991) y en las Patentes de EE.UU. N° 6.180.377; 6.054.297; 5.997.867; 5.866.692; 6.210.671; 6.350.861 y Publicación PCT N° WO 01/27160.

En otra alternativa, se pueden obtener anticuerpos completamente humanos usando ratones disponibles en el mercado que se hayan modificados con ingeniería genética para expresar proteínas de inmunoglobulina específicas humanas. Los animales transgénicos que se diseñan para producir una respuesta inmune más deseable (por ejemplo, anticuerpos completamente humanos) o una respuesta inmune más fuerte también se pueden usar para generación de anticuerpos humanizados o humanos. Ejemplos de tal tecnología son XenomouseTM de Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y HuMAB-Mouse[®] y TC MousseTM de Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

En una alternativa, los anticuerpos se pueden preparar de forma recombinante y expresarse usando cualquier método conocido en la técnica. En otra alternativa, los anticuerpos se pueden preparar de forma recombinante mediante tecnología de expresión en fago. Véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N° 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743 y 6.265.150 y Winter *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.* 12: 433-355 (1994). Alternativamente, la tecnología de expresión en fago (McCafferty *et al.*, *Nature* 348: 552-553 (1990)) se puede usar para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios génicos del dominio variable (V) de inmunoglobulina de donadores no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpo se clonan en fase de lectura en un gen de proteína de recubrimiento principal o secundario de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd y se muestran como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por tanto, el fago mimetiza algunas de las propiedades de la célula B. La expresión en fago puede realizar en una diversidad de formatos; para revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3, 564-571 (1993). Se pueden usar varias fuentes de segmentos de gen V para expresión en fago. En Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991) se aisló una serie variada de anticuerpos anti-oxazolona a partir de una genoteca combinatoria aleatoria pequeña de genes V obtenidos de los bazo de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos para una serie variada de antígenos (incluyendo auto-antígenos) siguiendo básicamente las técnicas descritas por Mark *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991) o Griffith *et al.*, *EMBO J.* 12: 725-734 (1993). En una respuesta inmune natural, los genes de anticuerpos acumulan mutaciones en una tasa elevada (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán afinidad mayor y las células B que muestren inmunoglobulinas de superficie de afinidad alta preferiblemente se replican y diferencian durante la estimulación antigénica posterior. Estos procesos naturales se pueden mimetizar empleando la técnica conocida como "transposición de cadena". Marks, *et al.*, *Bio/Technol.* 10: 779-783 (1992)). En este método, la afinidad de anticuerpos humanos "primarios" obtenida por expresión en fago se puede mejorar reemplazando de forma secuencial los genes de región V de la cadena pesada y ligera con repertorios de variantes de origen natural (repertorios) de genes de dominio V obtenidos de donadores no inmunizados. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con afinidades en el intervalo de pM-nM. Una estrategia para fabricar repertorios de anticuerpos de fago muy grandes (también conocidos como "la-madre-de-todas-las-genotecas") se ha descrito por Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 21: 2265-2266 (1993). La transposición de genes se puede usar también para obtener anticuerpos humanos a partir de anticuerpos de roedor, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo de roedor de partida. De acuerdo con este método, que también se denomina "impresión de epítipo", los genes de dominio V de cadenas pesada o ligera de anticuerpos de roedor obtenidos por la técnica de expresión en fago se reemplazan con un repertorio de genes de dominio V humanos, creando quimeras roedor-humano. La selección de un antígeno da como resultado aislamiento de regiones variables humanas capaces de restituir un sitio de unión de antígeno funcional, es decir, el epítipo dirige (imprime) la elección del ligando. Cuando se repite el proceso para reemplazar el dominio V de roedor restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase la Publicación PCT N° WO 93/06213, publicada el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos de roedor por inserción de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen residuos flanqueantes o CDR de origen de roedor. Es evidente que aunque la descripción anterior concierne a anticuerpos humanizados, los principios generales descritos son aplicables para adaptar los anticuerpos para uso en, por ejemplo, perros, gatos, primates, equinos y bovinos.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo monoclonal que tiene especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes y se puede preparar usando los anticuerpos descritos en este documento. Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, 1986, *Methods in Enzymology* 121: 210). Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basaba en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulinas, teniendo las dos cadenas pesadas especificidades diferentes (Millstein and Cuello, 1983, *Nature* 305, 537-539).

De acuerdo con un planteamiento para preparar anticuerpos biespecíficos, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación antígeno-anticuerpo) se fusionan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. Preferiblemente, la fusión es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones de bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere que la primera

región constante de cadena pesada (CH1), contenga el sitio necesario para unión de cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, de cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones en las que el uso de proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporciona los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales tienen como resultado rendimientos elevados o cuando las proporciones no tienen importancia particular.

En un planteamiento, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un par cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Esta estructura asimétrica, con una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica, facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas. Este planteamiento se describe en la Publicación PCT N° WO 94/04690, publicada el 3 de marzo de 1994.

Los anticuerpos heteroconjugados, que comprenden dos anticuerpos unidos covalentemente, también están dentro del alcance de la invención. Tales anticuerpos se han usado para dirigir células del sistema inmune hacia células no deseadas (Patente de EE.UU. N° 4.676.980) y para tratamiento de infección por VIH (Publicación PCT N° WO 91/00360 y WO 92/200373 y documento EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden preparar usando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Los agentes y técnicas de entrecruzamiento adecuados se conocen en la técnica y se describen en la Patente de EE.UU. N° 4.676.980.

Los anticuerpos se pueden preparar de forma recombinante aislando en primer lugar los anticuerpos preparados a partir de animales hospedadores, obteniendo la secuencia génica y usando la secuencia génica y usando la secuencia génica para expresar el anticuerpo de forma recombinante en células hospedadoras (por ejemplo, células CHO). Otro método que se puede emplear es expresar la secuencia de anticuerpo en plantas (por ejemplo, tabaco), leche transgénica o en otros organismos. Se han descrito métodos para expresar anticuerpos de forma recombinante en plantas o leche. Véase, por ejemplo, Peeters *et al.*, (2001) *Vaccine* 19: 27256; Longberg, N. y D. Huszar (1995) *Int. Rev. Immunol* 13: 65 y Pollock *et al.* (1999) *J Immunol Methods* 231: 147. Los métodos para preparar derivados de anticuerpos, por ejemplo, humanizados, monocatenarios, etc. se conocen en la técnica.

Los anticuerpos quiméricos o híbridos también se pueden preparar *in vitro* usando métodos conocidos de química de síntesis de proteínas, que incluyen los que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y 4-metil-mercaptobutirimidato.

Los fragmentos Fv monocatenarios también se pueden producir, tal como se ha descrito en Iliades *et al.*, 1997, FEBS Letters, 409: 437-441. El acoplamiento de tales fragmentos de cadena única usando diversos enlazadores se describe en Kortt *et al.*, 1997, *Protein Engineering*, 10: 423-433. Una diversidad de técnicas para la producción y manipulación recombinante de anticuerpos se conocen en la técnica.

Los anticuerpos se pueden modificar como se ha descrito en la Publicación PCT N° WO 99/58572, publicada el 18 de noviembre de 1999. Estos anticuerpos comprenden, además de un dominio de unión dirigido a la molécula diana, un dominio efector que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a todo o parte del dominio constante de una cadena pesada de inmunoglobulina humana. Estos anticuerpos son capaces de unirse a la molécula diana sin desencadenar lisis dependiente de complemento significativa o destrucción mediada por célula de la diana. Preferiblemente, el dominio efector es capaz de unirse específicamente a FcRn y/o FcγRIIb. Estos se basan típicamente en dominios quiméricos obtenidos a partir de dos o más dominios C_H2 de cadena pesada de inmunoglobulina humana. Se prefieren anticuerpos modificados de esta manera para uso en terapia de anticuerpos crónica, para evitar inflamación u otras reacciones adversas a la terapia con anticuerpos convencional.

Los anticuerpos preparados por inmunización de un animal hospedador o de forma recombinante deben mostrar una cualquiera o más de las siguientes características: (a) unirse a receptor trkC; (b) unirse a uno o más epítopos del receptor trkC; (c) unirse a receptor trkC y activar actividad o actividades biológicas de una o más rutas cadena abajo mediadas por función o funciones señalizadora de trkC; (d) unirse al receptor trkC y tratar, prevenir, revertir o mejorar uno o más síntomas de neuropatía sensorial inducida por taxol; (e) promover dimerización del receptor trkC; (f) unirse a receptor trkC y tratar, prevenir, revertir o mejorar el dolor (incluyendo alodinia y/o hiperalgesia) asociado con neuropatía sensorial inducida por taxol; (g) aumentar activación del receptor trkC; (h) presentar propiedades farmacocinéticas y de biodisponibilidad favorables; (i) promover el desarrollo, supervivencia, función, mantenimiento y/o regeneración de las células; (j) potenciar tratamiento de cáncer con taxol y (k) potenciar tratamiento con taxol en trasplante de médula ósea.

También se pueden emplear inmunoensayos y técnicas de separación por citometría de flujo tales como separación de células activada por fluorescencia (FACS) para aislar anticuerpos que son específicos para trkC.

Los anticuerpos se pueden unir a muchos vehículos diferentes. Los vehículos pueden ser activos y/o inertes. Los ejemplos de vehículos conocidos incluyen polipropileno, poliestireno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, vidrio, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. El vehículo puede ser de naturaleza soluble o insoluble para los propósitos de la invención. Los especialistas en la técnica conocerán otros vehículos adecuados para unir anticuerpos o serán capaces de determinarlos usando experimentos de rutina.

El ADN que codifica anticuerpos anti-trkC agonistas se puede secuenciar, como se conoce en la técnica. Véase la Publicación PCT N° WO 01/98361. Generalmente, el anticuerpo monoclonal se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar dentro de vectores de expresión (tales como vectores de expresión descritos en la Publicación PCT WO 87/04462), que posteriormente se transfectan en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de lo contrario no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Véase, por ejemplo, la Publicación PCT WO 87/04462. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en el lugar de secuencias murinas homólogas, Morrison *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81: 6851 (1984) o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no-inmunoglobulina. De esa manera, se preparan anticuerpos “quiméricos” o “híbridos” que tienen la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal anti-trkC de este documento. El ADN que codifica el anticuerpo anti-trkC agonista (tal como un fragmento de unión de antígeno del mismo) también se puede usar para reparto y expresión de anticuerpo anti-trkC agonista en una célula deseada, como se describe en este documento. Las técnicas de reparto de ADN se describen adicionalmente en este documento.

Los anticuerpos anti-trkC se pueden caracterizar usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método es identificar el epítipo al que se une, que incluyen resolver la estructura cristalina de un complejo anticuerpo-antígeno, ensayos de competición, ensayos de expresión de fragmentos génicos y ensayos basados en péptidos sintéticos, como se describe, por ejemplo, en el Capítulo 11 de Harlow y Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1999. En un ejemplo adicional, el mapeo de epítopos se puede usar para determinar la secuencia a la que se une un anticuerpo anti-trkC. El mapeo de epítopos está disponible en el mercado en diversas fuentes, por ejemplo, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, Los Países Bajos). El epítipo puede ser un epítipo lineal, es decir, contenido en una extensión única de aminoácidos o un epítipo conformacional formado por una interacción tridimensional de aminoácidos que pueden no estar necesariamente contenidos en una extensión única. Péptidos de diversas longitudes (por ejemplo, al menos 4-6 aminoácidos de longitud) se pueden aislar o sintetizar (por ejemplo, de forma recombinante) y usarse para ensayos de unión con anticuerpo anti-trkC. En otro ejemplo, el epítipo al que se une el anticuerpo anti-trkC se puede determinar en una detección sistemática usando péptidos solapantes obtenidos a partir de la secuencia extracelular de trkC y determinando la unión mediante el anticuerpo anti-trkC. De acuerdo con los ensayos de expresión de fragmentos génicos, la fase de lectura abierta que codifica trkC se fragmenta aleatoriamente o por construcciones genéticas específicas y se determina la reactividad de los fragmentos expresados de trkC con el anticuerpo que se tiene que ensayar. Los fragmentos génicos se pueden producir, por ejemplo, por PCR y después transcribirse y traducirse a proteína *in vitro*, en presencia de aminoácidos radiactivos. La unión del anticuerpo a los fragmentos trkC marcados radiactivamente se determina posteriormente por inmunoprecipitación y electroforesis en gel. Ciertos epítopos también se pueden identificar usando bibliotecas grandes de secuencias peptídicas aleatorias presentadas en la superficie de partículas de fago (bibliotecas de fagos).

Otro método que se puede usar para caracterizar un anticuerpo anti-trkC es usar ensayos de competición con otros anticuerpos conocidos para unir el mismo antígeno, es decir, dominio extracelular trkC para determinar si el anticuerpo anti-trkC se une al mismo epítipo que otros anticuerpos. Los especialistas en la técnica conocen los ensayos de competición. Los ejemplos de anticuerpos útiles en ensayos de competición incluyen los siguientes: anticuerpos 6,1,2, 6,4,1 2345, 2349, 2,5,1, 2344, 2248, 2250, 2253 y 2256. Véase Publicación PCT N° WO 01/98361.

El mapeo de epítopos también se puede realizar usando mutantes de intercambio de dominio como se ha descrito en la Publicación PCT N° WO 01/98361. Generalmente, este planteamiento es útil para anticuerpos anti-trkC que no reaccionan significativamente de forma cruzada con trkA o trkB. Los mutantes de intercambio de dominio se pueden preparar reemplazando dominios extracelulares de trkC con los dominios correspondientes de trkB o trkA. La unión de cada anticuerpo anti-trkC agonista a diversos mutantes de intercambio de dominio se puede evaluar y comparar con su unión a trkC de tipo silvestre (nativo) usando ELISA u otro método conocido en la técnica. En otro planteamiento, se puede realizar un barrido de alanina. Los residuos individuales del antígeno, el receptor trkC, se mutan sistemáticamente a otro aminoácido (habitualmente alanina) y el efecto de los cambios se evalúa ensayando la capacidad del trkC modificado de unirse a anticuerpo usando ELISA u otros métodos conocidos en la técnica.

Identificación de anticuerpos anti-trkC agonistas

Los anticuerpos agonistas se pueden identificar usando métodos reconocidos en la técnica, que incluyen uno o más de los siguientes métodos. Por ejemplo, se puede usar el ensayo de activación de receptor quinasa (KIRA) descrito en las Patentes de EE.UU. N° 5.766.863 y 5.891.650. Estos ensayos de tipo ELISA son adecuados para medición cualitativa o cuantitativa de activación de quinasas midiendo la autofosforilación del dominio quinasa de una proteína

receptora tirosina quinasa (rPTK, por ejemplo, receptor trk), así como para identificación y caracterización de agonistas o antagonistas potenciales de un rPTK seleccionado. La primera etapa del ensayo implica fosforilación del dominio quinasa de un receptor quinasa, en el presente caso un receptor trkC, donde el receptor está presente en la membrana celular de la célula eucariota. El receptor puede ser un receptor endógeno o un ácido nucleico que codifique el receptor o una construcción de receptor y se puede transformar en la célula. Típicamente, una primera fase sólida (por ejemplo, un pocillo de una primera placa de ensayo) se recubre con una población sustancialmente homogénea de tales células (habitualmente una línea celular de mamífero) para que las células se adhieran a la fase sólida. Con frecuencia, las células son adherentes y, por lo tanto, se adhieren naturalmente a la primera fase sólida. Si se usa una “construcción de receptor”, habitualmente comprende una fusión de un receptor quinasa y un polipéptido señal. El agente de captura, con frecuencia un anticuerpo de captura, reconoce el polipéptido señal, en la parte ELISA del ensayo. Después se añade un analito, tal como un agonista candidato, a los pocillos que tienen las células adherentes, de modo que el receptor tirosina quinasa (por ejemplo, receptor trkC) se exponga a (o se ponga en contacto con) el analito. Este ensayo permite la identificación de ligandos agonistas para el receptor tirosina quinasa de interés (por ejemplo, trkC). Después de la exposición al analito, las células adherentes se solubilizan usando un tampón de lisis (que tiene un detergente solubilizante en su interior) y agitación suave, liberando de ese modo el lisado celular que se puede someter a la parte ELISA del ensayo directamente, sin la necesidad de concentración o aclarado del lisado celular.

Entonces, el lisado celular preparado de este modo está listo para someterse a la fase ELISA del ensayo. Como una primera etapa en la fase de ELISA, una segunda fase sólida (habitualmente un pocillo de una placa de microtitulación de ELISA) se recubre con un agente de captura (con frecuencia un anticuerpo de captura) que se une específicamente al receptor tirosina quinasa o, en el caso de una construcción de receptor, al polipéptido señal. El recubrimiento de la segunda fase sólida se realiza para que el agente de captura se adhiera a la segunda fase sólida. El agente de captura es, generalmente, un anticuerpo monoclonal, pero, como se describe en los ejemplos en este documento, también se pueden usar anticuerpos policlonales u otros agentes. Después, el lisado celular obtenido se expone a o se pone en contacto con, el agente de captura adherente para que el receptor o construcciones de receptor se adhieran a (o se capturen en) la segunda fase sólida. Después se lleva a cabo una etapa de lavado, para retirar lisado celular no unido, dejando el receptor o construcción de receptor capturado. El receptor o construcción de receptor adherido o capturado después se expone a o se pone en contacto con, un anticuerpo anti-fosfotirosina que identifica residuos tirosina fosforilados en el receptor tirosina quinasa. En la realización preferida, el anticuerpo anti-fosfotirosina se conjuga (directa o indirectamente) a una enzima que cataliza un cambio de color de un reactivo de color no radiactivo. Por consiguiente, la fosforilación del receptor se puede medir por un cambio de color posterior del reactivo. La enzima se puede unir al anticuerpo anti-fosfotirosina directamente o una molécula de conjugación (por ejemplo, biotina) se puede conjugar al anticuerpo anti-fosfotirosina y la enzima se puede unir posteriormente al anticuerpo anti-fosfotirosina vía la molécula de conjugación. Finalmente, la unión del anticuerpo anti-fosfotirosina al receptor o construcción de receptor capturado se mide, por ejemplo, mediante un cambio de color en el reactivo de color.

A continuación de la identificación inicial, la actividad agonista de un anticuerpo candidato se puede confirmar y refinar mediante bioensayos conocidos para ensayar las actividades biológicas marcadas como diana. Por ejemplo, la capacidad de anticuerpos monoclonales anti-trkC de ser agonistas de trkC se puede ensayar en el ensayo de extensión neurítica PC12 usando células PC12 transfectadas con trkC humano de longitud completa (Urfer *et al.*, *Biochem.* 36: 4775-4781 (1997); Tsoulfas *et al.*, *Neuron* 10: 975-990 (1993)). Este ensayo mide la extensión de procesos neuríticos mediante células de feocromocitoma de rata (PC12) en respuesta a estimulación mediante ligandos apropiados. Estas células expresan trkA endógeno y son, por lo tanto, sensibles a NGF. Sin embargo, no expresan trkC endógeno y, por lo tanto, se transfectan con construcción de expresión de trkC para provocar respuesta a agonistas de trkC. Después de incubar las células transfectadas con anticuerpos anti-trkC, se mide la extensión neurítica y, por ejemplo, se realiza el recuento de células con neuritas que 2 veces mayores que el diámetro de la célula. Los anticuerpos anti-trkC que estimulan la extensión neurítica en células PC12 transfectadas demuestran la actividad agonista de trkC.

La activación de trkC también se puede determinar usando diversas neuronas específicas en fases específicas del desarrollo embrionario. Neuronas seleccionadas adecuadamente pueden depender de la activación de trkC para sobrevivir y, por tanto, es posible determinar la activación de trkC siguiendo la supervivencia de estas neuronas *in vitro*. La adición de anticuerpos candidatos a cultivos primarios de neuronas apropiadas conducirá a supervivencia de estas neuronas durante un período de al menos varios días si los anticuerpos candidatos activan trkC. Esto permite la determinación de la capacidad del anticuerpo candidato de activar trkC. En un ejemplo de este tipo de ensayo, se diseca el ganglio trigeminal de un embrión de ratón E11, se disocia y las neuronas resultantes se siembran en una placa de cultivo de tejido a densidad baja. Después, los anticuerpos candidatos se añaden al medio y las placas se incuban durante 24-48 horas. Pasado este tiempo, la supervivencia de las neuronas se evalúa por cualquiera de una diversidad de métodos. Las muestras que recibieron un anticuerpo anti-trkC agonista presentarán típicamente una tasa de supervivencia aumentada sobre las muestras que recibieron un anticuerpo de control y esto permite la determinación de la presencia de un anticuerpo anti-trkC agonista. Véase, por ejemplo, Buchman *et al* (1993) *Development* 118(3): 989-1001.

Los anticuerpos agonistas se pueden identificar por su capacidad de activar señalización cadena abajo en una diversidad de tipos celulares que expresan trkC de forma natural o después de transfección de ADN que codifica trkC. Este trkC puede ser trkC humano o de otro mamífero (tal como roedor o primate). La cascada de señalización cada abajo se puede detectar por cambios a una diversidad de parámetros bioquímicos o fisiológicos de la célula que expresa trkC, tales como el nivel de expresión proteica o de fosforilación proteica de proteínas o cambios al estado metabólico o de crecimiento de la célula (incluyendo supervivencia neuronal y/o extensión neurítica, como se describe en este documento). Los métodos para detectar parámetros bioquímicos o fisiológicos pertinentes se conocen en la técnica.

Administración de anticuerpos anti-trkC agonistas

Se pueden usar diversas formulaciones de anticuerpos anti-trkC agonistas para administración. En algunas realizaciones, se puede administrar un anticuerpo anti-trkC agonista solo. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-trkC agonista se administra en una composición que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes farmacéuticamente aceptables se conocen en la técnica y son sustancias relativamente inertes que facilitan la administración de una sustancia farmacológicamente eficaz. Por ejemplo, un excipiente puede dar forma o consistencia o actuar como un diluyente. Los excipientes adecuados incluyen, aunque sin limitación, agentes estabilizantes, agentes humectantes y emulsificantes, sales para variar la osmolaridad, agentes de encapsulación, tampones y potenciadores de penetración de piel. Los excipientes así como las formulaciones para la administración parenteral y no parenteral de fármacos se exponen en Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* 20ª Ed. Mack Publishing (2000).

Los anticuerpos anti-trkC agonistas se pueden formular para administración por inyección (por ejemplo, por vía intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscular, etc.). Por consiguiente, los anticuerpos se pueden combinar con vehículos farmacéuticamente aceptables tales como solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y similares. El régimen de dosificación particular, es decir, dosis, tiempo y repetición, dependerá del individuo particular y de la historia médica de ese individuo. Generalmente, se administró una dosis menor de aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, al menos aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal; al menos aproximadamente 2 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, al menos aproximadamente 5 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, al menos aproximadamente 10 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, al menos aproximadamente 20 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, al menos aproximadamente 50 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, al menos aproximadamente 100 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, al menos aproximadamente 200 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, al menos aproximadamente 500 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, al menos aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 2 mg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal o más (tal como aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 200 mg/kg o aproximadamente 500 mg/kg).

Consideraciones empíricas, tales como la semivida, generalmente contribuirán a la determinación de la dosis. Se pueden usar anticuerpos que sean compatibles con el sistema inmune humano, tales como anticuerpos humanizados o anticuerpos completamente humanos, para prolongar la semivida de los anticuerpos y para evitar que el sistema inmune del hospedador ataque al anticuerpo. La frecuencia de administración se puede determinar y ajustar a lo largo del ciclo de la terapia y generalmente, pero no necesariamente, se basa en mantener una concentración eficaz de un anticuerpo anti-trkC agonista en el paciente y en la supresión y/o mejora y/o retraso de uno o más síntomas de neuropatía sensorial inducida por taxol. Alternativamente, las formulaciones de liberación continua y sostenida de anticuerpos anti-trkC agonistas puede ser apropiada. En la técnica se conocen diversas formulaciones y dispositivos para conseguir liberación sostenida. La administración de un anticuerpo anti-trkC agonista de acuerdo con el método de la presente invención puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, de la condición fisiológica del receptor, si el propósito de la administración es terapéutico o profiláctico y otros factores conocidos por los especialistas en la técnica. La administración de un anticuerpo anti-trkC agonista puede ser básicamente continua a lo largo de un periodo preseleccionado de tiempo o puede ser en una serie de dosis espaciadas, por ejemplo, antes; durante o después de desarrollar síntomas de neuropatía sensorial inducida por taxol; antes y durante; antes y después; durante y después y/o antes, durante y después de desarrollar síntomas de neuropatía sensorial inducida por taxol.

Generalmente, para administración de anticuerpos anti-trkC agonistas, una dosis candidata inicial puede ser de aproximadamente 2 mg/kg. Para el propósito de la presente invención, una dosis típica diaria puede variar de aproximadamente 30 $\mu\text{g/kg}$ a 100 $\mu\text{g/kg}$ o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que ocurra una supresión deseada de los síntomas de enfermedad o hasta que se consigan niveles terapéuticos suficientes para tratar o prevenir neuropatía sensorial inducida por taxol. Un régimen de dosificación ilustrativo comprende administrar una dosis inicial de aproximadamente 2 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 1 mg/kg del anticuerpo agonista trkC o seguida de una dosis de mantenimiento de aproximadamente 1 mg/kg una semana sí y otra no.

En una realización, las dosis de un anticuerpo se pueden determinar de forma empírica en individuos a los que se ha dado una o más administraciones de un anticuerpo anti-trkC agonista que activa el receptor trkC para tratar una neuropatía sensorial inducida por taxol. Los individuos reciben dosis crecientes de un anticuerpo anti-trkC agonista. Para evaluar la eficacia de anticuerpos anti-trkC agonistas, se puede seguir un indicador de neuropatía sensorial inducida por taxol como se describe en este documento.

Otras formulaciones incluyen formas de administración adecuadas, conocidas en la técnica que incluyen, aunque sin limitación, como vehículos tales como liposoma. Véase, por ejemplo, Mahato *et al.*, (1997) *Pharm. Res.* 14: 853-859. Las preparaciones liposomales incluyen, aunque sin limitación, citofectinas, vesículas multilamelares y vesículas unilamelares.

Las formulaciones que se usan para la administración *in vivo* tienen que ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante, por ejemplo, filtración a través de membranas de filtración estériles. Generalmente, se colocan composiciones terapéuticas de anticuerpo anti-trkC agonista en un recipiente que tenga un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o vial que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

El anticuerpo anti-trkC agonista se administra a un individuo de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o por infusión continua a lo largo de un periodo de tiempo, por vías intramusculares, intraperitoneales, subcutáneas, orales, intratecales o tópicas. El anticuerpo anti-trkC agonista también se puede administrar por inhalación. Son útiles para administración los nebulizadores disponibles en el mercado para formulaciones líquidas, que incluyen nebulizadores de chorro y nebulizadores ultrasónicos. Las formulaciones líquidas se pueden nebulizar directamente y el polvo liofilizado se puede nebulizar después de reconstitución. Alternativamente, el anticuerpo anti-trkC agonista se puede aerosolizar usando una formulación de fluorocarbono y un inhalador de dosis medida o inhalarse como un polvo liofilizado y molido.

En algunas realizaciones, puede estar presente más de un anticuerpo. Los anticuerpos pueden ser iguales o diferentes unos de otros. En algunas realizaciones, están presentes al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco anticuerpos anti-trkC agonistas diferentes. Preferiblemente, esos anticuerpos tienen actividades complementarias que no influyen negativamente unas a otras.

Se puede usar un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-trkC agonista (tal como un fragmento de unión de antígeno del mismo) para transferencia y expresión de anticuerpo anti-trkC agonista en una célula deseada. Es evidente que se puede usar un vector de expresión para dirigir la expresión de un anticuerpo anti-trkC agonista. El vector de expresión se puede administrar por vía intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal, dérmica o por inhalación. Por ejemplo, la administración de vectores de expresión incluye administración local o sistémica, que incluye inyección, administración oral, bombardeo de partículas o administración cateterizada y administración tópica. Un especialista en la técnica está familiarizado con la administración de vectores de expresión para obtener expresión de una proteína exógena *in vivo*. Véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N° 6.436.908; 6.413.942 y 6.376.471.

También se puede usar la administración dirigida de composiciones terapéuticas que comprenden un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-trkC agonista. Las técnicas de transferencia de ADN mediado por receptor se describen en, por ejemplo, Findies *et al.*, *Trends Biotechnol.* (1993) 11: 202; Chiou *et al.*, *Gene Therapeutics: Methods and Applications of Direct Gene Transfer* (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1988) 263: 621; Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1994) 269: 542; Zenke *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1990) 87: 3655; Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1991) 266: 338. Las composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido se administran en un intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para administración local en un protocolo de terapia génica. También se pueden usar intervalos de concentración de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg, aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg y aproximadamente 20 µg a aproximadamente 100 µg de ADN durante un protocolo de terapia génica. Los polinucleótidos y polipéptidos terapéuticos de la presente invención se pueden transferir usando vehículos de transferencia génica. El vehículo de transferencia génica puede ser de origen viral o no viral (véase en general, Jolly, *Cancer Gene Therapy* (1994) 1: 51; Kimura, *Human Gene Therapy* (1994) 5: 845; Connolly, *Human Gene Therapy* (1995) 1: 185 y Kaplitt, *Nature Genetics* (1994) 6: 148). La expresión de tales secuencias codificantes se puede inducir usando promotores endógenos de mamífero o heterólogos. La expresión de la secuencia codificante puede ser constitutiva o regulada.

Los vectores basados en virus para transferencia de un polinucleótido deseado y expresión en una célula deseada se conocen en la técnica. Los vehículos basados en virus ilustrativos incluyen, aunque sin limitación, retrovirus recombinantes (véase, por ejemplo, las Publicaciones PCT N° WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; las Patentes N° 5.219.740; 4.777.127; Patente GB N° 2.200.651 y el documento EP 0 345 242), vectores basados en alfavirus (por ejemplo, vectores de virus Sindbis, virus de los bosques Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), virus Ross River (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) y virus de encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR-1249; ATCC VR-532)) y vectores de virus adenoasociados (AAV) (véase, por ejemplo, las Publicaciones PCT N° WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 y WO 95/00655). La administración de ADN unido a adenovirus inactivados como se describe en Curiel, *Hum. Gene Ther.* (1992) 3: 147 también se puede utilizar.

También se pueden utilizar vehículos y métodos de transferencia no virales, que incluyen, aunque sin limitación, ADN condensado policationico unido o no unido a adenovirus inactivado solo (véase, por ejemplo, Curiel, *Hum. Gene Ther.* (1992) 3: 147); ADN unido a ligando (véase, por ejemplo, Wu, *J. Biol. Chem.* (1989) 264: 16985); células de vehículo de transferencia de células eucariotas (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.814.482; las Publicaciones PCT N° WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763 y WO 97/42338) y neutralización de carga nucleica o fusión con membranas celulares. También se puede emplear ADN desnudo. Los métodos de introducción de ADN desnudo ilustrativos se describen en la Publicación PCT N° WO 90/11092 y en la Patente de EE.UU. N° 5.580.859. Los liposomas que pueden actuar como vehículos de transferencia génica se describen en la Patente de EE.UU. N° 5.422.120; en las Publicaciones PCT N° WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445 y el documento EP 0 524 968. En Philip, *Mol. Cell Biol.* (1994) 14: 2411 y Woffendin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1994) 91: 1581 se describen enfoques adicionales.

El taxol (incluyendo otros taxanos) se puede administrar solo o junto con otros fármacos. Más comúnmente, el taxol se administra en una formulación que comprende etanol y cremofor ELTM, que se diluye en una solución de sal acuosa para tratamiento. El taxol también se puede formular en otras diversas configuraciones diferentes, tales como en emulsiones. El taxol se administra comúnmente junto con radioterapia y/u otros fármacos quimioterapéuticos, incluyendo, aunque sin limitación, diversos compuestos que contienen platino (cis-platino, carboplatino, oxaliplatino),

ifosfamida, 5-fluorouracilo, doxorubicina, epirubicina, ciclofosfamida, gemcitabina, exisulind, topotecan, etoposide, alcaloides vinca (vincristina, vinblastina y vinorelbina) y otros fármacos quimioterapéuticos conocidos en la técnica. El taxol se administra también junto con fármacos diseñados para contrarrestar o tratar los efectos secundarios adversos del taxol y/u otros agentes quimioterapéuticos que se administran en combinación con taxol. Por ejemplo, se pueden administrar fármacos tales como eritropoyetina (Epoiten, Darbopoiten), G-CSF y GM-CSF) junto con taxol para tratar los efectos hematológicos de agentes quimioterapéuticos. Como otro ejemplo, fármacos tales como fenotiacinas (Compazine), Zofran y Anzemet se pueden administrar junto con taxol para tratar las náuseas que frecuentemente acompañan el uso de agentes quimioterapéuticos. Los pacientes se pueden pre-mediar antes del tratamiento con taxol.

El taxol se usa comúnmente y se aprueba para tratar diversas malignidades que incluyen sarcoma de Kaposi y las de mama, ovario y pulmón. El taxol se usa también para tratar otras malignidades, que incluyen las de próstata, cabeza y cuello y diversas malignidades hematológicas. El taxol también se proporciona durante trasplantes de médula ósea, por ejemplo, para movilizar células madre antes del tratamiento de médula ósea. Los regímenes de dosificación representativos de taxol incluyen: 135 mg/m² o 175 mg/m² administrados por vía intravenosa durante 3 horas cada tres semanas (para carcinoma de ovario); 175 mg/m² administrados por vía intravenosa durante 3 horas cada tres semanas (para carcinoma de mama); 135 mg/m² administrados por vía intravenosa durante 24 horas (para carcinoma de pulmón de células no pequeñas); 135 mg/m² administrados por vía intravenosa durante 3 horas cada tres semanas o 100 mg/m² administrados por vía intravenosa durante 3 horas cada dos semanas (sarcoma de Kaposi). Véase también Información de Prescripción de Taxol (prospecto), Bristol Meyers Squibb (1998) (disponible en <http://www.taxol.com/txpi.html>). En otras realizaciones, el taxol se administra a 775 mg/m², 475 mg/m², 200 mg/m² y/o 350 mg/m². El taxol también se usa en dosis elevadas durante trasplante de médula ósea, por ejemplo, en dosis tan altas como 825 mg/m². En algunas realizaciones, el tratamiento con taxol durante trasplante de médula ósea es en conjunto con uno o más de los siguientes agentes: melfalan, ciclofosfamida, tiotepa y carboplatino. Véase, por ejemplo, Vahdat *et al* (2002) *Bone Marrow Transplant* 30(3): 149-153.

El anticuerpo anti-trkC agonista se puede administrar junto con el taxol, es decir, administrarse en combinación con, de acuerdo con o secuencialmente con taxol. Tal administración incluye administrar el anticuerpo al paciente antes de la administración del fármaco que induce la neuropatía (tal como taxol), administrar el anticuerpo al paciente durante la administración del fármaco que induce la neuropatía o administración del anticuerpo al paciente después de la administración del fármaco que induce la neuropatía. La administración en conjunto, como se describe en este documento, comprende la administración simultánea y/o administración en momentos diferentes. La administración en conjunto también abarca la administración como coformulación (es decir, el anticuerpo anti-trkC agonista y taxol están presentes (combinados) en la misma composición) y/o administración como composiciones separadas. Como se usa en este documento, “administración en conjunto” tiene por objeto abarcar cualquier circunstancia en la que se administren anticuerpo anti-trkC agonista y taxol en una cantidad eficaz a un individuo. Como se trata adicionalmente en este documento, se entiende que el anticuerpo anti-trkC agonista y el taxol se pueden administrar con frecuencias y/o intervalos de dosificación diferentes. Por ejemplo, un anticuerpo anti-trkC agonista se puede administrar semanalmente, mientras que el taxol se puede administrar más frecuentemente. Se entiende que un anticuerpo anti-trkC agonista y taxol se pueden administrar usando la misma vía de administración o diferentes vías de administración y que los diferentes regímenes de dosificación pueden cambiar durante el ciclo de la administración o administraciones. La administración puede ser antes de la aparición de la neuropatía sensorial.

El tratamiento de cáncer con taxol puede también potenciarse como se describe en este documento, mediante administración del taxol junto con un anticuerpo anti-trkC agonista. La administración de anticuerpo anti-trkC agonista puede permitir dosis de taxol aumentadas, debido a la eliminación de los efectos secundarios de tratamiento con taxol que limitan la dosis tales como neuropatía sensorial periférica. Las cantidades relativas y proporciones de anticuerpo anti-trkC agonista y taxol pueden variar. En algunas realizaciones, se administrará suficiente anticuerpo anti-trkC agonista para permitir una reducción de efectos secundarios indeseados (tales como neuropatía sensorial) inducidos por o asociados con tratamiento con taxol.

Métodos de evaluar eficacia de tratamiento con anticuerpos anti-trkC agonistas

La evaluación y diagnóstico de neuropatía sensorial inducida por taxol se conoce en la técnica. La evaluación y diagnóstico se pueden realizar en varios niveles diferentes. La evaluación se puede hacer supervisando signos clínicos, por ejemplo, respuestas electrofisiológicas o cambios anatómicos o moleculares en neuronas afectadas (incluyendo neuronas sensoriales). Véase, por ejemplo, Quasthoff (2002) *J. Neurology* 249: 9-17. En algunas realizaciones, la neuropatía sensorial inducida por taxol se caracteriza por cualquiera de los siguientes síntomas: parestesia simétrica distal, pal-hipoestesia, pérdida del sentido de posición articular, disestesia dolorosa, signo de Lhermitte, dolor (incluyendo alodinia y/o hiperalgesia), paresis progresiva distal y/o proximal, mialgia, fleo paralítico, hipotensión ortostática y arritmia y degeneración de neuronas sensoriales periféricas (incluyendo neuronas sensoriales de fibras gruesas). Como se conoce en la técnica, la evaluación clínica de la neuropatía sensorial inducida por taxol incluye, aunque sin limitación, cualquiera de un examen neurológico convencional, entrevista con paciente o ensayo cuantitativo más especializado. Estos ensayos cuantitativos más especializados pueden incluir, aunque sin limitación, determinación de la velocidad de conducción de las neuronas afectadas mediante, por ejemplo, uso de microneurografía u otros ensayos electrofisiológicos; determinación cuantitativa y/o cualitativa de la capacidad de sentir estimulación cutánea, que incluyen, aunque sin limitación, calor, tacto suave, vibración o discriminación entre dos puntos; ensayos de audición; ensayos especializados de equilibrio; ensayos especializados de propiocepción o sentido cinestésico; ensayos

de función autonómica, que incluyen, aunque sin limitación, ensayo de control de presión sanguínea y ensayos de respuesta de frecuencia cardíaca a diversos estímulos fisiológicos y farmacológicos. Estos ensayos pueden también incluir ensayos de habilidad motriz.

5 Composiciones para uso en tratamiento de neuropatía sensorial inducida por taxol

La invención también proporciona composiciones para uso en cualquiera de los métodos descritos en este documento. Las composiciones usadas en los métodos de la invención comprenden una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-trkC agonista. En una sección anterior y más adelante se han descrito también ejemplos de tales composiciones, así como cómo formularlos. La invención también proporciona cualquiera de las composiciones descritas para cualquier uso descrito en este documento en el contexto de uso como medicamento y/o uso para preparación de un medicamento.

La composición usada en la presente invención puede comprender además vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables (*Remington; The Science and practice of Pharmacy* 20ª Ed. (2000) Lippincott Williams y Wilkins, Ed. K. E. Hoover.), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones y pueden comprender tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como octadecildimetilbencil cloruro de amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalkonio; cloruro de benzetonio; fenol; alcohol butílico o bencílico; parabenos de alquilo tales como metil o propil parabenos; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; mono-sacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextranos; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sucrosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra iones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilen glicol (PEG). Excipientes farmacéuticamente aceptables se describen adicionalmente en este documento.

En un aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden un anticuerpo anti-trkC agonista. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-trkC agonista reconoce trkC humano. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-trkC agonista es humanizado (tal como el anticuerpo A5 descrito en este documento). En otras realizaciones, el anticuerpo anti-trkC agonista comprende una o más CDR de anticuerpo A5 (tal como una, dos, tres, cuatro, cinco o, en algunas realizaciones, las seis CDR de A5). En otras realizaciones, el anticuerpo agonista anti-trkC comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada mostrada en la Tabla 1 (SEC. ID. N°: 1) y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera mostrada en la Tabla 2 (SEC. ID. N°: 2). En otras realizaciones, el anticuerpo anti-trkC agonista es un anticuerpo humano.

Se entiende que las composiciones pueden comprender más de un anticuerpo anti-trkC agonista (por ejemplo, una mezcla de anticuerpos anti-trkC agonistas que reconocen diferentes epítomos de trkC). Otras composiciones ilustrativas comprenden más de un anticuerpo anti-trkC agonista que reconoce el mismo o los mismos epítomos o especies diferentes de anticuerpo anti-trkC agonista que se unen a epítomos diferentes de trkC.

El anticuerpo anti-trkC agonista y composiciones del mismo también se pueden usar junto con otros agentes que sirven para potenciar y/o complementar la eficacia del anticuerpo anti-trkC agonista. Por ejemplo, tales compuestos adicionales pueden incluir compuestos que se conoce que son útiles para el tratamiento de neuropatía sensorial inducida por taxol o efectos secundarios del tratamiento con taxol, por ejemplo, anemia o náuseas, que incluyen, aunque sin limitación; eritropoyetina (Epoiten, Darbopoiten), G-CSF y GM-CSF, fenotiacinas (Compazine), Zofran y Anzemet. Tales moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido. El anticuerpo anti-trkC agonista y composiciones del mismo también se pueden usar junto con otros agentes que sirven para potenciar y/o complementar la eficacia de los anticuerpos, que incluyen eritropoyetina (Epoiten, Darbopoiten), G-CSF y GM-CSF, fenotiacinas (Compazine), Zofran y Anzemet.

Equipos

Se pueden usar equipos en los presentes métodos. Los equipos incluyen uno o más recipientes que comprenden un anticuerpo anti-trkC agonista y, en algunas realizaciones, comprenden además instrucciones de uso de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención descritos en este documento (tales como métodos para tratar neuropatía sensorial inducida por taxol). Estas instrucciones pueden comprender una descripción de selección de un individuo adecuado para el tratamiento que se basa en identificar si ese individuo tiene una neuropatía sensorial inducida por taxol y/o está en riesgo de desarrollar neuropatía sensorial inducida por taxol y puede describir además la administración de anticuerpo agonista anti-trkC para tratamiento y/o prevención de neuropatía sensorial. Cualquiera de los equipos descritos puede ser para cualquier uso descrito en este documento en el contexto de uso como medicamento y/o uso para preparación de un medicamento.

Por tanto, los equipos pueden comprender un anticuerpo anti-trkC agonista. Los equipos para uso con los métodos descritos en este documento pueden comprender un anticuerpo anti-trkC agonista. Las instrucciones pueden comprender descripción de administración de taxol junto con un anticuerpo anti-trkC agonista.

Los equipos están en un embalaje adecuado. El embalaje adecuado incluye, aunque sin limitación, viales, botellas, jarras, embalaje flexible (por ejemplo, Mylar sellado o bolsas de plástico) y similares. El equipo puede comprender un recipiente y una etiqueta o prospecto o prospectos en o asociados con el recipiente. La etiqueta o prospecto indica que la composición es útil para tratar, prevenir o mejorar neuropatía sensorial inducida por taxol. Se pueden proporcionar instrucciones para practicar cualquiera de los métodos descritos en este documento. El recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar neuropatía sensorial inducida por taxol y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo agonista anti-trkC. El recipiente puede comprender además un segundo agente farmacéuticamente activo. Los equipos pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales tales como tampones e información interpretativa.

Los siguientes Ejemplos se proporcionan para ilustrar pero sin limitar la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Efecto de NT3 y anticuerpos monoclonales anti-trkC agonistas sobre la supervivencia neuronal y extensión axonal

NT3 ha estado implicado en el tratamiento neuropatías inducidas por cis-platino y piridoxina. Este ejemplo demuestra que los anticuerpos anti-trkC agonistas no mimetizaron todas las actividades biológicas de NT-3, el ligando fisiológico del receptor trkC.

Capacidad de NT-3 o anticuerpo monoclonal anti-trkC agonista de promover extensión neurítica de neuronas DRG adultas

Para ensayar la capacidad de los anticuerpos agonistas anti-trkC de mimetizar los efectos de NT-3 sobre neuronas sensoriales adultas, se dejaron crecer cultivos de neuronas DRG adultas en presencia o ausencia de diversas concentraciones de NT-3 o del anticuerpo monoclonal anti-trkC agonista de ratón 2256. Después de cultivo durante 48 horas, los cultivos se fijaron y tiñeron con anticuerpos RT97 y se evaluó la extensión neurítica en neuronas RT97+. Como se muestra en la Figura 1, el tratamiento con NT3 dio como resultado extensión neurítica aumentada, mientras que el tratamiento con un anticuerpo anti-trkC agonista no dio como resultado extensión significativa.

Ganglios de la raíz dorsal de ratas Sprague-Dawley adultas (6 meses de edad) se disecaron y se disociaron y cultivaron mediante técnicas convencionales (Lindsay, 1988, *J Neurosci.* Jul; 8(7): 2394-405. En resumen, los ganglios se extrajeron de sus envolturas y se incubaron en colagenasa durante dos períodos de 90 minutos a 37 grados. Después se lavaron exhaustivamente y se incubaron en tripsina durante 30 minutos. Después de un lavado adicional, los ganglios se disociaron por trituración suave a través de una pipeta Pasteur esterilizada con llama. Después las neuronas se enriquecieron en esta mezcla por sedimentación a través de un gradiente al 30% de Percoll (Pharmacia) como se describe en (Horie, 1994, *NeuroReport* 6, 37-40). Las neuronas enriquecidas se sembraron en una placa a una densidad de 6,25/mm² sobre placas de 96 pocillos recubiertas con poliornitina y laminina. El medio consistía en F-14 con aditivos de glutamina 2 mM, Albumax II al 0,35% (Gibco BRL), progesterona 60 ng/ml, putrescina 16 µg/ml, L-tiroxina 400 ng/ml, selenita de sodio 38 ng/ml, tri-yodo-tironina 340 ng/ml, penicilina 60 µg/ml y estreptomycin 100 µg/ml y los factores de ensayo apropiados añadidos a las concentraciones indicadas. Después de cuarenta y ocho horas de cultivo, las células se fijaron con formaldehído al 4% en PBS con sucrosa al 5% durante 16-24 horas a 4 grados centígrados.

La tinción con anticuerpo RT-97 se usó para indicar la subclase de neuronas DRG con cuerpos celulares grandes y que, *in vivo*, tendrían un axón mielinizado de diámetro grande. Esta clase preferiblemente expresaba trkC. Los cultivos se aclararon 3 veces con PBS y 3 veces con una solución Tris 0,1M que contenía gelatina al 0,1%, NaCl al 0,9% y triton (TGST) al 0,3%. Después los cultivos se incubaron durante la noche en anticuerpo RT-97 en una concentración 1/100 de TGST que contenía sucrosa al 5% y suero normal de burro al 4%. Esta incubación se terminó con lavado exhaustivo de los cultivos en TGST y se añadió un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón IgG conjugado Cy-3 a las células a una dilución de 1:400 durante cuatro horas en TGST que contenía sucrosa al 5% y suero normal de burro al 4%. Después de un lavado adicional exhaustivo en TGST, las células se examinaron y se capturaron imágenes digitalmente con óptica fluorescente con un objetivo 4x. Estas imágenes se analizaron para indicar selectivamente los procesos de las neuronas usando umbralización, binarización, esqueletonización y medición del área de píxel resultante de procesos neuronales. Los resultados, mostrados en Figura 1, se presentan como el área de píxel media de procesos neuronales (+/- el error típico de la media) (n=4). El tratamiento con NT-3 dio como resultado extensión neurítica aumentada, mientras que del tratamiento con un anticuerpo anti-trkC agonista no dio como resultado extensión significativa.

Capacidad de NT-3 y anticuerpo anti-trkC agonista monoclonal de promover supervivencia de neuronas trigeminales de rata embrionarias

El ganglio trigeminal (TG) está comprendido de neuronas sensoriales cutáneas que inervan la región facial. Una edad apropiada para ensayar un anticuerpo anti-trkC agonista para determinar actividad promotora de supervivencia en neuronas trigeminales de ratón es el día embrionario 11 (E11), puesto que a esta edad las neuronas expresan TrkC, responden a NT3 en cultivo y no pueden sobrevivir en ausencia de soporte neurotrófico. Una edad equivalente en la rata es E12.

Cultivos disociados de neuronas TG se establecieron a partir de ratones Swiss-Webster E11 o ratas Sprague Dawley E12. Ganglios disecados se tripsinizaron y se disociaron por trituración (Davies *et al.*, 1993, *Neuron* 11, 565-574). Las neuronas se sembraron en placas a densidad baja en placas de Petri de cultivo de tejido de 35 mm de diámetro en un medio definido sin suero sobre un sustrato de poliornitina/laminina. Se añadió BDNF (2 ng/ml) como un control positivo y algunas neuronas se cultivaron en ausencia de factores como un control negativo. NT3 (2, 0,4 y 0,08 ng/ml) y el anticuerpo anti-trkC agonista de ratón, 2256 (véase Publicación PCT No. WO 01/98361) (2, 0,4 y 0,08 µg/ml) se añadieron en el momento de la siembra en placa, en diversas concentraciones, por duplicado. Para cuantificar el número de neuronas supervivientes en condiciones experimentales diferentes, se hizo un recuento del número total de neuronas 4-6 horas después de la siembra en placa y de nuevo después de 24 y 48 horas. El número de neuronas a 24 y 48 horas se expresó como un porcentaje del recuento a las 6 horas.

Los resultados de este experimento se muestran en Figura 2. El tratamiento con NT-3, así como con el anticuerpo anti-trkC agonista, dieron como resultado supervivencia de neuronas trigeminales. BDNF promovió la supervivencia de la mayoría de neuronas trigeminales ("TG") de ratón E11 y de rata E12, que de otra manera murieron en ausencia de factores. Después de 24 horas de cultivo, concentraciones de NT3 tan bajas como 0,08 ng/ml promovieron la supervivencia de todas las neuronas sugiriendo que éste era un acontecimiento mediado por trkC. Sólo un subconjunto de neuronas TG de ratón se rescató por NT3 después de 48 horas en cultivo mientras que en cultivos de neuronas TG de rata la mayoría de las neuronas sobrevivió en presencia de NT3 después de 48 horas. Esto puede haber reflejado en parte la mejor salud global de las neuronas TG de rata como se ha evidenciado por supervivencia mayor de los cultivos de control de rata en comparación con los del ratón. Los anticuerpos agonistas anti-trkC fueron capaces de promover la supervivencia de las neuronas TG tanto de ratón E11 como de rata E12.

Ejemplo 2

Desarrollo y dependencia de dosis de neuropatía sensorial inducida por taxol en modelos animales experimentales

El desarrollo y dependencia de dosis de neuropatía sensorial inducida por taxol se examinó en ratas adultas. El taxol se preparó como una solución en Cremofor/etanol (50:50), que se diluyó con solución salina (1 parte Cremofor/etanol en cuatro partes de solución salina) inmediatamente antes de la dosificación. Las ratas adultas se trataron mediante infusión IV lenta el día 1 y día 4 del estudio. Un grupo recibió 12 mg/kg de taxol, un grupo recibió 15 mg/Kg de taxol, un grupo recibió 18 mg/kg de taxol y otro grupo recibió el vehículo solamente. La función neuronal sensorial de fibras gruesas se ensayó el día 0, el día 14 y el día 28 usando métodos electrofisiológicos esencialmente como se describe en Cilfifer *et al.*, *Ann Neurol* (1998) 43: 46-55. Específicamente, se midió la respuesta de ondas H (reflejo sensorial), la velocidad de conducción nerviosa sensorial y la proporción del potencial de acción del compuesto de ondas H y del potencial de acción del compuesto de ondas M mediante registro en el músculo del pie seguido de estimulación del nervio ciático en el muslo y el gemelo.

Registro ciático

El registro del nervio ciático se condujo como sigue: se usaron agujas de acero inoxidable como electrodos estimulantes (calibre 26), de registro (calibre 28) y de tierra. Para estimulación ciática, el ánodo se insertó en la escotadura ciática y el cátodo 1 cm distal al ánodo. Para la simulación tibial, el cátodo se insertó en el tobillo (tendón de Aquiles) y el ánodo 1 cm proximal al cátodo. Se colocaron electrodos de registro sobre el pie, el electrodo activo dentro de los músculos hallucis abductor y el electrodo de referencia en la base de la 5ª falange. Un electrodo de tierra se colocó en la base de la cola. Estímulos de onda cuadrada bifásicos de corriente continua y de 0,2 ms de duración se descargaron a una frecuencia de 0,2-0,5 Hz por medio de un estimulador de pulso aislado (A-M Systems, Modelo 2100). Las salidas registradas se amplificaron diferencialmente (Brownlee Precision, Modelo 210 A) y se adquirieron digitalmente a 20.000-40.000 muestras/s (AD Instruments, PowerLab/4SP) y se almacenaron en un ordenador para análisis posterior.

Las posiciones de los electrodos estimulantes se ajustaron para alcanzar el umbral para las ondas M o H y se varió la intensidad de estimulación para maximizar la amplitud de ondas H (Hmax) y la amplitud de ondas M (Mmax). La distancia entre los cátodos ciático y tibial se dividió entre la diferencia entre latencias de ondas M y ondas H desde los dos emplazamientos (hacia los primeros picos negativo principales) para calcular las velocidades de conducción motora y sensorial. Se midieron amplitudes de pico a pico para las ondas M y las ondas H y se calculó la proporción Hmax/Mmax para proporcionar una medición de la amplitud de ondas H normalizada con la amplitud de ondas M.

Registro del nervio caudal

El registro y la estimulación del nervio caudal se llevaron a cabo usando electrodos de acero inoxidable de calibre 26 descubiertos insertados subcutáneamente en la parte lateral de la cola. Un electrodo de tierra se colocó siempre a una distancia igual de los electrodos de estimulación y registro. Para la estimulación se usaron pulsos cuadrados de 0,2 ms de duración y 0,8-1 mA de amplitud a 0,5 Hz. La distancia entre los electrodos de registro fue constante (10 mm). Se usaron dos configuraciones (A y B) y en cada una de ellas se hizo una estimulación a dos distancias de los electrodos de registro:

A) Electrodos de estimulación proximales, electrodos de registro distales: Esta configuración ensayó la función motora en la cola. Para la primera medición, el cátodo se puso a 30 mm de la base de la cola y el ánodo a 1 cm

proximal. Para la segunda medición, los electrodos de estimulación se movieron 30-35 mm distal. En ambos casos los electrodos de registro se colocaron a 110-130 mm de la base de la cola.

B) Electrodo de estimulación distales, electrodos de registro proximales: Esta configuración ensayó la función sensorial en la cola. Los electrodos de registro se colocaron a 30 mm de la base de la cola. Para la primera medición (S1), los electrodos de estimulación se colocaron a aproximadamente 110-130 mm de la base de la cola. Para la segunda medición (S2), los electrodos de estimulación se colocaron aproximadamente 30-35 mm más proximales. La velocidad de conducción nerviosa se obtuvo midiendo la distancia entre dos puntos de estimulación y dividiendo los resultados entre la diferencia de latencia entre los puntos de estimulación proximales y distales.

Resultados

El tratamiento con 12 mg/kg y 18 mg/kg de taxol dio como resultado una función sensorial reducida. Específicamente, ensayos electrofisiológicos revelaron amplitud de ondas H tibial y ciática reducida (Figs. 3 A y 3 B, respectivamente), velocidad de conducción del nervio ciático reducida (Fig. 3C), amplitud de onda H de nervio caudal reducida (Figs. 4A y 4B, respectivamente), pero velocidad de conducción de nervio sensorial caudal reducida (Fig. 4C). El tratamiento con 15 mg/ml de taxol también dio como resultado función sensorial reducida (datos no mostrados). La gravedad de la neuropatía también era dependiente de dosis (véase las Figuras 3A-3C y 4A-4C). La dosificación de taxol de 12 mg/kg y 15 mg/kg se seleccionó para experimentación adicional, basándose en la rapidez y profundidad de la neuropatía obtenida en esas dosis.

Ejemplo 3

Efecto de anticuerpos monoclonales anti-trkC agonistas sobre neuropatía sensorial inducida por taxol en un modelo animal de rata

Se ensayó la capacidad de un anticuerpo monoclonal anti-trkC agonista para proteger de la neuropatía sensorial inducida por tratamiento con taxol. Se trataron ratas adultas por vía intravenosa con 5 mg/kg del anticuerpo anti-trkC agonista de ratón 2256 (véase Publicación PCT N° WO 01/98361) los días 0 y día 7 del estudio. Se administraron 15 mg/kg de taxol por infusión lenta IV los días 1 y 4. La función del nervio caudal se ensayó electrofisiológicamente el día 14 de acuerdo con el método descrito anteriormente. En resumen, se registró la respuesta de onda M (motor director) y onda H (reflejo sensorial) después de estimulación del nervio caudal como se describe en este documento. Los resultados se mostraron como la proporción de la amplitud potencial de acción sensorial del compuesto a la amplitud del potencial de acción motor del compuesto. Como se muestra en la Figura 5, el tratamiento con anticuerpo agonista anti-trkC evitó la pérdida de amplitud de potencial de acción del compuesto inducida por taxol. Esto indica que el tratamiento con anticuerpo agonista anti-trkC mejoró la neuropatía inducida por tratamiento con taxol en un modelo de rata. Se observaron anticuerpos secundarios de rata frente al anticuerpo anti-trkC agonista de ratón después de aproximadamente diez días después del inicio del tratamiento con anticuerpo.

Ejemplo 4

Desarrollo de neuropatía sensorial inducida por taxol en un modelo de ratón y efecto de los anticuerpos monoclonales anti-trkC agonistas sobre la neuropatía sensorial inducida por taxol

Este ejemplo describe un modelo de ratón para neuropatía sensorial inducida por taxol y demuestra que el tratamiento con un anticuerpo anti-trkC agonista mejoraba la neuropatía sensorial inducida por tratamiento con taxol en este modelo. El modelo de ratón proporcionaba una ventaja con respecto a que los anticuerpos agonistas anti-trkC de ratón son compatibles entre especies y, por tanto, no provocan una respuesta inmune indeseada cuando se administran.

Ratones Swiss-Webster hembra (de 8 semanas de edad) se aclimataron a la instalación durante una semana antes de empezar con la dosificación. Los animales se trataron con vehículo solo (control), taxol solo o anticuerpo anti-trkC agonista y taxol. Se obtuvo taxol en Calbiochem y se preparó como una solución de 20 mg/kg en Cremofor/etanol (50:50 p/p), que se diluyó con solución salina (1 parte de Cremofor/etanol a cuatro partes de solución salina vol:vol), se filtró a través de un filtro de 0.1 micra y se administró dentro de los 20 minutos siguientes a la preparación. Todos los animales de tratamiento un ciclo de tres tratamientos con taxol o control (vehículo) un día sí y otro no, por ejemplo, lunes, miércoles y viernes. La dosis total de taxol administrada a cada animal fue de 300 mg/m², dividida uniformemente en las tres dosis descritas anteriormente. La dosis de taxol se determinó en base a mg/m² (usando la fórmula en que el área de superficie corporal (en centímetros cuadrados) es igual a 10,5 veces el peso en gramos a los dos tercios de potencia). Se administró anticuerpo agonista anti-trkC 2256 en intervalos semanales, empezando con el día de la primera dosis de taxol. Se administró taxol IP y el anticuerpo anti-trkC se administró por vía subcutánea en la nuca. Toda la dosificación se administró en anestesia con isoflurano leve. Durante la semana siguiente al tratamiento con taxol, se proporcionaron antibióticos profilácticos en el alimento para prevenir infecciones oportunistas potenciales asociadas con depresión inmune transitoria inducida por taxol como sigue: sulfametoxazol (60 mg) y trimetoprim (10 mg) por comprimido de alimento de cinco gramos, por día, (Bio-Serv producto SO443-J).

La función de la neurona sensorial de fibras gruesas se ensayó el día 14 usando métodos electrofisiológicos como se describe más adelante. Específicamente, la proporción del CAP de onda H y el CAP de onda M se determinó en la cola después de estimulación del nervio caudal como se describe más adelante.

5 Registro del nervio caudal

10 Todos los registros y análisis se realizaron mediante especialistas ciegos para el tratamiento experimental de los animales. Se anestesió a los animales con ketamina/xylazina 60 mg/kg de ketamina IP más 5 mg/kg de xylacina IP y se mantuvo una temperatura rectal de 36-37 grados durante toda la sesión manteniendo al animal sobre una almohadilla caliente (deltaphase). El registro y la estimulación se realizaron a través de electrodos de acero inoxidable de calibre 26 descubiertos insertados subcutáneamente en la parte lateral de la cola. Siempre se colocó un electrodo de tierra a igual distancia de los electrodos de estimulación y de registro. Los electrodos se desinfectaron con RX-444 (u otro desinfectante adecuado) y se aclararon con agua entre animales. Para estimulación, se usaron pulsos cuadrados monofásicos de 0,2 ms de duración y amplitud de 0,8-1 mA a 0,5 Hz. La distancia dentro de los electrodos de registro fue constante (10 mm).

Para estudiar los componentes motores y sensoriales del nervio, se usan dos configuraciones (A y B) y en cada una de las mismas se realizó la estimulación a dos distancias de los electrodos de registro.

20 (A) Electrodos de estimulación proximales, electrodos de registro distales. Esta configuración ensayó la función motora en la cola. Para la primera medición (S1) el cátodo de estimulación se colocó a 15 mm de la base de la cola y el ánodo 1 cm proximal al cátodo. Para la segunda medición (S2), los electrodos de estimulación se movieron 10-15 mm distal. Para ambas mediciones, los electrodos de registro se colocaron a 35 mm de la base de la cola.

25 (B) Electrodos de estimulación distales, electrodos de registro proximales. Esta configuración ensayó la función sensorial en la cola. Los electrodos de registro se colocaron a 5 mm de la base de la cola y los electrodos de estimulación se colocaron en primer lugar a 35 mm de la base de la cola y en segundo lugar en una posición que fue 10-15 mm más proximal.

30 Resultados

Como se muestra en Figura 6, hubo una reducción significativa en el tamaño del potencial de acción en animales tratados con taxol y esto se evitó por tratamiento con 2 mg/kg de anticuerpo trkC agonista. Por tanto, el tratamiento con un anticuerpo anti-trkC agonista mejoró la neuropatía sensorial inducida por tratamiento con taxol. Tamaño de grupo; n=10 para vehículo, n=5 para taxol solamente y n=8 para taxol más anticuerpo.

Ejemplo 5

40 Efecto de anticuerpo anti-trkC agonista de ratón 2256 sobre alodinia inducida por taxol

Este experimento ensayó la eficacia del anticuerpo anti-trkC agonista para aliviarlos síntomas de dolor neuropático producidos por tratamiento con taxol, concretamente, alodinia mecánica. Las ratas tratadas con taxol desarrollan alodinia. Véase, por ejemplo, Poloman, *et al.*, *Pain* (2001), 94 (3): 293-304; Dina *et al* (2001) *Neuroscience* 108 (3): 507-15. Cuando las ratas se trataron con taxol, las mismas desarrollaron una alodinia mecánica de larga duración (es decir, sensación nociva aumentada frente a un estímulo no nocivo normalmente). El tratamiento con anticuerpo anti-trkC agonista 2256 mejoró la alodinia inducida por taxol. Además, los animales tratados con anticuerpo agonista anti-trkC y taxol mostraron recuperación más rápida de alodinia inducida por taxol que los animales tratados con taxol solo.

50 Se realizaron experimentos en ratas Sprague-Dawley macho (Harlan, Oregon WI). Se aclimataron 50 ratas a la instalación durante siete días y se aclimataron a las cámaras de ensayo de von Frey (jaulas de plástico con fondo de malla de alambre que permitía acceso total a las patas), durante dos días adicionales antes del ensayo.

La alodinia al estímulo mecánico (tacto) se ensayó usando una serie convencional de filamentos de von Frey (monofilamentos de nylon) para evaluar el umbral de retirada mecánica, usando el método de arriba y abajo descrito por Chaplan *et al.*, *J. Neurosci Methods*, 53(1): 55-63 (1994). Después de dos sesiones de ensayo de línea basal, se seleccionaron treinta y ocho ratas para el estudio, basándose en los resultados uniformes entre las dos sesiones de ensayo de línea basal y los resultados uniformes entre patas derecha e izquierda. Estas ratas se dividieron en dos grupos de trece animales cada uno (para tratamiento con taxol o taxol más mAb 22569) y un grupo de doce animales (para tratamiento con vehículo (control)). Los grupos se equilibraron por sus umbrales de respuesta de línea basal y peso corporal.

65 El día menos dos ("-2"), un grupo de trece animales recibió 2 mg/kg de anticuerpo agonista anti-trkC de ratón mAb 2256 inyectado por vía intraperitoneal. Estas inyecciones de anticuerpos se repitieron semanalmente por toda la duración del estudio.

El día cero, los animales empezaron su tratamiento con taxol o vehículo, básicamente como se describe por Palomino, anteriormente. Taxol de uso clínico (obtenido como una reserva de 6 mg/ml en un vehículo que comprende etanol

anhidro y Cremofor EL® (50:50, v:v); Mead Johnson Oncology Products, una división de Bristol Myers Squibb). Inmediatamente antes del uso, la solución madre de taxol se diluyó con solución salina de dextrosa hasta 1 mg/ml y se filtró de forma estéril a través de un filtro de 0,2 micras. Se usó una solución de Cremofor EL®/ etanol diluida y filtrada de forma similar como un control en el grupo de vehículo.

El taxol y la solución de control se administraron básicamente como se ha descrito en Polomano *et al.*, *Pain* 94(3): 293-304 (2001) por un investigador ciego para el estado del tratamiento con anticuerpos de los animales. Específicamente, en los días 0, 2, 4 y 6, a ambos grupos de trece animales (con y sin tratamiento de mAb 2256) se inyectó 1,0 mg/kg de taxol por vía intraperitoneal. Al grupo de doce animales (el grupo vehículo) se inyectó una solución de control de volumen igualado basándose en el mismo programa de dosificación.

En intervalos después del tratamiento con taxol (cada siete a once días), un investigador ciego para el tratamiento de cada animal y cualquier asignación de grupo realizó mediciones de umbral mecánico (es decir, alodinia mecánica). Se promediaron las mediciones del umbral de retirada de las patas derecha e izquierda para obtener una medida del umbral de retirada global. Esto se expresó como el porcentaje del umbral promedio obtenido para cada animal antes del tratamiento con taxol, es decir, la línea basal, como se presenta en la Figura 7. Se usó análisis de varianza de dos vías (ANOVA) para análisis estadístico de los datos.

Como se muestra en la Figura 7, las ratas tratadas con taxol solo desarrollaron una disminución significativa y de larga duración en el umbral de respuesta de los animales, indicando alodinia ($p < 0,0001$ usando análisis de 2 vías ANOVA). El cotratamiento de animales con taxol y anticuerpo anti-trkC agonista disminuyó la profundidad de alodinia observada con animales tratados con taxol y aumentó espectacularmente la velocidad de recuperación de la alodinia ($p < 0,05$, usando análisis de 2 vías ANOVA).

A pesar del esfuerzo para normalizar los modelos de roedor de neuropatía inducida por taxol, estos modelos presentaron variabilidad. Específicamente, en el modelo ratón, de tres intentos para generar una neuropatía sensorial electrofisiológicamente detectable mediante administración de taxol como se describe en esta solicitud, sólo uno dio una neuropatía estadísticamente significativa. El experimento que generó una neuropatía se muestra en este documento como un ejemplo y los animales tratados con taxol más anticuerpo anti-trkC agonista mostraron una protección significativa del efecto del taxol. La falta de neuropatía en los siguientes dos intentos puede haberse debido al cambio de fuente de los animales para los dos experimentos donde no se había generado una neuropatía significativa (es decir, los animales en el segundo y tercer experimento eran de una fuente diferente a los animales del primer experimento) debido a un brote de patógeno en el proveedor de ratones para el primer experimento. En el modelo de rata usando electrofisiología como un criterio de valoración, hubo un efecto variable del tratamiento de ratas con taxol. Además de los experimentos descritos en este documento, hubo dos experimentos en los que no se detectó neuropatía significativa. Además, hubo dos experimentos en los que se generó una neuropatía significativa y se observó una tendencia a la mejoría de la neuropatía en los animales tratados con anticuerpo, pero el efecto del tratamiento con anticuerpo agonista trkC no alcanzó el patrón de $p < 0.05$ de significancia estadística. En el modelo de rata, usando alodinia como un criterio de valoración, de un total de seis experimentos que intentaron generar un estado de alodinia debido al tratamiento con taxol, dos generaron satisfactoriamente ratas con alodinia. Uno de estos es el experimento mostrado en este documento como un ejemplo (donde el tratamiento con anticuerpo agonista trkC mejoró la alodinia) y el otro fue el primer experimento para ensayar el modelo y determinar si alodinia sería detectable. En este experimento, no hubo grupo de ratas tratadas con anticuerpo, de manera que no se pudo sacar ninguna conclusión del mismo acerca de la eficacia potencial del tratamiento con agonista trkC.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo agonista anti-trkC para tratar neuropatía sensorial inducida por taxano en un individuo.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que se trata dolor neuropático inducido por taxano.

3. El anticuerpo de la reivindicación 2, en el que el dolor neuropático comprende alodinia.

4. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo agonista anti-trkC se une a trkC humano y trkC de roedor.

5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo agonista anti-trkC se une a un epítipo continuo o discontinuo en el dominio 4 y/o dominio 5 de trkC.

6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo agonista anti-trkC es un anticuerpo humano.

7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo agonista anti-trkC es un anticuerpo humanizado.

8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

9. Una composición farmacéutica para tratar neuropatía sensorial inducida por taxano que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo agonista anti-trkC y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

FIGURA 1

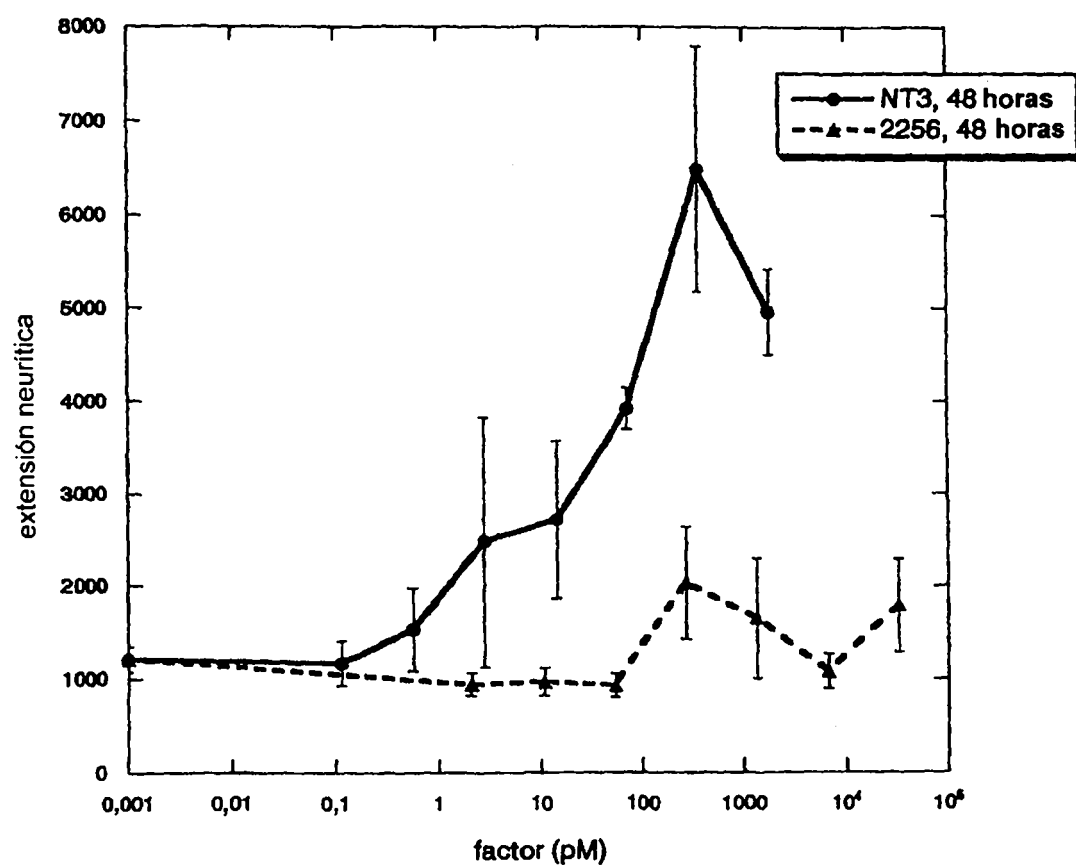


FIGURA 2

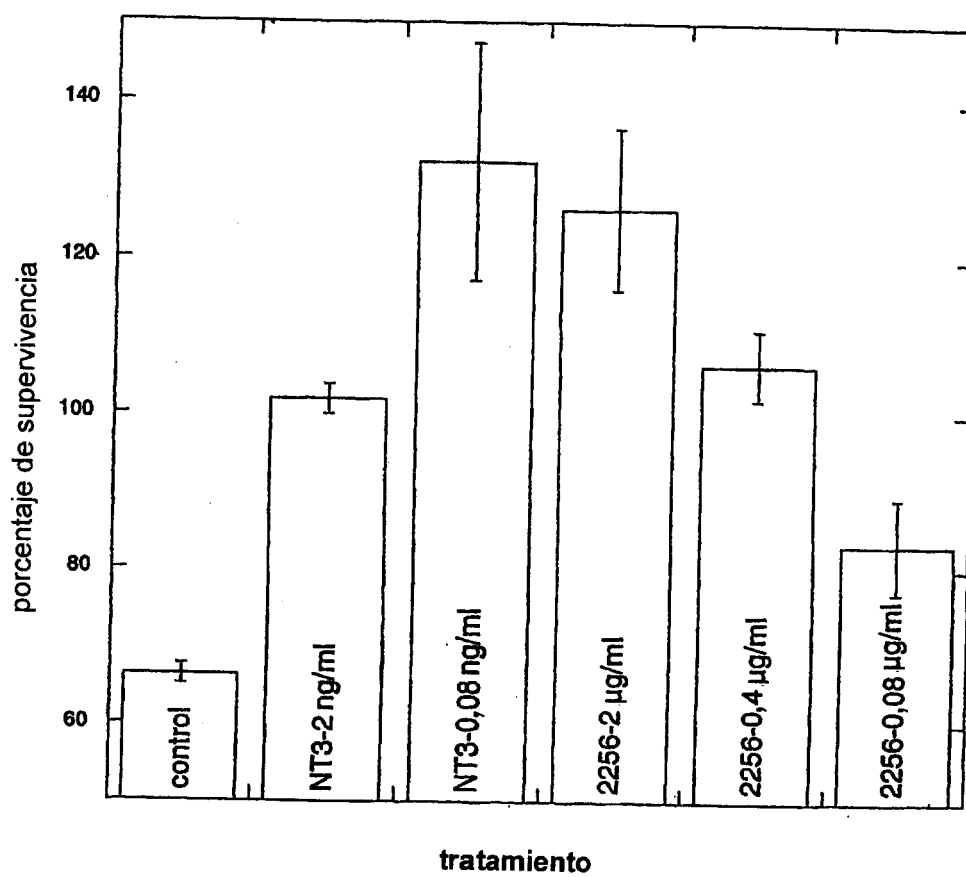


FIGURA 3A-3C

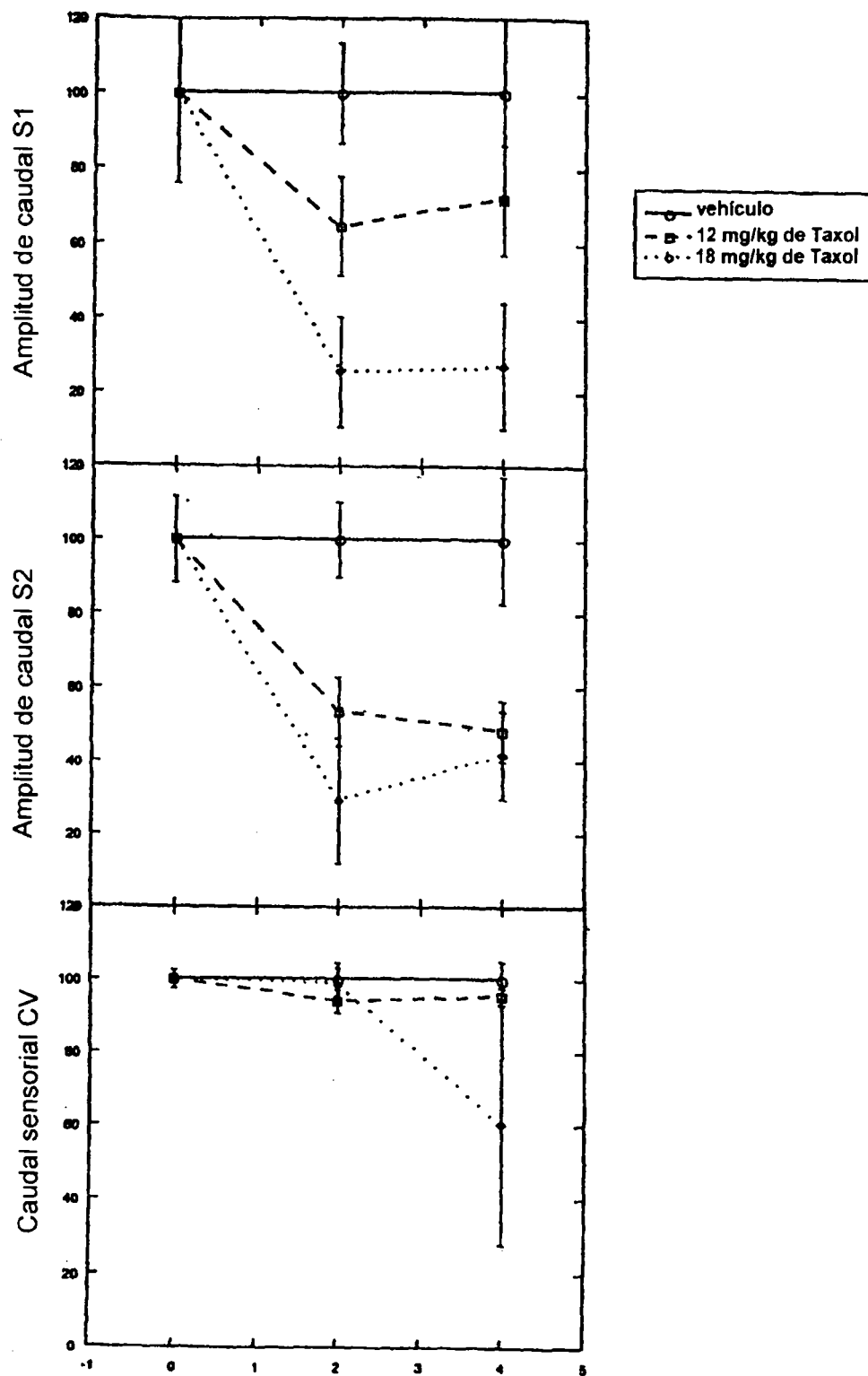


FIGURA 4A-4C

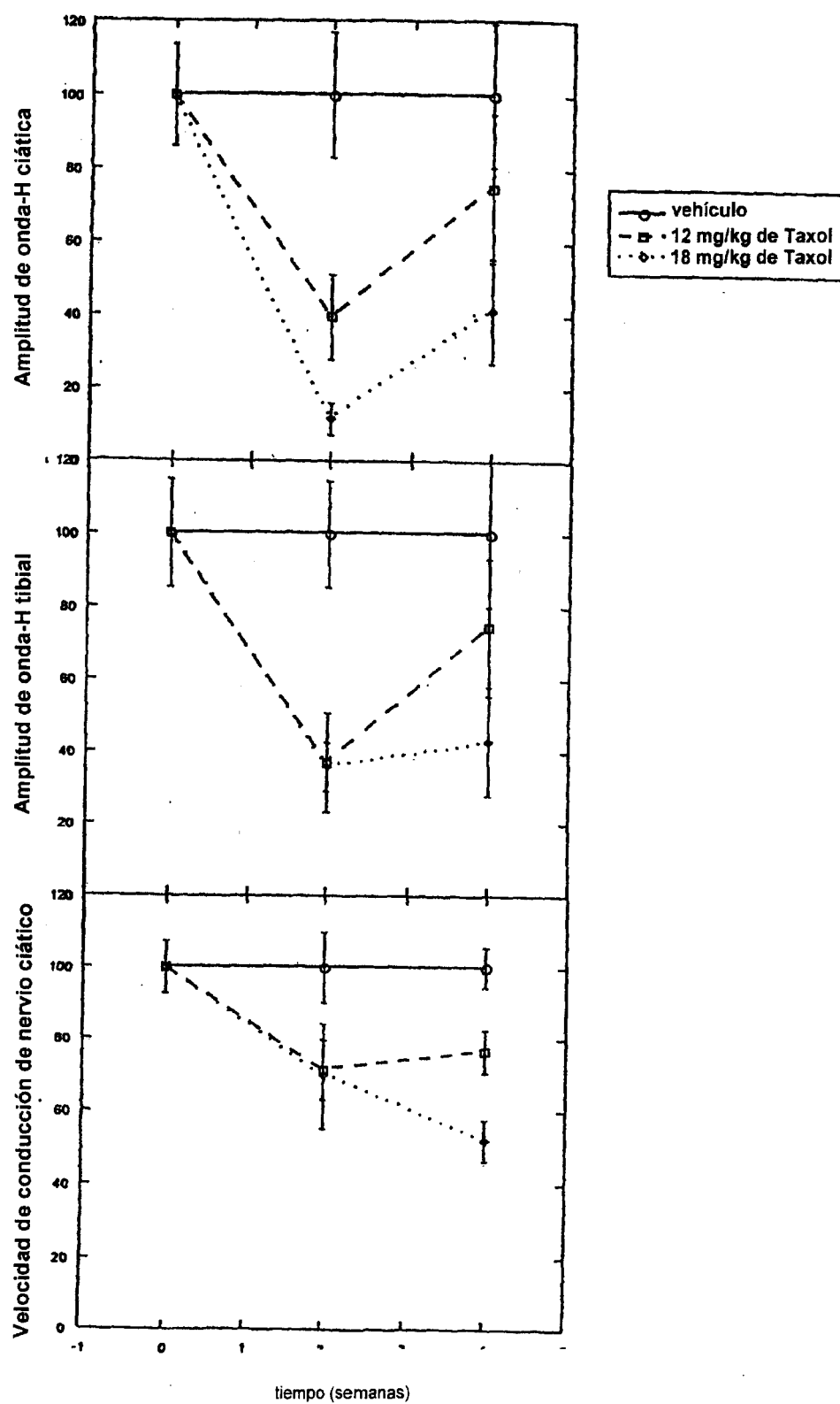
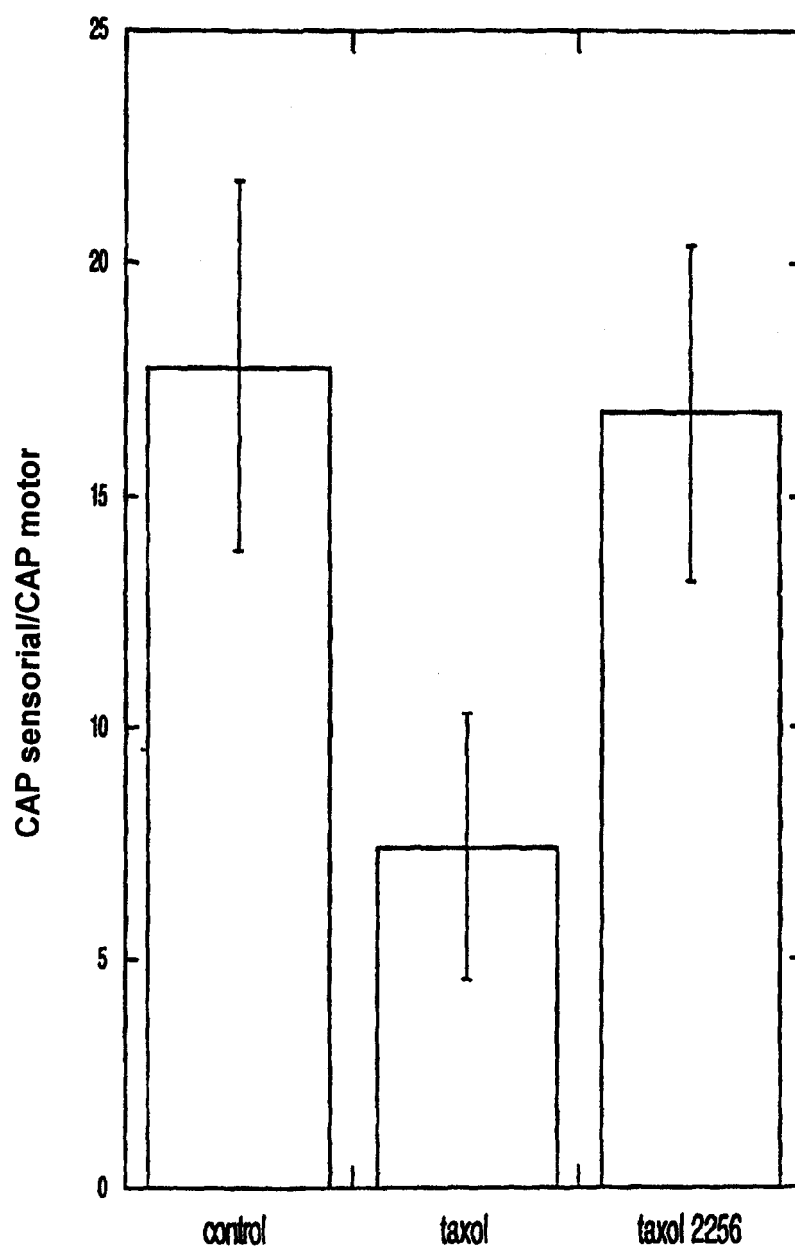
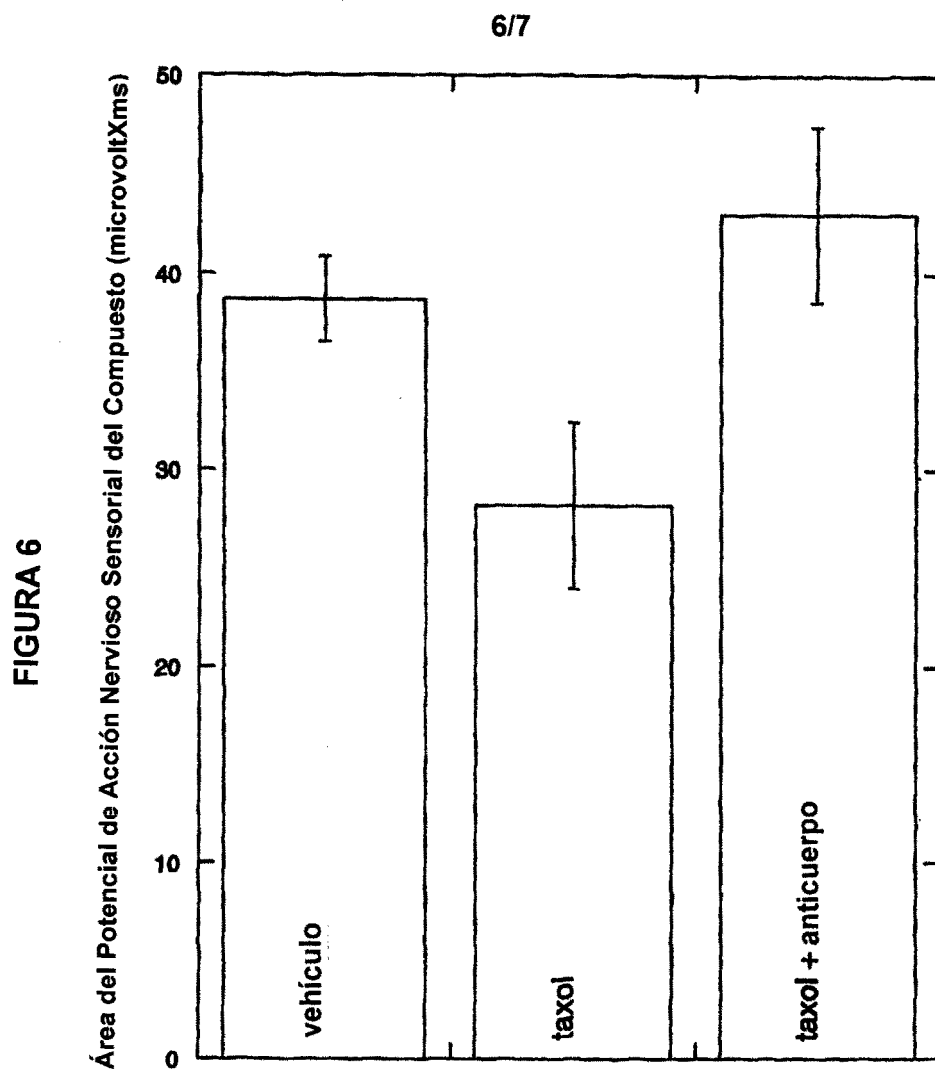


FIGURA 5

**El tratamiento con anticuerpo de trkC agonista
previene los cambios observados con neuropatía por taxol**





alodinia por taxol

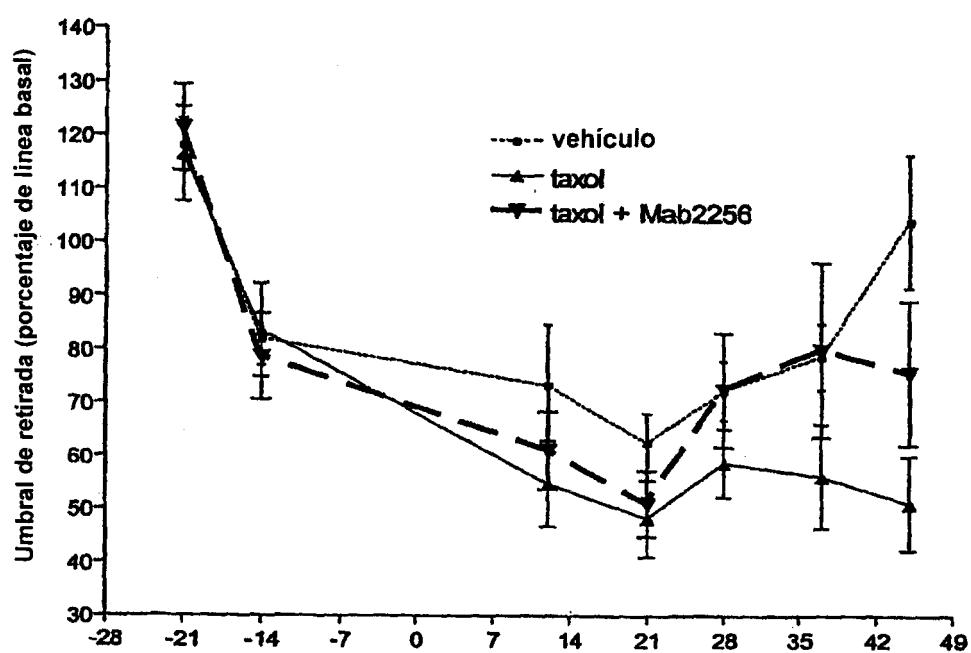


FIGURA 7