

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 905 682**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2012 E 18205428 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.11.2021 EP 3498732**

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

30 Prioridad:

06.05.2011 US 201161483488 P

06.09.2011 US 201161531439 P

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

11.04.2022

73 Titular/es:

**ZOETIS SERVICES LLC (100.0%)
10 Sylvan Way
Parsippany, NJ 07054, US**

72 Inventor/es:

GEARING, DAVID

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 905 682 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-factor de crecimiento nervioso y métodos de preparación y uso de los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos y fragmentos de los mismos que actúan como antagonistas del factor de crecimiento nervioso felino. La divulgación describe métodos para prepararlos, y la invención proporciona el uso terapéutico de estos anticuerpos y fragmentos en el tratamiento de afecciones asociadas con el factor de crecimiento nervioso como dolor, trastornos relacionados con el dolor y afecciones que dan como resultado la aparición de dolor en felinos, como se define en las reivindicaciones.

Antecedentes de la invención

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

Se ha descrito el uso de antagonistas de NGF para tratar el dolor y la sensibilidad al dolor en humanos (Cattaneo A., Curr. Op. Mol. Ther. 2010 12(1):94-106). Por ejemplo, la Solicitud de Patente Internacional N° WO 2006/131951 describe una forma humanizada del anticuerpo monoclonal alfaD11 (α D11) de rata. El anticuerpo α D11 tiene especificidad de unión al NGF de ratón, pero también se sabe que se une a formas humanas y de rata de NGF. Se requiere la humanización del anticuerpo monoclonal derivado de rata α D11 antes de la administración a humanos para minimizar la producción de anticuerpos neutralizantes que den como resultado una respuesta de anticuerpo anti-ratón humano (HAMA) que se monta contra anticuerpos derivados de roedores. Además, la sustitución de dominios constantes de ratón por dominios constantes humanos permite seleccionar funciones efectoras en sentido descendente.

El tratamiento del dolor en felinos se proporciona actualmente mediante la administración de fármacos analgésicos de varias clases, incluyendo anestésicos locales y generales, analgésicos opioides, agonistas de $\alpha 2$, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y esteroides. Cada uno de estos debe administrarse con frecuencia y también tiene limitaciones en cuanto a eficacia y seguridad. Por consiguiente, hay una necesidad de una forma de alivio del dolor eficaz, duradera y con dosis infrecuentes para los felinos que padecen dolor crónico, como aquellos con dolor neuropático u oncológico.

Aunque NGF se expresa en tejidos felinos, solo está disponible un clon parcial de su secuencia. Esta secuencia de ARNm parcial se define en el número de registro de Genbank EF065101 (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. ARNm de tipo beta del factor de crecimiento nervioso de *Felis catus*). No se ha descrito ningún antagonista del NGF felino, ni tampoco se ha descrito el uso de bloqueo de la señalización mediada por NGF en felinos para prevenir o aliviar el dolor. El uso en felinos de anticuerpos conocidos que actúan como antagonistas anti-NGF en otras especies no sería factible ya que no puede determinarse con certeza si un anticuerpo con especificidad de unión al factor de crecimiento nervioso expresado en otra especie también se unirá al factor de crecimiento nervioso felino. Además, también existe la posibilidad de que puedan producirse anticuerpos neutralizantes contra cualquier anticuerpo administrado, ya que sería reconocido como extraño por el sistema inmunitario felino. Cualquier producción de anticuerpos neutralizantes limitaría la administración a largo plazo del anticuerpo a felinos, siendo este un requisito particularmente importante cuando se trata una afección relacionada con el dolor crónico o una afección cancerosa. Además, la administración a un felino de un anticuerpo anti-NGF derivado de otra especie puede presentar reactividad cruzada con otros epítomos objetivo que pueden estar presentes en felinos, pero no presentes en la especie de la que se derivó originalmente el anticuerpo. Por consiguiente, hay una seria necesidad de miembros de unión que actúen como antagonistas del NGF felino y que retengan altos niveles de afinidad y avidéz de unión, evitando al mismo tiempo la producción de anticuerpos neutralizantes contra ellos, para su uso en el tratamiento del dolor en felinos.

La WO2010/027488 describe anticuerpos monoclonales.

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

Sumario de la invención

Después de amplios esfuerzos, el presente inventor ha producido sorprendentemente anticuerpos quiméricos y felinizados no inmunogénicos y fragmentos de unión derivados de los mismos que se unen

específicamente al NGF felino. En la presente se demuestra, de manera bastante inesperada, que la unión de los anticuerpos y fragmentos de unión de la invención a NGF felino secuestra la actividad biológica de NGF felino inhibiendo la unión de NGF felino al receptor TrkA de alta afinidad o al receptor p75. Esto, a su vez, evita la regulación por incremento de los neuropéptidos en las neuronas sensoriales con el efecto resultante de que la sensación de dolor se reducirá o eliminará. Los anticuerpos se han producido usando métodos de ADN recombinante de tal manera que sean sustancialmente no inmunogénicos, es decir, no se generan anticuerpos neutralizantes contra ellos cuando se administran a un sujeto felino. Tal descubrimiento es completamente sorprendente e inesperado, ya que los anticuerpos no se produjeron usando metodologías estándar, como injerto de CDR o similares.

La invención proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que es capaz de unirse específicamente al factor de crecimiento nervioso (NGF) felino e inhibir la capacidad del NGF felino para unirse al receptor de NGF felino p75 y/o TrkA, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23, y una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención o un fragmento de unión a antígeno del mismo, junto con por lo menos un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona además el anticuerpo de la invención o fragmento de unión a antígeno del mismo, para su uso en el tratamiento de una afección asociada con el dolor o para su uso en el tratamiento, mejora o inhibición del dolor asociado con poliartritis inmunomediada, osteoartritis o artritis reumatoide, o para su uso en el tratamiento de un tumor inducido a proliferar por NGF en un felino y afecciones asociadas con el mismo.

La invención proporciona además un kit para el tratamiento del dolor en felinos, o para el tratamiento de una afección asociada con el dolor, o para el tratamiento, mejora o inhibición del dolor asociado con poliartritis inmunomediada, osteoartritis o artritis reumatoide, o para el tratamiento de un tumor inducido a proliferar por NGF en un felino y afecciones asociadas con el mismo, que comprende un anticuerpo de la invención o un fragmento de unión a antígeno del mismo e instrucciones para su uso.

En la presente se describe un método para preparar un anticuerpo adecuado para su uso en un felino que comprende o consiste esencialmente de los pasos de:

- proporcionar un anticuerpo donante de una especie distinta a un felino, en donde el anticuerpo donante tiene especificidad de unión para un antígeno objetivo presente en felinos;
- comparar cada residuo de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de las regiones marco del anticuerpo donante con cada residuo de aminoácido presente en una posición correspondiente en la secuencia de aminoácidos de las regiones marco de uno o más anticuerpos de felino para identificar uno o más residuos de aminoácidos dentro la secuencia de aminoácidos de las regiones marco del anticuerpo donante que difieren de uno o más residuos de aminoácidos en la posición correspondiente dentro de la secuencia de aminoácidos de las regiones marco del uno o más anticuerpos de felino; y
- sustituir el uno o más residuos de aminoácidos identificados en el anticuerpo donante con uno o más residuos de aminoácidos presentes en la posición correspondiente en el uno o más anticuerpos de felino.

El método modifica un anticuerpo donante para su uso en un felino de tal manera que el anticuerpo modificado no contiene ningún aminoácido en ninguna posición dentro de las regiones marco que sería extraño en esa posición en felinos. Por lo tanto, el anticuerpo modificado conserva la especificidad y afinidad del anticuerpo donante por el antígeno objetivo, pero es importante que se modifique de tal manera que no se creen epítopos potencialmente extraños. Por lo tanto, el anticuerpo modificado no se considera extraño en felinos y, por lo tanto, no induce una respuesta inmunitaria en felinos que podría llevar a una neutralización de la eficacia del anticuerpo, especialmente después de la administración a largo plazo.

A veces, el paso de sustituir uno o más residuos de aminoácidos identificados comprende sustituir uno o más residuos de aminoácidos identificados con el uno o más residuos de aminoácidos presentes en la posición correspondiente que tienen la mayor homología con el uno o más residuos de aminoácidos sustituidos.

A veces, el método comprende además el paso de reemplazar dominios constantes de la cadena pesada y/o de la cadena ligera del anticuerpo donante con dominios constantes de una cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo felino. Típicamente, el dominio constante de cadena pesada se reemplaza con un dominio constante felino de tipo HC2.

El epítopo objetivo es el factor de crecimiento nervioso (NGF).

El método no comprende el injerto de CDR. Los anticuerpos preparados de acuerdo con el método

comprenden las CDR del anticuerpo donante, regiones marco felinizadas preparadas de acuerdo con el método y dominios constantes felinos.

En la presente se describe un anticuerpo quimérico o un fragmento de unión del mismo que se une específicamente al factor de crecimiento neuronal (NGF) felino, dicho anticuerpo quimérico comprendiendo dominios variables de cadena ligera y/o pesada derivados de un anticuerpo que se une al factor de crecimiento nervioso en una especie distinta a los felinos, y dominios constantes de cadena ligera y pesada obtenidos a partir de anticuerpos derivados de felinos. Típicamente, el anticuerpo quimérico o el fragmento de unión derivado del mismo se une al NGF felino en un epítipo de unión que, cuando se une, da como resultado la neutralización de la función biológica del NGF felino. Es decir, la unión del anticuerpo quimérico o el fragmento de unión al NGF felino secuestra la capacidad del NGF felino de unirse al receptor TrkA o al receptor p75. A veces, el anticuerpo quimérico, o fragmento de unión del mismo, se une al NGF felino con una afinidad de unión (K_D) de 1×10^{-8} o menos. En la presente se describe un anticuerpo quimérico anti-NGF felino o un fragmento de unión del mismo que se une al NGF felino y que neutraliza la capacidad del NGF felino para unirse a los receptores de NGF felino p75 o TrkA, el anticuerpo quimérico comprendiendo una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de por lo menos un 85, 90, 95 o 99% con la misma y/o una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o una secuencia que tiene una identidad de aminoácidos de por lo menos un 85, 90, 95 o 99% con la misma. Los dominios constantes de cadena pesada de la SEQ ID NO: 2 se derivan del anticuerpo derivado de *Felis catus* que está depositado con el número de registro de Genbank BAA32229.1. En un caso adicional, la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, que es un dominio constante unido a los dominios constantes de cadena pesada derivados del anticuerpo derivado del *Felis catus* que está depositado con el número de registro del Genbank BAA32230.1.

Típicamente, los dominios constantes del anticuerpo quimérico anti-NGF felino no median las funciones efectoras en sentido descendente asociadas con las regiones constantes del anticuerpo, como fijación del complemento, ADCC, unión al receptor de Fc o similares. A veces, los residuos de los dominios constantes de la cadena pesada pueden sustituirse por residuos que no pueden glicosilarse. A veces, la cadena pesada aglicosilada tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 o una secuencia que tiene una identidad de aminoácidos de por lo menos un 85, 90, 95 o 99% con la misma. El anticuerpo felinizado o el fragmento de unión del mismo neutraliza la función biológica del NGF felino, cuando se une al mismo. Es decir, la unión del anticuerpo felinizado o el fragmento de unión al NGF felino secuestra la capacidad del NGF felino para unirse al receptor de NGF TrkA o al receptor de NGF p75. El anticuerpo felinizado, o fragmento de unión del mismo, se une a NGF con una afinidad de unión K_D de 1×10^{-8} o menos. Típicamente, el anticuerpo felinizado no es inmunogénico en felinos.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo felinizado se prepara de acuerdo con el método de preparación de un anticuerpo de la divulgación.

En un aspecto adicional o relacionado de la invención y como se define en las reivindicaciones, se proporciona un anticuerpo neutralizante, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que es capaz de unirse específicamente al factor de crecimiento nervioso (NGF) felino, el anticuerpo o el fragmento de unión del anticuerpo que comprende, consiste de o consiste esencialmente de un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23, mientras que la divulgación incluye una secuencia que tiene una identidad de aminoácidos de por lo menos un 85, 90, 95 o 99% con la misma.

En algunas realizaciones, el anticuerpo neutralizante es un anticuerpo monoclonal. A veces, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. El anticuerpo de la invención es un anticuerpo felinizado, es decir, un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que ha sido desinmunizada de tal manera que no se producirán anticuerpos neutralizantes cuando se administre a un sujeto felino. En ciertas realizaciones, el anticuerpo felinizado se prepara de acuerdo con el método de preparación de un anticuerpo de la divulgación. Típicamente, los dominios constantes de la cadena pesada del anticuerpo se seleccionan o modifican mediante sustitución o delección de aminoácidos de manera que los dominios constantes no medien las funciones efectoras en sentido descendente.

En ciertas realizaciones como se define en las reivindicaciones, el anticuerpo felinizado o el fragmento de unión al anticuerpo del mismo comprende, consiste o consiste esencialmente de una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos un 85, 90, 95 o 99% de identidad de secuencia con la misma.

En un aspecto adicional o relacionado y como se define en las reivindicaciones, se proporciona un anticuerpo felinizado neutralizante, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que es capaz de unirse específicamente al factor de crecimiento nervioso (NGF) felino, el anticuerpo felinizado o el fragmento de unión del anticuerpo que comprende, consiste de o consiste esencialmente de un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, mientras que la divulgación incluye una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de por lo menos un 85, 90, 95 o 99% con la misma.

Típicamente, la región variable de la cadena pesada (VH) está unida a una región constante de la cadena pesada que comprende por lo menos un dominio constante de inmunoglobulina. Típicamente, una región constante de cadena pesada se compone de 3 dominios constantes en tándem (es decir, en línea), con una región bisagra que se proporciona entre 2 de los dominios para proporcionar flexibilidad estructural. Las regiones constantes de diferentes isotipos pueden comprender más o menos de 3 dominios constantes. En ciertas realizaciones, la región constante de la cadena pesada se deriva de un anticuerpo derivado de felino. Se conocen dos dominios constantes de felino diferentes (representados por los números de registro de Genbank BAA32229.1 y BAA32230.1), con la misma región de bisagra y ocho diferencias de secuencias de aminoácidos entre sus dominios CH3. Típicamente, dichos dominios constantes comprenden CH1, CH2 y CH3 junto con un conector adecuado (o "bisagra") localizado entre dichos dominios CH1 y CH2. Típicamente, el anticuerpo anti-NGF felino de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada unido a un dominio constante, en donde el dominio constante no da como resultado que una región Fc de anticuerpo medie en sentido descendente las funciones efectoras como la fijación del complemento, ADCC, unión al receptor de Fc o similares.

En ciertas realizaciones como se define en las reivindicaciones, el anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo comprende, consiste o consiste esencialmente de una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24 o una secuencia que tiene una identidad de aminoácidos de por lo menos un 85, 90, 95 o 99% con la misma.

En realizaciones particulares, el anticuerpo felinizado o el fragmento de unión derivado del mismo puede comprender una cadena pesada en la que por lo menos un residuo en un dominio constante ha sido sustituido o eliminado para prevenir la glicosilación de ese residuo. En ciertas realizaciones, el subtipo de cadena pesada se deriva de un anticuerpo felino del subtipo IgG2. En ciertas realizaciones adicionales, los dominios constantes se derivan del anticuerpo derivado de *Felis catus* que está depositado con el número de registro de Genbank BAA32230.1.

En otro aspecto adicional o relacionado más y como se define en las reivindicaciones, la presente invención se extiende a un anticuerpo felinizado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente al factor de crecimiento nervioso (NGF) felino y neutraliza su función biológica al unirse al receptor de NGF TrkA y al receptor de NGF p75, el anticuerpo felinizado o fragmento de unión al anticuerpo del mismo comprendiendo una cadena ligera y una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena ligera (VL) comprende, consiste o consiste esencialmente de una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23 (mientras que la divulgación incluye una secuencia que tiene una identidad de aminoácidos de por lo menos un 85, 90, 95 o 99% con la misma), y en donde el dominio variable de la cadena pesada (VH) comprende, consiste o consiste esencialmente de una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 (mientras que la descripción incluye una secuencia que tiene una identidad de aminoácidos de por lo menos un 85, 90, 95 o 98% con la misma).

En ciertas realizaciones como se define en las reivindicaciones, el anticuerpo felinizado o miembro de unión comprende una cadena ligera que comprende, consiste de o consiste esencialmente de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 o una secuencia que tiene una identidad de aminoácidos de por lo menos el 85%, más preferiblemente del 95% y lo más preferible por lo menos del 98% de identidad con la misma.

En ciertas realizaciones como se define en las reivindicaciones, el anticuerpo felinizado o miembro de unión comprende una cadena pesada que comprende, consiste o consiste esencialmente de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24 o un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de por lo menos el 85%, más preferiblemente del 95% y lo más preferible por lo menos del 98% de identidad con la misma.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo puede conjugarse con por lo menos una molécula informadora. En ciertas realizaciones adicionales, por lo menos un residuo en por lo menos uno de los dominios constantes puede sustituirse o eliminarse para evitar la glicosilación de ese residuo.

En la presente se describe un anticuerpo neutralizante, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que es capaz de unirse específicamente al factor de crecimiento nervioso (NGF) felino, el anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo, que comprende, consiste o consiste esencialmente de un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene una identidad de aminoácidos de por lo menos un 85, 90, 95 o 99% con la misma.

En la presente se describe un anticuerpo felinizado neutralizante, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que es capaz de unirse específicamente al factor de crecimiento nervioso (NGF) felino, el anticuerpo felinizado o el fragmento de unión del anticuerpo que comprende, consiste o consiste esencialmente de un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de por lo menos un 85, 90, 95 o 99%

Típicamente, la región variable de la cadena pesada (VH) está unida a una región constante de la cadena pesada que comprende por lo menos un dominio constante de inmunoglobulina. A veces, la región constante de la cadena pesada se deriva de un anticuerpo derivado de felino, por ejemplo, los representados por los números de registro de Genbank BAA32229.1 y BAA32230.1. Típicamente, dichos dominios constantes comprenden CH1, CH2 y CH3 junto con un conector adecuado (o "bisagra") localizado entre dichos dominios CH1 y CH2. Típicamente, el anticuerpo anti-NGF felino comprende un dominio variable de cadena pesada unido a un dominio constante, en donde el dominio constante no da como resultado funciones efectoras en sentido descendente mediadas por la región Fc del anticuerpo como fijación del complemento, ADCC, unión al receptor de Fc o similares.

En la presente se describe un anticuerpo felinizado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente al factor de crecimiento nervioso (NGF) felino y neutraliza su función biológica en la unión al receptor de NGF TrkA y el receptor de NGF p75, el anticuerpo felinizado o el fragmento de unión del anticuerpo del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena ligera (VL) comprende, consiste o consiste esencialmente de una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene una identidad de aminoácidos de por lo menos un 85, 90, 95 o 99% con la misma, y en donde el dominio variable de la cadena pesada (VH) comprende, consiste o consiste esencialmente de una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene una identidad de aminoácidos de por lo menos un 85, 90, 95 o 98% con la misma. A veces, dicha identidad es de una longitud de por lo menos aproximadamente 15 aminoácidos, preferiblemente aproximadamente 20 aminoácidos, más preferiblemente aproximadamente 25 aminoácidos.

A veces, el anticuerpo felinizado o miembro de unión comprende una cadena ligera que comprende, consiste o consiste esencialmente de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 o una secuencia que tiene una identidad de aminoácidos de por lo menos un 85%, más preferiblemente un 95% y lo más preferible por lo menos un 98% de identidad.

El inventor ha definido además una serie de regiones marco (FR) que pueden combinarse con regiones determinantes de la complementariedad (CDR) para formar dominios variables de cadena ligera y pesada felinizada. Cada uno de los dominios de cadena pesada y ligera tiene 4 regiones marco, denominadas FR1, FR2, FR3 y FR4.

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

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

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

Como se define adicionalmente en las reivindicaciones, la presente invención se extiende a un anticuerpo anti-NGF, o un fragmento de unión a antígeno de NGF del mismo, el anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo comprendiendo una región variable de cadena ligera que comprende por lo menos uno de:

una región marco FR1 que consiste o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26,
una región marco FR2 que consiste o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27,
una región marco FR3 que consiste o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28, y
una región marco FR4 que consiste o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29,

y/o una región variable de la cadena pesada que comprende por lo menos uno de:

una región marco FR1 que consiste o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30,
una región marco FR2 que consiste o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31,
una región marco FR3 que consiste o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32, y
una región marco FR4 que consiste o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33.

Típicamente, las CDR de cadena ligera y pesada se derivan de un anticuerpo que tiene especificidad de

unión a NGF, preferiblemente NGF felino, como se define en las reivindicaciones.

En ciertas realizaciones, el dominio variable de cadena ligera que comprende dicha por lo menos una región marco descrita anteriormente y definida adicionalmente en las reivindicaciones, se une a un dominio constante de cadena ligera derivado de felino, típicamente un dominio constante kappa de cadena ligera, pero opcionalmente un dominio constante de cadena ligera lambda. Como se define adicionalmente en las reivindicaciones, dicha cadena ligera comprende una región FR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26, una región FR2 con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27, una región FR3 con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28 y una región FR4 con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29 (mientras que la divulgación incluye una región marco con una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de por lo menos un 85, 90, 95 o 98% con las anteriores). A veces, dicha identidad tiene una longitud de por lo menos aproximadamente 5 aminoácidos, preferiblemente aproximadamente 10 aminoácidos.

En ciertas realizaciones adicionales, la región variable de la cadena pesada que comprende por lo menos una de las regiones marco descritas anteriormente y definidas adicionalmente en las reivindicaciones, se une a por lo menos un dominio constante de cadena pesada derivada de felino. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del dominio constante carece de modificaciones postraduccionales, o puede modificarse para eliminar cualquiera o todos los residuos que pueden estar sujetos a glicosilación N enlazada u O enlazada, de tal manera que los dominios constantes están aglicosilados.. Como se define adicionalmente en las reivindicaciones, la cadena pesada comprende una región FR1 con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30, una región FR2 con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31, una región FR3 con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32 y una región FR4 con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 (mientras que la divulgación incluye una región marco con una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de por lo menos un 85, 90, 95 o 98% con respecto a las anteriores). A veces, dicha identidad tiene una longitud de por lo menos aproximadamente 5 aminoácidos, preferiblemente aproximadamente 10 aminoácidos.

Pueden realizarse modificaciones en las regiones marco descritas en la presente. Es decir, el inventor ha identificado que para algunos residuos en cada región marco, hay una elección de aminoácidos para una posición dada. Es importante destacar que estas modificaciones de la región marco no dan como resultado un cambio conformacional de las regiones determinantes de la complementariedad asociadas, ya que esto puede alterar la especificidad y/o afinidad de unión del anticuerpo resultante. En ciertos casos, la divulgación se extiende a la introducción de 2 o más sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos de las regiones marco de la región variable de la cadena ligera y/o la región variable de la cadena pesada.

Por consiguiente, en ciertos casos, la divulgación se extiende a polipéptidos, como un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene una región FR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26 que ha sido modificada por una o más de las sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste de D1 es E o N, I2 es V, P o T, E3 es V o M, M4 es L o I, S7 es T, S10 es F, S12 es P o A, T14 es I o A, E17 es D, S18 es P o A, V19 es A, I21 es F y S22 es F.

En la presente se describe un anticuerpo anti-NGF, o un fragmento de unión a antígeno de NGF del mismo, el anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo comprendiendo una región variable de cadena ligera que comprende por lo menos uno de:

una región marco FR1 que consiste de o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8,
una región marco FR2 que consiste de o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9,
una región marco FR3 que consiste de o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, y
una región marco FR4 que consiste de o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11,

y/o una región variable de la cadena pesada que comprende por lo menos uno de:

una región marco FR1 que consiste de o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12,
una región marco FR2 que consiste de o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13,
una región marco FR3 que consiste de o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14, y
una región marco FR4 que consiste de o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15.

Típicamente, las CDR de cadena ligera y pesada se derivan de un anticuerpo que tiene especificidad de unión a NGF, preferiblemente NGF felino.

Típicamente, la producción de anticuerpos felinizados anti-NGF felino no requiere que se introduzcan mutaciones inversas en las regiones marco de los dominios variables de cadena ligera o pesada.

Por consiguiente, la divulgación se extiende a polipéptidos, como un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene una región FR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 que se ha modificado sustituyendo el aminoácido el residuo I en la

posición 21 (121) con el residuo de aminoácido A.

Además, se prefiere que los anticuerpos felinizados de la invención no tengan reactividad cruzada con ningún otro epítipo de unión presente en felinos (que no sea NGF), y además que no se generen anticuerpos neutralizantes contra los anticuerpos de la invención cuando se administran a un felino. Además, se prefiere que los dominios constantes de los anticuerpos no medien en ninguna función efectora en sentido descendente que incluye, pero no se limita a: fijación y activación del complemento, ADCC y unión y activación del receptor Fc. En ciertas realizaciones adicionales, pueden realizarse modificaciones en la secuencia de aminoácidos de las regiones constantes de la cadena pesada en los anticuerpos de la invención. Dicha modificación puede implicar la adición, sustitución o delección de uno o más residuos de aminoácidos. Dichos cambios de aminoácidos se realizan típicamente para modificar las características funcionales del anticuerpo. Por ejemplo, la modificación de aminoácidos puede realizarse para prevenir las funciones efectoras en sentido descendente mediadas por los dominios constantes del anticuerpo, por ejemplo evitando la capacidad del anticuerpo de unirse a los receptores Fc, activar el complemento o inducir la ADCC. Además, pueden realizarse modificaciones en la región bisagra del dominio constante de cadena pesada para modificar la vida media circulatoria de un anticuerpo cuando se administra a un felino.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, no interviene en las funciones efectoras posteriores. Típicamente, el anticuerpo o fragmento de unión tiene un subtipo de cadena pesada felina HC2.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo felinizado se prepara de acuerdo con el método de preparación de un anticuerpo de la divulgación.

La presente invención se extiende a fragmentos de anticuerpos que se unen al NGF felino y secuestran su capacidad para unirse a los receptores p75 o TrkA, como se define en las reivindicaciones.

En ciertas realizaciones, el fragmento de unión del anticuerpo puede comprender una secuencia de cadena pesada y de cadena ligera de la invención conectadas por un conector flexible para formar un anticuerpo de cadena sencilla.

Un Fv de cadena sencilla (scFv) comprende un dominio VH y VL. Los dominios VH y VL se asocian para formar un sitio de unión objetivo. Estos 2 dominios están enlazados covalentemente por un conector peptídico. Una molécula scFv puede tener la forma de VL-conector-VH, en los casos en que se requiere el dominio variable de la cadena ligera en el extremo N-terminal, o como VH-conector-VL en los casos en que se requiere el dominio VH en el extremo N-terminal. Por consiguiente, en ciertas realizaciones adicionales, el fragmento de unión a antígeno es un fragmento de anticuerpo Fv de cadena sencilla (scFv). En ciertas realizaciones adicionales, el fragmento de unión a anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de, pero no se limita a, un fragmento de anticuerpo Fab, un fragmento de anticuerpo Fab', un fragmento de anticuerpo F(ab')₂, un fragmento de anticuerpo Fv y un fragmento de anticuerpo scFv y similares.

En ciertas realizaciones adicionales, la invención proporciona anticuerpos multiespecíficos o multivalentes que comprenden un anticuerpo anti-NGF felino o un fragmento de unión derivado del mismo de acuerdo con la invención acoplado o unido a anticuerpos adicionales con diferentes especificidades de unión, para su uso en terapia de combinación. Un anticuerpo multiespecífico comprende por lo menos un anticuerpo felinizado o quimérico o un fragmento de unión derivado del mismo que se une específicamente a un primer epítipo de NGF felino, y por lo menos un sitio de unión específico para otro epítipo presente en NGF felino, o a un antígeno diferente. Un anticuerpo multivalente comprende anticuerpos o fragmentos de unión de anticuerpos que tienen especificidad de unión al mismo epítipo de NGF felino.

En la presente se describe un anticuerpo neutralizante anti-neurotrofina felinizado que comprende:

- (i) un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 23 o una secuencia que tiene por lo menos un 85% de identidad con la misma y/o un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 22 o una secuencia que tiene por lo menos un 85% de identidad con la misma, o
- (ii) un anticuerpo quimérico que tiene una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y/o una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

En la presente se describe un método para tratar, inhibir o aliviar el dolor en un felino, el método comprendiendo los pasos de:

- proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-NGF felino, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo es un anticuerpo felinizado de acuerdo con la presente invención o un fragmento de unión del mismo, o un anticuerpo quimérico de acuerdo con la divulgación, un

- fragmento de unión de lo mismo, y
- administrar el mismo a un felino con necesidad del mismo.

5 En ciertas realizaciones, el anticuerpo felinizado o fragmento de unión a antígeno del mismo es cualquiera de los proporcionados por los aspectos anteriores de la invención, como se define en las reivindicaciones.

10 En ciertas realizaciones, el dolor es un dolor neuropático. En particular, el dolor puede ser un dolor posoperatorio o posquirúrgico. El dolor postoperatorio puede resultar después de cualquier procedimiento quirúrgico que en felinos puede incluir, pero no se limita a, cirugía ortopédica, cirugía de tejidos blandos, procedimientos de ovariectomía, procedimientos de castración y similares. En ciertas realizaciones adicionales, el dolor es un dolor crónico asociado con el cáncer o una afección cancerosa (dolor oncológico). En ciertas realizaciones adicionales, el dolor está asociado con, o es resultado de, artritis, incluyendo poliartritis inmunomediada, inflamación, prurito, artritis reumatoide u osteoartritis.

15 En la presente se describe un método para el tratamiento de la artritis en un sujeto felino, dicho método comprendiendo los pasos de:

- proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-NGF felino de acuerdo con la invención o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y
- 20 - administrar el mismo a un felino con necesidad de ello. secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO 22 o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos un 85% de homología de secuencia con la misma.

25 En ciertas realizaciones, la artritis incluye las afecciones seleccionadas del grupo que consiste de poliartritis inmunomediada, artritis reumatoide, osteoartritis y afecciones relacionadas.

Típicamente, el tratamiento de la artritis comprende mejorar, inhibir, reducir, suprimir o retrasar la aparición del dolor asociado o atribuible a la enfermedad artrítica.

30 En la presente se describe un método para el tratamiento de una afección provocada por, asociada con o que da como resultado una expresión aumentada de NGF felino o una sensibilidad aumentada a NGF en un sujeto felino, dicho método comprendiendo los pasos de:

- 35 - proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-NGF felino de acuerdo con la invención o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y
- administrar el mismo a un felino con necesidad de ello.

40 En la presente se describe un método para el tratamiento de un tumor inducido a proliferar por NGF en un felino y las condiciones asociadas al mismo, dicho método comprendiendo los pasos de:

- proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-NGF felino de acuerdo con la invención o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y
- administrar el mismo a un felino con necesidad de ello.

45 Los ejemplos de analgésicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, butorfanol, buprenorfina, fentanilo, flunixin meglumina, merpidina, morfina, nalbufina y derivados de los mismos. Los AINE adecuados incluyen, pero no se limitan a, acetaminofeno, ácido acetilsalicílico, carprofeno, etodolac, ketoprofeno, meloxicam, firocoxib, robenacoxib, deracoxib y similares.

50 En varios aspectos adicionales, la presente invención se extiende a una composición que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo de acuerdo con cualquier aspecto anterior de la invención, como se define en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, la composición comprende además por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable.

55 Otro aspecto adicional más de la invención proporciona una composición farmacéutica para tratar el dolor, o una afección que resulta o es provocada por dolor crónico en un felino, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo felinizado anti-NGF felino de acuerdo con la presente invención, junto con por lo menos un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

60 En ciertas realizaciones, la composición comprende además por lo menos un analgésico, AINE, opioide, corticosteroide o esteroide.

En la presente se describe un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o los fragmentos de unión del anticuerpo de la invención.

65

En la presente se describe un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la invención. En la presente se describe un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o ligera o un dominio constante de cadena pesada y/o ligera de la invención. A veces, el vector de expresión comprende además una o más secuencias reguladoras. A veces, el vector es un plásmido o un vector retroviral.

En la presente se describe una célula huésped que incorpora el vector de expresión. En la presente se describe una célula huésped que produce el anticuerpo de cualquiera de los aspectos anteriores de la invención.

En la presente se describe un método para producir un anticuerpo neutralizante anti-NGF felino felinizado, el método comprendiendo el paso de cultivar la célula huésped para permitir que la célula exprese el anticuerpo neutralizante anti-NGF felino felinizado.

En la presente se describe un método para producir un anticuerpo felinizado anti-NGF felino de acuerdo con la invención que comprende los pasos de expresar uno o más de los polinucleótidos/ácidos nucleicos o vectores que expresan las cadenas ligeras y/o pesadas de los anticuerpos de la invención en una célula huésped adecuada, recuperar los polipéptidos expresados, que pueden expresarse juntos en una célula huésped, o por separado en diferentes células huésped, y aislar los anticuerpos.

En la presente se describe un método para tratar, mejorar o inhibir el dolor en un felino, el método comprendiendo el paso de administrar al felino una cantidad eficaz de un polinucleótido de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la invención.

En ciertas realizaciones, el dolor es un dolor agudo. En ciertas realizaciones, el dolor es un dolor crónico. Además, el dolor puede ser dolor posoperatorio o dolor resultante de cualquier procedimiento operatorio que en felinos puede incluir, pero no se limita a, cirugía ortopédica, cirugía de tejidos blandos, procedimientos de ovariectomía, procedimientos de castración y similares. En ciertas realizaciones adicionales, el dolor es un dolor crónico asociado con el cáncer o una condición cancerosa. En ciertas realizaciones adicionales, el dolor está asociado con, o es el resultado de, artritis o una condición artrítica que incluye poliartritis, inflamación, prurito, artritis reumatoide y osteoartritis.

En ciertas realizaciones, el dolor es un dolor agudo. En realizaciones adicionales, el dolor es un dolor crónico. Además, el dolor puede ser dolor posoperatorio o dolor resultante de cualquier procedimiento operatorio que en felinos puede incluir, pero no se limita a, cirugía ortopédica, cirugía de tejidos blandos, procedimientos de ovariectomía, procedimientos de castración y similares. En ciertas realizaciones adicionales, el dolor es un dolor crónico asociado con el cáncer o una condición cancerosa. En ciertas realizaciones adicionales, el dolor está asociado con, o es el resultado de, inflamación, prurito, artritis reumatoide u osteoartritis.

Otro aspecto adicional más de la presente invención proporciona un kit para el tratamiento del dolor en felinos, o para el tratamiento de una condición asociada con el dolor, o para el tratamiento, mejora o inhibición de la osteoartritis, artritis reumatoide o poliartritis asociada al dolor que comprende un anticuerpo de anti-NGF felino o fragmento de unión de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la invención e instrucciones de uso del mismo, como se define en las reivindicaciones.

En la presente se describe un kit de diagnóstico para la detección de un anticuerpo monoclonal anti-NGF felino en fluidos in vitro, ex vivo e in vivo, para su uso en la determinación de la concentración de dicho anticuerpo. El kit puede comprender cualquiera de los anticuerpos de la invención o un fragmento de unión del mismo. El kit puede comprender instrucciones de uso del mismo.

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1A es un gráfico que muestra la unión del anticuerpo quimérico de felino-rata al NGF felino. La Figura 1B muestra un gráfico que indica la unión del anticuerpo quimérico de felino-rata al NGF murino.

La Figura 2A muestra que el anticuerpo quimérico de felino-rata puede purificarse usando proteína A. La Figura 2B muestra un gel con bandas que indican cadenas tanto pesadas como ligeras del anticuerpo quimérico.

La Figura 3A es un gráfico que muestra la unión del anticuerpo felinizado al NGF felino.

La Figura 3B muestra un gráfico que indica la unión del anticuerpo felinizado al NGF murino.

La Figura 4A muestra que el anticuerpo felinizado puede purificarse usando proteína A. La Figura 4B muestra un gel con bandas que indican tanto la cadena pesada como la ligera del anticuerpo felinizado.

La Figura 5 es un gráfico que muestra la inhibición de la proliferación inducida por NGF de células TF-1 por el

anticuerpo felinizado anti-NGF felino.

La Figura 6 muestra un gráfico que muestra el depósito del complemento inducido por anticuerpos felinizados capturados por antígenos.

La Figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo quimérico de felino-rata de la divulgación, que incluye una secuencia líder y un codón de parada doble al final de la secuencia (SEQ ID NO: 20). Los residuos del dominio variable derivados de rata se muestran en negrita.

La Figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo quimérico de felino-rata de la divulgación, que incluye una secuencia líder y un codón de parada doble al final de la secuencia (SEQ ID NO: 21). Los residuos del dominio variable derivados de rata se muestran en negrita.

La Figura 9 muestra los residuos de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 3) de un anticuerpo felinizado de la divulgación. Los residuos que comprenden los 3 residuos de CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) están subrayados. Los asteriscos indican diferencias en un residuo con el residuo equivalente en el anticuerpo anti-NGF de ratón alfaD11 de rata. La numeración de los residuos es según Kabat.

La Figura 10 muestra los residuos de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada (SEQ ID NO: 4) de un anticuerpo felinizado de la divulgación. Los residuos que comprenden los 3 residuos de CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) están subrayados. Los asteriscos indican diferencias en un residuo con el residuo equivalente en el anticuerpo anti-NGF de ratón alfaD11 de rata. La numeración de los residuos es según Kabat.

La Figura 11 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo felinizado de la divulgación (SEQ ID NO: 5) en donde los residuos en negrita son los residuos de aminoácidos del dominio variable y los residuos posteriores son un dominio constante kappa de cadena ligera.

La Figura 12 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de un anticuerpo felinizado de la divulgación (SEQ ID NO: 6) en donde los residuos en negrita son los residuos de aminoácidos del dominio variable y los residuos posteriores son los residuos de los dominios constantes.

La Figura 13 muestra la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de un anticuerpo felinizado de la invención (SEQ ID NO: 22 - feN2-VH).

La Figura 14 muestra la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de un anticuerpo felinizado de la invención que tiene un dominio constante kappa de cadena ligera (SEQ ID NO: 23 - feN2-VK).

La Figura 15 muestra la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada completa de un anticuerpo felinizado de la invención (SEQ ID NO: 24 - feN2-HC2).

La Figura 16 muestra la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de un anticuerpo felinizado de la invención que tiene un dominio constante kappa de cadena ligera (SEQ ID NO: 25 - feN2-ILC).

La Figura 17 muestra que los anticuerpos monoclonales anti-NGF caninos preparados mediante un método correspondiente al método de la presente divulgación reducen el dolor inflamatorio en perros.

Descripción detallada de la invención

Tras una extensa experimentación, el inventor ha tomado la secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal (MAb) α D11 de rata anti-NGF de ratón y la ha usado para producir anticuerpos anti-NGF quiméricos y felinizados no inmunogénicos. El anticuerpo quimérico comprende los dominios variables de cadena ligera y pesada derivados del anticuerpo de rata alfaD11 anti-NGF de ratón unido a dominios constantes de cadena ligera y pesada derivados de anticuerpos felinos. Más sorprendentemente, se muestra que el anticuerpo felinizado, que no se produce usando técnicas estándar de injerto de CDR, muestra una unión de alta afinidad al NGF felino. Sorprendentemente, tanto los anticuerpos quiméricos como los felinizados neutralizan la función biológica del NGF felino, más específicamente inhibiendo la unión del NGF felino a los receptores de NGF basados en células TrkA y p75. Además, también se ha descubierto, inesperadamente, que cuando se administra a un felino, no se producen anticuerpos neutralizantes contra él. Por consiguiente, tanto los anticuerpos felinizados de la invención como los anticuerpos quiméricos de la divulgación son adecuados para el alivio del dolor crónico a largo plazo en gatos.

El proceso de generación de los dominios variables de cadena pesada y ligera para los anticuerpos de la invención que ha sido empleado por el inventor da como resultado el reemplazo de residuos de aminoácidos de rata (donantes) específicos que están presentes dentro de las regiones marco de los dominios variables de cadena ligera y pesada con residuos que, en base al análisis del inventor, retendrán la conformación de las regiones CDR y, por lo tanto, mantendrán la especificidad de unión y la avidéz, a la vez que reducen la presencia de epítomos

inmunogénicos que pueden dar como resultado la generación de anticuerpos neutralizantes contra el anticuerpo, si se administrase a felinos en forma inalterada. Específicamente, el método de preparación de anticuerpos de la invención (conocido como PETización) comprende evaluar la secuencia de las regiones marco de un anticuerpo donante (por ejemplo rata) para determinar su idoneidad para la administración a un felino comparando la secuencia de las regiones marco del anticuerpo donante con la secuencia de un anticuerpo o un grupo de anticuerpos derivados de felinos. Aunque la comparación puede ser entre la secuencia donante y un solo miembro de la secuencia objetivo, será obvio que se prefiere la comparación con un grupo de secuencias objetivo porque esto ampliará el número de opciones naturales en cada posición de Kabat en la especie objetivo. Esto no solo aumentará las posibilidades de una "coincidencia" entre el donante y el objetivo, sino que también ampliará las opciones de reemplazo cuando no exista una coincidencia. Como resultado, se podrá elegir un reemplazo con características lo más cercanas posible al donante. Cuando la secuencia donante y la secuencia felina difieren en cualquier número de Kabat o posición correspondiente, la secuencia donante se modifica para sustituir el residuo de aminoácido en cuestión con un residuo de aminoácido que se sabe que es natural en esa posición en felinos.

Cuando se requiere la sustitución de un residuo de aminoácido presente en una región marco de inmunoglobulina donante, típicamente esto se lleva a cabo usando el principio de sustitución conservadora en donde un residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que es natural en esa posición de Kabat en un felino y está tan estrechamente relacionado como sea posible en tamaño, carga e hidrofobicidad con el aminoácido que se está sustituyendo en la secuencia donante. La intención es elegir un reemplazo que no provocaría, o por lo menos provocaría solo una mínima, perturbación o alteración de la estructura tridimensional del anticuerpo donante. En ciertas situaciones, no habrá una opción clara y cada elección tendrá ventajas y desventajas. Una decisión final puede requerir un modelado tridimensional o incluso la expresión de varias secuencias alternativas. Sin embargo, en general, estará disponible una preferencia clara. Como resultado de este procedimiento, solo se realiza un cambio en la secuencia del donante cuando ese residuo sería extraño en el objetivo y el aminoácido de reemplazo está tan estrechamente relacionado como sea posible con el que reemplaza. Por tanto, se evita la creación de epítopos extraños, pero se conserva la estructura tridimensional general y, como resultado, también se conservan la afinidad y la especificidad.

Las regiones constantes de cadena ligera y pesada se derivan de anticuerpos derivados de felinos (objetivo). Los dominios constantes de cadena pesada se seleccionan o modifican de tal manera que no medien en funciones efectoras en sentido descendente. Como se ha descubierto, sorprendentemente, que se producen anticuerpos neutralizantes mínimos o nulos contra los anticuerpos producidos de acuerdo con la divulgación, se ha descubierto sorprendentemente que los anticuerpos tienen el beneficio asociado de una vida media circulatoria prolongada y la opción de dosificación repetida. Además, como la sustitución de los residuos del marco se realiza de tal manera que no afecte a la conformación tridimensional de las regiones CDR, no habrá variación en la especificidad de unión.

Hay cuatro isotipos principales de IgG en el hombre y el ratón y, aunque la nomenclatura es similar, difieren en comportamiento y función, incluyendo la afinidad por productos bacterianos como la proteína A y la proteína G, su capacidad para activar la citólisis dependiente del complemento (CDC) y su capacidad para inducir la muerte de las células objetivo mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). La selección de isotipos de IgG con dominios constantes activos o "armados" de CDC y ADCC se considera de beneficio clínico cuando los anticuerpos están diseñados para eliminar las células objetivo que llevan su antígeno afín, como en oncología o control de infecciones (por ejemplo, en uso médico humano se prefieren los isotipos de IgG1 humana para los propósitos anteriores). Por el contrario, la activación del sistema inmunitario se considera indeseable en otros entornos, como en el alivio de la inflamación, dolor o autoinmunidad y, por tanto, se prefieren los isotipos de IgG humana con actividad mínima de CDC y ADCC (por ejemplo, en tal uso médico humano, a menudo se prefieren los isotipos de IgG4). La selección de isotipos IgG con dominios constantes activos de CDC y ADCC se considera beneficiosa cuando los anticuerpos se diseñan para eliminar células objetivo que portan el antígeno afín, como en oncología o control de infecciones, por ejemplo, en uso médico humano se prefieren los isotipos de IgG1 humana. Por el contrario, la activación del sistema inmunitario se considera indeseable en otros entornos, como en el alivio de la inflamación, el dolor o la autoinmunidad, por lo que se prefieren los isotipos de IgG humana con actividad de CDC y ADCC mínima o "desarmada", por ejemplo, en uso médico en humanos se seleccionarían los isotipos de IgG4. Aunque no se sabe si los isotipos de MAb felino tendrán un espectro de actividades similar o diferente, se presume que la selección de cadenas pesadas armadas o desarmadas será de valor similar.

Tanto los anticuerpos felinizados de la invención como los anticuerpos quiméricos de la divulgación comprenden dominios constantes de cadena ligera y pesada derivados de felino. Además, tanto en los anticuerpos felinizados como en los quiméricos, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) se derivan del anticuerpo de rata alfaD11 anti-NGF de ratón. El anticuerpo α D11 fue descrito por primera vez por Cattaneo et al. (Cattaneo A, Rapposelli B, Calissano P. (1988) "Three distinct types of monoclonal antibodies after long-term immunization of rats with mouse nerve growth factor". J Neurochem 50(4): 1003-1010). El anticuerpo alphaD11 fue clonado posteriormente por Ruberti et al. ((Ruberti, F. et al. (1993) "Cloning and Expression of an Anti-Nerve Growth Factor (NGF) Antibody for Studies Using the Neuroantibody Approach". Cellular and Molecular Neurobiology. 13(5):559-568).

En los anticuerpos quiméricos de la divulgación, los dominios variables de cadena pesada y ligera son los dominios variables completos derivados del anticuerpo α D11.

En los anticuerpos felinizados de la invención, las regiones CDR derivadas del anticuerpo α D11 se combinan con secuencias de la región marco que, aunque se basan en las regiones marco presentes en el anticuerpo α D11, se han modificado mediante la sustitución de residuos de aminoácidos específicos. Este proceso da como resultado la eliminación de epítopos que pueden ser el objetivo de las células T después de la administración del anticuerpo a un felino. Además, las modificaciones del residuo marco se seleccionan de tal manera que se conserva la estructura terciaria de las regiones CDR, a la vez que se evita que se produzcan anticuerpos neutralizantes contra ellas, cuando el anticuerpo se administra a un felino.

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

Tabla 1 - Residuos de FR1 del dominio variable de la cadena ligera

Posición de FR1 de cadena ligera	Posición de numeración de la cadena ligera de Kabat	Residuos de aminoácidos del grupo 1	Residuos de aminoácidos del grupo 2
1	1	D	
2	2	I	
3	3	V	
4	4	M	
5	5	T	
6	6	Q	
7	7	T	
8	8	P	
9	9	L	
10	10	s	
11	11	L	
12	12	S	
13	13	V	
14	14	T	
15	15	P	
16	16	G	
17	17	E	
18	18	P	
19	19	A	
20	20	S	
21	21	A	I
22	22	S	
23	23	C	

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

Posición de FR2 de cadena ligera	Posición de numeración de la cadena ligera de Kabat	Residuos de aminoácidos del grupo 1	Residuos de aminoácidos del grupo 2
1	35	W	
2	36	Y	
3	37	L	
4	38	Q	

(continuación)

	Posición de FR2 de cadena ligera	Posición de numeración de la cadena ligera de Kabat	Residuos de aminoácidos del grupo 1	Residuos de aminoácidos del grupo 2
5	5	39	K	
	6	40	P	
	7	41	G	
	8	42	Q	
10	9	43	S	
	10	44	P	
	11	45	R	
	12	46	R	
15	13	47	L	
	14	48	I	
	15	49	Y	

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

	Posición de FR3 de cadena ligera	Posición de numeración de la cadena ligera de Kabat	Residuos de aminoácidos del grupo 1	Residuos de aminoácidos del grupo 2
	1	57	G	
25	2	58	V	
	3	59	P	
	4	60	D	
	5	61	R	
30	6	62	F	
	7	63	S	
	8	64	G	
	9	65	S	
35	10	66	G	
	11	67	S	
	12	68	G	
	13	69	T	
40	14	70	D	
	15	71	F	
	16	72	T	
	17	73	L	
	18	74	R	
45	19	75	I	
	20	76	S	
	21	77	R	
	22	78	V	
50	23	79	E	
	24	80	A	
	25	81	D	
	26	82	D	
55	27	82A	V	
	28	82B	G	
	29	82C	V	
	30	83	Y	
60	31	84	F	Y
	32	85	C	

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

	Posición de FR4 de cadena ligera	Posición de numeración de la cadena ligera de Kabat	Residuos de aminoácidos del grupo 1	Residuos de aminoácidos del grupo 2
5	1	95	F	
	2	96	G	
	3	97	P	
	4	98	G	
10	5	99	T	
	6	100	K	
	7	101	L	
	8	102	E	
15	9	103	I	
	10	104	K	

Tabla 5 - Residuos de FR1 del dominio variable de la cadena pesada

	Posición de FR1 de cadena pesada	Posición de numeración de la cadena pesada de Kabat	Residuos de aminoácidos del grupo 1	Residuos de aminoácidos del grupo 2
20	1	1	Q	D, H
	2	2	V	E
25	3	3	Q	L
	4	4	L	
	5	5	V	
	6	6	E	Q
	7	7	S	
30	8	8	G	
	9	9	G, A	R
	10	10	D, E	
	11	11	L	V
35	12	12	V	R, S
	13	13	Q	K
	14	14	P	
	15	15	G, E	
40	16	16	G, A	
	17	17	S	
	18	18	L	V
	19	19	R, K	S
45	20	20	L	I
	21	21	T	F, S
	22	22	C	
	23	23	A, V, M	K
50	24	24	A	T
	25	25	S	
	26	26	G	
	27	27	F	Y, L
55	28	28	S	T, N
	29	29	L	F, V
	30	30	T	S, G, R

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

Posición de FR2 de cadena pesada	Posición de numeración de la cadena pesada de Kabat	Residuos de aminoácidos del grupo 1	Residuos de aminoácidos del grupo 2
1	36	W	
2	37	V	LWFA
3	38	R	C
4	39	Q	
5	40	A	PT
6	41	P	
7	42	G	EA
8	43	K	QT
9	44	G	
10	45	L	F
11	46	E	Q
12	47	W	ET
13	48	M	VL
14	49	G	ATS

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

Posición de FR3 de cadena pesada	Posición de numeración de la cadena pesada de Kabat	Residuos de aminoácidos del grupo 1	Residuos de aminoácidos del grupo 2
1	66	R	
2	67	LF	
3	68	T	A
4	69	I	LV
5	70	ST	
6	71	R	AI
7	72	D	
8	73	TN	S
9	74	AS	GT
10	75	K	TRGQ
11	76	ND	
12	77	T	A
13	78	LA	
14	79	Y	DS
15	80	L	M
16	81	Q	ELR
17	82	M	LT
18	82A	N	SDT
19	82 B	S	INRT
20	82C	L	
21	83	KR	GT
22	84	ST	PA
23	85	E	TAD
24	86	D	
25	87	T	A
26	88	A	
27	89	T	VM
28	90	Y	
29	91	Y	CF
30	92	C	R
31	93	A	GITSV
32	94	R	KSTIVPN G

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

Posición de FR4 de cadena pesada	Posición de numeración de la cadena pesada de Kabat	Residuos de aminoácidos del grupo 1	Residuos de aminoácidos del grupo 2
1	103	W	R
2	104	G	R
3	105	Q	PVHR
4	106	G	
5	107	T	AVIS
6	108	LI	Q
7	109	V	
8	110	T	
9	111	V	
10	112	S	T
11	113	S	QAP

El anticuerpo felinizado de la invención, por lo tanto, difiere del anticuerpo monoclonal quimérico de la divulgación que comprende un dominio variable completo derivado de una primera especie (anticuerpo de rata alfaD11 anti-NGF de ratón) y dominios constantes derivados de una segunda especie (anticuerpos derivados de felino), o de un anticuerpo felinizado injertado con CDR, donde las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las regiones variables de cadena pesada y ligera comprenden residuos de aminoácidos derivados de un anticuerpo donante e introducidos en regiones marco (FR) y regiones constantes (CR) derivadas de un anticuerpo objetivo o de secuencias de la línea germinal felina.

Se prefiere que el anticuerpo felinizado retenga sustancialmente las propiedades de unión del anticuerpo original (donante) del que se derivan las CDR. Eso significa que el anticuerpo felinizado mostrará la misma o sustancialmente la misma afinidad y avidez de unión al antígeno que el anticuerpo donante del que se derivan las CDR, en este caso, el anticuerpo alfaD11 anti-NGF de ratón derivado de rata. Idealmente, la afinidad del anticuerpo felinizado no será menor del 10% de la afinidad del anticuerpo donante por el epítipo objetivo, más preferiblemente no menor de aproximadamente el 30%, y lo más preferible la afinidad no será menor del 50% del anticuerpo original. Los métodos para probar la afinidad de unión a antígeno son bien conocidos en la técnica e incluyen ensayos de unión media máxima, ensayos de competición y análisis de Scatchard.

Como se ha definido en la presente con anterioridad y como se define en las reivindicaciones, la presente invención se extiende a miembros de unión o fragmentos de unión a antígeno derivados de los anticuerpos felinizados de la invención, y la presente divulgación incluye miembros de unión o fragmentos de unión a antígeno derivados de los anticuerpos quiméricos de la divulgación. Tales fragmentos de unión a antígeno se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a NGF felino. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. En ciertas realizaciones, los miembros de unión o los fragmentos de unión a antígeno pueden ser miembros de unión aislados. Un miembro de unión o un fragmento de unión a antígeno de la invención puede comprender un fragmento de los anticuerpos de la presente invención, por ejemplo un fragmento de una molécula de anticuerpo completamente felinizada, como la cadena pesada o ligera solamente, o, por ejemplo, el dominio variable de la cadena pesada y/o ligera. En ciertas realizaciones, un miembro de unión puede comprender, consistir o consistir esencialmente de un dominio VH y/o VL de anticuerpo. Los dominios VH de los miembros de unión también se proporcionan como parte de la invención. Dentro de cada uno de los dominios VH y VL hay 3 regiones determinantes de la complementariedad ("CDR"), junto con 4 regiones marco asociadas ("FR"). Un dominio VH comprende típicamente 3 HCDR (regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada) y un dominio VL comprende típicamente 3 LCDR (regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera). Por consiguiente, un miembro de unión puede comprender un dominio VH que comprende, en secuencia, regiones VH CDR1 (o HCDR1), CDR2 (HCDR2) y CDR3 (HCDR3) junto con una pluralidad de regiones marco asociadas. Un miembro de unión puede comprender adicional o alternativamente un dominio VL que comprende dominios VL CDR1, CDR2 y CDR3 junto con regiones marco asociadas. Los dominios VH o VL típicamente comprenden cuatro regiones marco, FR1, FR2, FR3 y FR4, interpuestas con las 3 regiones determinantes de la complementariedad en la siguiente disposición: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

La Figura 9 muestra la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-NGF. Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están subrayadas. Además, la Figura 10 muestra la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-NGF. Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están subrayadas.

En las Figuras 9 y 10, los residuos del dominio variable de cadena ligera (Figura 9) y dominio variable de cadena pesada (Figura 10) se numeran convencionalmente de acuerdo con el sistema de numeración ideado por

Kabat et al. (Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H., Gottesman, K. y Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición. Publicación de NIH N° 91-3242). El sistema de numeración de Kabat se usa generalmente cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente los residuos 1-104 de la cadena ligera y los residuos 1-113 de la cadena pesada). Este sistema de numeración se usa en la presente memoria descriptiva, cuando se indique. Las designaciones de residuos de aminoácidos de Kabat no siempre se corresponden directamente con la numeración secuencial lineal de los residuos de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera de la presente invención proporcionadas en la secuencia enumerada en la SEQ ID NO correspondiente para esa secuencia. En particular, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o más aminoácidos que en la numeración estricta de Kabat correspondientes a un acortamiento de, o una inserción en, un componente estructural, ya sea una región marco o una región determinante de la complementariedad (CDR), de la estructura básica del dominio variable de la cadena pesada o ligera. La correcta numeración de residuos de Kabat puede determinarse para cualquier anticuerpo dado mediante la alineación de residuos en la secuencia del anticuerpo con una secuencia estándar a la que se ha aplicado la numeración de Kabat.

La Figura 10 muestra una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo felinizado anti-NGF. Esto también se muestra en la SEQ ID NO: 4. Sin embargo, en la Figura 10, la numeración usada (Kabat) tiene en cuenta los residuos de aminoácidos 80, 80A, 80B y 80C, mientras que en la SEQ ID NO: 4, la numeración continúa secuencialmente, es decir, los residuos 80, 81, 82 y 83. Lo mismo es cierto para los residuos de Kabat 100, 100A, 100B, 100C, 100D, 100E y 100F en la Figura 10.

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

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

Las técnicas usadas para la producción recombinante de fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ son bien conocidas por el experto en la técnica e incluyen las divulgadas en la Publicación de Patente de PCT Internacional WO 92/22324 y en Sawai et al., "Direct Production of the Fab Fragment Derived From the Sperm Immobilizing Antibody Using Polymerase Chain Reaction and cDNA Expression Vectors", 1995, AJRI 34:26-34. Ejemplos de técnicas que pueden usarse para producir scFv (fragmentos Fv de cadena sencilla) se describen en Huston et al., "Protein Engineering of Single-Chain Fv Analogs and Fusion Proteins", Methods in Enzymology, vol. 203:46-88 (1991).

En ciertas realizaciones, los fragmentos de anticuerpos pueden derivarse de anticuerpos de longitud completa mediante digestión proteolítica de acuerdo con el método de Morimoto et al., "Single-step purification of F(ab')₂ fragments of mouse monoclonal antibodies (immunoglobulins G1) by hydrophobic interaction high performance liquid chromatography using TSKgel Phenyl-5PW" Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)). Los fragmentos de anticuerpos también pueden ser producidos directamente por células huésped (Carter et al., "High level Escherichia coli expression and production of a bivalent humanized antibody fragment" Bio/Technology 10:163-167 (1992)).

Además de proporcionar anticuerpos monoclonales quiméricos y felinizados que tienen especificidad de unión al NGF felino y que antagonizan la función del NGF felino, la presente divulgación incluye además miembros de unión distintos de los anticuerpos, que comprenden un par de dominios de unión basados en la secuencia de aminoácidos de una región VL (variable de cadena ligera) como se define en la SEQ ID NO: 3 y una secuencia de aminoácidos de una región VH (variable de cadena pesada) como se define en la SEQ ID

En ciertas realizaciones, pueden usarse técnicas de ingeniería adicionales para modificar los anticuerpos de la presente invención, por ejemplo, incluyendo modificaciones de la región Fc que pueden alterar la vida media en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor de Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente del antígeno. Además, en ciertas realizaciones, pueden producirse anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que tienen patrones de glicosilación alterados. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención se altera para aumentar o disminuir el grado en el que el anticuerpo está glicosilado. La glicosilación de polipéptidos es típicamente o enlazada a N o enlazada a O. Enlazada a N se refiere a la unión de una fracción de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptidos asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la fracción de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación enlazada a O se refiere a la

unión de uno de los azúcares de N-aceilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. El inventor ha proporcionado la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada felina aglicosilada, que se define en la SEQ ID NO: 7.

Los anticuerpos quiméricos de la divulgación y los anticuerpos felinizados anti-NGF felino de la invención pueden PEGilarse haciendo reaccionar el anticuerpo con un derivado de plietilenglicol (PEG). A veces, el anticuerpo felinizado o quimérico está defucosilado y, por lo tanto, carece de residuos de fucosa.

En ciertas realizaciones, las modificaciones en las propiedades biológicas de un anticuerpo pueden lograrse seleccionando sustituciones que afecten a (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con las similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (A. L. Lehninger, in *Biochemistry*, 2ª Ed., 73-75, Worth Publishers, NuevaYork (1975)): (1) residuos no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M); (2) residuos polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q); (3) residuos ácidos: Asp (D), Glu (E); (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H). Alternativamente, los residuos de origen natural pueden dividirse en grupos basándose en las propiedades comunes de la cadena lateral: (1) residuos hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) residuos hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) ácidos: Asp, Glu; (4) residuos básicos: His, Lys, Arg; (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; (6) residuos aromáticos: Trp, Tyr, Phe. Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por un residuo derivado de otra clase. Tales residuos sustituidos pueden introducirse en los sitios de sustituciones conservadores o, en los sitios restantes (por ejemplo, no conservados).

En varios aspectos adicionales, la presente invención se extiende a un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti-NGF felino de la invención, o una porción de unión a antígeno del mismo unida a una molécula asociada. En ciertas realizaciones, tal conjugado anticuerpo-molécula asociada se conjuga por medio de un conector químico, como un conector de peptidilo, un conector de hidrazina o un conector de disulfuro. En ciertas realizaciones, el socio de acoplamiento es una molécula efectora, marcador, fármaco o molécula portadora. Las técnicas adecuadas para acoplar los anticuerpos de la invención a socios de acoplamiento tanto peptidilo como no peptidilo serán bien conocidas por los expertos en la técnica. Los ejemplos de marcadores adecuados incluyen marcadores detectables, como un marcador radiactivo, o un marcador enzimático, como peroxidasa de rábano picante, o fracciones químicas, como biotina. Alternativamente, el marcador puede ser un marcador funcional, por ejemplo, ricina, o profármacos que son capaces de convertir profármacos en fármacos activos en el sitio de unión del anticuerpo.

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

Moléculas de unión adicionales incluyen moléculas de aficuerpos (Patente de Estados Unidos 5.831.012), DARPs (proteínas de repetición de anquirina diseñadas) (Publicación de Solicitud de Patente de PCT Internacional WO 02/20565) y anticalinas (Patente de Estados Unidos Nº 7.250.297 y WO 99/16873). Los veracuerpos son otra tecnología mimética de anticuerpos. Los versacuerpos (Amunix, Publicación de solicitud de patente de Estados Unidos Nº 2007/0191272) son proteínas pequeñas, denominadas micropoteínas, de 3-5 kDa con más del 15% de residuos de cisteína, que forman un andamiaje de alta densidad de enlaces disulfuro que reemplaza el núcleo hidrófobo que típicamente muestra la proteína.

Los avímeros son otro tipo de mimético de anticuerpos. Los avímeros se originan a partir de la recombinación de familias de proteínas séricas humanas. Son cadenas de proteínas sencillas compuestas por dominios de unión modulares, cada uno de los cuales está diseñado para unirse a un sitio objetivo particular. Los avímeros pueden unirse simultáneamente a sitios en una única proteína objetivo y/o sitios en múltiples proteínas objetivo. Este mecanismo de unión, conocido como unión multipunto o avidéz, imita la forma en que las células y moléculas interactúan en el cuerpo, apoya la generación de antagonistas y agonistas y da como resultado fármacos con funciones múltiples y una actividad potente. Las bibliotecas de avímeros pueden producirse de acuerdo con la WO 2004/044011. Las bibliotecas de avímeros también están disponibles comercialmente en Avidia Inc, Mountain View, California, USA.

Producción de anticuerpos

Los anticuerpos y los miembros de unión de la invención pueden producirse total o parcialmente mediante síntesis química. Por ejemplo, los anticuerpos y los miembros de unión de la invención pueden prepararse mediante técnicas que son bien conocidas por los expertos en la técnica, como síntesis de péptidos líquida estándar, o mediante métodos de síntesis de péptidos en fase sólida. Alternativamente, los anticuerpos y los miembros de unión pueden prepararse en solución usando técnicas de síntesis de péptidos en fase líquida, o además mediante una combinación de química en fase sólida, fase líquida y solución.

La presente divulgación incluye la producción de los anticuerpos o miembros de unión de la invención mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica por lo menos un aminoácido que comprende un anticuerpo de la invención en un sistema de expresión adecuado, de tal manera que un péptido o polipéptido deseado pueda codificarse. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica la cadena ligera de aminoácidos y un segundo ácido nucleico que codifica una cadena pesada de aminoácidos pueden expresarse para proporcionar un anticuerpo de la presente invención.

En la presente se describen ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos que forman los anticuerpos o miembros de unión de la presente invención.

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

El experto en la técnica puede preparar fácilmente secuencias de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o miembros de unión de la invención usando técnicas que son bien conocidas por los expertos en la técnica, como las descritas en Sambrook et al. "Molecular Cloning", A laboratory manual, cold Spring Harbor Laboratory Press, Volúmenes 1-3, 2001 (ISBN-0879695773), y Ausubel et al. Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, 4ª Edición, 1999 (ISBN - 0471250929). Dichas técnicas incluyen (i) el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar muestras de ácido nucleico, (ii) síntesis química, o (iii) preparación de secuencias de ADNc. El ADN que codifica anticuerpos o miembros de unión de la invención puede generarse y usarse de cualquier manera adecuada conocida por los expertos en la técnica, incluyendo la toma de ADN codificante, identificando sitios de reconocimiento de enzimas de restricción adecuados en cualquier lado de la porción que se va a expresar y el corte de dicha porción del ADN. La porción escindida puede entonces enlazarse operativamente a un promotor adecuado y expresarse en un sistema de expresión adecuado, como un sistema de expresión disponible comercialmente. Alternativamente, las porciones relevantes de ADN pueden amplificarse usando cebadores de PCR adecuados. Pueden realizarse modificaciones en las secuencias de ADN usando mutagénesis dirigida al sitio.

Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o los miembros de unión de la invención pueden proporcionarse como constructos en forma de un plásmido, vector, casete de transcripción o expresión que comprende por lo menos un ácido nucleico como se ha descrito anteriormente. El constructo puede estar comprendido dentro de una célula huésped recombinante que comprende uno o más constructos como anteriormente. La expresión puede lograrse convenientemente cultivando, en condiciones apropiadas, células huésped recombinantes que contienen secuencias de ácidos nucleicos adecuadas. Después de la expresión, el anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse y/o purificarse usando cualquier técnica adecuada, y luego usarse según sea apropiado.

Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de células huésped diferentes son bien conocidos. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamíferos, levaduras, insectos y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamíferos disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster y células de mieloma de ratón NS0. Un huésped bacteriano preferido común es *E. coli*. La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en células procariotas como *E. coli* está bien establecida en la técnica. La expresión en células eucariotas en cultivo también está disponible para los expertos en la técnica como una opción para la producción de un miembro de unión.

Las técnicas generales para la producción de anticuerpos son bien conocidas por el experto en la técnica, y tales métodos se describen, por ejemplo, en Kohler y Milstein (1975) Nature 256:495-497; Patente de Estados Unidos Nº 4.376.110; Harlow y Lane, Antibodies: a Laboratory Manual, (1988) Cold Spring Harbor. Las técnicas para la preparación de moléculas de anticuerpos recombinantes se describen en las referencias anteriores y también en, por ejemplo, La Patente Europea Número 0,368,684.

A veces, se emplean ácidos nucleicos recombinantes que comprenden un inserto que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o un dominio variable de cadena ligera de anticuerpos o miembros de unión. Por

definición, tales ácidos nucleicos comprenden ácidos nucleicos de cadena sencilla codificados, ácidos nucleicos de cadena doble que consisten de dichos ácidos nucleicos codificantes y de ácidos nucleicos complementarios a los mismos, o estos propios ácidos nucleicos complementarios (de cadena sencilla).

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

10 Los anticuerpos de la invención pueden producirse por medios recombinantes, no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferiblemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferiblemente es una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para las células huésped procariontes que no reconocen y procesan una secuencia señal de anticuerpo nativa, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procarionte seleccionada, por ejemplo, del grupo de los líderes de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o enterotoxina II termoestable.

20 El término "aislado", cuando se usa en referencia a los anticuerpos felinizados de la invención, o a miembros de unión derivados de los mismos, o polipéptidos que codifican los mismos, se refiere al estado en el que dichos anticuerpos, miembros de unión o ácidos nucleicos (polinucleótidos) se proporcionan en forma aislada y/o purificada, es decir, se han separado, aislado o purificado de su entorno natural, y se proporcionan en una forma sustancialmente pura u homogénea, o, en el caso de ácido nucleico, libres o sustancialmente libres de ácido nucleico o genes de origen distintos de la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida. Por consiguiente, tales anticuerpos aislados, miembros de unión y ácidos nucleicos aislados estarán libres o sustancialmente libres de material con el que están asociados de manera natural, como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su entorno natural, o el entorno en el que se preparan (por ejemplo, cultivo celular) cuando tal preparación es mediante tecnología de ADN recombinante puesta en práctica in vitro o in vivo.

30 Los anticuerpos, los miembros de unión y los ácidos nucleicos pueden formularse con diluyentes o adyuvantes y todavía, con fines prácticos, pueden considerarse proporcionados en una forma aislada. Por ejemplo, los anticuerpos y los miembros de unión pueden mezclarse con gelatina u otros portadores si se usan para recubrir placas de microtitulación para su uso en inmunoensayos, o se mezclarán con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se usen en diagnóstico o terapia. Los anticuerpos o miembros de unión pueden glicosilarse, ya sea de manera natural o mediante sistemas de células eucariotas heterólogas (por ejemplo, células CHO o NSO, o pueden estar (por ejemplo, si se producen por expresión en una célula procarionte) no glicosilados.

40 También forman parte de la invención preparaciones heterogéneas que comprenden moléculas de anticuerpos felinizados anti-NGF felino. Por ejemplo, tales preparaciones pueden ser mezclas de anticuerpos con cadenas pesadas de longitud completa y cadenas pesadas que carecen de lisina C-terminal, con varios grados de glicosilación y/o con aminoácidos derivatizados, como la ciclación de un ácido glutámico N-terminal para formar un residuo de ácido piroglutámico.

45 *Composiciones farmacéuticas*

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

55 En ciertas realizaciones, la formulación comprende además un tampón. Típicamente, el pH de la formulación es de aproximadamente un pH de 5,5 a aproximadamente un pH de 6,5. En ciertas realizaciones, el tampón puede comprender de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 60 mM de tampón de histidina, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM de tampón de succinato, o de aproximadamente 5 mM a 25 mM de tampón de acetato. En ciertas realizaciones, el tampón comprende cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 10 mM a 300 mM, típicamente a una concentración de aproximadamente 125 mM y citrato de sodio a una concentración de aproximadamente 5 mM a 50 mM, típicamente 25 mM. En ciertas realizaciones, la formulación puede comprender además un surfactante a una concentración de justo por encima del 0% a aproximadamente el 0,2%. En ciertas realizaciones, el surfactante se selecciona del grupo que consiste de, pero no se limita a: polisorbato-20, polisorbato-40, polisorbato-60, polisorbato-65, polisorbato-80, polisorbato-85 y combinaciones de los mismos. En una realización preferida, el surfactante es polisorbato-20 y puede comprender además cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 125 mM y citrato de sodio a una concentración

de aproximadamente 25 mM.

Administración

Los anticuerpos o miembros de unión de la presente invención pueden administrarse solos pero preferiblemente se administrarán como una composición farmacéutica que comprenderá generalmente un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable adecuado seleccionado dependiendo de la vía de administración pretendida. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados incluyen; agua, glicerol, etanol y similares.

El anticuerpo monoclonal o miembro de unión de la presente invención puede administrarse a un paciente felino con necesidad de tratamiento por cualquier vía adecuada. Típicamente, la composición puede administrarse por vía parenteral mediante inyección o infusión. Los ejemplos de vías preferidas para la administración parenteral incluyen, pero no se limitan a; intravenosa, intracardiaca, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, intracavitaria, subcutánea, transmucosa, inhalatoria o transdérmica. Las vías de administración pueden incluir además la tópica y enteral, por ejemplo, mucosal (incluyendo pulmonar), oral, nasal, rectal.

En las realizaciones en las que la composición se administra como una composición inyectable, por ejemplo en aplicación intravenosa, intradérmica o subcutánea, el ingrediente activo puede estar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica relevante son capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer o inyección de lactato de Ringer. Pueden incluirse conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según se requiera.

La composición también puede administrarse mediante microesferas, liposomas, otros sistemas de administración de micropartículas o formulaciones de liberación sostenida colocadas en ciertos tejidos, incluyendo la sangre.

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

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

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

Los ejemplos de regímenes de dosificación que pueden administrarse a un sujeto pueden seleccionarse del grupo que comprende, pero no se limita a; 1 µg/kg/día hasta 20 mg/kg/día, 1 µg/kg/día hasta 10 mg/kg/día, 10 µg/kg/día hasta 1 mg/kg/día. En ciertas realizaciones, la dosificación será tal que se obtenga una concentración en plasma de 1 µg/ml a 100 µg/ml del anticuerpo. Sin embargo, la dosis real de la composición administrada y la velocidad y el curso temporal de la administración dependerán de la naturaleza y la gravedad de la afección que se está tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, etc., es en última instancia responsabilidad y discreción de los practicantes veterinarios y otros médicos veterinarios, y típicamente tiene en cuenta el trastorno a tratar, la condición del paciente individual, el sitio de administración, el método de administración y otros factores conocidos a los practicantes clínicos.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el significado comúnmente entendido por una persona experta en la técnica en el campo de la presente invención.

En toda la memoria descriptiva, a menos que el contexto exija lo contrario, se entenderá que los términos "comprender" o "incluir", o variaciones como "comprende" o "que comprende", "incluye" o "que incluye" implican la

inclusión de un número entero o grupo de números enteros establecido, pero sin la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros.

Como se usa en la presente, términos como "un", "uno" y "el" incluyen referentes en singular y plural a menos que el contexto claramente exija lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un agente activo" o "un agente farmacológicamente activo" incluye un único agente activo así como dos o más agentes activos diferentes en combinación, mientras que las referencias a "un portador" incluyen mezclas de dos o más portadores así como un único portador y similares.

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

En relación con el dolor operatorio o posoperatorio, la Ley de Bienestar Animal de los Estados Unidos (Ley de Bienestar Animal de 2002. Regulaciones de la AWA, CFR, Título 9 (Animales y productos de origen animal), Capítulo 1 (Servicio de Inspección de Sanidad Animal y Vegetal, Departamento de Agricultura). Subcapítulo A (Bienestar animal), Partes 1-4) define un procedimiento doloroso como cualquier procedimiento del que se podría esperar razonablemente que cause más que dolor o angustia leve o momentánea en un ser humano al que se le aplicó ese procedimiento, es decir, dolor en exceso del causado por inyecciones u otros procedimientos menores. Por lo tanto, si un felino se somete a un procedimiento quirúrgico doloroso, el animal debe recibir analgésicos postoperatorios.

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

El término "nocicepción" se refiere a la percepción de estímulos nocivos. Como se define en la presente, "dolor neuropático" (también conocido como "neuralgia") es un dolor que proviene de problemas con las señales de los nervios. Puede surgir como consecuencia de una lesión o enfermedad que afecte al sistema somatosensorial. Hay causas de dolor neuropático y puede estar asociado con sensaciones anormales llamadas disestesia, que se producen espontáneamente. Alternativamente, puede estar asociado con alodinia que se produce cuando el dolor aparece, o empeora, con un toque o estímulo que normalmente no causaría dolor. Por ejemplo, un ligero toque en la cara puede provocar dolor si tiene neuralgia del trigémino, o la presión de la ropa de cama puede provocar dolor si se tiene neuropatía diabética. El dolor neuropático también puede resultar de la alodinia, donde aparece el dolor, o empeora, con un toque o un estímulo que normalmente no causaría dolor. Por ejemplo, un ligero toque en la cara puede provocar dolor si un sujeto tiene neuralgia del trigémino. El dolor neuropático relacionado con la hiperalgesia significa que el dolor grave es el resultado de un estímulo o toque que normalmente solo causaría una leve molestia, mientras que parestesia significa que se producen sensaciones incómodas o dolorosas incluso cuando no hay nada en contacto con el área que causa el dolor, por ejemplo, alfileres y agujas. Otras formas de dolor neuropático implican prurito o picazón, que pueden estar asociados con respuestas alérgicas o inflamatorias en la piel y dolor inflamatorio resultante de daño tisular y procesos de reparación.

Como se define en la presente, el término "anticuerpo neutralizante de NGF" o similar describe un anticuerpo que es capaz de neutralizar la activación biológica y la señalización de NGF. El anticuerpo neutralizante, al que también puede hacerse referencia como anticuerpo antagonista, o un anticuerpo bloqueante, específicamente y preferiblemente de manera selectiva, se une a NGF e inhibe una o más actividades biológicas de NGF. Por ejemplo, el anticuerpo neutralizante puede inhibir la unión de un NGF a su ligando objetivo, como los receptores TrkA o p75 unidos a la membrana celular.

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

El término "región constante (CR)" como se usa en la presente, se refiere a la porción de la molécula de anticuerpo que confiere funciones efectoras. En la presente invención, regiones constantes significan típicamente regiones constantes felinas, es decir, que las regiones constantes de los anticuerpos felinizados en cuestión se derivan de inmunoglobulinas de felino. La región constante de la cadena pesada puede seleccionarse de cualquier isotipo del dominio constante de cadena pesada felina.

El término "anticuerpo quimérico" como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo que contiene secuencias derivadas de dos anticuerpos diferentes, que típicamente son de especies diferentes. Típicamente, los anticuerpos quiméricos comprenden dominios variables derivados de un donante específico que se unen

específicamente a un epítipo objetivo y dominios constantes derivados de anticuerpos obtenidos de la especie objetivo a la que se va a administrar el anticuerpo. Los anticuerpos quiméricos de la presente divulgación comprenden dominios variables de cadena pesada y ligera derivados de un anticuerpo de rata y dominios constantes de cadena ligera y pesada derivados de anticuerpos de felino.

El término "inmunogenicidad", como se usa en la presente, se refiere a una medida de la capacidad de una proteína de direccionamiento o fracción terapéutica para provocar una respuesta inmune (humoral o celular) cuando se administra a un receptor. La presente invención se refiere a la inmunogenicidad de los anticuerpos felinizados objeto. Preferiblemente, los anticuerpos de la presente invención no tienen inmunogenicidad, es decir, no se generarán anticuerpos neutralizantes contra ellos cuando se administren a un felino y, además, las regiones Fc del anticuerpo no median funciones efectoras.

El término "identidad" o "identidad de secuencia" como se usa en la presente, significa que en cualquier posición de residuos de aminoácidos particular en una secuencia alineada, el residuo de aminoácidos es idéntico entre las secuencias alineadas. El término "similitud" o "similitud de secuencia" como se usa en la presente, indica que, en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácidos es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, la leucina puede sustituirse por un residuo de isoleucina o valina. A esto puede hacerse referencia como sustitución conservadora. Preferiblemente, cuando las secuencias de aminoácidos de la invención se modifican mediante la sustitución conservadora de cualquiera de los residuos de aminoácidos contenidos en las mismas, estos cambios no tienen efecto sobre la especificidad de unión o la actividad funcional del anticuerpo resultante cuando se comparan con las del anticuerpo no modificado.

La identidad de secuencia con respecto a un polipéptido (nativo) de la invención y su derivado funcional se relaciona con el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos del polipéptido nativo correspondiente, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de homología, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Ni las extensiones N- o C-terminales, ni las inserciones se interpretarán como una reducción de la identidad u homología de secuencia. Los métodos y programas informáticos para realizar un alineamiento de dos o más secuencias de aminoácidos y determinar su identidad u homología de secuencia son bien conocidos por el experto en la técnica. Por ejemplo, el porcentaje de identidad o similitud de 2 secuencias de aminoácidos puede calcularse fácilmente usando algoritmos, por ejemplo, BLAST (Altschul et al. 1990), FASTA (Pearson & Lipman 1988), o el algoritmo de Smith-Waterman (Smith y Waterman 1981).

Como se usa en la presente, la referencia a un residuo de aminoácidos que tiene la "mayor homología" con un segundo residuo de aminoácidos se refiere al residuo de aminoácidos que tiene la mayoría de las características o propiedades en común con el segundo residuo de aminoácidos. Para determinar si un residuo de aminoácidos tiene la mayor homología con un segundo residuo de aminoácidos, típicamente puede realizarse una evaluación de factores como, pero no limitados a, carga, polaridad, hidrofobicidad, masa del brazo lateral y dimensión del brazo lateral.

El término "posición correspondiente" como se usa en la presente para referirse a un residuo de aminoácidos que está presente en una segunda secuencia en una posición correspondiente a un residuo de aminoácidos especificado en una primera secuencia se pretende que se refiera a la posición en la segunda secuencia que es la misma posición que la posición en la primera secuencia cuando las dos secuencias están alineadas para permitir la máxima identidad de secuencia entre las dos secuencias. Los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes tienen la misma numeración de Kabat.

El término "consiste esencialmente de" o "que consiste esencialmente de" como se usa en la presente significa que un polipéptido puede tener características o elementos adicionales más allá de los descritos, siempre que tales características o elementos adicionales no afecten materialmente la capacidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de tener especificidad de unión a NGF felino. Es decir, el anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo que comprenden los polipéptidos pueden tener características o elementos adicionales que no interfieren con la capacidad del anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo de unirse al NGF felino y antagonizar la actividad funcional del NGF felino. Tales modificaciones pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un polipéptido que consiste esencialmente de una secuencia específica puede contener uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos adicionales, eliminados o sustituidos, en cualquier extremo o en ambos extremos de la secuencia, siempre que estos aminoácidos no interfieran, inhiban, bloqueen o interrumpen la función del anticuerpo o fragmento en la unión al NGF felino y secuestren su función biológica. De manera similar, una molécula de polipéptido que contribuye a los anticuerpos antagonistas del NGF felino de la invención puede modificarse químicamente con uno o más grupos funcionales siempre que tales grupos funcionales no interfieran con la capacidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unirse al NGF felino y antagonizar su función.

Como se usa en la presente, el término "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de un agente, compuesto de unión, molécula pequeña o proteína de fusión de la invención como se define

en las reivindicaciones que se requiere para suprimir la unión de NGF felino a los receptores p75 y/o TrkA.

Los términos "polipéptido", "péptido" o "proteína" se usan indistintamente en la presente para designar una serie lineal de residuos de aminoácidos conectados entre sí por enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carboxi de residuos adyacentes. Los residuos de aminoácidos están habitualmente en forma isomérica "L" natural. Sin embargo, los residuos en la forma isomérica "D" pueden sustituirse por cualquier residuo de L-aminoácido, siempre que el polipéptido retenga la propiedad funcional deseada.

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

La frase "se une específicamente a" se refiere a la unión de un anticuerpo a una proteína u objetivo específico que está presente entre una población heterogénea de proteínas. Por tanto, cuando están presentes en condiciones de inmunoensayo específicas, los anticuerpos se unen a una proteína particular, en este caso NGF felino, y no se unen en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra.

Como se define en la presente, un "felino" también puede denominarse gato. Los felinos pueden clasificarse como pertenecientes a la subespecie con el nombre binomial *Felis catus*, que incluye *Felis catus* doméstica y *Felis silvestris catus*. Los felinos incluyen cualquier gato domesticado e incluyen razas domésticas y variedades de gatos domésticos, a las que también se hace referencia como mascotas o animales de compañía.

Se describirá ahora la presente invención con referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan con el propósito de ilustrar y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Producción de anticuerpo quimérico y caracterización del mismo

Las secuencias de cadena ligera (SEQ ID NO: 1 (feN-chi-LC1) y cadena pesada (SEQ ID NO: 2 (feN-chi-HC2)) se coexpresaron a partir de vectores de pcDNA3.1 en células CHO y se analizó el sobrenadante (sin diluir o en 1:10) para la unión a NGF felino y murino mediante ELISA usando un conjugado secundario de anticuerpo policlonal anti-IgG felino-HRP. Como control se usó sobrenadante de células CHO transfectadas solo con vector Mock pcDNA3.1 simulado (Mock).

Los resultados se muestran en la Figura 1(1A - unión a NGF felino, 1B - unión a NGF murino). Los resultados muestran que se detectó una señal clara para la unión del anticuerpo monoclonal (Mab) anti-NGF quimérico a NGF tanto de felino como de ratón.

El sobrenadante se purificó usando una columna de afinidad de Proteína A y el pico eluido se identificó mediante absorción UV y se analizó mediante SDS-PAGE. Los resultados se muestran en la Figura 2. La Figura 2A muestra que el anticuerpo quimérico puede purificarse en la proteína A. La Figura 2B muestra que el Mab felino quimérico se identificó por la presencia de cadenas tanto pesadas como ligeras en el gel teñido.

Ejemplo 2 - Producción de anticuerpos felinizados

Se produjeron secuencias completas de anticuerpos combinando secuencias de dominios variables felinizados con secuencias de cadenas pesadas constantes o ligeras constantes felinas C-terminales.

Las secuencias de aminoácidos combinadas se convirtieron en una forma expresable en células de mamíferos mediante la selección óptima de codones y la síntesis génica química completa y la clonación en un vector de expresión de células de mamíferos pcDNA3.1+.

Los ADNc resultantes se transfectaron en células CHO y los sobrenadantes se analizaron como se detalla en los ejemplos siguientes.

Ejemplo 3 - Determinación de la unión de anticuerpos felinizados a NGF

Se transfectaron combinaciones de ADNc felinizados de cadena pesada (SEQ ID NO: 6) y cadena ligera (SEQ ID NO: 5) en células CHO, los sobrenadantes se recogieron y reaccionaron en formato ELISA con NGF felino o murino. Después de los pasos de incubación y lavado, el anticuerpo felinizado unido se detectó por reactividad con

un anticuerpo policlonal específico de cabra anti-IgG felino enlazado a peroxidasa de rábano picante (HRP) y se desarrolló usando TMB. La densidad óptica del producto resultante se midió a 450 nm y se comparó con la del sobrenadante transfectado con vector vacío simulado (indicado como "Mock" en la Figura 1).

Los resultados se muestran en la Figura 3. La Figura 3A muestra que el anticuerpo felinizado se une al NGF felino. La Figura 3B muestra que el anticuerpo felinizado se une al NGF murino con la misma afinidad que al unirse al NGF felino.

Ejemplo 4 - Análisis de anticuerpos felinizados purificados usando SDS-PAGE

Los sobrenadantes de células CHO transfectadas de MAb anti-NGF felinizado del Ejemplo 3 se purificaron usando una columna de afinidad de Proteína A y el pico eluido se identificó mediante absorción UV y se analizó mediante SDS-PAGE. (LHS) Perfil de purificación de MAb de constructos de expresión de feN-HC2 y feN-kLC1 cotransfectadas con células CHO mediante cromatografía de afinidad de proteína A. (RHS) SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de la fracción de pico. Se observó alguna degradación menor de la cadena ligera.

Los resultados se muestran en la Figura 4. La Figura 4A muestra que el anticuerpo felinizado puede ser purificado por la proteína A. La Figura 4B muestra un gel con bandas que representan las cadenas pesada y ligera del anticuerpo felinizado (feN-chi-HC2 (cadena pesada de IgG2) y feN-chi-kLC (cadena ligera)).

Ejemplo 5 - Inhibición de la proliferación inducida por NGF de células TF-1 por anticuerpos felinizados

Se incubaron diluciones en serie de sobrenadantes de transfectantes de células CHO del Ejemplo 4 ("antagonista") con células TF-1 en presencia de 0,3 ng/ml de NGF. La proliferación resultante se midió mediante la incorporación de timidina.

Los resultados, mostrados en la Figura 5, demuestran una clara inhibición de la proliferación inducida por NGF por el sobrenadante de células CHO transfectadas con el MAb anti-NGF felinizado.

Ejemplo 6 - Depósito del complemento inducida por anticuerpos felinizados capturados por antígenos

Los sobrenadantes de transfectantes de células CHO del Ejemplo 4 se incubaron con placas recubiertas con 0,1 ng/ml de NGF para capturar los anticuerpos. Las placas se lavaron y luego se incubaron con suero humano y se midió el complemento C1q unido mediante la unión del HRP de anticuerpo policlonal anti-C1q humano y se desarrolló como anteriormente.

Método de unión del complemento:

Las placas se recubrieron con 100 µl/pocillo de 5 µg/ml de NGF de ratón y se bloquearon con BSA/PBS al 5%. Los pocillos recubiertos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con sobrenadantes de cultivo celular, que contenían IgG anti-NGF felinizado recombinante, diluido en PBS/BSA al 1% (100 µl/pocillo). Las placas se lavaron e incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con 100 µl/pocillo de suero humano diluido 1/100 en solución salina tamponada con veronal que contenía MgCl₂ 0,5 mM, CaCl₂ 2 mM, Tween-20 al 0,05%, gelatina al 0,1% y BSA al 0,5%. Después del lavado, las placas se incubaron con 100 µl de una dilución 1/800 de anti-C1q-HRP de oveja (Serotec) en PBS/BSA al 1%. Después del lavado, las placas se desarrollaron mediante la adición de 100 µl de sustrato TMB (Thermo Scientific). El desarrollo se detuvo mediante la adición de 100 µl de H₂SO₄ 2N y absorbancia leída a 450 nm.

Los resultados se muestran en la Figura 6. Los resultados muestran sorprendentemente que los anticuerpos felinizados que tienen la cadena pesada feN-chi-HC2 (IgG2) son inactivos en la fijación del complemento. Por consiguiente, se demuestra en la presente de manera bastante sorprendente, que cuando un anticuerpo de la invención tiene una cadena pesada derivada de felino del subtipo HC2, la unión del anticuerpo al NGF felino no da como resultado la activación del complemento u otras funciones efectoras en sentido descendente, como ADCC. Por tanto, dichos anticuerpos, al antagonizar la actividad funcional biológica del NGF felino evitando la unión del NGF felino a los receptores TrkA o p75 unidos a la membrana, inhiben la cascada de señalización intracelular en sentido descendente asociada. Además, como la expresión de NGF se produce con frecuencia en la proximidad de nervios y similares, la capacidad de los anticuerpos antagonistas o neutralizantes de NGF de la invención, la capacidad del NGF de antagonizar o neutralizar los anticuerpos de la invención, que tienen la cadena pesada de HC2 (IgG2) derivada de felino para secuestrar la actividad biológica de NGF felino sin reclutar una respuesta inmune más amplia es altamente deseable, aunque inesperada.

Ejemplo 7 - Formas variantes adicionales de anticuerpos monoclonales anti-NGF felino

Las Tablas 1 a 8 ilustran que pueden generarse versiones completamente felinas de anticuerpos anti-NGF mediante PETización en comparación con un conjunto limitado de secuencias de inmunoglobulinas felinas

(especialmente cadenas ligeras felinas, en cuyo caso se usó una única cadena ligera para comparación). Mediante secuenciación directa y extracción de bases de datos, se derivaron ADNc de cadena pesada y ligera kappa de inmunoglobulina felina adicionales y se usaron para comparar con las secuencias de anticuerpos α D11. Las Tablas 9-16 muestran que la adición de estas secuencias comparadoras aumenta el número de coincidencias homólogas entre α D11 de rata e IgG felina y, por tanto, reduce el número de cambios necesarios para convertir las secuencias marco variables de α D11 en variantes felinizadas.

Las Tablas 9-16 incluyen las variantes de secuencia de las Tablas 1-8 como secuencias del "conjunto 1" y secuencias adicionales de secuenciación de ADNc de novo y extracción de bases de datos como secuencias felinas del "conjunto 2". Las secuencias marco anti-NGF felinizadas preferidas de las Tablas 1-8 se anotan como "feN" y las secuencias marco anti-NGF felinizadas preferidas en comparación con las secuencias felinas del "conjunto 2" se anotan como "feN2". En las Figuras 13, 14, 15 y 16 se muestran secuencias de proteína de cadena pesada (feN2-VH) y ligera kappa (feN2-Vk) de inmunoglobulina anti-NGF de felino (SEQ ID NO: 22-25).

Tabla 9. Residuos de FR1 de dominio variable de cadena ligera

Número de residuo de FR1 de Vkappa	Número de Kabat	Conjunto 1 de Vk FR1 de felino	Conjunto 2 de Vk FR1 de felino	α D11 de Rata	feN-kLC	feN2-kLC
1	1	D	DEN	D	D	D
2	2	I	VIPT	I	I	I
3	3	V	VEM	Q	V	E
4	4	M	MLI	M	M	M
5	5	T	T	T	T	T
6	6	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	T	TS	S	T	S
8	8	P	P	P	P	P
9	9	L	L	A	L	L
10	10	s	SF	S	S	S
11	11	L	L	L	L	L
12	12	S	SPA	S	S	S
13	13	V	V	A	V	V
14	14	T	TIA	S	T	T
15	15	P	P	L	P	P
16	16	G	G	G	G	G
17	17	E	ED	E	E	E
18	18	P	PSA	T	P	S
19	19	A	AV	V	A	V
20	20	S	s	T	S	s
21	21	A	SI	I	I	I
22	22	S	SF	E	S	S
23	23	C	C	C	C	C

Tabla 10. Residuos de FR2 de dominio variable de cadena ligera

Número de residuo de VKFR2	Número de Kabat	Conjunto 1 de Vk FR2 de felino	Conjunto 2 de Vk FR2 de felino	α D11 de Rata	feN-kLC	feN2-kLC
1	36	W	W	W	W	W
2	37	Y	YF	Y	Y	Y
3	38	L	LFR	Q	L	L
4	39	Q	Q	Q	Q	Q
5	40	K	KR	K	K	K
6	41	P	P	P	P	P
7	42	G	G	G	G	G
8	43	Q	QR	K	Q	R
9	44	S	S	s	s	s
10	45	P	P	P	P	P
11	46	R	R	Q	R	R
12	47	R	RL	L	R	L

(continuación)

Número de residuo de VKFR2	Número de Kabat	Conjunto 1 de Vk FR2 de felino	Conjunto 2 de Vk FR2 de felino	aD11 de Rata	feN-kLC	feN2-kLC
13	48	L	L	L	L	L
14	49	I	IM	I	I	I
15	50	Y	YHA	Y	Y	Y

Tabla 11. Residuos de FR3 de dominio variable de cadena ligera

Número de residuo de VKFR3	Número de Kabat	Conjunto 1 de Vk FR3 de felino	Conjunto 2 de Vk FR3 de felino	aD11 de Rata	feN-kLC	feN2-kLC
1	66	G	GR	G	G	G
2	67	V	V	V	V	V
3	68	P	P	P	P	P
4	69	D	D	S	D	D
5	70	R	R	R	R	R
6	71	F	FI	F	F	F
7	72	S	ST	S	S	S
8	73	G	G	G	G	G
9	74	S	S	s	s	s
10	75	G	G	G	G	G
11	76	S	S	s	s	s
12	77	G	G	G	G	G
13	78	T	TAS	T	T	T
14	79	D	D	Q	D	D
15	80	F	F	Y	F	F
16	81	T	TIA	S	T	T
17	82	L	L	L	L	L
18	82A	R	RTK	K	R	K
19	82B	I	I	I	I	I
20	82C	S	SAGT	N	S	S
21	83	R	RG	S	R	R
22	84	V	VM	L	V	V
23	85	E	EQ	Q	E	Q
24	86	A	AVPT	S	A	T
25	87	D	DE	E	D	E
26	88	D	D	D	D	D
27	89	V	V	V	V	V
28	90	G	G	A	G	G
29	91	V	VIHL	S	V	V
30	92	Y	Y	Y	Y	Y
31	93	F	YF	F	F	F
32	94	C	C	C	C	C

Tabla 12. Residuos de FR4 de dominio variable de cadena ligera

Número de residuo de VKFR4	Número de Kabat	Conjunto 1 de Vk FR4 de felino	Conjunto 2 de Vk FR4 de felino	aD11 de Rata	feN-kLC	feN2-kLC
1	103	F	FS	F	F	F
2	104	G	G	G	G	G
3	105	P	QP	G	P	Q
4	106	G	G	G	G	G
5	107	T	T	T	T	T
6	108	K	KHQUEST	K	K	K
7	109	L	L	L	L	L
8	110	E	ED	E	E	E
9	111	I	IVML	L	I	L
10	112	K	KRDT	K	K	K

Tabla 13. Residuos de FR1 de dominio variable de cadena pesada

Número de residuo de VHFR1	Número de Kabat	Conjunto 1 de VH FR1 de felino	Conjunto 2 de VH FR1 de felino	aD11 de Rata	feN-kLC	feN2-kLC
1	1	QDH	QDE	Q	Q	Q
2	2	VE	VE	V	V	V
3	3	QL	LQR	Q	Q	Q
4	4	L	LV	L	L	L
5	5	V	VM	K	V	V
6	6	EQ	QED	E	E	E
7	7	S	S	s	s	s
8	8	G	G	G	G	G
9	9	GAR	AG	P	G	A
10	10	DE	EDN	G	D	E
11	11	LV	LVR	L	L	L
12	12	VRS	VRK	V	V	V
13	13	QK	KTQENR	Q	Q	Q
14	14	P	PT	P	P	P
15	15	GE	GE	S	G	G
16	16	GE	GATE	Q	G	E
17	17	S	SA	T	S	S
18	18	LV	LV	L	L	L
19	19	RKS	RKE	S	R	R
20	20	LI	IL P	L	L	L
21	21	TFS	FTS	T	T	T
22	22	C	C	C	C	C
23	23	AVMK	KVAQ	T	A	A
24	24	EN	ATD	V	A	A
25	25	S	S	S	S	S
26	26	G	GE	G	G	G

Tabla 14. Residuos de FR2 de dominio variable de cadena pesada

Número de residuo de VHFR2	Número de Kabat	Conjunto 1 de VH FR2 de felino	Conjunto 2 de VH FR2 de felino	aD11 de Rata	feN-kLC	feN2-kLC
1	36	W	W	W	W	W
2	37	VLWFA	VLFI	V	V	V
3	38	RC	RCH	R	R	R
4	39	Q	Q	Q	Q	Q
5	40	APT	ASVT	A	A	A
6	41	P	P	T	P	P
7	42	GEA	GAES	G	G	G
8	43	KQT	QKE	R	K	K
9	44	G	G	G	G	G
10	45	LF	LFP	L	L	L
11	46	EQ	EQ	E	E	E
12	47	WET	WCL	W	W	W
13	48	MVL	VE	M	M	M
14	49	AGCS	GAS	G	G	G

Tabla 15. Residuos de FR3 de dominio variable de cadena pesada

Número de residuo de VHFR3	Número de Kabat	Conjunto 1 de VH FR3 de felino	Conjunto 2 de VH FR3 de felino	aD11 de Rata	feN-kLC	feN2-kLC
1	66	R	RQK	R	R	R
2	67	LF	LF	L	F	L
3	68	TA	TI	T	T	T
4	69	ILV	LIMV	I	I	I
5	70	ST	ST	T	S	T
6	71	RAI	RATKGV	R	R	R
7	72	D	D	D	D	D
8	73	TNS	TNDAS	T	N	T
9	74	ASGT	SADT	S	A	S
10	75	KTRGQ	TKEQNR	K	K	K
11	76	ND	NDK	S	N	N
12	77	TA	TIA	Q	T	T
13	78	LA	ALVG	V	L	V
14	79	YDS	YFASVW	F	Y	F
15	80	LM	LM	L	L	L
16	81	QELR	EQDHV	K	Q	Q
17	82	MLT	LM	M	M	M
18	82A	NSDT	NSTDGRH	H	N	H
19	82B	SINRT	SN	S	S	S
20	82C	L	L	L	L	L
21	83	KRG	RKQT	Q	K	Q
22	84	STPA	STIAV	S	T	S
23	85	ETAD	EATDGS	E	E	E
24	86	D	D	D	D	D
25	87	TA	T	T	T	T
26	88	A	AGS	A	A	A
27	89	TVM	TVEA	T	T	T
28	90	Y	YH	Y	Y	Y
29	91	YCF	YHF	Y	Y	Y
30	92	CR	C	C	C	C
31	93	AGITSV	ATVGLIM	A	A	A
32	94	RKSTIVPNG	R	R	R	R

Tabla 16. Residuos de FR4 de dominio variable de cadena pesada

Número de residuo de VHFR4	Número de Kabat	Conjunto 1 de VH FR4 de felino	Conjunto 2 de VH FR4 de felino	aD11 de Rata	feN-kLC	feN2-kLC
1	103	WR	WRCL	W	W	W
2	104	GR	GA	G	G	G
3	105	QPVHR	QHRPV	Q	Q	Q
4	106	G	GD	G	G	G
5	107	TAVIS	ATV	T	T	T
6	108	LIQ	LIQMST	T	L	T
7	109	V	VI	V	V	V
8	110	T	TAIR	T	T	T
9	111	V	VG	V	V	V
10	112	ST	SP	S	S	S
11	113	SQP	SQA	A	S	A

Ejemplo 8 - Anticuerpos monoclonales anti-NGF felino - seguridad y pirexia

Los anticuerpos monoclonales anti-NGF felino de la invención se expresan en células CHO y se purifican mediante una combinación de cromatografía de proteína A y/o cromatografía de exclusión por tamaño y se

intercambian de tampón en solución salina tamponada con fosfato. Los anticuerpos se inyectan por vía intravenosa en gatos a 0,01-10 mg/kg de peso corporal y se evalúan los signos de toxicidad mediante inspección visual por un veterinario, cambios en el peso corporal, la temperatura corporal y la bioquímica plasmática. No se espera que se observen cambios en estos ni en ninguno de los analitos bioquímicos plasmáticos.

Ejemplo 9 - Farmacocinética en plasma de anticuerpos monoclonales anti-NGF felino in vivo - vida media en suero e inmunogenicidad

Los anticuerpos monoclonales anti-NGF de felino de la invención se expresaron en células CHO y se purificaron mediante una combinación de cromatografía de proteína A y/o cromatografía de exclusión por tamaño y se intercambiaron de tampón en solución salina tamponada con fosfato. Los anticuerpos se inyectan por vía intravenosa en gatos en el intervalo de 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal y se toman muestras de plasma en varios momentos durante las próximas 2 semanas. Las muestras de plasma diluidas se evalúan para determinar la concentración de anticuerpo anti-NGF felino mediante ELISA usando NGF como el objetivo y reactivo secundario de anticuerpo policlonal anti-felino - peroxidasa de rábano picante. Las concentraciones en plasma medidas son consistentes con una cinética de dos fases, con una fase de distribución tisular (alfa) y una fase de eliminación (beta) de varios días.

Se espera la ausencia de una fuerte disminución en la concentración en plasma de la concentración de anticuerpos anti-NGF de felino entre 100 y 300 horas. Esto demostraría que no hay anticuerpos neutralizantes preexistentes para anticuerpos monoclonales anti-NGF recombinantes en sangre de gato ni se generan tales anticuerpos neutralizantes después de la infusión.

Ejemplo 10 - Los anticuerpos monoclonales anti-NGF de felino reducen el dolor inflamatorio in vivo

Modelo felino de inflamación:

A los gatos se les inyecta (= día -1) un agente proinflamatorio (por ejemplo caolín) en la almohadilla de una pata para generar una inflamación que se resuelva por sí sola que comienza aproximadamente 24 horas después y que hace que los gatos se queden temporalmente cojos. En este modelo, una vez que retrocede la respuesta inflamatoria inicial al caolín, los gatos se vuelven cada vez menos cojos durante un período de aproximadamente 1 a 2 semanas y luego se recuperan.

A los grupos de gatos se les inyectan por vía intravenosa anticuerpos monoclonales anti-NGF felino de esta patente a 0,01-10 mg/kg de peso corporal o solución salina tamponada con fosfato como control de vehículo (= día 0). Se evalúa la cojera de los gatos durante 4-14 días mediante un método de puntuación visual (por ejemplo, Puntuación 0, sin cojera (carga de peso completo); puntuación 1, cojera leve (no soporta todo el peso pero camina bien); puntuación 2, cojera moderada (carga leve de peso y no camina bien), puntuación 3, cojera grave (sin carga de peso)). Los observadores no saben qué gatos reciben qué inyección.

Se espera que las puntuaciones de cojera se reduzcan en los gatos que reciben anticuerpos monoclonales anti-NGF felino en los días 2-4 después de la inyección en comparación con el control del vehículo, lo que indica que los anticuerpos monoclonales anti-NGF felino tendrán un efecto sobre la reducción del dolor en los gatos sobre lo visto con solo vehículo.

Ejemplo 11 - Ejemplo comparativo que muestra el efecto de los anticuerpos monoclonales anti-NGF canino en la reducción del dolor inflamatorio in vivo

Terapia de anticuerpos:

El método de preparación de anticuerpos de la presente invención se aplicó para producir un anticuerpo caninizado adecuado para su uso en caninos. Se combinó un dominio VL de α D11 caninizado con un dominio constante de cadena ligera kappa canina y se combinó un dominio VH de α D11 caninizado con un isotipo de cadena pesada canina.

Los anticuerpos monoclonales anti-NGF canino derivados de vectores de expresión que expresan las cadenas pesada y ligera se expresaron en células CHO y se purificaron mediante una combinación de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de exclusión por tamaño y tampón intercambiado en solución salina tamponada con fosfato.

Modelo canino de inflamación:

Todos los experimentos se llevaron a cabo con la aprobación previa del Comité de Ética Institucional (CRL, Irlanda). A los perros Beagle se les inyectó (= día -1) caolín en la almohadilla de una pata trasera para generar una inflamación que se resuelva por sí sola que comienza aproximadamente 24 horas después y que hace que los

perros se vuelvan cojos temporalmente. En este modelo, una vez que la respuesta inflamatoria inicial al caolín retrocede, los perros se vuelven cada vez menos cojos durante un período de aproximadamente 1 a 2 semanas y luego se recuperan por completo.

5 A grupos de 3 perros se les inyectaron por vía intravenosa anticuerpos monoclonales anti-NGF canino a 200 µg/kg de peso corporal o solución salina tamponada con fosfato como control de vehículo (= día 0). Se evaluó la cojera de los perros durante 7 días mediante un método de puntuación visual (puntuación 0, sin cojera (carga de peso completo); puntuación 1, cojera leve (no carga de peso completo pero camina bien); puntuación 2, cojera moderada (carga leve de peso) y no camina bien), puntuación 3, cojera grave (sin carga de peso)). Los observadores no saben qué perros recibieron qué inyección.

10 Los resultados se muestran en la Figura 17. Las puntuaciones de cojera se redujeron en los perros que recibieron anticuerpos monoclonales anti-NGF el día 3 después de la inyección en comparación con el control de vehículo, lo que indica que los anticuerpos monoclonales anti-NGF tuvieron un efecto sobre la reducción del dolor en los perros sobre el observado con solo vehículo. La actividad retardada es consistente con la farmacocinética plasmática de los anticuerpos monoclonales anti-NGF canino que demostraron una fase de distribución tisular lenta (alfa) de aproximadamente 30 horas y una vascularización relativamente pobre del área de la almohadilla plantar. Los resultados mostrados en la Figura 17 muestran que los anticuerpos anti-NGF canino preparados mediante un método correspondiente al método de la presente invención reducen el dolor inflamatorio en perros con la consiguiente reducción de la cojera.

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> NVIP Pty Ltd

<120> ANTICUERPOS ANTI-FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO Y MÉTODOS DE PREPARACIÓN Y USO DE LOS MISMOS

30 <130> P119712.WO.02

<150> US61/483488

<151> 2011-05-06

35 <150> US61/531439

<151> 2011-09-06

<160> 33

40 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 217

<212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena ligera V+C completa de quimérico

50 <400> 1

ES 2 905 682 T3

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

<210> 2
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cadena pesada V+C completa de quimérico

ES 2 905 682 T3

<400> 2

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

ES 2 905 682 T3

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

ES 2 905 682 T3

	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ile	Thr	Gly	Gln	Pro	Glu	Pro	Glu	Asn	Asn	385	390	395	400
5	Tyr	Arg	Thr	Thr	Pro	Pro	Gln	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Thr	Tyr	Phe	Val	405	410	415	
10	Tyr	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Asp	Arg	Ser	His	Trp	Gln	Arg	Gly	Asn	Thr	420	425	430	
15	Tyr	Thr	Cys	Ser	Val	Ser	His	Glu	Ala	Leu	His	Ser	His	His	Thr	Gln	435	440	445	
20	Lys	Ser	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys								450	455		
25	<210> 3																			
	<211> 107																			
	<212> PRT																			
	<213> Secuencia Artificial																			
	<220>																			
	<223> dominio variable de cadena ligera de fenilizado																			
30	<400> 3																			
	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly	1	5	10	15
35	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asp	Ile	Tyr	Asn	Ala	20	25	30	
40	Leu	Ala	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Arg	Arg	Leu	Ile	35	40	45	
45	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Leu	His	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
50	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Arg	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	65	70	75	80
55	Asp	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	His	Tyr	Phe	His	Tyr	Pro	Arg	85	90	95	
60	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys						100	105		
	<210> 4																			
	<211> 122																			
	<212> PRT																			
65	<213> Secuencia Artificial																			

ES 2 905 682 T3

<220>

<223> dominio variable de cadena pesada de fenilizado (HC derivado de BAA32229.1)

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5

40 <211> 217

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> cadena ligera completa de fenilizado

<400> 5

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

55 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala
20 25 30

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

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

65

ES 2 905 682 T3

	50	55	60	
5	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala 65 70 75 80			
10	Asp Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg 85 90 95			
15	Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Asp Ala Gln 100 105 110			
20	Pro Ser Val Phe Leu Phe Gln Pro Ser Leu Asp Glu Leu His Thr Gly 115 120 125			
25	Ser Ala Ser Ile Val Cys Ile Leu Asn Asp Phe Tyr Pro Lys Glu Val 130 135 140			
30	Asn Val Lys Trp Lys Val Asp Gly Val Val Gln Thr Lys Ala Ser Lys 145 150 155 160			
35	Glu Ser Thr Thr Glu Gln Asn Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser 165 170 175			
40	Ser Thr Leu Thr Met Ser Arg Thr Glu Tyr Gln Ser His Glu Lys Phe 180 185 190			
45	Ser Cys Glu Val Thr His Lys Ser Leu Ala Ser Thr Leu Val Lys Ser 195 200 205			
50	Phe Asn Arg Ser Glu Cys Gln Arg Glu 210 215			
55	<210> 6 <211> 457 <212> PRT <213> Secuencia Artificial			
60	<220> <223> cadena pesada completa de fenilizado (HC derivada de BAA32229.1)			
65	<400> 6			
55	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15			
60	Ser Leu Arg Leu Thr Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn 20 25 30			
65	Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met 35 40 45			

ES 2 905 682 T3

	Gly	Gly	Val	Trp	Ala	Gly	Gly	Ala	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys
	50					55						60				
5	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu
	65					70					75					80
10	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala
					85					90					95	
15	Arg	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ser	Ser	Ser	Thr	Leu	Tyr	Ala	Met	Asp	Ala	Trp
				100					105					110		
20	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Thr	Ala	Pro
			115					120					125			
25	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Cys	Gly	Thr	Thr	Ser	Gly	Ala	Thr
		130					135					140				
30	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
				165						170					175	
35	Ala	Val	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Met	Val	Thr
				180					185					190		
40	Val	Pro	Ser	Ser	Arg	Trp	Leu	Ser	Asp	Thr	Phe	Thr	Cys	Asn	Val	Ala
			195					200					205			
45	His	Pro	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Arg	Lys	Thr	Asp
	210						215					220				
50	His	Pro	Pro	Gly	Pro	Lys	Pro	Cys	Asp	Cys	Pro	Lys	Cys	Pro	Pro	Pro
	225					230					235					240
55	Glu	Met	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Ile	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
					245					250					255	
60	Asp	Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Leu	Val	Val
				260					265					270		
65	Asp	Leu	Gly	Pro	Asp	Asp	Ser	Asp	Val	Gln	Ile	Thr	Trp	Phe	Val	Asp
			275					280					285			
	Asn	Thr	Gln	Val	Tyr	Thr	Ala	Lys	Thr	Ser	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe

ES 2 905 682 T3

	290	295	300	
5	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Leu His Gln Asp 305 310 315 320			
10	Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Ser Lys Ser Leu 325 330 335			
15	Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro His 340 345 350			
20	Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Ala Gln Glu Glu Leu Ser Arg 355 360 365			
25	Asn Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Ile Lys Ser Phe His Pro Pro Asp 370 375 380			
30	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ile Thr Gly Gln Pro Glu Pro Glu Asn Asn 385 390 395 400			
35	Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Ser Asp Gly Thr Tyr Phe Val 405 410 415			
40	Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Arg Ser His Trp Gln Arg Gly Asn Thr 420 425 430			
45	Tyr Thr Cys Ser Val Ser His Glu Ala Leu His Ser His His Thr Gln 435 440 445			
50	Lys Ser Leu Thr Gln Ser Pro Gly Lys 450 455			
55	<210> 7 <211> 457 <212> PRT <213> Secuencia Artificial <220> <223> cadena pesada completa aglicosilada de fenilizado (HC modificada de BAA32229.1) <400> 7			
60	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15			
65	Ser Leu Arg Leu Thr Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn 20 25 30			
70	Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met			

ES 2 905 682 T3

	35	40	45
5	Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys 50 55 60		
10	Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu 65 70 75 80		
15	Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala 85 90 95		
20	Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp 100 105 110		
25	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro 115 120 125		
30	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly Thr Thr Ser Gly Ala Thr 130 135 140		
35	Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Leu Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr 145 150 155 160		
40	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro 165 170 175		
45	Ala Val Leu Gln Ala Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr 180 185 190		
50	Val Pro Ser Ser Arg Trp Leu Ser Asp Thr Phe Thr Cys Asn Val Ala 195 200 205		
55	His Pro Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Arg Lys Thr Asp 210 215 220		
60	His Pro Pro Gly Pro Lys Pro Cys Asp Cys Pro Lys Cys Pro Pro Pro 225 230 235 240		
65	Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Ile Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys 245 250 255		
70	Asp Thr Leu Ser Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Leu Val Val 260 265 270		
75	Asp Leu Gly Pro Asp Asp Ser Asp Val Gln Ile Thr Trp Phe Val Asp 275 280 285		

ES 2 905 682 T3

	Asn	Thr	Gln	Val	Tyr	Thr	Ala	Lys	Thr	Ser	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe
	290						295					300				
5	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Pro	Ile	Leu	His	Gln	Asp
	305					310					315					320
10	Trp	Leu	Lys	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Ser	Lys	Ser	Leu
					325					330					335	
15	Pro	Ser	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	His
				340					345					350		
20	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Ala	Gln	Glu	Glu	Leu	Ser	Arg
			355					360					365			
25	Asn	Lys	Val	Ser	Val	Thr	Cys	Leu	Ile	Lys	Ser	Phe	His	Pro	Pro	Asp
	370						375					380				
30	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ile	Thr	Gly	Gln	Pro	Glu	Pro	Glu	Asn	Asn
	385					390					395					400
35	Tyr	Arg	Thr	Thr	Pro	Pro	Gln	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Thr	Tyr	Phe	Val
					405					410					415	
40	Tyr	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Asp	Arg	Ser	His	Trp	Gln	Arg	Gly	Asn	Thr
				420					425					430		
45	Tyr	Thr	Cys	Ser	Val	Ser	His	Glu	Ala	Leu	His	Ser	His	His	Thr	Gln
			435					440					445			
50	Lys	Ser	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys							
	450						455									
55	<210> 8 <211> 23 <212> PRT <213> Secuencia Artificial <220> <223> FR1 de Cadena ligera															
60	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly
	1				5					10					15	
65	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys									
				20												
70	<210> 9															

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> FR2 de Cadena ligera
 <400> 9
 10 Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr
 1 5 10 15
 <210> 10
 <211> 33
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> FR3 de Cadena ligera
 20 <400> 10
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 25 Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys
 20 25 30
 30 Gln
 <210> 11
 <211> 10
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> FR4 de Cadena ligera
 40 <400> 11
 Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10
 45 <210> 12
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> FR1 de Cadena pesada
 <400> 12
 55 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Thr Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr
 20 25 30
 60 <210> 13
 <211> 14
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia Artificial

ES 2 905 682 T3

<220>
 <223> FR2 de Cadena pesada

5 <400> 13

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

10 <210> 14
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> FR3 de Cadena pesada

<400> 14

20 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

	1				5					10				15
--	---	--	--	--	---	--	--	--	--	----	--	--	--	----

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

				20				25					30	
--	--	--	--	----	--	--	--	----	--	--	--	--	----	--

30 <210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> FR4 de Cadena pesada

<400> 15

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

40 <210> 16
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> quimera de cadena pesada V+C completa alternativa (Dominio constante de HC alternativo anti-NGF quimérico de BAA32230.1)

50 <400> 16

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

55

ES 2 905 682 T3

	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Asn	Asn	
				20					25					30			
5	Asn	Val	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Thr	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
10	Gly	Gly	Val	Trp	Ala	Gly	Gly	Ala	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	
		50					55					60					
15	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	
	65					70					75					80	
20	Lys	Met	His	Ser	Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
					85					90					95		
25	Arg	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ser	Ser	Ser	Thr	Leu	Tyr	Ala	Met	Asp	Ala	Trp	
				100					105					110			
30	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Thr	Ala	Pro	
			115					120					125				
35	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Cys	Gly	Thr	Thr	Ser	Gly	Ala	Thr	
		130					135					140					
40	Val	Ala	Leu	Ala	Cys	Leu	Val	Leu	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	
		145				150					155					160	
45	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	
				165						170					175		
50	Ala	Val	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Met	Val	Thr	
				180					185					190			
55	Val	Pro	Ser	Ser	Arg	Trp	Leu	Ser	Asp	Thr	Phe	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	
			195				200						205				
60	His	Pro	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Arg	Lys	Thr	Asp	
		210					215					220					
65	His	Pro	Pro	Gly	Pro	Lys	Pro	Cys	Asp	Cys	Pro	Lys	Cys	Pro	Pro	Pro	
		225				230					235					240	
70	Glu	Met	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Ile	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
				245						250					255		
75	Asp	Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Leu	Val	Val	

ES 2 905 682 T3

	260	265	270	
5	Asp Leu Gly Pro Asp Asp Ser Asp Val Gln Ile Thr Trp Phe Val Asp 275 280 285			
10	Asn Thr Gln Val Tyr Thr Ala Lys Thr Ser Pro Arg Glu Glu Gln Phe 290 295 300			
15	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Leu His Gln Asp 305 310 315 320			
20	Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Ser Lys Ser Leu 325 330 335			
25	Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Asp Lys Gly Gln Pro His 340 345 350			
30	Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Ala Gln Glu Glu Leu Ser Arg 355 360 365			
35	Asn Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Ile Glu Gly Phe Tyr Pro Ser Asp 370 375 380			
40	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ile Thr Gly Gln Pro Glu Pro Glu Asn Asn 385 390 395 400			
45	Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Ser Asp Gly Thr Tyr Phe Leu 405 410 415			
50	Tyr Ser Arg Leu Ser Val Asp Arg Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asn Thr 420 425 430			
55	Tyr Thr Cys Ser Val Ser His Glu Ala Leu His Ser His His Thr Gln 435 440 445			
60	Lys Ser Leu Thr Gln Ser Pro Gly Lys 450 455			
65	<210> 17 <211> 457 <212> PRT <213> Secuencia Artificial <220> <223> cadena pesada completa alternativa de fenilizado (Dominio V anti-NGF fenilizado fusionado con dominio constante HC alternativo de BAA32230.1) <400> 17			
	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly			

ES 2 905 682 T3

	1			5						10					15		
5	Ser	Leu	Arg	Leu	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Asn	Asn	
				20					25					30			
10	Asn	Val	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
15	Gly	Gly	Val	Trp	Ala	Gly	Gly	Ala	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	
		50					55					60					
20	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	
	65					70					75					80	
25	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
					85					90					95		
30	Arg	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ser	Ser	Ser	Thr	Leu	Tyr	Ala	Met	Asp	Ala	Trp	
				100					105					110			
35	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Thr	Ala	Pro	
			115					120					125				
40	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Cys	Gly	Thr	Thr	Ser	Gly	Ala	Thr	
		130					135					140					
45	Val	Ala	Leu	Ala	Cys	Leu	Val	Leu	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	
	145					150					155					160	
50	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	
				165						170					175		
55	Ala	Val	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Met	Val	Thr	
				180					185					190			
60	Val	Pro	Ser	Ser	Arg	Trp	Leu	Ser	Asp	Thr	Phe	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	
			195					200					205				
65	His	Pro	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Arg	Lys	Thr	Asp	
		210					215					220					
70	His	Pro	Pro	Gly	Pro	Lys	Pro	Cys	Asp	Cys	Pro	Lys	Cys	Pro	Pro	Pro	
	225					230					235					240	
75	Glu	Met	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Ile	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
					245					250					255		

ES 2 905 682 T3

	Asp	Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Leu	Val	Val	
				260					265					270			
5	Asp	Leu	Gly	Pro	Asp	Asp	Ser	Asp	Val	Gln	Ile	Thr	Trp	Phe	Val	Asp	
			275					280					285				
10	Asn	Thr	Gln	Val	Tyr	Thr	Ala	Lys	Thr	Ser	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	
		290					295					300					
15	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Pro	Ile	Leu	His	Gln	Asp	
	305					310					315					320	
20	Trp	Leu	Lys	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Ser	Lys	Ser	Leu	
				325						330					335		
25	Pro	Ser	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Lys	Gly	Gln	Pro	His	
				340					345					350			
30	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Ala	Gln	Glu	Glu	Leu	Ser	Arg	
			355					360					365				
35	Asn	Lys	Val	Ser	Val	Thr	Cys	Leu	Ile	Glu	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	
		370					375					380					
40	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ile	Thr	Gly	Gln	Pro	Glu	Pro	Glu	Asn	Asn	
	385					390					395					400	
45	Tyr	Arg	Thr	Thr	Pro	Pro	Gln	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Thr	Tyr	Phe	Leu	
					405					410					415		
50	Tyr	Ser	Arg	Leu	Ser	Val	Asp	Arg	Ser	Arg	Trp	Gln	Arg	Gly	Asn	Thr	
				420					425					430			
55	Tyr	Thr	Cys	Ser	Val	Ser	His	Glu	Ala	Leu	His	Ser	His	His	Thr	Gln	
			435					440					445				
60	Lys	Ser	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys								
		450					455										
65	<210> 18 <211> 457 <212> PRT <213> Secuencia Artificial																
	<220> <223> cadena pesada completa alternativa aglicosilado de fenilizado (dominio V anti-NGF fenilizado fusionado con dominio constante de HC alternativo de BAA32230.1, con sitio de N-glicosilación sustituido)																
	<400> 18																

ES 2 905 682 T3

	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Asp	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
5	Ser	Leu	Arg	Leu	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Asn	Asn	
				20					25					30			
10	Asn	Val	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
15	Gly	Gly	Val	Trp	Ala	Gly	Gly	Ala	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	
		50					55					60					
20	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	
	65					70					75					80	
25	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
					85					90					95		
30	Arg	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ser	Ser	Ser	Thr	Leu	Tyr	Ala	Met	Asp	Ala	Trp	
				100					105					110			
35	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Thr	Ala	Pro	
			115					120					125				
40	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Cys	Gly	Thr	Thr	Ser	Gly	Ala	Thr	
		130					135					140					
45	Val	Ala	Leu	Ala	Cys	Leu	Val	Leu	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	
		145				150					155					160	
50	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	
				165						170					175		
55	Ala	Val	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Met	Val	Thr	
				180					185					190			
60	Val	Pro	Ser	Ser	Arg	Trp	Leu	Ser	Asp	Thr	Phe	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	
			195					200					205				
65	His	Pro	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Arg	Lys	Thr	Asp	
		210					215					220					
70	His	Pro	Pro	Gly	Pro	Lys	Pro	Cys	Asp	Cys	Pro	Lys	Cys	Pro	Pro	Pro	
		225				230					235					240	
75	Glu	Met	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Ile	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
				245						250					255		

ES 2 905 682 T3

	Asp	Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Leu	Val	Val	
				260					265					270			
5	Asp	Leu	Gly	Pro	Asp	Asp	Ser	Asp	Val	Gln	Ile	Thr	Trp	Phe	Val	Asp	
			275					280					285				
10	Asn	Thr	Gln	Val	Tyr	Thr	Ala	Lys	Thr	Ser	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	
		290					295					300					
15	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Pro	Ile	Leu	His	Gln	Asp	
	305					310					315					320	
20	Trp	Leu	Lys	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Ser	Lys	Ser	Leu	
				325						330					335		
25	Pro	Ser	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Lys	Gly	Gln	Pro	His	
				340					345					350			
30	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Ala	Gln	Glu	Glu	Leu	Ser	Arg	
			355					360					365				
35	Asn	Lys	Val	Ser	Val	Thr	Cys	Leu	Ile	Glu	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	
		370					375					380					
40	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ile	Thr	Gly	Gln	Pro	Glu	Pro	Glu	Asn	Asn	
	385					390					395					400	
45	Tyr	Arg	Thr	Thr	Pro	Pro	Gln	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Thr	Tyr	Phe	Leu	
					405					410					415		
50	Tyr	Ser	Arg	Leu	Ser	Val	Asp	Arg	Ser	Arg	Trp	Gln	Arg	Gly	Asn	Thr	
				420					425					430			
55	Tyr	Thr	Cys	Ser	Val	Ser	His	Glu	Ala	Leu	His	Ser	His	His	Thr	Gln	
			435					440					445				
60	Lys	Ser	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys								
		450					455										

<210> 19
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> HC química de aglicosilo (derivada de SEQ ID NO:2)

<400> 19

ES 2 905 682 T3

	Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Ser	Gln	
	1				5					10					15		
5	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Asn	Asn	
				20					25					30			
10	Asn	Val	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Thr	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
15	Gly	Gly	Val	Trp	Ala	Gly	Gly	Ala	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	
		50					55					60					
20	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	
	65				70						75					80	
25	Lys	Met	His	Ser	Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
					85					90					95		
30	Arg	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ser	Ser	Ser	Thr	Leu	Tyr	Ala	Met	Asp	Ala	Trp	
				100					105					110			
35	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Thr	Ala	Pro	
			115					120					125				
40	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Cys	Gly	Thr	Thr	Ser	Gly	Ala	Thr	
		130					135					140					
45	Val	Ala	Leu	Ala	Cys	Leu	Val	Leu	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	
		145				150					155					160	
50	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	
				165					170						175		
55	Ala	Val	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Met	Val	Thr	
				180					185					190			
60	Val	Pro	Ser	Ser	Arg	Trp	Leu	Ser	Asp	Thr	Phe	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	
			195				200						205				
65	His	Pro	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Arg	Lys	Thr	Asp	
		210					215					220					
70	His	Pro	Pro	Gly	Pro	Lys	Pro	Cys	Asp	Cys	Pro	Lys	Cys	Pro	Pro	Pro	
		225				230					235					240	
75	Glu	Met	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Ile	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
					245					250					255		

ES 2 905 682 T3

	Asp	Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Leu	Val	Val	
				260					265					270			
5	Asp	Leu	Gly	Pro	Asp	Asp	Ser	Asp	Val	Gln	Ile	Thr	Trp	Phe	Val	Asp	
			275					280					285				
10	Asn	Thr	Gln	Val	Tyr	Thr	Ala	Lys	Thr	Ser	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	
		290					295					300					
15	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Pro	Ile	Leu	His	Gln	Asp	
	305					310					315					320	
20	Trp	Leu	Lys	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Ser	Lys	Ser	Leu	
				325						330					335		
25	Pro	Ser	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	His	
				340					345					350			
30	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Ala	Gln	Glu	Glu	Leu	Ser	Arg	
			355					360					365				
35	Asn	Lys	Val	Ser	Val	Thr	Cys	Leu	Ile	Lys	Ser	Phe	His	Pro	Pro	Asp	
		370					375					380					
40	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ile	Thr	Gly	Gln	Pro	Glu	Pro	Glu	Asn	Asn	
	385					390					395					400	
45	Tyr	Arg	Thr	Thr	Pro	Pro	Gln	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Thr	Tyr	Phe	Val	
					405					410					415		
50	Tyr	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Asp	Arg	Ser	His	Trp	Gln	Arg	Gly	Asn	Thr	
				420					425					430			
55	Tyr	Thr	Cys	Ser	Val	Ser	His	Glu	Ala	Leu	His	Ser	His	His	Thr	Gln	
			435					440					445				
60	Lys	Ser	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys								
		450					455										
65	<210> 20 <211> 237 <212> PRT <213> Secuencia Artificial																
	<220> <223> cadena ligera de anticuerpo felino-rata quimérico con secuencia líder																
	<400> 20																

ES 2 905 682 T3

	Met	Gly	Val	Pro	Thr	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Ile	Thr	
	1				5					10					15		
5	Asp	Ala	Ile	Cys	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	
				20					25					30			
10	Ala	Ser	Leu	Gly	Glu	Thr	Val	Thr	Ile	Glu	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asp	
			35					40					45				
15	Ile	Tyr	Asn	Ala	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	
	50						55					60					
20	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Leu	His	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	
	65					70					75					80	
25	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ile	Asn	
					85					90					95		
30	Ser	Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Val	Ala	Ser	Tyr	Phe	Cys	Gln	His	Tyr	Phe	
				100					105					110			
35	His	Tyr	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	
			115					120					125				
40	Ser	Asp	Ala	Gln	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Gln	Pro	Ser	Leu	Asp	Glu	
		130					135					140					
45	Leu	His	Thr	Gly	Ser	Ala	Ser	Ile	Val	Cys	Ile	Leu	Asn	Asp	Phe	Tyr	
	145					150					155					160	
50	Pro	Lys	Glu	Val	Asn	Val	Lys	Trp	Lys	Val	Asp	Gly	Val	Val	Gln	Thr	
					165					170					175		
55	Lys	Ala	Ser	Lys	Glu	Ser	Thr	Thr	Glu	Gln	Asn	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	
				180					185					190			
60	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Met	Ser	Arg	Thr	Glu	Tyr	Gln	Ser	
			195					200					205				
65	His	Glu	Lys	Phe	Ser	Cys	Glu	Val	Thr	His	Lys	Ser	Leu	Ala	Ser	Thr	
	210						215					220					
	Leu	Val	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Ser	Glu	Cys	Gln	Arg	Glu				
	225					230					235						
	<210>	21															
	<211>	476															
	<212>	PRT															

ES 2 905 682 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena pesada de anticuerpo felino-rata quimérico con secuencia líder

5

<400> 21

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

ES 2 905 682 T3

	Asn Val Ala His Pro Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Arg	225	230	235	240
5	Lys Thr Asp His Pro Pro Gly Pro Lys Pro Cys Asp Cys Pro Lys Cys	245	250	255	
10	Pro Pro Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Ile Phe Ile Phe Pro Pro	260	265	270	
15	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Ser Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	275	280	285	
20	Leu Val Val Asp Leu Gly Pro Asp Asp Ser Asp Val Gln Ile Thr Trp	290	295	300	
25	Phe Val Asp Asn Thr Gln Val Tyr Thr Ala Lys Thr Ser Pro Arg Glu	305	310	315	320
30	Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Leu	325	330	335	
35	His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Ser	340	345	350	
40	Lys Ser Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	355	360	365	
45	Gln Pro His Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Ala Gln Glu Glu	370	375	380	
50	Leu Ser Arg Asn Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Ile Lys Ser Phe His	385	390	395	400
55	Pro Pro Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ile Thr Gly Gln Pro Glu Pro	405	410	415	
60	Glu Asn Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Ser Asp Gly Thr	420	425	430	
65	Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Arg Ser His Trp Gln Arg	435	440	445	
	Gly Asn Thr Tyr Thr Cys Ser Val Ser His Glu Ala Leu His Ser His	450	455	460	
	His Thr Gln Lys Ser Leu Thr Gln Ser Pro Gly Lys	465	470	475	

ES 2 905 682 T3

<210> 22
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> cadena pesada de VH anti-NGF fenilizada alternativa (feN2-VH)

<400> 22

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

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

45

<210> 23
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cadena ligera Vk anti-NGF fenilizada alternativa (feN2-Vk)

<400> 23

55

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

60

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

Leu Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Arg Ser Pro Arg Leu Leu Ile

65

ES 2 905 682 T3

	35	40	45
5	Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly 50 55 60		
10	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Gln Thr 65 70 75 80		
15	Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg 85 90 95		
20	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys 100 105		
25	<210> 24 <211> 476 <212> PRT <213> Secuencia Artificial <220> <223> cadena pesada de IgG anti-NGF felino completa alternativa (feN2-HC2) <400> 24		
30	Met Ala Val Leu Val Leu Leu Leu Cys Leu Val Thr Phe Pro Thr Cys 1 5 10 15		
35	Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Gln 20 25 30		
40	Pro Gly Glu Ser Leu Arg Leu Thr Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu 35 40 45		
45	Thr Asn Asn Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu 50 55 60		
50	Glu Trp Met Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser 65 70 75 80		
55	Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr 85 90 95		
60	Val Phe Leu Gln Met His Ser Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr 100 105 110		
65	Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met 115 120 125		
	Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr 130 135 140		

ES 2 905 682 T3

	Thr	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Cys	Gly	Thr	Thr	Ser
	145					150					155					160
5	Gly	Ala	Thr	Val	Ala	Leu	Ala	Cys	Leu	Val	Leu	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu
					165					170					175	
10	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His
				180					185					190		
15	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
			195					200					205			
20	Met	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Arg	Trp	Leu	Ser	Asp	Thr	Phe	Thr	Cys
	210						215					220				
25	Asn	Val	Ala	His	Pro	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Arg
	225					230					235					240
30	Lys	Thr	Asp	His	Pro	Pro	Gly	Pro	Lys	Pro	Cys	Asp	Cys	Pro	Lys	Cys
					245					250					255	
35	Pro	Pro	Pro	Glu	Met	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Ile	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro
				260					265					270		
40	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
			275					280					285			
45	Leu	Val	Val	Asp	Leu	Gly	Pro	Asp	Asp	Ser	Asp	Val	Gln	Ile	Thr	Trp
	290						295					300				
50	Phe	Val	Asp	Asn	Thr	Gln	Val	Tyr	Thr	Ala	Lys	Thr	Ser	Pro	Arg	Glu
	305					310					315					320
55	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Pro	Ile	Leu
					325					330					335	
60	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Lys	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Ser
				340					345					350		
65	Lys	Ser	Leu	Pro	Ser	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
			355					360					365			
70	Gln	Pro	His	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Ala	Gln	Glu	Glu
		370					375					380				
75	Leu	Ser	Arg	Asn	Lys	Val	Ser	Val	Thr	Cys	Leu	Ile	Lys	Ser	Phe	His

ES 2 905 682 T3

	385				390					395				400		
5	Pro	Pro	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ile	Thr	Gly	Gln	Pro	Glu	Pro
					405					410					415	
10	Glu	Asn	Asn	Tyr	Arg	Thr	Thr	Pro	Pro	Gln	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Thr
				420					425					430		
15	Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Asp	Arg	Ser	His	Trp	Gln	Arg
			435					440					445			
20	Gly	Asn	Thr	Tyr	Thr	Cys	Ser	Val	Ser	His	Glu	Ala	Leu	His	Ser	His
		450					455					460				
25	His	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys				
	465					470					475					
	<210> 25															
	<211> 237															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia Artificial															
	<220>															
30	<223> cadena ligera kappa de IgG anti-NGF felina completa alternativa (feN2-kLC)															
	<400> 25															
35	Met	Gly	Val	Pro	Thr	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Ile	Thr
	1				5					10					15	
40	Asp	Ala	Ile	Cys	Asp	Ile	Glu	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser
				20					25					30		
45	Val	Thr	Pro	Gly	Glu	Ser	Val	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asp
			35					40					45			
50	Ile	Tyr	Asn	Ala	Leu	Ala	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Arg	Ser	Pro
	50						55					60				
55	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Leu	His	Thr	Gly	Val	Pro	Asp
	65					70					75					80
60	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser
				85						90					95	
65	Arg	Val	Gln	Thr	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	His	Tyr	Phe
			100						105					110		
	His	Tyr	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg

ES 2 905 682 T3

	115	120	125	
5	Ser Asp Ala Gln Pro Ser Val Phe Leu Phe Gln Pro Ser Leu Asp Glu 130 135 140			
10	Leu His Thr Gly Ser Ala Ser Ile Val Cys Ile Leu Asn Asp Phe Tyr 145 150 155 160			
15	Pro Lys Glu Val Asn Val Lys Trp Lys Val Asp Gly Val Val Gln Thr 165 170 175			
20	Lys Ala Ser Lys Glu Ser Thr Thr Glu Gln Asn Ser Lys Asp Ser Thr 180 185 190			
25	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Met Ser Arg Thr Glu Tyr Gln Ser 195 200 205			
30	His Glu Lys Phe Ser Cys Glu Val Thr His Lys Ser Leu Ala Ser Thr 210 215 220			
35	Leu Val Lys Ser Phe Asn Arg Ser Glu Cys Gln Arg Glu 225 230 235			
40	<210> 26 <211> 23 <212> PRT <213> Secuencia Artificial <220> <223> FR1 de cadena ligera alternativa (feN2-kLC) <400> 26			
45	Asp Ile Glu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly 1 5 10 15			
50	Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys 20			
55	<210> 27 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia Artificial <220> <223> FR2 de cadena ligera alternativa (feN2-kLC) <400> 27			
60	Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Arg Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr 1 5 10 15			
65				

<210> 28
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> FR3 de cadena ligera alternativa (feN2-kLC)
 <400> 28
 10
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 15
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Gln Thr Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys
 20 25 30
 <210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> FR4 de cadena ligera alternativa (feN2-kLC)
 25
 <400> 29
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 1 5 10
 30
 <210> 30
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> FR1 de cadena pesada alternativa (feN2-VH)
 40
 <400> 30
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Gln Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 45
 Ser Leu Arg Leu Thr Cys Ala Ala Ser Gly
 20 25
 50
 <210> 31
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> FR2 de cadena pesada alternativa (feN2-VH)
 <400> 31
 60
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10
 65
 <210> 32
 <211> 32

ES 2 905 682 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> FR3 de cadena pesada alternativa (feN2-VH)

<400> 32

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

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

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> FR4 de cadena pesada alternativa (feN2-VH)

25 <400> 33

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que es capaz de unirse específicamente al factor de crecimiento nervioso (NGF) felino e inhibir la capacidad del NGF felino para unirse al receptor de NGF felino p75 y/o TrkA, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23, y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.
- 10 2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de por lo menos el 85% con la misma y en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de por lo menos el 85% con la misma.
- 15 3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende un dominio constante de cadena pesada seleccionado o modificado por medio de una sustitución o delección de aminoácidos de tal manera que dicho dominio constante no medie funciones efectoras en sentido descendente.
- 20 4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo como se reivindica en la reivindicación 3, en donde el anticuerpo tiene un dominio constante felino de tipo HC2.
- 25 5. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, junto con por lo menos un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 30 6. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en el tratamiento de una afección asociada con el dolor o para su uso en el tratamiento, mejora o inhibición del dolor asociado con poliartritis inmunomediada, osteoartritis o artritis reumatoide, o para su uso en el tratamiento de un tumor inducido a proliferar por NGF en un felino y afecciones asociadas con el mismo.
- 35 7. Un kit para el tratamiento del dolor en felinos, o para el tratamiento de una afección asociada con el dolor, o para el tratamiento, mejora o inhibición del dolor asociado con poliartritis inmunomediada, osteoartritis o artritis reumatoide, o para el tratamiento de un tumor inducido a proliferar por NGF en un felino y afecciones asociadas con el mismo, que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 e instrucciones para el uso del mismo.

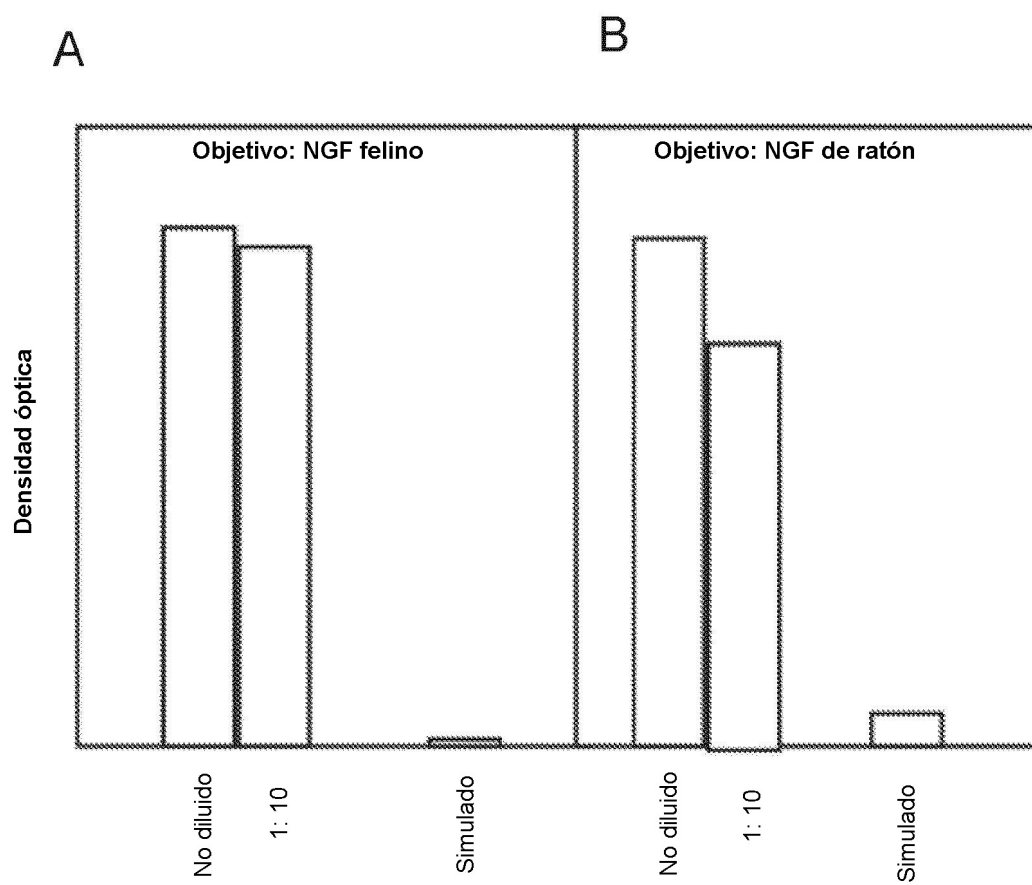


Figura 1

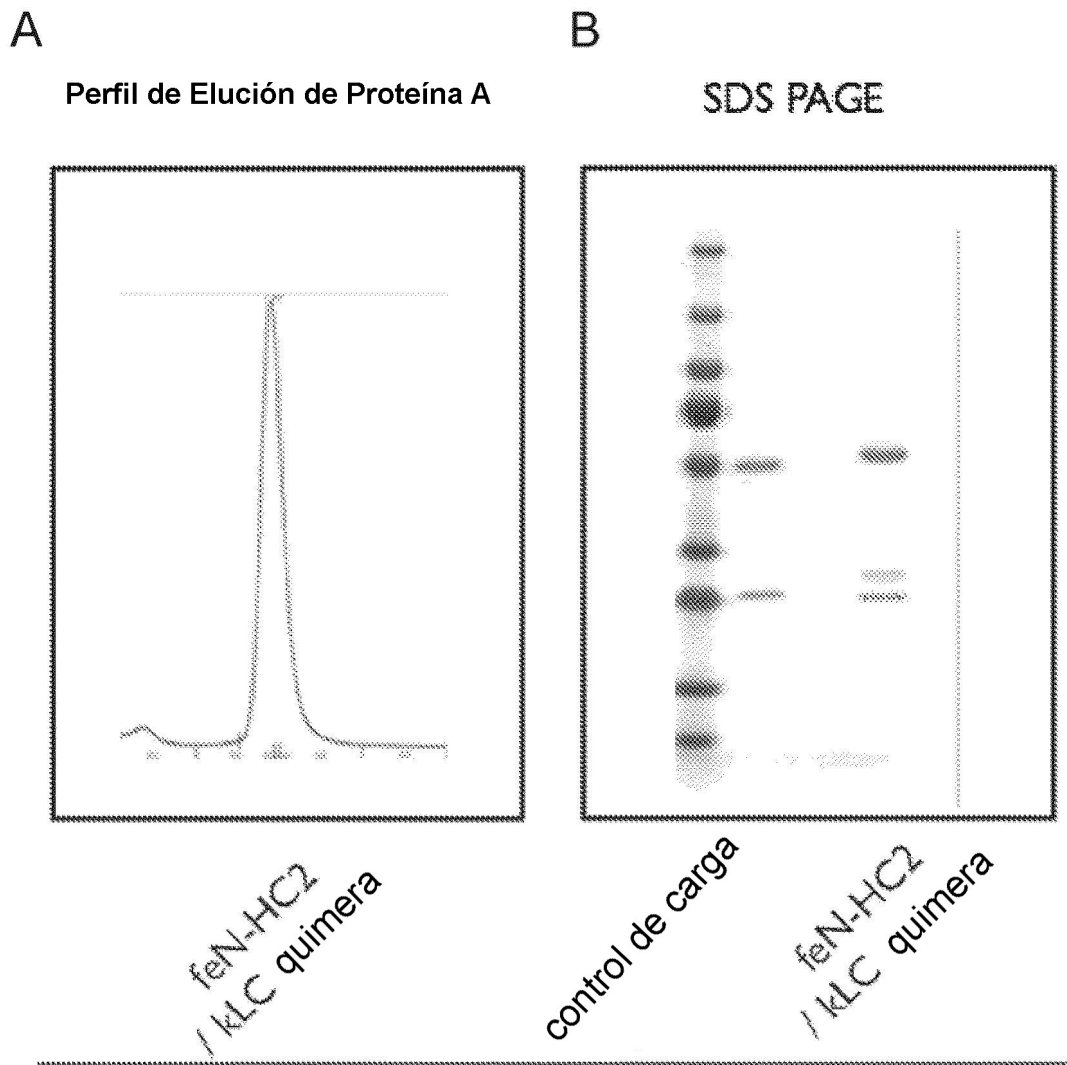


Figura 2

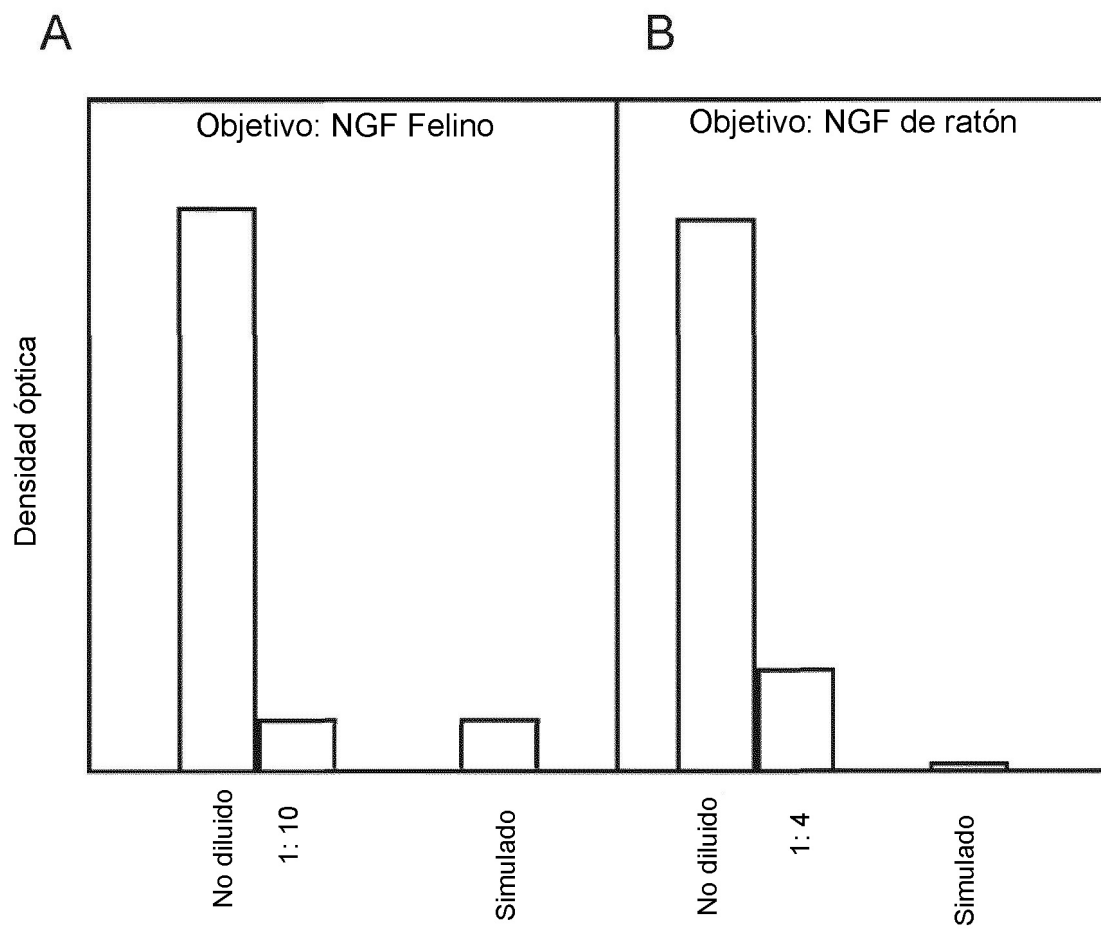
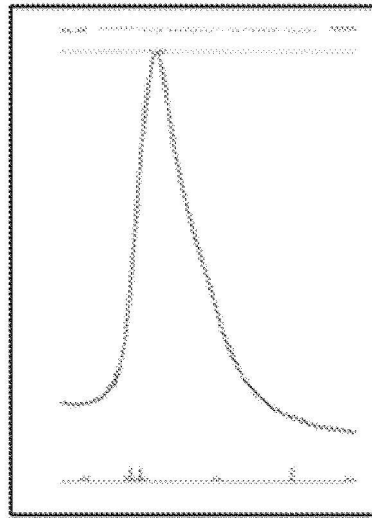


Figura 3

Perfil de elución de Proteína A

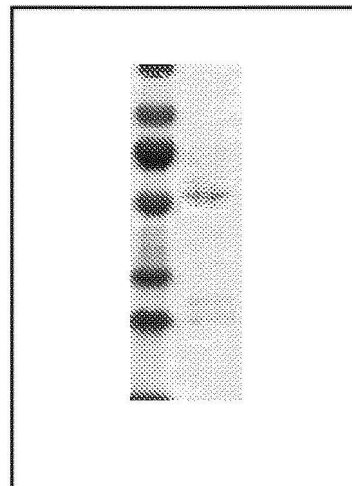
A



feN-HC2
/ kLC

SDS PAGE

B



Estandares
feN-HC2
/ kLC

Figura 4

anticuerpo basado en HC2 anti-NGF felino inhibe la proliferación celular de TF-1 inducida por NGF

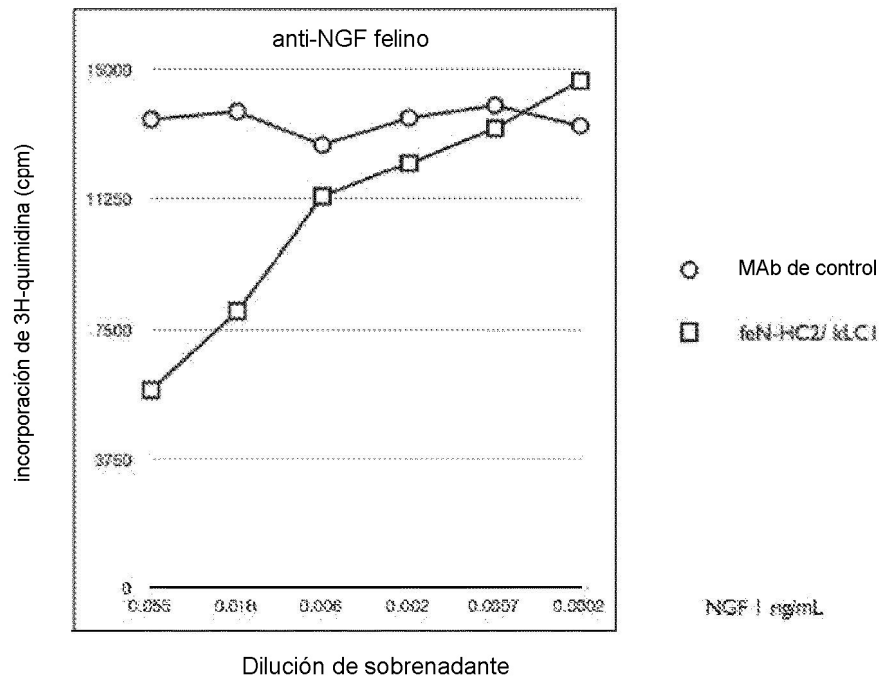


Figura 5

Los anticuerpos basados en HC2 felinos son inactivos en la fijación del complemento

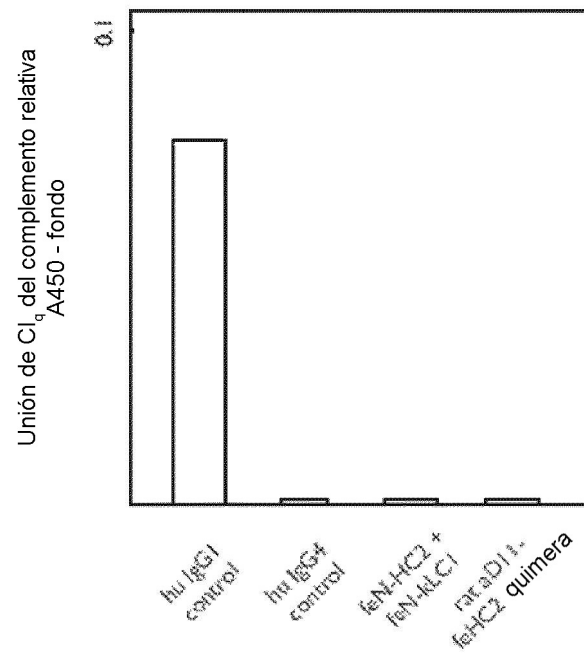


Figura 6

MGVPTQLLGLLLLWITDAICDIQMTQSPASLSASLGETVTIECR
ASEDIYNALAWYQQKPGKSPQLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSG
SGTQYSLKINSLQSEDVASYFCQHYPRTFGGGTKLELKR
SDAQPSVFLFQPSLDELHTGSASIVCILNDFYPKEVNVKWKVD
GVVQTKASKESTTEQNSKDSTYSLSSTLTMSRTEYQSHEKFSC
EVTHKSLASTLVKSFNRSECQRE**

Figura 7 - Cadena ligera quimérica

MAVLVLLLCLVTFPTCVLSQVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFS
LTNNNVNWVRQATGRGLEWMGGVWAGGATDYN SALKSRLTITRD
TSKSQVFLKMHSLQSEDTATYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGT
SVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGTTSGATVALACLVLGYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQASGLYSLSSMVTVPSSRWLSDTFTCNVAH
PPSNTKVDKTVRKTDHPPGPKPCDCPKCPPPEMLGGPSIFIFPPKPK
DTLSISRTPEVTCLVVDLGPDDSDVQITWFVDNTQVYTAKTSPREEQ
FNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSPIERTISKAKGQP
HEPQVYVLP PAQEELSRNKVSVTCLIKSFHPPDIAVEWEITGQPEPE
NNYRTTPPQLDSDGTYFVYSKLSVDRSHWQRGNTYTCSVSHEALH
SHHTQKSLTQSPGK**

Figura 8 - Cadena pesada quimérica

```

      *      * *      ***      ***      *
DI VMTQTPLSLSVTPGEPASISCRASEDIYNALAWYLQKP 40

      *      **                      *      ***      *      *****
GQSPRRLIYNTDTLHTGVDPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEA 80

      *      **                      *      *
DDVGVYFCQHYFHYPRTEFGPGTKLEIK 107

```

Figura 9 - Dominio variable de cadena ligera


```

      *      **      ***  *      **
QVQLVESGGDLVQPGGSLRLTCAASGFSLTNNNVNWVRQA 40

*  *                                     *  *  *  **  *****
PGKGLEWMGGVWAGGATDYNSALKGRFTISRDNAKNTLYL 80

82ABC                                100ABCDEF
*  *  **                                     *
QMNSLKTEDTATYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGTLVTVSS 113

```

Figura 10 - Dominio variable de cadena pesada

**DIVMTQTPLSLSVTPGEPASISCRASEDIYNALAWYLQKPGQSP
RRLIYNTDTLHTGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDVGVYFC
QHYPHYPRTFGPGTKLEIKRSDAQPSVFLFQPSLDELHTGSASI
VCILNDFYPKEVNVKWKVDGVVQTKASKESTTEQNSKDSTYSL
SSTLTMSRTEYQSHEKFSCEVTHKSLASTLVKSFNRSECQRE**

Figura 11- Cadena ligera kappa anti-NGF felinizada

**QVQLVESGGDLVQPGGSLRLTCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGK
GLEWMGGVWAGGATDYN SALKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKT
EDTATYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGT LVT VSSASTTAPSVF
PLAPSCGTTSGATVALACLVLGYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPA
VLQASGLYSLSSMVTVPSSRWLSDTFTCNVAHPPSNTKVDKTVRK
TDHPPGPKPCDCPKCPPPEMLGGPSIFIFPPKPKDTLSISRTPEVTC
LVVDLGPDDSDVQITWFVDNTQVYTAKTSPREEQFNSTYRVVSVLP
ILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSPIERTISKAKGQPHEPQVYVLPPA
QEELSRNKVSVTCLIKSFHPPDIAVEWEITGQPEPENNYRTTPPQLD
SDGTYFVYSKLSVDRSHWQRGNTYTCSVSHEALHSHHTQKSLTQS
PGK**

Figura 12 - Cadena pesada VH anti-NGF felinizada

QVQLVESGAELVQPGESLRLTCAASGFSLT
NNNVNWVRQAPGKGLEWMGGVWAGGATD
YNSALKSRLTITRDTSKNTVFLQMHSLQSED
TATYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGTTV
TVSA

Figura 13 - Cadena pesada VH anti-NGF felinizada
alternativa (feN2-VH)

DIEMTQSPLSLSVTPGESVSISCRASEDIYNA
LAWYLQKPGRSPRLLIYNTDTLHTGVPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVQTEDVG VYFCQH YFH
YPRTFGQGGTKLELK

Figura 14 - Cadena ligera Vk anti-NGF felinizada
alternativa (feN2-Vk)

MAVLVLLLCLVTFTCVLSQVQLVESGAELV
QPGESLRLTCAASGFSLTNNNVNWVRQAP
GKGLEWMGGVWAGGATDYNSALKSRLTIT
RDTSKNTVFLQMHSLQSEDTATYYCARDGG
YSSSTLYAMDAWGQGTTVTVSAASTTAPSV
FPLAPSCGTTSGATVALACLVLGYPPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQASGLYSLSSMV
TVPSSRWLSDTFTCNVAHPPSNTKVDKTVR
KTDHPPGPKPCDCPKCPPPEMLGGPSIFIFP
PKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLGPDDSDVQIT
WFVDNTQVYTAKTSPREEQFNSTYRVVSVL
PILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSPIERTISK
AKGQPHEPQVYVLPPAQEELSRNKVSVTCLI
KSFHPPDIAVEWEITGQPEPENNYRTTPPQL
DSDGTYFVYSKLSVDRSHWQRGNTYTCSV
SHEALHSHHTQKSLTQSPGK

Figura 15 - Cadena pesada de IgG anti-NGF completa
alternativa (feN2-HC2)

MGVPTQLLGLLLLWITDAICDIEMTQSPLSLS
VTPGESVSISCRASEDIYNALAWYLQKPGRS
PRLLIYNTDTLHTGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVQTEDVGVYFCQHYPRTFGQGTKLE
LKRSDAQPSVFLFQPSLDELHTGSASIVCILN
DFYPKEVNVKWKVDGVVQTKASKESTTEQN
SKDSTYSLSSSTLTMSRTEYQSHEKFSCEVT
HKSLASTLVKSFNRSECQRE

Figura 16 - Cadena ligera kappa de IgG anti-NGF felina completa alternativa (feN2-kLC)

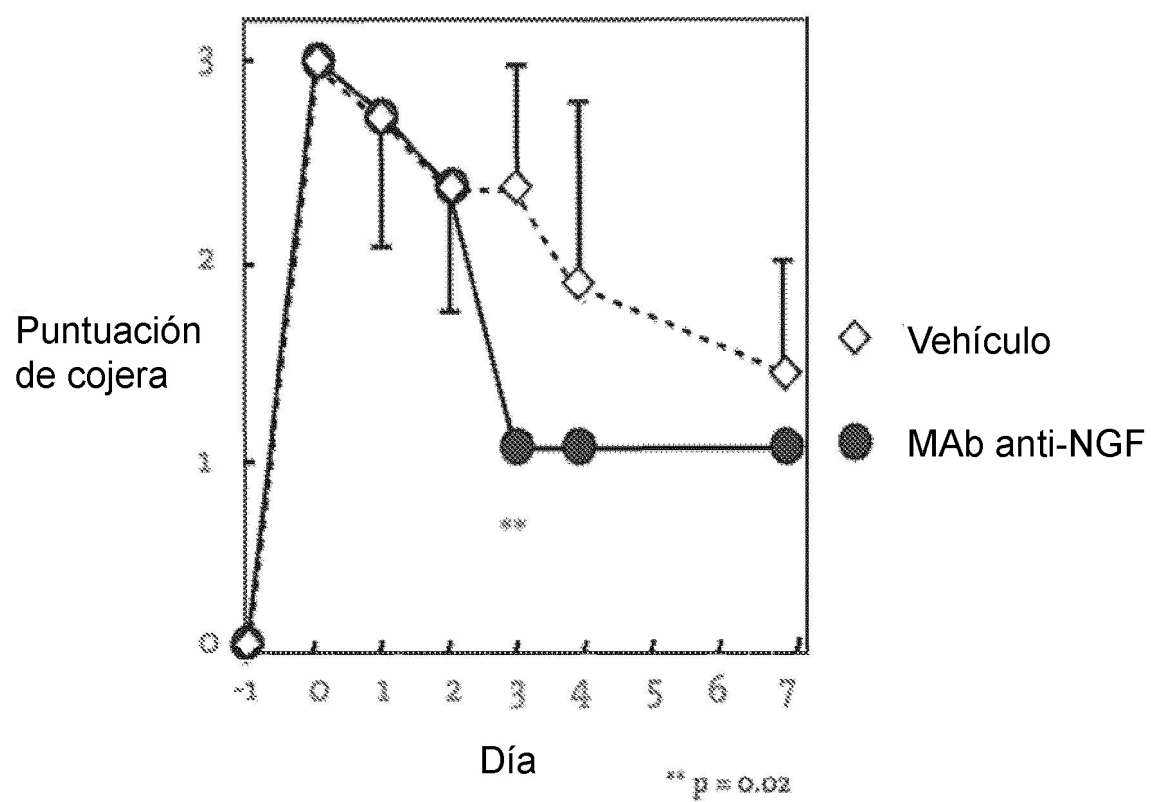


Figura 17