

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 960**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 19/02** (2006.01)  
**A61P 29/02** (2006.01)  
**C07K 16/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06750079 .3**  
96 Fecha de presentación: **11.04.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1871416**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2008**

54 Título: **Procedimientos para tratar dolor por osteoartritis administrando un antagonista del factor de crecimiento nervioso y composiciones que contienen el mismo**

30 Prioridad:  
**11.04.2005 US 104248**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.11.2012**

73 Titular/es:  
**RINAT NEUROSCIENCE CORP. (100.0%)**  
**230 East Grand Avenue**  
**South San Francisco, CA 94080 , US**

72 Inventor/es:  
**ROSENTHAL, ARNON;**  
**SHELTON, DAVID, L. y**  
**WALICKE, PATRICIA, ANN**

74 Agente/Representante:  
**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 389 960 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

Procedimientos para tratar dolor por osteoartritis administrando un antagonista del factor de crecimiento nervioso y composiciones que contienen el mismo.

**Campo de la invención**

- 5 La invención se refiere a anticuerpos anti-NGF (tal como anticuerpos antagonista anti-NGF). La invención se refiere adicionalmente al uso de un anticuerpo antagonista anti-NGF en la preparación de un medicamento para la mejora de la rigidez en un individuo que tiene osteoartritis.

**Antecedentes de la invención**

- 10 El factor de crecimiento nervioso (NGF) fue la primera neurotrofina en identificarse, y su función en el desarrollo y la supervivencia de neuronas tanto periféricas como centrales ha sido bien caracterizada. Se ha mostrado que el NGF es un factor de supervivencia y mantenimiento crítico en el desarrollo de neuronas sensitivas simpáticas y embrionarias periféricas y de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal. Smeyne y col., *Nature* 368:246-249 (1994) y Crowley y col., *Cell* 76:1001-1011 (1994). El NGF regula por incremento la expresión de neuropéptidos en neuronas sensitivas (Lindsay y Harmer, *Nature* 337:362-364 (1989)) y su actividad es mediada por dos receptores unidos a membrana diferentes, el receptor de tirosina cinasa TrkA y el receptor de neurotrofina común p75 (algunas veces llamado receptores de NGF de "alta afinidad" y "baja afinidad", respectivamente). Chao y col., *Science* 232:518-521 (1986). El receptor p75 está estructuralmente relacionado con otros miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (Chao y col., *Science* 232:518-521 (1986)). Para una revisión sobre NGF, véanse Huang y col., *Annu. Rev. Neurosci.* 24:677-736 (2001); Bibel y col., *Genes Dev.* 14:2919-2937 (2000). Se ha determinado la estructura cristalina de NGF y NGF en complejo con el receptor trkA. Véase *Nature* 254:411 (1991); *Nature* 401:184-188 (1996).

- 25 Además de sus efectos en el sistema nervioso, el NGF se ha implicado cada vez más en procedimientos fuera del sistema nervioso. Por ejemplo, se ha mostrado que el NGF potencia la permeabilidad vascular (Otten y col., *Eur J Pharmacol.* 106:199-201 (1984)), potencia respuestas inmunitarias de linfocitos T y B (Otten y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10059-10063 (1989)), induce diferenciación de linfocitos y proliferación de mastocitos y produce la liberación de señales biológicas solubles de mastocitos (Matsuda y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6508-6512 (1988); Pearce y col., *J. Physiol.* 372:379-393 (1986); Bischoff y col., *Blood* 79:2662-2669 (1992); Horigome y col., *J. Biol. Chem.* 268:14881-14887 (1993)). Aunque se ha mostrado que el NGF exógenamente añadido puede tener todos estos efectos, es importante observar que sólo se ha mostrado raramente que el NGF endógeno es importante en cualquiera de estos procedimientos *in vivo* (Torcia y col., *Cell.* 85(3):345-56 (1996)). Por tanto, no está claro qué podría ser ese efecto, si lo hubiera, para inhibir la bioactividad de NGF endógeno.

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

- 40 Se ha observado una asociación entre niveles de NGF elevados y una variedad de afecciones inflamatorias en pacientes humanos, además de en varios modelos animales. Éstas incluyen lupus eritematoso sistémico (Bracci-Laudiero y col., *Neuroreport* 4:563-565 (1993)), esclerosis múltiple (Bracci-Laudiero y col., *Neurosci. Lett.* 147:9-12 (1992)), psoriasis (Raychaudhuri y col., *Acta Derm. Venereol.* 78:84-86 (1998)), artritis (Falcim y col., *Ann. Rheum. Dis.* 55:745-748 (1996)), cistitis intersticial (Okragly y col., *J. Urology* 161:438-441 (1999)) y asma (Braun y col., *Eur. J Immunol.* 28:3240-3251 (1998)).

- 50 Coherentemente, un nivel elevado de NGF en tejidos periféricos está asociado a hiperalgesia e inflamación y se ha observado en varias formas de artritis. La membrana sinovial de pacientes afectados por artritis reumatoide expresa altos niveles de NGF, mientras que en la membrana sinovial no inflamada se ha informado que el NGF es indetectable (Aloe y col., *Arch. Rheum.* 35:351-355 (1992)). Se observaron resultados similares en ratas con artritis reumatoide experimentalmente inducida (Aloe y col., *Clin. Exp. Rheumatol.* 10:203-204 (1992)). Se ha informado de niveles elevados de NGF en ratones artríticos transgénicos, junto con un aumento en el número de mastocitos (Aloe y col., *Int. J. Tissue Reactions-Exp. Clin. Aspects* 15:139-143 (1993)). La publicación PCT nº WO 02/096458 desvela el uso de anticuerpos anti-NGF de ciertas propiedades en el tratamiento de diversos trastornos relacionados con NGF tales como afección inflamatoria (por ejemplo, artritis reumatoide). Se ha informado que un anticuerpo anti-NGF purificado inyectado en ratones transgénicos artríticos que llevan el gen factor de necrosis tumoral  $\alpha$  humano (TNF- $\alpha$ ) produjo la reducción en el número de mastocitos, además de una disminución en los niveles de histamina y sustancia P dentro de la membrana sinovial de ratones con artritis (Aloe y col., *Rheumatol. Int.* 14: 249-252 (1995)). Se ha mostrado que la administración exógena de un anticuerpo contra NGF redujo el nivel potenciado de TNF- $\alpha$

que se produce en ratones artríticos (Manni y col., Rheumatol. Int. 18: 97-102 (1998)).

Por tanto, se observó un aumento de la expresión de NGF y el receptor de NGF de alta afinidad (TrkA) en condrocitos de osteoartritis humana (Iannone y col., Rheumatology 41:1413-1418 (2002)).

5 Se ha informado de anticuerpos de roedor antagonista anti-NGF. Véase, por ejemplo, Hongo y col., Hybridoma (2000) 19(3):215-227; Ruberti metal. (1993) Cell. Molec. Neurobiol. 13(5): 559-568. Sin embargo, si se usan anticuerpos de roedor terapéuticamente en seres humanos, una respuesta de anticuerpos humanos anti-murinos se desarrolla en números significativos de individuos tratados. Además, las funciones efectoras de anticuerpos de ratón han demostrado ser menos eficientes en el contexto humano. Por tanto, hay una gran necesidad de anticuerpos antagonista anti-NGF, que incluyen anticuerpos antagonista anti-NGF humanizados.

## 10 **Breve resumen de la invención**

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo antagonista anti-NGF en la preparación de un medicamento para mejorar la rigidez en un individuo que tiene osteoartritis. La invención proporciona además un anticuerpo antagonista anti-NGF para su uso en mejorar la rigidez en un individuo que tiene osteoartritis. Otras características de la invención se proporcionan en las reivindicaciones adjuntas.

15 En un aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado y madurado por afinidad, E3, que se une específicamente al factor de crecimiento nervioso ("NGF") humano y de roedor. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de E3 se muestran en las Figuras 1A (SEC ID N°:1) y 1B (SEC ID N°:2), respectivamente. Las porciones de CDR del anticuerpo E3 (incluyendo CDR de Chothia y Kabat) se representan en diagramas en las Figuras 1A y 1B. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras de E3, y de las CDR extendidas individuales, también se muestran más adelante (véase, "secuencias de anticuerpos", más adelante).

20

En otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo que comprende un fragmento o una región del anticuerpo E3 (indistintamente llamado "E3" en este documento). En una realización, el fragmento es una cadena ligera del anticuerpo E3 como se muestra en la Figura 1B. En otra realización, el fragmento es una cadena pesada del anticuerpo E3 como se muestra en la Figura 1A. En otra realización más, el fragmento contiene una o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo E3. En otra realización más, el fragmento contiene una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo E3 como se muestra en la Figura 1A y 1B.

25

En otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo que comprende una cadena ligera que está codificada por un polinucleótido que es producido por una célula huésped con un número de depósito de ATCC n° PTA-4893 o ATCC n° PTA-4894. En otro aspecto, el anticuerpo comprende una cadena pesada que está codificada por un polinucleótido que es producido por una célula huésped con un número de depósito de ATCC n° PTA-4895. En otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo que comprende (a) una cadena ligera que está codificada por un polinucleótido que es producido por una célula huésped con un número de depósito de ATCC n° PTA-4894 o ATCC n° PTA-4893; y (b) una cadena pesada que está codificada por un polinucleótido que es producido por una célula huésped con un número de depósito de ATCC n° PTA-4895 (por comodidad en este documento, el (los) polinucleótido(s) producido(s) por una célula huésped depositada se denomina en lo sucesivo que tienen un número de depósito de ATCC n° PTA-4894, PTA-4893 y PTA-4895). En otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena ligera de una cadena ligera que está codificada por un polinucleótido que es producido por una célula huésped con un número de depósito de ATCC n° PTA-4894 o ATCC n° PTA-4893. En otro aspecto, la invención es un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada de una cadena pesada que está codificada por un polinucleótido que es producido por una célula huésped con un número de depósito de ATCC n° PTA-4895. En otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo que comprende (a) una región variable de la cadena ligera de una cadena ligera que está codificada por un polinucleótido que es producido por una célula huésped con un número de depósito de ATCC n° PTA-4894 o ATCC n° PTA-4893, y (b) una región variable de la cadena pesada de una cadena pesada que está codificada por un polinucleótido que es producido por una célula huésped con un número de depósito de ATCC n° PTA-4895. En otro aspecto adicional, el anticuerpo es un anticuerpo que comprende una o más CDR codificadas por (a) un polinucleótido que es producido por una célula huésped con un número de depósito de ATCC n° PTA-4894; y/o (b) una cadena pesada que está codificada por un polinucleótido que es producido por una célula huésped con un número de depósito de ATCC n° PTA-4895.

30

35

40

45

50

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende la región constante de IgG2a de la cadena pesada humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende la región constante kappa de la cadena ligera humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte, por ejemplo, no desencadena la lisis mediada por complemento o no estimula la citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ATCC). En otras realizaciones, la región constante se modifica como se describe en Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624; publicación PCT n° WO1999/058572. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende una región constante de IgG2a de la cadena pesada humana que comprende las siguientes mutaciones: A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos con referencia a la secuencia de IgG2a natural). Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624.

55

- En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una cualquiera o más de las siguientes: a) una o más CDR del anticuerpo E3 mostrado en las Figuras 1A y 1B; b) CDR H3 de la cadena pesada del anticuerpo E3 mostrado en la Figura 1A; c) CDR L3 de la cadena ligera del anticuerpo E3 mostrado en la Figura 1B; d) tres CDR de la cadena ligera del anticuerpo E3 mostrado en la Figura 1B; e) tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo E3 mostrado en la Figura 1A; y f) tres CDR de la cadena ligera y tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo E3 mostrado en las Figuras 1A y 1B. La invención proporciona además un anticuerpo que comprende una cualquiera o más de las siguientes: a) una o más (una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) CDR derivadas del anticuerpo E3 mostrado en las Figuras 1A y 1B; b) una CDR derivada del CDR H3 de la cadena pesada del anticuerpo E3 mostrado en la Figura 1A; y/o c) una CDR derivada del CDR L3 de la cadena ligera del anticuerpo E3 mostrado en la Figura 1B. En algunas realizaciones, las CDR pueden ser CDR de Kabat, CDR de Chothia, o una combinación de CDR de Kabat y de Chothia (llamadas CDR "extendidas" o "combinadas" en este documento). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a NGF (tal como NGF humano). En algunas realizaciones, los anticuerpos comprenden cualquiera de las configuraciones de CDR (incluyendo combinaciones, variantes, etc.) descritas en este documento.
- En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID N°:9 en la que I34 es S, L, V, A o I; y N35 está sustituido con N, T o S. Por comodidad en este documento, "sustituido" o "es" en este contexto o referencia a un aminoácido se refiere a elecciones de aminoácido(s) para una posición dada. Como es evidente, la sustitución, o elección, puede ser el aminoácido representado en una SEC ID o figura.
- En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID N°:10 en la que M50 es M, I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V.
- En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID N°: 11 en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; y en la que Y110 es Y, K, S, R o T.
- En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID N°: 11 en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido.
- En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID N°: 11 en la que G98 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que G99 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y 107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido.
- En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID N°: 12 en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q.
- En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID N°: 13 en la que I51 es I, T, V o A; y S56 es S o T.
- En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID N°: 14 en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R.
- En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID N°: 14 en la que S91 es S o E; K92 es cualquier aminoácido; T93 es cualquier aminoácido; y en la que Y96 es Y o R.
- En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 9 en la que I34 es S, L, V A o I; y N35 es N, T o S.
- En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 10 en la que M50 es M, I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V.
- En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 11 en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; y en la que Y110 es Y, K, S, R o T.
- En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 11 en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido.

- 5 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 11 en la que G98 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que G99 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S 105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido.
- En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 12 en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q.
- En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 13 en la que I51 es I, T, V o A; y S56 es S o T.
- 10 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 14 en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R.
- En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 14 en la que S91 es S o E; K92 es cualquier aminoácido; T93 es cualquier aminoácido; y en la que Y96 es Y o R.
- 15 En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos (incluyendo anticuerpos humanizados) que comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende la región CDR1 de SEC ID N°: 9 en la que I34 es S, L, V A o I; y N35 es N, T o S; la región CDR2 de SEC ID N°: 10 en la que M50 es M, I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V; y la región CDR3 de SEC ID N°: 11 en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S 105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; en la que Y110 es Y, K, S, R o T. En algunas realizaciones, la región variable de la cadena pesada comprende la región CDR3 de SEC ID N°: 11 en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; en la que Y110 es cualquier aminoácido. En otras realizaciones, la región variable de la cadena pesada comprende la región CDR3 de SEC ID N°: 11 en la que G98 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que G99 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende además una región variable de la cadena ligera del anticuerpo.
- 20
- 25
- 30 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende la región CDR1 de SEC ID N°: 12 en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q; la región CDR2 de SEC ID N°: 13 en la que I51 es I, T, V o A; y S56 es S o T; y la región CDR3 de SEC ID N°: 14 en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, la región variable de la cadena ligera comprende la región CDR3 de SEC ID N°: 14 en la que S91 es S o E; K92 es cualquier aminoácido; T93 es cualquier aminoácido; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, el polipéptido (tal como un anticuerpo) comprende además una cadena pesada del anticuerpo.
- 35
- En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la región CDR1 de SEC ID N°: 9 en la que I34 es S, L, V A o I; y N35 es N, T o S; la región CDR2 de SEC ID N°: 10 en la que M50 es M, I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V; y la región CDR3 de SEC ID N°: 11 en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; en la que Y110 es Y, K, S, R o T; y (b) una región variable de la cadena ligera que comprende la región CDR1 de SEC ID N°: 12 en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q; la región CDR2 de SEC ID N°: 13 en la que I51 es I, T, V o A; y S56 es S o T; y la región CDR3 de SEC ID N°: 14 en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, la región variable de la cadena ligera comprende la región CDR3 de SEC ID N°: 14 en la que S91 es S o E; K92 es cualquier aminoácido; T93 es cualquier aminoácido; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, la región variable de la cadena pesada comprende la región CDR3 de SEC ID N°: 11 en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; en la que Y110 es cualquier aminoácido. En otras realizaciones, la región variable de la cadena pesada comprende la región CDR3 de SEC ID N°: 11 en la que G98 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que G99 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende además una cadena ligera del anticuerpo.
- 40
- 45
- 50
- 55
- En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo,(incluyendo un anticuerpo humanizado) que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 9 en la que I34 es S, L, V A o I; y N35 es N, T o S; una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 10 en la que M50 es M, I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L

o V; y una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 11 en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; en la que Y110 es Y, K, S, R o T. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 11 en la que Y100 es Y, L o R; y en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido. En otras realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 11 en la que G98 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que G99 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y 106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende además una región variable de la cadena ligera del anticuerpo.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 12 en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q; una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 13 en la que I51 es I, T, V o A; y S56 es S o T; y una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 14 en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 14 en la que S91 es S o E; K92 es cualquier aminoácido; T93 es cualquier aminoácido; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende además una región variable de la cadena pesada del anticuerpo.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende (a) una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 9 en la que I34 es S, L, V A o I; y N35 es N, T o S; una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 10 en la que M50 es M, I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V; y una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 11 en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; y en la que Y110 es Y, K, S, R o T; y (b) una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 12 en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q; una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 13 en la que I51 es I, T, V o A; y S56 es S o T; y una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 14 en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 14 en la que S91 es S o E; K92 es cualquier aminoácido; T93 es cualquier aminoácido; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 11 en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; en la que Y110 es cualquier aminoácido. En otras realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 11 en la que G98 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que G99 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende además una región variable de la cadena ligera del anticuerpo.

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende: (a) una región CDR1 de SEC ID N°: 9 en la que I34 es S, L, V A o I; y N35 está sustituido con N, T o S; (b) una región CDR2 de SEQ I17 NO:10 en la que M50 es I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V; y (c) una región CDR3 de SEC ID N°: 11 en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; y en la que Y110 es Y, K, S, R o T; en la que el anticuerpo se une a NGF.

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden una región variable de la cadena ligera que comprende: (a) una región CDR1 de SEC ID N°: 12 en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q; (b) una región CDR2 de SEC ID N°: 13 en la que I51 es I, T, V o A; y S56 es S o T; y (c) una región CDR3 de SEC ID N°: 14 en la que K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R; en la que el anticuerpo se une a NGF.

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden (a) una región variable de la cadena pesada que comprende: (i) una región CDR1 de SEC ID N°: 9 en la que I34 está sustituido con S, L, V A o I; y N35 está sustituido con N, T o S; (ii) una región CDR2 de SEC ID N°: 10 en la que M50 es I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V; y (iii) una región CDR3 de SEC ID N°: 11 en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; en la que Y110 es Y, K, S, R o T; y (b) una región variable de la cadena ligera que comprende:

(i) una región CDR1 de SEC ID N°: 12 en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q; (ii) una región CDR2 de SEC ID N°: 13 en la que I51 es I, T, V o A; y S56 es S o T; y (iii) una región CDR3 de SEC ID N°: 14 en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R; en la que el anticuerpo se une a NGF.

A menos que se indique lo contrario, la elección (por ejemplo, sustitución) de un aminoácido en una localización se selecciona independientemente de la selección de un aminoácido en cualquier otra localización.

En algunas realizaciones, los anticuerpos se unen a NGF (tal como NGF humano). En algunas realizaciones, los anticuerpos comprenden cualquiera de las configuraciones de CDR (incluyendo combinaciones, variaciones, etc.) descritas en este documento.

Como es evidente de la descripción en este documento, la numeración de la región variable usada en este documento es la numeración secuencial. Un experto en la materia entiende fácilmente que existen varios sistemas de numeración de anticuerpos (tales como la numeración de Kabat y de Chothia), y cómo convertir la numeración secuencial en otro sistema de numeración, tal como la numeración de Kabat o la numeración de Chothia.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una secuencia de CDR3) seleccionada de SEC ID N°: 46 ó 50. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende además una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID N°: 3, 4, 5, 6, 7 y 8. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende además una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID N°: 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDR, tal como una región CDRH1 y/o CDR H2) seleccionada de (a) SEC ID N°: 28 y/o 29; (b) SEC ID N°: 30 y/o 31; (c) SEC ID N°: 32 y/o 33; (d) SEC ID N°: 34 y/o 35; (e) SEC ID N°: 36 y/o 37; (f) SEC ID N°: 38 y/o 39; y (g) SEC ID N°: 40 y 41. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDR H1) seleccionada de SEC ID N°: 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDR H2) seleccionada de SEC ID N°: 29, 31, 33, 35, 37, 39 y 41. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende además una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID N°: 3, 4, 5, 6, 7 y 8. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende además una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID N°: 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDR, tal como una región CDR L1 y/o CDR L2) seleccionada de (a) SEC ID N°: 18 y/o 19; (b) SEC ID N°: 20 y/o 21; y (c) SEC ID N°: 22 y/o 23. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDR L1) seleccionada de SEC ID N°: 18, 20 y 22. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDR L2) seleccionada de SEC ID N°: 19, 21 y 23. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende además una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID N°: 3, 4, 5, 6, 7, 8. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende además una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID N°: 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDR, tal como una región CDRL3 y/o CDR H3) seleccionada de (a) SEC ID N°: 51 y/o 52; (b) SEC ID N°: 55 y/o 56; (c) SEC ID N°: 57 y/o 58; (c) SEC ID N°: 59 y/o 60; (d) SEC ID N°: 61 y/o 62; (e) SEC ID N°: 63 y/o 64. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDR L3) seleccionada de SEC ID N°: 51, 55, 57, 59, 61 y 63. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDR H3) seleccionada de SEC ID N°: 52, 56, 58, 60, 62 y 64. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende además una secuencia de aminoácidos mostrada en una o más de SEC ID N°: 18, 19, 30 y 31. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende además una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID N°: 3, 4, 5, 6, 7 y 8. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende además una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID N°: 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una o más de una secuencia de aminoácidos (tal como una región CDR) mostrada en SEC ID N°: 61, 63, 18, 19, 30 y 31.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo antagonista anti-NGF que se une a NGF (tal como NGF humano) con alta afinidad. En algunas realizaciones, alta afinidad es (a) unión a NGF con una  $K_D$  inferior a aproximadamente 2 nM (tal como cualquiera de aproximadamente 1 nM, 800 pM, 600 pM, 400 pM, 200 pM, 100 pM, 90 pM, 80 pM, 70 pM, 60 pM, 50 pM, o menos), y/o una  $K_{dis}$  más lenta de aproximadamente  $6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ; y/o (b) inhibición (reducción y/o bloqueo) de la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una  $CI_{50}$  (en presencia de aproximadamente 15 pM de NGF) de aproximadamente cualquiera de 200 pM, 150 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 20 pM, 10 pM, o menos; y/o (c) inhibición (reducción y/o bloqueo) de la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una  $CI_{50}$  (en presencia de aproximadamente 1,5 pM de NGF) de aproximadamente cualquiera de 50 pM, 40 pM, 30 pM, 10 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, 2 pM, 1 pM, o menos; y/o (d) inhibición (reducción y/o bloqueo) de la supervivencia dependiente de NGF de rata de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una  $CI_{50}$  (en presencia de aproximadamente 15 pM de NGF) de aproximadamente cualquiera de 150 pM, 125 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 30 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, o menos; y/o (e) inhibición (reducción y/o bloqueo) de la supervivencia dependiente de NGF de rata de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una  $CI_{50}$  (en presencia de aproximadamente 1,5 pM de NGF) de aproximadamente cualquiera de 30 pM, 25 pM, 20 pM, 15 pM, 10 pM, 5 pM, 4 pM, 3 pM, 2 pM, 1 pM, o menos; y/o (f) y/o unión a NGF

con mayor afinidad que el receptor trkA.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo en el que los anticuerpos (a) se unen a NGF (tal como NGF humano) con una  $K_D$  inferior a aproximadamente 2 nM (tal como cualquiera de aproximadamente 1 nM, 800 pM, 600 pM, 400 pM, 200 pM, 100 pM, 90 pM, 80 pM, 70 pM, 60 pM, 50 pM, o menos) y/o una  $K_{dis}$  más lenta de aproximadamente  $6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ; y/o (b) inhiben la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una  $CI_{50}$  (en presencia de aproximadamente 15 pM de NGF) de aproximadamente cualquiera de 200 pM, 150 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 20 pM, 10 pM, o menos; y/o (c) inhiben la supervivencia dependiente de NGF humana de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una  $CI_{50}$  (en presencia de aproximadamente 1,5 pM de NGF) de aproximadamente cualquiera de 50 pM, 40 pM, 30 pM, 10 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, 2 pM, 1 pM, o menos; y/o se unen a NGF con mayor afinidad que el receptor trkA. En algunas realizaciones, los polipéptidos (a) se unen a NGF con una  $K_D$  inferior a aproximadamente 2 nM; y/o (b) inhiben la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una  $CI_{50}$  de aproximadamente 100 pM o menos en la que la  $CI_{50}$  se mide en presencia de aproximadamente 15 pM NGF; y/o (c) inhiben la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una  $CI_{50}$  de aproximadamente 10 pM o menos en la que la  $CI_{50}$  se mide en presencia de aproximadamente 1,5 pM de NGF en la que la  $CI_{50}$  se mide en presencia de aproximadamente NGF 15 pM. En algunas realizaciones, los anticuerpos (a) se unen a NGF con una  $K_D$  inferior a aproximadamente 100 pM; y/o (b) inhiben la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una  $CI_{50}$  de aproximadamente 20 pM o menos en la que la  $CI_{50}$  se mide en presencia de aproximadamente 15 pM NGF; y/o (c) inhiben la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una  $CI_{50}$  de aproximadamente 2 pM o menos en la que la  $CI_{50}$  se mide en presencia de aproximadamente 1,5 pM de NGF.

Como es evidente de la descripción en este documento, de la invención se excluyen específicamente realizaciones de polipéptidos que consisten en las secuencia de aminoácidos idénticas a una secuencia de aminoácidos de anticuerpo monoclonal de ratón, 911. Las secuencias de CDR extendidas de Mab 911 se muestran en las Figuras 1A y 1B, y en SEC ID N°: 9-14.

En algunas realizaciones, la invención proporciona cualquiera de los anticuerpos anteriores, adicionalmente en la que el anticuerpo se aísla. En algunas realizaciones, el anticuerpo está sustancialmente purificado. En otras realizaciones más, el anticuerpo es madurado por afinidad. En otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo antagonista. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende secuencias de la región estructural humana. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende uno o más residuos de la región estructural no humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a NGF (tal como NGF humano) con una  $K_D$  de 2 nM o menos. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una o más (tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) sustituciones de aminoácidos humanos con respecto a una secuencia de aminoácidos no humana (tal como una secuencia de la región variable, tal como una secuencia de CDR, tal como una secuencia de la región estructural). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende al menos 1, al menos 2, o más de tales como al menos 3, 4, 5, 6 o más sustituciones de aminoácidos con respecto a una secuencia de aminoácidos del polipéptido parental (tal como una secuencia de aminoácidos del anticuerpo 911, tal como una cualquiera o más de SEC ID N° 9-14). En algunas realizaciones, la afinidad de unión del anticuerpo ha sido alterada (en algunas realizaciones, elevada) con respecto a una afinidad del anticuerpo parental (tal como Mab 911). En otras realizaciones más, la afinidad de unión del anticuerpo es inferior a la afinidad de unión del receptor trkA por NGF (tal como NGF humano). En algunas realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos humanos. En otras realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos humanizados. En otras realizaciones más, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo madurado por afinidad.

La invención proporciona polinucleótidos (incluyendo polinucleótido aislado) que comprenden polinucleótidos que codifican cualquiera de las realizaciones anteriores.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende un polinucleótido que codifica un fragmento o una región del anticuerpo E3 (llamado indistintamente "E3" en este documento). En una realización, el fragmento es una cadena ligera del anticuerpo E3 como se muestra en la Figura 1B. En otra realización, el fragmento es una cadena pesada del anticuerpo E3 como se muestra en la Figura 1A. En otra realización más, el fragmento contiene una o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo E3. En otra realización más, el fragmento contiene una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo E3 como se muestra en las Figuras 1A y 1B.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo E3. En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende cualquiera o ambos de los polinucleótidos mostrados en las Figuras 2 y 3.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un polinucleótido aislado que codifica una cadena ligera de E3 con un número de depósito de ATCC n° PTA-4893 o ATCC n° PTA-4894. En otro aspecto, la invención es un polinucleótido aislado que codifica una cadena pesada de E3 con un número de depósito de ATCC n° PTA-4895. En otro aspecto más, la divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende (a) una región variable codificada en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC n° PTA-4893 o PTA-4894 y (b) una región variable codificada en

el polinucleótido con un número de depósito de ATCC n° PTA-4895. En otro aspecto, la divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende (a) una o más CDR codificadas en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC n° PTA-4893 o PTA-4894; y/o (b) una o más CDR codificadas en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC n° PTA-4895.

- 5 En otro aspecto, la divulgación proporciona polinucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpos) o polipéptidos descritos en este documento.

En otro aspecto, la divulgación proporciona vectores (incluyendo vectores de expresión y de clonación) y células huésped que comprenden cualquiera de los polinucleótidos desvelados en este documento.

- 10 Como es evidente de la descripción en este documento, la invención incluye específicamente realizaciones de polinucleótidos que consisten en las secuencia de polinucleótidos idénticas a una secuencia de polinucleótidos de anticuerpo monoclonal de ratón, 911. Las secuencias de CDR extendidas de Mab 911 se muestran en las Figuras 1A y 1B, y en SEC ID N°: 9-14.

- 15 En otro aspecto, la divulgación proporciona una célula huésped que comprende un polinucleótido que codifica la cadena ligera de E3 y un polinucleótido que codifica la cadena pesada de E3 en la que el (los) polinucleótido(s) que codifica(n) la cadena ligera de E3 tiene(n) un número de depósito de ATCC n° PTA-4893 y/o ATCC n° PTA-4894, y el polinucleótido que codifica la cadena pesada de E3 tiene un número de depósito de ATCC n° PTA-4895. En algunas realizaciones, la célula huésped comprende un polinucleótido que comprende (a) una región variable codificada en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC n° PTA-4893 o PTA-4894 y/o (b) una región variable codificada en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC n° PTA-4895. En algunas realizaciones, la célula huésped comprende un polinucleótido que codifica (a) una o más CDR codificadas en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC n° PTA-4893 o PTA-4894; y/o (b) una o más CDR codificadas en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC n° PTA-4895. En algunas realizaciones, la célula huésped es una célula de mamífero.

- 25 En otro aspecto, la divulgación proporciona un complejo de NGF unido por el anticuerpo E3. En otro aspecto, el complejo está aislado. En otro aspecto, el complejo está sustancialmente purificado.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un complejo de NGF unido por cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos descritos en este documento. En otro aspecto, el complejo está aislado. En otro aspecto, el complejo está sustancialmente purificado.

- 30 En otro aspecto, la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista anti-NGF, tal como composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo E3 o un anticuerpo que comprende un fragmento del anticuerpo E3, y un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en mejorar la rigidez en un individuo que tiene osteoartritis.

- 35 En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de generación del anticuerpo E3 que comprende preparar una célula huésped que comprende un vector de expresión que codifica el anticuerpo E3; cultivar la célula huésped o progenie de la misma en condiciones que permitan la producción del anticuerpo E3; y purificar el anticuerpo E3. En algunas realizaciones, el vector de expresión comprende una o ambas de las secuencias de polinucleótidos mostradas en las Figuras 2 y 3.

- 40 En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de generación del anticuerpo E3 que comprende expresar un polinucleótido que codifica la cadena ligera de E3 y un polinucleótido que codifica la cadena pesada de E3 en una célula adecuada en la que el polinucleótido que codifica la cadena ligera de E3 tiene un número de depósito de ATCC n° PTA-4893 y/o ATCC n° PTA-4894, y el polinucleótido que codifica la cadena pesada de E3 tiene un número de depósito de ATCC n° PTA-4895; generalmente seguido de recuperar y/o aislar el anticuerpo.

- 45 En otro aspecto, la divulgación proporciona procedimientos de generación de cualquiera de los polipéptidos (tal como anticuerpos) descritos en este documento expresando uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo (que puede expresarse por separado como una única cadena ligera o pesada, o tanto una cadena ligera como una pesada pueden expresarse a partir de un vector) en una célula adecuada, generalmente seguido de recuperar y/o aislar el anticuerpo o polipéptidos de interés.

- 50 En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de antagonización de la actividad biológica de NGF (tal como NGF humano) usando cualquiera de los polipéptidos (incluyendo anticuerpos tales como el anticuerpo E3) desvelados en este documento. En una realización, el procedimiento comprende poner en contacto el factor de crecimiento nervioso humano con cualquiera de los polipéptidos (incluyendo el anticuerpo E3) descritos en este documento, por lo que la actividad de NGF (tal como la actividad de factor de crecimiento nervioso humano) se antagoniza, reduce, bloquea o suprime.

- 55 En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de detección de NGF usando cualquiera de los polipéptidos (incluyendo anticuerpos, tales como el anticuerpo E3) descritos en este documento. La presencia de NGF se detecta detectando un complejo entre NGF y cualquiera de los polipéptidos descritos en este documento (tal

como el anticuerpo E3). El término “detección” como se usa en este documento incluye detección cualitativa y/o cuantitativa (niveles de medición) con o sin referencia a un control.

5 En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar dolor administrando una cantidad eficaz de una composición que comprende el anticuerpo E3 o cualquiera de las realizaciones de anticuerpos o polinucleótidos descritas en este documento.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para prevenir o tratar dolor por osteoartritis en un individuo administrando una cantidad eficaz de un antagonista de factor de crecimiento nervioso (tal como un anticuerpo antagonista anti-NGF) al individuo.

10 En otro aspecto, la divulgación proporciona procedimientos para reducir la incidencia de dolor por osteoartritis, mejorar el dolor por osteoartritis, suprimir el dolor por osteoartritis, paliar el dolor por osteoartritis y/o retrasar la aparición, desarrollo o progresión de dolor por osteoartritis en un individuo, comprendiendo dicho procedimiento administrar una cantidad eficaz de un antagonista de NGF (tal como el anticuerpo antagonista anti-NGF) al individuo.

15 En otro aspecto, la divulgación proporciona procedimientos para mejorar la función física en un individuo que tiene osteoartritis, comprendiendo dicho procedimiento administrar una cantidad eficaz de un antagonista de NGF (tal como el anticuerpo antagonista anti-NGF) al individuo.

La invención proporciona el uso de un anticuerpo antagonista anti-NGF en la preparación de un medicamento para mejorar la rigidez en un individuo que tiene osteoartritis.

20 En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano. En algunas realizaciones, para tratar dolor por osteoartritis, la frecuencia de dosificación del anticuerpo antagonista anti-NGF es entre una vez cada semana y una vez cada doce semanas.

25 En otro aspecto, la divulgación proporciona kits que comprenden una cualquiera o más de las composiciones descritas en este documento. Estos kits, generalmente en envases adecuados y provistos de instrucciones apropiadas, son útiles para cualquiera de los procedimientos descritos en este documento. La invención también proporciona composiciones farmacéuticas para su uso en cualquiera de los usos médicos descritos en este documento, composiciones que comprenden una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-NGF y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona cualquiera de las composiciones descritas para cualquier uso descrito en este documento tanto si es en el contexto de uso como medicamento como de uso para la preparación de un medicamento.

### 30 **Breve descripción de las figuras**

35 FIGURA 1A: muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo E3 (marcada “6” y “5 + H3 de maduración por afinidad). Las CDR de Chothia y las CDR de Kabat se representan por texto subrayado y texto en negrita y en cursiva, respectivamente. La Figura 1A también muestra el alineamiento de las siguientes secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada; (2) secuencia aceptora de la línea germinal humana VH4-59 (marcada “VH4-59” o “2”) (SEC ID N°: 69); (3) las secuenciasceptoras injertadas con las CDR extendidas del anticuerpo 911 de ratón (marcada “injertada con CDR” o “3”) (SEC ID N°: 70); (4) las secuenciasceptoras injertadas con CDR que incluyen la sustitución V71K (marcada “3 + una mutación de la región estructural” o “4”) (SEC ID N°: 71); (5) el clon que contiene CDR H1 y H2 maduras por afinidad (marcadas “5” o “4 + H1, H2 de maduración por afinidad”) (SEC ID N°: 72); y el anticuerpo E3 (como se ha descrito anteriormente).

40 FIGURA 1B: muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo E3 (marcada “5” o “4 + L3 de maduración por afinidad). Las CDR de Chothia y las CDR de Kabat se representan por texto subrayado y texto en negrita y en cursiva, respectivamente. La Figura 1B también muestra el alineamiento de las siguientes secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera: (2) secuencia del aceptor de la línea germinal humana 08 (marcada “08” o “2”) (SEC ID N°: 73); (3) las secuencias del aceptor injertadas con las CDR extendidas del anticuerpo 911 de ratón (marcada “CDR injertada” o “3”) (SEC ID N°: 74); (4) secuencias del aceptor injertado de CDR (marcada “3 + L1, L2 de maduración por afinidad” o “4”) (SEC ID N°: 75); (5) el clon que contiene CDR L1 y L2 maduras por afinidad (marcada “5” o “4 + L3 de maduración por afinidad”); y el anticuerpo E3 (como se ha descrito anteriormente).

50 FIGURA 2: muestra un polinucleótido que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo E3 (SEC ID N°: 76).

FIGURA 3: muestra un polinucleótido que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo E3 (SEC ID N°: 77).

FIGURA 4: es una gráfica que representa la supervivencia dependiente de NGF de neuronas E13.5 en presencia de concentración variable de NGF humano y de rata. El eje X se corresponde con la concentración de NGF (ng/ml) y el

eje Y se corresponde con las neuronas contadas.

FIGURA 5: es una gráfica que compara el efecto de bloqueo de NGF de diversos Fab en presencia de tanto 0,04 ng/ml de NGF humano (aproximadamente 1,5 pM; mostrado en el panel inferior) como 0,4 ng/ml de NGF humano (aproximadamente 15 pM; mostrado en el panel superior). Se evaluó la supervivencia de neuronas trigeminales de ratón E13.5 en diversas concentraciones de Fab E3; Fab 911 murino; y Fab H19-L129 y Fab 8L2-6D5. La  $CI_{50}$  (en pM) se calculó para cada Fab a cada concentración de NGF, y se muestra en la Tabla 9. Fab E3 bloqueó fuertemente la supervivencia de neuronas trigeminales dependiente de NGF humano, con una  $CI_{50}$  de aproximadamente 21 pM en presencia de NGF humano 15 pM, y una  $CI_{50}$  de aproximadamente 1,2 pM en presencia de NGF humano 1,5 pM. Fab 3C y H19-L129 también bloquearon fuertemente la supervivencia de neuronas trigeminales dependiente de NGF humano. En ambos paneles, el eje X se corresponde con la concentración de anticuerpo (nM) y el eje Y se corresponde con las neuronas contadas. 1,5 pM de NGF fue aproximadamente la  $CI_{50}$ , mientras que 15 pM representó una concentración saturante de NGF.

FIGURA 6: es una gráfica que compara el efecto de bloqueo de NGF de diversos Fab en presencia de tanto 0,04 ng/ml de NGF de rata (aproximadamente 1,5 pM; mostrado en el panel inferior) como 0,4 ng/ml de NGF de rata (aproximadamente 15 pM; mostrado en el panel superior). La supervivencia de neuronas trigeminales de ratón E13.5 en diversas concentraciones de Fab E3; Fab 911 murino; y Fab H19-L129 y 8L2-6D5 se evaluó como se ha descrito anteriormente. La  $CI_{50}$  (en pM) se calculó para cada Fab a cada concentración de NGF, y se muestra en la Tabla 9. Fab E3 bloqueó fuertemente la supervivencia de neuronas trigeminales dependiente de NGF humano, con una  $CI_{50}$  de aproximadamente 31,6 pM en presencia de NGF de rata 15 pM, y una  $CI_{50}$  de aproximadamente 1,3 pM en presencia de NGF de rata 1,5 pM. Fab 3C y H19-L129 también bloquearon fuertemente la supervivencia de neuronas trigeminales dependiente de NGF de rata. 1,5 pM de NGF fue aproximadamente la  $CI_{50}$ , mientras que 15 pM representó una concentración saturante de NGF. En ambos paneles, el eje X se corresponde con la concentración de anticuerpo (nM) y el eje Y se corresponde con las neuronas contadas.

FIGURA 7: es una gráfica que representa el dolor en reposo evaluado 24 horas después de la cirugía y que muestra que el tratamiento con 0,02 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,6 mg/kg o 1 mg/kg de anticuerpo anti-NGF E3 redujo el dolor. “\*\*” indica una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) del control negativo.

FIGURA 8: es una gráfica que representa el dolor en reposo evaluado 24 horas después de la cirugía y que muestra que el tratamiento con 0,5 mg/kg de anticuerpo anti-NGF E3 redujo significativamente ( $p < 0,005$ ) el dolor en reposo cuando se inyecta dos horas después de la cirugía.

FIGURA 9: es una gráfica que muestra los resultados del análisis BIAcore de la afinidad de unión por NGF humano del anticuerpo 911 de ratón (Fab). El anticuerpo 911 de ratón se unió a NGF con una  $K_D$  de 3,7 nM,  $k_{dis}$  de  $8,4 \times 10^{-5} s^{-1}$  y  $k_{as}$  de  $2,2 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ .

FIGURA 10: es una gráfica que muestra los resultados del análisis BIAcore de la afinidad de unión por NGF humano del anticuerpo E3 (Fab) (denominado en lo sucesivo “Fab 3E”). E3 se unió a NGF humano con una  $K_D$  de aproximadamente 0,07 nM (y con una  $K_{as}$  de aproximadamente  $6,0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$  y una  $K_{dis}$  de aproximadamente  $4,2 \times 10^{-5} s^{-1}$ ).

FIGURA 11: es una gráfica que representa que el anticuerpo E3 bloquea la interacción de NGF con sus receptores, trkA y p75, como se evalúa por el porcentaje de unión detectado entre NGF y trkA (mostrado en círculos negros) y NGF y p75 (mostrado como cuadrados huecos). El eje X se corresponde con la concentración de anticuerpo 3E (Fab) y el eje Y se corresponde con la unión de NGF (porcentaje máximo de UR). El aumento de las concentraciones de Fab E3 bloqueó la interacción de NGF con tanto p75 como trkA, como se muestra por la disminución de la señal (medida en UR). Cuando la concentración de anticuerpo E3 (Fab) igualó a la concentración de NGF, no se observó unión de NGF (como se muestra por una señal de cero).

FIGURA 12: es una gráfica que representa la capacidad de bloqueo de NGF humano del anticuerpo E3 completo y Fab E3. Se evaluó la supervivencia de neuronas trigeminales de ratón E13.5 en presencia de NGF humano y diversas concentraciones de Fab E3 y anticuerpo E3. El eje X se corresponde con sitios de unión a NGF (nM) y el eje Y se corresponde con el recuento normalizado de neuronas trigeminales (TG). El anticuerpo E3 completo y Fab 3E mostraron niveles similares de inhibición de la supervivencia dependiente de NGF de neuronas trigeminales cuando la concentración de anticuerpo completo y Fab se normalizaron al número de sitios de unión a NGF (Fab tiene un sitio de unión y el anticuerpo completo tiene dos sitios de unión).

FIGURA 13: es una gráfica que representa la capacidad de diversas concentraciones (20, 4, 0,8, 0,16, 0,032, 0,0064, 0,00128 y 0,0 nm) del anticuerpo E3 (triángulos sólidos; denominados en lo sucesivo “3E”), anticuerpo 911 (círculos sólidos) y una inmunoadhesina del receptor trkA (cuadrados sombreados; denominada “trkA-Fc) para inhibir la supervivencia dependiente de NGF de neuronas trigeminales E13.5 en presencia de 0,4 ng/ml de NGF humano (condiciones saturantes). El eje X se corresponde con la concentración de anticuerpo (nM) y la concentración de Y se corresponde con las neuronas contadas. Estos resultados demostraron que el anticuerpo E3 bloqueó NGF significativamente mejor que tanto el anticuerpo anti-NGF monoclonal de ratón 911 como la inmunoadhesina de trkA.

- FIGURA 14: es una gráfica que representa que el anticuerpo antagonista anti-NGF E3 (llamado "3E" en la figura) o Fab 911 no inhiben la supervivencia neuronal promovida por NT3, NT4/5 y MSP, incluso a concentraciones de anticuerpo de hasta 200 nM. Los datos representaron la supervivencia en porcentaje media después de 48 horas en cultivo ( $\pm$  error estándar de la media,  $n=3$  para cada punto de datos) con respecto a la supervivencia observada en el control positivo para cada experimento (100% de supervivencia de neuronas trigeminales cultivadas en presencia de concentración de NGF saturante). Se usaron diversas concentraciones (20 nM, 2 nM o 0,2 nM) de Fab E3 (llamado "3E" en la figura) y el anticuerpo de ratón Fab 911 en presencia de neurotrofina no añadida (llamado "control"), NGF 400 pM (llamado "NGF-400pM), NT3 10 nM (llamado "NT3-10nM) o MSP 600 pM (llamado "MSP-600pM).
- FIGURA 15: es una gráfica que representa que el anticuerpo antagonista anti-NGF E3 (Fab o anticuerpo completo) (llamado "3E" en la figura) o anticuerpo 911 de ratón (Fab o anticuerpo completo) no inhibió la supervivencia neuronal promovida por NT3, NT4/5 y MSP, incluso a concentraciones de anticuerpo de hasta 200 nM. Diversas concentraciones (200 nM y 80 nM) de Fab E3 y anticuerpo completo y el anticuerpo de ratón anticuerpo completo 911 y Fab se usaron en presencia de neurotrofinas no añadidas (llamado "sin factor"), NGF 400 pM (llamado "NGF-400pM), NT3 10 nM (llamado "NT3-10nM) o MSP 600 pM (llamado "MSP-600pM).
- FIGURA 16: es una gráfica que representa que el anticuerpo antagonista anti-NGF E3 o Fab E3 no inhibió la supervivencia de neuronas nodosas E17 promovida por BDNF, NT4/5 o LIF. También se probó el anticuerpo antagonista anti-NGF de ratón 911, y se observaron resultados similares. Diversas concentraciones (200 nM o 80 nM) de anticuerpo completo E3 (llamado "3E" en la figura), Fab E3, anticuerpo completo 911 o Fab 911 se probaron en presencia de neurotrofinas no añadidas (llamado "sin factores"), BDNF 400 pM (llamado "BDNF-400pM), NT4/5 400 pM (llamado "NT4/5-400pM) o LIF 2,5 nM (llamado "LIF-2,5nM).
- FIGURA 17: es una gráfica que representa que el anticuerpo antagonista anti-NGF E3 o Fab E3 no inhibió la supervivencia de neuronas nodosas E17 promovida por BDNF, NT4/5 o LIF. Se probaron diversas concentraciones (200 nM, 20 nM, 2 nM) de Fab E3 (llamado "3E" en la figura), o Fab 911 en presencia de neurotrofinas no añadidas (llamado "control"), BDNF 400 pM (llamado "BDNF-400pM), NT4/5 400 pM (llamado "NT4/5-400pM) o LIF 2,5 nM (llamado "LIF-2,5nM).
- FIGURA 18: es una gráfica que demuestra la respuesta nociceptiva en ratas artríticas (modelo de artritis reumatoide) después de la administración de anticuerpos anti-NGF (E3 y 911) en D 14 y D 19. E3 (1 mg/kg, i.v. en el día 14 y día 19), 911 (10 mg/kg, i.v. en el día 14 y día 19) o indo (indometacina 3 mg/kg, p.o. diariamente durante 10 días) se administraron a ratones artríticos. Los valores de intensidad de la vocalización se expresan en mV como medias  $\pm$  e.e.m.
- FIGURA 19: es una gráfica que demuestra los efectos de anticuerpos anti-NGF sobre el peso corporal en artritis en ratas (modelo de artritis reumatoide) después de la administración de anticuerpos anti-NGF en D 14 y D 19. E3 (1 mg/kg, i.v. en el día 14 y día 19), 911 (10 mg/kg, i.v. en el día 14 y día 19) o indo (indometacina 3 mg/kg, p.o. diariamente durante 10 días) se administraron a ratones artríticos. Los valores del peso corporal se expresan en gramos como media  $\pm$  e.e.m.
- FIGURA 20: es una gráfica que demuestra la respuesta nociceptiva en ratas artríticas (modelo de artritis reumatoide) después de la administración de diferentes dosis de anticuerpo anti-NGF E3 (0,003 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,3 mg/kg y 5 mg/kg) en D 14 y D 18. Los valores de intensidad de la vocalización se expresan en mV como medias  $\pm$  e.e.m.
- FIGURA 21: es una gráfica que demuestra los efectos del anticuerpo anti-NGF E3 sobre el porcentaje de peso en el día 14 (normalizados al día 14) en ratas artríticas (modelo de artritis reumatoide) después de la administración de diferentes dosis de anticuerpo anti-NGF E3 (0,03 mg/kg, 0,3 mg/kg y 5 mg/kg) en D 14 y D 18.
- FIGURA 22: es una gráfica que demuestra los efectos del anticuerpo anti-NGF E3 sobre la pérdida de peso en ratas artríticas (modelo de artritis reumatoide) después de la administración de diferentes dosis del anticuerpo anti-NGF E3 (0,03 mg/kg, 0,3 mg/kg y 5 mg/kg) en D 14 y D 18. Los valores del peso corporal se normalizaron al día 0.
- FIGURA 23: representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada E3 (Fig. 23A) y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (Fig. 23B), como se numera usando la numeración secuencial, numeración de Kabat y numeración de Chothia.
- FIGURA 24: representa los cambios en la intensidad de dolor diaria media después de la administración del anticuerpo anti-NGF E3 con respecto al nivel inicial en el día 0. El eje Y se corresponde con la reducción en la intensidad de dolor diaria media (puntuación VAS) con respecto a la intensidad de dolor diaria media en el día 0. El eje X se corresponde con los días después de la administración del anticuerpo anti-NGF E3.
- FIGURA 25: representa la puntuación VAS media después de la administración del anticuerpo anti-NGF E3. "EE" se refiere al error estándar.
- FIGURA 26: representa porcentaje de reducción máxima en la suma de la diferencia en intensidad de dolor (SPID) del día 2 al día 14 y del día 2 al día 28 después de la administración del anticuerpo anti-NGF E3.

FIGURA 27: representa la respuesta media de los mínimos cuadrados (MMC) para WOMAC, subescala de dolor, subescala de función física y subescala de rigidez del día 1 al día 28 después de la administración de diferentes dosis (3 µg/kg, 10 µg/kg, 30 µg/kg, 100 µg/kg y 300 µg/kg) del anticuerpo anti-NGF E3. "EE" se refiere al error estándar. Los ejes X se corresponden con la dosis de anticuerpo anti-NGF E3 administrado. "\*" indica P < 0,05 con respecto al nivel inicial bajo la prueba de Dunnett.

### **Descripción detallada de la invención**

La invención desvelada en este documento proporciona el uso de un anticuerpo antagonista anti-NGF en la preparación de un medicamento para mejorar la rigidez en un individuo que tiene osteoartritis. La invención proporciona además un anticuerpo antagonista anti-NGF para su uso en mejorar la rigidez en un individuo que tiene osteoartritis.

La invención desvelada en este documento proporciona el uso de anticuerpos antagonista anti-NGF que se unen a NGF (tal como NGF humano) con alta afinidad. La invención proporciona además anticuerpos derivados de E3 que se unen a NGF, y procedimientos de preparación y uso de estos anticuerpos. En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo humanizado, E3, que se une al factor de crecimiento nervioso ("NGF"), y procedimientos de preparación y uso de este anticuerpo. La invención también proporciona anticuerpos E3 que se unen a NGF, y polinucleótidos que codifican el anticuerpo y/o polipéptido E3.

#### *Técnicas generales*

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la habilidad de la materia. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook y col., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather y P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths y D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel y col., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis y col., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan y col., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway y P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita y col., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

#### *Definiciones*

Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina que puede unirse específicamente a una diana, tal como un hidrato de carbono, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., mediante al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en este documento, el término engloba no sólo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), monocatenarios (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM (o subclase de los mismos), y el anticuerpo no necesita ser de cualquier clase particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM, y varias de éstas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2. Los dominios constantes de las cadenas pesadas que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman alfa, delta, epsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas

"Fv" es un fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y unión a antígeno completo. En una especie de Fv bicatenaria, esta región consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y uno de la ligera en estrecha asociación no covalente. En una especie de Fv monocaténaria, un dominio variable de la cadena pesada y uno de la ligera pueden unirse covalentemente por un ligador de péptidos flexible de forma que las cadenas ligeras y pesadas puedan asociarse en una estructura dimérica análoga la de en una especie Fv bicatenaria. En esta configuración, las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir una especificidad de unión a antígeno sobre la superficie del dímero VH-VL. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo 3 CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad para reconocer y unirse a antígeno, aunque generalmente a una menor afinidad que el sitio de unión entero.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de algunos residuos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de las regiones bisagra del anticuerpo.

5 Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de anticuerpos homogénea en la que el anticuerpo monoclonal comprende aminoácidos (que se producen naturalmente y que no se producen naturalmente) que participan en la unión selectiva de un antígeno. Una población de anticuerpos monoclonales es altamente específica, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. El término "anticuerpo monoclonal" engloba no sólo anticuerpos monoclonales intactos y anticuerpos monoclonales de longitud completa, sino también fragmentos de los mismos (tal como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), monocatenarios (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden 10 una porción de anticuerpo, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad y la capacidad requerida para unirse a un antígeno. No pretende limitarse en cuanto a la fuente del anticuerpo o al modo en el que se produce (por ejemplo, por hibridoma, selección en fago, expresión recombinante, animales transgénicos, etc.).

15 Como se usa en este documento, "anticuerpo humano" significa un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que ha sido producido usando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos conocidas en la técnica o desveladas en este documento. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de la cadena pesada humana o al menos un polipéptido de la cadena ligera humana. Un ejemplo tal es un 20 anticuerpo que comprende polipéptidos de la cadena ligera murina y de la cadena pesada humana. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona de una biblioteca de fagos, en la que esa biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan y col., 1996, Nature Biotechnology, 14:309-314; Sheets y col., 1998, PNAS, (USA) 95:6157-6162; Hoogenboom y Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381; Marks y col., 1991, J. Mol. Biol., 222:581). Los anticuerpos humanos también pueden prepararse introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido inactivados parcialmente o completamente. Este enfoque se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016. Alternativamente, el anticuerpo humano puede prepararse inmortalizando linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (tales linfocitos B pueden recuperarse de un individuo o pueden haberse inmunizado *in vitro*). Véase, por ejemplo, Cole y col., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner y col., 1991, J. Immunol., 147 (1):86-95; y la patente de EE.UU. nº 5.750.373.

"Anticuerpos quiméricos" se refiere a aquellos anticuerpos en los que una porción de cada una de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras es homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos 35 derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase particular, mientras que el segmento restante de las cadenas es homólogo a secuencias correspondientes en otra. Normalmente, en estos anticuerpos quiméricos, la región variable de tanto las cadenas ligeras como pesadas imita las regiones variables de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos, mientras que las porciones constantes son homólogas a las secuencias en anticuerpos derivados de la otra. Una ventaja clara para tales formas quiméricas es que, por ejemplo, las regiones variables pueden derivarse convenientemente de fuentes presentemente conocidas usando hibridomas o linfocitos B fácilmente disponibles de organismos huésped no humanos en combinación con regiones constantes derivadas de, por ejemplo, preparaciones de células humanas. Aunque la región variable tiene la ventaja de facilitar la preparación, y la especificidad no es afectada por su fuente, la región constante que es humana, es menos probable que provoque una respuesta inmunitaria de un sujeto humano cuando los anticuerpos se inyectan que la que provocaría 45 la región constante de una fuente no humana. Sin embargo, la definición no se limita a este ejemplo particular.

Una "región Fc funcional" posee al menos una función efectora de una región Fc de la secuencia nativa. "Funciones efectoras" a modo de ejemplo incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación por 50 disminución de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B; BCR), etc. Tales funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y pueda evaluarse usando diversos ensayos conocidos en la técnica para evaluar tales funciones efectoras de anticuerpos.

Una "región Fc de la secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Una "variante de la región Fc" comprende una secuencia de aminoácidos que se diferencia de la de una región Fc de la secuencia nativa en virtud de al menos una 55 modificación de aminoácidos, aunque retiene al menos una función efectora de la región Fc de la secuencia nativa. Preferentemente, la variante de la región Fc tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de la secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de la secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La variante de la región Fc en este documento poseerá preferentemente al menos 60 aproximadamente el 80% de identidad de secuencias con una Fc de la secuencia nativa, el 90% de secuencia con

una región Fc de un polipéptido parental y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencias con la misma, más preferentemente al menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencias con la misma.

5 Como se usa en este documento, "citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por célula en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (FcR) (por ejemplo, linfocitos citolíticos espontáneos (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen anticuerpo unido sobre una célula diana y posteriormente producen la lisis de la célula diana. La actividad de ADCC de una molécula de interés puede evaluarse usando un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en las patentes de EE.UU. n° 5.500.362 o 5.821.337. Células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos NK. Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes y col., 1998, PNAS (USA), 95:652-656.

10 Como se usa en este documento, "receptor de Fc" y "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. La FcR preferida es una FcR de la secuencia humana nativa. Además, una FcR preferida es una que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, que incluyen variantes alélicas y alternativamente formas cortadas y empalmadas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activante") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que se diferencian principalmente en los dominios citoplásmicos de las mismas. Las FcR se revisan en Ravetch y Kinet, 1991, Ann. Rev. Immunol., 9:457-92; Capel y col., 1994, Immunomethods, 4:25-34; y de Haas y col., 1995, J. Lab. Clin. Med., 126:330-41. "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternal al feto (Guyer y col., 1976, J. Immunol., 117:587; y Kim y col., 1994, J. Immunol., 24:249).

15 "Citotoxicidad dependiente del complemento" y "CDC" se refieren a la lisis de una diana en presencia de complemento. La ruta de activación del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) complejada con un antígeno relacionado. Para evaluar la activación del complemento puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro y col., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996).

20 Como se usa en este documento, los términos "E3", "3E" y "anticuerpo E3" se usan indistintamente para referirse a un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera mostradas en las Figuras 1A (SEC ID N°: 1) y 1B (SEC ID N°: 2), respectivamente. Las porciones de CDR del anticuerpo E3 (incluyendo CDR de Chothia y Kabat) se representan en diagramas en las Figuras 1A y 1B. Las Figuras 2 y 3 muestran polinucleótidos que codifican cadenas pesadas y ligeras, respectivamente, que comprende las regiones variables de la cadena pesada y ligera mostradas en las Figuras 1A y 1B, respectivamente. La generación y caracterización de E3 se describe en los ejemplos. Diferentes funciones biológicas están asociadas a E3, que incluyen, pero no se limitan a, capacidad para unirse a NGF e inhibir la actividad biológica de NGF y/o ruta(s) en la dirección 3' mediada(s) por la señalización de NGF; y capacidad para inhibir la supervivencia dependiente de NGF de neuronas trigeminales E13.5 de ratón. Como se trata en este documento, los anticuerpos de la invención pueden tener una cualquiera o más de estas características. En algunas realizaciones, el término "E3" se refiere a inmunoglobulina codificada por (a) un polinucleótido que codifica la cadena ligera de E3 que tiene un número de depósito de ATCC n° PTA-4893 o ATCC n° PTA-4894, y (b) un polinucleótido que codifica la cadena pesada de E3 que tiene un número de depósito de ATCC n° PTA-4895.

25 Como se usa en este documento, unión "inmunespecífica" de anticuerpos se refiere a la interacción de unión específica para antígeno que se produce entre el sitio de combinación del antígeno de un anticuerpo y el antígeno específico reconocido por ese anticuerpo (es decir, el anticuerpo reacciona con la proteína en un ELISA u otro inmunoensayo, y no reacciona detectablemente con proteínas sin relacionar).

30 Un epítipo que "se une específicamente" o "se une preferencialmente" (usado indistintamente en este documento) a un anticuerpo o un polipéptido es un término bien entendido en la materia, y procedimientos para determinar tal unión específica o preferencial también son muy conocidos en la técnica. Una molécula se dice que presenta "unión específica" o "unión preferencial" si reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una célula o sustancia particular que con células o sustancias alternativas. Un anticuerpo "se une específicamente" o "se une preferencialmente" a una diana si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que se une a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente o preferencialmente a un epítipo de NGF es un anticuerpo que se une a este epítipo con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que se une a otros epítopos de NGF o epítopos de no NGF. También se entiende leyendo esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o resto o epítipo) que se une específicamente o preferencialmente a una primera diana puede o puede no unirse específicamente o preferencialmente a una segunda diana. Como tal, la "unión específica" o "unión preferencial" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) unión exclusiva. Generalmente, pero no necesariamente, referencia a unión significa unión preferencial.

35 Los términos "polipéptido", "oligopéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en este documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede

comprender aminoácidos modificados, y pueden estar interrumpidos por no aminoácidos. Los términos también engloban un polímero de aminoácidos que ha sido modificado naturalmente o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marca. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), además de otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que, debido a que los polipéptidos de la presente invención se basan en un anticuerpo, los polipéptidos pueden producirse como cadenas individuales o cadenas asociadas.

“Polinucleótido” o “ácido nucleico”, como se usan indistintamente en este documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificadas, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero por ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación a la estructura del nucleótido puede conferirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes de no nucleótido. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente de marca. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, “tapas”, sustitución de uno o más de los nucleótidos que se producen naturalmente con un análogo, modificaciones de internucleótidos tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces sin carga (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforditioatos, etc.), aquellos que contienen restos laterales, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, ply-L-lisina, etc.), aquellos con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellos que contiene alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), además de formas sin modificar de polinucleótido(s). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo generalmente presentes en los azúcares puede sustituirse, por ejemplo, con grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse por grupos protectores estándar, o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o pueden conjugarse con soportes sólidos. El OH del extremo 5' y 3' puede fosforilarse o sustituirse con aminas o restos de grupos de remate orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que son generalmente conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares  $\alpha$ -anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como metilribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero no se limitan a, realizaciones en las que fosfato se sustituye con P(O)S (“tioato”), P(S)S (“ditioato”), (O)NR<sub>2</sub> (“amidato”), P(O)R, P(O)OR', CO o CH<sub>2</sub> (“formacetal”), en las que cada R o R' es independientemente H o alquilo (C1-20) sustituido o sin sustituir que opcionalmente contiene un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos citados en este documento, que incluyen ARN y ADN.

Una “región variable” de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, tanto solas como en combinación. Las regiones variables de la cadena pesada y ligera consisten cada una en cuatro regiones estructurales (FR) conectadas por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos. Hay al menos dos técnicas para determinar CDR: (1) un enfoque basado en la variabilidad de secuencia de especies cruzadas (es decir, Kabat y col. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (5<sup>a</sup> ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Chothia y col. (1989) *Nature* 342:877; Al-lazikani y col. (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948)). Como se usa en este documento, una CDR puede referirse a CDR definidas por cualquier enfoque o por una combinación de ambos enfoques.

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

Como se usa en este documento, el término “factor de crecimiento nervioso” y “NGF” se refieren al factor de crecimiento nervioso y variantes del mismo que retienen al menos parte de la actividad biológica de NGF. Como se usa en este documento, NGF incluye todas las especies de mamífero de NGF de secuencia nativa, que incluyen humana, canina, felina, equina o bovina.

“Receptor de NGF” se refiere a un polipéptido que está unido por o activado por NGF. Los receptores de NGF incluyen el receptor TrkA y el receptor p75 de cualquier especie de mamífero que incluyen, pero no se limitan a, humana, canina, felina, equina, primate o bovina.

Como se usa en este documento, un “anticuerpo antagonista anti-NGF” (llamado indistintamente “anticuerpo anti-NGF”) se refiere a un anticuerpo que puede unirse a NGF e inhibir la actividad biológica de NGF y/o ruta(s) en la

dirección 3' mediada(s) por la señalización de NGF. Un anticuerpo antagonista anti-NGF engloba anticuerpos que bloquean, antagonizan, suprimen o reducen (incluyendo significativamente) la actividad biológica de NGF, que incluye rutas en la dirección 3' mediadas por la señalización de NGF, tal como unión a receptor y/o provocación de una respuesta celular a NGF. Para el fin de la presente invención, se entenderá explícitamente que el término "anticuerpo antagonista anti-NGF" engloba todos los términos, títulos y estados funcionales previamente identificados y las características por las cuales el propio NGF, una actividad biológica de NGF (incluyendo, pero no se limita a, su capacidad para mediar en cualquier aspecto de dolor posquirúrgico) o las consecuencias de la actividad biológica, son sustancialmente anulados, disminuidos o neutralizados en cualquier grado significativo. En algunas realizaciones, un anticuerpo antagonista anti-NGF se une a NGF y previene la dimerización de NGF y/o unión a un receptor de NGF (tal como p75 y/o trkA). En otras realizaciones, un anticuerpo anti-NGF se une a NGF y previene la dimerización del receptor trkA y/o autofosforilación de trkA. Ejemplos de anticuerpos antagonista anti-NGF se proporcionan en este documento.

"Actividad biológica" de NGF generalmente se refiere a la capacidad para unirse a receptores de NGF y/o activar rutas de señalización de receptores de NGF. Sin limitación, una actividad biológica incluye una cualquiera o más de las siguientes: la capacidad para unirse a un receptor de NGF (tal como p75 y/o trkA); la capacidad para promover la dimerización y/o autofosforilación del receptor trkA; la capacidad para activar una ruta de señalización de los receptores de NGF; la capacidad para promover la diferenciación, proliferación, supervivencia, crecimiento celular y otros cambios en la fisiología célula, que incluyen (en el caso de neuronas, incluyendo neurona periférica y central) cambio en la morfología neuronal, sinaptogénesis, función sináptica, liberación de neurotransmisores y/o neuropéptidos y regeneración tras la lesión; la capacidad para promover la supervivencia de neuronas trigeminales E13.5 de ratón; y la capacidad para mediar en dolor, que incluye dolor posquirúrgico.

Como se usa en este documento, "sustancialmente puro" se refiere a un material que es al menos el 50% puro (es decir, libre de contaminantes), más preferentemente al menos el 90% puro, más preferentemente al menos el 95% puro, más preferentemente al menos el 98% puro, más preferentemente al menos el 99% puro.

Una "célula huésped" incluye una célula individual o cultivo celular que puede ser o ha sido un receptor para vector(es) para la incorporación de insertos de polinucleótidos. Las células huésped incluyen progenie de una única célula huésped, y la progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN genómico) a la célula parental original debido a mutación natural, accidental o deliberada. Una célula huésped incluye células transfectadas *in vivo* con un polinucleótido(s) de la presente invención.

Como se usa en este documento, "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los fines de la presente invención, resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: mejora o alivio de cualquier aspecto de dolor, que incluye dolor agudo, crónico, inflamatorio, neuropático, posquirúrgico, dolor por artritis reumatoide o dolor por osteoartritis. Para los fines de la presente invención, resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: que incluye reducir la gravedad, alivio de uno o más síntomas asociados al dolor que incluyen cualquier aspecto de dolor (tal como acortar la duración del dolor, reducción de la sensibilidad al dolor o sensación).

Una "cantidad eficaz" de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados que incluyen resultados clínicos tales como alivio o reducción en la sensación de dolor. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones. Para los fines de la presente invención, una cantidad eficaz de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para tratar, mejorar, reducir la intensidad de y/o prevenir el dolor, que incluye dolor posquirúrgico, dolor por artritis reumatoide y/o dolor por osteoartritis. En algunas realizaciones, la "cantidad eficaz" puede reducir el dolor en reposo o dolor mecánicamente inducido (incluyendo dolor tras movimiento), o ambos, y puede administrarse antes, durante o después de una incisión, corte, desgarro o lesión y/o antes, durante o después de estímulo doloroso. Como se entiende en el contexto clínico, una cantidad eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede o puede no lograrse conjuntamente con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por tanto, una "cantidad eficaz" puede considerarse en el contexto de administrar uno o más agentes terapéuticos, y un único agente puede considerarse que se administra en una cantidad eficaz si, conjuntamente con uno o varios agentes, puede lograr o logra un resultado deseable.

"Reducir la incidencia" de dolor significa cualquiera de reducir la gravedad (que puede incluir reducir la necesidad de y/o cantidad de (por ejemplo, exposición a) otros fármacos y/o terapias generalmente usadas para estas afecciones, que incluyen, por ejemplo, opiáceos), duración y/o frecuencia (incluyendo, por ejemplo, retrasar o aumentar el momento hasta el dolor posquirúrgico en un individuo). Como es entendido por aquellos expertos en la materia, los individuos pueden variar en términos de su respuesta a tratamiento y, como tales, por ejemplo, un "procedimiento de reducir la incidencia de dolor por artritis reumatoide o dolor por osteoartritis en un individuo" refleja administrar el anticuerpo antagonista anti-NGF basándose en una esperanza razonable de que tal administración pueda producir probablemente una reducción tal en la incidencia en ese individuo particular.

"Mejorar" un dolor o uno o más síntomas de un dolor (tal como dolor por artritis reumatoide o dolor por osteoartritis) significa una reducción o mejora de uno o más síntomas de un dolor con respecto a no administrar un anticuerpo antagonista anti-NGF. "Mejorar" también incluye acortar o reducir en duración un síntoma.

“Paliar” un dolor o uno o más síntomas de un dolor (tal como dolor por artritis reumatoide o dolor por osteoartritis) significa reducir el grado de una o más manifestaciones clínicas no deseables de dolor posquirúrgico en un individuo o población de individuos tratados con un anticuerpo antagonista anti-NGF según la invención.

5 Como se usa en este documento, “retrasar” el desarrollo de dolor significa diferir, dificultar, ralentizar, retardar estabilizar y/o posponer la progresión de dolor, tal como dolor posquirúrgico, dolor por artritis reumatoide o dolor por osteoartritis. Este retraso puede ser de longitudes de tiempo variables, dependiendo de la historia de la enfermedad y/o individuos que están tratándose. Como es evidente para un experto en la materia, un retraso suficiente o significativo puede englobar, en efecto, la prevención, de forma que el individuo no desarrolle dolor. Un procedimiento que “retrasa” el desarrollo del síntoma es un procedimiento que reduce la probabilidad de desarrollar el síntoma en un intervalo de tiempo dado y/o reducir el grado de los síntomas en un intervalo de tiempo dado, cuando se compara con no usar el procedimiento. Tales comparaciones se basan normalmente en estudios clínicos, usando un número de sujetos estadísticamente significativo.

15 “Dolor” como se usa en este documento se refiere a dolor de cualquier etiología, que incluye dolor agudo y crónico, y cualquier dolor con un componente inflamatorio. Ejemplos de dolor incluyen dolor posquirúrgico, dolor posoperatorio (incluyendo dolor dental), migraña, cefalea y neuralgia trigeminal, dolor asociado a quemadura, herida o cálculo renal, dolor asociado a traumatismo (incluyendo lesión de cabeza traumática), dolor neuropático, dolor asociado a trastornos musculoesqueléticos tales como artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante, artropatías sero-negativas (no reumatoides), reumatismo no articular y trastornos peri-articulares, y dolor asociado a cáncer (incluyendo “dolor intercurrente” y dolor asociado a cáncer terminal), neuropatía periférica y neuralgia posherpética. Ejemplos de dolor con un componente inflamatorio (además de algunos de aquellos descritos anteriormente) incluyen dolor reumático, dolor asociado a mucositis y dismenorrea.

20 “Dolor posquirúrgico” (llamado indistintamente “dolor posincisional” o “postraumático”) se refiere a dolor que se produce o resultante de un traumatismo externo tal como un corte, punción, incisión, desgarro o herida en el tejido de un individuo (incluyendo el que se produce a partir de todos los procedimientos quirúrgicos, tanto si son invasivos como no invasivos). Como se usa en este documento, dolor posquirúrgico no incluye dolor que tiene lugar (se produce u origina) sin un traumatismo físico externo. En algunas realizaciones, el dolor posquirúrgico es dolor interno o externo (incluyendo periférico), y la herida, corte, traumatismo, desgarro o incisión puede producirse accidentalmente (como con una herida traumática) o deliberadamente (como con una incisión quirúrgica). Como se usa en este documento, “dolor” incluye nocicepción y la sensación de dolor, y el dolor puede evaluarse objetivamente y subjetivamente, usando puntuaciones de dolor y otros procedimientos muy conocidos en la técnica. El dolor posquirúrgico, como se usa en este documento, incluye alodinia (es decir, respuesta elevada a un estímulo normalmente no tóxico) e hiperalgesia (es decir, respuesta elevada a un estímulo normalmente tóxico o desagradable), que a su vez puede ser de naturaleza térmica o mecánica (táctil). En algunas realizaciones, el dolor se caracteriza por sensibilidad térmica, sensibilidad mecánica y/o dolor en reposo. En algunas realizaciones, el dolor posquirúrgico comprende dolor mecánicamente inducido o dolor en reposo. En otras realizaciones, el dolor posquirúrgico comprende dolor en reposo. El dolor puede ser dolor primario o secundario, como es muy conocido en la técnica.

25 Una “muestra biológica” engloba una variedad de tipos de muestras obtenidas de un individuo y puede usarse en un ensayo de diagnóstico o monitorización. La definición engloba sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras sólidas de tejido tal como un espécimen de biopsia o cultivos de tejido o células derivadas de los mismos, y la progenie de los mismos. La definición también incluye muestras que han sido manipuladas de cualquier forma después de su obtención, tal como mediante tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento para ciertos componentes, tales como proteínas o polinucleótidos, o incorporación en una matriz semi-sólida o sólida para fines de seccionamiento. El término “muestra biológica” engloba una muestra clínica, y también incluye células en cultivo, sobrenadantes de células, lisados celulares, suero, plasma, líquido biológico y muestras de tejido.

30 Un “individuo” es un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales de granja (tales como vacas), animales para deportes, mascotas (tales como gatos, perros y caballos), primates, ratones y ratas.

35 Como se usa en este documento, “vector” significa una construcción que puede administrar, y preferentemente expresar, uno o más genes o secuencias de interés en una célula huésped. Ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores víricos, vectores de expresión de ADN o ARN desnudo, vectores de plásmidos, cósmidos o de fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados a agentes de condensación catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas, y ciertas células eucariotas, tales como células productoras.

40 Como se usa en este documento, “secuencia de control de la expresión” significa una secuencia de ácidos nucleicos que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Una secuencia de control de la expresión puede ser un promotor, tal como un promotor constitutivo o inducible, o un potenciador. La secuencia de control de la expresión está operativamente ligada a la secuencia de ácidos nucleicos que va a transcribirse.

45 Como se usa en este documento, “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye cualquier material que, cuando se combina con un principio activo, permite que el componente retenga la actividad biológica y es no reactivo con el

sistema inmunitario del sujeto. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión de aceite/agua, y diversos tipos de agentes humectantes. Diluyentes preferidos para administración por aerosol o parenteral son solución salina tamponada con fosfato o solución salina normal (0,9%). Las composiciones que comprenden tales vehículos se formulan por procedimientos convencionales muy conocidos (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; y Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Ed. Mack Publishing, 2000).

El término " $K_{dis}$ ", como se usa en este documento, pretende referirse a la constante de disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno.

El término " $K_D$ ", como se usa en este documento, pretende se refieren a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno.

**ANTICUERPO E3, ANTICUERPOS DERIVADOS DE E3, COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS DE USO**

**Composiciones de E3, composiciones derivadas de E3 y procedimientos de preparación de las composiciones**

La presente invención engloba composiciones, que incluyen composiciones farmacéuticas, que comprenden un anticuerpo o polipéptido E3; y polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican un anticuerpo o polipéptido E3. Como se usa en este documento, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos o polipéptidos (que pueden o pueden no ser un anticuerpo) que se unen a NGF, y/o uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican uno o más anticuerpos o polipéptidos que se unen a NGF. Estas composiciones pueden comprender adicionalmente excipientes adecuados tales como excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyen tampones, que son muy conocidos en la técnica.

La invención también engloba realizaciones de anticuerpos, polipéptidos y polinucleótidos aislados. La invención también engloba realizaciones de anticuerpos, polipéptidos y polinucleótidos sustancialmente puros.

Los anticuerpos y polipéptidos de la invención se caracterizan por cualquiera (una o más) de las siguientes características: (a) capacidad para unirse a NGF; (b) capacidad para reducir y/o inhibir la actividad biológica de NGF y/o ruta(s) en la dirección 3' mediadas por la señalización de NGF; (c) capacidad para reducir y/o inhibir la supervivencia dependiente de NGF de neuronas trigeminales E13.5 de ratón; (d) ausencia de cualquier reactividad cruzada significativa con NT3, NT4/5 y/o BDNF; (e) capacidad para tratar y/o prevenir dolor (incluyendo dolor posquirúrgico); (f) capacidad para aumentar la eliminación de NGF; (g) capacidad para reducir o inhibir la activación del receptor trkA como se detecta, por ejemplo, usando ensayo de activación de receptores de cinasas (KIRA) (véase la patente de EE.UU. nº 6.027.927).

Las propiedades de unión del anticuerpo E3, que se une a NGF humano con alta afinidad, y la lenta cinética de disociación, en comparación con el anticuerpo monoclonal anti-NGF murino parental 911, se resumen más adelante. E3 se une a NGF humano con una afinidad de unión aproximadamente 50 veces superior al anticuerpo de ratón parental 911.

anticuerpo	$k_D$	$K_{dis}$	$K_{as}$
911 (Fab)	3,7 nM	$9 \times 10^{-5} s^{-1}$	$2,2 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$
E3 (Fab)	0,07 nM	$< 4 \times 10^{-5} s^{-1}$	$6 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$

El anticuerpo E3 y anticuerpos relacionados también presentan una fuerte capacidad para antagonizar NGF humano, como se evalúa por los ensayos *in vitro* (véanse los Ejemplos 2 y 3). Por ejemplo, el anticuerpo E3 antagoniza la supervivencia dependiente de NGF de neuronas trigeminales E13 de ratón a una  $CI_{50}$  de aproximadamente 21 pM en presencia de 15 pM de NGF humano, y aproximadamente 1,2 pM en presencia de 1,5 pM de NGF humano.

Por consiguiente, en otro aspecto, los anticuerpos y polipéptidos de la invención se identifican adicionalmente y se caracterizan por: (h) unión de alta afinidad a NGF humano con baja cinética de disociación (en algunas realizaciones, con una  $K_D$  inferior a aproximadamente 2 nM, y/o una  $K_{dis}$  más lenta de aproximadamente  $6 \times 10^{-5} s^{-1}$ ) y/o (i) capacidad para inhibir (bloquear) la supervivencia dependiente de NGF de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una  $CI_{50}$  de aproximadamente 100 pM o menos a aproximadamente 15 pM de NGF (en algunas realizaciones, NGF humano) y/o una  $CI_{50}$  de aproximadamente 20 pM o menos a aproximadamente 1,5 pM de NGF.

En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a NGF humano, y no se une significativamente a un NGF de otra especie de vertebrado (en algunas realizaciones, mamífero). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a NGF humano, además de a uno o más NGF de otra especie de vertebrado (en algunas realizaciones, mamífero). En otras realizaciones más, el anticuerpo se une a NGF y no reacciona significativamente de forma cruzada con otras

neurotrofinas (tal como las neurotrofinas relacionadas NT3, NT4/5 y/o BDNF). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a NGF, además de a al menos otra neurotrofina. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a una especie de mamífero de NGF, tal como caballo o perro; pero no se une significativamente a NGF de otra especie de mamífero.

- 5 En algunas realizaciones, la invención es un anticuerpo que comprende una cadena ligera que está codificada por un polinucleótido que es producido por una célula huésped con un número de depósito de ATCC n° PTA-4893 o ATCC n° PTA-4894. En otro aspecto, la invención es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que está codificada por un polinucleótido que es producido por una célula huésped con un número de depósito de ATCC n° PTA-4895. La presente invención también engloba diversas formulaciones de E3 y fragmentos de anticuerpos  
10 equivalentes (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fc, etc.), monocatenarios (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, y cualquier otra configuración de E3 modificada que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno (NGF) de la especificidad requerida. Los anticuerpos equivalentes de E3, que incluyen fragmentos de anticuerpos y de polipéptidos (que pueden o pueden no ser anticuerpos) de E3, y polipéptidos que comprenden fragmentos de polipéptidos de E3, se identifican y se  
15 caracterizan por cualquiera (uno o más) de los criterios descritos anteriormente.

Por consiguiente, la invención proporciona cualquiera de lo siguiente, o composiciones (incluyendo composiciones farmacéuticas) que comprenden cualquiera de lo siguiente: (a) anticuerpo E3; (b) un fragmento o una región del anticuerpo E3; (c) una cadena ligera del anticuerpo E3 como se muestra en las Figuras 1B; (c) una cadena pesada del anticuerpo E3 como se muestra en las Figuras 1A; (d) una o más regiones variables de una cadena ligera y/o  
20 una cadena pesada del anticuerpo E3; (e) una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR) del anticuerpo E3 mostrado en las Figuras 1A y 1B; (f) CDR H3 de la cadena pesada del anticuerpo E3 mostrado en la Figura 1A; (g) CDR L3 de la cadena ligera del anticuerpo E3 mostrado en la Figura 1B; (h) tres CDR de la cadena ligera del anticuerpo E3 mostrado en la Figura 1B; (i) tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo E3 mostrado en la Figura 1A; (j) tres CDR de la cadena ligera y tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo E3 mostrado en las Figuras 1A y 1B; y (k) un anticuerpo que comprende una cualquiera de (b) a (j). Como es evidente de la descripción en este documento, específicamente excluidas de la invención están realizaciones de polipéptidos que consisten en la  
25 secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal de ratón, 911. Las secuencias de CDR extendidas de Mab 911 se muestran en las Figuras 1A y 1B, y en SEC ID N°: 9-14.

Las porciones de CDR del anticuerpo E3 (incluyendo CDR de Chothia y de Kabat) se representan en diagramas en las Figuras 1A y 1B, y consisten en las siguientes secuencias de aminoácidos: (a) CDR 1 de la cadena pesada ("CDR H1") GFSLIGYDLN (SEC ID N°: 3); (b) CDR 2 de la cadena pesada ("CDR H2") IIWGDGTTDYNSAVKS (SEC ID N°: 4); (c) CDR 3 de la cadena pesada ("CDR H3") GGYWYATSYFYDY (SEC ID N°: 5); (d) CDR 1 de la cadena ligera ("CDR L1") RASQSISSLN (SEC ID N°: 6); (e) CDR 2 de la cadena ligera ("CDR L2") YTSRFHS (SEC ID N°: 7); y (f) CDR 3 de la cadena ligera ("CDR L3") QQEHTLPYT (SEC ID N°: 8). La determinación de regiones CDR está  
30 dentro de la habilidad de la materia. Se entiende que en algunas realizaciones, las CDR pueden ser una combinación de las CDR de Kabat y de Chothia (también llamadas "CDR combinadas" o "CDR extendidas"). En algunas realizaciones, las CDR comprenden las CDR de Kabat. En otras realizaciones, las CDR son las CDR de Chothia.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo que comprende al menos una CDR que es sustancialmente homóloga a al menos una CDR, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos 5 CDR de E3 (o, en algunas realizaciones sustancialmente homólogo a las 6 CDR de E3, o derivadas de E3). Otras realizaciones incluyen anticuerpos que tienen al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR que son sustancialmente homólogas a al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR de E3 o derivadas de E3. Se entiende que, para los fines de la presente invención, la especificidad de unión y/o la actividad global (que pueden ser en términos de tratar y/o  
40 prevenir dolor o inhibir la supervivencia dependiente de NGF de neuronas trigeminales de ratón E13.5) son generalmente retenidas, aunque el grado de actividad pueda variar en comparación con E3 (puede ser mayor o menor).

La invención también proporciona un polipéptido (que puede o puede no ser un anticuerpo) que comprende una secuencia de aminoácidos de E3 (mostrada en las Figuras 1A y 1B) que tiene cualquiera de lo siguiente: al menos 5 aminoácidos contiguos, al menos 8 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 10 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 15 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 20 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 25 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de una secuencia de E3 en la que al menos 3 de los aminoácidos son de una región variable de E3, con el entendimiento de que las realizaciones que consisten en la secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal de ratón, 911, son específicamente excluidas. Las secuencias de CDR extendidas del Mab 911 se muestran en las Figuras 1A y 1B, y en SEC ID N°: 9-14. En una realización, la región variable es de una cadena ligera de E3. En otra realización, la región variable es de una cadena pesada de E3. En otra realización, los 5 (o más) aminoácidos contiguos son de una región determinante de la complementariedad (CDR) de E3 mostrada en las Figuras 1A y 1B.  
55

60 En otra realización, la invención proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de E3 que tiene cualquiera de lo siguiente: al menos 5 aminoácidos contiguos, al menos 8 aminoácidos contiguos, al

menos aproximadamente 10 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 15 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 20 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 25 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de una secuencia de E3 en la que la secuencia de E3 comprende uno cualquiera o más de: residuo de aminoácido L29 de CDRH1, I50 de CDRH2, W101 de CDRH3, y/o A103 de CDRH3; y/o residuo de aminoácido S28 de CDRL1, N32 de CDRL1, T51 de CDRL2; 91E de CDRL3 y/o H92 de CDRL3, con el entendimiento de que las realizaciones que consisten en la secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de aminoácidos de anticuerpo monoclonal de ratón, 911, son específicamente excluidas.

Como es evidente, en toda esta divulgación se usa un esquema de numeración de aminoácidos secuencial para referirse a los residuos de aminoácidos en las regiones variables (es decir, los residuos de aminoácidos en cada región variable están numerados en la secuencia). Como es muy conocido en la técnica, los sistemas de numeración de Kabat y/o de Chothia son útiles cuando se comparan dos anticuerpos o polipéptidos, tales como un anticuerpo E3 y una variante de E3 (o polipéptido que se sospecha que es una variante de E3). Es bien entendido en la materia cómo convertir la numeración secuencial en la numeración de Chothia y/o de Kabat, si se desea, por ejemplo, para su uso en la realización de comparaciones entre E3 y otro polipéptido. La Figura 23 representa las regiones variables de E3 numeradas usando la numeración secuencial, de Chothia y de Kabat. Además, para facilitar la comparación, generalmente se entiende que los residuos de la región estructural tienen generalmente, pero no siempre, aproximadamente el mismo número de residuos. Sin embargo, las CDR pueden variar en tamaño (es decir, es posible tener inserciones y/o deleciones de uno o más residuos de aminoácidos). Si se compara un anticuerpo E3 y una variante de E3 candidata (por ejemplo, en el caso de una región CDR de una secuencia candidata que es más larga en la secuencia en el anticuerpo E3 con la que está alineada), pueden seguirse las siguientes etapas (aunque se conocen otros procedimientos en la técnica). La secuencia de anticuerpos candidata se alinea con regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera del anticuerpo E3. El alineamiento puede hacerse a mano, o por ordenador usando programas informáticos comúnmente aceptados. El alineamiento puede facilitarse usando algunos residuos de aminoácidos que son comunes a la mayoría de las secuencias de Fab. Por ejemplo, las cadenas ligeras y pesadas tienen cada una normalmente dos cisteínas, que se encuentran frecuentemente en una posición conservada. Se entiende que la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de variante candidata puede ser más larga (es decir, tener residuos de aminoácidos insertados) o más corta (tener residuos de aminoácidos delecionados). Pueden añadirse sufijos al número de residuo para indicar la inserción de residuos adicionales, por ejemplo, residuo 34 abc. Para secuencias candidatas que, por ejemplo, se alinean con una secuencia de E3 para, por ejemplo, los residuos 33 y 35, pero no tienen residuos entre ellas para alinearse con el residuo 35, el residuo 35 simplemente no se asigna a un residuo. En otro enfoque, es generalmente muy conocido que la comparación pueda hacerse entre aminoácidos equivalentes estructurales (por ejemplo, misma posición en el complejo antígeno-anticuerpo) cuando se comparan CDR de diferentes longitudes. Por ejemplo, la numeración de Chothia (Al-Lazikani y col., arriba) sitúa generalmente (pero no en todos los casos) inserciones y deleciones en las posiciones estructuralmente correctas. La equivalencia estructural también puede deducirse o demostrarse usando cristalografía de rayos X o análisis de ciclo de dobles mutantes (véase Pons y col. (1999) Prot. Sci. 8:958-968).

La afinidad de unión de un anticuerpo anti-NGF por NGF (tal como hNGF) puede ser aproximadamente 0,10 a aproximadamente 0,80 nM, aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,75 nM y aproximadamente 0,18 a aproximadamente 0,72 nM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 40 pM, o superior a aproximadamente 40 pM. En una realización, la afinidad de unión es entre aproximadamente 2 pM y 22 pM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es inferior a aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 4 nM, aproximadamente 3,5 nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 2,5 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 1,5 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 900 pM, aproximadamente 800 pM, aproximadamente 700 pM, aproximadamente 600 pM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 400 pM, aproximadamente 300 pM, aproximadamente 200 pM, aproximadamente 150 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 90 pM, aproximadamente 80 pM, aproximadamente 70 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 40 pM, aproximadamente 30 pM, aproximadamente 10 pM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es aproximadamente 10 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es inferior a aproximadamente 10 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es inferior a aproximadamente 0,1 nM o inferior a aproximadamente 0,07 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es cualquiera de aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 4 nM, aproximadamente 3,5 nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 2,5 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 1,5 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 900 pM, aproximadamente 800 pM, aproximadamente 700 pM, aproximadamente 600 pM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 400 pM, aproximadamente 300 pM, aproximadamente 200 pM, aproximadamente 150 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 90 pM, aproximadamente 80 pM, aproximadamente 70 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 40 pM, aproximadamente 30 pM, aproximadamente 10 pM a cualquiera de aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM, o aproximadamente 40 pM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es cualquiera de aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 4 nM, aproximadamente 3,5 nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 2,5 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 1,5 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 900 pM, aproximadamente 800 pM,

aproximadamente 700 pM, aproximadamente 600 pM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 400 pM, aproximadamente 300 pM, aproximadamente 200 pM, aproximadamente 150 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 90 pM, aproximadamente 80 pM, aproximadamente 70 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 40 pM, aproximadamente 30 pM, aproximadamente 10 pM. En otras realizaciones más, la afinidad de unión es aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 40 pM, o superior a aproximadamente 40 pM.

La afinidad de unión del anticuerpo por NGF puede determinarse usando procedimientos muy conocidos en la técnica. Una forma de determinar la afinidad de unión de anticuerpos por NGF es midiendo la afinidad de fragmentos Fab monofuncionales del anticuerpo, como se describe en los ejemplos. Para obtener fragmentos Fab monofuncionales, un anticuerpo (por ejemplo, IgG) puede escindir-se con papaína o expresarse recombinantemente. La afinidad de un fragmento Fab anti-NGF de un anticuerpo puede determinarse por resonancia de plasmones superficiales (sistema de resonancia de plasmones superficiales (SPR) BIAcore3000™, BIAcore, INC, Piscataway NJ), como se describe en los ejemplos. Este protocolo es adecuado para su uso en determinar la afinidad de unión de un anticuerpo por NGF de cualquier especie, que incluye NGF humano, NGF de otro vertebrado (en algunas realizaciones, mamífero) (tal como NGF de ratón, NGF de rata, NGF de primate), además de para su uso con otras neurotrofinas, tales como las neurotrofinas relacionadas NT3, NT4/5 y/o BDNF.

En algunas realizaciones, los anticuerpos o péptidos de la invención pueden inhibir (reducir y/o bloquear) la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una  $CI_{50}$  (en presencia de aproximadamente 15 pM de NGF) de aproximadamente cualquiera de 200 pM, 150 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 20 pM, 10 pM, o menos. En algunas realizaciones, los anticuerpos o péptidos de la invención pueden inhibir (reducir y/o bloquear) la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una  $CI_{50}$  (en presencia de aproximadamente 1,5 pM de NGF) de aproximadamente cualquiera de 50 pM, 40 pM, 30 pM, 10 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, 2 pM, 1 pM, o menos. En algunas realizaciones, los anticuerpos o péptidos de la invención pueden inhibir (reducir y/o bloquear) la supervivencia dependiente de NGF de rata de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una  $CI_{50}$  (en presencia de aproximadamente 15 pM de NGF) de aproximadamente cualquiera de 150 pM, 125 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 30 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, o menos. En algunas realizaciones, los anticuerpos o péptidos de la invención pueden inhibir (reducir y/o bloquear) la supervivencia dependiente de NGF de rata de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una  $CI_{50}$  (en presencia de aproximadamente 1,5 pM de NGF) de aproximadamente cualquiera de 30 pM, 25 pM, 20 pM, 15 pM, 10 pM, 5 pM, 4 pM, 3 pM, 2 pM, 1 pM, o menos. Los procedimientos para la medición de la supervivencia dependiente de NGF de neuronas trigeminales E13 de ratón se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en el Ejemplo 2.

La invención también proporciona procedimientos de producción de cualquiera de estos anticuerpos o polipéptidos. Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse mediante procedimientos conocidos en la técnica, algunos de los cuales se ilustran en los ejemplos. Los polipéptidos pueden producirse por degradación proteolítica u otra degradación de los anticuerpos, mediante procedimientos recombinantes (es decir, polipéptidos individuales o fusión) como se ha descrito anteriormente o por síntesis química. Los polipéptidos de los anticuerpos, especialmente polipéptidos más cortos de hasta aproximadamente 50 aminoácidos, se preparan convenientemente por síntesis química. Los procedimientos de síntesis química se conocen en la técnica y están comercialmente disponibles. Por ejemplo, un anticuerpo E3 podría producirse por un sintetizador de polipéptidos automatizado empleando el procedimiento en fase sólida. Véanse, por tanto, las patentes de EE.UU. nº 5.807.715; 4.816.567; y 6.331.415. Los anticuerpos quiméricos o híbridos también pueden producirse *in vitro* usando procedimientos conocidos de química de proteínas sintéticas, que incluyen aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y 4-mercaptobutirimidato de metilo.

En otra alternativa, los anticuerpos pueden producirse recombinantemente usando procedimientos que son muy conocidos en la técnica. En una realización, un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica las regiones variables y de la cadena ligera del anticuerpo E3 (mostradas en las Figuras 1A y 1B) se clona en un vector para la expresión o propagación en una célula huésped (por ejemplo, células CHO). En otra realización, las secuencias de polinucleótidos mostradas en las Figuras 2 y 3 se clonan en uno o más vectores para la expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse en un vector en una célula huésped y la célula huésped puede luego expandirse y congelarse para el uso futuro. Los vectores (incluyendo vectores de expresión) y células huésped se describen adicionalmente en este documento. Se han desvelado procedimientos para expresar anticuerpos recombinantemente en plantas o leche. Véase, por ejemplo, Peeters y col. (2001) *Vaccine* 19:2756; Lonberg, N. y D. Huszar (1995) *Int. Rev. Immunol* 13:65; y Pollock y col. (1999) *J Immunol Methods* 231:147. En la técnica se conocen procedimientos para producir derivados de anticuerpos, por ejemplo, humanizados, monocatenarios, etc.

La invención también engloba fragmentos de la región variable monocatenaria ("scFv") de anticuerpos de la presente invención, tales como E3. Los fragmentos de la región variable monocatenaria se preparan ligando regiones variables de la cadena ligera y/o pesada usando un péptido de enlace corto. Bird y col. (1988) *Science* 242:423-426. Un ejemplo de un péptido de enlace es (GGGS)<sub>3</sub> (SEC ID N°: 15), que une mediante puentes aproximadamente 3,5 nm entre el extremo carboxi de una región variable y el extremo amino de la otra región variable. Se han

diseñado y usado ligadores de otras secuencias (Bird y col. (1988)). Los ligadores pueden modificarse a su vez para funciones adicionales, tales como unión de fármacos o unión a soportes sólidos. Las variantes monocatenarias pueden producirse tanto recombinantemente como sintéticamente. Para la producción sintética de scFv puede usarse un sintetizador automatizado. Para la producción recombinante de scFv, un plásmido adecuado que contiene polinucleótido que codifica el scFv puede introducirse en una célula huésped adecuada, tanto eucariota, tal como células de levadura, planta, insecto o de mamífero, como procaríota, tal como *E. coli*. Los polinucleótidos que codifican el scFv de interés pueden prepararse por manipulaciones rutinarias tales como ligación de polinucleótidos. El scFv resultante puede aislarse usando técnicas convencionales de purificación de proteínas conocidas en la técnica.

También están englobadas otras formas de anticuerpos monocatenarios, tales como diacuerpos. Los diacuerpos son bivalentes, anticuerpos biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una única cadena de polipéptidos, pero usando un ligador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando así a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión a antígeno (véase por ejemplo, Holliger, P. y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J. y col. (1994) Structure 2:1121-1123).

El anticuerpo puede ser un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo monoclonal que tiene especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. Un anticuerpo biespecífico puede prepararse usando los anticuerpos desvelados en este documento. Los procedimientos para producir anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Suresh y col., 1986, Methods in Enzymology 121:210). Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basó en la coexpresión de dos pares de cadenas pesadas-cadenas ligeras de la inmunoglobulina, teniendo las dos cadenas pesadas diferentes especificidades (Millstein y Cuello, 1983, Nature 305, 537-539).

Según un enfoque para producir anticuerpos biespecíficos, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) están fusionados con secuencias del dominio constante de la inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de la cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en realizaciones cuando relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos usadas en la construcción proporcionan el rendimiento óptimo. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en relaciones iguales dé altos rendimientos o cuando las relaciones no sean de significancia particular.

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

Los anticuerpos heteroconjugados, que comprenden dos anticuerpos covalentemente unidos, también están dentro del alcance de la invención. Tales anticuerpos se han usado para elegir como diana células del sistema inmunitario para células no deseadas (la patente de EE.UU. nº 4.676.980), y para el tratamiento de infección por el VIH (publicaciones de solicitud PCT nº WO 91/00360 y WO 92/200373; documento EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Agentes y técnicas de reticulación adecuados son muy conocidos en la técnica, y se describen en la patente de EE.UU. nº 4.676.980.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado, por ejemplo, como se conoce en la técnica, y como se describe en este documento.

Los anticuerpos pueden modificarse como se describe en publicación PCT nº WO 99/58572 publicada el 18 de noviembre de 1999. Estos anticuerpos comprenden, además de un dominio de unión dirigido a la molécula diana, un dominio efector que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a todo o parte de un dominio constante de una cadena pesada humana de la inmunoglobulina. Estos anticuerpos pueden unirse a la molécula diana sin desencadenar una lisis dependiente del complemento significativa, o destrucción mediada por células de la diana. Preferentemente, el dominio efector puede unirse específicamente a FcRn y/o FcγRIIb. Éstos se basan normalmente en dominios quiméricos derivados de dos o más dominios CH2 de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana. Los anticuerpos modificados de este modo se prefieren para su uso en terapia con anticuerpos crónica, para prevenir reacciones inflamatorias y otras reacciones adversas a la terapia con anticuerpos convencional.

La invención engloba modificaciones al anticuerpo E3, que incluyen anticuerpos funcionalmente equivalentes que no afectan significativamente sus propiedades, y variantes que han potenciado o disminuido la actividad. La modificación de polipéptidos es práctica rutinaria en la materia y se ejemplifica adicionalmente en los ejemplos. Ejemplos de polipéptidos modificados incluyen polipéptidos con sustituciones (incluyendo sustituciones conservativas) de residuos de aminoácidos, una o más deleciones o adiciones de aminoácidos que no cambian significativamente perjudicialmente la actividad funcional, o uso de análogos químicos.

Una "variante" de polipéptido, como se usa en este documento, es un polipéptido que se diferencia de una proteína nativa en una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones, de forma que la inmunorreactividad del polipéptido no disminuye sustancialmente. En otras palabras, la capacidad de una variante para unirse específicamente a antígeno puede potenciarse o no cambiarse, con respecto a la proteína nativa, o puede disminuirse menos del 50%, y preferentemente menos del 20%, con respecto a la proteína nativa. Las variantes de polipéptido presentan preferentemente al menos aproximadamente el 80%, más preferentemente al menos aproximadamente el 90% y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 95% de identidad (determinada como se describe en este documento) para los polipéptidos identificados.

Las variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos pueden prepararse introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN de anticuerpo, o por síntesis de péptidos. Tales variantes incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en, y/o sustituciones de, residuos dentro de las secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 1 ó 2 descritas en este documento. Cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución se hace para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácido también pueden alterar los procedimientos postraduccionales del anticuerpo, tal como el cambio del número o la posición de sitios de glicosilación.

Un procedimiento útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para mutagénesis o modificación se llama "mutagénesis por barrido con alanina", y se describe por Cunningham y Wells, 1989, Science, 244:1081-1085. Un residuo o grupo de residuos diana se identifica (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituye por un aminoácido neutro o negativamente cargado (lo más preferentemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con antígeno. Aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan luego introduciendo más u otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, mientras que el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación no necesita en sí predeterminarse. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, la mutagénesis por barrido con ala o al azar se realiza en el codón o región diana y las variantes de anticuerpos expresadas se criban para la actividad deseada. La mutagénesis por barrido de bibliotecas, como se describe en este documento, también puede usarse para identificar localizaciones en un anticuerpo que son adecuadas para mutagénesis o modificación.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones de extremos amino y/o carboxilo que oscilan en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, además de inserciones intrasecuencia de un único residuo o múltiples residuos de aminoácidos. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo del extremo N o el anticuerpo fusionado con una marca de epítipo. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión con el extremo N o C del anticuerpo de una enzima o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

Las variantes de sustitución tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo eliminado y un residuo diferente insertado en su sitio. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de "sustituciones conservativas". Si tales sustituciones producen un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse cambios más sustanciales, denominados "Sustituciones a modo de ejemplo" en la Tabla 1, o como se describe adicionalmente más adelante en referencia a las clases de aminoácidos, y cribarse los productos.

Tabla 1: Sustituciones de aminoácidos

Residuo original	Sustituciones conservativas	Sustituciones a modo de ejemplo
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg

(continuación)

Residuo original	Sustituciones conservativas	Sustituciones a modo de ejemplo
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina
Leu (L)	Ile	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

5 Modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se llevan a cabo seleccionando sustituciones que se diferencian significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto de polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hoja o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos que se producen naturalmente se dividen en grupos basándose en propiedades comunes de las cadenas laterales:

- 10 (1) Hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;  
 (2) Hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr;  
 (3) Ácidos: Asp, Glu;  
 (4) Básicos: Asn, Gln, His, Lys, Arg;  
 (5) Residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y  
 (6) Aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservativas se hacen intercambiando un miembro de una de estas clases con otra clase.

15 Cualquier residuo de cisteína que no participe en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo también puede estar sustituido, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir reticulación anómala. En cambio, el (los) enlace(s) de cisteína puede(n) añadirse al anticuerpo para mejorar su estabilidad, particularmente si el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv.

20 Las modificaciones de aminoácidos pueden oscilar de cambiar o modificar uno o más aminoácidos para completar el rediseño de una región, tal como la región variable. Los cambios en la región variable pueden alterar la afinidad de unión y/o especificidad. En alguna realización, no más de una a cinco sustituciones de aminoácidos conservativas se hacen dentro de un dominio CDR. En otras realizaciones, no más de una a tres sustituciones de aminoácidos conservativas se hacen dentro de un dominio CDR3. En otras realizaciones más, el dominio CDR es CDRH3 y/o CDRL3.

25 Las modificaciones también incluyen polipéptidos glicosilados y no glicosilados, además de polipéptidos con otras modificaciones postraduccionales tales como, por ejemplo, glicosilación con diferentes azúcares, acetilación y fosforilación. Lo anticuerpos se glicosilan en posiciones conservadas en sus regiones constantes (Jefferes Y Lund, 1997, Chem. Immunol. 65:111-128; Wright y Morrison, 1997, TibTECH 15:26-32). Las cadenas laterales de

oligosacáridos de las inmunoglobulinas afectan la función de la proteína (Boyd y col., 1996, Mol. Immunol. 32:1311-1318; Wittwe y Howard, 1990, Biochem. 29:4175-4180) y la interacción intramolecular entre porciones de la glicoproteína, que pueden afectar la conformación y superficie tridimensional presentada de la glicoproteína (Hefferes Y Lund, arriba; Wyss y Wagner, 1996, Current Opin. Biotech. 7:409-416). Los oligosacáridos también pueden servir para elegir como diana una glicoproteína dada para ciertas moléculas basadas en estructuras de reconocimiento específicas. También se ha informado que la glicosilación de anticuerpos afecta la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). En particular, se informó que las células CHO con expresión regulada con tetraciclina de  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una formación catalizadora de glicosiltransferasa de GlcNAc bisecante, tenían actividad ADCC mejorada (Umana y col., 1999, Mature Biotech 17:176-180).

La glicosilación de anticuerpos está normalmente o ligada a N o ligada a O. Ligado a N se refiere a la unión del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, están en las secuencias de reconocimiento para unión enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un posible sitio de glicosilación. La glicosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, los más comunes serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas anteriormente descritas (para sitios de glicosilación ligados a N). La alteración también puede hacerse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación ligados a O).

El patrón de glicosilación de anticuerpos también puede alterarse sin alterar la secuencia de nucleótidos subyacente. La glicosilación depende ampliamente de la célula huésped usada para expresar el anticuerpo. Debido a que el tipo de célula usado para la expresión de glicoproteínas recombinantes, por ejemplo anticuerpos, como posibles medicamentos es raramente la célula nativa, pueden esperarse variaciones significativas en el patrón de glicosilación de los anticuerpos (véase, por ejemplo Hse y col., 1997, J. Biol. Chem. 272:9062-9070).

Además de la elección de células huésped, los factores que afectan la glicosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen modo de crecimiento, formulación de medios, densidad de cultivo, oxigenación, pH, esquemas de purificación y similares. Se han propuesto diversos procedimientos para alterar el patrón de glicosilación logrado en un organismo huésped particular que incluyen introducir o sobreexpresar ciertas enzimas que participan en la producción de oligosacáridos (patentes de EE.UU. nº 5.047.335; 5.510.261 y 5.278.299). La glicosilación, o ciertos tipos de glicosilación, puede eliminarse enzimáticamente de la glicoproteína, por ejemplo, usando endoglicosidasa H (Endo H). Además, la célula huésped recombinante puede manipularse genéticamente para ser defectuosa en el procesamiento de ciertos tipos de polisacáridos. Estas técnicas y similares son muy conocidas en la técnica.

Otros procedimientos de modificación incluyen usar técnicas de acoplamiento conocidas en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, medios enzimáticos, sustitución oxidativa y quelación. Las modificaciones pueden usarse, por ejemplo, para la unión de marcas para inmunoensayo. Los polipéptidos E3 modificados se preparan usando procedimientos establecidos en la materia y pueden cribarse usando ensayos convencionales conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen más adelante y en los ejemplos.

Otras modificaciones de anticuerpos incluyen anticuerpos que han sido modificados como se describe en la publicación PCT nº WO 99/58572 publicada el 18 de noviembre de 1999. Estos anticuerpos comprenden, además de un dominio de unión dirigido a la molécula diana, un dominio efector que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a todo o parte de un dominio constante de una cadena pesada humana de la inmunoglobulina. Estos anticuerpos pueden unirse a la molécula diana sin desencadenar una lisis dependiente del complemento significativa, o destrucción mediada por células de la diana. En algunas realizaciones, el dominio efector puede unirse específicamente a FcRn y/o Fc $\gamma$ RIIb. Éstos se basan normalmente en dominios quiméricos derivados de dos o más dominios CH2 de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana. Los anticuerpos modificados de este modo son particularmente adecuados para su uso en terapia con anticuerpos crónica, para prevenir reacciones inflamatorias y otras reacciones adversas a la terapia con anticuerpos convencional.

La invención también engloba proteínas de fusión que comprenden uno o más fragmentos o regiones de los anticuerpos (tal como E3) o polipéptidos de la presente invención. En una realización se proporciona un polipéptido de fusión que comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de la región variable de la cadena ligera mostrada en la Figura 1B y/o al menos 10 aminoácidos de la región variable de la cadena pesada mostrada en la Figura 1A. En otra realización, el polipéptido de fusión comprende una región variable de la cadena ligera y/o una región variable de la cadena pesada de E3, como se muestra en las Figuras 1A y 1B. En otra realización, el polipéptido de fusión comprende una o más CDR de E3. En otras realizaciones más, el polipéptido de fusión comprende CDR H3 y/o CDR L3 del anticuerpo E3. En otra realización, el polipéptido de fusión comprende uno cualquiera o más de: residuo de aminoácido L29 de CDRH1, 150 de CDRH2, W101 de CDRH3, y/o A103 de CDRH3; y/o residuo de aminoácido

S28 de CDRL1, N32 de CDRL1, T51 de CDRL2, 91E de CDRL3 y/o H92 de CDRL3. Para los fines de la presente invención, una proteína de fusión E3 contiene uno o más anticuerpos E3 y otra secuencia de aminoácidos a la que no está unida en la molécula nativa, por ejemplo, una secuencia heteróloga o una secuencia homóloga de otra región. Secuencias heterólogas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, una "marca" tal como una marca FLAG o una marca 6His. Las marcas son muy conocidas en la técnica.

Un polipéptido de fusión E3 puede crearse mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, sintéticamente o recombinantemente. Normalmente, las proteínas de fusión de E3 de la presente invención se producen preparando una que expresa un polinucleótido que las codifica usando procedimientos recombinantes descritos en este documento, aunque también pueden prepararse por otros medios conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, síntesis química.

La presente invención también proporciona composiciones que comprenden anticuerpos o polipéptidos E3 conjugados (por ejemplo, ligados) a un agente que facilita el acoplamiento a un soporte sólido (tal como biotina o avidina). Por simplicidad, generalmente se hará referencia a E3 o anticuerpos con el entendimiento de que estos procedimientos se aplican a cualquiera de las realizaciones de unión a NGF descritas en este documento. La conjugación se refiere generalmente a enlazar estos componentes como se describe en este documento. El enlace (que es generalmente fijar estos componentes en asociación próxima al menos para la administración) puede lograrse en cualquier número de formas. Por ejemplo, una reacción directa entre un agente y un anticuerpo es posible cuando cada uno posee un sustituyente que pueda reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleófilo, tal como un grupo amino o sulfhidrilo, sobre uno puede poder reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, tal como un anhídrido o un haluro de ácido, o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo saliente (por ejemplo, un haluro) sobre el otro.

Un anticuerpo o polipéptido de la presente invención puede ligarse a un agente de marcado (llamado alternativamente "marca") tal como una molécula fluorescente, una molécula radiactiva o cualquier otra marca conocida en la técnica. En la técnica se conocen marcas que generalmente proporcionan (tanto directamente como indirectamente) una señal. Por consiguiente, la invención incluye anticuerpos marcados y polipéptidos.

La capacidad de los anticuerpos y polipéptidos de la presente invención, tal como la unión a NGF; reducción o inhibición de una actividad biológica de NGF; reducción y/o bloqueo de la supervivencia inducida por NGF de neuronas trigeminales de ratón E13.5, puede probarse usando procedimientos conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en los ejemplos.

La invención también proporciona composiciones (incluyendo composiciones farmacéuticas) y kits que comprenden anticuerpo E3, y, como aclara esta divulgación, cualquiera o todos los anticuerpos y/o polipéptidos descritos en este documento.

#### *Polinucleótidos, vectores y células huésped*

La divulgación también proporciona polinucleótidos aislados que codifican los anticuerpos y polipéptidos de la invención (incluyendo un anticuerpo que comprende las secuencias de polipéptidos de las regiones variables de la cadena ligera y de la cadena pesada mostradas en las Figuras 1A y 1B), y vectores y células huésped que comprenden el polinucleótido.

Por consiguiente, la divulgación proporciona polinucleótidos (o composiciones que incluyen composiciones farmacéuticas) que comprenden polinucleótidos que codifican cualquiera de lo siguiente: (a) anticuerpo E3; (b) un fragmento o una región del anticuerpo E3; (c) una cadena ligera del anticuerpo E3 como se muestra en las Figuras 1B; (d) una cadena pesada del anticuerpo E3 como se muestra en las Figuras 1A; (e) uno o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo E3; (f) una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR) del anticuerpo E3 mostrado en las Figuras 1A y 1B; (g) CDR H3 de la cadena pesada del anticuerpo E3 mostrado en la Figura 1A; (h) CDR L3 de la cadena ligera del anticuerpo E3 mostrado en la Figura 1B; (i) tres CDR de la cadena ligera del anticuerpo E3 mostrado en la Figura 1B; (j) tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo E3 mostrado en la Figura 1A; (k) tres CDR de la cadena ligera y tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo E3 mostrado en las Figuras 1A y 1B; o (1) un anticuerpo que comprende cualquiera de (b) a (k). En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende uno cualquiera o ambos de los polinucleótidos mostrados en las Figuras 2 y 3.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un polinucleótido aislado que codifica una cadena ligera de E3 con un número de depósito de ATCC n° PTA-4893 o ATCC n° PTA-4894. En otro aspecto, la invención es un polinucleótido aislado que codifica una cadena pesada de E3 con un número de depósito de ATCC n° PTA-4895. En otro aspecto más, la divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende (a) una región variable codificada en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC n° PTA-4894 y (b) una región variable codificada en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC n° PTA-4895. En otro aspecto, la divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende (a) una o más CDR codificadas en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC n° PTA-4894; y/o (b) una o más CDR codificadas en el polinucleótido con un número de depósito de ATCC n° PTA-4895.

En otro aspecto, la divulgación proporciona polinucleótidos que codifica cualquiera de los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpos) y polipéptidos descritos en este documento. Los polinucleótidos pueden prepararse mediante procedimientos conocidos en la técnica

5 En otro aspecto, la divulgación proporciona composiciones (tal como una composición farmacéutica) que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la invención. En algunas realizaciones, la composición comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo E3 como se describe en este documento. En otra realización, la composición comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos descritos en este documento. En otras realizaciones más, la  
10 composición comprende cualquiera o ambos de los polinucleótidos mostrados en las Figuras 2 y 3. Vectores de expresión, y administración de composiciones de polinucleótidos, se describen adicionalmente en este documento.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de preparación de cualquiera de los polinucleótidos descritos en este documento.

15 Los polinucleótidos complementarios a cualquiera de tales secuencias también están englobados por la presente invención. Los polinucleótidos pueden ser monocatenarios (codificantes o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o de ARN. Las moléculas de ARN incluyen moléculas de HnARN, que contienen intrones y se corresponden con una molécula de ADN en una forma una a una, y moléculas de ARNm, que no contienen intrones. Secuencias codificantes o no codificantes adicionales pueden estar presentes, pero no se necesita, dentro de un polinucleótido de la presente invención, y un polinucleótido puede ligarse, pero no se necesita, a otras moléculas y/o materiales de soporte.

20 Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un anticuerpo o una parte del mismo) o pueden comprender una variante de una secuencia tal. Las variantes de polinucleótidos contienen una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones de forma que la inmunorreactividad del polipéptido codificado no disminuya con respecto a una molécula inmunorreactiva nativa. El efecto sobre la inmunorreactividad del polipéptido codificado puede evaluarse generalmente como se describe en  
25 este documento. Las variantes presentan preferentemente al menos aproximadamente el 70% de identidad, más preferentemente al menos aproximadamente el 80% de identidad y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 90% de identidad con una secuencia de polinucleótidos que codifica un anticuerpo nativo o una parte del mismo.

30 Dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos se dice que son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para la máxima correspondencia como se describe más adelante. Las comparaciones entre dos secuencias se realizan normalmente comparando las secuencias sobre una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencias. Una "ventana de comparación" como se usa en este documento se refiere a un segmento de al menos  
35 aproximadamente 20 posiciones contiguas, normalmente 30 a aproximadamente 75, 40 a aproximadamente 50, en la que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de alinearse óptimamente las dos secuencias.

El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación puede realizarse usando el programa Megalign en el juego Lasergene del software de bioinformática (DNASTAR, Inc., Madison, WI) usando parámetros por defecto. Este programa incorpora varios esquemas de alineamiento descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O. (1978)  
40 A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. En Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pág. 345-358; Hein J., 1990, Unified Approach for Alignment and Phylogenesis pág. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. y Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. y Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol.  
45 Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. y Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.

Preferentemente, el "porcentaje de identidad de secuencias" se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación de al menos 20 posiciones en la que la porción de la secuencia de  
50 polinucleótidos o polipéptidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos, normalmente del 5 al 15 por ciento, o del 10 al 12 por ciento, con respecto a las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones o deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en el que las bases de ácido nucleico idénticas o residuo de aminoácido se producen en ambas secuencias para dar el número de posiciones apareadas,  
55 dividiendo el número de posiciones apareadas entre el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando los resultados por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencias.

Por tanto, o alternativamente, las variantes pueden ser sustancialmente homólogas a un gen nativo, o una parte o complemento del mismo. Tales variantes de polinucleótidos pueden hibridarse bajo condiciones moderadamente

rigurosas con una secuencia de ADN que se produce naturalmente que codifica un anticuerpo nativo (o una secuencia complementaria).

5 "Condiciones moderadamente rigurosas" adecuadas incluyen prelavado en una disolución de 5 X SSC, 0,5% de SDS, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); hibridación a 50°C-65°C, 5 X SSC, durante la noche; seguido de lavado dos veces a 65°C durante 20 minutos con cada uno de 2X, 0,5X y 0,2X SSC que contiene 0,1% de SDS.

10 Como se usa en este documento, "condiciones altamente rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad" son aquellas que: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo cloruro sódico 0,015 M / citrato de sodio 0,0015 M / 0,1% de dodecilsulfato de sodio a 50°C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizante tal como formamida, por ejemplo, 50% (v/v) de formamida con 0,1% de albúmina de suero bovino / 0,1% de Ficoll / 0,1% de polivinilpirrolidona / tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42°C; o (3) emplean 50% de formamida, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato de sodio, 5 x disolución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), 0,1% de SDS y 10% de sulfato de dextrano a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato de sodio) y 50% de formamida a 55°C, seguido de un lavado a alta rigurosidad que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C. El experto reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. según sea necesario para acomodar factores tales como la longitud de sonda y similares.

20 Se apreciará por aquellos expertos en la materia que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido como se describe en este documento. Algunos de estos polinucleótidos poseen homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. Sin embargo, los polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso de codones son específicamente contemplados por la presente invención. Además, dentro del alcance de la presente invención se proporcionan alelos de los genes que comprenden las secuencias de polinucleótidos en este documento. Los alelos son genes endógenos que están alterados como resultado de una o más mutaciones, tales como deleciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El ARNm resultante y la proteína pueden tener, pero no necesitan, una estructura o función alterada. Los alelos pueden identificarse usando técnicas convencionales (tales como hibridación, amplificación y/o comparación de secuencias de bases de datos).

25 Los polinucleótidos de la presente invención pueden obtenerse usando síntesis química, procedimientos recombinantes o PCR. Los procedimientos de síntesis química de polinucleótidos son muy conocidos en la técnica y no necesitan describirse en detalle en este documento. Un experto en la materia puede usar las secuencias proporcionadas en este documento y un sintetizador de ADN comercial para producir una secuencia de ADN deseada.

30 Para preparar polinucleótidos usando procedimientos recombinantes, un polinucleótido que comprende una secuencia deseada puede insertarse en un vector adecuado, y el vector puede introducirse a su vez en una célula huésped adecuada para la replicación y amplificación, como se trata adicionalmente en este documento. Los polinucleótidos pueden insertarse en células huésped mediante cualquier medio conocidos en la técnica. Las células se transforman introduciendo un polinucleótido exógeno por captación directa, endocitosis, transfección, apareamiento F o electroporación. Una vez introducido, el polinucleótido exógeno puede mantenerse dentro de la célula como un vector no integrado (tal como un plásmido) o integrarse en el genoma de la célula huésped. El polinucleótido así amplificado puede aislarse de la célula huésped mediante procedimientos muy conocidos dentro de la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook y col. (1989).

35 Alternativamente, la PCR permite la reproducción de secuencias de ADN. La tecnología de PCR es muy conocida en la técnica y se describe en las patentes de EE.UU. n° 4.683.195, 4.800.159, 4.754.065 y 4.683.202, además de PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis y col. eds., Birkauwer Press, Boston (1994).

40 El ARN puede obtenerse usando el ADN aislado en un vector apropiado e insertándolo en una célula huésped adecuada. Cuando la célula se replica y el ADN se transcribe en ARN, el ARN puede entonces aislarse usando procedimientos muy conocidos para aquellos expertos en la materia como se exponen, por ejemplo, en Sambrook y col., (1989).

45 Pueden construirse vectores de clonación adecuados según técnicas convencionales, o pueden seleccionarse de un gran número de vectores de clonación disponibles en la materia. Aunque el vector de clonación seleccionado puede variar según la célula huésped prevista que vaya a usarse, vectores de clonación útiles tendrán generalmente la capacidad para auto-replicarse, pueden poseer una única diana para una endonucleasa de restricción particular y/o pueden llevar genes para un marcador que puede usarse en la selección de clones que contienen el vector. Ejemplos adecuados incluyen plásmidos y virus bacterianos, por ejemplo, pUC18, pUC19, Bluescript (por ejemplo, pBS SK+) y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ADN de fago, y vectores lanzadera tales como pSA3 y pAT28. Estos y muchos otros vectores de clonación están disponibles de vendedores comerciales tales como BioRad, Strategene e Invitrogen.

50 Los vectores de expresión son generalmente construcciones de polinucleótidos replicables que contienen un polinucleótido según la invención. Se supone que un vector de expresión debe ser replicable en las células huésped

tanto como episomas como una parte integral del ADN cromosómico. Vectores de expresión adecuados incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, vectores víricos que incluyen adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, cósmidos y vector(es) de expresión desvelados en la publicación PCT n° WO 87/04462. Los componentes de vector pueden incluir generalmente, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal; un origen de replicación; uno o más genes marcadores; elementos de control de la transcripción adecuados (tales como promotores, potenciadores y terminador). Para la expresión (es decir, traducción) también se requieren normalmente uno o más elementos de control de la traducción, tal como sitios de unión de ribosoma, sitios de iniciación de la traducción y codones de terminación.

Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés pueden introducirse en la célula huésped por distintos medios apropiados que incluyen electroporación, transfección empleando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano u otras sustancias; bombardeo con microproyectiles; lipofección; e infección (por ejemplo, si el vector es un agente infeccioso tal como el virus de la variolovacuna). La elección de introducir vectores o polinucleótidos dependerá frecuentemente de las características de la célula huésped.

La divulgación también proporciona células huésped que comprenden cualquiera de los polinucleótidos descritos en este documento. Cualquier célula huésped que pueda expresar en exceso de ADN heterólogo puede usarse con el fin de aislar los genes que codifican el anticuerpo, polipéptido o proteína de interés. Ejemplos no limitantes de células huésped de mamífero incluyen, pero no se limitan a, células COS, HeLa y CHO. Véase también la publicación PCT n° WO 87/04462. Células huésped de no mamífero adecuadas incluyen procariontes (tales como *E. coli* o *B. subtilis*) y levadura (tales como *S. cerevisiae*, *S. pombe*; o *K. lactis*). Preferentemente, las células huésped expresan los ADNc a un nivel de aproximadamente 5 veces superior, más preferentemente 10 veces superior, incluso más preferentemente 20 veces superior al del anticuerpo endógeno correspondiente o proteína de interés, si está presente en las células huésped. El cribado de las células huésped para una unión específica a NGF se efectúa por un inmunoensayo o FACS. Puede identificarse una célula que expresa en exceso el anticuerpo o proteína de interés.

#### *Procedimientos usando E3 y anticuerpos derivados de E3*

El anticuerpo E3 que se une a NGF puede usarse para identificar o detectar la presencia o ausencia de NGF. Por simplicidad, generalmente se hará referencia a E3 o anticuerpos con el entendimiento de que estos procedimientos se aplican a cualquiera de las realizaciones de unión a NGF (tal como polipéptidos) descritas en este documento. La detección implica generalmente poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo descrito en este documento que se une a NGF y formación de un complejo entre NGF y un anticuerpo (por ejemplo, E3) que se une específicamente a NGF. La formación de un complejo tal puede ser *in vitro* o *in vivo*. El término "detección" como se usa en este documento incluye detección cualitativa y/o cuantitativa (niveles de medición) con o sin referencia a un control.

Puede usarse cualquiera de una variedad de procedimientos conocidos para la detección que incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayo, usando anticuerpo que se une al polipéptido, por ejemplo, por enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y similares; y ensayo funcional para el polipéptido codificado, por ejemplo, actividad de unión o ensayo enzimático. En algunas realizaciones, el anticuerpo está detectablemente marcado.

#### *Usos de diagnóstico de E3 y derivados*

Los anticuerpos y polipéptidos de la divulgación pueden usarse en la detección, diagnóstico y monitorización de una enfermedad, afección o trastorno asociado a expresión de NGF alterada o anómala (en algunas realizaciones, aumento o disminución de la expresión de NGF (con respecto a una muestra normal) y/o expresión inapropiada, tal como presencia de la expresión en tejido(s) y/o célula(s) que normalmente carecen de expresión de NGF, o ausencia de expresión de NGF en tejido(s) o célula(s) que normalmente poseen expresión de NGF). Los anticuerpos y polipéptidos de la divulgación son adicionalmente útiles para la detección de expresión de NGF, por ejemplo, en una enfermedad asociada a sensibilidad alterada o anómala o sensibilidad a NGF. En algunas realizaciones, la expresión de NGF se detecta en una muestra de un individuo del que se sospecha que tiene una enfermedad, trastorno que se caracteriza por o asociado a una sensibilidad alterada o anómala o sensibilidad a la expresión de NGF (por ejemplo, un cáncer en el que NGF promueve el crecimiento y/o metástasis).

Por tanto, en algunas realizaciones, la divulgación proporciona procedimientos que comprenden poner en contacto un espécimen (muestra) de un individuo del que se sospecha que tiene expresión de NGF alterada o anómala con un anticuerpo o polipéptido de la invención y determinar si el nivel de NGF se diferencia del de un espécimen de control o de comparación. En algunas realizaciones, el individuo tiene una arritmia cardíaca, enfermedad de Alzheimer y/o disfunción autonómica.

En otras realizaciones, la divulgación proporciona procedimientos que comprenden poner en contacto un espécimen (muestra) de un individuo y determinar el nivel de expresión de NGF. En algunas realizaciones, el individuo es del que se sospecha que tiene una enfermedad, trastorno que se caracteriza por o asociado a una sensibilidad alterada o anómala o sensibilidad a la expresión de NGF. En algunas realizaciones, el individuo tiene cáncer de pulmón de

células pequeñas, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma de ovario, carcinoma hepatocelular o melanoma.

5 Para aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo normalmente se marcará con un resto detectable que incluye, pero no se limita a, radioisótopos, marcas fluorescentes y diversas marcas de enzima-sustrato. Los procedimientos de conjugación de marcas con un anticuerpo se conocen en la técnica. En otras realizaciones de la invención, los anticuerpos de la invención no necesitan marcarse, y la presencia de los mismos puede detectarse usando un anticuerpo marcado que se une a los anticuerpos de la invención.

10 Los anticuerpos de la presente invención pueden emplearse en cualquier procedimiento de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pág. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

Los anticuerpos también pueden usarse para ensayos de diagnóstico *in vivo*, tales como obtención de imágenes *in vivo*. Generalmente, el anticuerpo está marcado con un radionúclido (tal como  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$  o  $^3\text{H}$ ), de manera que las células o tejido de interés puedan localizarse usando inmunoescintigrafía.

15 El anticuerpo también puede usarse como reactivo de tinción en patología, siguiendo técnicas muy conocidas en la técnica.

#### *Procedimientos de uso de E3 y derivados para fines terapéuticos*

20 El anticuerpo E3 es útil para reducir y/o bloquear la actividad biológica de NGF. Se cree que esta actividad antagonista es útil en el tratamiento de afecciones patológicas asociadas a la producción de NGF endógeno, tal como dolor. Generalmente, en estas realizaciones, una cantidad eficaz se administra a un individuo. Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de antagonizar actividad biológica de NGF humano usando cualquiera de los polipéptidos (incluyendo anticuerpos tales como el anticuerpo E3) desvelados en este documento. En una realización, el procedimiento comprende poner en contacto factor de crecimiento nervioso humano con cualquiera de los polipéptidos (incluyendo el anticuerpo E3) descritos en este documento, por lo que la actividad del factor de crecimiento nervioso humano es antagonizada, reducida, bloqueada o suprimida. En otra realización más, a un individuo con dolor (tal como dolor posquirúrgico, o dolor por artritis reumatoide) se le administra tratamiento con E3.

Por simplicidad, generalmente se hará referencia a E3 o anticuerpo con el entendimiento de que estos procedimientos se aplican a cualquiera de los anticuerpos y polipéptidos de variante E3 descritos en este documento.

30 Para la administración pueden usarse diversas formulaciones de E3 o fragmentos de E3 (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fc, etc.), tal como monocatenarios (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo y cualquier otra configuración modificada de E3 que comprenda un sitio de reconocimiento de NGF de antígeno de la especificidad requerida. En algunas realizaciones, los anticuerpos E3 o diversas formulaciones de E3 de los mismos pueden administrarse puros. En otras realizaciones se administran E3 o diversas formulaciones de E3 (incluyendo cualquier realización de composición descrita en este documento) de los mismos y un excipiente farmacéuticamente aceptable, y pueden estar en diversas formulaciones. Excipientes farmacéuticamente aceptables se conocen en la técnica, y son sustancias relativamente inertes que facilitan la administración de una sustancia farmacológicamente eficaz. Por ejemplo, un excipiente puede dar forma o consistencia, o actuar de diluyente. Excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, agentes estabilizantes, agentes humectantes y emulsionantes, sales para variar la osmolaridad, agentes de encapsulamiento, tampones y promotores de la penetración de la piel. Excipientes, además de formulaciones para la administración de fármaco parenteral y no parenteral, se exponen en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20<sup>a</sup> ed. Mack Publishing (2000).

45 En algunas realizaciones, estos agentes se formulan para administración por inyección (por ejemplo, intraperitonealmente, intravenosamente, subcutáneamente, intramuscularmente, etc.), aunque también pueden usarse otras formas de administración (por ejemplo, oral, mucosa, por inhalación, sublingualmente, etc.). Por consiguiente, el anticuerpo E3 y equivalentes del mismo se combinan preferentemente con vehículos farmacéuticamente aceptables tales como solución salina, disolución de Ringer, disolución de dextrosa y similares. La pauta de dosificación particular, es decir, dosis, momento adecuado y repetición, dependerá del individuo particular y la historia médica de ese individuo. Generalmente puede usarse cualquiera de las siguientes dosis: una dosis de al menos aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 750 µg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 500 µg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 250 µg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 100 µg /kg de peso corporal; al menos aproximadamente 50 µg /kg de peso corporal; al menos aproximadamente 10 µg /kg de peso corporal; se administra al menos aproximadamente 1 µg/kg de peso corporal, o menos. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento es sostenido hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Una pauta de dosificación a modo de ejemplo comprende

5 administrar una dosis inicial de aproximadamente 2 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 1 mg/kg del anticuerpo anti-NGF, o seguido de una dosis de mantenimiento de aproximadamente 1 mg/kg cada dos semanas. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación, dependiendo del patrón de descomposición farmacocinética que desee lograr el médico. Consideraciones empíricas, tales como la semivida, contribuirán generalmente a la determinación de la dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

10 En algunos individuos puede requerirse más de una dosis. La frecuencia de administración puede determinarse y ajustarse durante el transcurso de la terapia. Por ejemplo, la frecuencia de administración puede determinarse o ajustarse basándose en el tipo y la gravedad del dolor que va a tratarse, si el agente se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al agente, y la discreción del médico adjunto. Normalmente, el profesional clínico administrará un anticuerpo antagonista anti-NGF (tal como E3) hasta que se alcance una dosificación que logre el resultado deseado. En algunos casos pueden ser apropiadas formulaciones de liberación continua de anticuerpos E3. En la técnica se conocen diversas formulaciones y dispositivos para lograr la liberación sostenida.

15 En una realización, las dosificaciones para los anticuerpos E3 (o polipéptidos) pueden determinarse empíricamente en individuos a los que se les ha administrado una o más administraciones. A los individuos se les administran dosificaciones incrementales de E3. Para evaluar la eficacia de E3 u otro anticuerpo equivalente pueden monitorizarse marcadores de los síntomas de enfermedad (tal como dolor).

20 La administración de un anticuerpo (tal como E3) o polipéptido según la presente invención puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, de la afección fisiológica del receptor, si el fin de la administración es terapéutico o profiláctico, y otros factores conocidos para médicos expertos. La administración de un anticuerpo puede ser esencialmente continua durante un periodo de tiempo preseleccionado o puede ser en una serie de dosis espaciadas, por ejemplo, tanto antes, durante o después de desarrollar dolor, antes, durante, antes y después, durante y después como antes, durante y después de desarrollar dolor. La administración puede ser antes, durante y/o después de la herida, incisión, traumatismo, cirugía, y cualquier otro acontecimiento que probablemente dé lugar a dolor posquirúrgico.

25 Otras formulaciones incluyen formas de administración adecuadas conocidas en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, vehículos tales como liposomas. Véase, por ejemplo, Mahato y col. (1997) Pharm. Res. 14:853-859. Las preparaciones liposómicas incluyen, pero no se limitan a, citofectinas, vesículas multilaminares y vesículas unilaminares.

30 En algunas realizaciones, más de un anticuerpo o polipéptido puede estar presente. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Tales composiciones pueden contener al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco anticuerpos diferentes. Una mezcla de anticuerpos, como se denota frecuentemente en la materia, puede ser particularmente útil en el tratamiento de un intervalo más amplio de población de individuos.

35 Un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos de la invención (tal como el anticuerpo E3) también puede usarse para la administración y expresión de cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos de la invención (tal como el anticuerpo E3) en una célula deseada. Es evidente que un vector de expresión puede usarse para dirigir la expresión de un anticuerpo o polipéptido E3. El vector de expresión puede administrarse mediante cualquier medio conocido en la técnica, tal como intraperitonealmente, intravenosamente, intramuscularmente, subcutáneamente, intratecalmente, intraventricularmente, por vía oral, enteralmente, parenteralmente, intranasalmente, dérmicamente, sublingualmente, o por inhalación. Por ejemplo, la administración de vectores de expresión incluye administración local o sistémica, que incluye inyección, administración por vía oral, pistola de partículas o administración cateterizada, y administración tópica. Un experto en la materia está familiarizado con la administración de vectores de expresión para obtener la expresión de una proteína exógena *in vivo*. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 6.436.908; 6.413.942; y 6.376.471.

45 También puede usarse la administración elegida como diana de composiciones terapéuticas que comprenden un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos de la invención (tal como el anticuerpo E3). Las técnicas de administración de ADN mediada por receptor se describen en, por ejemplo, Findees Y col., Trends Biotechnol. (1993) 11:202; Chiou y col., Gene Therapeutics: Methods And Applications of Direct Gene Transfer (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu y col., J. Biol. Chem. (1988) 263:621; Wu y col., J. Biol. Chem. (1994) 269:542; Zenke y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1990) 87:3655; Wu y col., J. Biol. Chem. (1991) 266:338. Las composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido se administran en un intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para la administración local en un protocolo de terapia génica. También pueden usarse intervalos de concentración de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg, aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg y aproximadamente 20 µg a aproximadamente 100 µg de ADN durante un protocolo de terapia génica. Los polinucleótidos y polipéptidos terapéuticos de la presente invención pueden administrarse usando vehículos de administración génica. El vehículo de administración génica puede ser de origen vírico o no vírico (véase generalmente, Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1:51; Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5:845; Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1:185; y Kapliitt, Nature Genetics (1994) 6:148). La expresión de tales secuencias codificantes puede inducirse usando promotores

de mamífero endógenos o heterólogos. La expresión de la secuencia codificante puede ser tanto constitutiva como regulada.

Los vectores basados en víricos para la administración de un polinucleótido deseado y la expresión en una célula deseada son muy conocidos en la técnica. Vehículos basados en víricos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, retrovirus recombinantes (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT n° WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; las patentes de EE.UU. n° 5.219.740; 4.777.127; la patente de GB n° 2.200.651; y la patente EP n° 0 345 242), vectores basados en alfa-virus (por ejemplo, vectores del virus Sindbis, virus del bosque Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), virus del río Ross (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) y virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)) y vectores de virus adenoasociados (AAV) (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT n° WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 y WO 95/00655). También puede emplearse la administración de ADN ligado a adenovirus muertos como se describe en Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147.

También pueden emplearse vehículos y procedimientos de administración no vírica que incluyen, pero no se limitan a, ADN condensado policatiónico ligado o sin ligar a adenovirus muerto solo (véase, por ejemplo, Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147); ADN ligado de ligando (véase, por ejemplo, Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985); células vehículo de administración de células eucariotas (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.814.482; publicaciones PCT n° WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; y WO 97/42338) y neutralización o fusión de carga nucleica con membranas celulares. También puede emplearse ADN desnudo. Los procedimientos de introducción de ADN desnudo a modo de ejemplo se describen en la publicación PCT n° WO 90/11092 y la patente de EE.UU. n° 5.580.859. Los liposomas que pueden actuar de vehículos de administración de genes se describen en la patente de EE.UU. n° 5.422.120; publicaciones PCT n° WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; y la patente EP n° 0 524 968. Enfoques adicionales se describen en Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14:2411 y en Wdisendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:1581.

Con respecto a todos los procedimientos descritos en este documento, la referencia a anticuerpos antagonista anti-NGF también incluye composiciones que comprenden uno o más de estos agentes. Estas composiciones pueden comprender adicionalmente excipientes adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyen tampones, que son muy conocidos en la técnica. La presente invención puede usarse sola o en combinación con otros procedimientos convencionales de tratamiento.

### **Uso de un anticuerpo antagonista anti-NGF para mejorar la rigidez**

La invención proporciona el uso de un anticuerpo antagonista anti-NGF en la preparación de un medicamento para mejorar la rigidez en un individuo que tiene osteoartritis. La invención proporciona además un anticuerpo antagonista anti-NGF para su uso en mejorar la rigidez en un individuo que tiene osteoartritis.

La divulgación también proporciona procedimientos para tratar y/o prevenir dolor por osteoartritis en individuos que incluyen mamíferos, tanto humanos como no humanos. Por consiguiente, la divulgación proporciona procedimientos para tratar dolor por osteoartritis en un individuo que comprenden administrar una cantidad eficaz de un antagonista de NGF (tal como un anticuerpo antagonista anti-NGF). Los antagonistas de NGF, que incluye anticuerpos antagonista anti-NGF, se conocen en la técnica y se describen en este documento.

En otro aspecto, la divulgación proporciona procedimientos para reducir la incidencia de, mejorar, suprimir, paliar y/o retrasar la aparición, el desarrollo o la progresión de dolor por osteoartritis en un individuo que comprenden administrar una cantidad eficaz de un antagonista de NGF (tal como un anticuerpo antagonista anti-NGF). Por tanto, en algunas realizaciones, el antagonista de NGF (tal como el anticuerpo antagonista anti-NGF) se administra antes del desarrollo de dolor o un episodio de dolor en un individuo que tiene osteoartritis.

El diagnóstico o la evaluación de dolor por osteoartritis está bien establecido en la materia. La evaluación puede realizarse basándose en medidas conocidas en la técnica, tales como caracterización del dolor del paciente usando diversas escalas de dolor. Véase, por ejemplo, Katz y col., Surg Clin North Am. (1999) 79 (2):231-52; Caraceni y col. J Pain Symptom Manage (2002) 23(3):239-55. Por ejemplo, puede emplearse la escala de dolor a la deambulación de WOMAC (que incluye dolor, rigidez y función física) y la escala de análogos visuales a 100 mm (VAS) para evaluar el dolor y evaluar la respuesta al tratamiento.

Los antagonistas de NGF (tal como un anticuerpo antagonista anti-NGF) pueden administrarse a un individuo por cualquier vía adecuada. Ejemplos de diferentes vías de administración se describen en este documento.

En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF se administra una vez cada semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada siete semanas, una vez cada ocho semanas, una vez cada nueve semanas, una vez cada diez semanas, una vez cada quince semanas, una vez cada veinte semanas, una vez cada veinticinco semanas, o una vez cada veintiséis semanas. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF se administra una vez cada mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada cuatro meses, una vez cada cinco meses, o una vez cada seis meses.

El alivio del dolor puede caracterizarse por el transcurso de tiempo del alivio. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el alivio del dolor se observa en el plazo de aproximadamente 24 horas después de la administración de un antagonista de NGF (tal como un anticuerpo antagonista anti-NGF). En otras realizaciones, el alivio del dolor se observa en el plazo de aproximadamente 36, 48, 60, 72 horas o 4 días después de la administración del antagonista de NGF (tal como el anticuerpo antagonista anti-NGF). En algunas realizaciones, la frecuencia y/o intensidad de dolor disminuye, y/o aumenta la calidad de vida de aquellos que padecen la enfermedad. En algunas realizaciones, el alivio del dolor para osteoartritis se proporciona durante la duración de al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 28 días, al menos aproximadamente 35 días, al menos aproximadamente 42 días, al menos aproximadamente 49 días, al menos aproximadamente 56 días, al menos aproximadamente 63 días, al menos aproximadamente 70 días, al menos aproximadamente 77 días, al menos aproximadamente 84 días, al menos aproximadamente 180 días, o más después de una dosis única del antagonista de NGF (tal como el anticuerpo antagonista anti-NGF).

La preparación y el uso de antagonistas de NGF (incluyendo anticuerpos anti-NGF) para estos procedimientos se describen en secciones más adelante (“Antagonistas de NGF”, “Anticuerpo antagonista anti-NGF”; “Otros antagonistas de NGF”; “Identificación de antagonistas de NGF (tal como anticuerpos antagonista anti-NGF)”; “Composiciones para su uso en los procedimientos de la invención”; “Administración de un antagonista de NGF (tal como un anticuerpo antagonista anti-NGF)”).

#### Antagonistas de NGF

La invención se refiere a anticuerpos antagonista anti-NGF como antagonistas de NGF. Otros antagonistas de NGF que se refieren a cualquier molécula que bloquea, suprime o reduce (incluyendo significativamente) la actividad biológica de NGF, que incluye rutas en la dirección 3' mediadas por la señalización de NGF, tal como unión a receptor y/o provocación de una respuesta celular a NGF, se desvelan para fines comparativos. El término “antagonista” implica mecanismo no específico de acción biológica sea cual fuere, y se considera que incluye y engloba expresamente todas las posibles interacciones farmacológicas, fisiológicas y bioquímicas con NGF y sus consecuencias que pueden lograrse mediante una variedad de composiciones diferentes, y químicamente divergentes. Antagonistas de NGF a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo anti-NGF, una molécula antisentido dirigida a NGF (incluyendo una molécula antisentido dirigida a un ácido nucleico que codifica NGF), una molécula antisentido dirigida a un receptor de NGF (tal como el receptor TrkA y/o el receptor p75) (incluyendo una molécula antisentido dirigida a un ácido nucleico que codifica TrkA y/o p75), un compuesto inhibidor de NGF, un análogo estructural de NGF, una mutación negativa dominante de un receptor TrkA que se une a un NGF, una inmunoadhesina de TrkA, un anticuerpo anti-TrkA, una mutación negativa dominante de un receptor p75 que se une a un NGF, un anticuerpo anti-p75 y un inhibidor de cinasas. Para el fin de la presente invención, se entenderá explícitamente que el término “antagonista” engloba todos los términos, títulos y estados funcionales previamente identificados y las características por las cuales el propio NGF, una actividad biológica de NGF (incluyendo, pero no se limita a, su capacidad para mediar en cualquier aspecto de dolor) o las consecuencias de la actividad biológica, son sustancialmente anulados, disminuidos o neutralizados en cualquier grado significativo. En algunas realizaciones, un antagonista de NGF (por ejemplo, un anticuerpo) se une (interactúa físicamente con) a NGF, se une a un receptor de NGF (tal como el receptor TrkA y/o el receptor p75) y/o reduce (impide y/o bloquea) la señalización del receptor de NGF en la dirección 3'. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un antagonista de NGF se une (interactúa físicamente con) a NGF. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF es un polipéptido que se une a NGF. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF es un péptido o un péptido modificado (tal como péptido de unión a NGF fusionado con un dominio Fc) descrito en el documento PCT WO 2004/026329. En otra realización, un antagonista de NGF se une a un receptor de NGF (tal como el receptor trkA o p75). En otras realizaciones, un antagonista de NGF reduce (impide y/o bloquea) la señalización del receptor de NGF en la dirección 3' (por ejemplo, inhibidores de la señalización de cinasas). En otras realizaciones, un antagonista de NGF inhibe (reduce) la síntesis y/o liberación de NGF. En otra realización, el antagonista de NGF es un antagonista de NGF que no es una inmunoadhesina de TrkA (es decir, es distinta de una inmunoadhesina de TrkA). En otra realización, el antagonista de NGF es distinto de un anticuerpo anti-NGF. En otra realización, el antagonista de NGF es distinto de una inmunoadhesina de TrkA y distinto de un anticuerpo anti-NGF. En alguna realización, el antagonista de NGF se une a NGF (tal como hNGF) y no se une significativamente a neurotrofinas relacionadas, tales como NT-3, NT4/5 y/o BDNF. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF no está asociado a una respuesta inmunitaria adversa. En otras realizaciones, el antagonista de NGF es un anticuerpo anti-NGF. En otras realizaciones más, el anticuerpo anti-NGF es humanizado (tal como el anticuerpo E3 descrito en este documento). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF es el anticuerpo E3 (como se describe en este documento). En otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF comprende una o más CDR del anticuerpo E3 (tal como una, dos, tres, cuatro, cinco o, en algunas realizaciones, seis CDR de E3). En otras realizaciones, el anticuerpo es humano. En otras realizaciones más, el anticuerpo anti-NGF comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada mostrada en la Figura 1A (SEC ID N°: 1) y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera mostrada en la Figura 1B (SEC ID N°: 2). En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende una región constante modificada tal como una región constante que es inmunológicamente inerte, por ejemplo, no desencadena lisis mediada por el complemento, o no estimula la citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC). En otras realizaciones, la región constante se modifica como se describe en Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624; solicitud PCT n° PCT/GB99/01441; y/o solicitud de patente UK n° 9809951.8.

Anticuerpo antagonista anti-NGF

Los usos médicos de la invención usan un anticuerpo antagonista anti-NGF, que se refiere a cualquier molécula de anticuerpo que bloquea, suprime o reduce (incluyendo significativamente) la actividad biológica de NGF, que incluye rutas en la dirección 3' mediadas por la señalización de NGF, tal como unión a receptor y/o provocación de una respuesta celular a NGF.

Un anticuerpo antagonista anti-NGF debería presentar una cualquiera o más de las siguientes características: (a) se unen a NGF e inhiben la actividad biológica de NGF o rutas en la dirección 3' mediadas por la función de señalización de NGF; (b) previenen, mejoran o tratan cualquier aspecto de dolor por artritis reumatoide o dolor por osteoartritis; (c) bloquean o disminuyen la activación de receptores de NGF (incluyendo la dimerización y/o autofosforilación del receptor TrkA); (d) aumentan la eliminación de NGF; (e) inhiben (reducen) la síntesis, producción o liberación de NGF. Los anticuerpos antagonista anti-NGF se conocen en la técnica, véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT nº WO 01/78698, WO 01/64247, las patentes de EE.UU. nº 5.844.092, 5.877.016 y 6.153.189; Hongo y col., *Hybridoma*, 19:215-227 (2000); *Cell. Molec. Biol.* 13:559-568 (1993); nº de acceso de GenBank U39608, U39609, L17078 o L17077. Los anticuerpos antagonista anti-NGF y polipéptidos también se describen en el documento PCT WO 2005/019266.

Para los fines de la presente invención, el anticuerpo reacciona con NGF de un modo tal que inhibe NGF y/o rutas en la dirección 3' mediadas por la función de señalización de NGF. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF reconoce NGF humano. En otras realizaciones más, el anticuerpo antagonista anti-NGF se une específicamente a NGF humano. En alguna realización, el anticuerpo antagonista anti-NGF no se une significativamente a neurotrofinas relacionadas, tales como NT-3, NT4/5 y/o BDNF. En otras realizaciones más, el anticuerpo anti-NGF puede unirse a NGF e inhibir eficazmente la unión de NGF a su receptor TrkA y/o p75 *in vivo* y/o inhibir eficazmente que NGF active su receptor TrkA y/o p75. En otras realizaciones más, el anticuerpo antagonista anti-NGF es un anticuerpo monoclonal. En otras realizaciones más, el anticuerpo anti-NGF es humanizado (tal como el anticuerpo E3 descrito en este documento). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF es humano. Véase, por ejemplo, el documento WO 2005/019266. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano que reconoce uno o más epítopes sobre NGF humano. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de ratón o de rata que reconoce uno o más epítopes sobre NGF humano. En otra realización, el anticuerpo reconoce uno o más epítopes sobre un NGF seleccionado del grupo que consiste en: primate, canino, felino, equino y bovino. En otras realizaciones más, el anticuerpo antagonista anti-NGF se une esencialmente al mismo epítipo de NGF 6 que un anticuerpo seleccionado de uno cualquiera o más de los siguientes: MAb 911, MAb 912 y MAb 938 (Véase Hongo y col., *Hybridoma* 19:215-227 (2000)). En otras realizaciones, el anticuerpo se une al mismo epítipo que Mab 911. En otra realización, el anticuerpo comprende una región constante que es inmunológicamente inerte (por ejemplo, no desencadena lisis mediada por el complemento o citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC)). La actividad de ADCC puede evaluarse usando procedimientos desvelados en la patente de EE.UU. nº 5.500.362. En algunas realizaciones, la región constante se modifica como se describe en *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624; publicación PCT nº WO1999/058572.

En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF es un anticuerpo monoclonal anti-NGF de ratón humanizado llamado anticuerpo "E3", cualquiera de los anticuerpos relacionados con E3 descritos en este documento o cualquier fragmento del mismo, que son antagonistas de NGF.

Los anticuerpos útiles en la presente invención pueden englobar anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos heteroconjugados, monocatenarios (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos humanizados y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida, que incluye variantes de glicosilación de anticuerpos, variantes de secuencias de aminoácidos de anticuerpos y anticuerpos covalentemente modificados. Los anticuerpos pueden ser murinos, de rata, humanos o de cualquier otro origen (incluyendo anticuerpos quiméricos o humanizados).

La afinidad de unión de un anticuerpo antagonista anti-NGF por NGF (tal como hNGF) puede ser aproximadamente 0,10 a aproximadamente 0,80 nM, aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,75 nM y aproximadamente 0,18 a aproximadamente 0,72 nM. En una realización, la afinidad de unión es entre aproximadamente 2 pM y 22 pM. En una realización, la afinidad de unión es entre aproximadamente 23 pM y aproximadamente 100 pM. En alguna realización, la afinidad de unión es aproximadamente 10 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es inferior a aproximadamente 10 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es aproximadamente 0,1 nM o aproximadamente 0,07 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es inferior a aproximadamente 0,1 nM o inferior a aproximadamente 0,07 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es cualquiera de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, o aproximadamente 50 pM a cualquiera de aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM, o aproximadamente 40 pM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es cualquiera de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, o aproximadamente 50 pM, o inferior a aproximadamente 50 pM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es

inferior a cualquiera de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, o aproximadamente 50 pM. En otras realizaciones más, la afinidad de unión es aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 40 pM, o superior a aproximadamente 40 pM.

Una forma de determinar la afinidad de unión de anticuerpos por NGF es midiendo la afinidad de unión de fragmentos monofuncionales Fab del anticuerpo. Para obtener fragmentos monofuncionales Fab, un anticuerpo (por ejemplo, IgG) puede escindirse con papaína o expresarse recombinantemente. La afinidad de un fragmento Fab anti-NGF de un anticuerpo puede determinarse por resonancia de plasmones superficiales (sistema de resonancia de plasmones superficiales (SPR) BIAcore3000™, BIAcore, INC, Piscaway NJ). Los chips CM5 pueden activarse con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del proveedor. El NGF humano (o cualquier otro NGF) puede diluirse en acetato sódico 10 mM a pH 4,0 e inyectarse sobre el chip activado a una concentración de 0,005 mg/ml. Usando tiempo de flujo variable a través de los canales del chip individuales pueden lograrse dos intervalos de densidad de antígeno: 100-200 unidades de respuesta (UR) para estudios cinéticos detallados y 500-600 UR para ensayos de cribado. El chip puede bloquearse con etanolamina. Los estudios de regeneración han mostrado que una mezcla de tampón de elución Pierce (producto nº 21004, Pierce Biotechnology, Rockford IL) y NaCl 4 M (2:1) elimina eficazmente el Fab unido, a la vez que mantiene la actividad de hNGF sobre el chip durante más de 200 inyecciones. El tampón HB S-EP (HEPES 0,01M, pH 7,4, NaCl 0,15, EDTA 3 mM, 0,005% de tensioactivo P29) se usa como tampón de electroforesis para los ensayos BIAcore. Las diluciones seriadas (0,1-10x  $K_D$  estimada) de muestras de Fab purificadas se inyectan durante 1 min a 100  $\mu$ l/min y se permiten tiempos de disociación de hasta 2 h. Las concentraciones de las proteínas de Fab se determinan por ELISA y/o electroforesis en SDS-PAGE usando un Fab de concentración conocida (como se determina por el análisis de aminoácidos) como un patrón. Las constantes de asociación ( $k_{as}$ ) y las constantes de disociación ( $k_{dis}$ ) cinéticas se obtienen simultáneamente ajustando los datos a un modelo de unión 1:1 de Langmuir (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6. 99-110) usando el programa BIAevaluation. Los valores de la constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) se calculan como  $k_{dis}/k_{as}$ . Este protocolo es adecuado para su uso en la determinación de la afinidad de unión de un anticuerpo con cualquier NGF, que incluye NGF humano, NGF de otro vertebrado (en algunas realizaciones, mamífero) (tal como NGF de ratón, NGF de rata, NGF de primate), además de para su uso con otras neurotrofinas, tales como las neurotrofinas relacionadas NT3, NT4/5 y/o BDNF.

En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a NGF humano, y no se une significativamente a un NGF de otra especie de vertebrado (en alguna realización, mamífero). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a NGF humano, además de a uno o más NGF de otra especie de vertebrado (en algunas realizaciones, mamífero). En otras realizaciones más, el anticuerpo se une a NGF y no reacciona significativamente de forma cruzada con otras neurotrofinas (tal como las neurotrofinas relacionadas NT3, NT4/5 y/o BDNF). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a NGF, además de a al menos otra neurotrofina. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a especies de mamífero de NGF, tales como caballo o perro, pero no se une significativamente a NGF de otras especies de mamífero.

El (Los) epítipo(s) puede(n) ser continuo(s) o discontinuo(s). En una realización, el anticuerpo se une esencialmente a los mismos epítopos de hNGF que un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en MAb 911, MAb 912 y MAb 938 como se describe en Hongo y col., *Hybridoma*, 19:215-227 (2000). En otra realización, el anticuerpo se une esencialmente al mismo epítipo de hNGF que MAb 911. En todavía otra realización, el anticuerpo se une esencialmente al mismo epítipo que MAb 909. Hongo y col., arriba. Por ejemplo, el epítipo puede comprender uno o más de: residuos K32, K34 y E35 dentro de la región variable 1 (aminoácidos 23-35) de hNGF; residuos F79 y T81 dentro de la región variable 4 (aminoácidos 81-88) de hNGF; residuos H84 y K88 dentro de la región variable 4; residuo R103 entre la región variable 5 (aminoácidos 94-98) de hNGF y el extremo C (aminoácidos 111-118) de hNGF; residuo E11 dentro de la región pre-variable 1 (aminoácidos 10-23) de hNGF; Y52 entre la región variable 2 (aminoácidos 40-49) de hNGF y la región variable 3 (aminoácidos 59-66) de hNGF; residuos L112 y S113 dentro del extremo C de hNGF; residuos R59 y R69 dentro de la región variable 3 de hNGF; o residuos V18, V20 y G23 dentro de la región pre-variable 1 de hNGF. Además, un epítipo puede comprender uno o más de la región variable 1, región variable 3, región variable 4, región variable 5, la región del extremo N y /o el extremo C de hNGF. En todavía otra realización, el anticuerpo reduce significativamente la accesibilidad al disolvente del residuo R103 de hNGF. Se entiende que aunque los epítopos descritos anteriormente se refieren a NGF humano, un experto habitual puede alinear las estructuras de NGF humano con el NGF de otras especies e identificar homólogos probables a estos epítopos.

En un aspecto, los anticuerpos (por ejemplo, humanos, humanizados, de ratón, quiméricos) que pueden inhibir NGF pueden producirse usando inmunógenos que expresan la secuencia de longitud completa o parcial de NGF. En otro aspecto puede usarse un inmunogén que comprende una célula que expresa en exceso NGF. Otro ejemplo de un inmunogén que puede usarse es la proteína de NGF que contiene NGF de longitud completa o una parte de la proteína de NGF.

Los anticuerpos antagonista anti-NGF pueden producirse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. La vía y el programa de inmunización del animal huésped están generalmente de acuerdo con técnicas establecidas

y convencionales para la estimulación y producción de anticuerpos, como se describe adicionalmente en este documento. Técnicas generales para la producción de anticuerpos humanos y de ratón se conocen en la técnica y se describen en este documento.

5 Se contempla que cualquier sujeto mamífero que incluye seres humanos o células productoras de anticuerpo del mismo pueda manipularse para servir de base para la producción de líneas celulares de hibridoma de mamífero, que incluyen humanas. Normalmente, el animal huésped se inocula intraperitonealmente, intramuscularmente, por vía oral, subcutáneamente, intraplantar y/o intradérmicamente con una cantidad de inmunogén, incluyendo como se ha descrito en este documento.

10 Los hibridomas pueden prepararse a partir de los linfocitos y células inmortalizadas de mieloma usando la técnica de hibridación de células somáticas generales de Kohler, B. y Milstein, C. (1975) Nature 256:495-497 o como se modifica por Buck, D. W. y col., In Vitro, 18:377-381 (1982). Líneas de mieloma disponibles que incluyen, pero no se limitan a, X63-Ag8.653 y aquellas del Instituto Salk, Centro de distribución de células, San Diego, Calif., EE.UU., pueden usarse en la hibridación. Generalmente, la técnica implica fusionar células de mieloma y células linfoides usando un fusógeno tal como polietilenglicol, o por medios eléctricos muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Después de la fusión, las células se separan del medio de fusión y se cultivan en un medio de crecimiento selectivo, tal como medio hipoxantina-aminopterin-timidina (HAT), para eliminar las células parentales sin hibridar. Cualquiera de los medios descritos en este documento, complementado con o sin suero, puede usarse para cultivar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales. Como otra alternativa a la técnica de fusión de células, los linfocitos B inmortalizados con EBV pueden usarse para producir los anticuerpos anti-NGF monoclonales de la invención objeto. Los hibridomas se expanden y se subclonan, si se desea, y los sobrenadantes se ensayan para la actividad anti-inmunogénica por procedimientos de inmunoensayo convencionales (por ejemplo, radioinmunoensayo, enzimoimmunoensayo o inmunoensayo de fluorescencia).

15 Los hibridomas que pueden usarse como fuente de anticuerpos engloban todos los derivados, células de progenie de los hibridomas parentales que producen anticuerpos monoclonales específicos para NGF, o una parte de los mismos.

20 Los hibridomas que producen tales anticuerpos pueden cultivarse *in vitro* o *in vivo* usando procedimientos conocidos. Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse de los medios de cultivo o fluidos corporales por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como precipitación con sulfato de amonio, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía y ultrafiltración, si se desea. La actividad no deseada, si está presente, puede eliminarse, por ejemplo, ejecutando la preparación sobre adsorbentes preparados a partir del inmunogén unido a una fase sólida y eluyendo o liberando los anticuerpos deseados del inmunógeno. La inmunización de un animal huésped con un NGF humano, o un fragmento que contiene la secuencia de aminoácidos diana conjugada con una proteína que es inmunogénica en las especies que van a inmunizarse, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil-sulfosuccinimida (conjugación mediante residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (mediante residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl<sub>2</sub>, o R1N=C=NR en la que R y R1 son grupos alquilo diferentes, puede dar una población de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales).

25 Si se desea, el anticuerpo antagonista anti-NGF (monoclonal o policlonal) de interés puede secuenciarse y la secuencia de polinucleótidos puede entonces clonarse en un vector para la expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse en vector en una célula huésped y la célula huésped puede luego expandirse y congelarse para el uso futuro. En una alternativa, la secuencia de polinucleótidos puede usarse para la manipulación genética para "humanizar" el anticuerpo o para mejorar la afinidad, u otras características del anticuerpo. Por ejemplo, la región constante puede manipularse para parecerse más a regiones constantes humanas para evitar respuesta inmunitaria si el anticuerpo se usa en ensayos clínicos y tratamientos en seres humanos. Puede desearse manipular genéticamente la secuencia de anticuerpos para obtener mayor afinidad por NGF y mayor eficacia en inhibir NGF. Será evidente para un experto en la materia que pueden hacerse uno o más cambios de polinucleótidos al anticuerpo antagonista anti-NGF y todavía mantener su capacidad de unión a NGF.

30 Hay cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Éstas son: (1) determinar el nucleótido y la secuencia de aminoácidos predicha de los dominios variables pesados y ligeros del anticuerpo de partida (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región estructural del anticuerpo usar durante el procedimiento de humanización (3) las metodologías/técnicas de humanización reales y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; 6.331.415; 5.530.101; 5.693.761; 5.693.762; 5.585.089; y 6.180.370.

35 Se han descrito varias moléculas de anticuerpo "humanizadas" que comprenden un sitio de unión a antígeno derivado de una inmunoglobulina no humana, que incluye anticuerpos quiméricos que tienen regiones V de roedor o de roedor modificadas y sus regiones determinantes de la complementariedad (CDR) asociadas fusionadas con dominios constantes humanos. Véase, por ejemplo, Winter y col. Nature 349:293-299 (1991), Lobuglio y col. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:4220-4224 (1989), Shaw y col. J Immunol. 138:4534-4538 (1987), y Brown y col. Cancer Res. 47:3577-3583 (1987). Otras referencias describen CDR de roedor injertadas en una región estructural (FR) de

soporte humana antes de la fusión con un dominio constante de anticuerpo humano apropiado. Véase, por ejemplo, Riechmann y col. *Nature* 332:323-327 (1988), Verhoeyen y col. *Science* 239:1534-1536 (1988) y Jones y col. *Nature* 321:522-525 (1986). Otra referencia describe CDR de roedor soportadas por regiones estructurales de roedor recombinantemente chapadas. Véase, por ejemplo, la publicación de patente europea nº 0519596. Estas moléculas "humanizadas" se diseñan para minimizar la respuesta inmunológica no deseada hacia moléculas de anti-anticuerpo humano de roedor que limita la duración y eficacia de aplicaciones terapéuticas de aquellos restos en receptores humanos. Por ejemplo, la región constante del anticuerpo puede manipularse de forma que sea inmunológicamente inerte (por ejemplo, no desencadena la lisis del complemento). Véase, por ejemplo, la publicación PCT nº WO1999/058572. Otros procedimientos de humanizar anticuerpos que también pueden utilizarse se desvelan por Daugherty y col., *Nucl. Acids Res.* 19:2471-2476 (1991) y en las patentes de EE.UU. nº 6.180.377; 6.054.297; 5.997.867; 5.866.692; 6.210.671; y 6.350.861; y en la publicación PCT nº WO 01/27160.

En otra alternativa más, los anticuerpos completamente humanos pueden obtenerse usando ratones comercialmente disponibles que han sido manipulados para expresar proteínas de inmunoglobulina humana específica. Los animales transgénicos que se diseñan para producir una respuesta inmunitaria más deseable (por ejemplo, anticuerpos completamente humanos) o más robusta también pueden usarse para la generación de anticuerpos humanizados o humanos. Ejemplos de tal tecnología son Xenomouse™ de Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y HuMAb-Mouse® y TC Mouse™ de Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

En una alternativa, los anticuerpos pueden producirse recombinantemente y expresarse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. En otra alternativa, los anticuerpos pueden producirse recombinantemente por tecnología de expresión en fago. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743; y 6.265.150; y Winter y col., *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455 (1994). Alternativamente, la tecnología de expresión en fago (McCafferty y col., *Nature* 348:552-553 (1990)) puede usarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios de genes del dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes sin inmunizar. Según esta técnica, los genes del dominio V del anticuerpo se clonan en un gen de la proteína de la envoltura tanto principal como secundario de un bacteriófago filamentosos, tal como M13 o fd, y se expresan en fragmentos funcionales de anticuerpos sobre la superficie de la partícula de fago. Debido a que las partículas filamentosas contienen una única copia de ADN monocatenaria del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también producen la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta aquellas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B. La expresión en fago puede realizarse en una variedad de formatos; para una revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Varias fuentes de segmentos de genes V pueden usarse para la expresión en fago. Clackson y col., *Nature* 352:624-628 (1991) aislaron una matriz diferente de anticuerpos de anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes de V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V de donantes humanos sin inmunizar y los anticuerpos con respecto a una matriz diferente de antígenos (incluyendo autoantígenos) pueden aislarse esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Mark y col., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), o Griffith y col., *EMBO J.* 12:725-734 (1993). En una respuesta inmunitaria natural, los genes de anticuerpos acumulan mutaciones a una alta velocidad (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán mayor afinidad, y los linfocitos B que muestran inmunoglobulina de superficie de alta afinidad se replican y se diferencian preferencialmente durante la posterior exposición del antígeno. Este proceso natural puede imitarse empleando la técnica conocida como "barajado de cadenas", Marks y col., *Bio/Technol.* 10:779-783 (1992)). En este procedimiento, la afinidad de anticuerpos humanos "primarios" obtenidos por expresión en fago puede mejorarse sustituyendo secuencialmente los genes de la región V de la cadena pesada y ligera por variantes (repertorios) que se producen naturalmente de genes del dominio V obtenidos a partir de donantes sin inmunizar. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con afinidades en el intervalo de nM. Una estrategia para preparar repertorios de anticuerpos de fago muy grandes (también conocidos como "las bibliotecas madre de todas las bibliotecas") se ha descrito por Waterhouse y col., *Nucl. Acids Res.* 21, 2265-2266 (1993). El barajado de genes también puede usarse para derivar anticuerpos humanos de anticuerpos de roedor, en el que el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo de roedor de partida. Según este procedimiento, que también se denomina en lo sucesivo "sellado de epítopes", el gen del dominio V de la cadena pesada o ligera de anticuerpos de roedor obtenido por la técnica de expresión en fago se reemplaza por un repertorio de genes del dominio V humano, creándose quimeras de roedor-ser humano. La selección en antígeno produce el aislamiento de variable humano que puede restaurar un sitio de unión a antígeno funcional, es decir, el epítotope gobierna (sella) la elección del componente. Si el proceso se repite con el fin de sustituir el dominio V de roedor restante se obtiene un anticuerpo humano (véase la publicación PCT WO 93/06213 publicada el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos de roedor por injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos que no tienen región estructural o residuos de CDR de origen de roedor.

Es evidente que aunque la discusión anterior se refiere a anticuerpos humanizados, los principios generales tratados son aplicables a personalizar anticuerpos para su uso, por ejemplo, en perros, gatos, primates, equinos y bovinos. Es adicionalmente evidente que uno o más aspectos de humanizar un anticuerpo descritos en este documento pueden combinarse, por ejemplo, injerto de CDR, mutación de la región estructural y mutación de CDR.

Los anticuerpos pueden producirse recombinantemente aislando primero los anticuerpos y produciendo el anticuerpo células de animales huésped, obteniendo la secuencia del gen y usando la secuencia del gen para

expresar el anticuerpo recombinantemente en células huésped (por ejemplo, células CHO). Otro procedimiento que puede emplearse es expresar la secuencia de anticuerpos en plantas (por ejemplo, tabaco) o leche transgénica. Se han desvelado procedimientos para expresar anticuerpos recombinantemente en plantas o leche. Véanse, por ejemplo, Peeters y col. *Vaccine* 19:2756 (2001); Lonberg, N. y D. Huszar *Int. Rev. Immunol* 13:65 (1995); y Pollock y col., *J Immunol Methods* 231:147(1999). Los procedimientos de producción de derivados de anticuerpos, por ejemplo, humanizados, monocatenarios, etc. se conocen en la técnica.

Los inmunoensayos y las técnicas de clasificación por citometría de flujo tales como citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS) también pueden emplearse para aislar anticuerpos que son específicos para NGF.

Los anticuerpos pueden unirse a muchos vehículos diferentes. Los vehículos pueden ser activos y/o inertes. Ejemplos de vehículos muy conocidos incluyen polipropileno, poliestireno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, vidrio, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser tanto soluble como insoluble para los fines de la invención. Aquellos expertos en la materia conocerán otros vehículos adecuados para la unión de anticuerpos, o podrán determinar tales usando experimentación rutinaria. En algunas realizaciones, el vehículo comprende un resto que elige como diana el miocardio.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven de fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede disponerse en vectores de expresión (tal como los vectores de expresión desvelados en la publicación PCT nº WO 87/04462), que luego se transfectan en células huésped tal como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Véase, por ejemplo, la publicación PCT nº WO 87/04462. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante con dominios constantes de la cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas, Morrison y col., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81:6851 (1984), o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un no polipéptido de inmunoglobulina. De ese modo se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión de un anticuerpo anti-NGF monoclonal en este documento.

Los anticuerpos antagonista anti-NGF pueden caracterizarse usando procedimientos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento es para identificar el epítipo con el que se une, o "mapeo de epítipos". Hay muchos procedimientos conocidos en la técnica para mapear y caracterizar la localización de epítipos sobre proteínas, que incluyen resolver la estructura cristalina de un complejo anticuerpo-antígeno, ensayos de competencia, ensayos de expresión de fragmentos de genes y ensayos basados en péptidos sintéticos como se describe, por ejemplo, en el Capítulo 11 de Harlow y Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1999. En un ejemplo adicional, el mapeo de epítipos puede usarse para determinar la secuencia a la que se une un anticuerpo antagonista anti-NGF. El mapeo de epítipos está comercialmente disponible de diversas fuentes, por ejemplo, sistemas Pepscan (Edelhartweg 15, 8219 PH Lelystad, Los Países Bajos). El epítipo puede ser un epítipo lineal, es decir, estar contenido en un único estiramiento de aminoácidos, o un epítipo conformacional formado por una interacción tridimensional de aminoácidos que puede no necesariamente estar contenida en un único estiramiento. Los péptidos de longitudes variables (por ejemplo, al menos 4-6 aminoácidos de longitud) pueden aislarse o sintetizarse (por ejemplo, recombinantemente) y usarse para ensayos de unión con un anticuerpo antagonista anti-NGF. En otro ejemplo, el epítipo con el que el anticuerpo antagonista anti-NGF se une puede determinarse en un cribado sistemático usando péptidos solapantes derivados de la secuencia de NGF y determinando la unión por el anticuerpo antagonista anti-NGF. Según los ensayos de expresión de fragmentos de genes, el marco de lectura abierto que codifica NGF se fragmenta tanto al azar como por construcciones genéticas específicas y se determina la reactividad de los fragmentos de NGF expresados con el anticuerpo que va a probarse. Los fragmentos del gen pueden producirse, por ejemplo, por PCR y luego transcribirse y traducirse en proteína *in vitro*, en presencia de aminoácidos radiactivos. La unión del anticuerpo con los fragmentos de NGF radiactivamente marcados se determina luego por inmunoprecipitación y electroforesis en gel. Ciertos epítipos también pueden identificarse usando grandes bibliotecas de secuencias de péptidos al azar expresadas sobre la superficie de partículas de fago (bibliotecas de fagos). Alternativamente, una biblioteca definida de fragmentos de péptidos solapantes puede probarse para unirse al anticuerpo de prueba en simples ensayos de unión. En un ejemplo adicional, la mutagénesis de un dominio de unión a antígeno, experimentos de cambio de dominio y mutagénesis por barrido de alanina pueden realizarse para identificar residuos requeridos, suficientes y/o necesarios para la unión a epítipo. Por ejemplo, los experimentos de barrido de dominios pueden realizarse usando un NGF mutante en el que diversos fragmentos del polipéptido de NGF han sido sustituidos (cambiados) con secuencias de una proteína estrechamente relacionada, pero antígenicamente distinta (tal como otro miembro de la familia de las proteínas de neurotrofina). La importancia del fragmento de NGF particular para la unión al anticuerpo puede evaluarse evaluando la unión del anticuerpo al mutante NGF.

Todavía otro procedimiento que puede usarse para caracterizar un anticuerpo antagonista anti-NGF es usar ensayos de competencia con otros anticuerpos conocidos por unirse al mismo antígeno, es decir, diversos fragmentos sobre NGF, para determinar si el anticuerpo antagonista anti-NGF se une al mismo epítipo que otros anticuerpos. Los ensayos de competencia son muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Ejemplos de anticuerpos que

pueden usarse en los ensayos de competencia para la presente invención incluyen MAb 911, 912, 938, como se describen en Hongo y col., *Hybridoma* 19:215-227 (2000).

Un vector de expresión puede usarse para dirigir expresión de un anticuerpo antagonista anti-NGF. Un experto en la materia está familiarizado con la administración de vectores de expresión para obtener la expresión de una proteína exógena *in vivo*. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 6.436.908; 6.413.942; y 6.376.471. La administración de vectores de expresión incluye administración local o sistémica, que incluye inyección, administración por vía oral, pistola de partículas o administración cateterizada, y administración tópica. En otra realización, el vector de expresión se administra directamente al tronco o ganglio simpático, o en una arteria coronaria, aurícula, ventrículo o pericardio.

También puede usarse administración elegida como diana de composiciones terapéuticas que contienen un vector de expresión, o polinucleótidos subgenómicos. Las técnicas de administración de ADN mediado por receptor se describen en, por ejemplo, Findees Y col., *Trends Biotechnol.* (1993) 11:202; Chiou y col., *Gene Therapeutics: Methods And Applications of Direct Gene Transfer* (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu y col., *J. Biol. Chem.* (1988) 263:621; Wu y col., *J. Biol. Chem.* (1994) 269:542; Zenke y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990) 87:3655; Wu y col., *J. Biol. Chem.* (1991) 266:338. Las composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido se administran en un intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para la administración local en un protocolo de terapia génica. También pueden usarse intervalos de concentración de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg, aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg y aproximadamente 20 µg a aproximadamente 100 µg de ADN durante un protocolo de terapia génica. Los polinucleótidos y polipéptidos terapéuticos pueden administrarse usando vehículos de administración de genes. El vehículo de administración de genes puede ser de origen vírico o no vírico (véase generalmente, Jolly, *Cancer Gene Therapy* (1994) 1:51; Kimura, *Human Gene Therapy* (1994) 5:845; Connolly, *Human Gene Therapy* (1995) 1:185; y Kaplitt, *Nature Genetics* (1994) 6:148). La expresión de tales secuencias codificantes puede inducirse usando promotores de mamífero endógenos o heterólogos. La expresión de la secuencia codificante puede ser tanto constitutiva como regulada.

Los vectores basados en víricos para la administración de un polinucleótido deseado y la expresión en una célula deseada son muy conocidos en la técnica. Vehículos basados en víricos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, retrovirus recombinantes (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT nº WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; las patentes de EE.UU. nº 5.219.740 y 4.777.127; la patente de GB nº 2.200.651; y la patente EP nº 0 345 242), vectores basados en alfa-virus (por ejemplo, vectores del virus Sindbis, virus del bosque Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), virus del río Ross (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) y virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)) y vectores de virus adenoasociados (AAV) (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT nº WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 y WO 95/00655). También puede emplearse la administración de ADN ligado a adenovirus muertos como se describe en Curiel, *Hum. Gene Ther.* (1992) 3:147.

También pueden emplearse vehículos y procedimientos de administración no vírica que incluyen, pero no se limitan a, ADN condensado policatiónico ligado o sin ligar a adenovirus muerto solo (véase, por ejemplo, Curiel, *Hum. Gene Ther.* (1992) 3:147); ADN ligado de ligando (véase, por ejemplo, Wu, *J. Biol. Chem.* (1989) 264:16985); células vehículo de administración de células eucariotas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.814.482; publicaciones PCT nº WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; y WO 97/42338) y neutralización o fusión de carga nucleica con membranas celulares. También puede emplearse ADN desnudo. Los procedimientos de introducción de ADN desnudo a modo de ejemplo se describen en publicación PCT nº WO 90/11092 y la patente de EE.UU. nº 5.580.859. Los liposomas que pueden actuar de vehículos de administración de genes se describen en la patente de EE.UU. nº 5.422.120; publicaciones PCT nº WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; y la patente EP nº 0 524 968. Enfoques adicionales se describen en Philip, *Mol. Cell Biol.* (1994) 14:2411 y en Wdisendin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1994) 91:1581.

#### Otros antagonistas de NGF

Se desvelan antagonistas de NGF distintos de anticuerpos anti-NGF para fines comparativos. En algunas realizaciones de la invención, el antagonista de NGF comprende al menos una molécula antisentido que puede bloquear o disminuir la expresión de un NGF funcional. Las secuencias de nucleótidos de NGF son conocidas y están fácilmente disponibles de bases de datos públicamente disponibles. Véase, por ejemplo, Borsani y col., *Nuc. Acids Res.* 1990, 18, 4020; número de acceso NM 002506; Ullrich y col., *Nature* 303:821-825 (1983). Es rutina preparar moléculas de oligonucleótidos antisentido que se unirán específicamente a ARNm de NGF sin reaccionar de forma cruzada con otros polinucleótidos. Sitios a modo de ejemplo de elección de diana incluyen, pero no se limitan a, el codón de iniciación, las regiones reguladoras 5', la secuencia codificante y la región sin traducir 3'. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos tienen aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de longitud, aproximadamente 15 a 50 nucleótidos de longitud, aproximadamente 18 a 25 nucleótidos de longitud, o más. Los oligonucleótidos pueden comprender modificaciones del esqueleto tales como, por ejemplo, enlaces fosforotioato y modificaciones de 2'-O-azúcares bien conocidas en la materia. Moléculas antisentido a modo de ejemplo incluyen las moléculas antisentido de NGF descritas en la publicación de EE.UU. nº 20010046959; véase también

<http://www.rna-tec.com/ropair.htm>.

5 En otras realizaciones, el antagonista de NGF comprende al menos una molécula antisentido que puede bloquear o disminuir la expresión de un receptor de NGF funcional (tal como TrkA y/o p75). Woolf y col., J. Neurosci. (2001) 21(3):1047-55; Taglialetela y col., J Neurochem (1996) 66(5): 1826-35. Las secuencias de nucleótidos de TrkA y p75 son conocidas y están fácilmente disponibles de bases de datos públicamente disponibles.

Alternativamente, la expresión de NGF y/o la liberación y/o la expresión de receptores de NGF puede disminuirse usando inactivación de genes, oligonucleótidos de morfolino, ARNi o ribozimas, procedimientos que son muy conocidos en la técnica. Véanse

<http://www.maclester.edu/~montgomery/RNAi.html>;

10 <http://pub32.ezboard.com/fmorpholinosfrm19.showMessage?topicID=6.topic>;

<http://www.highveld.com/ribozyme.html>.

15 En otras realizaciones, el antagonista de NGF comprende al menos un compuesto inhibidor de NGF. Como se usa en este documento, "compuesto inhibidor de NGF" se refiere a un compuesto distinto de un anticuerpo anti-NGF que reduce, inhibe, neutraliza o abole directamente o indirectamente la actividad biológica de NGF. Un compuesto inhibidor de NGF debería presentar una cualquiera o más de las siguientes características: (a) unirse a NGF e inhibir la actividad biológica de NGF y/o rutas en la dirección 3' mediadas por la función de señalización de NGF; (b) prevenir, mejorar o tratar cualquier aspecto de dolor (tal como dolor por osteoartritis); (c) bloquear o disminuir la activación de receptores de NGF (incluyendo la dimerización y/o autofosforilación del receptor TrkA); (d) aumentar la eliminación de NGF; (e) inhibir (reducir) la síntesis, producción o liberación de NGF. Compuestos inhibidores de NGF a modo de ejemplo incluyen los inhibidores de NGF de moléculas pequeñas descritos en la publicación de EE.UU. n° 20010046959; los compuestos que inhiben la unión de NGF con p75, como se describen en la publicación PCT n° WO 00/69829, y PD90780 [ácido 7-(benzolibamino)-4,9-dihidro-4-metil-9-oxo-pirazolo[5,1-b]quinazolin-2-carboxílico] como se describe por Colquhoun y col., J. Pharmacol. Exp. Ther. 310(2):505-11 (2004); los compuestos que inhiben la unión de NGF a TrkA y/o p75, como se describe en la publicación PCT n° WO 98/17278. Ejemplos adicionales de compuestos inhibidores de NGF incluyen los compuestos descritos en las publicaciones PCT n° WO 02/17914 y WO 20 02/20479 y en las patentes de EE.UU. n° 5.342.942; 6.127.401; y 6.359.130. Otros compuestos inhibidores de NGF a modo de ejemplo son compuestos que son inhibidores competitivos de NGF. Véase la patente de EE.UU. n° 6.291.247. Además, un experto en la materia puede preparar otros compuestos inhibidores de NGF de moléculas pequeñas.

30 En algunas realizaciones, un compuesto inhibidor de NGF se une a NGF. Sitios a modo de ejemplo de elección de diana (unión) incluyen, pero no se limitan a, la porción del NGF que se une al receptor TrkA y/o receptor p75, y aquellas porciones del NGF que son adyacentes a la región de unión al receptor y que son responsables, en parte, de la correcta forma tridimensional de la porción de unión al receptor. En otra realización, un compuesto inhibidor de NGF se une al receptor de NGF (tal como TrkA y/o p75) e inhibe una actividad biológica de NGF. Sitios a modo de ejemplo de elección de diana incluyen aquellas porciones de TrkA y/o p75 que se unen a NGF.

40 En realizaciones que comprenden moléculas pequeñas, una molécula pequeña puede tener un peso molecular de aproximadamente cualquiera de 100 a 20.000 dalton, 500 a 15.000 dalton, o 1000 a 10.000 dalton. Las bibliotecas de moléculas pequeñas están comercialmente disponibles. Las moléculas pequeñas pueden administrarse usando cualquier medio conocido en la técnica, que incluye inhalación, intraperitonealmente, intravenosamente, intramuscularmente, subcutáneamente, intratecalmente, intraventricularmente, por vía oral, enteralmente, parenteralmente, intranasalmente o dérmicamente. En general, si el antagonista de NGF según la invención es una molécula pequeña, se administrará a la tasa de 0,1 a 300 mg/kg del peso del paciente dividida entre una a tres o más dosis. Para un paciente adulto de peso normal puede administrarse la dosis que oscila de 1 mg a 5 g por dosis.

45 En otras realizaciones, el antagonista de NGF comprende al menos un análogo estructural de NGF. "Análogos estructurales de NGF" en la presente invención se refiere a compuestos que tienen una estructura tridimensional similar como parte de la de NGF y que se unen a un receptor de NGF bajo condiciones fisiológicas *in vitro* o *in vivo* en las que la unión inhibe al menos parcialmente una actividad biológica de NGF. En una realización, el análogo estructural de NGF se une a un receptor TrkA y/o p75. Análogos estructurales de NGF a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los péptidos bicíclicos descritos en la publicación PCT n° WO 97/15593; los péptidos bicíclicos descritos en la patente de EE.UU. n° 6.291.247; los compuestos cíclicos descritos en la patente de EE.UU. n° 6.017.878; y péptidos derivados de NGF descritos en la publicación PCT n° WO 89/09225. También puede diseñarse y sintetizarse análogos estructurales de NGF adecuados mediante modelado molecular de unión a receptor de NGF, por ejemplo, mediante el procedimiento descrito en la publicación PCT n° WO 98/06048. Los análogos estructurales de NGF pueden ser monómeros o dímeros/oligómeros en cualquier combinación deseada de las mismas estructuras o estructuras diferentes para obtener afinidades y efectos biológicos mejorados.

55 En otras realizaciones, la invención proporciona un antagonista de NGF que comprende al menos un mutante negativo dominante del receptor TrkA y/o receptor p75. Un experto en la materia puede preparar mutantes negativos dominantes de, por ejemplo, el receptor TrkA de forma que el receptor se una a NGF y, por tanto, actúe de

“sumidero” para capturar NGF. Sin embargo, los mutantes negativos dominantes no tendrán la bioactividad normal del receptor TrkA tras la unión a NGF. Mutantes negativos dominantes a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los mutantes descritos en las siguientes referencias: Li y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95, 10884; Eide y col., J. Neurosci. 1996, 16, 3123; Liu y col., J. Neurosci 1997, 17, 8749; Klein y col., Cell 1990, 61, 647; Valenzuela y col., Neuron 1993, 10, 963; Tsoulfas y col., Neuron 1993, 10, 975; y Lamballe y col., EMBO J. 1993, 12, 3083. Los mutantes negativos dominantes pueden administrarse en forma de proteína o en forma de un vector de expresión de forma que el mutante negativo dominante, por ejemplo, el receptor TrkA mutante, se exprese *in vivo*. La proteína o vector de expresión puede administrarse usando cualquier medio conocido en la técnica, tal como intraperitonealmente, intravenosamente, intramuscularmente, subcutáneamente, intratecalmente, intraventricularmente, por vía oral, enteralmente, parenteralmente, intranasalmente, dérmicamente o por inhalación. Por ejemplo, la administración de vectores de expresión incluye administración local o sistémica, que incluyen inyección, administración por vía oral, pistola de partículas o administración cateterizada, y administración tópica. Un experto en la materia está familiarizado con la administración de vectores de expresión para obtener la expresión de una proteína exógena *in vivo*. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 6.436.908; 6.413.942; y 6.376.471.

También puede usarse administración elegida como diana de composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido antisentido, vector de expresión o polinucleótidos subgenómicos. Las técnicas de administración de ADN mediada por receptor se describen en, por ejemplo, Findees Y col., Trends Biotechnol. (1993) 11:202; Chiou y col., Gene Therapeutics: Methods And Applications of Direct Gene Transfer (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu y col., J. Biol. Chem. (1988) 263:621; Wu y col., J. Biol. Chem. (1994) 269:542; Zenke y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:3655; Wu y col., J. Biol. Chem. (1991) 266:338. Las composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido se administran en un intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para administración local en un protocolo de terapia génica. En algunas realizaciones también pueden usarse intervalos de concentración de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg, aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg y aproximadamente 20 µg a aproximadamente 100 µg de ADN o más durante un protocolo de terapia génica. Los polinucleótidos y polipéptidos terapéuticos de la presente invención pueden administrarse usando vehículos de administración de genes. El vehículo de administración de genes puede ser de origen vírico o no vírico (véase generalmente, Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1:51; Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5:845; Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1:185; y Kaplitt, Nature Genetics (1994) 6:148). La expresión de tales secuencias codificantes puede inducirse usando promotores y/o potenciadores de mamífero endógenos o heterólogos. La expresión de la secuencia codificante puede ser tanto constitutiva como regulada.

Los vectores basados en víricos para la administración de un polinucleótido deseado y la expresión en una célula deseada son muy conocidos en la técnica. Vehículos basados en víricos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, retrovirus recombinantes (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT n° WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; las patentes de EE.UU. n° 5.219.740 y 4.777.127; la patente de GB n° 2.200.651; y la patente EP n° 0 345 242), vectores basados en alfa-virus (por ejemplo, vectores del virus Sindbis, virus del bosque Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), virus del río Ross (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) y virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)) y vectores de virus adenoasociados (AAV) (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT n° WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 y WO 95/00655). También puede emplearse la administración de ADN ligado a adenovirus muertos como se describe en Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147.

También pueden emplearse vehículos y procedimientos de administración no vírica que incluyen, pero no se limitan a, ADN condensado policatiónico ligado o sin ligar a adenovirus muerto solo (véase, por ejemplo, Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147); ADN ligado de ligando (véase, por ejemplo, Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985); células vehículo de administración de células eucariotas (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.814.482; publicaciones PCT n° WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; y WO 97/42338) y neutralización o fusión de carga nucleica con membranas celulares. También puede emplearse ADN desnudo. Los procedimientos de introducción de ADN desnudo a modo de ejemplo se describen en la publicación PCT n° WO 90/11092 y la patente de EE.UU. n° 5.580.859. Los liposomas que pueden actuar de vehículos de administración de genes se describen en la patente de EE.UU. n° 5.422.120; publicaciones PCT n° WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; y la patente EP n° 0 524 968. Enfoques adicionales se describen en Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14:2411 y en Wdisendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:1581.

También es evidente que un vector de expresión puede usarse para dirigir la expresión de cualquiera de los antagonistas de NGF basados en proteínas descritos en este documento (por ejemplo, anticuerpo anti-NGF, inmunoadhesina de TrkA, etc.). Por ejemplo, en la técnica se conocen otros fragmentos del receptor TrkA que pueden bloquear (bloquear de parcialmente a completamente) NGF y/o una actividad biológica de NGF.

En otra realización, el antagonista de NGF comprende al menos una inmunoadhesina de TrkA. Inmunoadhesinas de TrkA como se usa en este documento se refieren a moléculas quiméricas solubles que comprenden el dominio extracelular de un receptor TrkA y una secuencia de inmunoglobulina, que retiene la especificidad de unión del receptor TrkA (retiene sustancialmente la especificidad de unión del receptor trkA) y puede unirse a NGF.

Las inmunoadhesinas de TrkA se conocen en la técnica, y se ha encontrado que bloquean la unión de NGF al receptor TrkA. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.153.189. Brennan y col. informan de la administración de la inmunoadhesina de TrkA en un modelo de rata de dolor posquirúrgico. Véase Society for Neuroscience Abstracts 24 (1-2) 880 (1998). En una realización, la inmunoadhesina de TrkA comprende una fusión de una secuencia de aminoácidos del receptor TrkA (o una parte de la misma) del dominio extracelular de TrkA que puede unirse a NGF (en algunas realizaciones, una secuencia de aminoácidos que retiene sustancialmente la especificidad de unión del receptor TrkA) y una secuencia de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, el receptor TrkA es una secuencia del receptor TrkA humana, y la fusión es con una secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina. En otras realizaciones, la secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina es una secuencia del dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina. En otras realizaciones, la asociación de dos fusiones de receptor TrkA-cadena pesada de la inmunoglobulina (por ejemplo, mediante enlace covalente por enlace(s) disulfuro) produce una estructura similar a inmunoglobulina homodimérica. Una cadena ligera de la inmunoglobulina puede asociarse adicionalmente a una o ambas de las quimeras de receptor TrkA-inmunoglobulina en el dímero unido por disulfuro para dar una estructura homotrimérica u homotetramérica. Ejemplos de inmunoadhesinas TrkA adecuadas incluyen aquellas descritas en la patente de EE.UU. nº 6.153.189.

En otra realización, el antagonista de NGF comprende al menos un anticuerpo anti-TrkA que puede bloquear, suprimir, alterar y/o reducir la interacción física de NGF con el receptor TrkA y/o la señalización en la dirección 3', por lo que una actividad biológica de NGF se reduce y/o bloquea. Los anticuerpos anti-TrkA se conocen en la técnica. Anticuerpos anti-TrkA a modo de ejemplo incluyen aquellos descritos en las publicaciones PCT nº WO 97/21732, WO 00/73344, WO 02/15924, y la publicación de EE.UU. nº 20010046959.

En otra realización, el antagonista de NGF comprende al menos un anticuerpo anti-p75 que puede bloquear, suprimir y/o reducir la interacción física de NGF con el receptor p75 y/o la señalización en la dirección 3', por lo que se reduce y/o bloquea una actividad biológica de NGF.

En otra realización, el antagonista de NGF comprende al menos un inhibidor de cinasas que puede inhibir la señalización de cinasas en la dirección 3' asociada a la actividad de receptores TrkA y/o p75. Un inhibidor de cinasas a modo de ejemplo es K252a o K252b, que se conoce en la técnica y se describe en Knusel y col., J. Neurochem. 59:715-722 (1992); Knusel y col., J. Neurochemistry 57:955-962 (1991); Koizumi y col., J. Neuroscience 8:715-721 (1988); Hirata y col., Chemical Abstracts 111:728, XP00204135, véase el resumen y 12th Collective Chemical Substance Index, pág. 34237, c. 3 (5-7), 55-60, 66-69), pág. 34238, c. 1 (41-44), c. 2 (25-27, 32-33), pág. 3423, c. 3 (48-50, 52-53); y la patente de EE.UU. nº 6.306.849.

Se espera que varias otras categorías de antagonistas de NGF sean identificadas si son buscadas por el profesional clínico.

#### Identificación de antagonistas de NGF (tal como anticuerpos antagonista anti-NGF)

Los antagonistas de NGF, que incluyen anticuerpos antagonista anti-NGF, pueden identificarse o caracterizarse usando procedimientos conocidos en la técnica, por lo que la reducción, mejora o neutralización de una actividad biológica de NGF se detecta y/o mide. Pueden usarse los procedimientos descritos en el documento PCT WO 04/065560. Otro procedimiento, por ejemplo, un ensayo de activación de receptores de cinasas (KIRA) descrito en las patentes de EE.UU. nº 5.766.863 y 5.891.650, puede usarse para identificar agentes anti-NGF. Este ensayo de tipo ELISA es adecuado para la medición cualitativa o cuantitativa de la activación de cinasas midiendo la autofosforilación del dominio de cinasa de una proteína tirosina cinasa de receptor (denominada en lo sucesivo "rPTK"), por ejemplo, receptor TrkA, además de para la identificación y caracterización de posibles antagonistas de una rPTK seleccionada, por ejemplo, TrkA. La primera etapa del ensayo implica la fosforilación del dominio cinasa de un receptor de cinasa, por ejemplo, un receptor TrkA en el que el receptor está presente en la membrana celular de una célula eucariota. El receptor puede ser un receptor endógeno o ácido nucleico que codifica el receptor, o una construcción de receptor puede transformarse en la célula. Normalmente, una primera fase sólida (por ejemplo, un pocillo de una primera placa de ensayo) se recubre con una población sustancialmente homogénea de tales células (normalmente una línea celular de mamífero), de manera que las células se adhieren a la fase sólida. Frecuentemente, las células son adherentes y así se adhieren naturalmente a la primera fase sólida. Si se usa una "construcción de receptor", normalmente comprende una fusión de un receptor de cinasas y un polipéptido flag. El polipéptido flag es reconocido por el agente de captura, frecuentemente un anticuerpo de captura, en la parte de ELISA del ensayo. Un analito, tal como un antagonista de NGF candidato (incluyendo anticuerpo antagonista anti-NGF) se añade luego junto con NGF a los pocillos que tienen las células adherentes, de forma que el receptor de tirosina cinasa (por ejemplo, el receptor TrkA) se expone a (o se pone en contacto con) NGF y el analito. Este ensayo permite la identificación de antagonistas (incluyendo anticuerpos) que inhiben la activación de TrkA por su NGF ligando. Tras la exposición a NGF y el analito, las células adherentes se solubilizan usando un tampón de lisis (que tiene un detergente solubilizante en su interior) y agitación suave, liberando así el lisado celular que puede someterse directamente a la parte de ELISA del ensayo sin la necesidad de concentración o clarificación del lisado celular.

El lisado celular así preparado está entonces listo para someterse a la etapa de ELISA del ensayo. Como primera etapa en la etapa de ELISA, una segunda fase sólida (normalmente un pocillo de una placa de microtitulación de

ELISA) se recubre con un agente de captura (frecuentemente un anticuerpo de captura) que se une específicamente al receptor de tirosina cinasa o, en el caso de una construcción de receptor, al polipéptido flag. El recubrimiento de la segunda fase sólida se lleva a cabo de manera que el agente de captura se adhiera a la segunda fase sólida. El agente de captura es generalmente un anticuerpo monoclonal pero, como se describe en los ejemplos en este documento, también pueden usarse anticuerpos policlonales. El lisado celular obtenido se expone entonces a, o se pone en contacto con, el agente de captura adherente de manera que el receptor o la construcción de receptor se adhiera a (o sea capturado en) la segunda fase sólida. Entonces se lleva a cabo una etapa de lavado, de manera que se elimine el lisado celular sin unir, quedando el receptor o construcción de receptor capturado. El receptor o construcción de receptor adherente o capturado se expone entonces a, o se pone en contacto con, un anticuerpo anti-fosfotirosina que identifica residuos de tirosina fosforilados en el receptor de tirosina cinasa. En una realización, el anticuerpo anti-fosfotirosina se conjuga (directamente o indirectamente) con una enzima que cataliza un cambio de color de un reactivo de color no radiactivo. Por consiguiente, la fosforilación del receptor puede medirse por un posterior cambio de color del reactivo. La enzima puede unirse al anticuerpo anti-fosfotirosina directamente, o una molécula de conjugación (por ejemplo, biotina) puede conjugarse con el anticuerpo anti-fosfotirosina y la enzima puede unirse posteriormente al anticuerpo anti-fosfotirosina mediante la molécula de conjugación. Finalmente se mide la unión del anticuerpo anti-fosfotirosina al receptor o construcción de receptor capturado, por ejemplo, por un cambio de color en el reactivo de color.

Los antagonistas de NGF (tales como el anticuerpo antagonista anti-NGF) también pueden identificarse incubando un agente candidato con NGF y monitorizando una cualquiera o más de las siguientes características: (a) unión a NGF y inhibición de la actividad biológica de NGF o rutas en la dirección 3' mediadas por la función de señalización de NGF; (b) inhibición, bloqueo o disminución de la activación de receptores de NGF (incluyendo dimerización y/o autofosforilación de TrkA); (c) aumento de la eliminación de NGF; (d) tratamiento o prevención de cualquier aspecto de dolor por artritis reumatoide o dolor por osteoartritis; (e) inhibición (reducción) de la síntesis, producción o liberación NGF. En algunas realizaciones, un antagonista de NGF (por ejemplo, un anticuerpo antagonista anti-NGF) se identifica incubando un agente candidato con NGF y monitorizando la unión y/o reducción o neutralización que conlleva de una actividad biológica de NGF. El ensayo de unión puede realizarse con polipéptido(s) de NGF purificados, o con células que expresan naturalmente, o se transfectan para expresar, polipéptido(s) de NGF. En una realización, el ensayo de unión es un ensayo de unión competitiva, en el que se evalúa la capacidad de un agente candidato (tal como un anticuerpo) para competir con un anticuerpo antagonista anti-NGF conocido por la unión a NGF. El ensayo puede realizarse en diversos formatos, que incluyen el formato de ELISA. En otras realizaciones, un antagonista de NGF (tal como el anticuerpo antagonista anti-NGF) se identifica incubando un agente candidato con NGF y monitorizando la unión e inhibición que conlleva de la dimerización y/o autofosforilación del receptor trkA.

Tras la identificación inicial, la actividad de un antagonista anti-NGF candidato (tal como un anticuerpo antagonista anti-NGF) puede confirmarse adicionalmente y refinarse por bioensayos, conocidos para probar las actividades biológicas elegidas como diana. Alternativamente, los bioensayos pueden usarse para cribar candidatos directamente. Por ejemplo, NGF promueve varios cambios morfológicamente reconocibles en células sensibles. Éstos incluyen, pero no se limitan a, promoción de la diferenciación de células PC12 y potenciamiento del crecimiento de neuritas de estas células (Greene y col., Proc Natl Acad Sci USA. 73(7):2424-8, 1976), promoción del crecimiento de neuritas de explantes de ganglios sensoriales y simpáticos sensibles (Levi-Montalcini, R. y Angeletti, P. Nerve growth factor. *Physiol. Rev.* 48:534-569, 1968) y promoción de la supervivencia de neuronas dependientes de NGF tales como ganglio de la raíz dorsal embrionaria, ganglio trigeminal, o neuronas del ganglio simpático (por ejemplo, Chun & Patterson, *Dev. Biol.* 75:705-711, (1977); Buchman & Davies, *Development* 118:989-1001 (1993). Por tanto, el ensayo para la inhibición de la actividad biológica de NGF implica cultivar células sensibles a NGF con NGF más un analito, tal como un antagonista de NGF candidato (incluyendo el anticuerpo antagonista anti-NGF). Después de un tiempo apropiado, la respuesta celular se ensayará (diferenciación celular, crecimiento de neuritas o supervivencia celular).

La capacidad de un antagonista de NGF candidato (incluyendo anticuerpo antagonista anti-NGF) para bloquear o neutralizar una actividad biológica de NGF también puede evaluarse monitorizando la capacidad del agente candidato para inhibir la supervivencia mediada por NGF en el bioensayo de supervivencia de los ganglios de la raíz dorsal de rata embrionaria como se describe en Hongo y col., *Hybridoma* 19:215-227 (2000).

#### Composiciones para su uso en los procedimientos de la invención

Las composiciones usadas en los usos médicos de la invención comprenden una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-NGF y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición es para su uso en cualquiera de los usos médicos descritos en este documento. Ejemplos de tales composiciones, además de cómo formularlas, también se describen en una sección anterior y más adelante. En otra realización, la composición comprende uno o más antagonistas de NGF. En otra realización, la composición comprende uno o más antagonistas de NGF seleccionados de uno cualquiera o más de los siguientes: un antagonista (por ejemplo, un anticuerpo) que se une (interactúa físicamente con) a NGF, un antagonista que se une a un receptor de NGF (tal como un receptor TrkA y/o p75) y un antagonista que reduce (impide y/o bloquea) la señalización del receptor de NGF en la dirección 3'. En otras realizaciones más, la composición comprende cualquier antagonista de NGF que no es una inmunoadhesina de TrkA (es decir, es distinto de una inmunoadhesina de TrkA). En otras realizaciones, la composición comprende cualquier antagonista de NGF que es distinto de un anticuerpo anti-NGF. En otras

realizaciones más, la composición comprende cualquier antagonista de NGF que es distinto de una inmunoadhesina de TrkA y distinto de un anticuerpo anti-NGF. En otras realizaciones, un antagonista de NGF inhibe (reduce) la síntesis, producción o liberación de NGF. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF se une a NGF y no reacciona significativamente de forma cruzada con neurotrofinas relacionadas (tales como NT3, NT4/5 y/o BDNF).

5 En algunas realizaciones, el antagonista de NGF no está asociado a una respuesta inmunitaria adversa. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-NGF, una molécula antisentido dirigida a un NGF (incluyendo una molécula antisentido dirigida a un ácido nucleico que codifica NGF), una molécula antisentido dirigida a un receptor de NGF (tal como TrkA y/o p75), un compuesto inhibidor de NGF, un análogo estructural de NGF, una mutación negativa dominante de un receptor TrkA que se une a NGF, una

10 inmunoadhesina de TrkA, un anticuerpo anti-TrkA, un anticuerpo anti-p75 y un inhibidor de cinasas. En otra realización, el antagonista de NGF es un anticuerpo anti-NGF. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF reconoce NGF humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF es humano. En otras realizaciones más, el anticuerpo anti-NGF es humanizado (tal como el anticuerpo E3 descrito en este documento). En todavía otra realización, el anticuerpo anti-NGF comprende una región constante que no desencadena una respuesta inmunitaria

15 no querida o no deseable, tal como lisis mediada por anticuerpo o ADCC. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF comprende una o más CDR del anticuerpo E3 (tal como una, dos, tres, cuatro, cinco o, en algunas realizaciones, las seis CDR de E3).

Se entiende que las composiciones pueden comprender más de un antagonista de NGF. Por ejemplo, una composición puede comprender más de un miembro de una clase de antagonista de NGF (por ejemplo, una mezcla

20 de anticuerpos anti-NGF que reconocen diferentes epítopes de NGF), además de miembros de diferentes clases de antagonistas de NGF (por ejemplo, un anticuerpo anti-NGF y un compuesto inhibidor de NGF). Otras composiciones a modo de ejemplo comprenden más de un anticuerpo anti-NGF que reconoce el (los) mismo(s) epítipo(s), diferentes especies de anticuerpos anti-NGF que se unen a diferentes epítopes de NGF o diferentes compuestos inhibidores de NGF.

La composición usada en la presente invención puede comprender adicionalmente vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams y Wilkins, Ed. K. E. Hoover) en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. En este documento se describen adicionalmente excipientes farmacéuticamente aceptables.

25

El antagonista de NGF y composiciones del mismo también pueden usarse conjuntamente con otros agentes que sirven para potenciar y/o complementar la eficacia de los agentes. Para dolor por osteoartritis, el antagonista de NGF puede administrarse conjuntamente con uno o varios analgésicos, AINE o esteroides. Los analgésicos incluyen, pero no se limitan a, acetaminofeno, tramadol, capsaicina (tópica). Ejemplos de AINE son salicilatos acetilados que incluyen aspirina; salicilatos no acetilados que incluyen salsalato, diflunisal; ácidos acéticos que incluyen etodolac, diclofenac, indometacina, ketorolac, nabumetona; ácidos propiónicos que incluyen fenoprofeno,

30 flurbiprofeno, ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, naproxeno sodio, oxaprozina; fenamatos que incluyen meclofenamato, ácido mefenámico; fenilbutazona, piroxicam; inhibidores de la COX-2 que incluyen celecoxib, etoricoxib, valdecoxib, rofecoxib, lumiracoxib. Un ejemplo de esteroides es corticosteroides intraarticulares (CIA).

35

Para tratar dolor por artritis reumatoide, el antagonista de NGF puede administrarse conjuntamente con uno o varios analgésicos, AINE, corticosteroides (por ejemplo, prednisona) u otros fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad. Ejemplos de fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad son metrotrexato, hidroxcloroquina, sulfasalazina, leflunomida, inhibidores de TNF, receptor de interleucina-1 soluble, conjugados de oro, agentes citotóxicos (azatiprina, ciclofosfamida, ciclosporina A).

40

#### Administración de un antagonista de NGF (tal como un anticuerpo antagonista anti-NGF)

El antagonista de NGF (tal como el anticuerpo antagonista anti-NGF) puede administrarse a un individuo (para artritis reumatoide y osteoartritis) por cualquier vía adecuada. Debe ser evidente para un experto en la materia que no está previsto que los ejemplos descritos en este documento sean limitantes, sino ilustrativos de las técnicas disponibles. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el antagonista de NGF (tal como el anticuerpo antagonista anti-NGF) se administra a un individuo según procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, sublingualmente, intrasinovial, por insuflación, intratecal, oral, inhalación o tópica. La administración puede ser sistémica, por ejemplo, administración intravenosa, o localizada. Nebulizadores comercialmente disponibles para formulaciones líquidas, que incluyen nebulizadores de chorro y nebulizadores ultrasónicos, son útiles para la administración. Las formulaciones líquidas pueden nebulizarse directamente y el polvo liofilizado puede nebulizarse después de la reconstitución. Alternativamente, el antagonista de NGF (tal como el anticuerpo antagonista anti-NGF) puede aerosolizarse usando una formulación de fluorocarburo y un inhalador de dosis medidas, o inhalarse como un polvo liofilizado y molido.

45

50

55

En una realización, un antagonista de NGF (tal como un anticuerpo antagonista anti-NGF) se administra por técnicas de administración local específicas para sitio o elegidas como diana. Ejemplos de técnicas de administración local específicas para sitio o elegidas como diana incluyen diversas fuentes de liberación prolongada implantables del antagonista de NGF (tal como el anticuerpo antagonista anti-NGF) o catéteres de administración local, tales como

60

catéteres de infusión, un catéter permanente, o un catéter de aguja, injertos sintéticos, envolturas adventicias, derivaciones y prótesis endovasculares u otros dispositivos implantables, vehículos específicos para sitio, inyección directa o aplicación directa. Véase, por ejemplo, la publicación PCT nº WO 00/53211 y la patente de EE.UU. No. 5.981.568.

5 Pueden usarse diversas formulaciones de un antagonista de NGF (tal como un anticuerpo antagonista anti-NGF) para la administración. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF (por ejemplo, anticuerpo antagonista anti-NGF) puede administrarse puro. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF (por ejemplo, anticuerpo antagonista anti-NGF) y un excipiente farmacéuticamente aceptable puede estar en diversas formulaciones. En la técnica se conocen excipientes farmacéuticamente aceptables y son sustancias relativamente inertes que facilitan la  
10 administración de una sustancia farmacológicamente eficaz. Por ejemplo, un excipiente puede dar forma o consistencia, o actuar de diluyente. Excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, agentes estabilizantes, agentes humectantes y emulsionantes, sales para variar la osmolaridad, agentes de encapsulamiento, tampones y promotores de la penetración de la piel. Excipientes, además de formulaciones para la administración de fármaco parenteral y no parenteral, se exponen en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20ª ed. Mack  
15 Publishing (2000).

En algunas realizaciones, estos agentes se formulan para administración mediante inyección (por ejemplo, intraperitonealmente, intravenosamente, subcutáneamente, intramuscularmente, etc.). Por consiguiente, estos agentes pueden combinarse con vehículos farmacéuticamente aceptables tales como solución salina, disolución de Ringer, disolución de dextrosa y similares. La pauta de dosificación particular, es decir, dosis, momento adecuado y repetición, dependerá del individuo particular y la historia médica de ese individuo.  
20

Un anticuerpo anti-NGF puede administrarse usando cualquier procedimiento adecuado, que incluye por inyección (por ejemplo, intraperitonealmente, intravenosamente, subcutáneamente, intramuscularmente, etc.). Los anticuerpos anti-NGF también pueden administrarse por inhalación, como se describe en este documento. Generalmente, para administración de anticuerpos anti-NGF, una dosificación de candidato inicial puede ser aproximadamente 2 mg/kg.  
25 Con el fin de la presente invención, una dosificación diaria típica podría oscilar de aproximadamente cualquiera de 0,1 µg/kg a 1 µg/kg a 3 µg/kg a 30 µg/kg a 300 µg/kg a 3 mg/kg, a 30 mg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, un anticuerpo anti-NGF puede administrarse a aproximadamente 1 µg/kg, aproximadamente 10 µg/kg, aproximadamente 20 µg/kg, aproximadamente 50 µg/kg, aproximadamente 100 µg/kg, aproximadamente 200 µg/kg, aproximadamente 500 µg/kg, aproximadamente 1 mg/kg o aproximadamente 2  
30 mg/kg. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento es sostenido hasta que se produce una supresión deseada de síntomas o hasta que se alcanzan niveles terapéuticos suficientes para reducir el dolor. Una pauta de dosificación a modo de ejemplo comprende administrar una dosis inicial de aproximadamente 2 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 1 mg/kg del anticuerpo anti-NGF, o seguido de una dosis de mantenimiento de aproximadamente 1 mg/kg cada dos  
35 semanas. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación, dependiendo del patrón de descomposición farmacocinética que desee lograr el médico. Por ejemplo, en algunas realizaciones se contempla la dosificación de una-cuatro veces a semana. Puede usarse dosificación incluso menos frecuente. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF se administra una vez cada 2 semanas, cada 3 semanas, cada 4 semanas, cada 5 semanas, cada 6 semanas, cada 7 semanas, cada 8 semanas, cada 9 semanas, cada 10 semanas, cada 15 semanas, cada  
40 20 semanas, cada 25 semanas o más. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF se administra una vez cada 1 mes, cada 2 meses, cada 3 meses, cada 4 meses, cada 5 meses, cada 6 meses o más. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente por técnicas y ensayos convencionales. La pauta de dosificación (incluyendo el (los) antagonista(s) de NGF usado(s)) puede variar con el tiempo.

Estudios llevados a cabo en pacientes con dolor de moderado a grave de osteoartritis de la rodilla (resumido en el Ejemplo 9) demostraron que las dosificaciones en el intervalo de 3 a 300 µg/kg proporcionaron el alivio del dolor durante duraciones variables. Todas las dosificaciones probadas (3, 10, 30, 100 y 300 µg/kg) produjeron una reducción en el dolor durante al menos 7 días; dosificaciones mayores produjeron un alivio del dolor prolongado de al menos 28 días (Figura 24). Una dosis de 100 µg/kg produjo el alivio del dolor durante al menos 80 días (Figura 25).  
45

En general, si no es un anticuerpo, un antagonista de NGF puede administrarse (en algunas realizaciones) a la tasa de aproximadamente 0,1 a 300 mg/kg de peso del paciente dividida en una a tres dosis, o como se desvela en este documento. En algunas realizaciones, para un paciente adulto de peso normal, puede administrarse la dosis que oscila de aproximadamente 0,3 a 5,00 mg/kg. La pauta de dosificación particular, es decir, dosis, momento adecuado y repetición, dependerá del individuo particular y la historia médica de ese individuo, además de las propiedades de los agentes individuales (tales como la semivida del agente, y otras consideraciones muy conocidas en la técnica).  
50  
55

Con el fin de la presente invención, la dosificación apropiada de un antagonista de NGF (incluyendo un anticuerpo antagonista anti-NGF) dependerá del antagonista de NGF (o composiciones del mismo) empleado, el tipo y la gravedad del dolor que va a tratarse, si el agente se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta al agente, y la discreción del médico adjunto. Normalmente, el profesional clínico administrará un antagonista de NGF (por ejemplo, anticuerpo antagonista anti-NGF) hasta que se alcance  
60

una dosificación que logre el resultado deseado. Las dosis y/o frecuencia pueden variar durante el transcurso del tratamiento.

Consideraciones empíricas, tales como la semivida, contribuirán generalmente a la determinación de la dosificación. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos que son compatibles con el sistema inmunitario humano, tal como anticuerpos humanizados o anticuerpos completamente humanos, para prolongar la semivida del anticuerpo y para prevenir que el anticuerpo sea atacado por el sistema inmunitario del huésped. La frecuencia de administración puede determinarse y ajustarse durante el transcurso de la terapia y generalmente se basa, pero no necesariamente, en el tratamiento y/o la supresión y/o la mejora y/o el retraso del dolor. Alternativamente, pueden ser apropiadas formulaciones de liberación continua sostenida de antagonistas de NGF (por ejemplo, anticuerpos antagonista anti-NGF). En la técnica se conocen diversas formulaciones y dispositivos para lograr la liberación sostenida.

En una realización, las dosificaciones para un antagonista de NGF (por ejemplo, anticuerpo antagonista anti-NGF) pueden determinarse empíricamente en individuos a los que se les ha administrado una o más administraciones de un antagonista de NGF. A los individuos se les administran dosificaciones incrementales de un antagonista de NGF (por ejemplo, un anticuerpo antagonista anti-NGF). Para evaluar la eficacia de un antagonista de NGF (por ejemplo, anticuerpo antagonista anti-NGF) puede seguirse un indicador de dolor.

La administración de un antagonista de NGF (por ejemplo, un anticuerpo antagonista anti-NGF) según el procedimiento en la presente invención puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, de la afección fisiológica del receptor, si el fin de la administración es terapéutico o profiláctico, y otros factores conocidos para los médicos expertos. La administración de un antagonista de NGF (por ejemplo, un anticuerpo antagonista anti-NGF) puede ser esencialmente continua durante un periodo de tiempo preseleccionado, o puede ser en una serie de dosis separadas, por ejemplo, tanto antes, durante o después de desarrollarse el dolor; antes; durante; antes y después; durante y después; antes y durante; como antes, durante y después de desarrollarse el dolor.

En algunas realizaciones puede estar presente más de un antagonista de NGF, tal como un anticuerpo antagonista anti-NGF. Pueden estar presentes al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco diferentes, o más antagonistas de NGF (por ejemplo, anticuerpos antagonista anti-NGF). Generalmente, aquellos antagonistas de NGF (tal como anticuerpos antagonista anti-NGF) tienen actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. También pueden usarse antagonistas de NGF conjuntamente con otros agentes que sirven para potenciar y/o complementar la eficacia de los agentes.

Las formulaciones terapéuticas del antagonista de NGF (por ejemplo, anticuerpo antagonista anti-NGF) usadas según la presente invención se preparan para el almacenamiento mezclando un antagonista de NGF (por ejemplo, un anticuerpo) que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000)), en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, y pueden comprender tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; sales tales como cloruro sódico; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> o polietilenglicol (PEG).

Los liposomas que contienen el antagonista de NGF (tal como el anticuerpo antagonista anti-NGF) se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); y las patentes de EE.UU. n° 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con tiempo de circulación potenciado se desvelan en la patente de EE.UU. n° 5.013.556. Pueden generarse liposomas particularmente útiles por el procedimiento de evaporación en fase inversa con una composición de lípido que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para dar liposomas con el diámetro deseado.

Los principios activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000).

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el antagonista (tal como el anticuerpo), matrices que están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de 7-etilo, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPREN DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), acetato isobutirato de sacarosa y ácido poli-D-(-)-3-hidroxitútrico.

Las formulaciones que van a usarse para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se realiza fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles. Las composiciones de antagonista de NGF terapéuticas (por ejemplo, anticuerpo antagonista anti-NGF) se disponen generalmente en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de disolución intravenosa o vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Las composiciones según la presente invención pueden estar en formas de dosificación unitaria tales como comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, disoluciones o suspensiones, o supositorios, para administración oral, parenteral o rectal, o administración por inhalación o insuflación.

Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, el principio activo principal se mezcla con un vehículo farmacéutico, por ejemplo, componentes de formación de comprimidos convencionales tales como almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato de dicalcio o gomas, y otros diluyentes farmacéuticos, por ejemplo, agua para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable no tóxica de la misma. Cuando se refiere a estas composiciones de preformulación como homogéneas se indica que el principio activo está uniformemente dispersado en toda la composición, de manera que la composición puede subdividirse fácilmente en formas de dosificación unitaria igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta composición de preformulación sólida se subdivide luego en formas de dosificación unitaria del tipo descrito anteriormente que contienen de 0,1 a aproximadamente 500 mg del principio activo de la presente invención. Los comprimidos o píldoras de la novedosa composición pueden recubrirse o combinarse de otro modo para proporcionar una forma de dosificación que proporciona la ventaja de acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender un componente de dosificación interna y de dosificación externa, estando este último en forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden separarse por una capa entérica que sirve para resistir la disgregación en el estómago y permite que el componente interno pase intacto al duodeno o se retrase en la liberación. Puede usarse una variedad de materiales para tales capas o recubrimientos entéricos, incluyendo tales materiales varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con tales materiales como shellac, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Agentes tensioactivos adecuados incluyen, en particular, agentes no iónicos tales como polioxietilensorbitanos (por ejemplo Tween™ 20, 40, 60, 80 u 85) y otros sorbitanos (por ejemplo, Span™ 20, 40, 60, 80 u 85). Las composiciones con un agente tensioactivo comprenderán convenientemente entre el 0,05 y el 5% de agente tensioactivo, y puede estar entre el 0,1 y el 2,5%. Se apreciará que pueden añadirse otros componentes, por ejemplo, manitol u otros vehículos farmacéuticamente aceptables, si fuera necesario.

Pueden prepararse emulsiones adecuadas usando emulsiones de grasa comercialmente disponibles tales como Intralipid™, Liposyn™, Infonutrol™, Lipofundin™ y Lipiphysan™. El principio activo puede estar tanto disuelto en una composición de emulsión premezclada como alternativamente puede disolverse en un aceite (por ejemplo, aceite de soja, aceite de alazor, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de maíz o aceite de almendra) y una emulsión formada tras la mezcla con un fosfolípido (por ejemplo, fosfolípidos de huevo, fosfolípidos de soja o lecitina de soja) y agua. Se apreciará que pueden añadirse otros componentes, por ejemplo, glicerol o glucosa, para ajustar la tonicidad de la emulsión. Emulsiones adecuadas contendrán normalmente hasta el 20% de aceite, por ejemplo, entre el 5 y el 20%. La emulsión de grasa puede comprender gotitas de grasa entre 0,1 y 1,0 µm, particularmente 0,1 y 0,5 µm, y tener un pH en el intervalo de 5,5 a 8,0.

Las composiciones en emulsión pueden ser aquellas preparadas mezclando un antagonista de NGF (tal como un anticuerpo contra el factor de crecimiento nervioso) con Intralipid™ o los componentes del mismo (aceite de soja, fosfolípidos de huevo, glicerol y agua).

Composiciones para inhalación o insuflación incluyen disoluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se explica anteriormente. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por vía oral o respiratoria nasal para el efecto local o sistémico. Las composiciones en disolventes farmacéuticamente aceptables preferentemente estériles pueden nebulizarse usando gases. Las disoluciones nebulizadas pueden respirarse directamente del dispositivo de nebulización o el dispositivo de nebulización puede unirse a una mascarilla para la cara, tienda o máquina de respiración de presión positiva intermitente. Las composiciones en disolución, suspensión o polvo pueden administrarse, preferentemente por vía oral o nasalmente, de dispositivos que administran la formulación de un modo apropiado.

La eficacia del tratamiento puede evaluarse mediante procedimientos muy conocidos en la técnica.

#### **Kits que comprenden anticuerpos y polinucleótidos de la invención**

5 La divulgación también proporciona kits que comprenden anticuerpos o polipéptidos para su uso en la detección y/o terapia. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los kits comprenden un anticuerpo E3. En algunas realizaciones, el kit comprende cualquier anticuerpo o polipéptido descrito en este documento.

10 En otros aspectos, los kits pueden usarse para cualquiera de los procedimientos descritos en este documento que incluyen, por ejemplo, para tratar un individuo con dolor (incluyendo dolor posquirúrgico, dolor por artritis reumatoide y dolor por osteoartritis). Los kits de la presente invención están en envases adecuados y opcionalmente pueden proporcionar componentes adicionales tales como tampones e instrucciones para el uso del anticuerpo en cualquiera de los procedimientos descritos en este documento. En algunas realizaciones, los kits incluyen instrucciones para tratar dolor. En algunas realizaciones, el kit comprende un anticuerpo antagonista anti-NGF descrito en este documento e instrucciones para tratar y/o prevenir dolor por artritis reumatoide en un individuo. En otras realizaciones, el kit comprende un antagonista de NGF (tal como un anticuerpo antagonista anti-NGF) descrito en este documento e instrucciones para tratar y/o prevenir dolor por osteoartritis en un individuo. En algunas de las realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF es el anticuerpo E3.

15 En otro aspecto, la invención proporciona kits que comprenden un polinucleótido que codifica un polipéptido E3 como se describe en este documento. En algunas realizaciones, los kits comprenden además instrucciones para el uso del polinucleótido en cualquiera de los procedimientos descritos en este documento.

#### **Procedimientos para ajustar la afinidad de un anticuerpo y procedimientos para caracterizar una cdr**

20 Los inventores han desarrollado un novedoso procedimiento para caracterizar una CDR de un anticuerpo y/o alterar (tal como mejorar) la afinidad de unión de un polipéptido, tal como un anticuerpo, llamado "mutagénesis por barrido de bibliotecas". Generalmente, la mutagénesis por barrido de bibliotecas trabaja del siguiente modo. Una o más posiciones de aminoácidos en la CDR se reemplazan por dos o más (tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20) aminoácidos usando procedimientos reconocidos en la técnica. Esto genera pequeñas bibliotecas de clones (en algunas realizaciones, una para cada posición de aminoácido que se analiza), cada una con un complejidad de dos o más miembros (si dos o más aminoácidos están sustituidos en cada posición). Generalmente, la biblioteca también incluye un clon que comprende el aminoácido nativo (sin sustituir). Un pequeño número de clones, por ejemplo, aproximadamente 20-80 clones (dependiendo de la complejidad de la biblioteca), de cada biblioteca se criba para afinidad de unión por el polipéptido diana, y se identifican candidatos con unión elevada, la misma, reducida o sin unión. Los procedimientos para determinar la afinidad de unión son muy conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, la afinidad de unión se determina usando el análisis de resonancia de plasmones superficiales BIAcore, que detecta diferencias en la afinidad de unión de aproximadamente 2 veces o superiores. BIAcore es particularmente útil cuando el anticuerpo de partida ya se une con una afinidad relativamente alta, por ejemplo, una  $K_D$  de aproximadamente 10 nM o inferior. El cribado usando resonancia de plasmones superficiales BIAcore se describe en los ejemplos, en este documento.

25 En otras realizaciones, la afinidad de unión se determina usando Kinexa Biocensor, ensayos de proximidad por centelleo, ELISA, inmunoensayo ORIGEN (IGEN), extinción de la fluorescencia, transferencia de la fluorescencia y/o expresión en levadura. En otras realizaciones, la afinidad de unión se criba usando un bioensayo adecuado.

30 En algunas realizaciones, cada posición de aminoácido en una CDR se sustituye (en algunas realizaciones, una a una) con los 20 aminoácidos naturales usando procedimientos de mutagénesis reconocidos en la técnica (algunos de los cuales se describen en este documento). Esto genera pequeñas bibliotecas de clones (en algunas realizaciones, una para cada posición de aminoácido que se analiza), cada una con una complejidad de 20 miembros (si los 20 aminoácidos están sustituidos en cada posición).

35 En algunas realizaciones, la biblioteca que va a cribarse comprende sustituciones en dos o más posiciones, que puede estar en la misma CDR o en dos o más CDR. Por tanto, en algunas realizaciones, la biblioteca comprende sustituciones en dos o más posiciones en una CDR. En otras realizaciones, la biblioteca comprende sustitución en dos o más posiciones en dos o más CDR. En otras realizaciones más, la biblioteca comprende sustitución en 3, 4, 5 o más posiciones, dichas posiciones encontradas en dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR. En algunas realizaciones, la sustitución se hace usando codones de baja redundancia. Véase, por ejemplo, la Tabla 2 de Balint y col. (1993) Gene 137(1):109-18).

40 En algunas realizaciones, la CDR es CDRH3 y/o CDRL3. En otras realizaciones, la CDR es una o más de CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 y/o CDRH3. En algunas realizaciones, la CDR es una CDR de Kabat, una CDR de Chothia o una CDR extendida.

Pueden secuenciarse candidatos con unión mejorada, identificándose así un mutante de sustitución de CDR que produce afinidad mejorada (también llamada una "sustitución mejorada"). Por ejemplo, como se demuestra en el Ejemplo 1, el uso de este procedimiento permitió la identificación de una única sustitución que mejoró la unión, incluso cuando un estimado de otras 18 sustituciones en la misma posición de aminoácidos no produjo unión (es decir, pérdida de la función del anticuerpo). Los candidatos que se unen también pueden secuenciarse, identificándose así una sustitución de CDR que retiene la unión.

En algunas realizaciones se realizan múltiples rondas de cribado. Por ejemplo, los candidatos (comprendiendo cada uno una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones de uno o más CDR) con unión mejorada también son útiles para el diseño de una segunda biblioteca que contiene al menos el aminoácido original y sustituido en cada posición de CDR mejorada (es decir, posición de aminoácido en la CDR en la que un mutante de sustitución mostró unión mejorada). La preparación, y el cribado o selección de esta biblioteca, se trata más adelante.

La mutagénesis por barrido de bibliotecas también proporciona un medio para caracterizar una CDR, en tanto que la frecuencia de clones con unión mejorada, la misma unión, unión reducida o sin unión también proporcionen información referente a la importancia de cada posición de aminoácido para la estabilidad del complejo anticuerpo-antígeno. Por ejemplo, si una posición de la CDR retiene la unión cuando se cambia a los 20 aminoácidos, entonces la posición se identifica como una posición que es poco probable que se requiera para la unión a antígeno. En cambio, si una posición de CDR retiene la unión en sólo un pequeño porcentaje de sustituciones, entonces la posición se identifica como una posición que es importante para la función de CDR. Por tanto, los procedimientos de mutagénesis por barrido de bibliotecas generan información referente a las posiciones en las CDR que pueden cambiarse a muchos aminoácidos diferentes (incluyendo los 20 aminoácidos), y posiciones en las CDR que no pueden cambiarse o que sólo pueden cambiarse a unos pocos aminoácidos. Este aspecto se trata y se ejemplifica en el Ejemplo 1.

En algunas realizaciones, candidatos con afinidad mejorada se combinan en una segunda biblioteca, que incluye el aminoácido mejorado, el aminoácido original en esa posición, y adicionalmente pueden incluir sustituciones adicionales en esa posición, dependiendo de la complejidad de la biblioteca que se desea, o se permite que usen el procedimiento de cribado o selección deseado. Además, si se desea, la posición de aminoácido adyacente puede aleatorizarse a al menos dos o más aminoácidos. La aleatorización de aminoácidos adyacentes puede permitir la flexibilidad conformacional adicional en el mutante CDR, que a su vez puede permitir o facilitar la introducción de un mayor número de mutaciones de mejora. En algunas realizaciones, la biblioteca también comprende la sustitución en las posiciones que no mostraron afinidad mejorada en la primera ronda de cribado.

La segunda biblioteca se criba o se selecciona para miembros de la biblioteca con afinidad de unión mejorada y/o alterada usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, que incluye cribado usando análisis de resonancia de plasmones superficiales BIAcore y selección usando cualquier procedimiento conocido en la técnica para la selección, que incluye expresión en fago, expresión en levadura y expresión en ribosomas.

#### *Ventajas de los procedimientos para ajustar la afinidad de un anticuerpo y caracterizar una CDR*

Los procedimientos son útiles para el cribado previo de posiciones de aminoácidos de CDR con el fin de identificar sustituciones de aminoácidos que mejoran la unión o retienen la unión. La identificación previa de residuos importantes, sustituciones que mejoran la unión y/o sustituciones que retienen la función del anticuerpo permite el diseño y cribado eficiente de una biblioteca de maduración por afinidad.

El presente procedimiento también es útil para caracterizar una CDR, y proporciona información completa referente a la importancia de cada posición de aminoácido en una CDR para unirse a antígeno. El presente procedimiento también puede usarse para identificar sustituciones que mejoran la unión.

El uso de bibliotecas pequeñas, en las que cada posición puede aleatorizarse (en algunas realizaciones, una a una), permite el cribado de mutantes de sustitución usando procedimientos sensibles tales como BIAcore que proporcionan información cinética detallada. Los procedimientos de cribado son generalmente poco prácticos cuando se criban bibliotecas más grandes. En su lugar, los procedimientos de selección, tales como expresión en fago, expresión en levadura y expresión en ribosomas, se usan comúnmente para identificar clones que retienen la unión. La expresión en fago y los ensayos de ELISA pueden depender mucho de la concentración de la muestra de proteína preparada a partir del clon y, por tanto, tienden a ser muy sesgadas hacia clones que tienen expresión elevada, estabilidad elevada o toxicidad reducida, en vez de identificar clones con afinidad de unión elevada. Además, las diferencias en el nivel de expresión de los clones pueden enmascarar pequeñas mejoras en la afinidad de unión. Estas desventajas son particularmente graves cuando un anticuerpo con alta afinidad de unión se usa como material de partida, debido a que deben usarse niveles muy bajos de antígeno con el fin de que el cribado sea suficientemente riguroso.

Por el contrario, los procedimientos de la divulgación, tales como aleatorización en cada posición (en algunas realizaciones, de una en una posición), permiten la introducción y caracterización del efecto de la sustitución de, por ejemplo, los 20 aminoácidos en una posición dada. Este análisis proporciona información sobre cuántas sustituciones son toleradas en una posición dada (es decir, retienen unión a anticuerpo) que, a su vez, proporciona

información referente a la importancia de cada aminoácido para la función del anticuerpo. Además, pueden identificarse sustituciones que producen unión mejorada, incluso bajo circunstancias en las que muchas o la mayoría de las sustituciones en una posición dada proporcionan anticuerpos no funcionales (de no unión). Por el contrario, la mutagénesis por barrido de alanina, que se usa comúnmente para identificar posiciones de CDR importantes, proporciona información referente a si la sustitución de alanina permite o evita la unión. Generalmente, las posiciones en las que una sustitución de alanina evita la unión se eliminan de la biblioteca de maduración por afinidad. En muchos casos, sin embargo, la alanina puede ser un mal sustituto en la posición de CDR.

Los presentes procedimientos también permiten la identificación y caracterización del efecto de mutaciones únicas de CDR. Por el contrario, procedimientos tales como la expresión en fago introducen y seleccionan muchas mutaciones simultáneamente y, por tanto, aumentan potencialmente el riesgo de que mutaciones positivas sean enmascaradas por la presencia de una mutación perjudicial presente en un clon particular.

Los presentes procedimientos también son útiles para mejorar la afinidad, a la vez que retienen la especificidad de unión del anticuerpo original (de partida), en tanto que los presentes procedimientos permitan la identificación de pequeños números de mutaciones (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5 mutaciones en una única CDR) que produzcan afinidad de unión mejorada. Por el contrario, procedimientos tales como la expresión en fago normalmente mejoran la afinidad de unión usando múltiples mutaciones a la vez que pueden producir el desplazamiento de la especificidad del anticuerpo y/o el aumento de reactividad cruzada no deseable.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar, pero no limitar, la invención.

## Ejemplos

### ***Ejemplo 1: Humanización y maduración por afinidad del anticuerpo anti-NGF antagonista de ratón 911***

#### **A. Procedimientos generales**

En este ejemplo se usaron los siguientes procedimientos generales.

#### **Generación de bibliotecas**

Se generaron bibliotecas por mutagénesis en casete por PCR con oligonucleótidos degenerados como se describe en Kay y col. (1996), Phage display of peptides and proteins laboratory manual, San Diego, Academic Press (véanse, páginas 277-291). El codón de dopaje NNK se usó para aleatorizar una posición de aminoácido para incluir 20 aminoácidos posibles. Para aleatorizar una posición de aminoácido para incluir sólo un subconjunto de aminoácidos con propiedades específicas se usaron codones de dopaje como se describe en Balint y col., (1993) Gene 137(1):109-18). La mutagénesis dirigida a sitio se realizó usando PCR recombinante como se describe en Innes Y col., (1990) PCR protocols: A guide to methods and applications (véase, pág. 177-183).

#### **Preparación de Fab a pequeña escala**

La expresión a pequeña escala en placa de 96 pocillos se optimizó cribando bibliotecas de Fab. A partir de *E. coli* transformada con una biblioteca de Fab, las colonias se recogieron para inocular tanto una placa maestra (agar LB + ampicilina (50 µg/ml) + 2% de glucosa) como una placa de trabajo (2 ml/pocillo, 96 pocillos/placa que contiene 1,5 ml de LB + ampicilina (50 µg/ml) + 2% de glucosa). Ambas placas se cultivaron a 30°C durante 8-12 horas. La placa maestra se almacenó a 4°C y las células de la placa de trabajo se sedimentaron a 5000 rpm y se resuspendieron con 1 ml de LB + ampicilina (50 µg/ml) + IPTG 1 mM para inducir la expresión de Fab. Las células se recogieron por centrifugación después de 5 h de tiempo de expresión a 30°C, luego se resuspendieron en 500 µl de tampón HBS-EP (tampón HEPES 100 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, 0,005% de P20, EDTA 3 mM). La lisis de células resuspendidas en HBS-EP se obtuvo por un ciclo de congelación (-80°C), luego descongelación a 37°C. Los lisados celulares se centrifugaron a 5000 rpm durante 30 min para separar residuos de células de sobrenadantes que contenían Fab. Entonces, los sobrenadantes se inyectaron en el aparato de resonancia de plasmones BIAcore para obtener información de afinidad para cada Fab. Los clones que expresan Fab se rescataron de la placa maestra para secuenciar el ADN y para la producción de Fab a gran escala y caracterización detallada como se describe más adelante.

#### **Preparación de Fab a gran escala**

Para obtener parámetros cinéticos detallados, los Fab se expresaron y se purificaron a partir de cultivos grandes. Matraces Erlenmeyer que contenían 200 ml de LB + ampicilina (50 µg/ml) + 2% de glucosa se inocularon con 5 ml de cultivo durante la noche de un clon de *E. coli* que expresa Fab seleccionado. Los clones se incubaron a 30°C hasta que se obtuvo una DO<sub>550nm</sub> de 1,0 y luego se indujeron sustituyendo el medio por 200 ml de LB + ampicilina (50 µg/ml) + IPTG 1 mM. Después de 5 h de tiempo de expresión a 30°C, las células se sedimentaron por centrifugación, luego se resuspendieron en 10 ml de PBS (pH 8). La lisis de las células se obtuvo por dos ciclos de congelación/descongelación (a -80°C y 37°C, respectivamente). El sobrenadante de los lisados celulares se cargó sobre columnas de Ni-NTA Superflow Sepharose (Qiagen, Valencia, CA) equilibradas con PBS, pH 8, luego se lavó con 5 volúmenes de columna de PBS, pH 8. Los Fab individuales se eluyeron en diferentes fracciones con PBS (pH

8) + imidazol 300 mM. Las fracciones que contenían Fab se reunieron y se dializaron en PBS, luego se cuantificaron por ELISA antes de la caracterización por afinidad.

### Preparación de anticuerpos completos

5 Para la expresión de anticuerpos completos, regiones variables de la cadena pesada y ligera se clonaron en 2 vectores de expresión de mamífero (Eb.911.E3 o Eb.pur.911.3E para la cadena ligera y Db.911.3E para la cadena pesada; descritos en este documento) y se transfectaron usando lipofectemina en células HEK 293 para la expresión transitoria. Los anticuerpos se purificaron usando proteína A usando procedimientos convencionales.

### Ensayo Biacore

10 Las afinidades de Fab anti-NGF y anticuerpos monoclonales se determinaron usando el sistema de resonancia de plasmones superficiales (SPR) BIAcore3000™ (BIAcore, INC, Piscaway NJ). Los chips CM5 se activaron con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del proveedor. El NGF humano se diluyó en acetato sódico 10 mM a pH 4,0 y se inyectó sobre el chip  
15 individuales se lograron dos intervalos de densidad de antígeno: 100-200 unidades de respuesta (UR) para estudios cinéticos detallados y 500-600 UR para ensayos de cribado. El chip se bloqueó con etanolamina. Los estudios de regeneración mostraron que una mezcla de tampón de elución Pierce (producto nº 21004, Pierce Biotechnology, Rockford IL) y NaCl 4 M (2:1) elimina eficazmente el Fab unido, a la vez que mantiene la actividad de hNGF sobre el chip durante más de 200 inyecciones. El tampón HB S-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15, EDTA 3 mM, 0,005% de tensioactivo P29) se usó como tampón de electroforesis para los ensayos BIAcore.

### 20 Ensayo de cribado

Se optimizó un ensayo BIAcore de cribado para determinar la afinidad de clones de Fab de bibliotecas. Los sobrenadantes de lisados de cultivos pequeños se inyectaron a 50 µl/min durante 2 min. Se usaron tiempos de disociación de 10 a 15 minutos para la determinación de una única constante de disociación exponencial ( $k_{dis}$ ) usando el software BIAevaluation. Las muestras que mostraron constantes de  $k_{dis}$  en el mismo intervalo que en el  
25 molde usado para crear la biblioteca (clon 8L2-6D5,  $k_{dis} 1 \times 10^{-3} s^{-1}$ ) se inyectaron para la confirmación y se permitieron tiempos de disociación de hasta 45 min para obtener mejores valores de  $k_{dis}$ . Los clones que mostraron valores de  $k_{dis}$  mejorados (más lentos) se expresaron a gran escala y los parámetros cinéticos completos,  $k_{as}$  y  $k_{dis}$ , se determinaron sobre la proteína purificada. El ensayo pudo detectar diferencias en la afinidad que fueron aproximadamente 2 veces o más.

### 30 Ensayo de determinación de la afinidad

Las diluciones seriadas (0,1-10x  $K_D$  estimada) de muestras de Fab purificadas se inyectaron durante 1 min a 100 µl/min y se permitieron tiempos de disociación de hasta 2 h. Las concentraciones de las proteínas de Fab se  
35 determinaron por ELISA y/o electroforesis en SDS-PAGE usando como patrón un Fab de concentración conocida (como se determina por el análisis de aminoácidos). Las constantes de asociación ( $k_{as}$ ) y las constantes de disociación ( $k_{dis}$ ) cinéticas se obtuvieron simultáneamente ajustando los datos a un modelo de unión 1:1 de Langmuir (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). Methods Enzymology 6. 99-110) usando el programa BIAevaluation. Los valores de la constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) se calcularon como  $k_{dis}/k_{as}$ .

### **B. Humanización y maduración por afinidad del anticuerpo anti-NGF antagonista de ratón 911**

40 El anticuerpo anti-NGF antagonista de ratón, 911 (véase Hongo y col., (2000) Hybridoma 19(3):215-227), se seleccionó para la humanización y maduración por afinidad. El Mab 911 se une a NGF humano y de rata con alta afinidad y presenta reactividad cruzada no significativa con las neurotrofinas NT3, NT4/5 o BDNF. Véase Hongo, ídem. La afinidad del fragmento Fab escindido con papaína de Mab 911 de ratón se determinó usando análisis BIAcore como se ha descrito anteriormente. El fragmento Fab escindido con papaína de Mab 911 de ratón se unió a NGF humano con una  $K_D$  de aproximadamente 10 nM.

45 La humanización y la maduración por afinidad se realizaron en varias etapas, del siguiente modo:

**(1) Preparación de molde injertado con CDR.** Las CDR extendidas de la cadena ligera del anticuerpo 911 (es decir, que incluyen las regiones CDR tanto de Kabat como de Chothia) se injertaron en las secuencias del aceptor de la línea germinal humana 08 con JK2 y las CDR extendidas de la cadena pesada del anticuerpo 911 se injertaron en la secuencia del aceptor de la línea germinal humana VH4-59 con JH4. Las secuencias de aminoácidos de las  
50 secuencias del aceptor de la línea germinal humana se muestran en las Figuras 1A y 1B. La numeración de aminoácidos es secuencial. Usando las regiones estructurales de proteínas observadas anteriormente, las secuencias de ADN se diseñaron para genes sintéticos que codificaban la región estructural humana con las CDR murinas. Estos dominios variables pesados y ligeros humanizados se llamaron hVH y hVL, respectivamente. Los codones se optimizaron para el uso en *E. coli* y hámster. Se usaron varios oligonucleótidos solapantes (69-90 bases de longitud) que extendían la longitud completa del hVL y hVH con dos cebadores flanqueantes cortos para cada  
55 cadena para sintetizar por separado los dos genes por PCR recursiva esencialmente como se describe en

Prodomou y col., (1992) *Protein Eng* 5(8): 827-9. Los fragmentos de ADN resultantes de la longitud correcta se purificaron en gel y luego se clonaron en un plásmido de expresión bicistrónico de *E. coli* (resistente a ampicilina). La expresión de los anticuerpos estuvo bajo el control de un promotor lacZ inducible por IPTG similar al descrito en Barbas (2001) *Phage display: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press (véase Vector pComb3X, en pg 2.10); sin embargo, las modificaciones incluyeron la adición y expresión de los siguientes dominios adicionales: el dominio constante de la cadena ligera kappa humano (véase el nº de acceso de GenBank CAA09181) y el dominio constante CHI de la inmunoglobulina humana IgG2a (nº de acceso de GenBank P01859).

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo injertado con CDR (también llamado el "molde"), llamado 8L2-4D5, también se muestran en las Figuras 1A y 1B. La afinidad de 8L2-4D5 se determinó usando el análisis BIAcore como se ha descrito anteriormente. 8L2-4D5 se unió a NGF humano con una  $K_D$  de aproximadamente 38 nM.

**(2) Introducción de una mutación puntual en la secuencia de la región estructural.** La sustitución V71K se introdujo en la cadena pesada injertada con CDR usando mutagénesis dirigida a sitio por PCR recombinante como se describe en Innes Y col., (1995) *PCR strategies*, San Diego, Academic Press. Esta sustitución sustituyó el residuo de la región estructural humana con el residuo de la región estructural de ratón correspondiente. El anticuerpo resultante se llamó 8L2-6D5, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 8L2-6D5 se muestra en la Figura 1A. La afinidad de 8L2-6D5 se determinó usando análisis BIAcore como se ha descrito anteriormente. El fragmento Fab 8L2-6D5 se unió a NGF humano con una  $K_D$  de aproximadamente 15 nM. 8L2-6D5 se eligió como molde para la maduración por afinidad.

**(3) Humanización y maduración por afinidad de las CDR L1, L2, H1 y H2.** Las CDR L1, L2, H1 y H2 se sometieron a humanización y maduración por afinidad. Se identificó que las posiciones de aminoácidos en CDR L1, L2, H1 y H2 no eran esenciales para la estructura de las CDR basándose en la estructura canónica de Chothia (véase Al-Lazikani y col. (1997) *J. Mol. Biol.* 273(4):927-48); y se sometieron a aleatorización del siguiente modo. Se prepararon dos bibliotecas que contenían las mutaciones de la cadena ligera o mutaciones de la cadena pesada mostradas en la Tabla 2, y las CDR L3 o CDR H3 injertadas (ratón), respectivamente, usando mutagénesis de casete por PCR con oligonucleótidos degenerados como se describe en Kay y col. (1996), *Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual*, San Diego, Academic Press, usando codones de dopaje como se describe en Balint y col., (1993) *Gene* 137(1):109-18). Generalmente, los residuos de aminoácidos se alteraron a residuos que son más comunes en anticuerpos humanos, basándose en alineamientos de las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo 911 con secuencias de anticuerpos de la línea germinal humana. El residuo de aminoácido natural (sin sustituir) también se representó en la biblioteca con la excepción del residuo 50 de CDR H2, una metionina, en la que la metionina natural no estaba representada en la biblioteca. Los residuos de metionina se someten a oxidación; por tanto, se esperaba que la sustitución de ese residuo mejorara la estabilidad del anticuerpo resultante. Las bibliotecas de Fab se clonaron en el vector pComb3X más las regiones CH1 y Ck humanas, como se ha descrito anteriormente.

**Tabla 2:**

*1. Biblioteca de cadenas pesadas H1/H2:*

CDR-H1

I34 se cambió a F, L, V, S, P, T, A o I

N35 se cambió a N, T, S o Y

CDR-H2

M50 se cambió a los 20 aminoácidos naturales

A62 se cambió a A o S

L63 se cambió a L o V

*2. Biblioteca de cadenas ligeras L1/L2*

CDR-L1

S26 se cambió a S, A, V, o F

D28 se cambió a D, A, S o Y

(continuación)

H32 se cambió a H, N, K, D, E, Q o Y

CDR-L2

Y50 se cambió a Y, D, A o S

I51 se cambió a I, T, A o V

F54 se cambió a F o L

S56 se cambió a S y T

- 5 Para los experimento de cribado de afinidad, cada biblioteca se emparejó adicionalmente con la cadena ligera o pesada injertada con CDR correspondiente (por ejemplo, la biblioteca H1/H2 se emparejó con la cadena ligera injertada con CDR), el anticuerpo se expresó y afinidad por NGF humano de los clones individuales se cribó usando el sistema de resonancia de plasmones superficiales (SPR) BIACORE (BIAcore, Inc. Piscataway, NJ) según las instrucciones del fabricante y como se ha descrito anteriormente. Se determinaron  $k_{dis}$ ,  $k_{as}$  y  $K_D$ . Los clones del anticuerpo se clasificaron basándose en las constantes  $k_{dis}$ , ya que generalmente la mayor variación en la afinidad se observa en las constantes  $k_{dis}$ , y además porque las constantes  $k_{dis}$  son independientes de la concentración de anticuerpo.
- 10 Se determinó la secuencia de clones que se unió y la secuencia de clones que se unió se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Secuencias de aminoácidos de L1 y L2, secuencias de aminoácidos de H1 y H2 y datos cinéticos para los clones que se unieron siguiendo el cribado de afinidad de clones de la biblioteca H1/H2 o L1/L2.

<b>Datos cinéticos de los mutantes CDR 1-2</b>				
Clones de la biblioteca de la cadena ligera emparejados con la cadena pesada 8L2	CDRL1 Secuencia de AA	CDRL2 Secuencia de AA	$k_{dis}$ (s-1)	* $K_D$ (nM)
8L2-6D5 (control)	RASQDISNHLN (SEC ID N°: 12)	YISRFHS (SEC ID N°: 13)	**1e-3	25
L129	RASQISISNNLN (SEC ID N°: 18)	YTSRFHS (SEC ID N°: 19)	4,5e-4	11
L208	RASQYISNHLN (SEC ID N°: 20)	YTSRFHS (SEC ID N°: 21)	4,6e-4	11
L97	RASQISISNQLN (SEC ID N°: 22)	YVSRFHS (SEC ID N°: 23)	5,6e-4	14
L81	RAFQAISNQLN (SEC ID N°: 24)	YISRFHT (SEC ID N°: 25)	7,4e-4	18
L6	RAFQISISNQLN (SEC ID N°: 26)	YASRFHS (SEC ID N°: 27)	8,2e-4	20
Clones de la biblioteca de la cadena pesada emparejados con la cadena ligera 6D5	CDRH1 Secuencia de AA	CDRH2 Secuencia de AA	$k_{dis}$ (s-1)	* $K_D$ (nM)
8L2-6D5 (control)	GFSLIGYDIN (SEC ID N°: 9)	MIWGDGTTDYNSAL (SEC ID N°: 10)	1e-3	25

(continuación)

<b>Datos cinéticos de los mutantes CDR 1-2</b>				
H109	GFSLIGYDSN (SEC ID N°: 28)	IIWGDGTTDYNSAL (SEC ID N°: 29)	1,6e-4	4
H19	GFSLIGYDLN (SEC ID N°: 30)	IIWGDGTTDYNSAV (SEC ID N°: 31)	2,4e-4	6
H222	GFSLIGYDVT (SEC ID N°: 32)	GIWGDGTTDYNSAV (SEC ID N°: 33)	3,8e-4	9,5
H225	GFSLIGYDVT (SEC ID N°: 34)	GIWGDGTTDYNSSV (SEC ID N°: 35)	3,8e-4	9,5
H18	GFSLIGYDAT (SEC ID N°: 36)	GIWGDGTTDYNSAV (SEC ID N°: 37)	4,2e-4	10,5
H9	GFSLIGYDVS (SEC ID N°: 38)	IIWGDGTTDYNSSV (SEC ID N°: 39)	4,1e-4	10,2
H227	GFSLIGYDIS (SEC ID N°: 40)	QIWGDGTTDYNSSV (SEC ID N°: 41)	5,4e-4	13,5
H17	GFSLIGYDAS (SEC ID N°: 42)	GIWGDGTTDYNSSV (SEC ID N°: 43)	6,1e-4	15,2
H28	GFSLIGYDST (SEC ID N°: 44)	SIWGDGTTDYNSAL (SEC ID N°: 45)	7,5e-4	18,7
AA en negrita se aleatorizaron como se indica anteriormente				
*K <sub>D</sub> calculada usando k <sub>as</sub> 4e4 M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>				
**Por comodidad, "e" como se usa en este documento denota "x10". Por tanto, 4e4 significa indistintamente 4x10 <sup>4</sup> .				

Las CDR que contienen las siguientes sustituciones retuvieron la unión:

CDR-H1

I34: S, L, V, I y A unidos.

N35: N, T y S unidos.

CDR-H2

M50: M, I, G, Q, S, L unidos.

A62: A y S unidos.

L63: L y V unidos.

CDR-L1

S26: S y F unidos.

D28: D, S, A, Y unidos.

H32: H, N, Q unidos.

CDR-L2

Y50: Y unidos.

I51: I, T, V, A, unidos.

F54: F unidos

S56: S y T unidos

Las CDR que contienen las siguientes sustituciones se seleccionaron generalmente basándose en la afinidad de unión y se combinaron en un único clon, llamado H19-L129:

- 5  
 CDR-H1: I34L; N35N (sin cambio)  
 CDR-H2: M50I; A62A (sin cambio); L63V  
 CDR-L1: S26S (sin cambio); D28S; H32N  
 CDR-L2: Y50Y (sin cambio); I51T; F54F (sin cambio); S56S (sin cambio)

10 Estas mutaciones se combinaron (amplificando las cadenas H y L por PCR, cortando los productos de PCR y el vector (pRN8) con enzima de restricción y realizando una ligación de 3 fragmentos) en un único clon, llamado H19-L129, que también incluyó las CDR H3 y L3 injertadas. La secuencia de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de H19-L129 se muestra en las Figuras 1A y 1B, y la Tabla 4 muestra la secuencia de aminoácidos de CDR L1, L2, H1 y H2. H19-L129 se unió a NGF con una  $K_D$  de aproximadamente 1 nM, como se determinó usando análisis BIAcore como se describe en este documento.

**Tabla 4:** Secuencia de aminoácidos de CDR H1, H2, L1 y L2 y datos cinéticos para el clon combinado H19-L129.

Clon de combinación: mutaciones en CDR H1, H2, L1, L2	CDRL1 CDRH1 Secuencia de AA	CDRL2 CDRH2 Secuencia de AA	$k_{dis}$ (s <sup>-1</sup> )	* $K_D$ (nM)
H19-L129	CDR-L1: RASQSISNNLN (SEC ID N°: 18) CDR H1: GFSLIGYDLN (SEC ID N°: 30)	CDRL2: YTSRFHS (SEC ID N°: 19) CDR-H2: IIWGDGTTDYNSAV (SEC ID N°: 31)	1,1e-4	3,5
* $K_D$ calculada usando $k_{as}$ 4e4 M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>				

15 **(4) Maduración por afinidad de CDR H3 y L3.** La maduración por afinidad de las CDR H3 y L3 se llevó a cabo en dos etapas. Primero, en un procedimiento llamado "mutagénesis por barrido de bibliotecas", cada residuo de aminoácido en H3 y L3 se cribó previamente individualmente con el fin de identificar posiciones de aminoácidos en las que una mutación produjo un aumento de la afinidad de unión por NGF humano. Basándose en los resultados de la mutagénesis por barrido de bibliotecas (también llamada "análisis de aleatorización de bibliotecas pequeñas") se seleccionó un subconjunto de posiciones de aminoácidos en H3 y L3 para la preparación de la biblioteca de maduración por afinidad, y la biblioteca de maduración por afinidad se cribó para la afinidad por NGF humano usando análisis BIAcore como se describe en este documento. Se aprecia que estas técnicas pueden aplicarse generalmente.

**(a) Mutagénesis por barrido de bibliotecas**

25 Cada posición de aminoácido en las CDR H3 y L3 se cribó previamente individualmente para sustituciones que produjeron un aumento de la afinidad de unión por NGF humano. La frecuencia de sustituciones de aminoácidos en cualquier posición dada que produjo unión mejorada, la misma unión, peor unión o sin unión proporcionó información referente a las posiciones en las CDR que pueden cambiarse a muchos aminoácidos diferentes (incluyendo los 20 aminoácidos), y posiciones en las CDR que no pueden cambiarse o que sólo pueden cambiarse a algunos aminoácidos. También se identificaron sustituciones de aminoácidos que produjeron un aumento de la afinidad de unión. Basándose en los resultados de este cribado se seleccionó un subconjunto de posiciones de aminoácidos en las CDR H3 y L3 para la preparación de una biblioteca de maduración por afinidad.

35 Se prepararon bibliotecas de Fab individuales en las que cada aminoácido de CDR L3 y H3 se aleatorizó a los 20 aminoácidos, uno cada vez, produciendo varias bibliotecas pequeñas (5 bibliotecas para la cadena ligera y 13 bibliotecas para la cadena pesada), cada una con una complejidad de 20 posibilidades de aminoácidos en cada posición de aminoácido. En todos los casos, el aminoácido nativo (es decir, sin cambiar) estaba representado en la biblioteca. Las bibliotecas se prepararon por mutagénesis en casete por PCR con oligonucleótidos degenerados como se describe en Kay y col. (1996), Phage display of Peptides and Proteins: a laboratory manual, San Diego, Academic Press, usando el codón de dopaje NNK para aleatorizar una posición de aminoácido para incluir 20 aminoácidos posibles. 8L2-6D5 (el anticuerpo injertado con CDR, que tiene la mutación de la región estructural V71K) sirvió de molde para la construcción de bibliotecas debido a que la menor afinidad del anticuerpo injertado con CDR permitió una detección más fácil de diferencias en la afinidad en mutantes H3 y L3 durante el cribado. Por tanto, cada miembro de una biblioteca contuvo una CDR3 (tanto H3 o L3) con una sustitución de aminoácidos, y 5 CDR injertadas.

5 Se cribaron 20-80 clones de cada biblioteca pequeña usando análisis BIAcore como se describe en este documento. Las muestras se analizaron simultáneamente por BIAcore para la afinidad de unión por NGF en un canal del chip BIAcore y para la presencia de Fab por unión a un anticuerpo penta-marca de his en otro canal del chip sensor para detectar la marca de his en el extremo C de la cadena pesada. Los clones que expresaron la proteína se clasificaron como que tenían la misma afinidad, peor afinidad, mejor afinidad o sin unión, usando  $k_{dis}$  para clasificar. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Los clones que expresaron la proteína se clasificaron como que tenían la misma afinidad, peor afinidad, mejor afinidad o sin unión, basándose en  $k_{dis}$ .

Mutación	Mejor que 1e-3<	Igual que $\geq$ 1e-3, 2e-3<	Peor que $\geq 2e-3$	Sin unión	Porcentaje de AA que retienen la capacidad de unión
<b>Cadena ligera</b>					
L_S91X	13%	40%	20%	26%	50%
L_K92X		100%			~100%
L_T93X		93%	7%		93%
L_L94X		40%	60%		40%
L_Y96X		13%	80%	7%	13%
<b>Cadena pesada</b>					
H_G98X		50%	37%	13%	50%
H_G99X		46%	54%		46%
H_Y100X		26%		73%	26%
H_Y101X	6%		12%	82%	6%
H_Y102X		7%	25	68%	7%
H_G103X	4%	21%	16%	58%	25%
H_T104X		20%	30%	50%	20%
H_S105X	10%	25%	26%	39%	35%
H_Y106X		75%	25%		75%
H_Y107X		8%	46%	46%	8%
H_F108X		23%	27%	50%	23%
H_D109X		29%	46%	25%	29%
H_Y110X		90%	5%	5%	90%

10 Se determinó la secuencia de todos los clones con afinidad mejorada, revelando la frecuencia e identidad de sustituciones de aminoácidos que produjeron el aumento de la afinidad. Además, de cada biblioteca se seleccionaron algunos clones que retuvieron una afinidad similar a la del clon 8I2-6D5 con el fin de determinar las sustituciones de secuencias de aminoácidos que se permitieron en una posición dada, aún cuando la sustitución no aumentó necesariamente la afinidad de unión. Los resultados de este análisis se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6.

<b>Mutaciones de CDR H3</b> (molde de 8L2-6D5, que incluye la secuencia de aminoácidos de CDR-H3 del anticuerpo 911: GGYYYGTSYYFDY (SEC ID N°: 11))	$k_{dis}$ ( $s^{-1}$ )	$K_D^*$ (nM)
	1E-3	25
Y100L	1,2E-3	30
Y100R	1,1E-3	27
Y101W	5,6E-4	14
G103A	1,6E-4	4
T104S	2,2E-3	55
S105A	5,1E-4	13
S105T	6,4E-4	16
Y106R	1,6E-3	40
Y106T	2,0E-3	50
Y106M	2,7E-3	67
Y107F	1,4E-3	35
F108W	1,22E-3	30
D109N	1,5E-3	37
D109G	1E-3	25
Y110K	1,4E-3	35
Y110S	1,5E-3	37
Y110R	1,6E-3	40
Y110T	1,7E-3	42
<b>Mutaciones de CDR L3</b> (molde de 8L2-6D5, que incluye la secuencia de aminoácidos de CDR-L3 (sin sustituir) natural: QQSKTLPYT (SEC ID N°: 14))	$k_{dis}$ ( $s^{-1}$ )	$K_D^*$ (nM)
	1E-3	25
S91E	2,5E-4	6
Y96R	1,7E-3	42
* $K_D$ calculada usando $k_{as}$ $4e4 M^{-1}s^{-1}$		

5 Varias mutaciones produjeron un aumento de la afinidad de unión. Al menos las siguientes mutaciones produjeron significativamente un aumento de la afinidad de unión en comparación con el molde de 8L2-6D5: (H\_Y101W (secuencia de CDR GGYWYGTSYYFDY (SEC ID N°: 46)); H\_S105A (secuencia de CDR GGYYYGTAYYFDY (SEC ID N°: 47)); H\_S105T (secuencia de CDR GGYYYGTTYFDY (SEC ID N°: 48)); H\_G103A (secuencia de CDR GGYYYATSYYFDY (SEC ID N°: 49); y L\_S91E (secuencia de CDR QQEKTLPYT (SEC ID N°: 50)).

Los resultados de este experimento se usaron para guiar la selección de posiciones de aminoácidos para la generación de las bibliotecas de maduración por afinidad.

10 Este experimento también proporcionó información referente a la frecuencia de sustituciones de aminoácidos en cualquier posición dada que produjo unión mejorada, la misma unión, peor unión o sin unión, como se muestra en la Tabla 5. Esta información permitió la identificación de posiciones de aminoácidos en las CDR que pudieron cambiarse a muchos aminoácidos diferentes (incluyendo los 20 aminoácidos) y posiciones en las CDR que pudieron

cambiarse a algunos aminoácidos o a muy pocos aminoácidos (en algunas realizaciones, sin aminoácidos). Estos resultados también demostraron sustituciones de aminoácidos que aumentaron la afinidad de unión.

**(b) Maduración por afinidad**

5 A continuación, los resultados del análisis de aleatorización de bibliotecas pequeñas (arriba) se usaron para seleccionar residuos para la producción de las bibliotecas de H3 y L3 para la maduración por afinidad de las CDR H3 y L3. Los residuos Y101 y G103 de CDR H3 y los residuos S91 y K92 de CDR L3 se seleccionaron para la producción de las bibliotecas de H3 y L3 para la maduración por afinidad de las CDR H3 y L3.

10 Esta biblioteca combinó las mutaciones en H3 y L3 al mismo tiempo en el clon injertado con CDR 8L2-6D5, y por separado en la referencia de H19-L129, y tuvo una diversidad de 80 clones diferentes. La Tabla 7 muestra los residuos de aminoácidos seleccionados para la sustitución y los aminoácidos que se sustituyeron en cada posición.

Tabla 7. Residuos de aminoácidos en H3 y L3 seleccionados para la sustitución y los aminoácidos que se sustituyeron en cada posición

**CDR-H3:**

15 Y101 se cambió a Y y W, C. (Obsérvese que C se incluyó debido a que el uso del codón TRS en un oligonucleótido degenerado también generó el codón C).

G103 se cambió a A, P, S

**CDR-L3:**

S91 se cambió a E.

K92 se cambió a los veinte aminoácidos. A, R, K, y H unidos.

20 Cada polipéptido se expresó como un Fab, y la afinidad por NGF humano de los 96 clones individuales se cribó para cada biblioteca usando el análisis BIAcore según las instrucciones del fabricante y descritas anteriormente. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8.**

<b>Mutaciones de COMBINACIÓN de CDR L3 H3</b>	$k_{dis}(s^{-1})$	$K_D^*(nM)$
(molde de 8L2-6D5)	1E-3	25
L_S91E; L_K92A (secuencia de CDR QQEATLPYT (SEC ID N°: 51)) H_Y101W; H_G103A (secuencia de CDR GGYWYATSYFFDY (SEC ID N°: 52))	5,5E-4	13
L_S91E; L_K92R (secuencia de CDR QQERTLPYT (SEC ID N°: 53)) H_Y101W; H_0103A (secuencia de CDR GGYWYATSYFFDY (SEC ID N°: 54))	1,0E-4	25
	1,1e-4	

(continuación)

<b>Mutaciones de COMBINACIÓN de CDR L3 H3</b>	kdis(s-1)	KD*(nM)
(molde de 8L2-6D5)	1E-3	25
L_S91E; L_K92H (secuencia de CDR QQEHTLPYT (SEC ID N°: 55)) H_Y401W; H_G103A (secuencia de CDR GGYWYATSYFFDY (SEC ID N°: 56)) (CLON E3)	1,2E-5	0,3
L_S91E; L_K92S (secuencia de CDR QQESTLPYT (SEC ID N°: 57)) H_Y101W; H_G103S (secuencia de CDR GGYWYSTSYFFDY (SEC ID N°: 58))	4,7E-5	1,1
L_K92K (secuencia de CDR QQEKTLPYT (SEC ID N°: 59)) H_Y101Y; H_G103A (secuencia de CDR GGYYYATSYFFDY (SEC ID N°: 60))	2E-5	0,5
L_S91E; L_K92R (secuencia de CDR QQERTLPYT (SEC ID N°: 61)) H_Y101W; H_G103A (secuencia de CDR GGYWYATSYFFDY (SEC ID N°: 62)) (CLON 3C)	1,4E-5	0,35
L_S91E; L_K92R (secuencia de CDR QQERTLPYT (SEC ID N°: 63)) H_Y101Y; H_G103A (secuencia de CDR GGYYYATSYFFDY (SEC ID N°: 64))	1,5E-5	0,37
*K <sub>D</sub> calculada usando k <sub>as</sub> 4e4 M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>		

Basándose en la afinidad de unión, los mejores clones, E3 (llamado indistintamente "3E") y 3C, se seleccionaron para la posterior caracterización. E3 comprendió las siguientes sustituciones de CDR: CDR-H3: Y101W, G103A; y CDR-L3: S91E, K92H, que se combinaron en un único clon que también incluyó las siguientes mutaciones de L1, L2, H1 y H2:

5

CDR-H1: I34L;  
CDR-H2: MS0I; L63V;  
CDR-L1: D28S; H32N;  
CDR-L2: I51T.

10 La secuencia de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de E3 se muestra en las Figuras 1A y 1B. 3C comprendió las siguientes sustituciones de CDR: CDR-L3: S91E; K92R; CDRH3: Y101W; G103A, que se combinaron en un único clon que también incluyó las mutaciones de L1, L2, H1 y H2 descritas para el clon 3E.

15 Las secuencias de 3E y 3C se clonaron en vectores de expresión de mamífero para la producción de Fab y anticuerpo completo, y se expresaron en células HEK293 y se purificaron usando cromatografía de Ni-NTA o proteína A. La proteína pura se cuantificó con exactitud por análisis de aminoácidos.

Las afinidades de unión por NGF humano de los Fab E3 y 3C se midieron usando el análisis BIAcore según las instrucciones del fabricante y como se ha descrito anteriormente, excepto que se usaron 100 UR de NGF sobre el chip para evitar un efecto de reunión. Brevemente, varias concentraciones de anticuerpos (Fab) se inyectaron

durante 2 minutos sobre un chip CM5 con 100 UR de NGF humano inmovilizado sobre el mismo, y se permitió que se disociara durante 1800 segundos. El anticuerpo 911 de ratón (Fab) se analizó como control. Los datos se analizaron usando el software BIAevaluation siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados del análisis del anticuerpo E3 y 911 se muestran en las Figuras 9 y 10. E3 se unió a NGF humano con una  $K_D$  de aproximadamente 0,07 nM (y con una  $K_{as}$  de aproximadamente  $6,0e5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  y una  $K_{dis}$  de aproximadamente  $4,2e-5 \text{ s}^{-1}$ ). 3C se unió a NGF humano con una  $K_D$  de aproximadamente 0,35 nM (con una  $K_{dis}$  de aproximadamente  $1,4E-5$ ). Por el contrario, el anticuerpo 911 de ratón se unió a NGF con una  $K_D$  de 3,7 nM,  $K_{dis}$  de  $8,4x10^{-5}\text{s}^{-1}$  y  $K_{as}$  de  $2,2x10^4 \text{ Ms}^{-1}$ .

El anticuerpo E3 (llamado indistintamente 3E) se seleccionó para el posterior análisis basándose en la alta afinidad de unión. Para probar la capacidad de E3 para prevenir la interacción de NGF con los receptores de NGF trkA y p75, 2,5 nM de NGF humano se premezclaron y se incubaron durante una hora con 0 a 50 nM del anticuerpo E3 (Fab). Después de la incubación, las muestras se inyectaron a 10 ul/minuto sobre un chip CM5 de BIAcore que contenía 260 UR de p75 (canal 2) y 600 UR de trkA (canal 3), y se determinó el porcentaje de unión. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 11. El aumento de las concentraciones del Fab E3 bloqueó la interacción de NGF con tanto p75 como trkA, como se muestra por la disminución de la señal (medida en UR), que indica que el Fab E3 bloquea la interacción de NGF humano con tanto trkA como p75. Cuando la concentración del anticuerpo E3 (Fab) igualó la concentración de NGF (a aproximadamente 2,5 nM de concentración de NGF), no se observó unión de NGF (como se muestra por una señal de cero). El hecho de que el cero de porcentaje de unión a receptor de NGF se produjera cuando la concentración de NGF fue igual a la concentración del anticuerpo 3E sugirió que NGF 2,5 nM fue al menos diez veces superior a la  $K_D$  de E3 para NGF y en equilibrio.

**Ejemplo 2: Evaluación de la capacidad de bloqueo de NGF de anticuerpos anti-NGF usando el ensayo de supervivencia de neuronas trigeminales E13.5 de ratón**

La capacidad de Fab E3 o anticuerpo completo E3 para bloquear la actividad de NGF se evaluó por medición de la capacidad del anticuerpo para inhibir la supervivencia dependiente de NGF de neuronas trigeminales E13.5 de ratón *in vitro*. El ganglio trigeminal comprende neuronas sensitivas cutáneas que inervan la región facial. La supervivencia de neuronas trigeminales E13.5 de ratón es un ensayo sensible para evaluar la actividad de bloqueo de NGF de anticuerpos antagonista anti-NGF debido a que se requiere NGF para soportar la supervivencia de estas neuronas. Por ejemplo, a concentraciones saturantes de NGF, la supervivencia es próxima al 100% a las 48 horas en cultivo. Por el contrario, menos del 5% de las neuronas sobreviven 48 horas en ausencia de NGF.

El ensayo de supervivencia se realizó del siguiente modo: ratones hembra Swiss Webster preñados apareados en periodos de 24 horas se sacrificaron por inhalación de  $\text{CO}_2$ . Los cuernos uterinos se extirparon y los embriones en el estadio embrionario E13.5 se extrajeron y se decapitaron. Los ganglios trigeminales se diseccionaron usando agujas de tungsteno electrolíticamente afiladas. Entonces, los ganglios se tripsinaron, se disociaron mecánicamente y se sembraron a una densidad de 200-300 células por pocillo en medio sin suero definido en placas de 96 pocillos recubiertas con poli-L-ornitina y laminina.

La actividad de bloqueo de Fab o anticuerpos anti-NGF se evaluó añadiendo a las neuronas trigeminales dosis variables de anticuerpos anti-NGF Mab 911 (Fab), 8L2-6D5; H19-L129; E3 y 3C; y NGF humano o de rata a las siguientes concentraciones: 0,4 ng/ml (~15 pM; esta concentración representó una concentración saturante de NGF para la supervivencia) y 0,04 ng/ml (~1,5 pM; esta concentración es aproximadamente la  $CI_{50}$ ). Después de 48 horas en cultivo, las células se sometieron a un protocolo de inmunocitoquímica automatizado realizado en una estación de trabajo de manipulación de líquidos Biomek FX (Beckman Coulter) del siguiente modo: fijación usando 4% de formaldehído, 5% de sacarosa y PBS; permeabilización usando 0,3% de Triton X-100 en PBS; bloqueo de los sitios de unión no específicos usando 5% de suero de cabra normal, 0,11% de BSA en PBS; e incubación secuencial con anticuerpos primario y secundario para detectar neuronas. El anticuerpo primario fue anticuerpo policlonal de conejo contra el producto génico de proteína 89.5 (PGP9.5, Chemicon), un marcador fenotípico neuronal establecido. El anticuerpo secundario fue Alexa Fluor 488 de cabra anti-conejo (Molecular Probes), junto con el colorante nuclear Hoechst 33342 (Molecular Probes) para marcar los núcleos de todas las células presentes en el cultivo. La adquisición de imágenes y el análisis de imágenes se realizaron en un sistema de obtención de imágenes Discovery-I/GenII (Universal Imaging Corporation). Las imágenes se adquirieron automáticamente a dos longitudes de onda para Alexa Fluor 488 y Hoechst 33342, usándose la tinción nuclear como punto de referencia para el sistema de autoenfoco basado en imágenes del sistema de obtención de imágenes, ya que la tinción nuclear está presente en todos los pocillos. Se seleccionaron objetivos apropiados y número de sitios obtenidos como imágenes por pocillo para cubrir la superficie entera de cada pocillo. El análisis de imágenes automatizado se estableció para contar el número de neuronas presentes en cada pocillo después de 48 horas en cultivo basándose en su tinción específica con el anticuerpo anti-PGP9.5. La cuidadosa elección del umbral de la imagen y la aplicación del filtro de selectividad basado en morfología e intensidad de fluorescencia produjeron un recuento preciso de las neuronas por pocillo.

Los resultados de este experimento demostraron que el Fab E3 bloqueó la actividad de NGF con una alta afinidad. Los resultados se muestran en las Figuras 4-6, y la Tabla 9.

La Figura 4 es una gráfica que muestra la supervivencia dependiente de NGF de neuronas E13.5 en presencia de concentración variable de NGF humano y de rata.

La Figura 5 es una gráfica que compara el efecto de bloqueo de NGF de diversos Fab en presencia de tanto 0,04 ng/ml de NGF humano (aproximadamente 1,5 pM; mostrado en el panel superior) como 0,4 ng/ml de NGF humano (aproximadamente 15 pM; mostrado en el panel inferior). 1,5 pM de NGF fue aproximadamente la  $CE_{50}$  de NGF que promovió la supervivencia, mientras que 15 pM representó una concentración saturante de NGF. La supervivencia de neuronas trigeminales de ratón E13.5 en diversas concentraciones de Fab E3; Fab 911 murino; y Fab H19-L129 y Fab 8L2-6D5 se evaluó como se ha descrito anteriormente. La  $CI_{50}$  (en pM) se calculó para cada Fab a cada concentración de NGF, y se muestra en la Tabla 9. Fab E3 bloqueó fuertemente la supervivencia de neuronas trigeminales dependiente de NGF humano, con una  $CI_{50}$  de aproximadamente 21 pM en presencia de NGF humano 15 pM, y una  $CI_{50}$  de aproximadamente 1,2 pM en presencia de NGF humano 1,5 pM. Los Fab 3C y H19-L129 también bloquearon fuertemente la supervivencia de neuronas trigeminales dependiente de NGF humano.

La Figura 6 es una gráfica que compara el efecto de bloqueo de NGF de diversos Fabs en presencia de tanto 0,04 ng/ml de NGF de rata (aproximadamente 1,5 pM; mostrado en el panel inferior) como 0,4 ng/ml de NGF de rata (aproximadamente 15 pM; mostrado en el panel superior). 1,5 pM de NGF fue aproximadamente la  $CE_{50}$ , mientras que 15 pM representó una concentración saturante de NGF. La supervivencia de neuronas trigeminales de ratón E13.5 en diversas concentraciones de Fab E3; Fab 911 murino; y Fab H19-L129 y 8L2-6D5 se evaluó como se ha descrito anteriormente. La  $CE_{50}$  (en pM) se calculó para cada Fab a cada concentración de NGF, y se muestra en la Tabla 9. Fab E3 bloqueó fuertemente la supervivencia de neuronas trigeminales dependiente de NGF humano, con una  $CI_{50}$  de aproximadamente 31,6 pM en presencia de NGF de rata 15 pM, y una  $CI_{50}$  de aproximadamente 1,3 pM en presencia de NGF de rata 1,5 pM. Los Fab 3C y H19-L129 también bloquearon fuertemente la supervivencia de neuronas trigeminales dependiente de NGF de rata.

**Tabla 9:**

<b>NGF humano</b>	$CI_{50}$ (en presencia de NGF 15 pM)	$CI_{50}$ (en presencia de NGF 1,5 pM)
	pM	pM
Fab 8L2-6D5	1580,5	461,8
Fab H19-L129	60,1	9,6
Fab 3E	<21,0	<1,2
Fab 3C	80,9	5,6
Fab 911	322,3	63,5
<b>NGF de rata</b>	$CI_{50}$ (NGF 15 pM)	$CI_{50}$ (NGF 1,5 pM)
	pM	pM
Fab 8L2-6D5	730,3	169,4
Fab H19-L129	31,0	6,0
Fab 3E	<8,3	<1,3
Fab 3C	31,6	6,0
Fab 911	161,0	34,6

En un experimento diferente, los inventores compararon la capacidad del anticuerpo completo E3 y Fab 3E para inhibir la supervivencia dependiente de NGF de neuronas E13.5 en presencia de 0,4 ng/ml (concentración saturante) de NGF humano: los resultados del análisis se muestran en la Figura 12. El anticuerpo completo E3 y Fab 3E mostraron niveles similares de inhibición de la supervivencia dependiente de NGF cuando la concentración de

anticuerpo completo y Fab se normalizaron al número de sitios de unión de NGF (Fab tiene un sitio de unión y el anticuerpo completo tiene dos sitios de unión). Estos resultados demostraron que no hubo efecto de avidéz debido a la unión de un anticuerpo completo con el NGF dímero.

5 En otro experimentos, los inventores compararon la capacidad de diversas concentraciones (20, 4, 0,8, 0,16, 0,032, 0,0064, 0,00128 y 0,0 nM) de anticuerpo E3, anticuerpo 911 y una inmunoadhesina de receptor trkA (que consiste en el dominio extracelular del receptor de NGF trkA fusionado con el dominio Fc de inmunoglobulina, CH2-CH3) para inhibir la supervivencia dependiente de NGF de neuronas E13.5 en presencia de 0,4 ng/ml (condiciones saturantes). Estos resultados se muestran en la Figura 13. Estos resultados demostraron que el anticuerpo E3 bloqueó NGF mejor que tanto el anticuerpo 911 como la inmunoadhesina de TrkA.

10 **Ejemplo 3: Evaluación de la especificidad del anticuerpo anti-NGF E3 usando ensayos de supervivencia de neuronas trigeminales y nodosas de ratón**

15 La capacidad del anticuerpo E3 para bloquear específicamente la actividad de NGF se evaluó por medición de la capacidad del anticuerpo para inhibir la supervivencia de neuronas trigeminales E17/18 de ratón *in vitro* en presencia de concentraciones saturantes de NGF, la neurotrofina relacionada con NGF NT3 o el factor neurotrófico no relacionado con NGF, la proteína estimulante de macrófagos (MSP). La supervivencia de neuronas trigeminales E17/18 de ratón es un ensayo sensible para evaluar la actividad de bloqueo de NGF de anticuerpos antagonista anti-NGF debido a que se requiere NGF para soportar la supervivencia de estas neuronas a mayores concentraciones que el nivel de NGF requerido para soportar la supervivencia de neuronas TG E13.5. La supervivencia de estas neuronas también está soportada por NT3 o MSP; por tanto, la supervivencia de estas neuronas también es un ensayo sensible para evaluar si el anticuerpo antagonista anti-NGF también bloqueó NT3 o MSP.

20 La capacidad del anticuerpo E3 para bloquear específicamente la actividad de NGF también se evaluó por medición de la capacidad del anticuerpo para inhibir la supervivencia de neuronas E17 nodosas de ratón en presencia de concentraciones saturantes de BDNF o NT4/5. La supervivencia de neuronas nodosas está soportada por BDNF o NT4/5; por tanto, la supervivencia de estas neuronas es un ensayo sensible para evaluar la capacidad de bloqueo de BDNF o NT4/5 del anticuerpo antagonista anti-NGF.

25 El ensayo de supervivencia se realizó del siguiente modo: ratones hembra Swiss Webster preñados apareados en periodos de 24 horas se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub>. Los cuernos uterinos se extirparon y los embriones (en el día embrionario 17 ó 18) se extrajeron y se decapitaron. Los ganglios trigeminales y nodosos se diseccionaron y se limpiaron. Entonces, los ganglios se tripsinaron, se disociaron mecánicamente y se sembraron a una densidad de 100-300 células por pocillo en medio sin suero definido en placas de 4 pocillos (Greiner) recubiertas con poli-L-ornitina y laminina.

30 Las neuronas trigeminales E17/18 se cultivaron tanto sin factores neurotróficos añadidos (control negativo) como en presencia de concentraciones saturantes de NGF humano (400 pM y 15 pM) (control positivo); NT3 (400 pM); o MSP (600 pM). Se establecieron cultivos por duplicado que incluyeron concentraciones variables de Fab E3 y 911 y anticuerpos completos. La concentración de Fab y anticuerpos completos se indicó por sitio de unión (por ejemplo, un anticuerpo completo contiene dos sitios de unión, mientras que un Fab contiene un sitio de unión).

35 Las neuronas nodosas E17 se cultivaron tanto en ausencia de factores neurotróficos añadidos (control negativo) como con concentraciones saturantes de BDNF (400 pM) (control positivo) o NT4/5 (400 pM) o factor de crecimiento no relacionado con NGF ILF (factor inhibidor de interleucina). Se usaron altas concentraciones de neurotrofinas, ya que el objetivo de este experimento era probar la especificidad de los anticuerpos. Se establecieron cultivos por duplicado que incluyeron de nuevo variar con y sin la adición de anticuerpos E3 y 911. Después de 48 horas en cultivo, el número total de neuronas que sobrevivió en cada pocillo bajo cada condición se determinó por recuento manual usando un microscopio de contraste de fase.

40 Los resultados de estos experimentos demostraron que los anticuerpos E3 y 911 bloquearon completamente la supervivencia que promovía los efectos de NGF sobre neuronas trigeminales E18. Por el contrario, los anticuerpos E3 y 911 no tuvieron efecto sobre la supervivencia de neuronas trigeminales promovidas por NT3 o MSP, o la supervivencia de neuronas nodosas promovidas por BDNF o NT4/5 o LIF. Estos resultados demostraron que el anticuerpo E3 poseyó especificidad selectiva por NGF, ya que no se detectó interacción entre estos anticuerpos y otras neurotrofinas relacionadas con NGF (NT3, NT4/5, BDNF) a concentraciones de 1000 veces a 10.000 veces superiores a una concentración eficaz para bloquear NGF. Además, estos resultados demostraron que la muerte neuronal observada en cultivos complementados con NGF de neuronas dependientes de NGF con la adición de anticuerpo o Fab E3 fue debida a una interacción específica entre estos anticuerpos y NGF y no fue debida a un efecto tóxico generalizado. También se probó el anticuerpo antagonista anti-NGF de ratón 911, y se observaron resultados similares. Obsérvese que debido a las altas concentraciones de neurotrofinas usadas, tanto el anticuerpo E3 como 911 están muy próximos a sus condiciones de valoración y era de esperar que se unieran a NGF a niveles similares debido a que las diferencias en la afinidad de unión de estos anticuerpos por NGF serían menos evidentes bajo estas condiciones.

Los resultados de estos experimentos se muestran en las Figuras 14, 15, 16 y 17. Los datos mostraron porcentaje

de supervivencia medio después de 48 horas en cultivo ( $\pm$  error estándar de la media,  $n=3$  para cada punto de datos) con respecto a la supervivencia observada en el control positivo para cada experimento (por ejemplo, 100% de supervivencia de neuronas trigeminales cultivadas en presencia de concentración saturante de NGF, y 100% de supervivencia de neuronas nodosas cultivadas en presencia de concentración de BDNF saturante, respectivamente). Las Figuras 14-15 son gráficas que muestran que el anticuerpo antagonista anti-NGF E3 o Fab E3 no inhibió la supervivencia promovidas por NT3 y MSP, incluso a concentraciones de anticuerpo de hasta 200 nM. Por el contrario, 20 nM del anticuerpo E3 o Fab 3E y Fab 911 bloquearon totalmente la supervivencia provocada por NGF. También se probó el anticuerpo antagonista anti-NGF de ratón 911, y se observaron resultados similares. Específicamente, la Figura 14 es una gráfica que muestra la comparación del efecto de diversas concentraciones (20 nM, 2 nM, o 0,2 nM) de Fab E3 (llamado "3E" en la figura) y el anticuerpo de ratón Fab 911 sobre la supervivencia de neuronas trigeminales E18 en presencia de neurotrofina no añadida (llamado "control"), NGF 400 pM (llamado "NGF-400pM), NT3 10 nM (llamado "NT3-10nM) o MSP 600 pM (llamado "MSP-600pM). La Figura 15 es una gráfica que representa la comparación del efecto de diversas concentraciones (200 nM y 80 nM) de anticuerpo Fab y completo E3 y el anticuerpo de ratón anticuerpo completo 911 y Fab de supervivencia de neuronas trigeminales E17 en presencia de neurotrofinas no añadidas (llamado "sin factor"), NGF 400 pM (llamado "NGF-400pM), NT3 10 nM (llamado "NT3-10nM) o MSP 600 pM (llamado "MSP-600pM).

Las Figuras 16-17 son gráficas que muestran que el anticuerpo antagonista anti-NGF E3 o Fab E3 no inhibió la supervivencia de neuronas nodosas E17 promovida por BDNF, NT4/5 o LIF. También se probó el anticuerpo antagonista anti-NGF de ratón 911, y se observaron resultados similares. Específicamente, la Figura 16 es una gráfica que muestra la comparación del efecto de diversas concentraciones (200 nM o 80 nM) de anticuerpo completo E3 (llamado "3E" en la figura), Fab E3, anticuerpo completo 911 o Fab 911 sobre la supervivencia de neuronas nodosas E17 en presencia de neurotrofinas no añadidas (llamado "sin factores"), BDNF 400 pM (llamado "BDNF-400pM), NT4/5 400 pM (llamado "NT4/5-400pM), o LIF 2,5 nM (llamado "LIP-2,5nM). La Figura 17 es una gráfica que muestra la comparación del efecto de diversas concentraciones (200 nM, 20 nM, 2 nM) de Fab E3 (llamado "3E" en la figura) o Fab 911 sobre la supervivencia de neuronas nodosas E17 en presencia de neurotrofinas no añadidas (llamado "control"), BDNF 400 pM (llamado "BDNF-400pM), NT4/5 400 pM (llamado "NT4/5-400pM) o LIF 2,5 nM (llamado "LIP-2,5nM).

#### **Ejemplo 4: Preparación de vectores de expresión de mamífero y expresión del anticuerpo E3 en células de mamífero**

Se diseñaron tres vectores de expresión de mamífero y se construyeron para su uso en la expresión del anticuerpo E3 en células de mamífero.

El vector Db.911.3E es un vector de expresión que comprende la región variable de la cadena pesada del anticuerpo E3 y la región constante de IgG2a humana, y es adecuado para la expresión transitoria o estable de la cadena pesada. Db.911.3E consiste en secuencias de nucleótidos correspondientes a las siguientes regiones: la región promotora del citomegalovirus murino (nucleótidos 1-612); un intrón sintético (nucleótidos 619-1507); la región codificante DHFR (nucleótidos 707-1267); péptido señal de la hormona de crecimiento humana (nucleótidos 1525-1602); región variable de la cadena pesada del anticuerpo 3E (nucleótidos 1603-1965); región constante de IgG2a de la cadena pesada humana que contiene las siguientes mutaciones: A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos con referencia a la secuencia de IgG2a natural; véase Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624); señal de poliadenilación tardía del SV40 (nucleótidos 2974-3217); región potenciadora del SV40 (nucleótidos 3218-3463); región f1 de fago (nucleótidos 3551-4006) y región codificante de beta-lactamasa (AmpR) (nucleótidos 4443-5300). Db.911.3E se depositó en la ATCC el 8 de enero de 2003, y se le asignó el nº de acceso de la ATCC PTA-4895.

El vector Eb.911.3E es un vector de expresión que comprende la región variable de la cadena ligera del anticuerpo E3 y la región constante de la cadena kappa humana, y es adecuado para la expresión transitoria o estable de la cadena ligera. Eb.911.3E consiste en secuencias de nucleótidos correspondientes a las siguientes regiones: la región promotora del citomegalovirus murino (nucleótidos 1-612); un intrón EF-1 humano (nucleótidos 619-1142); péptido señal de la hormona de crecimiento humana (nucleótidos 1173-1150); región variable de la cadena ligera del anticuerpo E3 (nucleótidos 1251-1571); región constante de la cadena kappa humana (nucleótidos 1572-1892); señal de poliadenilación tardía del SV40 (nucleótidos 1910-2153); región potenciadora del SV40 (nucleótidos 2154-2399); región f1 de fago (nucleótidos 2487-2942) y región codificante de beta-lactamasa (AmpR) (nucleótidos 3379-4236). Eb.911.3E se depositó en la ATCC el 8 de enero de 2003, y se le asignó el nº de acceso de la ATCC PTA-4893.

El vector Eb.pur.911.3E es un vector de expresión que comprende la región variable de la cadena ligera del anticuerpo E3 y la región constante kappa humana, y es adecuado para la expresión estable de la cadena ligera. Eb.pur.911.3E consiste en secuencias de nucleótidos correspondientes a las siguientes regiones: la región promotora del citomegalovirus murino (nucleótidos 1-612); intrón EF-1 humano (nucleótidos 619-1758); región codificante del gen pac (puromicina R) (nucleótidos 739-1235); región 5'UTR de hsp70 humana (nucleótidos 1771-1973); péptido señal de la hormona de crecimiento humana (nucleótidos 1985-2062); región variable de la cadena ligera del anticuerpo E3 (nucleótidos 2063-2383); región constante de la cadena kappa humana (nucleótidos 2384-2704); señal de poliadenilación tardía del SV40 (nucleótidos 2722-2965); región potenciadora del SV40 (nucleótidos 2966-3211); región f1 de fago (nucleótidos 3299-3654) y región codificante de beta-lactamasa (AmpR) (nucleótidos

4191-5048). Eb.pur.911.E3 se depositó en la ATCC el 8 de enero de 2003, y se le asignó el nº de acceso de la ATCC PTA-4894.

La expresión transitoria de células se realizó del siguiente modo: células CHO y HEK293T en placas de 150 mm se cotranfectaron transitoriamente con 25 ug de cada plásmido (es decir, un plásmido que contiene la cadena pesada y un plásmido que contiene la cadena ligera). El ADN se mezcló con 100 ul de lipofectamina 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Se dejó que los complejos de ADN-lípido se pusieran en contacto con las células en medio DMEM/F12 sin suero o antibióticos durante 5 horas. Tras esta incubación, los medios se cambiaron para la expresión a Opti-MEM (Invitrogen) sin ningún aditivo durante dos días. Los sobrenadantes de células que contenían anticuerpo se recogieron secuencialmente hasta cuatro veces con posterior sustitución del medio. Los sobrenadantes se purificaron por cromatografía de afinidad usando la resina de proteína A MapSelect (Amersham biosciences 17-5199-02). El anticuerpo se unió a la resina de proteína A en glicina 0,3 M, tampón NaCl 0,6 M a pH 8, luego se eluyó con tampón citrato 0,1 M a pH 3. Las fracciones que contenían el anticuerpo se neutralizaron inmediatamente con tampón Tris 1 M a pH 8,0. Entonces, las fracciones de anticuerpo se dializaron y concentraron en PBS.

#### **Ejemplo 5: El anticuerpo anti-NGF E3 es eficaz en el tratamiento de dolor posquirúrgico**

Los inventores usaron un modelo de dolor que imita el dolor posquirúrgico para evaluar la eficacia del tratamiento con anticuerpo E3. El anticuerpo E3 comprendió la región constante de IgG2a de la cadena pesada humana que contiene las siguientes mutaciones: A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos con referencia a la secuencia de IgG2a natural; véase Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624); la región constante kappa de la cadena ligera humana; y las regiones variables de la cadena pesada y ligera mostradas en la Tablas 1A y 1B.

Animales. Ratas Sprague Dawley macho que pesaban entre 220-240 gramos se compraron de Harlan (Wisconsin) y se aclimataron a la instalación del animal durante una semana antes de la cirugía.

Cirugía. La cirugía se basó en el procedimiento descrito por Brennan y col. Pain 64:493-501 (1996). Los animales se anestesiaron con 2% de isoflurano en mezcla con aire que se mantuvo durante la cirugía por un cono nasal. La superficie plantar de la pata trasera derecha se preparó con una almohadilla de povidona-yodo, y se hizo una incisión longitudinal central de 1 cm a través de la piel y la fascia, empezando 0,5 cm desde el borde del talón y extendiéndose hacia los dedos. Las mediciones se hicieron con una regla con el pie mantenido en una posición flexionada. El músculo plantar se elevó usando pinzas curvas y se hizo una incisión longitudinalmente. Se hizo una incisión en el músculo a través de su profundidad completa, entre el origen y la inserción. El sangrado se controló mediante cirugía por presión aplicada a través de una almohadilla de gasa. La herida se cerró con dos suturas de colchonero (monofilamento negro 5-0 Ethicon). Estas suturas se anudaron 5-6 veces, con el primer nudo atado sin apretar. El sitio de la herida se limpió con hisopo con disolución de bacitracina. Se dejó que los animales se recuperaran y descansaran en jaulas limpias durante dos horas o más antes de empezar la prueba de comportamiento.

Evaluación del dolor en reposo. Se usó una puntuación de dolor acumulada para evaluar el dolor relacionado con la carga de peso. Los animales se colocaron en una malla de plástico (rejilla: 8 mm<sup>2</sup>) en jaulas de plástico limpias que se elevaron sobre una plataforma (h: 18") permitiendo la inspección de la parte inferior de sus patas. Después de un periodo de aclimatación de 20 minutos, la carga de peso se evaluó en una escala de 0 a 2. Se dio una puntuación de 0 si la pata estaba pálida o presionada contra la malla, que indica carga de peso completo. Se dio una puntuación de 1 si la pata no estaba forzada tocando justamente la piel la malla, sin palidecimiento o indentación de la piel. Se dio una puntuación de 2 si la pata era completamente mantenida lejos de la malla. El estremecimiento de la pata se consideró un 2 si la rata estaba todavía en reposo. Cada animal se observó durante 1 minuto cada 5 minutos durante 30 minutos. La suma de las 6 puntuaciones (0-12) obtenidas durante ½ hora se usó para evaluar el dolor en el pie en el que se había practicado la incisión. También se calculó la frecuencia de puntuaciones de 2 y se usó para evaluar la incidencia de dolor grave o la protección total de la pata por el animal. Cada animal se probó 24 horas antes de la cirugía (nivel inicial) y 2 h, 24 h, 48 h y 72 h posoperativamente. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 1, que representa la puntuación de dolor en reposo acumulada observada en animales tratados con 35 mg/kg de anticuerpo de ratón anti-NGF 911. Estos resultados demostraron que el tratamiento con anticuerpo anti-NGF redujo significativamente el dolor en reposo posquirúrgico. La carga de peso estableció una buena correlación sobre cómo de dispuesto estaba el animal a usar la extremidad y, por tanto, fue una medida eficaz del alivio del dolor.

El anticuerpo E3 se inyectó intraperitoneal (i.p.) a diversas concentraciones de anticuerpo (0,004, 0,01, 0,02, 0,1, 0,6 y 1 mg por kilogramo de peso del animal) 15 horas antes de la incisión. El grupo de control negativo no recibió anticuerpo, pero se inyectó i.p. con una solución salina. Se inyectó fentanilo a 0,01 mg/kg i.p. como control positivo 30 minutos antes de la prueba 24 horas después de la cirugía. En cada experimento participaron 8 animales (n=8 por grupo) para cada condición, y el grupo de control tuvo 56 animales. Se realizó la cirugía y se midió una puntuación de dolor acumulada como se ha descrito anteriormente. El dolor en reposo se evaluó veinticuatro horas después de la cirugía.

Como se muestra en la Figura 7, el anticuerpo anti-NGF humanizado E3 redujo significativamente el dolor en reposo

( $p < 0,05$ ) después de la cirugía cuando se administró a 0,02 mg/kg a 1 mg/kg de dosificación. Un “\*” denota una diferencia significativamente significativa del control ( $p < 0,05$ ). El tratamiento con 0,02 mg/kg alivió el comportamiento de dolor al menos tan eficazmente como el tratamiento con 0,01 mg/kg de fentanilo. Esta dosis de fentanilo es 10 veces la dosis humana normal de este potente opioide.

- 5 En otro experimento se probó la eficacia del anticuerpo E3 en reducir el dolor posquirúrgico cuando se administró posquirúrgicamente. El anticuerpo E3 (0,5 mg/kg) se inyectó intravenosamente (i.v.) dos horas después de la cirugía. El grupo de control no recibió anticuerpo, pero se inyectó i.v. con una solución salina. Se realizó la cirugía y el dolor en reposo expresado como una puntuación de dolor acumulada se evaluó 24 horas después de la cirugía. Como se muestra en la Figura 8, el tratamiento con anticuerpo anti-NGF redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) el dolor en reposo a las veinticuatro horas después de la incisión cuando el anticuerpo se administró 2 horas después de la incisión. Estos resultados demostraron que el anticuerpo E3 alivió eficazmente el dolor posquirúrgico cuando se administró después de la cirugía.

**Ejemplo 6: Evaluación de efectos analgésicos del anticuerpo antagonista anti-NGF 911 en un modelo de rata de artritis reumatoide**

- 15 Los efectos analgésicos del anticuerpo anti-NGF, 911 (véase Hongo y col., *Hybridoma* 19(3):215-227 (2000)) en artritis crónica inducida por adyuvante completo de Freund (CFA) en ratas se investigaron usando la prueba de vocalización en comparación con indometacina usada como sustancia de referencia.

20 En este estudio se incluyeron cincuenta (50) ratas Lewis macho (LEWIS LEW / Crl Ico) (Charles River Belgium) que pesaban 150 g a 220 g al principio de la fase experimental. Todos los animales se mantuvieron durante al menos 5 días antes del experimento, y se alojaron en una habitación de temperatura (19,5-24,5°C), humedad relativa (45-65%) y ciclo de 12 h de luz/oscuridad controlado con acceso a voluntad a agua de grifo filtrada y pienso de laboratorio en gránulos convencional (U.A.R., France) durante todo el estudio. Los animales se identificaron individualmente en la cola.

25 En el día 0 (D 0), la artritis se indujo en ratas por inyección intradérmica en la cola de 0,05 ml de una suspensión de *Mycobacterium butyricum* (Difco, USA) en aceite mineral (10 mg/ml). En el día 14 (D 14), las ratas artríticas se incluyeron en el estudio según su capacidad para vocalizar tras la flexión suave de la pata trasera y por su índice de artritis, evaluado usando una puntuación de inflamación para cada pata trasera y delantera (véase Kuzuna y col., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 23:1184-1191 (1975); Pearson y col., *Arthritis Rheum.* 2:440-459 (1959)). Los animales se puntuaron basándose en los siguientes criterios: puntuación 0: aspecto normal; puntuación 1: eritema; puntuación 30 2: eritema con ligero edema; puntuación 3: fuerte inflamación sin anquilosis; puntuación 4: anquilosis. En el estudio sólo se incluyeron los animales que pueden vocalizar tras la flexión suave y presentar una puntuación de 2 ó 3.

35 Cuatro grupos de 10 ratas cada uno se incluyeron en el estudio. Para el grupo 1 (vehículo), en el día 14 (D 14), después de la selección, a las ratas se les administró intravenosamente vehículo (solución salina). En el día 18 (D 18), la intensidad nociceptiva se evaluó por la flexión suave de la pata trasera y la intensidad del nivel de vocalización se registró para cada animal. Para el grupo 2 (4 días), en D 14, después de la selección, a las ratas se les administró intravenosamente 911 (10 mg/kg). En el día 18 (D 18), la intensidad nociceptiva se evaluó por la flexión suave de la pata trasera y la intensidad del nivel de vocalización se registró para cada animal. Para el grupo 3 (24 horas), en el día 17 después de inyección de CFA, a las ratas se les administró intravenosamente 911 (10 mg/kg). La intensidad nociceptiva se evaluó por la flexión suave de la pata trasera 24 horas después, y la intensidad del nivel de vocalización se registró para cada animal. Para el grupo 4 (indometacina), en el día 18 (D 18), la intensidad nociceptiva se evaluó por la flexión suave de la pata trasera una hora después de la administración por vía oral de indometacina (10 mg/kg). La intensidad del nivel de vocalización también se registró para cada animal. Las sustancias de prueba se administraron de un modo ciego y al azar por vía intravenosa bajo un volumen de 5 ml/kg, mientras que la indometacina se administró por vía oral bajo un volumen de 10 ml/kg.

45 Los efectos analgésicos del anticuerpo anti-NGF 911 se muestran en la Tabla 10. Los resultados se expresaron para cada grupo como la intensidad nociceptiva evaluada por la intensidad del nivel de vocalización registrada para cada animal en mV (media  $\pm$  SEM), y el porcentaje de variación de la intensidad nociceptiva calculado a partir del valor medio del grupo tratado con vehículo. La significancia estadística entre los grupos tratados y el grupo de vehículo se determinó con una prueba de Dunnett usando la varianza residual después de un análisis unilateral de la varianza (P < 0,05).

Tabla 10. Efectos analgésicos de 911 en artritis crónica inducida por adyuvante completo de Freund en ratas

Sustancias (Día de dosificación)	Vehículo (D 14)	911 (D 14)	911 (D 17)	Indometacina (D 18)
Dosis (mg/kg)		10	10	10
Intensidad nociceptiva (mV)	971,0 ± 116,2	234,7 ± 34,4 *	247,2 ± 41,8*	145,8 ± 29,9 *
% de variación	-	-76	-75	-85

Los resultados se expresan como media ± eem

n=10 ratas por grupo

Día 0 (D 0): Inducción de artritis crónica por administración de CFA

Vehículo: solución salina

911 (10 mg/kg) se administró intravenosamente en el D 14 o D 17 y la medición del dolor se realizó en D 18. La indometacina (10 mg/kg) se administró por vía oral en D 18 y la medición del dolor se realizó una hora después de la dosificación. Prueba de Dunnett: \* indica una diferencia significativa en comparación con el grupo tratado con vehículo para P<0,05

Como se muestra en la Tabla 10, el anticuerpo anti-NGF 911 redujo significativamente el dolor en un modelo de rata de artritis reumatoide 24 horas o 4 días después de una única administración del anticuerpo.

5 *Ejemplo 7: Efectos farmacológicos del anticuerpo antagonista anti-NGF E3 y 911 en un modelo de rata de artritis reumatoide*

Los efectos farmacológicos (efectos antiinflamatorios y analgésicos) del anticuerpo antagonista anti-NGF E3 y 911 se investigaron en un modelo de artritis crónica inducida por adyuvante completo de Freund (CFA) en ratas en comparación con indometacina usada como una sustancia de control positivo interno. Los efectos analgésicos de E3 y 911 se evaluaron por la medición de la respuesta nociceptiva. Los efectos antiinflamatorios se evaluaron por el volumen de las patas, índice de artritis (puntuación de inflamación), peso corporal y de las pata traseras. Los niveles de citocinas de las patas (IL-6, IL-1β, TNF-α y TGF-β1), TGF-β1 en circulación en suero, concentraciones en plasma de E3 y 911, parámetros biológicos y radiografías de rayos X se realizaron al final del experimento.

Protocolo experimental

15 1. Diseño del estudio

En este estudio se incluyeron 80 ratas Lewis macho (LEWIS Lew / Ico) (Charles River Laboratories - Bélgica) de 5 semanas de edad. Se alojaron en una habitación de temperatura (19,5-24,5°C) y humedad relativa (45-65%) controlada con un ciclo de 12 h de luz/oscuridad, con acceso a voluntad a agua de grifo filtrada y pienso de laboratorio en gránulos convencional (SAFE, France) durante todo el estudio. Tras la recepción en las instalaciones de los animales, se alojaron 5 por jaula y antes de cualquier prueba se observaron un periodo de aclimatación de 10 días. Los animales se identificaron individualmente en la cola.

En este estudio se incluyeron cinco grupos de 10 animales cada uno (ratas Lewis macho de 5 semanas de edad - LEWIS Lew/Ico, de Charles River Laboratories - Bélgica): Grupo 1: ratas no artríticas / solución salina (vehículo), bolo i.v., n=10; Grupo 2: ratas artríticas / solución salina (vehículo), bolo i.v., n=10; Grupo 3: ratas artríticas / indometacina 3 mg/kg, p.o. diariamente durante 10 días, n=10; Grupo 4: ratas artríticas / E3, 1 mg/kg , bolo i.v., n=10; Grupo 5: ratas artríticas / 911, 10 mg/kg, bolo i.v., n=10. Las dosis se expresaron en términos de sustancia activa libre (mg/kg). E3 y 911 se prepararon extemporáneamente en solución salina a partir de la disolución madre a la concentración deseada. E3 1 mg/kg: 3,41 ml de la disolución madre (0,88 mg/ml) c.s.p. 15 ml de solución salina. 911 10 mg/kg: 12 ml de la disolución madre (2,5 mg/ml) c.s.p. 15 ml de solución salina. Todas las disoluciones diluidas (antes de la inyección i.v.) se esterilizaron usando una unidad de filtro estéril de 0,20 μm. Los valores de pH y osmolaridad de las disoluciones diluidas se midieron antes de cada inyección i.v. Antes de la primera i.v., la osmolaridad (mosm/l) para la solución salina, E3 y 911 fueron 278, 269; y 308, respectivamente; el pH para la solución salina, E3 y 911 fueron 5,93, 6,76, 6,71 respectivamente. Antes de la segunda i.v., la osmolaridad (mosm/l) para solución salina, E3 y 911 fueron 280, 270 y 309 respectivamente; el pH para la solución salina, E3 y 911 fueron 5,86, 6,72 y 6,59 respectivamente.

Se administraron E3 o 911 o solución salina por inyección en bolo i.v. en el día 14 y el día 19 después de la inducción de artritis en un orden codificado y al azar con un volumen de 5 ml/kg. El grupo no artrítico se administró por inyección en bolo i.v de solución salina en el día 14 y el día 19 con un volumen de 5 ml/kg. La indometacina se preparó extemporáneamente en 1% de metilcelulosa. La indometacina se administró por vía oral (p.o.) una vez al

día durante 10 días desde el día 14 hasta el día 23 después de la inducción de artritis en un orden codificado y al azar con un volumen de 10 ml/kg.

## 2. Inducción de artritis

5 En el día 0 (D 0), la artritis se indujo en 70 ratas por inyección intradérmica en la cola de 0,05 ml de una suspensión de *Mycobacterium butyricum*. Un grupo de 10 ratas no recibió ninguna inyección intradérmica (ratas no artríticas). En el día 14 (D 14), las ratas artríticas se incluyeron en el estudio usando los siguientes criterios: todos incluyeron ratas que mostraron un aumento del volumen de las patas medio (media del volumen de la pata izquierda y derecha) de al menos 0,30 ml en comparación con el volumen de las patas medio (media del volumen de la pata izquierda y derecha) en el grupo no artrítico (medición del volumen de las patas como se describe más adelante); todos incluyeron ratas que mostraron una vocalización tras flexión suave (la medición de la respuesta nociceptiva como se describe más adelante); y todos incluyeron ratas que mostraron una puntuación del índice de artritis de 2-3 en cada pata trasera (medición del índice de artritis como se describe más adelante) (los animales con una puntuación de 0, 1 ó 4 se desecharon).

## 3. Peso corporal

15 Los animales se pesaron una vez al día desde el día 0 hasta el día 24 (excepto durante los días del fin de semana antes el tratamiento: D 1, D 2, D 8, D 9, D 10). Todas las mediciones se realizaron entre 9:00 y 12:00 am, excepto en D 14 (7:30 - 9:00 am) y D 24 (7:30 - 8:00 am).

## 3. Medición del volumen de las patas

20 El volumen de las patas traseras derecha e izquierda de cada rata (ratas artríticas y no artríticas) se midió usando un pletismómetro. Las mediciones se realizaron en los siguientes momentos (después de la inducción de artritis): Día 14 (antes del bolo i.v. o administración p.o.); y día 24 (5 días después de la última inyección en bolo i.v. o 24 h después de la última administración p.o.). Todas las mediciones se realizaron entre 9:00 y 12:00 am. Todos los datos se recogieron y se guardaron por el software WinDas.

## 4. Índice de artritis

25 El índice de artritis se evaluó usando una puntuación de inflamación para cada pata trasera y delantera (ratas artríticas): puntuación 0: aspecto normal; puntuación 1: eritema; puntuación 2: eritema con ligero edema; puntuación 3: fuerte inflamación sin anquilosis; puntuación 4: anquilosis. Esta evaluación se realizó en los siguientes momentos (después de la inducción de artritis): día 14 (antes del bolo i.v. o administración p.o.); y día 24 (5 días después de la última inyección en bolo i.v. o 24 h después de la última administración p.o.). Todas las mediciones se realizaron entre 2:00 y 3:00 pm (D 14); 8:00 y 9:00 am (D 24). Todos los datos se recogieron y se guardaron por el software WinDas.

## 5. Medición de la respuesta nociceptiva (prueba de vocalización)

35 La respuesta nociceptiva se evaluó por la flexión suave de la pata trasera derecha e izquierda repetidamente 2 veces a intervalos de 4 a 5 s con un dedo del operador (ratas artríticas). La intensidad del nivel de vocalización se registró para cada animal para cada pata trasera (2 veces: en la pata trasera derecha: s1 y s3; 2 veces: en la pata trasera izquierda: s2 y s4). Esta evaluación se realizó en los siguientes momentos (después de la inducción de artritis): día 14 (antes del bolo i.v. o administración p.o.); día 18 (antes de la segunda inyección en bolo i.v. o 1 h después de la administración p.o.); y día 24 (5 días después de la última inyección en bolo i.v. o 24 h después de la última administración p.o.). Todas las mediciones se realizaron entre 9:00 y 12:00 am, excepto en el D 14 (7:30-9:00 am) y D 24 (7:30 - 9:00 am).

## 6. Recogida de sangre para la medición de la concentración de E3 o 911 y TGF-β1 en circulación y parámetros hematológicos

45 En el día 24 (después de las mediciones del volumen de las patas e índice de artritis y la prueba de vocalización), bajo anestesia general usando isoflurano (en una mezcla de oxígeno y óxido nitroso), se recogieron muestras de sangre (aproximadamente 800-1000 µl) por acción capilar con una micropipeta del seno retroorbital.

*Medición de la concentración de E3 o 911* (grupos 2, 4 y 5): una parte de la muestra de sangre se recogió en tubos que contenían Li-heparina (mantenidos sobre hielo) y se centrifugaron a 2500-3000 g durante 10 min. Se obtuvieron muestras de sangre (al menos 100 µl), se congelaron en nitrógeno líquido, se guardaron a -80°C. Una muestra se hemolisó ligeramente (rata artrítica tratada con vehículo n° 36).

50 *Medición de TGF-β1 en circulación* (grupos 1-2-3-4-5): una parte de la muestra de sangre se recogió en microtubos para la preparación de suero a temperatura ambiente. Tras la recogida de muestras, la sangre se mezcló y se dejó que coagulara durante 30 minutos antes de la centrifugación. Los tubos se centrifugaron a aproximadamente 6000 g durante 3 minutos. Cada muestra de suero (al menos 100 µl, excepto para la rata n° 52 y n° 53) se tomó en alícuotas y se guardó a -20°C hasta la activación de muestras para el análisis de TGF-β1. Estas alícuotas (50 viales) se

mantuvieron durante un periodo de 6 meses a partir del fin del estudio. Algunas muestras se hemolisaron ligeramente (rata no artrítica tratada con vehículo nº 2, nº 5, nº 9, nº 10; rata artrítica tratada con vehículo: nº 53, nº 63; rata artrítica tratada con E3 nº 31, nº 51; rata artrítica tratada con 911: nº 52, 62, nº 64). Los niveles de TGF- $\beta$ 1 se midieron usando el kit de ELISA para TGF- $\beta$ 1 humano (ref. DB100, lote 212258 y 213610, R&D Systems - Francia).

Recogida de sangre para parámetros hematológicos (grupos 1-2-3-4-5: 50 viales): una parte de la muestra de sangre se recogió en tubos que contenían K3 - EDTA (al menos 100  $\mu$ l). La determinación de parámetros se realizó en el día de la recogida y las muestras no se almacenaron. Los parámetros hematológicos que incluyen glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas, hemoglobina, hematocrito se midieron con un contador de células de hematología (D 24). No se midieron algunos parámetros hematológicos debido a las muestras coaguladas (rata no artrítica tratada con vehículo: nº 10; ratas artríticas tratadas con E3: nº 59, nº 67; ratas artríticas tratadas con 911: nº 16).

#### 7. Niveles de citocinas en las patas

En el día 24 (5 días después de la última inyección en bolo i.v. o 24 horas después de la última administración p.o.) (después de las radiografías de rayos X), cada pata trasera del animal (ratas artríticas y no artríticas) se pesó y se recogió en un vial de polietileno etiquetado. La muestras de tejido se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C.

*Preparación de homogeneizados de articulaciones:* Patas traseras congeladas se pulverizaron usando Bio-Pulverizer. Entonces, las patas traseras en polvo se colocaron en un tubo de centrifuga cónico de 50 ml que contenía 3 ml de PBS complementado con 50  $\mu$ l de mezcla anti-proteasa y se homogeneizaron sobre hielo usando el homogeneizador Ultra-Turrax (50% de la velocidad máxima). Entonces, los homogeneizados se centrifugaron a 2000 x g durante 15 minutos a 4°C y los sobrenadantes se filtraron a través de filtros Sartorius de 0,2  $\mu$ m, se separaron en alícuotas y se guardaron a -80°C hasta uso.

*Medición de los niveles de citocinas:* Los niveles de citocinas de TNF- $\alpha$  (kit de ELISA de TNF- $\alpha$  de rata, ref. RTA00, lote 213718, R&D Systems, Francia), IL-1 $\beta$  (kit de ELISA de IL-1 $\beta$  de rata, ref. RLB00, lote 212435, R&D Systems, Francia), IL-6 (kit de ELISA de IL-6 de rata, ref. R6000, lote 211773, 214008 y 214362, R&D Systems, Francia) y TGF- $\beta$ 1 (kit de ELISA de TGF- $\beta$ 1 humano, ref. DB100, lote 212258 y 213610, R&D Systems, Francia) se determinaron por duplicado según el procedimiento del fabricante. Las alícuotas de los homogeneizados de las patas traseras se almacenaron a -80°C.

#### 8. Análisis de rayos X

En el día 24, después de la recogida de sangre, los animales se sacrificaron y se obtuvieron radiografías de rayos X (patas traseras) para la evaluación de lesiones de las articulaciones. Los análisis de rayos X se centraron en erosiones articulares, espacio articular, anomalías del periostio en ambas patas traseras. Todas las radiografías se analizaron mirando siete puntos diferentes: la lesión del tejido blando, deformidad, desmineralización, espacio de la articulación, erosiones, osteogénesis y reacción periostal. Para cada animal, los seis primeros puntos se analizaron independientemente mirando la peor pata trasera. La reacción periostal se analizó mirando la cola. Para cada punto, la puntuación va de 0 (normal) a 4 (lesión máxima). Por tanto, la puntuación total va de 0 a 28. La interpretación radiográfica se hizo por el mismo lector sin saber nada sobre los animales (tratados o sin tratar).

#### 9. Observaciones

Un animal (nº 65) murió el D 23 después de la administración de indometacina (antes la administración en el D 23) debido a una causa desconocida.

#### 10. Análisis y expresión de resultados

Todos los resultados se informaron como media  $\pm$  E.E.M. de 10 ratas en cada grupo en cada momento de tiempo. El volumen de las patas se expresó en ml calculados a partir del valor medio del volumen de la pata derecha e izquierda. El índice de artritis se calculó a partir de la suma de la puntuación obtenida para cada una de las 4 patas. La respuesta nociceptiva se evaluó por la intensidad del nivel de vocalización registrada para cada animal (media de 4 valores: 2 veces/pata) en mV. El porcentaje de inhibición de la respuesta nociceptiva se calculó a partir del valor medio del grupo artrítico tratado con vehículo [(valor medio del grupo artrítico tratado con vehículo - valor medio del grupo artrítico tratado / valor medio del grupo artrítico tratado con vehículo)\*100]. El peso corporal se expresó en gramos. El peso de las patas traseras (izquierda y derecha) se expresó en gramos. Los niveles de citocinas (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ 1) de cada pata trasera se expresaron en pg/ml. Los niveles en circulación de TGF- $\beta$ 1 se expresaron en pg/ml. El índice radiológico para cada parámetro (desmineralización, erosiones, reacción periostal, lesión de tejido blando, espacio de la articulación, deformidad por osteogénesis) e índice radiológico total (puntuación total) se calcularon a partir de la suma de las puntuaciones obtenidas para cada parámetro. Las significancias entre grupos de las desviaciones entre los valores del grupo tratado con vehículo (ratas artríticas) y grupo tratado con vehículo (ratas no artríticas) se evaluaron por la prueba de la *t* de Student para datos independientes o la prueba del orden de Mann-Whitney cuando fracasó la prueba de varianza igual o de normalidad.

Las significancias entre grupos de las desviaciones entre los valores de grupo tratado con vehículo (ratas artríticas) y grupos tratados con E3 y 911 e indometacina se evaluaron por el análisis unilateral de la varianza ANOVA seguido de la prueba de la *t* de Dunnett para datos independientes. Una probabilidad de  $P \leq 0,05$  se consideró significativa. Todo el análisis estadístico se realizó por el software Sigmastat™.

## 5 Resultados

### 1. Respuesta nociceptiva (prueba de vocalización)

Como se muestra en la Tabla 11 y la Figura 18, en D 14, la respuesta nociceptiva fue  $4147 \pm 331$ ,  $4386 \pm 235$ ,  $4644 \pm 367$  y  $4468 \pm 143$  en grupos artríticos tratados con vehículo, indometacina, E3 y 911, respectivamente. La indometacina disminuyó fuertemente y significativamente la respuesta nociceptiva después de 3 mg/kg/día p.o. (durante 10 días) aproximadamente  $-3768$  mV (% de inhibición: 71%) y  $-4353$  mV (% de inhibición: 74%) en D 18 y D 24, respectivamente, en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo (D 18:  $1511 \pm 398$  frente a  $5279 \pm 326$  mV; D 24:  $1552 \pm 508$  frente a  $5905 \pm 345$  mV). E3 (1 mg/kg i.v. en D 14 y D 19) disminuyó fuertemente y significativamente la respuesta nociceptiva aproximadamente  $-4167$  mV (% inhibición: 79%) y  $-5905$  mV (% de inhibición: 100%) en D 18 y D 24, respectivamente, en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo (D 18:  $1112 \pm 401$  frente a  $5279 \pm 326$  mV; D 24:  $0 \pm 0$  frente a  $5905 \pm 345$  mV). 911 (10 mg/kg i.v. 2 días en D 14 y D 19) disminuyó fuertemente y significativamente la respuesta nociceptiva aproximadamente  $-3932$  mV (% de inhibición: 74%) y  $-5358$  mV (% de inhibición: 91%) en D 18 y D 24, respectivamente, en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo (D 18:  $1347 \pm 492$  frente a  $5279 \pm 326$  mV; D 24:  $547 \pm 307$  frente a  $5905 \pm 345$  mV).

20 Tabla 11. Efectos de E3 y 911 después de la inyección i.v. (2 días: D 14 - D 19) sobre la respuesta nociceptiva en artritis reumatoide en ratas

	Día	D 14	D 18	D 24
<b>Ratas artríticas</b>	<b>vehículo i.v.</b>	<b>4147 ± 331</b>	<b>5279 ± 326</b>	<b>5905 ± 345</b>
	<b>E3 1 mg/kg i.v.</b>	<b>4644 ± 367</b>	<b>1112 ± 401 *</b>	<b>0 ± 0 *</b>
	<b>% de inhibición</b>	<b>0</b>	<b>79</b>	<b>100</b>
	<b>911 10 mg/kg i.v.</b>	<b>4468 ± 143</b>	<b>1347 ± 492 *</b>	<b>547 ± 307 *</b>
	<b>% de inhibición</b>	<b>0</b>	<b>74</b>	<b>91</b>
	<b>Indometacina 3 mg/kg p.o. (durante 10 días)</b>	<b>4386 ± 235</b>	<b>1511 ± 398 *</b>	<b>1552 ± 508</b>
	<b>% de inhibición</b>	<b>0</b>	<b>71</b>	<b>74</b>

Los valores se expresan en mV como media ± E.E.M.

n=10 animales por grupo, excepto en D 24 para indometacina (n=9)

Prueba de la *t* de Dunnett: \*  $P \leq 0,05$  frente a ratas artríticas tratadas con vehículo

### 2. Peso corporal

Como se muestra en la Tabla 12 y la Figura 19, se observó una notable disminución en el aumento del peso corporal en ratas artríticas en comparación con ratas no artríticas de D 0 a D 14 debido al establecimiento de la artritis. En D 14 (día de selección), las ratas artríticas mostraron una disminución significativa en el peso en comparación con las ratas no artríticas ( $289 \pm 2$  frente a  $217 \pm 4$  g) (prueba de la *t* de Student para datos independientes  $P < 0,05$ ). Sin embargo, no se detectó diferencia significativa en el peso (D 14) en todos los grupos artríticos (prueba de la *t* de Dunnett  $P > 0,05$ ). El peso corporal aumentó moderadamente y significativamente en el grupo tratado con indometacina (3 mg/kg/día durante 10 días) de D 17 a D 24 con un máximo de aproximadamente 43 g en D 24 en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo ( $261 \pm 5$  frente a  $218 \pm 3$  g). Después del tratamiento con E3 (1 mg/kg i.v. en D 14 y D 19), el peso corporal aumentó moderadamente y significativamente de D 17 a D 24 con un máximo de aproximadamente 46 g en D 24 en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo ( $264 \pm 5$  frente a  $218 \pm 3$  g). Después del tratamiento con 911 (10 mg/kg i.v. a 14 y D 19), el peso corporal aumentó moderadamente y significativamente de D 18 a D 24 con un máximo de aproximadamente 47 g en D 24 en comparación con el artríticas tratadas con vehículo ( $265 \pm 7$  frente a  $218 \pm 3$  g).

35

Tabla 12. Efectos de E3 y 911 después de inyección i.v. (2 días: D 14 - D 19) sobre el peso corporal en artritis reumatoide en ratas

Día		D 0	D 3	D 4	D 5	D 6	D 7	D 11	D 12	D 13	D 14
<b>Ratas no artríticas</b>	vehículo i.v.	197 ± 2	215 ± 2	222 ± 2	232 ± 2	236 ± 2	244 ± 2	272 ± 2	277 ± 2	282 ± 2	289 ± 2
<b>Ratas artríticas</b>	vehículo i.v.	199 ± 2	214 ± 2	221 ± 2	230 ± 2	236 ± 2	241 ± 3	229 ± 6	223 ± 5	218 ± 5	217 ± 4
	E3 1 mg/kg iv.	206 ± 4	222 ± 3	230 ± 3	241 ± 3	243 ± 3	249 ± 3	242 ± 6	237 ± 6	230 ± 5	225 ± 5
	911 10 mg/kg i.v.	201 ± 2	211 ± 5	218 ± 5	227 ± 5	231 ± 5	239 ± 5	234 ± 8	228 ± 7	221 ± 7	218 ± 6
	Indometacina 3 mg/kg p.o. durante 10 días	202 ± 3	217 ± 4	225 ± 4	235 ± 4	239 ± 4	246 ± 4	242 ± 7	235 ± 7	227 ± 6	224 ± 5
Día		D 15	D 16	D 17	D 18	D 19	D 20	D 21	D 22	D 23	D 24
<b>Ratas no artríticas</b>	vehículo i.v.	285 ± 2	291 ± 2	297 ± 2	302 ± 3	307 ± 3	308 ± 3	312 ± 3	316 ± 3	321 ± 3	326 ± 3
<b>Ratas artríticas</b>	vehículo i.v.	213 ± 4	212 ± 4	211 ± 3	210 ± 3	208 ± 3	210 ± 3	212 ± 3	214 ± 3	216 ± 3	218 ± 3
	E3 1 mg/kg i.v.	223 ± 5	224 ± 5	227 ± 4 *	232 ± 4 *	235 ± 4 *	238 ± 4 *	245 ± 4 *	250 ± 5 *	257 ± 5 *	264 ± 5 *
	911 10 mg/kg i.v.	217 ± 5	221 ± 5	226 ± 5	229 ± 5	233 ± 6 *	239 ± 6 *	246 ± 6 *	253 ± 6 *	258 ± 6 *	265 ± 7 *
	Indometacina 3 mg/kg p.o. durante 10 días	230 ± 4	230 ± 5	231 ± 4 *	234 ± 4 *	236 ± 4 *	241 ± 4 *	246 ± 4 *	248 ± 5 *	253 ± 5 *	261 ± 5 *

Los valores se expresan en gramos como media ± E.E.M. n=10 animales por grupo, excepto en D 23 y D 24 (n=9) para indometacina  
Prueba de la t de Dunnett: \* P ≤ 0,05 frente a ratas artríticas tratadas con vehículo

3. Volumen de las patas

5 En D 14 se realizó una aleatorización con el fin de obtener grupos homogéneos en términos de volumen de las patas. Como se muestra en la Tabla 13, en D 14, el volumen de las patas traseras (media del volumen de la pata derecha e izquierda) fue significativamente mayor en el grupo artrítico que en el grupo no artrítico (2,10 ± 0,05 frente a 1,44 ± 0,02 ml (prueba de la t de Student para datos independientes P<0,05)). La indometacina (3 mg/kg/día p.o. durante 10 días) disminuyó significativamente el volumen de las patas aproximadamente -0,75 ml (D 24) en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo (1,59 ± 0,03 ml frente a 2,34 ± 0,08 ml). E3 (1 mg/kg i.v. en D 14 y D 19) aumentó ligeramente y significativamente el volumen de las patas aproximadamente 0,37 ml en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo (2,71 ± 0,09 ml frente a 2,34 ± 0,08 ml). 911 (10 mg/kg i.v. en D 14 y D 19) aumentó ligeramente y significativamente el volumen de las patas aproximadamente 0,36 ml en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo (2,70 ± 0,11 ml frente a 2,34 ± 0,08 ml).

15 Tabla 13. Efectos de E3 y 911 después de inyección i.v. (2 días: D 14 - D 19) sobre el volumen de las patas en artritis reumatoide en ratas

Día		D 14	D 24
<b>Ratas no artríticas</b>	vehículo i.v.	1,44 ± 0,02	1,47 ± 0,02
<b>Ratas artríticas</b>	vehículo i.v.	2,10 ± 0,05	2,34 ± 0,08
	E3 1 mg/kg i.v.	2,06 ± 0,03	2,71 ± 0,09 *
	911 10 mg/kg i.v.	2,02 ± 0,07	2,70 ± 0,11 *
	Indometacina 3 mg/kg p.o. durante 10 días	2,08 ± 0,06	1,59 ± 0,03 *

Los valores se expresan en ml como media ± E.E.M.  
n=10 animales por grupo, excepto en D 24 para indometacina (n=9)

Prueba de la *t* de Dunnett: \*P ≤ 0,05 frente a ratas artríticas tratadas con vehículo

#### 4. Índice de artritis

Como se muestra en la Tabla 14, en D 14, el índice de artritis fue  $10,1 \pm 0,8$ ,  $8,7 \pm 0,6$ ,  $10,2 \pm 0,4$  y  $9,4 \pm 0,7$  y en grupos artríticos tratados con vehículo, indometacina, E3 y 91,1, respectivamente. La indometacina disminuyó fuertemente y significativamente el índice de artritis después de 3 mg/kg/día p.o. (durante 10 días) un máximo de aproximadamente -8,0 en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo ( $2,7 \pm 0,7$  frente a  $10,7 \pm 0,6$ ). E3 (1 mg/kg i.v. en D 14 y D 19) no afectó el índice de artritis en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo ( $11,4 \pm 0,4$  frente a  $10,7 \pm 0,6$ ). 911 (10 mg/kg i.v. en D 14 y D 19) no afectó el índice de artritis en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo ( $10,9 \pm 0,7$  frente a  $10,7 \pm 0,6$ ).

Tabla 14. Efectos de E3 y 911 después de la inyección i.v. (2 días: D 14 – D 19) sobre el índice de artritis en artritis reumatoide en ratas

	Día	D 14	D 24
<b>Ratas artríticas</b>	<b>vehículo i.v.</b>	<b>10,1 ± 0,8</b>	<b>10,7 ± 0,6</b>
	<b>E3 1 mg/kg i.v.</b>	<b>10,2 ± 0,4</b>	<b>11,4 ± 0,4</b>
	<b>911 10 mg/kg i.v.</b>	<b>9,4 ± 0,7</b>	<b>10,9 ± 0,7</b>
	<b>Indometacina 3 mg/kg p.o. durante 10 días</b>	<b>8,7 ± 0,6</b>	<b>2,7 ± 0,7 *</b>

Lo valores se expresan como media ± E.E.M. (puntuación)

n=10 animales por grupo, excepto para indometacina (n=9)

Prueba de la *t* de Dunnett: \* P ≤ 0,05 frente a ratas artríticas tratadas con vehículo

#### 5. Niveles de citocinas en las patas

Como se muestra en la Tabla 15, en D 24, los niveles de citocinas en las patas izquierda y derecha aumentaron en el grupo artrítico tratado con vehículo un máximo de aproximadamente 3,5 (IL-1β), 4 (TNF-α) y 1,8 (TGF-β1) veces en comparación con el grupo no artrítico tratado con vehículo. No se observó diferencia significativa para los niveles de IL-6, en la pata derecha e izquierda, entre los dos grupos. Los niveles de citocinas del grupo artrítico fueron similares en la pata izquierda y derecha:  $259,7 \pm 38,5$  frente a  $219,2 \pm 32,4$ ,  $4802,8 \pm 365,5$  frente a  $4007,1 \pm 380,4$ ,  $17,8 \pm 1,6$  frente a  $18,6 \pm 1,9$  y  $9735,0 \pm 1219,8$  frente a  $9161,4 \pm 846,1$  pg/ml para IL-6, IL-1β, TNF-α y TGF-β1 respectivamente. La indometacina disminuyó ligeramente, pero significativamente, el nivel de TGF-β1 en la pata derecha después de 3 mg/kg/día p.o. (durante 10 días) aproximadamente 1,3 veces en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo ( $7057,4 \pm 335,6$  frente a  $9161,4 \pm 846,1$ ), mientras que no modificó los niveles de IL-6, TNF-α o IL-1β. Se observó un efecto similar, pero no significativo, en la pata izquierda. E3 (1 mg/kg i.v. en D 14 y D 19) no afectó el nivel de IL-6, 1β, TNF-α o TGF-β1, patas, en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo. 911 (10 mg/kg i.v. en D 14 y D 19) aumentó el nivel de IL-1β en la pata derecha en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo ( $6215,3 \pm 666,7$  frente a  $4007,1 \pm 380,4$ ). No tuvo efecto sobre otros niveles de citocinas en ambas patas.

Tabla 15. Efecto de E3 y 911 después de la inyección i.v. (2 días en D 14 y D 19) sobre los niveles de citocinas en las patas en ratas artríticas reumatoides

#### Niveles de citocinas en la pata izquierda

<b>Ratas no artríticas</b>		<b>Ratas artríticas</b>			
<b>vehículo i.v.</b>		<b>vehículo i.v.</b>	<b>E3 1 mg/kg i.v.</b>	<b>911 10 mg/kg i.v.</b>	<b>Indometacina 3 mg/kg p.o.</b>
<b>IL-6</b>	<b>298,6 ± 35,6</b>	<b>259,7 ± 38,5</b>	<b>234,4 ± 35,2</b>	<b>262,5 ± 42,5</b>	<b>249,7 ± 60,4</b>
<b>IL-1β</b>	<b>1383,0 ± 57,9</b>	<b>4802,8 ± 365,5</b>	<b>5060,0 ± 473,5</b>	<b>5500,8 ± 625,3</b>	<b>4029,1 ± 449,9</b>
<b>TNF-α</b>	<b>4,3 ± 2,9</b>	<b>17,8 ± 1,6</b>	<b>23,6 ± 2,5</b>	<b>29,9 ± 4,8</b>	<b>29,9 ± 3,6</b>
<b>TGF-β1</b>	<b>5264,7 ± 209,2</b>	<b>9735,0 ± 1219,8</b>	<b>9796,7 ± 491,2</b>	<b>11053,5 ± 713,3</b>	<b>7708,2 ± 293,9</b>

(continuación)

**Niveles de citocinas en la pata derecha**

<b>Ratas no artríticas</b>		<b>Ratas artríticas</b>			
<b>vehículo i.v.</b>		<b>vehículo. i.v.</b>	<b>E3 1 mg/kg i.v.</b>	<b>911 10 mg/kg i.v.</b>	<b>Indometacina 3 mg/kg p.o.</b>
<b>IL-6</b>	286,4 ± 76,1	219,2 ± 32,4	214,6 ± 47,2	284,9 ± 38,9	295,9 ± 47,8
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	1342,1 ± 86,1	4007,1 ± 380,4	4853,5 ± 605,0	6215,3 ± 666,7 *	3884,4 ± 534,4
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	15,7 ± 4,8	18,6 ± 1,9	21,5 ± 2,5	33,4 ± 5,7	30,6 ± 5,7
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	5024,8 ± 148,4	9161,4 ± 846,1	9362,7 ± 423,4	10861,2 ± 604,6	7057,4 ± 335,6 *

Los valores se expresan en pg/ml, como media  $\pm$  E.E.M.

n=10 animales por grupo, excepto para no artríticas/vehículo (pata derecha), artríticas/vehículo (pata izquierda) e indometacina (n=9)

Prueba de la *t* de Dunnett: \* P  $\leq$  0,05 frente a ratas artríticas tratadas con vehículo

**6. Medición de TGF- $\beta$ 1 en circulación**

Como se muestra en la Tabla 16, en D 24, el nivel de TGF- $\beta$ 1 en suero aumentó en el grupo artrítico tratado con vehículo en comparación con el grupo no artrítico tratado con vehículo (81715,7  $\pm$  1984,1 frente a 60269,9  $\pm$  2142,8). La indometacina disminuyó significativamente el nivel de TGF- $\beta$ 1 en suero después de 3 mg/kg/día p.o. (durante 10 días) aproximadamente 1,5 veces en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo (57222,2  $\pm$  3194,1 frente a 81715,7  $\pm$  1984,1). E3 (1 mg/kg i.v. en D 14 y D 19) y 911 (10 mg/kg i.v. en D 14 y D 19) disminuyó significativamente el nivel de TGF-1 $\beta$  en suero de manera que el nivel de citocinas en los grupos tratados con E3 y 911 fue comparable al de aquellos observado en el grupo no artrítico tratado con vehículo (69408,8  $\pm$  3926,7 y 67214,5  $\pm$  3649,4 respectivamente, frente a 60269,9  $\pm$  2142,8).

Tabla 16. Efecto de E3 y 911 después de la inyección i.v. (2 días en D 14 y D 19) sobre los niveles de TGF- $\beta$ 1 en suero en ratas artríticas reumatoides

<b>Ratas no artríticas</b>		<b>Ratas artríticas</b>			
<b>vehículo i.v.</b>		<b>vehículo i.v.</b>	<b>E3 1 mg/kg i.v.</b>	<b>911 10 mg/kg i.v.</b>	<b>Indometacina 3 mg/kg p.o.</b>
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	60269,9 $\pm$ 2142,8	81715,7 $\pm$ 1984,1	69408,8 $\pm$ 3926,7 *	67214,5 $\pm$ 3649,4 *	57222,2 $\pm$ 3194,1 *

Los valores se expresan en pg/ml, como media  $\pm$  E.E.M.

n=10 animales por grupo, excepto para no artríticas/vehículo (pata derecha), artríticas/vehículo (pata izquierda) e indometacina (n=9)

Prueba de la *t* de Dunnett: \* P  $\leq$  0,05 frente a ratas artríticas tratadas con vehículo

**7. Parámetros hematológicos**

Como se muestra en la Tabla 17, los parámetros hematológicos tales como glóbulos blancos y plaquetas fueron mayores en ratas artríticas tratadas con vehículo en comparación con ratas no artríticas tratadas con vehículo (prueba de la *t* de Student para datos independientes P<0,05), mientras que los glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito (prueba de la *t* de Student para datos independientes P>0,05) no cambiaron. La indometacina no afectó los parámetros de la sangre después de 3 mg/kg/día p.o. (durante 10 días) en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo. E3 (1 mg/kg i.v. en D 14 y D 19) no afectó los parámetros de la sangre en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo. 911 (10 mg/kg i.v. en D 14 y D 19) no afectó los parámetros de la sangre en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo.

Tabla 17. Efectos de E3 y 911 después de la inyección i.v. (2 días en D 14 y D 19) sobre los parámetros de la sangre en artritis reumatoide en ratas (medición en D 24)

Día		Glóbulos blancos 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	Glóbulos rojos 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	Hemoglobina g/dl	Hematocrito %	Plaquetas 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>
<b>Ratas no artríticas</b>	vehículo i.v.	8,7 ± 0,9 n=9	7,98 ± 0,31 n=9	15,1 ± 0,7 n=9	42,6 ± 1,6 n=9	322 ± 89 n=9
	vehículo i.v.	19,0 ± 0,9 n=10	7,54 ± 0,31 n=10	13,2 ± 0,7 n=10	37,4 ± 1,6 n=10	10,43 ± 89 n=10
<b>Ratas artríticas</b>	E3	19,1 ± 1,2 n=7	7,74 ± 0,17 n=8	12,9 ± 0,3 n=8	38,5 ± 1,0 n=8	827 ± 77 n=8
	1 mg/kg i.v.	22,6 ± 2,9 n=8	7,30 ± 0,40 n=9	12,1 ± 0,7 n=9	36,5 ± 2,1 n=9	799 ± 121 n=9
	10 mg/kg i.v.					
	Indometacina	21,7 ± 2,5 n=9	6,93 ± 0,31 n=9	11,8 ± 0,6 n=9	35,0 ± 1,5 n=9	705 ± 111 n=9
<b>3 mg/kg p.o. durante 10 días</b>						

Los valores se expresan como media ± E.E.M.  
Anova: P> 0,05 frente a ratas artríticas tratadas con vehículo

### 7. Peso de las patas traseras

Como se muestra en la Tabla 18, el peso de la pata trasera izquierda y derecha fue mayor en ratas artríticas tratadas con vehículo que en ratas no artríticas tratadas con vehículo ( $3,43 \pm 0,11$  frente a  $1,98 \pm 0,01$  y  $3,32 \pm 0,12$  frente a  $1,99 \pm 0,02$  g, respectivamente) (prueba de la *t* de Student para datos independientes o Mann-Connery  $P < 0,05$ ). La indometacina disminuyó significativamente el peso de las patas traseras después de 3 mg/kg/día p.o. (durante 10 días) en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo (pata trasera izquierda:  $2,23 \pm 0,04$  frente a  $3,43 \pm 0,11$  g; pata trasera derecha:  $2,20 \pm 0,05$  frente a  $3,32 \pm 0,12$  g). E3 (1 mg/kg i.v. en D 14 y D 19) sólo aumentó significativamente el peso de la pata trasera izquierda en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo (pata trasera izquierda:  $3,86 \pm 0,14$  frente a  $3,43 \pm 0,11$  g; pata trasera derecha:  $3,72 \pm 0,13$  frente a  $3,32 \pm 0,12$  g). 911 (10 mg/kg i.v. en D 14 y D 19) sólo aumentó significativamente el peso de la pata trasera derecha en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo (pata trasera izquierda:  $3,73 \pm 0,12$  frente a  $3,43 \pm 0,11$  g; pata trasera derecha:  $3,83 \pm 0,15$  frente a  $3,32 \pm 0,12$  g).

Tabla 18. Efectos de E3 y 911 después de la inyección i.v. (2 días en D 14 y D 19) sobre el peso de las patas traseras en artritis reumatoide en ratas (medición en D 24)

		Pata izquierda	Pata derecha
<b>Ratas no artríticas</b>	<b>vehículo i.v.</b>	<b><math>1,98 \pm 0,01</math></b>	<b><math>1,99 \pm 0,02</math></b>
	<b>vehículo i.v.</b>	<b><math>3,43 \pm 0,11</math></b>	<b><math>3,32 \pm 0,12</math></b>
<b>Ratas artríticas</b>	<b>E3 1 mg/kg i.v.</b>	<b><math>3,86 \pm 0,14</math> *</b>	<b><math>3,72 \pm 0,13</math></b>
	<b>911 10 mg/kg i.v.</b>	<b><math>3,73 \pm 0,12</math></b>	<b><math>3,83 \pm 0,15</math> *</b>
	<b>Indometacina 3 mg/kg p.o. durante 10 días</b>	<b><math>2,23 \pm 0,04</math> *</b>	<b><math>2,20 \pm 0,05</math> *</b>

Los valores se expresan en gramos como media  $\pm$  E.E.M.

n=10 animales por grupo, excepto para indometacina (n=9)

Prueba de la *t* de Dunnett: \*  $P \leq 0,05$  frente a ratas artríticas tratadas con vehículo

### 8. Análisis de rayos X

Como se muestra en la Tabla 19, una puntuación total de  $0,0 \pm 0,0$  se observó en las ratas no artríticas tratadas con vehículo. Las ratas artríticas tratadas con vehículo tienen una puntuación total de  $15,1 \pm 1,3$  con altas puntuaciones para desmineralización ( $2,4 \pm 0,3$ ), erosiones ( $2,7 \pm 0,3$ ), lesión de tejido blando ( $3,1 \pm 0,2$ ) y espacio de la articulación ( $3,3 \pm 0,2$ ), una puntuación moderada para reacción periostal ( $1,0 \pm 0,3$ ), osteogénesis ( $0,8 \pm 0,2$ ) y deformidad ( $1,8 \pm 0,2$ ). La indometacina (3 mg/kg/día p.o. durante 10 días) disminuyó fuertemente y significativamente la puntuación total aproximadamente 10,7 en comparación con ratas artríticas tratadas con vehículo ( $4,4 \pm 0,9$  frente a  $15,1 \pm 1,3$ ). E3 (1 mg/kg i.v. en D 14 y D 19) no afectó la puntuación total en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo ( $14,2 \pm 1,3$  frente a  $15,1 \pm 1,3$ ). 911 (10 mg/kg i.v. en D 14 y D 19) no afectó la puntuación total en comparación con el grupo artrítico tratado con vehículo ( $15,4 \pm 1,0$  frente a  $15,1 \pm 1,3$ ).

Tabla 19. Efectos de E3 y 911 después de la inyección i.v. (2 días en D 14 y D 19) sobre los parámetros de rayos X en artritis reumatoide en ratas

Día	Desmineralización	Erosiones	Reacción periosteal	Lesión de tejido blando	Espacio de la articulación	Osteogénesis	Deformidad	Puntuación TOTAL
Ratas no artríticas	vehículo i.v.	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Ratas artríticas	vehículo i.v.	2,4 ± 0,3	2,7 ± 0,3	3,1 ± 0,2	3,3 ± 0,2	0,8 ± 0,2	1,8 ± 0,2	15,1 ± 1,3
	E3 1 mg/kg i.v.	2,0 ± 0,2	2,4 ± 0,3	3,3 ± 0,3	2,7 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,8 ± 0,2	14,2 ± 1,3
	911 10 mg/kg i.v.	2,3 ± 0,3	2,5 ± 0,2	3,4 ± 0,2	3,3 ± 0,2	0,9 ± 0,2	2,0 ± 0,2	15,4 ± 1,0
	Indometacina 3 mg/kg p.o.	0,3 ± 0,2 *	0,9 ± 0,2 *	1,0 ± 0,2 *	1,0 ± 0,2 *	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,2 *	4,4 ± 0,9 *

Los valores se expresan como media ± E.E.M (puntuación).  
n=10 animales por grupo, excepto para indometacina (n=9)

Prueba de la *t* de Dunnett: \* P ≤ 0,05 frente a ratas artríticas tratadas con vehículo

Conclusión

Bajo las condiciones experimentales descritas anteriormente, E3 (1 mg/kg i.v. 2 días: D 14 - D 19) y 911 (10 mg/kg i.v. 2 días: D 14 - D 19) mostraron fuertes efectos analgésicos, pero no mostraron efectos antiinflamatorios significativos en este modelo de artritis.

5 **Ejemplo 8: Efectos de diferentes dosis del anticuerpo anti-NGF E3 en un modelo de rata de artritis reumatoide**

10 La capacidad de E3 para producir la reducción en el dolor en ratas artríticas se investigó adicionalmente examinando la relación de la respuesta a dosis entre la administración de E3 y la reducción del dolor. Las ratas se trataron con adyuvante para inducir artritis como se ha descrito anteriormente. Diez ratas no inyectadas con adyuvante se usaron como controles no artríticos. Catorce días después de la inyección del adyuvante, los animales se calificaron en el estudio basándose en los criterios establecidos anteriormente, se aleatorizaron en ocho grupos de diez ratas y se probaron para la intensidad de su respuesta de vocalización. Entonces se dosificaron en el día 14 con solución salina, o 0,003 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg o 5 mg/kg de anticuerpo E3 como se ha descrito anteriormente. Los animales se probaron para su respuesta de vocalización en los días 16, 18, 20 y 24.

15 A los animales se les dosificó solución salina o la misma dosis de E3 en el día 18 después de la prueba de vocalización. Los animales también se pesaron cada día, empezando en el día 14. Por tanto, a los animales se les dosificó dos veces una dosis dada de anticuerpo o solución salina en los días 14 y 18, y se evaluaron para dolor cinco veces, en los días 14, 16, 18, 20 y 24. Los datos se muestran en las Tablas 20-22 y en las Figuras 20-22.

20 Tabla 20. Efectos de diferentes dosis de E3 sobre la respuesta nociceptiva (intensidad de la vocalización) en ratas artríticas reumatoides. Los valores de intensidad de la vocalización se expresan en mV como media ± e.e.m.

	vehículo	0,003 mg/kg	0,01 mg/kg	0,03 mg/kg	0,1 mg/kg	0,3 mg/kg	1,0 mg/kg	5,0 mg/kg	
día 14	media	1129,25	981,75	1007,28	963,18	1159,30	1191,58	1067,00	896,25
	e.e.m	143,06	71,00	66,50	62,12	132,76	123,44	69,73	57,53
día 16	media	1042,85	825,60	576,88	448,43	283,71	151,85	98,62	79,18
	e.e.m	130,51	57,94	49,71	81,01	60,00	26,08	29,17	27,30
día 18	media	968,10	427,43	334,45	292,52	262,96	194,19	174,13	200,42
	e.e.m	117,85	48,55	35,10	52,36	62,32	53,56	88,61	120,15
día 20	media	942,18	448,00	313,13	209,48	79,74	66,27	71,23	63,57
	e.e.m	100,69	33,73	61,98	24,43	33,18	31,34	42,37	23,47
día 24	media	913,68	724,50	596,38	513,60	432,45	176,32	19,21	12,35
	e.e.m	131,29	115,90	44,76	63,67	70,38	66,61	10,14	12,35

25 El efecto de tratar animales con diversas dosis de anticuerpo anti-NGF E3 en vocalización inducida por dolor (los datos mostrados en la Tabla 20) se analizó estadísticamente usando ANOVA bilateral para comparar los resultados obtenidos por parejas entre animales artríticos tratados con vehículo con aquellos tratados con una dosis dada de anticuerpo E3. Hubo un efecto altamente significativo a todos los niveles de E3 probados ( $p < 0,0001$ ). Incluso a la dosis más baja probada (0,003 mg/kg de E3), la diferencia en la vocalización fue significativa ( $p < 0,0001$ ).

30 Como se muestra en la Tabla 20 y la Figura 20, de acuerdo con los experimentos anteriores, el tratamiento con anticuerpo E3 a 1 mg/kg mostró un alivio rápido y robusto del dolor. En el plazo de dos días (el momento de tiempo más temprano probado), la intensidad de vocalización disminuyó el 90%. El tratamiento con menores concentraciones de E3 también proporcionó un alivio del dolor robusto, aunque a menores dosis el alivio del dolor necesitó algo más de tiempo para manifestarse. Es probable que la evidente disminución en la eficacia en el día 24

de todas, excepto de las mayores dosis probadas, sea debida a una disminución en el nivel real del nivel E3 en plasma secundario a una respuesta inmunitaria por las ratas objeto. Es evidente que la dosis de tan sólo 0,003 mg/kg proporcione al menos alivio del dolor parcial en este modelo.

5

Tabla 21. Efectos de diferentes dosis de E3 sobre el peso corporal en ratas artríticas reumatoides (normalizados al día 14)

Día	No artrítica		vehículo		0,003 mg/kg		0,01 mg/kg		0,03 mg/kg	
	Media	E.E.M.	Media	E.E.M.	Media	E.E.M.	Media	E.E.M.	Media	E.E.M.
14	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
15	99,53	0,30	99,14	0,37	99,20	0,48	99,18	0,43	100,34	0,36
16	102,52	0,45	99,57	0,60	99,58	0,79	99,33	0,72	100,89	0,57
17	103,31	0,41	99,50	0,64	100,46	0,77	99,69	0,73	101,80	0,82
18	106,11	0,72	100,26	0,93	100,90	1,19	100,69	0,72	102,70	0,92
20	109,62	0,85	101,46	1,22	102,26	1,58	102,70	1,07	104,51	0,75
21	110,52	0,93	102,73	1,49	103,16	1,87	102,63	1,18	105,08	0,98
23	114,28	1,19	104,54	1,92	106,09	1,67	104,41	1,33	106,14	1,06
24	115,44	1,15	105,12	1,92	106,16	1,90	104,23	1,46	106,23	1,26

Día	0,1 mg/kg		0,3 mg/kg		1,0 mg/kg		5,0 mg/kg	
	Media	E.E.M	Media	E.E.M	Media	E.E.M	Media	E.E.M
14	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
15	99,83	0,59	101,05	0,38	100,53	0,37	101,61	0,41
16	101,07	0,82	102,88	0,50	102,95	0,56	104,09	0,60
17	101,89	1,12	104,76	0,70	105,74	0,76	106,85	0,79
18	103,69	1,47	107,11	0,78	108,46	0,82	109,53	1,00
20	107,36	1,78	111,26	0,77	113,57	0,83	115,32	1,11
21	108,50	2,01	113,31	0,87	116,71	0,92	119,11	1,21
23	109,25	2,15	115,59	1,38	123,35	1,13	126,36	1,94
24	108,77	2,08	115,58	1,43	124,41	1,00	127,25	1,79

Tabla 22. Efectos de diferentes dosis de E3 sobre el peso corporal en ratas artríticas reumatoides (normalizados al día 0)

Día	No artríticas		vehículo		0,003 mg/kg		0,01 mg/kg		0,03 mg/kg	
	Media	E.E.M	Media	E.E.M	Media	E.E.M	Media	E.E.M	Media	E.E.M
0	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
1	100,45	0,19	98,34	0,48	98,37	0,35	98,86	0,33	98,67	0,34
2	105,94	0,33	101,75	0,71	102,47	0,59	102,61	0,40	102,05	0,53
3	109,29	0,33	105,04	1,04	106,54	0,99	106,29	0,60	105,31	0,85
4	113,13	0,46	109,14	1,15	110,09	0,72	110,61	0,41	109,24	0,82
7	124,15	0,70	119,90	1,39	121,29	1,32	121,59	0,72	117,15	1,36
8	127,82	0,80	123,38	1,52	124,44	1,43	124,47	1,24	118,52	1,89
9	132,40	0,80	125,50	1,59	125,91	1,69	125,82	1,95	118,60	2,62
10	135,91	0,83	123,51	1,77	123,30	2,47	123,87	2,59	115,26	3,19
11	140,42	1,13	119,82	1,98	119,55	2,76	121,20	2,99	112,94	3,48
14	152,59	1,72	111,79	1,40	111,50	1,87	111,80	1,65	108,37	2,75
15	151,87	1,87	110,82	1,41	110,63	2,05	110,85	1,44	108,68	2,45
16	156,47	2,25	111,33	1,74	111,08	2,32	110,98	1,31	109,21	2,16
17	157,65	2,08	111,24	1,62	112,06	2,36	111,42	1,66	110,16	2,03
18	161,98	2,71	112,16	2,21	112,60	2,78	112,54	1,64	111,14	2,11
20	167,36	2,93	113,49	2,37	114,17	3,24	114,82	2,12	113,17	2,49
21	168,73	3,07	114,93	2,62	115,25	3,68	114,76	2,30	113,80	2,68
23	174,51	3,54	116,96	3,02	118,48	3,49	116,76	2,51	114,93	2,62
24	176,27	3,50	117,63	3,13	118,58	3,71	116,56	2,57	114,99	2,51

10

(continuación)

Día	0,1 mg/kg		0,3 mg/kg		1,0 mg/kg		5,0 mg/kg	
	Media	E.E.M	Media	E.E.M	Media	E.E.M	Media	E.E.M
0	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
1	99,31	0,61	99,26	0,28	98,81	0,27	98,25	0,58
2	102,87	0,73	102,98	0,43	103,18	0,50	101,82	0,53
3	106,26	0,82	106,95	0,50	106,52	0,55	105,47	0,58
4	110,20	0,64	110,50	0,58	110,52	0,67	109,29	0,58
7	120,50	1,20	120,03	0,82	121,54	1,15	119,77	1,19
8	123,48	1,58	121,38	1,31	124,28	1,59	121,96	1,72
9	125,46	2,47	121,57	2,09	125,60	2,23	123,04	2,42
10	123,95	3,38	118,27	3,07	124,11	2,97	120,00	2,81
11	121,98	3,93	116,02	3,32	121,27	3,42	117,97	2,98
14	113,90	2,14	108,43	1,94	111,72	2,27	111,58	2,59
15	113,66	1,91	109,59	2,12	112,30	2,23	113,33	2,37
16	115,06	2,00	111,54	2,02	115,00	2,36	116,06	2,30
17	115,99	2,18	113,57	2,04	118,08	2,32	119,14	2,42
18	118,01	2,29	116,13	2,14	121,16	2,55	122,14	2,61
20	122,17	2,57	120,62	2,20	126,90	2,87	128,60	2,77
21	123,49	2,90	122,88	2,49	130,41	2,98	132,82	2,84
23	124,35	3,02	125,36	2,83	137,81	3,09	140,79	2,83
24	123,77	2,80	125,33	2,75	138,93	2,76	141,77	2,61

El efecto de tratar animales con diversas dosis de anticuerpo anti-NGF E3 sobre el peso corporal se analizó estadísticamente usando ANOVA bilateral para comparar los resultados obtenidos por parejas entre animales artríticos tratados con vehículo con aquellos tratados con una dosis dada de anticuerpo E3. Usando los datos normalizados al peso en el día 4 (Tabla 21), la dosis de 0,03 mg/kg de E3 produjo un cambio significativo en el peso corporal ( $p < 0,005$ ). A todas las dosis mayores de E3, la diferencia entre animales artríticos tratados y sin tratar fue significativa ( $p = 0 < 0,0001$ ). Usando los datos normalizados al peso en el día 0 (Tabla 22), la dosis de 0,03 mg/kg de E3 produjo un cambio significativo en el peso corporal ( $p < 0,002$ ). A todas las dosis mayores de E3, la diferencia entre animales artríticos tratados y sin tratar fue significativa ( $p < 0,0001$ ).

- 5
- 10 De nuevo de acuerdo con estudios anteriores, las ratas tratadas con E3 mostraron menos pérdida de peso evidente que las ratas artríticas tratadas con solución salina (Tabla 22 y Figura 22). En realidad, las ratas tratadas con alta dosis del anticuerpo E3 se fueron recuperando de la anterior pérdida de peso, y en realidad ganaron peso más rápido que sus cohortes no artríticas (Tabla 21 y Figura 21).

15 **Ejemplo 9. Efectos analgésicos del anticuerpo anti-NGF E3 en pacientes con dolor de moderado a grave de osteoartritis de la rodilla**

En este estudio aleatorizado, controlado por placebo, de doble ciego, de aumento de la dosis, los efectos analgésicos de una única dosis intravenosa (3 µg/kg, 10 µg/kg, 30 µg/kg, 100 µg/kg o 300 µg/kg) de anticuerpo anti-NGF E3 se compararon con placebo en pacientes con dolor de moderado a grave de osteoartritis de la rodilla. En el estudio se enrolaron machos y hembras adultos (edades entre 35 y 65) que estaban experimentando dolor de moderado a grave de osteoartritis de la rodilla, pero que por lo demás tenían buen estado de salud general. Durante el periodo de cribado se requirió que los pacientes interrumpieran las medicaciones para la artritis tales como AINE, inhibidores de la ciclooxigenasa tipo-2 (COX-2) y opiáceos al menos 14 días antes de la administración del anticuerpo anti-NGF E3. Se permitió que los pacientes usaran medicaciones de rescate de acetaminofeno o ibuprofeno con algunas restricciones basándose en hallazgos de laboratorio o historia médica anterior. Algunos pacientes tomaron medicaciones de rescate durante el estudio, pero las medicaciones de rescate no fueron consumidas durante 2 días antes y después de la administración del anticuerpo anti-NGF E3.

Se admitieron treinta y cuatro pacientes al estudio y se evaluaron como pacientes hospitalizados durante los días del estudio -1, 1 y 2. La administración del anticuerpo anti-NGF E3 se produjo en la mañana del día 1. Se usaron diarios electrónicos para registrar el índice de dolor de la rodilla y el uso de medicación de rescate en la clínica y en casa. Diez pacientes se trataron con placebo. Veinticuatro pacientes se trataron con anticuerpo anti-NGF E3: cuatro pacientes por nivel de dosis durante 3 µg/kg (cohorte 1), 10 µg/kg (cohorte 2) y 30 µg/kg (cohorte 3); y seis pacientes por nivel de dosis para 100 µg/kg (cohorte 4) y 300 µg/kg (cohorte 5). El placebo usado fue inyección estéril de cloruro sódico al 0,9%, USP (solución salina normal). El anticuerpo anti-NGF E3 fue una formulación líquida congelada que consistió en 10 mg/ml de anticuerpo en una disolución acuosa de histidina 10 mM, sacarosa 275 mM, 0,01% de polisorbato 20, pH 6,0. Una hora antes de la administración IV, el anticuerpo congelado se descongeló y se diluyó en inyección de cloruro sódico, USP. El volumen para cada paciente se calculó basándose en el peso en el día -1 del sujeto y se asignó el nivel de dosis, que osciló de 3-6 cm<sup>3</sup> para la cohorte 1, 10-20 cm<sup>3</sup> para la cohorte 2, 30-60 cm<sup>3</sup> para la cohorte 3 y 100 cm<sup>3</sup> para la cohorte 4 y la cohorte 5. Para las cohortes 1 y 2, el anticuerpo E3 se administró por un bolo IV lento durante 3 a 5 minutos, seguido de un lavado IV de 5 cm<sup>3</sup> de inyección de cloruro

sódico, USP. Para las cohortes 3-5, el anticuerpo E3 se administró a 100 cc/hora por bomba de infusión, seguido de un lavado IV de 5 cm<sup>3</sup> de inyección de cloruro sódico, USP e interrupción del IV. Dentro de cada cohorte, el placebo (inyección de cloruro sódico, USP) se administró por bolo lento o infusión continua del mismo modo que el anticuerpo E3.

5 Después de dos días hospitalizados, a los pacientes se les dio el alta. Dependiendo de la cohorte del nivel de dosis, continuaron evaluándose para los niveles de dolor durante 28 días después de la administración del anticuerpo E3 (cohortes 1, 2 y 3) o hasta 181 días después de la administración del anticuerpo E3 (cohortes 4 y 5). Se realizaron evaluaciones de seguridad periódicas durante 181 días en todos los pacientes.

10 Los efectos analgésicos se evaluaron antes de la dosificación y en múltiples momentos después de la administración de anticuerpo E3. La VAS electrónica validada que oscila de 0-100 con resolución de 101 puntos se usó para el presente índice de dolor de la rodilla. Los pacientes fueron puestos al corriente 4 veces al día y se instruyeron para indicar el nivel de dolor por artritis en el índice de rodilla en ese momento. La VAS electrónica validada que osciló de 0-100 con resolución de 101 puntos también se usó para el índice de dolor de la rodilla durante el caminar. La VAS para el índice de dolor de rodilla durante el caminar se completó diariamente, simultáneamente al cuatro índice  
15 presente de la VAS del dolor de rodilla.

La recogida de datos del diario electrónico fue proporcionada en el día -8 y una evaluación de cribado de 7 días del cumplimiento del diario electrónico se realizó del día -8 al día -2 para determinar el éxito del uso de los diarios electrónicos para un sujeto dado. Los sujetos fueron instruidos para completar 4 diarios por día. La VAS media registrada durante el periodo de cribado se usa como nivel de referencia para la evaluación de la eficacia.

20 También se usó el índice de osteoartritis WOMAC (escala de artritis de las universidades Western Ontario y McMaster) 3.1 versión VA.1<sup>®</sup> para evaluar el dolor por artritis. WOMAC 3.1<sup>™</sup> consiste en 24 preguntas divididas en 3 dominios: dolor (5 preguntas), rigidez (2 preguntas) y función física (17 preguntas). Bellamy y col., J. Rheumatol 15:1833-40 (1988); y Bellamy, Semin. Arthritis Rheum. 18:14-7 (1989). El dominio de la función física proporciona información de la capacidad para realizar actividades de la vida diaria. Los pacientes realizaron la prueba  
25 directamente en el diario electrónico durante las visitas clínicas designadas usando la VAS electrónica validada que oscila de 0-100 con resolución de 101 puntos. Cada dominio se puntuó determinando las medias de las puntuaciones VAS de las preguntas de componente. La WOMAC 3.1<sup>™</sup> total se puntuó determinando las medias de las puntuaciones de cada uno de los 3 dominios. También se requirió que los pacientes informaran de la medicación de rescate usada por el diario electrónico.

30 El resultado se evaluó como el cambio del nivel inicial (nivel de dolor durante el periodo de cribado), expresado como la diferencia de la intensidad de dolor (PID) o la suma de las diferencias de la intensidad de dolor (SPID) para diferentes niveles de dosis. Los cambios del nivel inicial en las mediciones de actividad se analizaron usando un análisis del modelo de la covarianza (ANCOVA) con tratamiento como el factor principal y dolor del nivel de referencia como covariable. Para las medias y los cambios de las medias, las comparaciones del anticuerpo E3 con  
35 el placebo se hicieron usando la prueba de Dunnett. La prueba de tendencias de Tukey-Ciminera-Heysse se usó para evaluar la relación de dosis-respuesta.

40 Como se muestra en la Figura 24, la disminución de la intensidad de dolor diaria media después de la única administración del anticuerpo anti-NGF E3 se observó en cada dosis probada. Generalmente, el efecto en la reducción de la intensidad de dolor duró más en el grupo tratado con la mayor dosis (30 µg/kg, 100 µg/kg y 300 µg/kg) que en el grupo tratado con la menor dosis (3 µg/kg y 10 µg/kg). Como se muestra en la Figura 25, las reducciones de la intensidad de dolor duraron al menos 80 días después de la administración de 100 µg/kg de E3.

45 La Tabla 23 dada a continuación muestra la suma de las diferencias de la intensidad de dolor (SPID) para cada dosificación de E3 para los días 2-8, días 2-14, días 2-21 y días 2-28 con respecto a los niveles iniciales. Se usó ANCOVA para el análisis estadístico. La Tabla 23 indica que la reducción del dolor fue estadísticamente significativa (p < 0,05) después de una única administración del anticuerpo anti-NGF E3.

Tabla 23. Suma de las diferencias de la intensidad de dolor para intervalos de tiempo variables con respecto al nivel inicial.

	Días 2-8	Días 2-14	Días 2-21	Días 2-28
<b>Placebo</b>	-269	-486	-758	-1055
<b>3 µg/kg</b>	-572	-956	-1048	-1067
	(0,11)	(0,18)	(0,63)	(0,99)
	(0,43)	(0,62)	(0,99)	(1,00)

(continuación)

	Días 2-8	Días 2-14	Días 2-21	Días 2-28
<b>10 µg/kg</b>	-671 (0,04) (0,17)	-1174 (0,05) (0,24)	-1623 (0,15) (0,55)	-2020 (0,29) (0,81)
<b>30 µg/kg</b>	-733 (0,02) (0,09)	-1371 (0,02) (0,08)	-2042 (0,04) (0,17)	-2566 (0,10) (0,40)
<b>100 µg/kg</b>	-766 (<0,01) (0,02)	-1403 (<0,01) (0,02)	-1996 (0,02) (0,10)	-2726 (0,04) (0,17)
<b>300 µg/kg</b>	-769. (<0,01) (0,02)	-1340 (<0,01) (0,04)	-1869 (0,04) (0,17)	-2521 (0,07) (0,29)
<b>Todos</b>	-713 (<0,01) (< 0,01)	-1269 (<0,01) (<0,01)	-1752 (0,01) (0,06)	-2254 (0,04) (0,18)

El análisis estadístico se realizó sin ajuste y con ajuste para múltiples comparaciones. La primera fila de los valores de p entre paréntesis para cada intervalo de tiempo fue sin ajuste; la segunda fila de los valores de p entre paréntesis fue con ajuste de Dunnett.

- 5 Como se muestra en la Figura 26, el porcentaje de reducción máxima en SPID por la única administración de anticuerpo anti-NGF E3 alcanzó aproximadamente del 45% a aproximadamente el 65% del día 2 al día 14 para cada dosis de E3 probada, y alcanzó aproximadamente del 45% a aproximadamente el 60% del día 2 al día 28 para 10 µg/kg, 30 µg/kg, 100 µg/kg y 300 µg/kg de dosis de E3.

- 10 Como se muestra en la Figura 27, la administración del anticuerpo anti-NGF E3 también redujo la puntuación de WOMAC del día 1 al día 28. La puntuación de dolor, función física y rigidez se redujeron significativamente a 100 µg/kg de dosis de E3. Estos datos indican que la única administración de anticuerpo anti-NGF no sólo reduce el dolor, sino que también mejora la función física y rigidez en pacientes que tienen osteoartritis.

#### **Depósito de material biológico**

- 15 Los siguientes materiales se han depositado en la Colección americana de cultivos tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia, EE.UU. (ATCC):

<b>Material</b>		Nº de acceso de ATCC	Fecha del depósito
Eb.911.3E	cadena ligera de E3	PTA-4893	8 de enero de 2003
Eb.pur.911.3E	cadena ligera de E3	PTA-4894	8 de enero de 2003
Db.911.3E	cadena pesada de E3	PTA-4895	8 de enero de 2003

El vector Eb.911.3E es un polinucleótido que codifica la región variable de la cadena ligera de E3; el vector Eb.pur.911.3E es un polinucleótido que codifica la región variable de la cadena ligera de E3 y el vector Db.911.3E es un polinucleótido que codifica la región variable de la cadena pesada de E3.

- 20 Este depósito se hizo bajo las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento de patente y las reglamentaciones bajo el mismo (Tratado de Budapest). Éste asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años desde la fecha del depósito. El depósito será puesto a disposición por la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, y sujeto a un acuerdo entre Rinat Neuroscience Corp. y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y de libre acceso de la progenie del cultivo del depósito al público tras la concesión de la patente de EE.UU. pertinente o tras

5 la apertura a consulta por el público de cualquier solicitud de patente de EE.UU. o extranjera, independiente de la que venga primera, y asegura la disponibilidad de la progenie a uno determinado por el Comisionado de patentes y marcas registradas de EE.UU. que está autorizado por el mismo según la sección 122 del título 35 del USC y las reglas del comisionado con arreglo al mismo (incluyendo la sección 1.14 del título 37 del CFR, con particular referencia a 886 OG 638).

10 El cesionario de la presente solicitud está de acuerdo en que si un cultivo de los materiales en depósito debe morir o perderse o destruirse cuando se cultiva bajo condiciones adecuadas, los materiales serán inmediatamente sustituidos tras la notificación por otros iguales. La disponibilidad del material depositado no debe interpretarse como una licencia para poner en práctica la invención en infracción de los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno según su ley de patentes.

**Secuencias de anticuerpos**

Región variable de la cadena pesada (las CDR de Kabat están subrayadas; la CDR de Chothia están en **NEGRITA Y EN CURSIVA**)

**QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDY  
NSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFFDYWGQGTL  
VTVS (SEC ID N°: 1)**

15 Región variable de la cadena ligera (las CDR de Kabat están subrayadas; la CDR de Chothia están en **NEGRITA Y EN CURSIVA**)

**DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASOSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIY YTSRFHSGVP  
SRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKRT (SEC ID N°: 2)**

CDR extendidas de la cadena pesada de E3

CDRH1: GFSLIGYDLN (SEC ID N°: 3)

20 CDRH2: IIWGDGTTDYN SAVKS (SEC ID N°: 4)

CDRH3: GGYWYATSYFFDY (SEC ID N°: 5)

CDR extendidas de la cadena ligera de E3

CDRL1: RASQSSISNNLN (SEC ID N°: 6)

CDRL2: YTSRFHS (SEC ID N°: 7)

25 CDRL3: QQEHTLPYT (SEC ID N°: 8)

CDR extendidas del anticuerpo monoclonal de ratón 911

CDR extendidas de la cadena pesada de 911

CDRH1: GFSLIGYDIN (SEC ID N°: 9)

CDRH2: MIWGDGTTDYN SALKS (SEC ID N°: 10)

30 CDRH3: GGYYYGTSYFFDY (SEC ID N°: 11)

CDR extendidas de la cadena ligera de 911

CDRL 1: RASQDISNHLN (SEC ID N°: 12)

CDRL2: YISRFHS (SEC ID N°: 13)

CDRL3: QQSKTLPYT (SEC ID N°: 14)

35 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de E3 (completa)

**QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIHWGDGTTD  
YNSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDYWGQ  
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV  
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPP  
CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN  
AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQP  
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDS  
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK (SEC ID  
Nº: 16)**

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 3E (anticuerpo completo)

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGV  
PSRFGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP  
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL  
STLTLSKADYEKHXVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID Nº: 17)**

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de 3E (anticuerpo completo)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGAETGGTGAAGCCTTCCGAGACCCTGT  
 CCCTCACCTGCACTGTCTCTGGGTTCTCACTTATCGGCTATGATCTTAACTGGATCC  
 GACAGCCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGATTATCTGGGGTGATGGAA  
 CCACAGACTATAATTCAGCTGTCAAATCCCGCGTCACCATCTCAAAGACACCTCCA  
 AGAACAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTA  
 TTA CTGTGCGAGAGGAGGTTATTGGTACGCCACTAGCTACTACTTTGACTACTGG  
 GGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCTGTCTT  
 CCCACTGGCCCCATGCTCCCGCAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCC  
 TGGTCAAGGACTACTTCCCAGAACCTGTGACCGTGTCTGGA ACTCTGGCGCTCTG  
 ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTG CAGTCTCAGGTCTCTACTCCCTC  
 AGCAGCGTGGTGACCGTGCCATCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAA  
 CGTAGATCACAAGCCAAGCAACACCAAGGTGACAAAGACCGTGGAGAGAAAGTGT  
 TGTGTGGAGTGTCCACCTTGTCCAGCCCCTCCAGTGGCCGGACCATCCGTGTTCT  
 GTTCCCTCCAAAGCCAAAGGACACCCTGATGATCTCCAGAACCCAGAGGTGACCT  
 GTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTATG  
 TGGACGGAGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAAGAGAGGAGCAGTTCA  
 ACTCCACCTTCAGAGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAA  
 CGGAAAGGAGTATAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGGACTGCCATCCAGCATCGA  
 GAAGACCATCTCCAAGACCAAGGGACAGCCAAGAGAGCCACAGGTGTATAACCTG  
 CCACCATCCAGAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGA  
 AGGGATTCTATCCATCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCAGA  
 GAACA ACTATAAGACCACCCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGATCCTTCTTCTGTA  
 TTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCTTGT  
 TCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTATAACCAGAAGAGCCTGTCCCTGTC  
 TCCAGGAAAGTAA (SEC ID N°: 65)

Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la cadena pesada de 3E

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCCGAGACCCTGT  
 CCCTCACCTGCACTGTCTCTGGGTTCTCACTTATCGGCTATGATCTTAACTGGATCC  
 GACAGCCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGATTATCTGGGGTGATGGAA  
 CCACAGACTATAATTCAGCTGTCAAATCCCGCGTCACCATCTCAAAGACACCTCCA  
 AGAACAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTA  
 TTA CTGTGCGAGAGGAGGTTATTGGTACGCCACTAGCTACTACTTTGACTACTGG  
 GGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEC ID N°: 66)

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de 3E (anticuerpo completo)

GATATCCAGATGACACAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCCTCTGTGGGTGACCGCGT  
CACCATCACCTGCCGCGCATCTCAGTCCATTAGCAATAATCTGAACTGGTATCAGC  
AGAAGCCAGGCAAAGCCCCAAAACCTCCTGATCTACTACACCTCACGCTTCCACTCA  
GGTGTCCCATCACGCTTCAGTGGCAGTGGCTCTGGTACAGATTTACCTTCACCAT  
TAGCAGCCTGCAACCAGAAGATATTGCCACTTATTACTGCCAACAGGAGCATACCC  
TTCCATATACCTTCGGTCAAGGCACCAAGCTGGAGATCAAACGCCTGTGGCTGCA  
CCATCTGTCTTCATCTTTCCCTCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCCGGAACCTGCCTCT  
GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCACGCGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGG  
TGGATAACGCCCTCCAATCCGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG  
CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGCAGACTAC  
GAGAAACACMAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGTTCTCCAG  
TCACAAAGAGCTTCAACCGCGGTGAGTGCTAA (SEC ID N°: 67)

Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la cadena ligera de 3E

GATATCCAGATGACACAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCCTCTGTGGGTGACCGCGT  
CACCATCACCTGCCGCGCATCTCAGTCCATTAGCAATAATCTGAACTGGTATCAG  
CAGAAGCCAGGCAAAGCCCCAAAACCTCCTGATCTACTACACCTCACGCTTCCACT  
CAGGTGTCCCATCACGCTTCAGTGGCAGTGGCTCTGGTACAGATTTACCTTCACC  
ATTAGCAGCCTGCAACCAGAAGATATTGCCACTTATTACTGCCAACAGGAGCATA  
CCCTTCCATATACCTTCGGTCAAGGCACCAAGCTGGAGATCAAACGC (SEC ID  
N°: 68)

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de un anticuerpo antagonista anti-NGF en la preparación de un medicamento para mejorar la rigidez en un individuo que tiene osteoartritis.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que el individuo es un ser humano.
- 5 3. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo antagonista anti-NGF es para administrar a una frecuencia de dosificación en un intervalo de una vez cada semana a una vez cada doce semanas.
4. El uso de la reivindicación 3, en el que el anticuerpo antagonista anti-NGF es para administrar una vez cada ocho semanas.
- 10 5. El uso de la reivindicación 3, en el que el anticuerpo antagonista anti-NGF es para administrar una vez cada mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada cuatro meses, una vez cada cinco meses o una vez cada seis meses.
6. El uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo antagonista anti-NGF es para administrar a una dosis en un intervalo de 3 µg/kg a 1 mg/kg.
- 15 7. El uso de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo antagonista anti-NGF es para administrar a una dosis de 100 µg/kg o de 300 µg/kg.
8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo antagonista anti-NGF es para administrar intravenosamente o subcutáneamente.
9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo antagonista anti-NGF es un anticuerpo monoclonal.
- 20 10. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo antagonista anti-NGF es un anticuerpo humanizado.
11. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo antagonista anti-NGF se une a NGF humano.
- 25 12. El uso de la reivindicación 11, en el que el anticuerpo antagonista anti-NGF se une adicionalmente a NGF de roedor.
13. El uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo antagonista anti-NGF:
  - (a) se une a NGF con una  $K_D$  inferior a aproximadamente 2 nM; y/o
  - (b) inhibe la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una  $CI_{50}$  de 100 pM o menor en la que la  $CI_{50}$  se mide en presencia de NGF humano 15 pM; y/o
  - 30 (c) inhibe la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una  $CI_{50}$  de 10 pM o menor en la que la  $CI_{50}$  se mide en presencia de 1,5 pM de NGF.
14. El uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo antagonista anti-NGF comprende (i) una región variable de la cadena pesada que comprende:
  - 35 (a) una región CDR1 que tiene la secuencia GFSLIGYDLN;
  - (b) una región CDR2 que tiene la secuencia IIWGDGTTDYNSAVKS; y
  - (c) una región CDR3 que tiene la secuencia GGYWYATSYFFDY;
 y (ii) una región variable de la cadena ligera que comprende:
  - 40 (a) una región CDR1 que tiene la secuencia RASQISNNLN;
  - (b) una región CDR2 que tiene la secuencia YTSRFHS; y
  - (c) una región CDR3 que tiene la secuencia QQEHTLPYT.
15. El uso de la reivindicación 14, en el que el anticuerpo antagonista anti-NGF es un anticuerpo que comprende:
  - (a) una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia:

**QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIG  
IIWGDGTTDYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR  
GGYWYATSYFFDYWGQGLTVTS; y**

- (b) una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISISNNLNWYQQKPGKAPKLLIY  
YTSRFHSGVPSRFSGSGSDFTFTISSLQPEDIATYYCQEHPLPYTFG  
QGTKLEIKRT.

16. El uso de la reivindicación 15, en el que el anticuerpo antagonista anti-NGF es un anticuerpo que comprende:

(a) una cadena pesada que tiene la secuencia:

QVQLQESGPGGLVVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIG  
IIWGDGTTDYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR  
GGYWYATSYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA  
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV  
PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVAGPSV  
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA  
KTKPREEQFNSTFRVVSFLTVDVHVDLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK  
TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES  
NGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE  
ALHNHYTQKSLSLSPGK; y

5 (b) una cadena ligera que tiene la secuencia:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISISNNLNWYQQKPGKAPKLLIY  
YTSRFHSGVPSRFSGSGSDFTFTISSLQPEDIATYYCQEHPLPYTFG  
QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ  
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHXVYAC  
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC.

17. Un anticuerpo antagonista anti-NGF para su uso en mejorar la rigidez en un individuo que tiene osteoartritis.

18. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista anti-NGF y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en mejorar la rigidez en un individuo que tiene osteoartritis.





FIGURA 1B (continuación)

	95	100	105	109
1-T	<u>L P Y T</u>			
2-N	<u>L P</u>			
3-T	<u>L P Y T F G Q G T K L E I K R T</u>			
4-T	<u>L P Y T F G Q G T K L E I K R T</u>			
5-T	<u>L P Y T F G Q G T K L E I K R T</u>			

FIGURA 2

Db.911.3E estándar; ADN circular; 1429 pb  
 Este archivo ha sido creado por Vector NTI

```

http://www.informaxino.com/
VNTDATE|285871584|
VNTDBDATE|285873257|
VNTAUTHORNAME|Demo User|
Sequence 1429 BP; 331 A; 440 C; 380 G; 278 T;
atggccaccg actccagaac ctcctggctg ctgacagtgt cctgctgtg tctgctgtgg 60
ccacaggagg ccagcgtca ggtgcagctg caggagtctg gccacggact ggtgaagcct 120
tccgagacc tgtccctcac ctgcactgtc tctgggttct cacttatcgg ctatgatctt 180
aatggatcc gacagcctcc agggaaggga ctggagtggg ttgggattat ctgggggtgat 240
ggaaccacag actataattc agctgtoaaa tcccgcgtca ccatotcaaa agacacctcc 300
aagaaccagt tctccctgaa gctgagctct gtgaccgctg cggacacggo cgtgtattac 360
tgtgcgagag gaggttattg gtacgcaact agotactact ttgactactg gggccagggo 420
accctggtoa ccgtctctc agcctcaacc aagggcccat ctgtctctcc actggcccca 480
tgtcccgca gcacctccga gacacagcc gccctgggct gcctgggtcaa ggaactactc 540
ccagaacctg tgacctgtc ctggaactct ggcgctotga ccagcggcgt gcacacctc 600
ccagctgtcc tgcagtcctc aggtctctac tccctoagca gcgtgggtgac cgtgccaacc 660
agcaacttcg gcácccagac ctacacctgc aacgtagatc acaagccaag caacaccaag 720
gtcgacaaga ccgtggagag aaagtgtgt gtggagtgtc caccttgtcc agcccctcca 780
gtggccggac catccgtgtt cctgttccct ccaaagccaa aggacacct gatgatctcc 840
agaaccccag aggtgacctg tgtgggtggtg gacgtgtccc acgaggacct agaggtgeag 900
ttcaactggt atgtggacgg agtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc agagagggag 960
cagttcaact ccacctcag agtgggtgag ctgctgacctg tggtgacca ggaactggctg 1020
aacggaaagg agtataagtg taaggtgtcc acaaggagac tgccatccag catcgagaag 1080
accatctcca agacaaagg acagccaaga gaccacagg tgtataacct gccaccatcc 1140
agagaggaga tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc ttggtgaaggg attctatcca 1200
tccgacatcg ccgtggagtg ggagtccaac ggacagccag agaacaacta taagaccacc 1260
cctccaatgc tggactccga cggatccttc ttctgtatt ccaagctgac cgtggacaag 1320
tccagatggc agcagggaaa cgtgttctct tgttccctga tgcacgaggc cctgcacaac 1380
cactataccc agaagagcct gtccctgtct ccaggaaagt aattctaga 1429
    
```

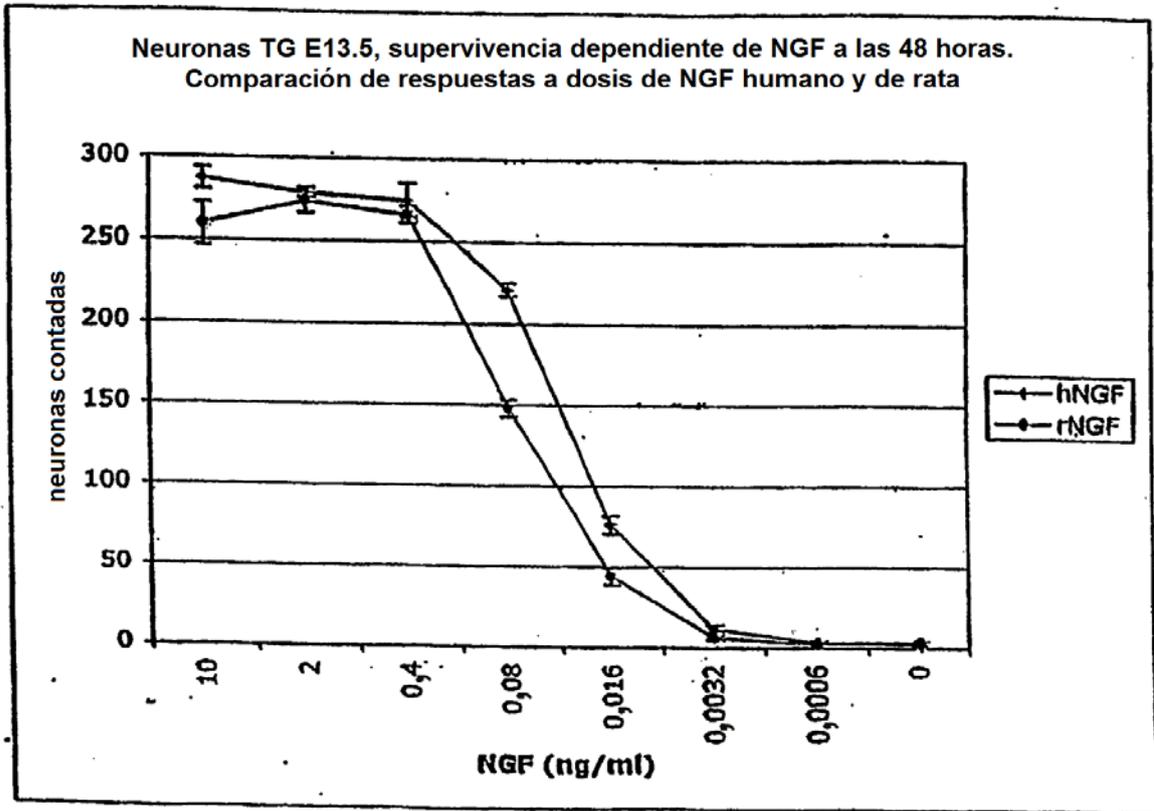
FIGURA 3

Eb.911.3E estándar; ADN circular; 729 pb  
 Este archivo ha sido creado por Vector NTI

```

http://www.informaxinc.com/
VNTDATE|285871514|
VNTDBDATE|285872959|
VNTAUTHORNAME|Demo User|
Sequence 729 BP; 182 A; 231 C; 161 G; 154 T; 1 other;
atggccaacg actocagaac ctccctggctg ctgacagtgt ccttgotgtg tctgotgtgg 60
ccacaggagg ccagcgtga tatccagatg acacagtccc catcctccct gtctgcctct 120
gtgggtgacc gcgtcaccat cacctgccgc gcattctcagt ccattagcaa taatctgaac 180
tggtatcagc agaagccagg caaagcccca aaactcctga totactacac ctacagcttc 240
caotoaggtg tcccatcag cttcagtggc agtggctctg gtaacagattt caccttcacc 300
attagcagcc tgcaaacaga agatatggc acttattact gcaaacaggga gcataccctt 360
ccatatacct tcggtcaagg caccaagctg gagatcaaac gcaotgtggc tgcaccatct 420
gtcttcatct ttcctccatc tgatgagcag ttgaaatccg gaaactgcctc tgttctgtgc 480
ctgctgaata actttatatc acgcgagggc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccttc 540
caatccggta actcccagga gagtgtcaca gacaggaca gcaaggacag cacctacagc 600
ctcagcagca ccctgacctt gagcaagca gactacgaga aacacmaagt ctacgcctgc 660
gaagtcaccc atcagggcct gagttctcca gtcacaaaga gcttcaaccg cgggtgagtgc 720
taattotag 729
    
```

FIGURA 4



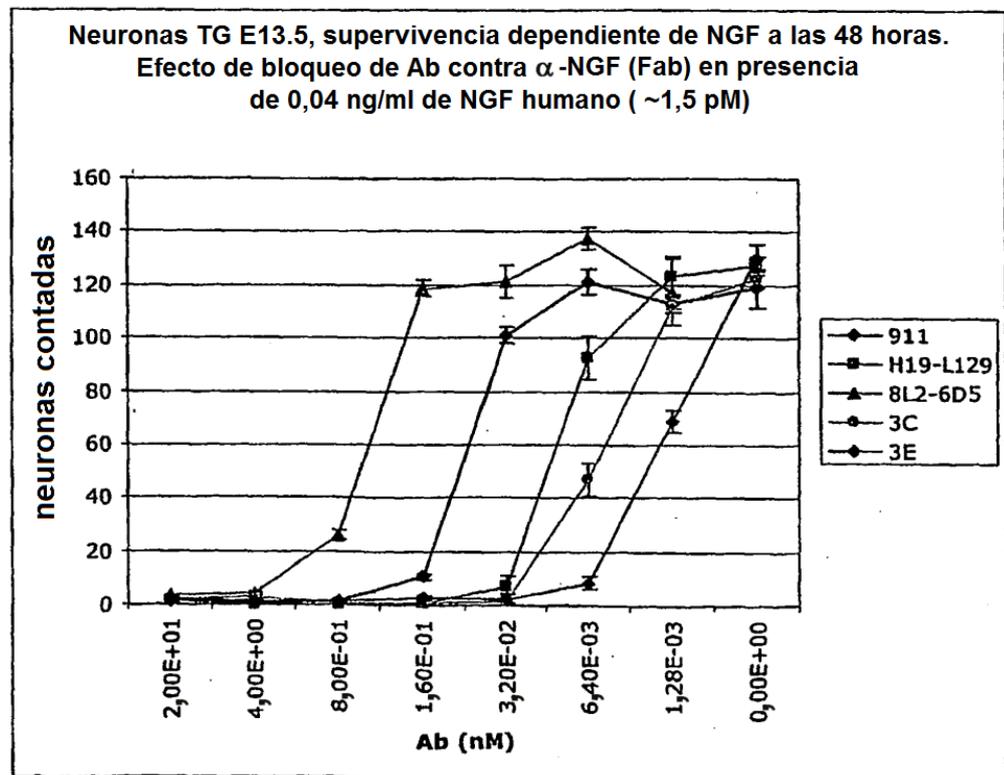
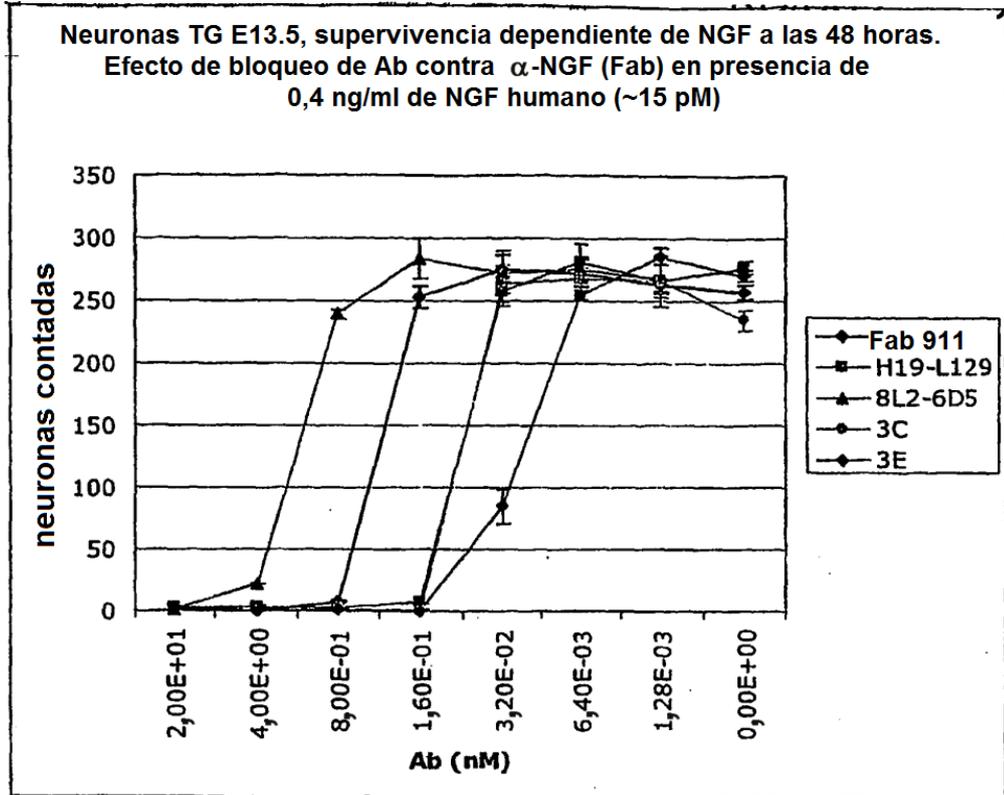


FIGURA 5

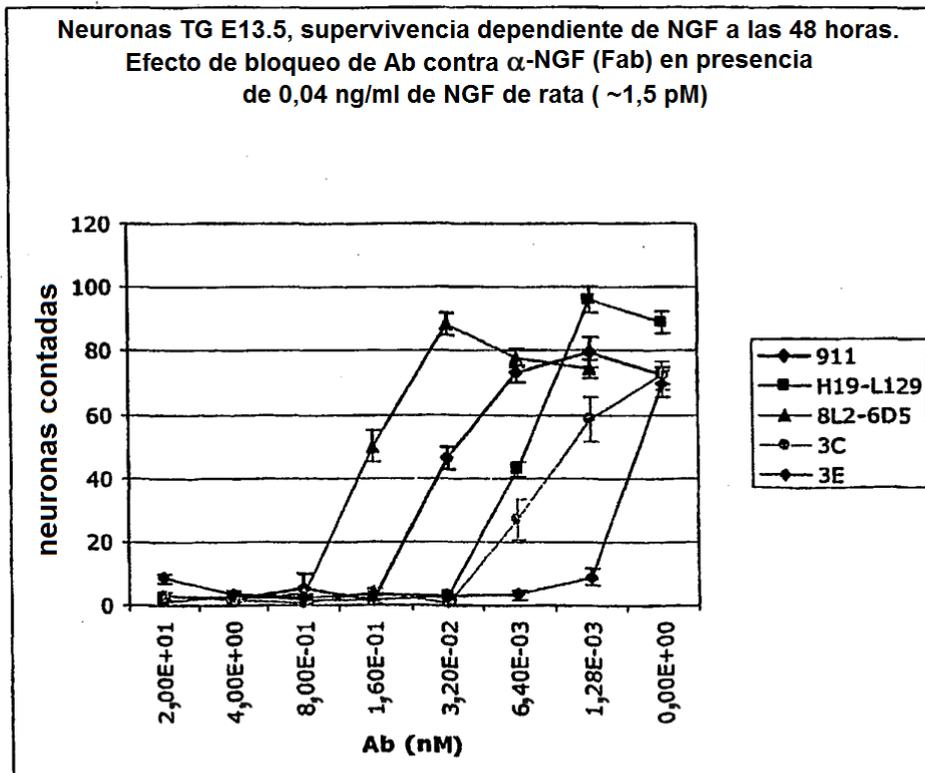
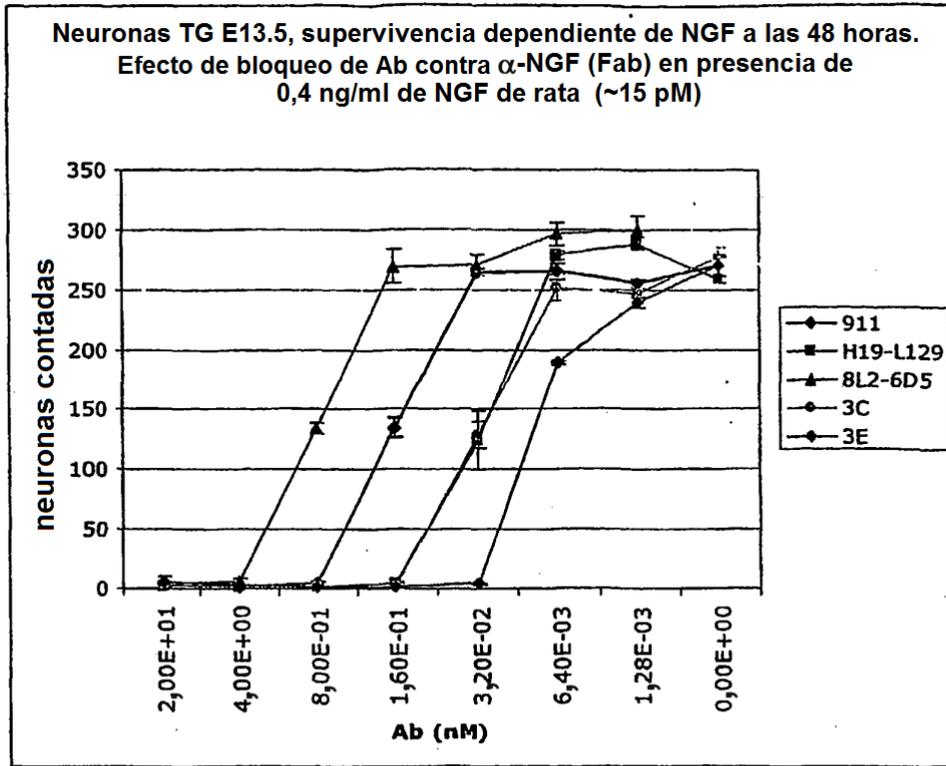
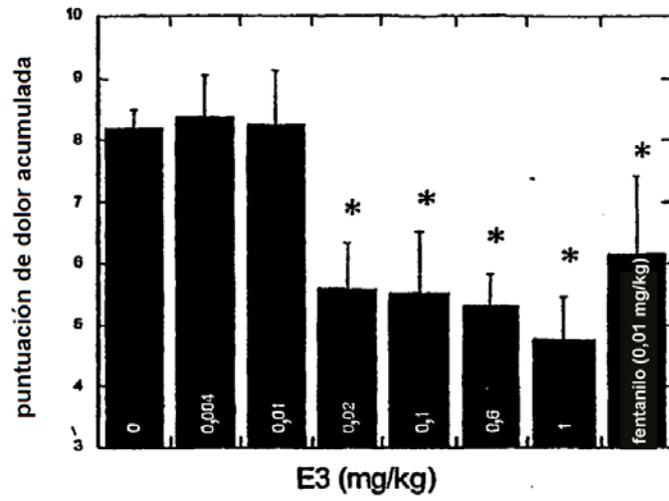


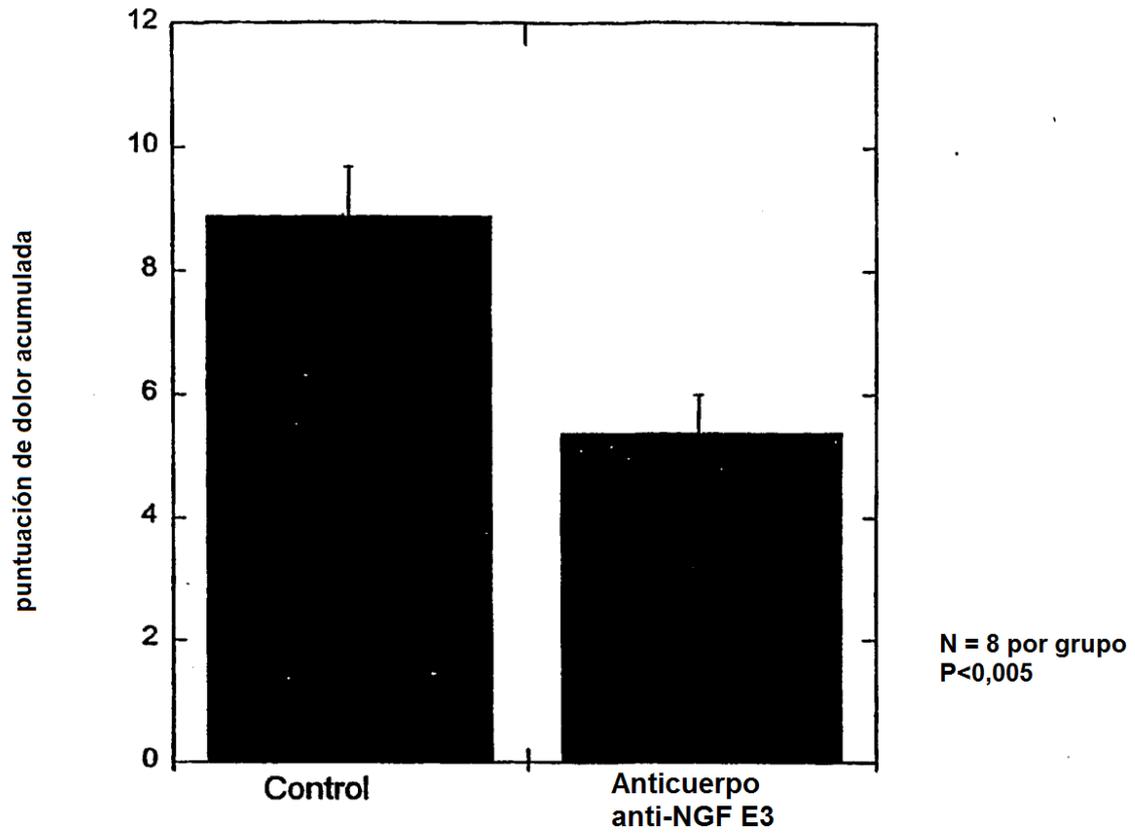
FIGURA 6

**El anticuerpo anti-NGF humanizado E3 mejora el dolor posquirúrgico**



**FIGURA 7**

**El anticuerpo anti-NGF E3 alivia el dolor cuando se inyecta dos horas después de la cirugía**



**Figura 8**

FIGURA 9

Cinética de unión: Fab 911 sobre chip CM5 de NGF

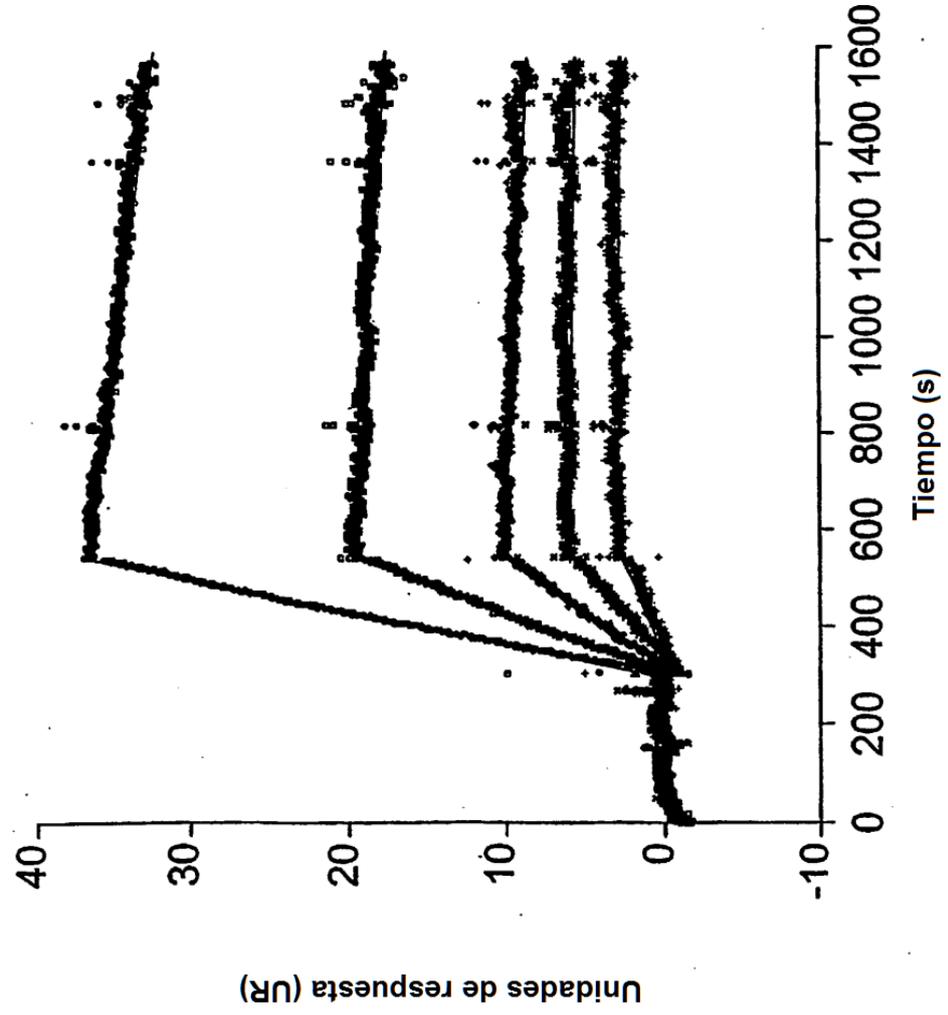


FIGURA 10

Cinética de unión: Fab 3E sobre chip CM5 de NGF

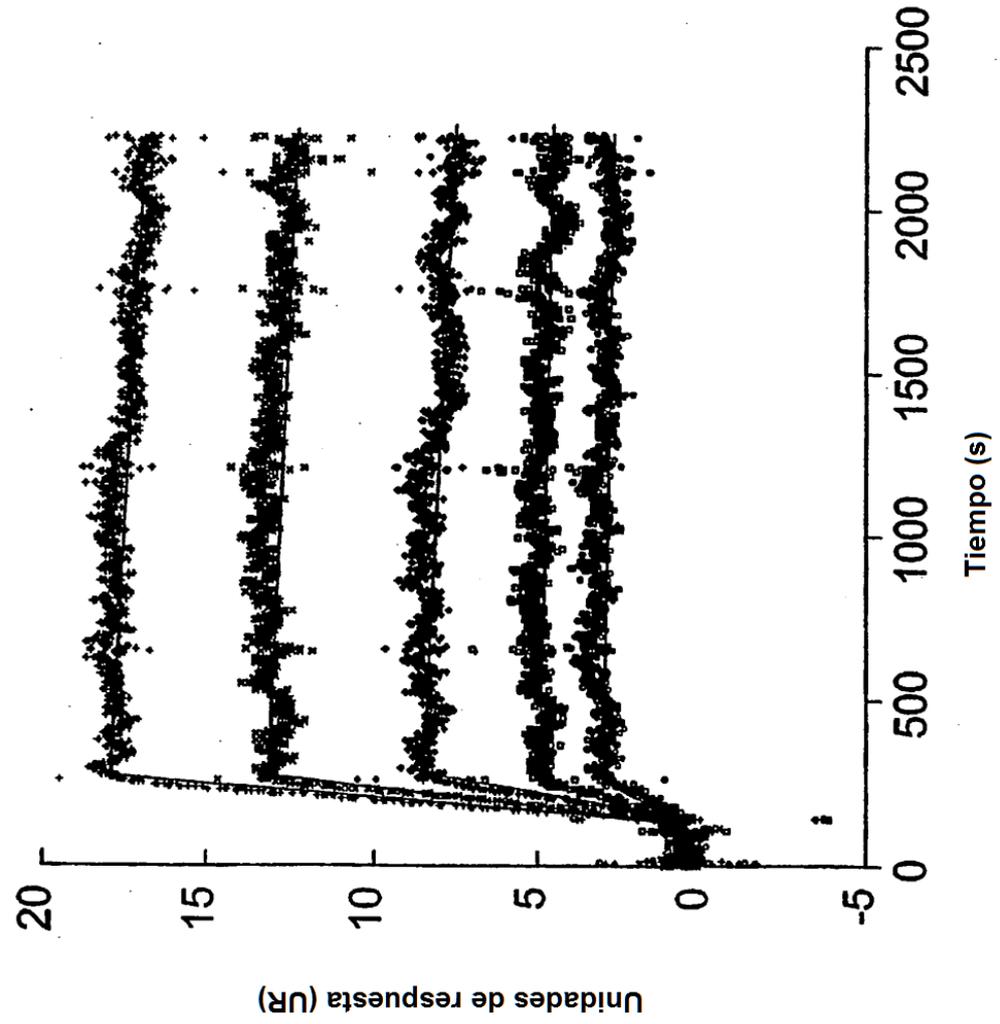
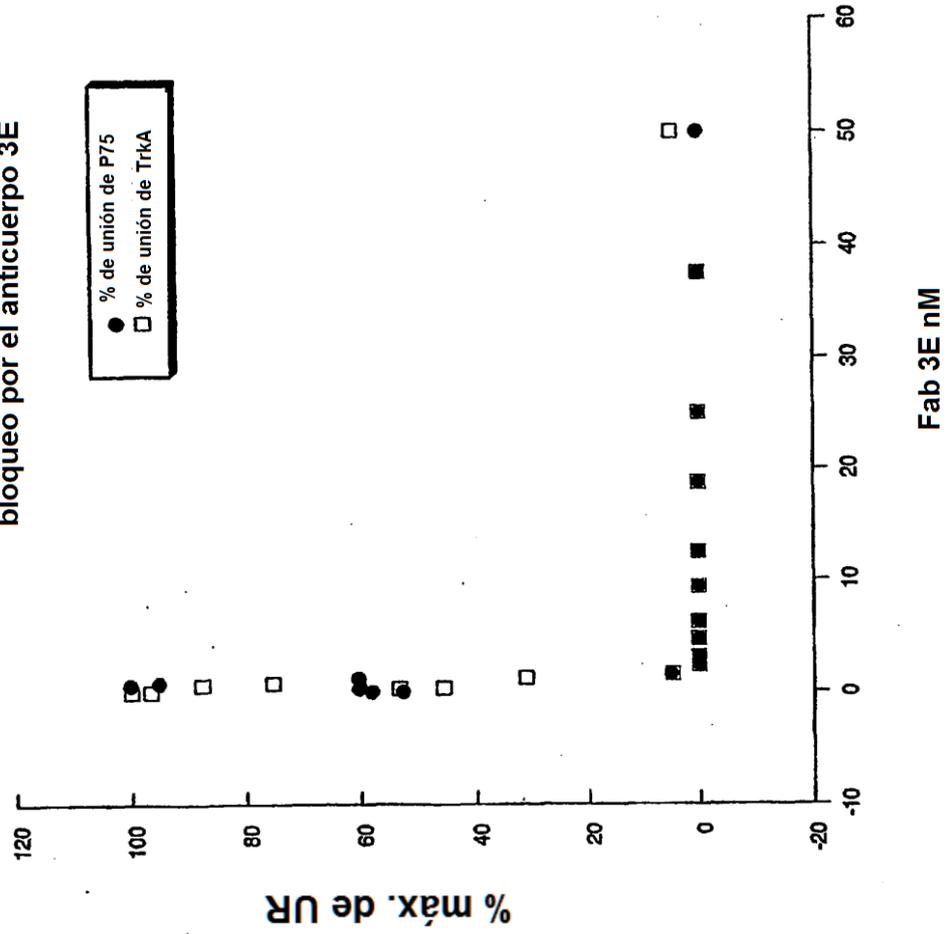


FIGURA 11

Interacción de NGF-TrkA y NGF-P75:  
bloqueo por el anticuerpo 3E



Comparación de Fab 3E de longitud completa frente a 3E. Cultivos TG E13.5, 48 h. Inhibición de la supervivencia dependiente de NGF por 3E, NGF a 0,4 ng/ml (saturante)

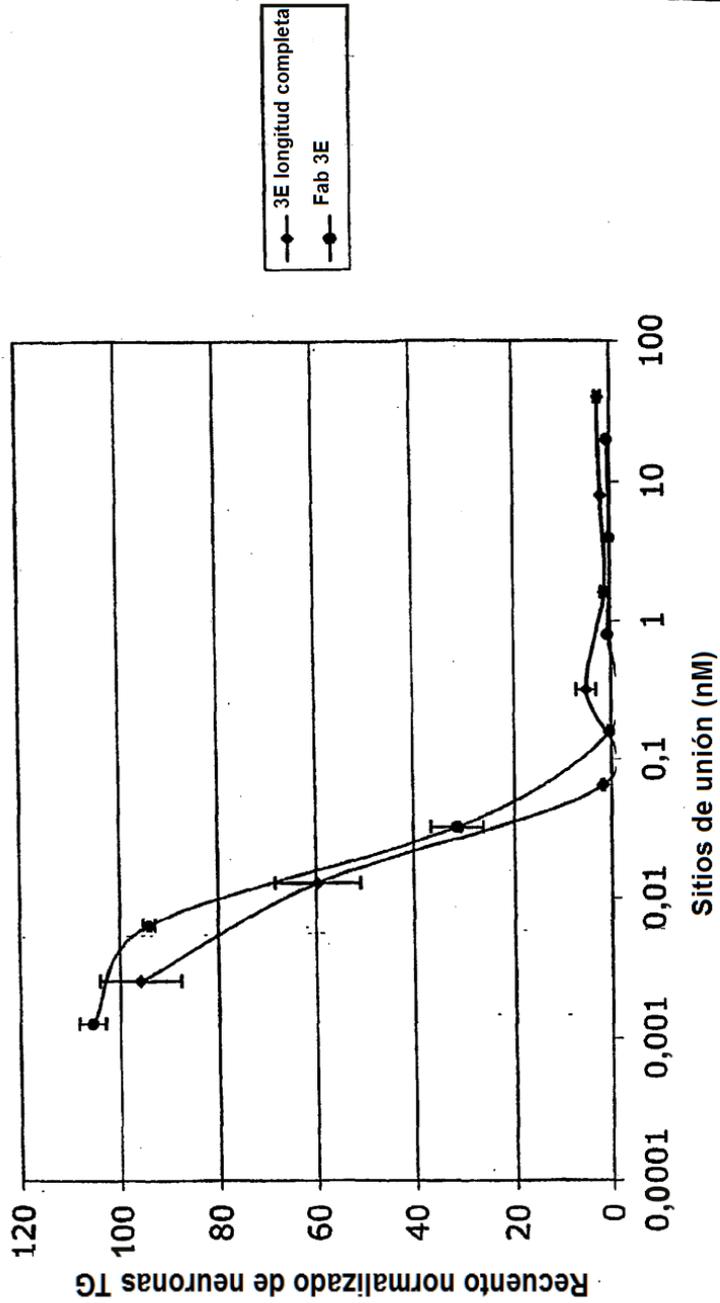


FIGURA 12

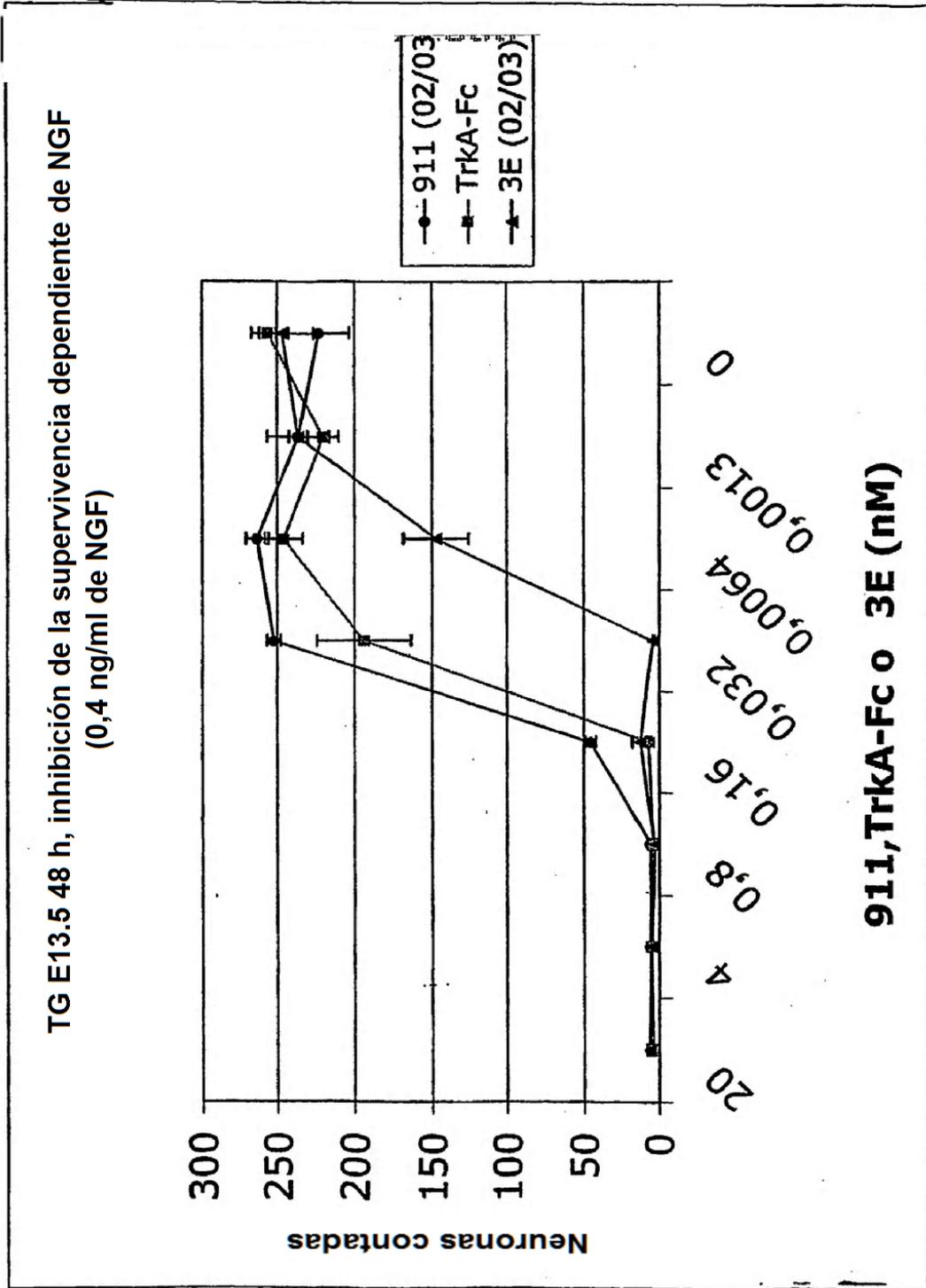


FIGURA 13

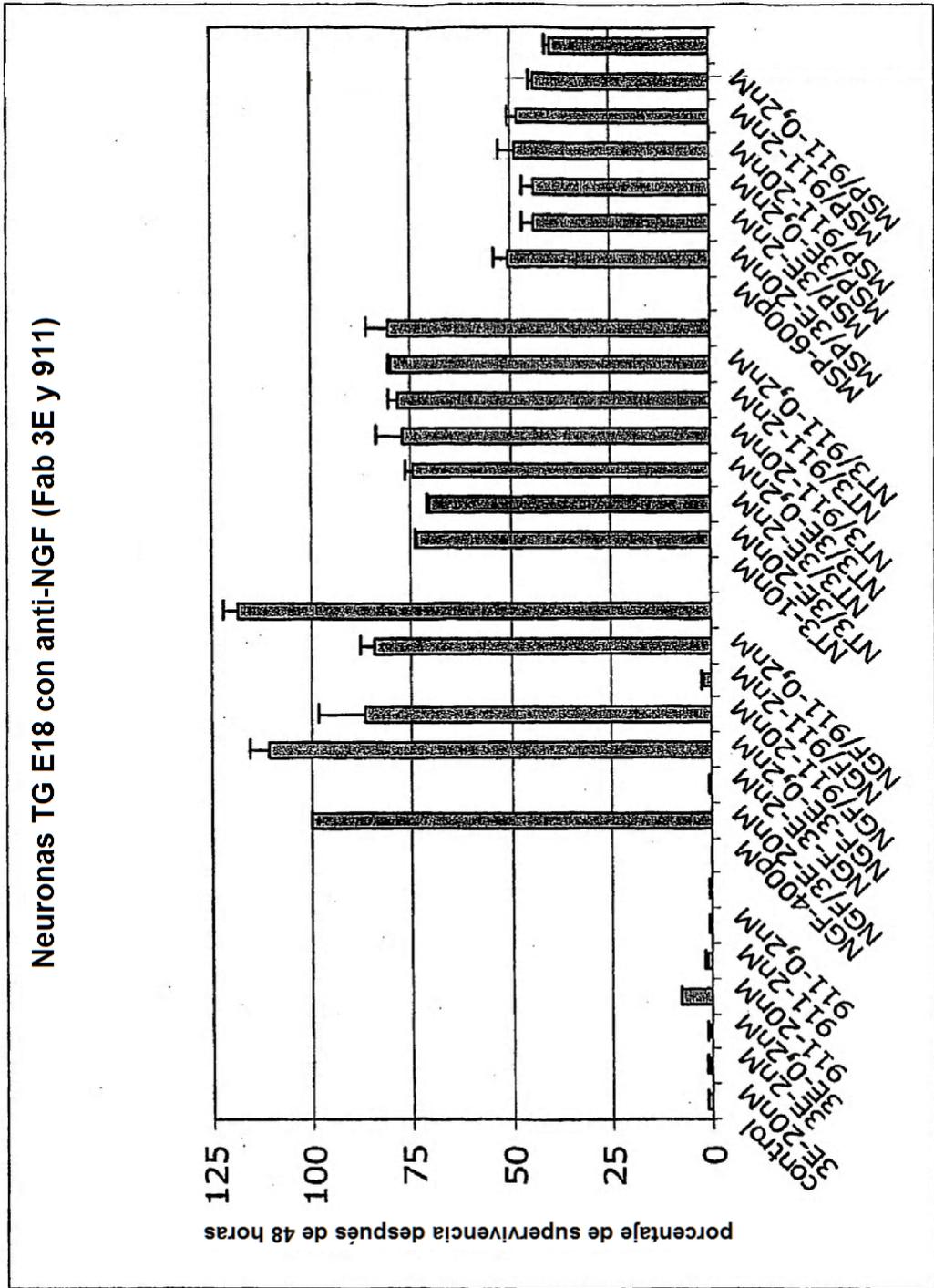


FIGURA 14

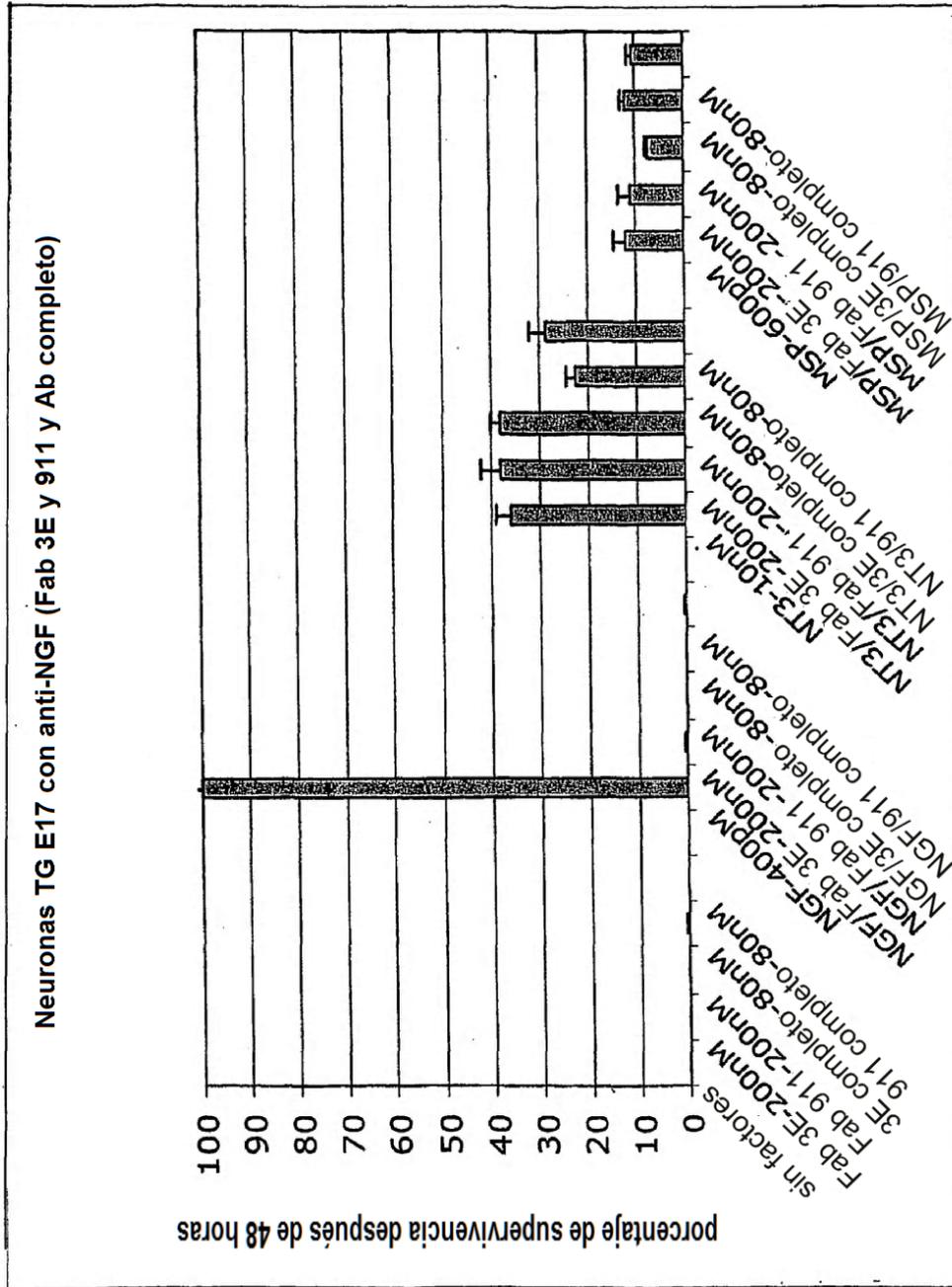


FIGURA 15

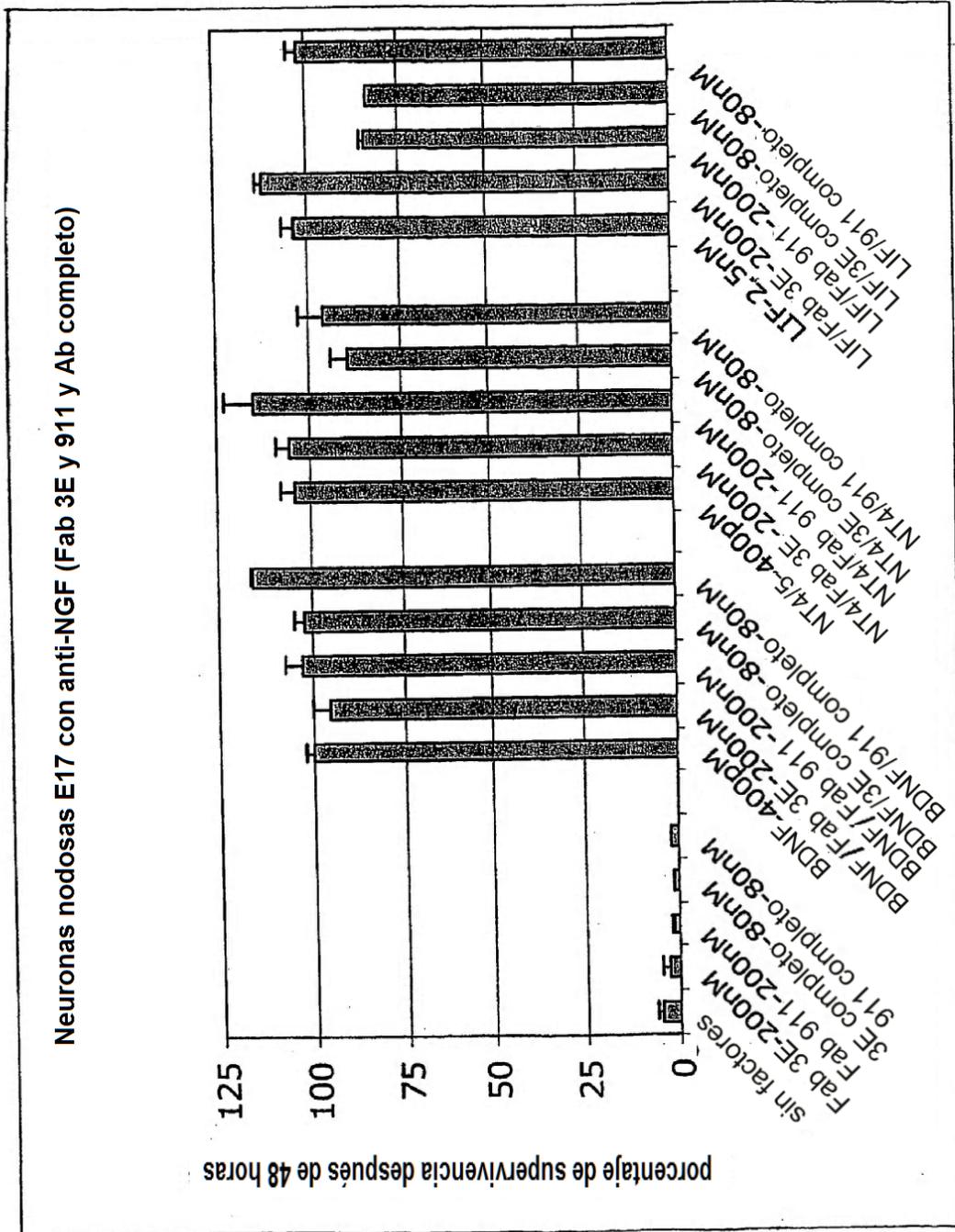


FIGURA 16

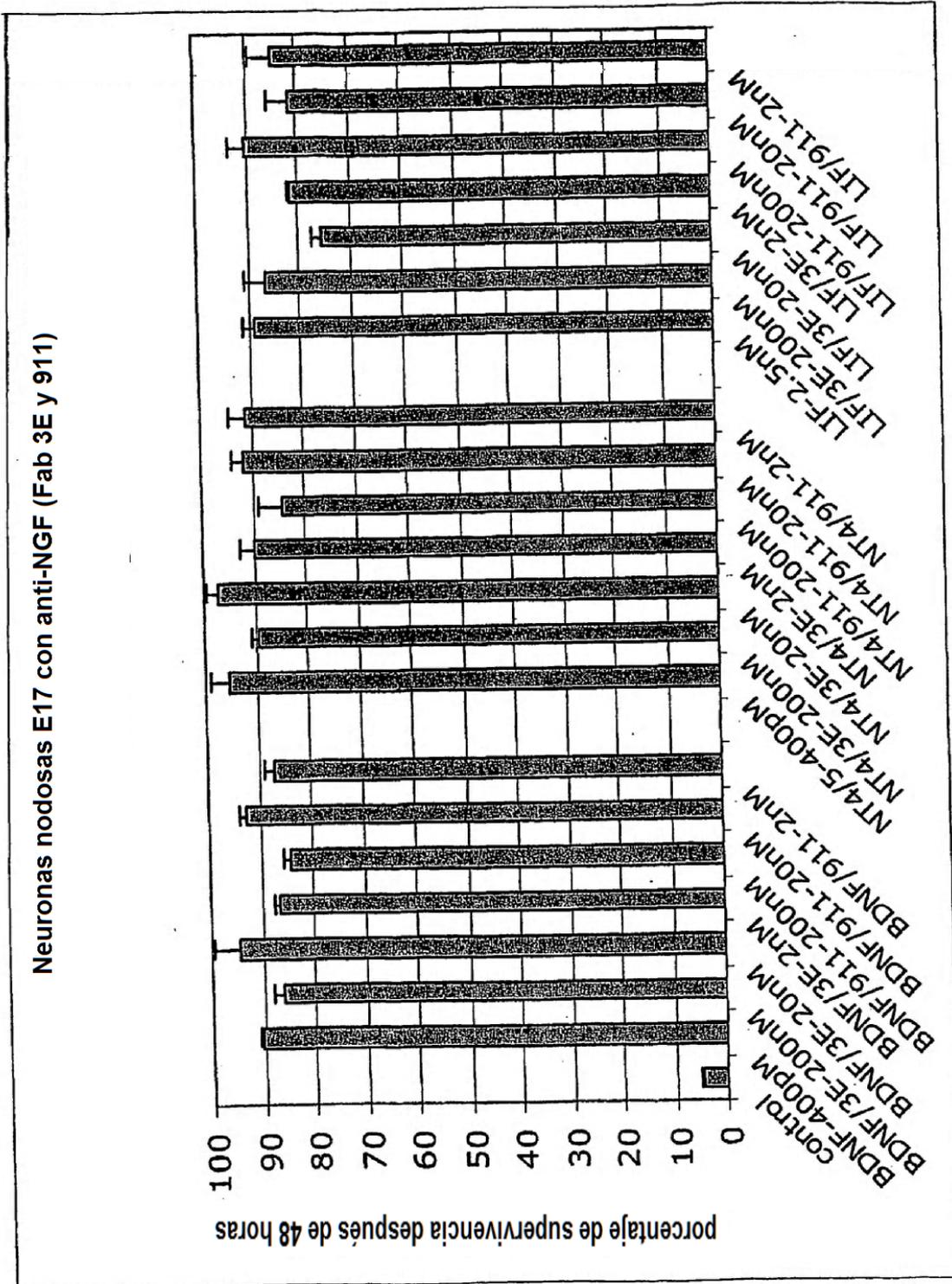
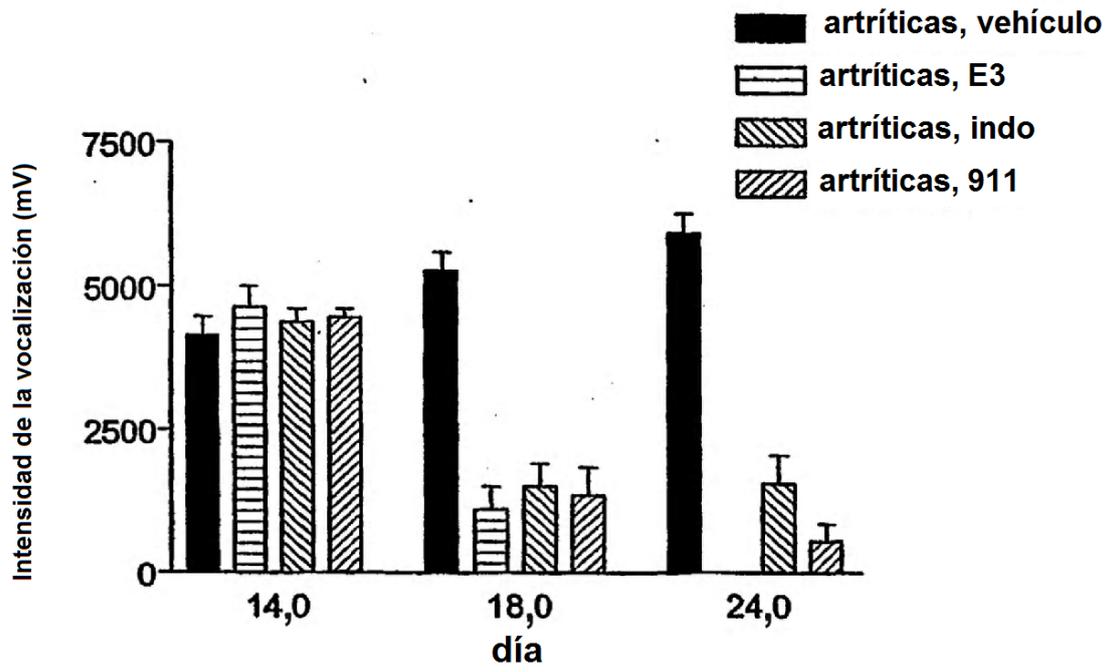
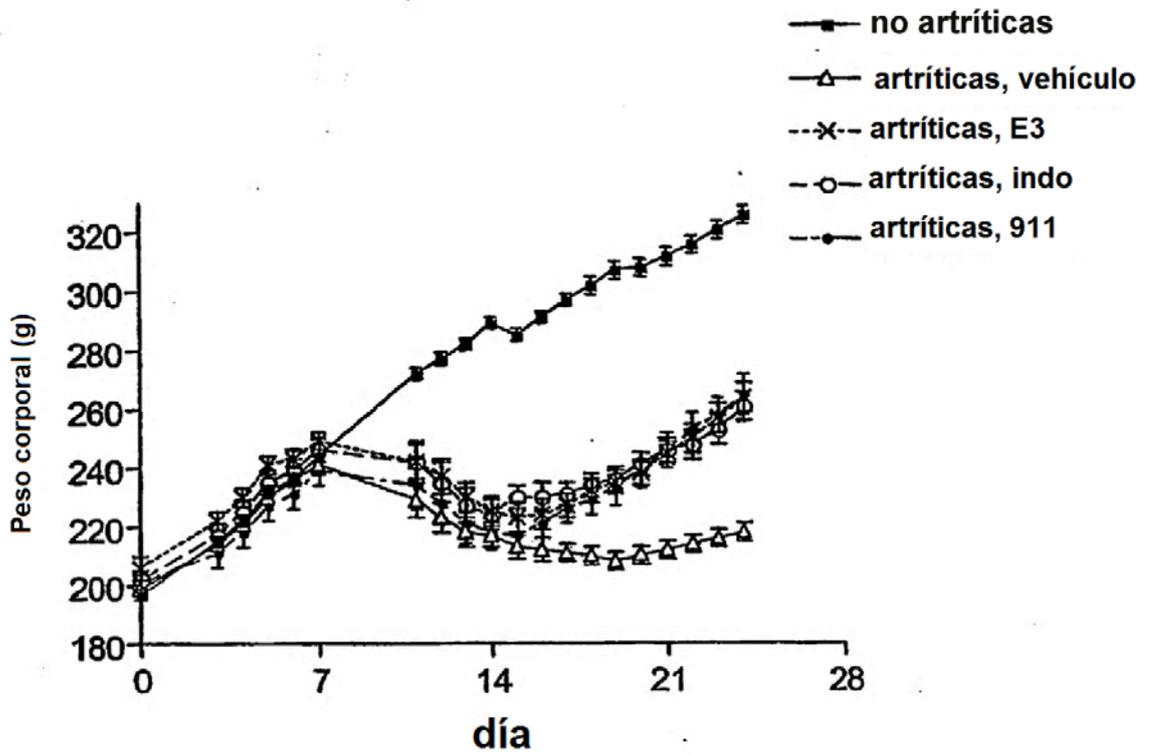


FIGURA 17

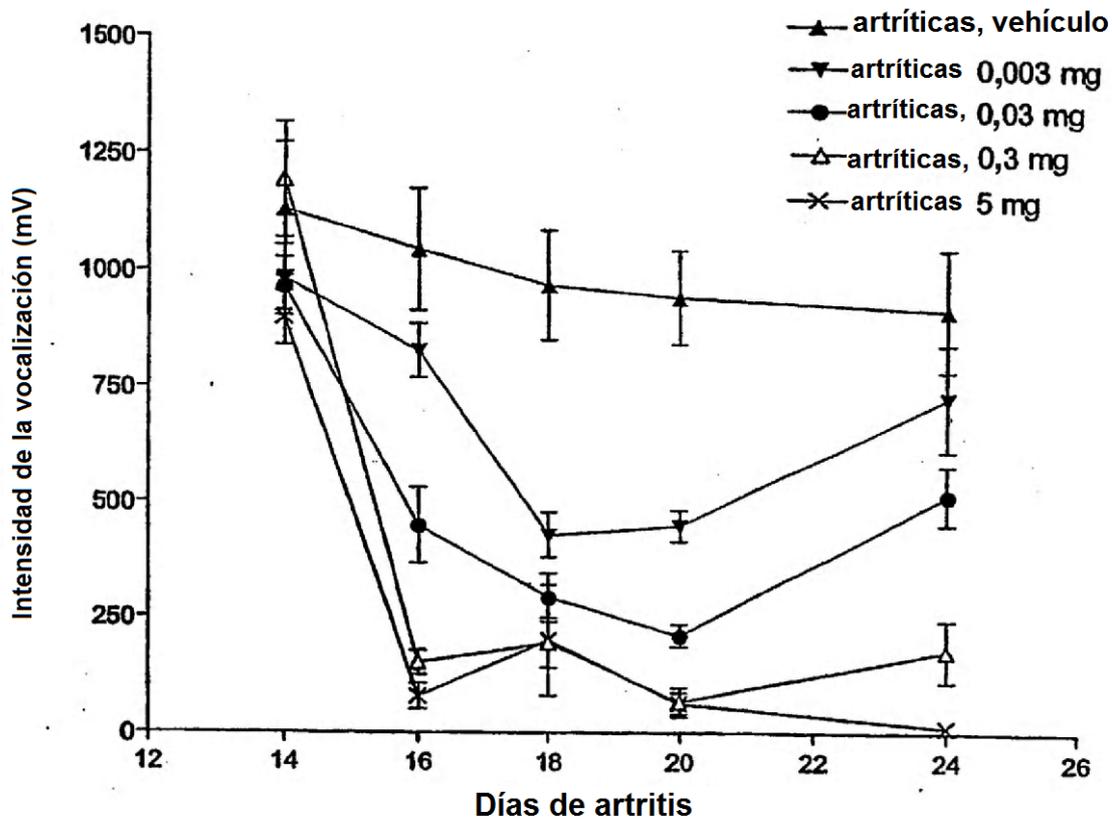
**FIG. 18**



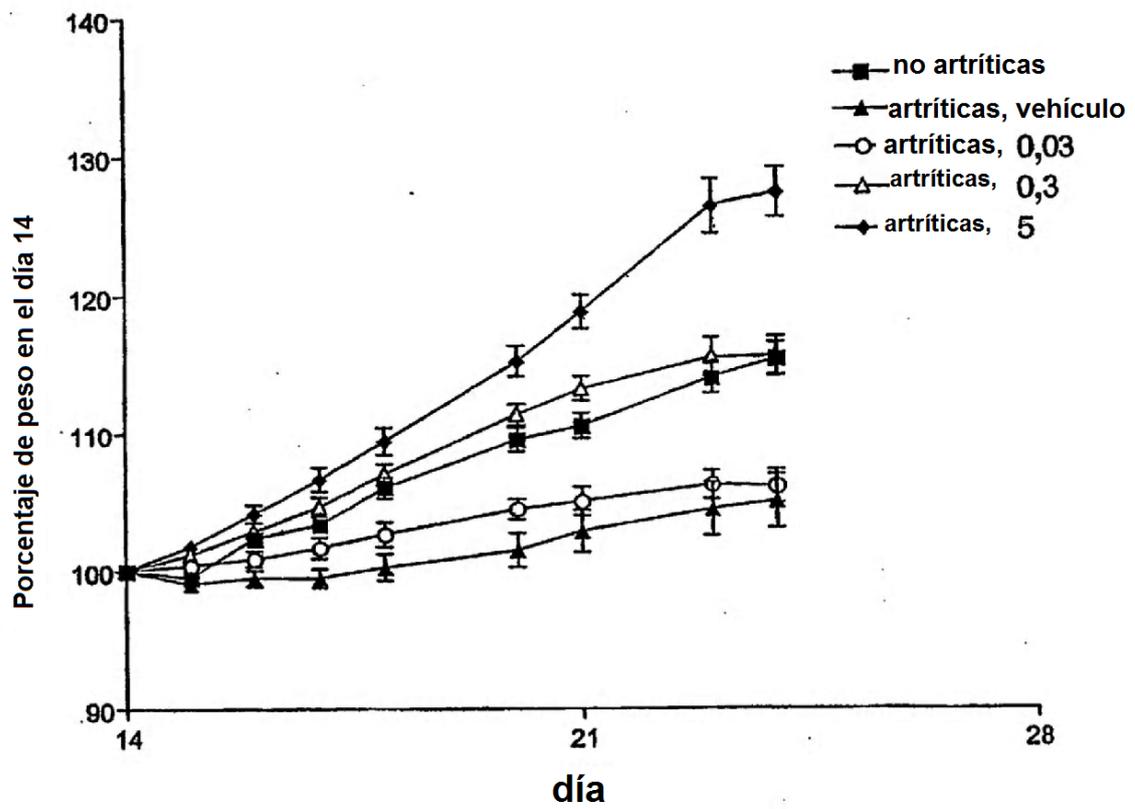
**FIG. 19**



**FIG. 20**



**FIG. 21**



**FIG. 22**

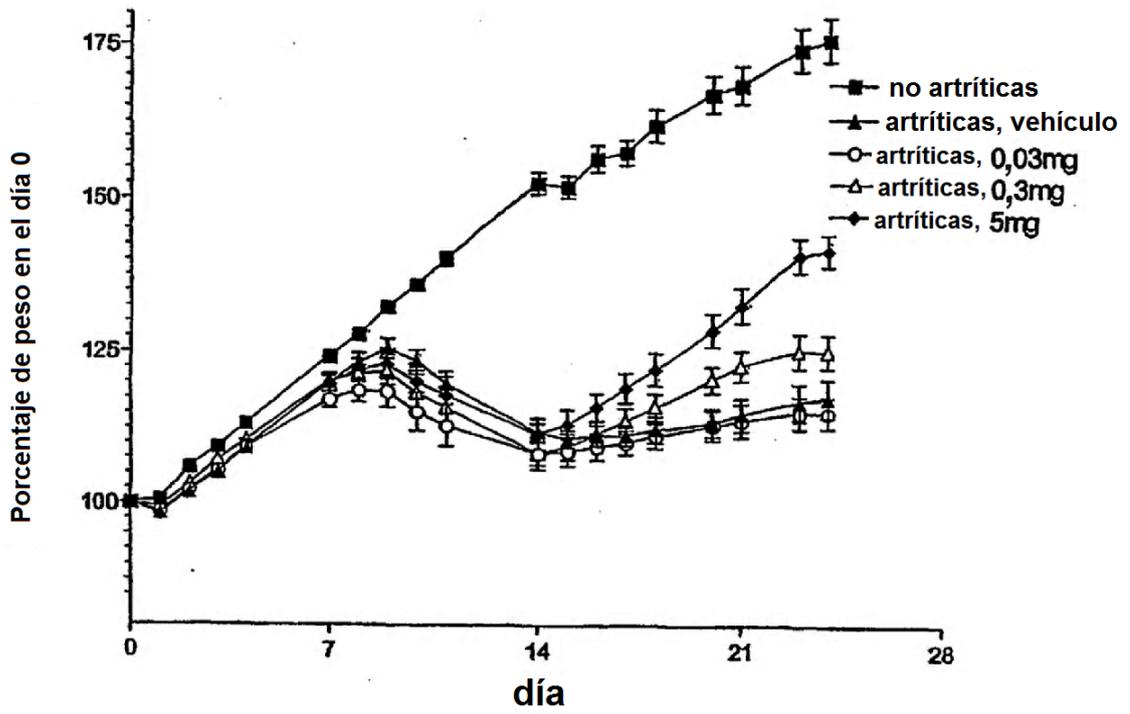


FIGURA 23A

NUMERACIÓN DEL DOMINIO VARIABLE DE LA CADENA PESADA DE 3E

A - NUMERACIÓN SECUENCIAL DE PROTEÍNAS

B - NUMERACIÓN DE KABAT

C - NUMERACIÓN DE CHOTHIA

RECUADROS: CDR SEGÚN KABAT													SUBRAYADA = CDR SEGÚN CHOTHIA
A-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
B-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
C-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
P	S	E	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	
H1													
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
F	S	L	I	G	Y	D	L	N	W	I	R	Q	
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
P	P	G	K	G	L	E	W	I	G	I	I	W	
H2													
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
G	D	G	T	T	D	Y	N	S	A	V	K	S	
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	
R	V	T	I	S	K	D	T	S	K	N	Q	F	
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	
79	80	81	82	82A	82B	82C	83	84	85	86	87	88	
79	80	81	82	82A	82B	82C	83	84	85	86	87	88	
S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A	

FIGURA 23A (continuación)

										H3		
92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104
89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A
89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A
V	Y	Y	C	A	R	G	G	Y	W	Y	A	T

105	106	107	108	109	109	110	111	112	113	114	115	116
100B	100C	100D	100E	101	102	103	104	105	106	107	108	109
100B	100C	100D	100E	101	102	103	104	105	106	107	108	109
S	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V

117	118	119
110	111	112
110	111	112
T	V	S

FIGURA 23B

NUMERACIÓN DEL DOMINIO VARIABLE DE LA CADENA LIGERA DE 3E

A - NUMERACIÓN SECUENCIAL DE PROTEÍNAS

B - NUMERACIÓN DE KABAT

C - NUMERACIÓN DE CHOTHIA

RECUADROS: CDR SEGÚN KABAT, SUBRAYADA = CDR SEGÚN CHOTHIA

A-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
B-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
C-1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A
													L1
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	27
28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39		
	Q	S	I	S	N	N	L	N	W	Y	Q	Q	K
													L2
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	Y	T	S
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
	R	F	H	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	66
67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78		
	G	S	G	T	D	F	T	F	T	I	S	S	L
													L3
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	
	Q	P	E	D	I	A	T	Y	Y	C	Q	Q	E
92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	
	H	T	L	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L

**FIGURA 23B (continuación)**

<b>105</b>	<b>106</b>	<b>107</b>	<b>108</b>	<b>109</b>
<b>105</b>	<b>106</b>	<b>106A</b>	<b>107</b>	<b>108</b>
<b>105</b>	<b>106</b>	<b>106A</b>	<b>107</b>	<b>108</b>
<b>E</b>	<b>I</b>	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>T</b>

Figura 24

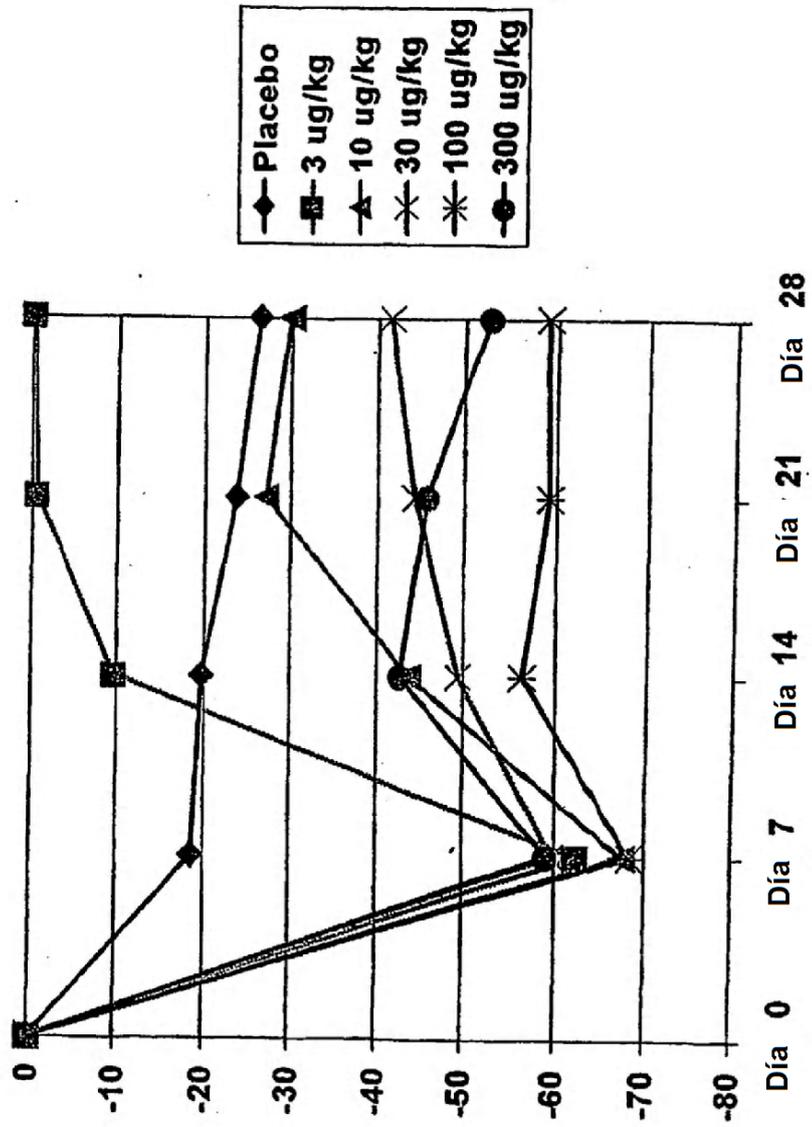


Figura 25

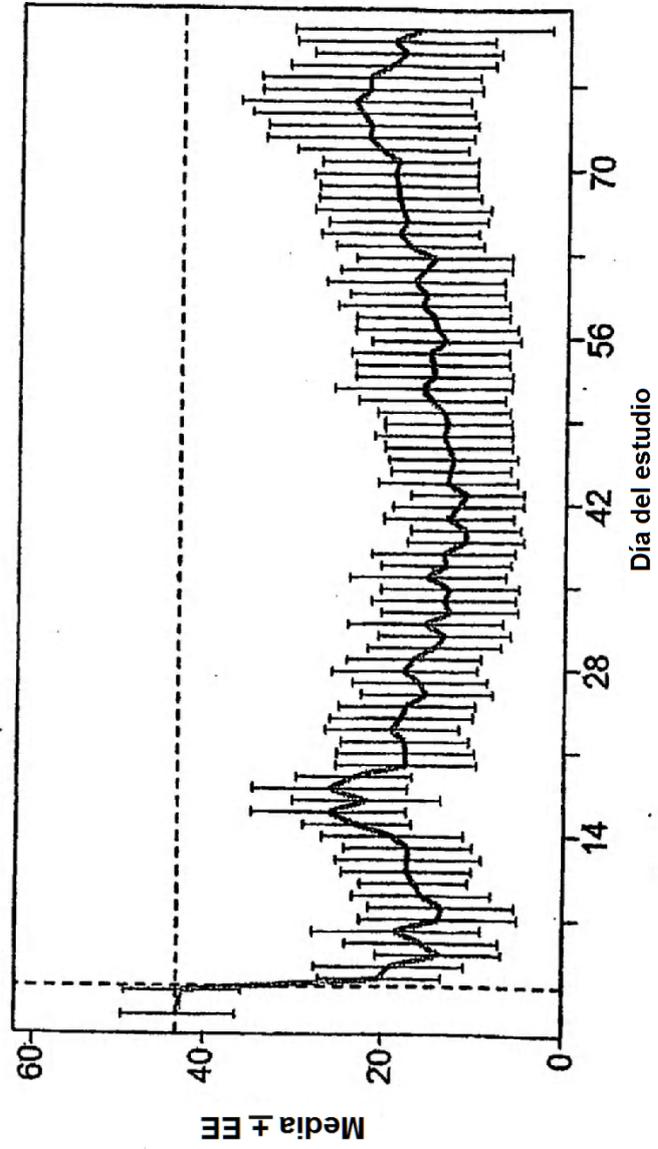


Figura 26

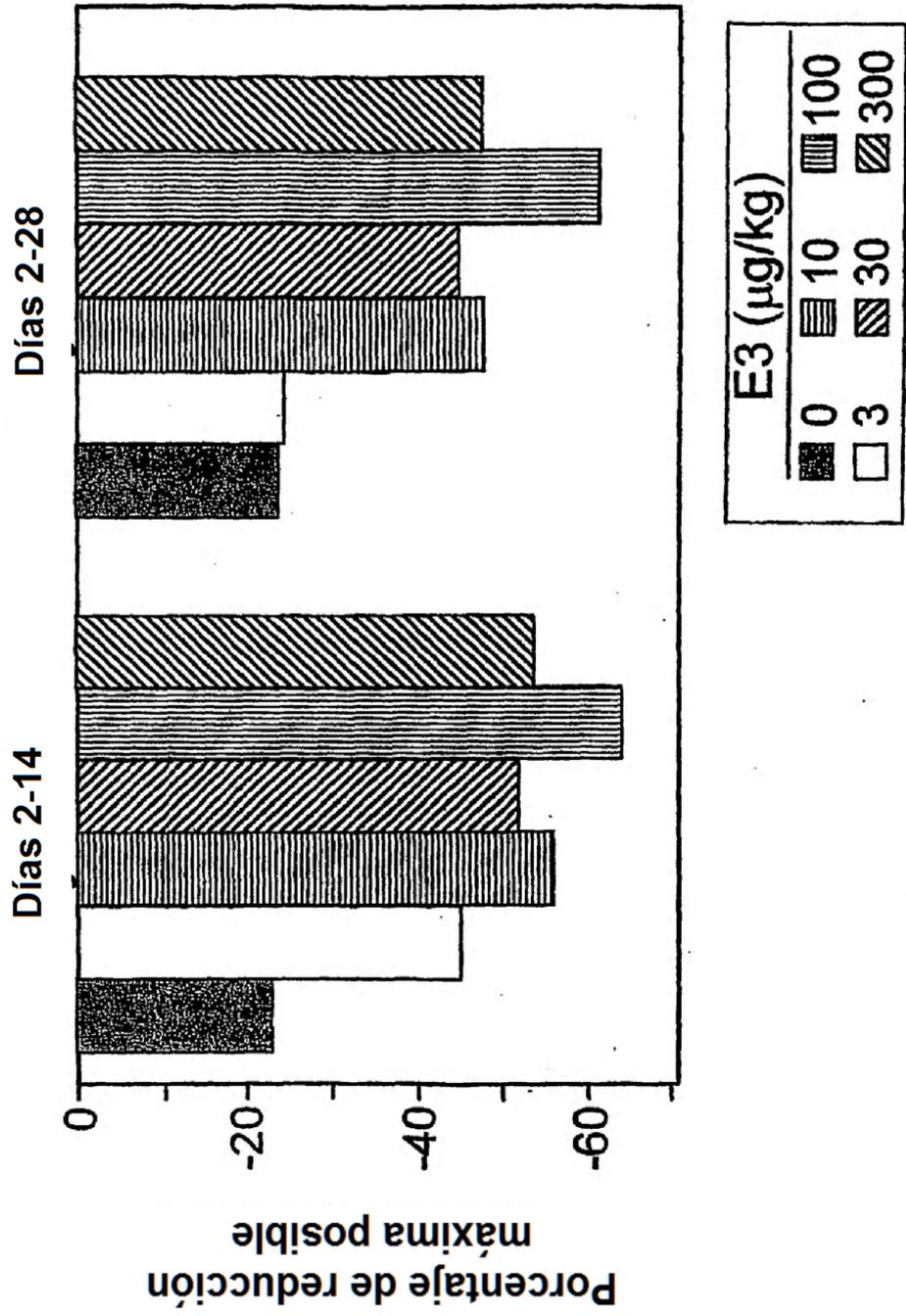


Figura 27

