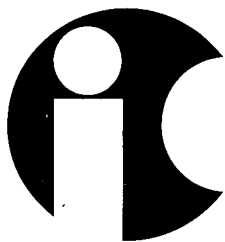




No. 11-030038- -00000-0000

Fecha: 2011-03-11 11:17:55 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 417**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

**PCT**

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
**INVENTARIO**

División de Nuevas Creaciones

**SOLICITUD  
PATENTE DE INVENCION**

21. EXPEDIENTE No.

**11-300038**

54. TÍTULO

ANTICUERPOS PARA CCR2

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

PFIZER INC y AMGEN FREMONT INC.

DOMICILIO

NEW YORK, NEW YORK y FREMONT, CALIFORNIA, U.S.A.

74. APODERADO

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C.,

18-03-2011



**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

**PETITORIO**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-030038-00000-0000

Fecha: 2011-03-11 11:17:55  
Tra. 11 PATENTEIYII  
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Eve: 378 FASENACIONALI  
Folios: 417**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE  
PCT  
ENTRADA EN FASE NACIONAL****SOLICITUD DE:**

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE  
(71)**Nombre: **PFIZER INC y AMGEN  
FREMONT INC.**sociedades constituidas y existentes bajo  
las leyes del Estado de Delaware, Estados  
Unidos de América.Dirección: 235 East 42nd Street,  
New York,  
New York 10017,  
Estados Unidos de América

y

6701 Kaiser Drive,  
Fremont,  
California 94555,  
Estados Unidos de AméricaDomicilio: New York,  
New York,  
Estados Unidos de América

y

Fremont,  
California,  
Estados Unidos de América

respectivamente.

**IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE  
O APODERADO**Nombre: **LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ**

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@cavelier.com

Domicilio: Bogotá, Colombia

**IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 35.456.344T.P 23.555

4

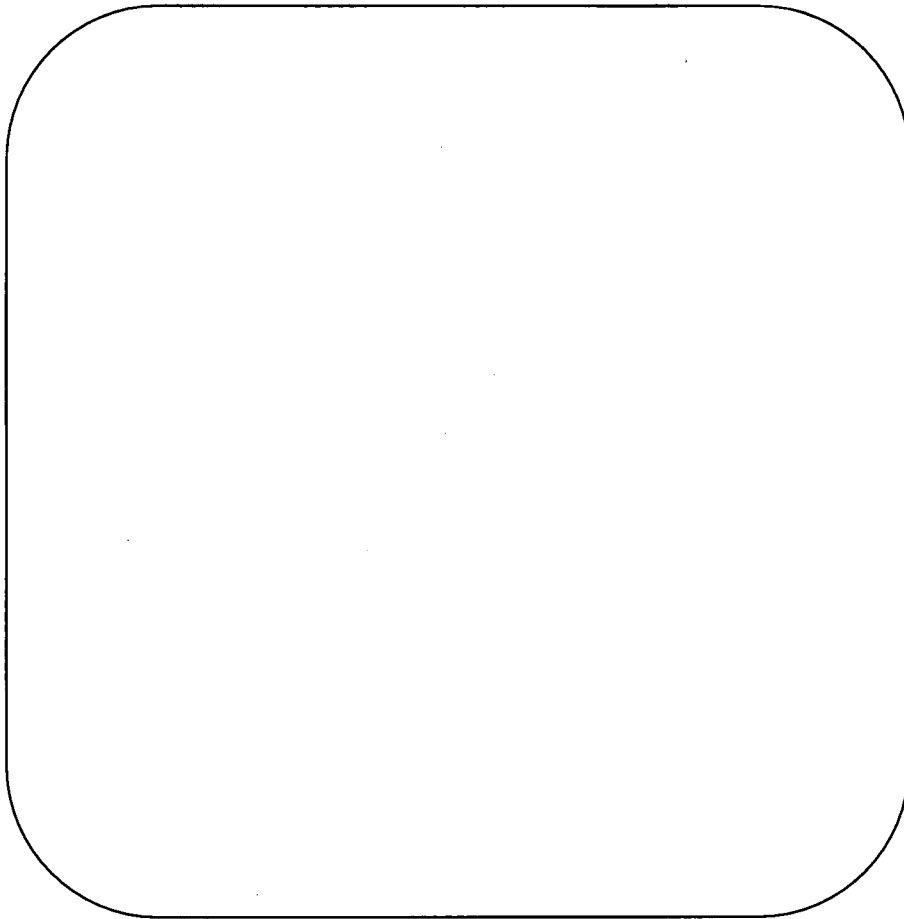
**INVENTOR (ES)  
(72)**1. **Shelley Sims BELOUSKI**  
4541 La Tuna Court,  
Camarillo,  
California 93012,  
Estados Unidos de América3. **Meina L. LIANG**  
115 Glasgow Circle,  
Danville,  
California 94526,  
Estados Unidos de América2. **Larry L. GREEN**  
464 Hill Street,  
San Francisco,  
California 94114,  
Estados Unidos de América4. **Ronald P. GLADUE**  
83 Rowley Drive,  
Stonington,  
Connecticut 06378,  
Estados Unidos de América

|                                                 | <b>5. Bradley T. KELLER</b><br>1861 Sweet Lake Court,<br>Chesterfield,<br>Missouri 63017,<br>Estados Unidos de América                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <b>6. Shinji OGAWA</b><br>15588 Hitchcock Road,<br>Chesterfield,<br>Missouri 63017,<br>Estados Unidos de América                                                                                                                           |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------|
|                                                 | <b>7. Arvind RAJPAL</b><br>519 Foerster Street,<br>San Francisco,<br>California 94127,<br>Estados Unidos de América                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <b>8. Laurie A. TYLASKA</b><br>173 Branch Hill Road,<br>Preston,<br>Connecticut 06365,<br>Estados Unidos de América                                                                                                                        |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |
| <b>5</b>                                        | <b>PCT (86)</b><br>Solicitud Internacional No. <u>PCT/US2009/004711</u> Fecha: <u>17 de agosto de 2009</u><br>Publicación Internacional No. <u>WO 2010/021697 A3</u> Fecha: <u>25 de febrero de 2010</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                            |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |
| <b>6</b>                                        | <b>Título (54)</b><br><b><u>ANTICUERPOS PARA CCR2</u></b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                            |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |
| <b>7</b>                                        | <b>Clasificación Internacional (51)</b> <u>C07K 016/028</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                            |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |
| <b>8</b>                                        | <b>Prioridad</b><br>SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <table border="1"><thead><tr><th>(33) País de Origen</th><th>(32) Fecha</th><th>(31) Número de Solicitud</th></tr></thead><tbody><tr><td><u>US</u></td><td><u>18 de agosto de 2008</u></td><td><u>61/189,357</u></td></tr></tbody></table> | (33) País de Origen                             | (32) Fecha                               | (31) Número de Solicitud                        | <u>US</u>                                | <u>18 de agosto de 2008</u>                     | <u>61/189,357</u>                        |                                                 |                                          |                                                 |                                          |
| (33) País de Origen                             | (32) Fecha                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | (31) Número de Solicitud                                                                                                                                                                                                                   |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |
| <u>US</u>                                       | <u>18 de agosto de 2008</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | <u>61/189,357</u>                                                                                                                                                                                                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |
| <b>9</b>                                        | <table><tr><td><b>Comprobante de pago No.: <u>11-04484</u></b></td><td><b>Fecha: <u>17 de enero de 2011</u></b></td></tr><tr><td><b>Comprobante de pago No.: <u>11-18655</u></b></td><td><b>Fecha: <u>01 de marzo de 2011</u></b></td></tr><tr><td><b>Comprobante de pago No.: <u>11-18711</u></b></td><td><b>Fecha: <u>01 de marzo de 2011</u></b></td></tr><tr><td><b>Comprobante de pago No.: <u>11-21170</u></b></td><td><b>Fecha: <u>08 de marzo de 2011</u></b></td></tr><tr><td><b>Comprobante de pago No.: <u>11-21171</u></b></td><td><b>Fecha: <u>08 de marzo de 2011</u></b></td></tr></table>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                            | <b>Comprobante de pago No.: <u>11-04484</u></b> | <b>Fecha: <u>17 de enero de 2011</u></b> | <b>Comprobante de pago No.: <u>11-18655</u></b> | <b>Fecha: <u>01 de marzo de 2011</u></b> | <b>Comprobante de pago No.: <u>11-18711</u></b> | <b>Fecha: <u>01 de marzo de 2011</u></b> | <b>Comprobante de pago No.: <u>11-21170</u></b> | <b>Fecha: <u>08 de marzo de 2011</u></b> | <b>Comprobante de pago No.: <u>11-21171</u></b> | <b>Fecha: <u>08 de marzo de 2011</u></b> |
| <b>Comprobante de pago No.: <u>11-04484</u></b> | <b>Fecha: <u>17 de enero de 2011</u></b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                            |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |
| <b>Comprobante de pago No.: <u>11-18655</u></b> | <b>Fecha: <u>01 de marzo de 2011</u></b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                            |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |
| <b>Comprobante de pago No.: <u>11-18711</u></b> | <b>Fecha: <u>01 de marzo de 2011</u></b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                            |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |
| <b>Comprobante de pago No.: <u>11-21170</u></b> | <b>Fecha: <u>08 de marzo de 2011</u></b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                            |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |
| <b>Comprobante de pago No.: <u>11-21171</u></b> | <b>Fecha: <u>08 de marzo de 2011</u></b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                            |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |
| <b>10</b>                                       | <b>Anexos:</b><br><input checked="" type="checkbox"/> Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 571.000.00.<br><input checked="" type="checkbox"/> Comprobante de pago por 21 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$567.000.00.<br><input checked="" type="checkbox"/> Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.<br><input checked="" type="checkbox"/> Poderes, si fuere el caso.<br><input type="checkbox"/> Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.<br><input type="checkbox"/> Declaraciones.<br><input checked="" type="checkbox"/> Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)<br><input checked="" type="checkbox"/> Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)<br><input type="checkbox"/> Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.<br><input type="checkbox"/> Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.<br><input type="checkbox"/> De ser el caso, copia del contrato de acceso.<br><input type="checkbox"/> De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.<br><input type="checkbox"/> De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.<br><input type="checkbox"/> Arte final 12x12<br><input type="checkbox"/> De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.<br><input checked="" type="checkbox"/> Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS |                                                                                                                                                                                                                                            |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |                                                 |                                          |



11

## FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

**NOMBRE:** LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ

**FIRMA:** Luz Clemencia Solórzano  
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

JGG

B4

**DOCUMENTOS ANEXOS**

1. ☒ Publicación Internacional WO 2010/021697 A3

Descripción:

Páginas 101 en el idioma original

Páginas 118 en español

Reivindicaciones: Número (s) 31

Figuras: Número (s) 17

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias.

4. ☒ **Forma PCT/IB/306.** Notificación de la inscripción de la adición de la sociedad **AMGEN  
FREMONT INC.** como solicitante.

5. ☒ **Forma PCT/IB/306.** Notificación de la inscripción de la adición de Shelley Sims Belouski,  
Larry L. Green y Meina L. Liang como inventores.

6. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA  
FASE INTERNACIONAL**

# Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by **Norman Goodman**

3. acting in the capacity of **County Clerk**

4. bears the seal/stamp of the county of **New York**

Certified

5. At Albany, New York

6. the 21st day of November 2001

7. by Special Deputy Secretary of State, State of New York

8. No. A-85700E

9. Seal/Stamp

10. Signature

*Howard J Carr*

Howard J. Carr

Special Deputy Secretary of State

04135595.RSL (REV: 2/6/96)

TRADUCCION No.: 0112101

MARIA ELVIRA MARTELO

Traductora e Interprete Oficial

Ingeniero de Negocios, Universidad de Bogotá.  
Res. No. 0427/1994, M. S. P. D. C. COINCIDE  
CON EL ORIGINAL, QUE HE TENIDO A LA VISTA  
NOTARIA D. C. REPUBLICA DE COLOMBIA

14 FEB. 2011

AMPARO QUINTERO ARTURO  
NOTARIA

For patents, utility models, industrial designs,  
trademarks, commercial names, trade emblems,  
slogans.

Para patentes, modelos de utilidad, diseños  
industriales, marcas de fábrica, nombres  
comerciales, enseñanzas, lemas comerciales.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND  
POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned / Yo (nosotros), abajo firmado (s)  
Pfizer, Inc

of/ domiciliado (s) en  
235 E. 42nd Street, 20th Floor

New York, New York 10017-5755, U.S.A.

por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

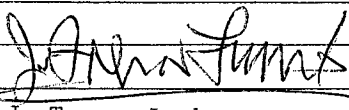
Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mí (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñanzas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

In due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; and LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact of its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

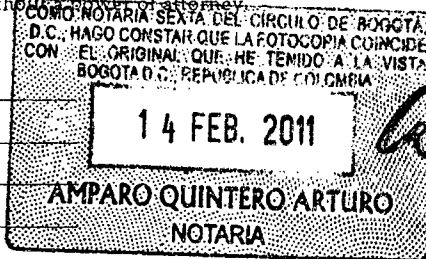
In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Given and signed this/Dado y firmado hoy  
8th Day of October, 2001

in/en New York, NY, U.S.A.

Signature 

J. Trevor Lumb  
Asst. Gen. Patent Counsel



State of New York  
County of New York,

CLERK

NEW YORK  
COUNTY

255074

Form 1

I, NORMAN GOODMAN, County Clerk and Clerk of the Supreme Court of the State of New York, in and for the County of New York, a Court of Record, having by law a seal,  
DO HEREBY CERTIFY pursuant to the Executive Law of the State of New York, that

Koy F. Waldron

whose name is subscribed to the annexed affidavit, deposition, certificate of acknowledgment or proof, was at the time of taking the same a NOTARY PUBLIC in and for the State of New York duly commissioned, sworn and qualified to act as such; that pursuant to law, a commission or a certificate of his official character, with his autograph signature has been filed in my office; that at the time of taking such proof, acknowledgment or oath, he was duly authorized to take the same; that I am well acquainted with the handwriting of such NOTARY PUBLIC or have compared the signature on the annexed instrument with his autograph signature deposited in my office, and I believe that such signature is genuine.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand affixed my official seal this

NOV 16 2001

FEE PAID \$3.00

TRADUCCION No.: 0112/01

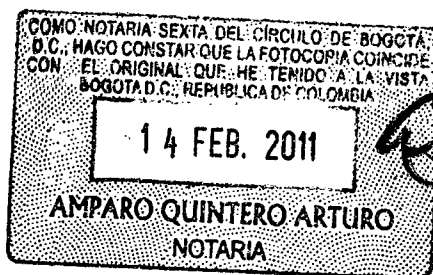
MARIA ELVIRA MARTELO

Traductora e Interprete Oficial

Inglés - Español - Inglés

*Norman Goodman*

County Clerk and Clerk of the Supreme Court, New York County



CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los \* días del mes de OCTUBRE de 19 2001  
ante mí, Notario Público de Estado de Nueva York, NY  
compareció(eron) personalmente EEUU  
J. Trevor Lumb

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)  
persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es)  
tiene(n) capacidad legal para otorgarlo.

Notario Público — Notary Public

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy, 8 de Octubre de 2001  
compareció(eron) ante mí  
J. Trevor Lumb

a quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documen  
to en representación de la Sociedad/compañía  
denominada Pfizer Inc

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:\*  
ARTICULOS DE CONSTITUCION, 30 OCTUBRE 1997

NOTIFICACION DE ACCION DEL COMITE ADMINISTRATIVO,  
16 ENERO, 2001

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que Pfizer Inc  
es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente  
de acuerdo con las leyes de Delaware, EEUU.

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es  
Nueva York, NY EEUU

2.3. Que el objeto u objeto para los cuales se otorga el presente  
poder están comprendidos dentro del objeto social de la  
mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) J. Trevor Lumb

está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad Nueva York  
Estado Nueva York

Hoy 8 Octubre de 19 2001

Notario Público — Notary Public

\* Los documentos deben identificarse con fecha y origen.

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this 8th day of October, 2001  
before me, a Notary Public of State of New York, NY, USA  
personally appeared J. Trevor Lumb

to me known, and known to me to be the person(s) who  
executed that foregoing document and who has(have) legal  
capacity to execute it.

Roy F. Waldron  
Notary Public, State of New York  
No. 02WA6030057  
Qualified in New York County  
Commission Expires September 7, 20 05

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 8th day of October, 2001  
appeared before me  
J. Trevor Lumb

who(m) I know personally and who(m) signed this document as  
representative(s) of the Corporation/Company  
named Pfizer Inc

I Certify:

1. That I have seen the following documents:\*  
Certificate of Incorporation, October 30, 1997

Notification of Corporate Management  
Committee Action, January 16, 2001

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Pfizer Inc  
is a Corporation/Company legally constituted and in existence  
in accordance with the laws of Delaware, USA

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is  
New York, NY, USA

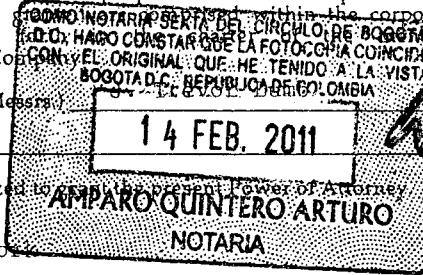
2.3. That the purpose of purposes for which the present Power  
of Attorney is granted within the corporation  
purposes set forth in the foregoing documents.

2.4. That Mr.(Messrs.)

is(are) authorized to execute the present Power of Attorney

City New York  
State New York

This 8th day of October, 2001



Roy F. Waldron  
Notary Public, State of New York  
No. 02WA6030057  
Qualified in New York County  
Commission Expires September 7, 20 05

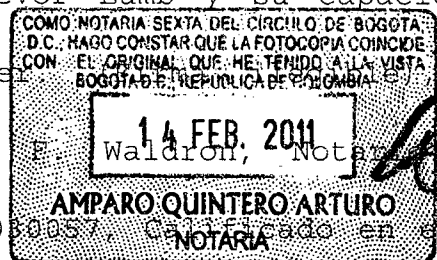
\* Documents must be identified with date and origin.

TRADUCCION No. 0112101  
MARIA ELVIRA MARTELO  
Traductora e Interprete Oficial  
Inglés - Español - Inglés  
Res. No. 2879 Min. Justicia

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 01.12/01 preparada por María Elvira Martelo, Traductora Oficial debidamente aprobada por el Ministerio de Justicia de Colombia mediante Resolución 2879 de 1995 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

(A continuación se traducen las legalizaciones de un documento de Representación y Poder escrito en inglés y español, por el cual **PFIZER INC**, domiciliada en 235 E. 42nd Street, 20th Floor, New York, New York 10017-5755, Estados Unidos, otorga poder a **GERMAN CAVELIER, GONZALO PERDOMO, EMILIO FERRERO y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**.) Dado y firmado el 8 de octubre de 2001 en Nueva York, Nueva York, EUA. (Firma ilegible), J. Trevor Lumb, Asistente General del Asesor de Patentes.

CERTIFICADO NOTARIAL -INDIVIDUO- otorgado en inglés y español certificando la firma de J. Trevor Lumb y su capacidad legal para otorgar el anterior poder. (Sello en tinta) Roy F. Waldron, Notario Público. (Sello seco ilegible).



CERTIFICADO NOTARIAL -SOCIEDAD- otorgado en inglés y español referente a la existencia legal de **PFIZER INC**. Dado en la ciudad de Nueva York, en el Estado de Nueva York, el 8 de octubre de 2001. (Firma ilegible), Notario Público. (Sello en tinta) Roy F. Waldron, Notario Público, Estado de Nueva York, No. 02WA6030057, Calificado en el Condado de Nueva York, Comisión expira el 7 de

(10)

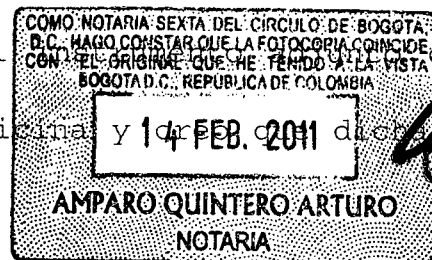
septiembre de 2005. (Sello seco ilegible)

Estado de Nueva York )

255074

Condado de Nueva York) ss

Yo, NORMAN GOODMAN, Escribano de Condado y Escribano de la Suprema Corte del Estado de Nueva York, en y para el Condado de Nueva York, una Corte de registro que por ley tiene un sello, POR EL PRESENTE CERTIFICO de acuerdo con la ley ejecutiva del Estado de Nueva York, que ROY F. WALDRON, cuyo nombre suscribe la declaración juramentada, declaración, certificado de reconocimiento o prueba adjunta, era en el momento de tomarla un NOTARIO PÚBLICO en y para el Estado de Nueva York, debidamente comisionado, juramentado y calificado para actuar como tal; que de acuerdo con la ley, una comisión o certificado de su carácter oficial, con firma autógrafa, ha sido registrada en mi oficina; que estoy familiarizado con la escritura de dicho NOTARIO PÚBLICO o he comparado la firma del con su firma autógrafa depositada en mi oficina y la firma es genuina.



EN FE DE LO CUAL, he firmado e impuesto el sello oficial hoy 16 de noviembre de 2001.

(Firma facsimilar ilegible), Escribano de Condado y Escribano de la Corte Suprema, Condado de Nueva York. (Sello en tinta del Escribano de Condado).



11

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. Ha sido firmado por Norman Goodman

3. Actuando en su capacidad de Escribano de Condado

4. Lleva el sello/timbre del Condado de Nueva York

CERTIFICADO

5. En Nueva York, Nueva York.

6. el 21 de noviembre de 2001

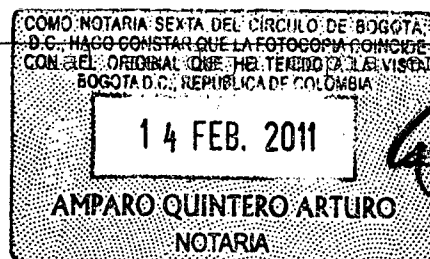
7. Por el Subsecretario de Estado Especial, Estado de Nueva York

8. No. A-85700E.

9. Sello: EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE NUEVA YORK.

10. Firma (Firma ilegible) Howard J. Carr, Subsecretario de Estado Especial

Es traducción fiel y completa de la \_\_\_\_\_ esta  
oficina para su confrontación.

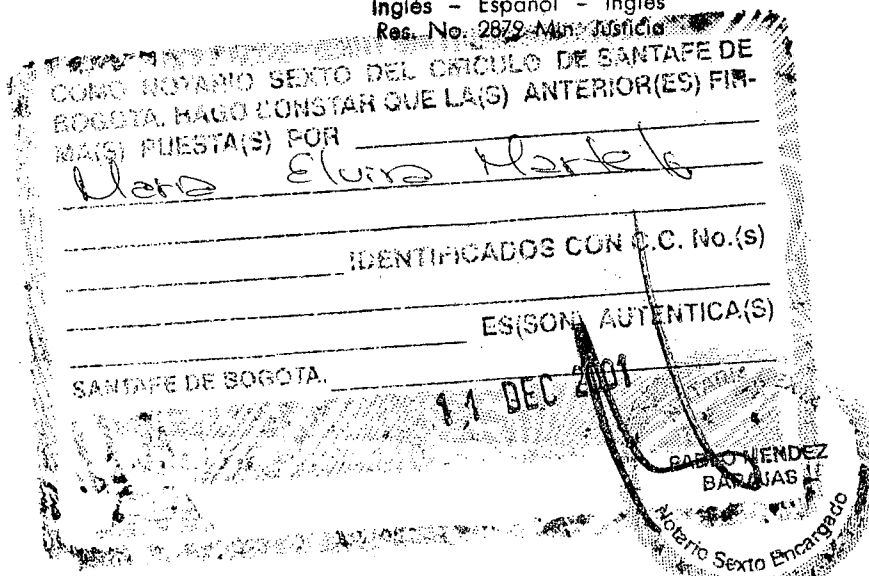


COLO 12889-801-001-1

ID. 5

DIC. 11/01

*Maria E. Martelo*  
TRADUCCION No.: 0.12/01  
MARIA ELVIRA MARTELO  
Traductora e Interprete Oficial  
Inglés - Español - Inglés  
Res. No. 2879-Min. Justicia



# CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI  
CARRERA 4 No. 72 - 35  
BOGOTA 8, COLOMBIA

WEB SITE: www.cavelier.com  
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

TELEFONO: (57) (1) 347-3611  
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

13

Señores

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

E. S. D.

Poderdante : **PFIZER INC.**

Poder conferido el : 08/10/2001

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.

Señora Jefe,



EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

C.C. N° 438.019 de Usaquén

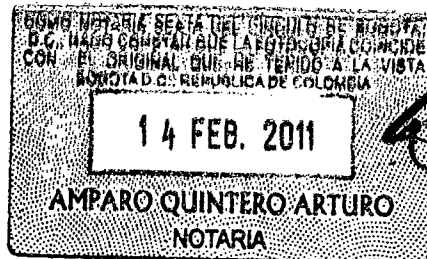
Acepto:



LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

T.P.A. N° 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén



**NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ**  
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL.  
Bogotá, D.C. 04 NOV 2009  
Ante mí AMPARO QUINTERO ARTURO,  
NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE  
BOGOTÁ, D.C.  
Comparecieron

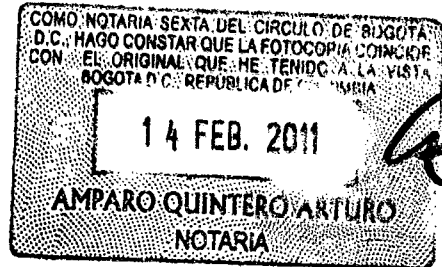
Emilio  
Ferrero Williamson  
Luz Clemencia Suarez  
De Paéz

Quion(es) exhibió(aron) la(s) C.C.

438019 T.P. 31929  
35456344 T.P. 23555

Y declaró(aron) que la(s) firma(s) que aparece(n)  
en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y  
que el contenido del mismo es cierto.  
En constancia se firma esta diligencia.

Emilio Ferrero  
Luz Clemencia Suarez



# CAVELIER

ABOGADOS  
EDIFICIO SISKI  
CARRERA 4a N° 72-35  
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

181

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseññas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Authority with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

## REPRESENTATION Y PODER

## REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

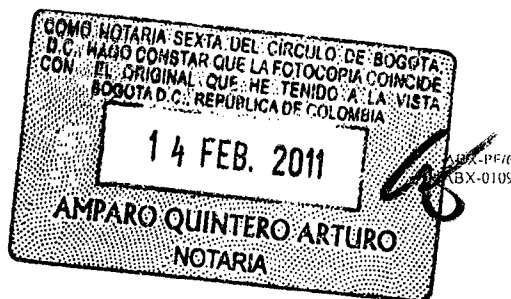
AMGEN FREMONT INC., a corporation organized and existing under the laws of the State of Delaware, U.S.A. domiciliado (s) en/of 6701 Kaiser Drive, Fremont, California 94555, United States of America National Phase of International Application No. PCT/US2005/000370

hereby ratify the Patent Application No. 06.077.165 filed by Emilio Ferrero on August 4, 2006.

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso. Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseññas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact of its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time. In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters

© CAVELIER ABOGADOS  
WPP0001-181 (MINUTA N°12.1.1.2.6 USA)



CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los 20 días del mes de OCTUBRE  
de 2006 ante mí, Notario Público o Funcionario Autorizado  
de California, EUA  
Stuart L. Watt  
a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)  
persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es)  
tiene(n) capacidad legal para otorgarlo

Notario Público o Funcionario Autorizado -- Notary Public or Attesting Official

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this 20th day of October  
2006 before me, a Notary Public or Attesting Official of  
California, USA  
personally Stuart L. Watt  
appeared  
to me known, and known to me to be the person(s) who  
executed that foregoing document, and who has(have) legal  
capacity to execute it.

Debra L. Merrill

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy 20 de OCTUBRE de 2006  
Compareció(eron) ante mí  
STUART WATT  
quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este  
documento en representación de la Sociedad/compañía  
denominada AMGEN FREMONT INC.

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos: \*  
CERTIFICADO DE FUSION & ACTAS DE  
LA JUNTA DIRECTIVA DE AMGEN FREMONT INC.

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:  
AMGEN FREMONT INC.

2.1. Que  
es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente  
de acuerdo con las leyes de  
ESTADO DE DELAWARE

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es  
FREMONT, CALIFORNIA

2.3. Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente  
poder están comprendidos dentro del objeto social de la  
mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) STUART L. WATT  
está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad THOUSANDS OAKS  
Estado CALIFORNIA  
Hoy 20 OCTUBRE de 2006

Notario Público o Funcionario Autorizado -- Notary Public or Attesting Official

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 20th day of October 2006  
appeared before me  
Stuart Watt  
who(m) I know personally and who(m) signed this document as  
representative(s) of the Corporation/Company named  
AMGEN FREMONT INC.

I certify:

1. That I have seen the following documents: \*  
State of Delaware Certificate of Merger &  
Minutes of Action of the Board of Directors of  
Amgen Fremont Inc.  
2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Amgen Fremont Inc.  
is a Corporation/Company legally constituted and in existence  
in accordance with the laws the State of Delaware

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is  
State of California

2.3. That the purpose or purposes for which the present Power  
of Attorney is granted are comprised within the corporation  
purposes set forth in the charter of the mentioned  
Corporation/Company.

2.4. That Mr.(Messrs.) Stuart L. Watt  
is ~~(are)~~ authorized to grant the present Power of Attorney.

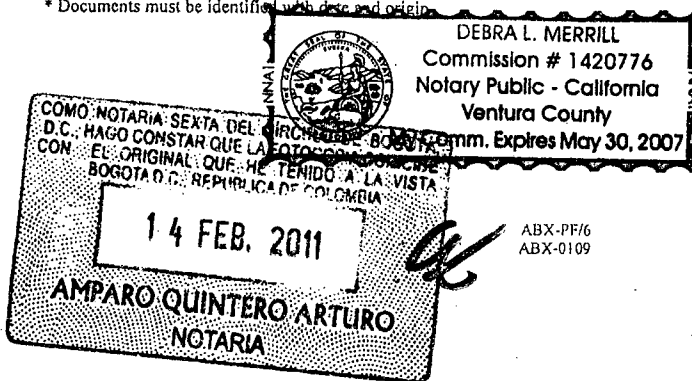
City Thousand Oaks  
State California  
This 20th day of October 2006

Debra L. Merrill

\* Los documentos deben identificarse con fecha y origen

© CAVELIER ABOGADOS  
WPP0DE01-181 (MINUTA N°12.1.1.2.6 USA)

\* Documents must be identified with date and origin



# State of California

## SECRETARY OF STATE

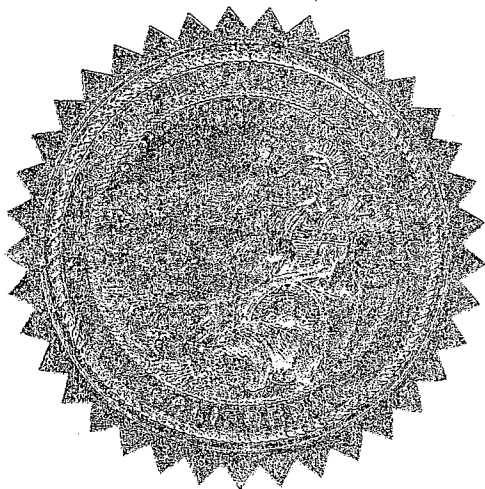
### APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

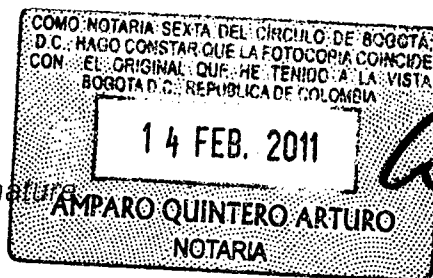
1. Country: United States of America  
This public document
2. has been signed by Debra L. Merrill
3. acting in the capacity of Notary Public, State of California
4. bears the seal/stamp of Debra L. Merrill, Notary Public,  
State of California

### CERTIFIED

5. At Sacramento, California
6. the 9th day of November 2006
7. by Deputy Secretary of State, State of California
8. No. 323785
9. Seal/Stamp:



10. Signature



*Debra L. Merrill*

Secretary of State

*Bocanegra*



promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this October 20, 2006

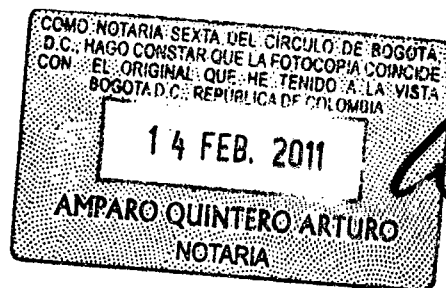
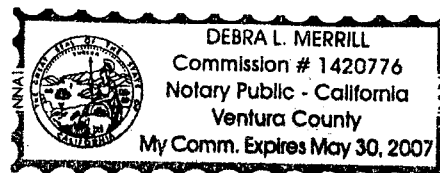
cn/in Thousand Oaks, California, U.S.A.

por/by Stuart Watt, Vice President, Law

Firma Stuart L. Watt Signature

Subscribed and sworn before me, Debra L. Merrill  
a Notary Public, this 20<sup>th</sup> day of October, 2006

Debra L. Merrill  
Notary Public



18

**TRADUCCIÓN OFICIAL No. 15/11.06** preparada por María Elvira Martelo, traductora oficial aprobada por el Ministerio de Justicia mediante Resolución No. 2879 de 1995 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento escrito en inglés y español, por el cual **AMGEN FREMONT INC.**, una sociedad organizada y existente bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América, otorga poder a **EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Y GERMÁN CAVELIER**.

Dado y firmado el 20 de octubre de 2006

Por: Stuart Watt, Vicepresidente Jurídico

Firma [Firmado] Stewart L. Watt.

Suscrito ante mí, Debra L. Merrill, Notario público, hoy 20 de octubre de 2006.

[Firmado] Debra L. Merrill

Notario público

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA  
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCORIA COINCIDE  
CON EL ORIGINAL QUE SE TENIO A LA VISTA  
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

14 FEB. 2011

AMPARO QUINTERO ARTURO  
NOTARIA

DEBRA L MERRILL  
Comisión # 1420776  
Notario Público – California  
Condado de Ventura  
Mi comisión expira el 30 de mayo de 2007

**CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)** en inglés y español referente a la firma de **Stewart L. Watt**. Dado el 20 de octubre de 2006.

[Firmado] Debra L. Merrill, Notario Público.



19

**CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)** en inglés y español referente a la existencia legal de **Amgen Fremont Inc.** Dado en la

Ciudad: Thousand Oaks

Estado: California

El 20 de octubre de 2006.

[Firmado] Debra L. Merrill, Notario Público.

[Firmado] Debra L. Merrill

Notario público

DEBRA L MERRILL  
Comisión # 1420776  
Notario Público – California  
Condado de Ventura  
Mi comisión expira el 30 de mayo de 2007

ESTADO DE CALIFORNIA

SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

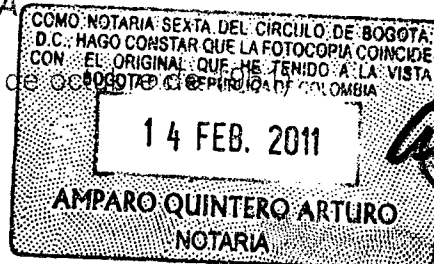
1. País: *Estados Unidos de América*

*Este documento público*

2. *ha sido firmado por Debra L. Merrill*

3. *en su capacidad de Notario Público, Estado de California*

4. *lleva el sello/timbre de Debra L. Merrill, Notario Público, Estado de California*



**CERTIFICADO**

- 5. en Sacramento, California
- 6. el 9 de noviembre de 2006
- 7. por el Subsecretario de Estado, Estado de California
- 8. No. 323785
- 9. Sello/Timbre: EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE CALIFORNIA.
- 10. Firma (Firma ilegible), Secretario de Estado

Por: [Firma ilegible]

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

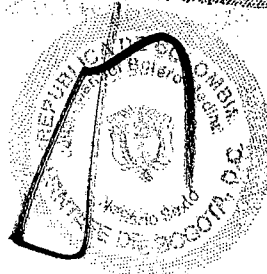
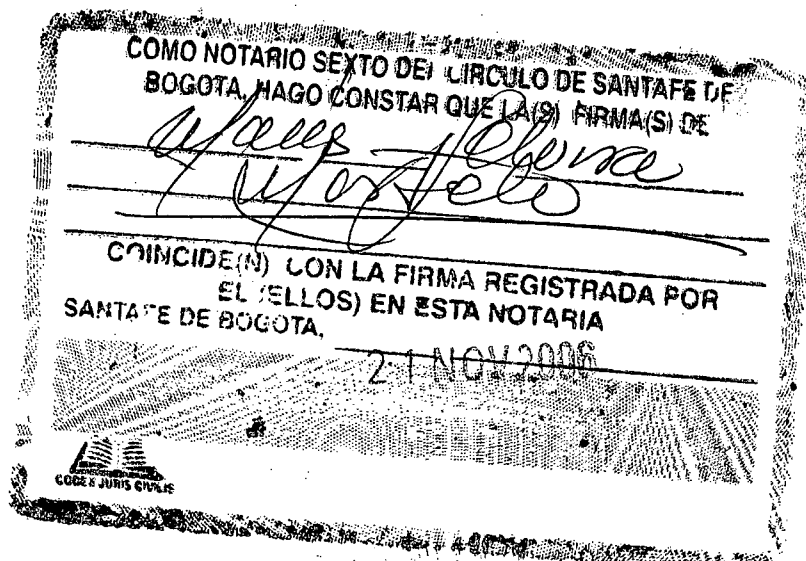
COLO 10097-704-001-1

WPC 10097 - ID 10

OCT 23/06

*Maria E. Martelo*  
TRADUCCION No.: 15/1106  
MARIA ELVIRA MARTELO  
Traductora e Interprete Oficial  
Inglés - Español - Inglés  
Res. No. 2879 Min. Justicia

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA  
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE  
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA  
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA  
14 FEB. 2011  
AMPARO QUINTERO ARTURO  
NOTARIA



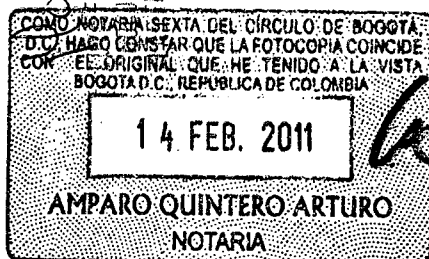
NO SE ASUME  
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 NOV 21 P 2:09

*[Handwritten signature]*  
JEFECIA DE EJECUCIONES  
BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE  
RELACIONES EXTERIORES

527255  
*[Handwritten signature]*  
FIRMA APARECE EN EL  
DOCUMENTO DESEMPEÑA  
FUNCIONES INDICADAS



# CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI  
CARRERA 4 No. 72 - 35  
BOGOTA 8, COLOMBIA

WEB SITE: www.cavelier.com  
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

TELEFONO: (57) (1) 347-3611  
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

21

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

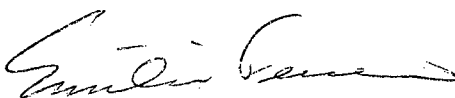
E. S. D.

Poderdante : AMGEN FREMONT INC

Poder conferido el : 20/10/2006

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.



EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

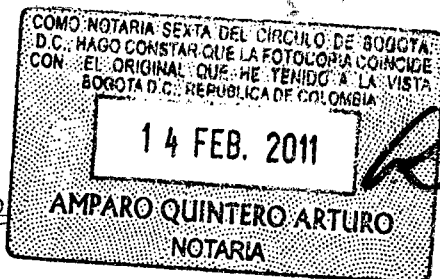
C.C. N° 438.019 de Usaquén

Acepto:

  
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

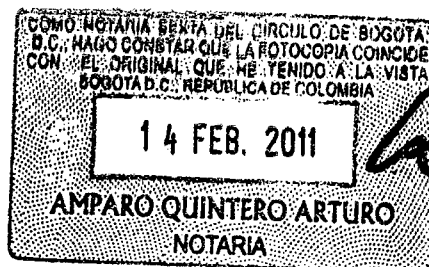
T.P.A. N° 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén



**NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ**  
**RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL**  
 Bogotá, D.C. **03 NOV 2009**  
 Ante el  
 NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE  
 BOGOTÁ D.C.  
 Compareció(eron) *Emilio F. Enxeto*  
*Luz Clemencia de Paz.*  
 Quien(es) exhibió(aron) la(s) C.C.  
*C.C. # 43809777 31929*  
*C.C. # 354363447823555*  
 Y declaró(aron) que la(s) firma(s) que aparece(n)  
 en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y  
 que el contenido del mismo es cierto.  
 En constancia se firma esta diligencia.

*Emilio Enxeto*  
*Luz Clemencia de Paz*



22

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
25 February 2010 (25.02.2010)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 2010/021697 A3

- (51) International Patent Classification:  
C07K 16/28 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)  
C07K 14/715 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)  
C12N 5/12 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)
- (21) International Application Number:  
PCT/US2009/004711
- (22) International Filing Date:  
17 August 2009 (17.08.2009)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
61/189,357 18 August 2008 (18.08.2008) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **PFIZER INC.** [US/US]; 235 East 42nd Street, New York, New York 10017 (US).
- (72) Inventors; and  
(71) Applicants : **BELOUSKI, Shelley Sims** [US/US]; 4541 La Tuna Court, Camarillo, California 93012 (US). **GREEN, Larry L.** [US/US]; 464 Hill Street, San Francisco, California 94114 (US). **LIANG, Meina L.** [US/US]; 115 Glasgow Circle, Danville, California 94526 (US).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): **GLADUE, Ronald P.** [US/US]; 83 Rowley Drive, Stonington, Connecticut 06378 (US). **KELLER, Bradley T.** [US/US]; 1861 Sweet Lake Court, Chesterfield, Missouri 63017 (US). **OGAWA, Shinji** [JP/US]; 15588 Hitchcock Road, Chesterfield, Missouri 63017 (US). **RAJPAL, Arvind** [US/US]; 519 Foerster Street, San Francisco, California 94127 (US). **TYLASKA, Laurie A.** [US/US]; 173 Branch Hill Road, Preston, Connecticut 06365 (US).
- (74) Agents: **GUNNISON, Jane T.** et al.; Ropes & Gray LLP, 1211 Avenue of the Americas, New York, New York 10036-8704 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— with international search report (Art. 21(3))  
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))  
— with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description (Rules 13bis.4(d)(i) and 48.2(a)(viii))  
— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))
- (88) Date of publication of the international search report:  
16 September 2010

(54) Title: ANTIBODIES TO CCR2

(57) Abstract: Provided are antibodies including human antibodies and antigen-binding portions thereof that specifically bind to CCR2, specifically human CCR2, and that may function to inhibit CCR2. Anti-CCR2 antibodies include those which bind to the first and/or second extracellular loops of CCR2. Also provided are human anti-CCR2 antibodies and antigen-binding portions thereof. Isolated heavy and light chain immunoglobulins derived from human anti-CCR2 antibodies and nucleic acid molecules encoding such immunoglobulins are provided. Methods of making human anti-CCR2 antibodies or antigen-binding portions, compositions comprising these antibodies or antigen-binding portions, methods of using the antibodies and antigen-binding portions, and compositions for diagnosis and treatment are provided. Also provided are gene therapy methods using nucleic acid molecules encoding the heavy and/or light immunoglobulin molecules that comprise the human anti-CCR2 antibodies or antigen-binding portions thereof.

WO 2010/021697 A3

23

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
25 February 2010 (25.02.2010)

(10) International Publication Number  
**WO 2010/021697 A2**

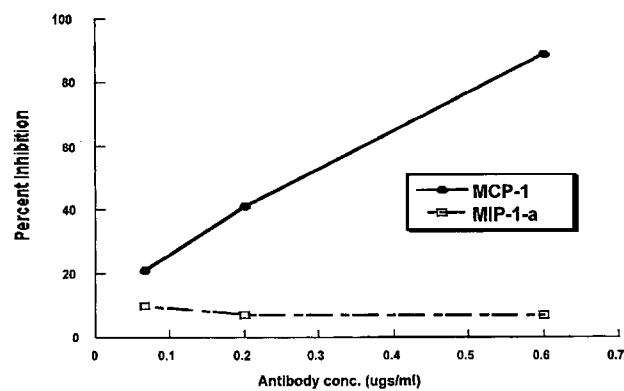
- (51) International Patent Classification:  
C07K 16/28 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)  
C07K 14/715 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)  
C12N 5/12 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)
- (21) International Application Number:  
PCT/US2009/004711
- (22) International Filing Date:  
17 August 2009 (17.08.2009)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
61/189,357 18 August 2008 (18.08.2008) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **PFIZER INC.** [US/US]; 235 East 42nd Street, New York, New York 10017 (US).
- (71) Applicants and
- (72) Inventors: **BELOUSKI, Shelley Sims** [US/US]; 4541 La Tuna Court, Camarillo, California 93012 (US). **GREEN, Larry L.** [US/US]; 464 Hill Street, San Francisco, California 94114 (US). **LIANG, Meina L.** [US/US]; 115 Glasgow Circle, Danville, California 94526 (US).

- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **GLADUE, Ronald P.** [US/US]; 83 Rowley Drive, Stonington, Connecticut 06378 (US). **KELLER, Bradley T.** [US/US]; 1861 Sweet Lake Court, Chesterfield, Missouri 63017 (US). **OGAWA, Shinji** [JP/US]; 15588 Hitchcock Road, Chesterfield, Missouri 63017 (US). **RAJPAL, Arvind** [US/US]; 519 Foerster Street, San Francisco, California 94127 (US). **TYLASKA, Laurie A.** [US/US]; 173 Branch Hill Road, Preston, Connecticut 06365 (US).
- (74) Agents: **GUNNISON, Jane T.** et al.; Ropes & Gray LLP, 1211 Avenue of the Americas, New York, New York 10036-8704 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,

[Continued on next page]

(54) Title: ANTIBODIES TO CCR2

Figure 3



(57) Abstract: Provided are antibodies including human antibodies and antigen-binding portions thereof that specifically bind to CCR2, specifically human CCR2, and that may function to inhibit CCR2. Anti-CCR2 antibodies include those which bind to the first and/or second extracellular loops of CCR2. Also provided are human anti-CCR2 antibodies and antigen-binding portions thereof. Isolated heavy and light chain immunoglobulins derived from human anti-CCR2 antibodies and nucleic acid molecules encoding such immunoglobulins are provided. Methods of making human anti-CCR2 antibodies or antigen-binding portions, compositions comprising these antibodies or antigen-binding portions, methods of using the antibodies and antigen-binding portions, and compositions for diagnosis and treatment are provided. Also provided are gene therapy methods using nucleic acid molecules encoding the heavy and/or light immunoglobulin molecules that comprise the human anti-CCR2 antibodies or antigen-binding portions thereof.

WO 2010/021697 A2

24

WO 2010/021697 A2 

GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Published:**

- without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))
- with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description (Rules 13bis.4(d)(i) and 48.2(a)(viii))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))



25

ANTIBODIES TO CCR2

## CROSS-REFERENCE TO RELATED PATENTS AND PATENT APPLICATIONS

5 [001] This application claims the benefit of U.S. Provisional Patent Application No. 61/189,357, filed August 18, 2008, which is incorporated by reference herein in its entirety.

## JOINT RESEARCH AGREEMENT

10

[002] The disclosure and claims herein were made as a result of activities undertaken within the scope of a joint research agreement between Pfizer Inc. and Abgenix Inc. that was in effect on or before the date the claimed subject matter was made.

15

## BACKGROUND

[003] Leukocyte infiltration into inflammatory sites is believed to be regulated by 8-10 kD proteins known as chemokines. These chemokines are classified into  
20 four groups, depending on the spacing of their N-terminal cysteine residues, designated CC, CXC, XC and CX3C. Chemokines can mediate a range of pro-inflammatory effects on leukocytes, such as triggering of chemotaxis, degranulation, synthesis of lipid mediators, and integrin activation (Oppenheim, J. J. *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:617-648 (1991); Baggiolini, M., *et al.*, *Adv. Immunol.*, 55:97-179 (1994); Miller, M. D. and Krangel, M. S., *Crit. Rev. Immunol.*, 12:17-46 (1992)).

25 [004] One chemokine, Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP-1), also known as CCL2, acts upon monocytes, lymphocytes and dendritic cells, to induce chemotaxis, granule release, respiratory burst and cytokine release. Studies have  
30 suggested that MCP-1 is implicated in the pathology of diseases such as rheumatoid arthritis, atherosclerosis, granulomatous diseases, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), obesity/diabetes, neuropathic pain, cancer, and

26

multiple sclerosis (Koch, *J. Clin. Invest.* 90:772-79 (1992); Hosaka *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.* 97:451-457 (1994); Schwartz *et al.*, *Am. J. Cardiol.* 71(6):9B-14B (1993); Schimmer *et al.*, *J. Immunol.* 160:1466-1471 (1998); Flory *et al.*, *Lab. Invest.* 69:396-404 (1993); Gong *et al.*, *J. Exp. Med.* 186:131-137 (1997); Salcedo *et al. Blood* 96(1) 34-40 (2000); Bracke *et al.*, *Inflammation & Allergy – Drug Targets* 6: 75-79 (2007); Chung *Current Drug Targets – Inflammation & Allergy* 4: 619-625 (2005).

**[005]** CCR2 is a seven-transmembrane domain G-protein coupled chemotactic receptor which binds MCP-1 as well as other chemokines including CCL8 (MCP-2), CCL7 (MCP-3) and CCL13 (MCP-4) (Charo, I. F., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2752-2756 (1994); Myers, S. J., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:5786-5792 (1995); Gong *et al.*, *J. Biol Chem* 272:11682-11685 (1997); Garcia-Zepeda *et al.*, *J. Immunol.* 157:5613-5626 (1996)). CCR2 is also known as CMKBR2 and CKR2. Two alternatively-spliced forms of the CCR2, CCR2A and CCR2B, have been cloned which differ in their C-termini (Wong *et al* (1997) *J. Biol. Chem.* 272:1038-1045). In signaling studies, both CCR2A and CCR2B mediate agonist-dependent calcium mobilization and adenylyl cyclase inhibition. CCR2 is expressed on monocytes, T cells, and dendritic cells, and interacts with chemokines secreted by endothelial cells, monocytes, and synovial fibroblasts.

**[006]** The biological role of CCR2 has been probed through the use of CCR2 knockout mice (Boring *et al.*, *J Clin Invest.* 100(10):2552-61 (1997); Boring *et al.*, *Nature* 394(6696):894-7 (1998); De Paolo *et al.*, *J Immunol.* 171(7):3560-7 (2003); Gaupp *et al.*, *Am J Pathol.* 162(1):139-50(2003)). CCR2-/- mice have significant defects in both delayed-type hypersensitivity responses and production of Th1-type cytokines, and are generally less susceptible to developing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). In addition to modulating immune responses, CCR2 is a co-receptor for HIV (Connor *et al.*, *J. Exp. Med.* 185:621-628 (1997); Frade *et al.*, *J Clin Invest.* 100(3):497-502(1997)).

**[007]** Due to the involvement of MCP-1 and its receptor CCR2 in undesirable immune responses, CCR2 antagonists may be promising therapeutic agents. However, few CCR2 antagonists have been described (see Ogilvie *et al.*, *Blood* 97(7):1920-4 (2001)). Thus, there is a need for novel and improved compositions that will bind CCR2 and block CCR2 signaling mediated by its ligand.

2A

## SUMMARY

**[008]** Provided are isolated antibodies, or antigen-binding portions thereof, that specifically bind CCR2, particularly human CCR2, and may act as a CCR2 antagonist, and compositions comprising said antibodies or portions. Included are antibodies or antigen-binding portions that bind to CCR2 at an epitope other than the N-terminal portion or the third loop of CCR2. Such antibodies may bind to the first and/or second extracellular loops of CCR2.

**[009]** Compositions comprising (i) the heavy and/or light chain, the variable domains thereof, or antigen-binding portions thereof, of said anti-CCR2 antibody, or nucleic acid molecules encoding them; and (ii) a pharmaceutically acceptable carrier are provided. The compositions may further comprise another component, such as a therapeutic agent or a diagnostic agent.

**[0010]** Diagnostic and therapeutic methods are also provided. Similarly, anti-CCR2 antibodies and portions thereof for the manufacture of medicaments to treat inflammatory and non-inflammatory disorders are provided.

**[0011]** Provided are vectors and host cells comprising the nucleic acid molecules, as well as methods of recombinantly producing the polypeptides encoded by the nucleic acid molecules. Isolated cell lines that produces an anti-CCR2 antibody or an antigen-binding portion thereof are also provided.

## BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

**[0012]** Figures 1A, 1B, & 1C are graphs showing the binding of a CCR2 antibody to cells as assayed by FACS analysis. Figure 1A is a graph illustrating binding of the AF-488 (ALEXA FLUOR® 488, Invitrogen) conjugated CCR2 antibody 4.40 A68G S230P to human whole blood monocytes compared to a KLH control antibody as assayed by FACS analysis. Figure 1B is a graph illustrating binding of AF-488 conjugated CCR2 antibody 4.40 A68G S230P to 300-19 cells expressing human CCR2 as assayed by FACS analysis. Figure 1C is a graph illustrating the binding of different concentrations of 4.40 A68G S230P antibody to CCR2 transfected 300-19 cells as detected with anti-human PE.

**[0013]** Figure 2 illustrates the dose related binding of 4.40 A68G S230P antibody to CCR2 transfected 300-19 cells in a saturation binding assay.

28

**[0014]** Figure 3 illustrates the ability of the 4.40 A68G S230P antibody to inhibit the chemotaxis of THP-1 cells in response to the CCR2 ligand MCP-1 but not in response to the CCR1/CCR5 ligand MIP-1a.

**[0015]** Figure 4 illustrates the ability of the 4.40 A68G S230P antibody to inhibit the chemotaxis of primary human monocytes in response to MCP-1.

**[0016]** Figure 5 shows the plasmid map of a retroviral vector for expression of the CCR1/CCR2 chimeras.

**[0017]** Figures 6A & 6B illustrates the binding of 4.40 A68G S230P antibody to 300-19 cells expressing a chimeric receptor consisting of only the extracellular 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> loops of CCR2 and the N terminus and third loop of CCR1. Figure 6C depicts a saturation binding assay of 4.40 A68G S230P to the chimeric receptor transfected 300-19 cells as measured by FACS analysis.

**[0018]** Figure 7 shows saturation binding analysis (3hr saturation curve) of the 4.40 A68G S230P antibody on (A) 300-19 control cells; (B) transfected 300-19 cells expressing full length CCR2; (C) transfected 300-19 cells expressing flag-tagged (M1) MRRR chimera [N terminus of CCR2 (M) flag tagged to ensure receptor expression and the loop regions of CCR1 (R)]; (D) transfected 300-19 cells expressing flag-tagged (M1) RRRM chimera [N terminus and 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> loop of CCR1 (R) flag tagged to ensure receptor expression and the 3<sup>rd</sup> loop of CCR2 (M)]; and (E) transfected 300-19 cells expressing flag-tagged (M1) RMMR chimera [N terminus and 3rd loop of CCR1 (R) flag tagged to ensure receptor expression and the 1<sup>st</sup> and 2nd loop of CCR2 (M)].

**[0019]** Figure 8 shows binding of the 4.40 A68G S230P antibody to either loop 2 or loop 3 peptide regions of CCR2 as assessed in a capture ELISA.

**[0020]** Figure 9 shows two graphs illustrating the FACS immunostaining of 300-19 cells expressing recombinant CCR5, with either the AF-488 conjugated 4.40.3 A68G S230P antibody (panel A) or with an anti-CCR5 antibody (panel B).

**[0021]** Figure 10 illustrates the inhibition of MCP-1 induced activity by 4.40 A68G S230P antibody as assessed by calcium mobilization on CCR2 transfected 300-19 cells.

**[0022]** Figure 11 demonstrates the inhibition of MCP-3 induced chemotaxis of CCR2 transfected 300-19 cells by the 4.40 A68G S230P antibody.

29

[0023] Figure 12 illustrates the inhibition of human monocyte actin polymerization in response to MCP-1 in whole blood by the 4.40 A68G S230P antibody.

[0024] Figure 13 illustrates the inhibition of monocyte actin polymerization in female cynomolgus monkey response to MCP-1 in whole blood by the 4.40 A68G S230P antibody.

[0025] Figure 14 shows the dose-dependent inhibition of collagen 1 mRNA synthesis in the hHSC cell line, LI90, by the 4.40 A68G S230P antibody.

[0026] Figure 15 demonstrates the dose-dependent inhibition of pERK phosphorylation in human whole blood at 10 nM MCP-1 by the 4.40 A68G S230P antibody.

[0027] Figure 16 shows the decrease of plasma alanine transaminase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities in human CCR2 knock-in mice by the 4.40 A68G S230P antibody 24 hours after a single ConA injection.

[0028] Figures 17A-17D show an alignment of the germline amino acid sequences of the heavy and light chain variable regions compared to the respective 4.22.3, 4.40.2, 4.39.3 and 4.9.2 antibody heavy and light chain variable regions (only mistakes are shown for the 4.22.3, 4.40.2, 4.39.3 and 4.9.2 antibody). The CDRs are underlined and mismatched gap(s) are indicated by a pound sign (#).

DETAILED DESCRIPTION

Definitions and General Techniques

[0029] Unless otherwise defined herein, scientific and technical terms used herein shall have the meanings that are commonly understood by those of ordinary skill in the art. Further, unless otherwise required by context, singular terms shall include pluralities and plural terms shall include the singular. All publications and other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety. Generally, nomenclature used in connection with, and techniques of, cell and tissue culture, molecular biology, immunology, microbiology, genetics, protein and nucleic acid chemistry, and hybridization described herein are those well known and commonly used in the art. In case of conflict, the present specification, including definitions, will control.

**[0030]** The methods and techniques are generally performed according to conventional methods well known in the art and as described in various general and more specific references that are cited and discussed throughout the present specification unless otherwise indicated. See, e.g., Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992); and Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), all of which are incorporated herein by reference. Enzymatic reactions and purification techniques are performed according to manufacturer's specifications, as commonly accomplished in the art or as described herein. The nomenclature used in connection with, and the laboratory procedures and techniques of, analytical chemistry, synthetic organic chemistry, and medicinal and pharmaceutical chemistry described herein are those well known and commonly used in the art. Standard techniques are used for chemical syntheses, chemical analyses, pharmaceutical preparation, formulation, and delivery, and treatment of patients.

**[0031]** The following terms, unless otherwise indicated, shall be understood to have the following meanings:

**[0032]** The term "polypeptide" encompasses native or artificial proteins, protein fragments and polypeptide analogs of a protein sequence. A polypeptide may be monomeric or polymeric.

**[0033]** The term "isolated protein," "isolated polypeptide" or "isolated antibody" is a protein, polypeptide or antibody that by virtue of its origin or source of derivation (1) is not associated with naturally associated components that accompany it in its native state, (2) is free of other proteins from the same species, (3) is expressed by a cell from a different species, or (4) does not occur in nature. Thus, a polypeptide that is chemically synthesized or synthesized in a cellular system different from the cell from which it naturally originates will be "isolated" from its naturally associated components. A protein may also be rendered substantially free of naturally-associated components by isolation, using protein purification techniques well known in the art.

**[0034]** Examples of isolated antibodies include an anti-CCR2 antibody that has been affinity purified using CCR2 or a portion thereof, an anti-CCR2 antibody that has been synthesized by a hybridoma or other cell line *in vitro*, and a human anti-CCR2 antibody derived from a transgenic mouse.

5 **[0035]** A protein or polypeptide is "substantially pure," "substantially homogeneous," or "substantially purified" when at least about 60 to 75% of a sample exhibits a single species of polypeptide. The polypeptide or protein may be monomeric or multimeric. A substantially pure polypeptide or protein will typically comprise about 50%, 60%, 70%, 80% or 90% W/W of a protein sample,  
10 more usually about 95%, and may be over 99% pure. Protein purity or homogeneity may be indicated by a number of means well known in the art, such as polyacrylamide gel electrophoresis of a protein sample, followed by visualizing a single polypeptide band upon staining the gel with a stain well known in the art. For certain purposes, higher resolution may be provided by using HPLC or other  
15 means well known in the art for purification.

**[0036]** The term "antibody analog" as used herein refers to an antibody that comprises a segment that has substantial identity to a portion of an amino acid sequence and that has at least one of the following properties: (1) specific binding to CCR2 under suitable binding conditions, (2) ability to inhibit at least one  
20 biological activity of CCR2. Typically, antibody analogs comprise a conservative amino acid substitution (or insertion or deletion) with respect to the native sequence. Analogs typically are at least 20 or 25 amino acids long, at least 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 or 200 amino acids long or longer, and can often be as long as a full-length heavy chains or light chains of the antibodies. Some cases  
25 include antibody analogs with 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 or 17 substitutions from the germline amino acid sequence.

**[0037]** In certain cases, amino acid substitutions to an anti-CCR2 antibody or antigen-binding portion thereof are those which: (1) reduce susceptibility to proteolysis, (2) reduce susceptibility to oxidation, (3) alter binding affinity for  
30 forming protein complexes, (4) add or remove glycosylation sites and (5) confer or modify other physicochemical or functional properties of such analogs, but still retain specific binding to CCR2. Analogs can include various muteins of a sequence other than the normally-occurring peptide sequence. For example,

single or multiple amino acid substitutions, such as conservative amino acid substitutions, may be made in the normally-occurring sequence in a portion of the polypeptide outside the domain(s) forming intermolecular contacts. A conservative amino acid substitution should not substantially change the structural characteristics of the parent sequence; e.g., a replacement amino acid should not alter the anti-parallel  $\beta$ -sheet that makes up the immunoglobulin binding domain that occurs in the parent sequence, or disrupt other types of secondary structure that characterizes the parent sequence. In general, glycine and proline would not be used in an anti-parallel  $\beta$ -sheet. Examples of art-recognized polypeptide secondary and tertiary structures are described in *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); and Thornton *et al.*, *Nature* 354:105 (1991), incorporated herein by reference.

[0038] Where an "antibody" is referred to herein, it is normally understood that an antigen-binding portion thereof may also be used. An antigen-binding portion competes with the intact antibody for specific binding. See generally, *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., second ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (incorporated by reference in its entirety for all purposes). Antigen-binding portions may be produced by recombinant DNA techniques or by enzymatic or chemical cleavage of intact antibodies. In some cases, antigen-binding portions include Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, dAb, and complementarity determining region (CDR) fragments, single-chain antibodies (e.g., scFv), chimeric antibodies, diabodies and polypeptides that contain at least a portion of an antibody that is sufficient to confer specific antigen binding to the polypeptides.

[0039] From N-terminus to C-terminus, both the mature light and heavy chain variable domains of an antibody comprise the regions FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 and FR4. The assignment of amino acids to each domain herein is in accordance with the definitions of Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)); Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); or Chothia *et al.*, *Nature* 342:878-883 (1989).



**[0040]** As used herein, an antibody that is referred to by number is the same as a monoclonal antibody that is obtained from the hybridoma of the same number. For example, monoclonal antibody 4.40 is the same antibody as one obtained from hybridoma 4.40, or a subclone thereof. Sequential subclones are designated  
5 for example 4.40.1, 4.40.2, and 4.40.3, and have substantially the same sequences and functionality.

**[0041]** As used herein, an Fd fragment means an antibody fragment that consists of the V<sub>H</sub> and C<sub>H</sub>1 domains; an Fv fragment consists of the V<sub>L</sub> and V<sub>H</sub> domains of a single arm of an antibody; and a dAb fragment (Ward *et al.*, *Nature* 341:544-546  
10 (1989)) consists of a V<sub>H</sub> domain.

**[0042]** In some cases, the antibody is a single-chain antibody (e.g., scFv) in which V<sub>L</sub> and V<sub>H</sub> domains are paired to form a monovalent molecules via a synthetic linker that enables them to be made as a single polypeptide chain. (See, e.g., Bird *et al.*, *Science* 242:423-426 (1988) and Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*  
15 *USA* 85:5879-5883 (1988).) In some cases, the antibodies are diabodies, *i.e.*, are bivalent antibodies in which V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> domains are expressed on a single polypeptide chain, but using a linker that is too short to allow for pairing between the two domains on the same chain, thereby forcing the domains to pair with complementary domains of another chain and creating two antigen binding sites.

(See, e.g., Holliger P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993), and Poljak R. J. *et al.*, *Structure* 2:1121-1123 (1994).) In some cases, one or more CDRs from an antibody herein may be incorporated into a molecule either covalently or noncovalently to make it an immunoadhesin that specifically binds to CCR2. In such cases, the CDR(s) may be incorporated as part of a larger  
20 polypeptide chain, may be covalently linked to another polypeptide chain, or may be incorporated noncovalently. In cases having one or more binding sites, the binding sites may be identical to one another or may be different.

**[0043]** As used herein, the term "human antibody" means any antibody in which the variable and constant domain sequences are human sequences. The term  
30 encompasses antibodies with sequences derived from human genes, but which have been changed, e.g., to decrease possible immunogenicity, increase affinity, eliminate cysteines that might cause undesirable folding, etc. The term encompasses such antibodies produced recombinantly in non-human cells, which

might impart glycosylation not typical of human cells. These antibodies may be prepared in a variety of ways, as described herein.

**[0044]** The term "chimeric antibody" as used herein means an antibody that comprises regions from two or more different antibodies. In one case, one or more of the CDRs of the chimeric antibody are derived from a human anti-CCR2 antibody. In another case, all of the CDRs are derived from human anti-CCR2 antibodies. In another case, the CDRs from more than one human anti-CCR2 antibodies are combined in a chimeric antibody. For instance, a chimeric antibody may comprise a CDR1 from the light chain of a first human anti-CCR2 antibody, a CDR2 from the light chain of a second human anti-CCR2 antibody and a CDR3 from the light chain of a third human anti-CCR2 antibody, and CDRs from the heavy chain may be derived from one or more other anti-CCR2 antibodies. Further, the framework regions may be derived from one of the anti-CCR2 antibodies from which one or more of the CDRs are taken or from one or more different human antibodies.

**[0045]** In some cases, a chimeric antibody is a humanized anti-CCR2 antibody. A humanized anti-CCR2 antibody comprises the amino acid sequence of one or more framework regions and/or the amino acid sequence from at least a portion of the constant region of one or more human anti-CCR2 antibodies and CDRs derived from a non-human anti-CCR2 antibody.

**[0046]** Fragments or analogs of antibodies or immunoglobulin molecules can be readily prepared by those of ordinary skill in the art following the teachings of this specification. Preferred amino- and carboxy-termini of fragments or analogs occur near boundaries of functional domains.

**[0047]** The term "surface plasmon resonance," as used herein, refers to an optical phenomenon that allows for the analysis of real-time biospecific interactions by detection of alterations in protein concentrations within a biosensor matrix, for example using the BIACORE™ system (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.). For further descriptions, see Jonsson U. *et al.*, *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26 (1993); Jonsson U. *et al.*, *Biotechniques* 11:620-627 (1991); Jonsson B. *et al.*, *J. Mol. Recognit.* 8:125-131 (1995); and Johnsson B. *et al.*, *Anal. Biochem.* 198:268-277 (1991).

35

**[0048]** The term " $K_D$ " refers to the equilibrium dissociation constant of a particular antibody-antigen interaction. An antibody is said to specifically bind an antigen when the dissociation constant is  $\leq 1$  mM,  $\leq 100$  nM, or  $\leq 10$  nM. In certain cases, the  $K_D$  is 1 pM to 500 pM. In other cases, the  $K_D$  is between 500 pM to 1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M to 100 nM, or 100 mM to 10 nM.

**[0049]** The term "epitope" includes any protein determinant capable of specific binding to an immunoglobulin or T-cell receptor or otherwise interacting with a molecule. Epitopic determinants generally consist of chemically-active surface groupings of molecules such as amino acids or carbohydrate or sugar side chains and generally have specific three dimensional structural characteristics, as well as specific charge characteristics. An epitope may be "linear" or "conformational." In a linear epitope, all of the points of interaction between the protein and the interacting molecule (such as an antibody) occur linearly along the primary amino acid sequence of the protein. In a conformational epitope, the points of interaction occur across amino acid residues on the protein that are separated from one another. Once a desired epitope on an antigen is determined, it is possible to generate antibodies to that epitope, e.g., using the techniques described in the present specification. Alternatively, during the discovery process, the generation and characterization of antibodies may elucidate information about desirable epitopes. From this information, it is then possible to competitively screen antibodies for binding to the same epitope. An approach to achieve this is to conduct competition and cross-competition studies to find antibodies that compete or cross-compete with one another for binding to CCR2, e.g., the antibodies compete for binding to the antigen. A high throughput process for "binning" antibodies based upon their cross-competition is described in International Patent Application No. WO 03/48731.

**[0050]** As used herein, the twenty conventional amino acids and their abbreviations follow conventional usage. See Immunology - A Synthesis (second Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), incorporated herein by reference.

**[0051]** The term "polynucleotide" as referred to herein means a polymeric form of nucleotides of at least 10 bases in length, either ribonucleotides or

36

deoxyribonucleotides or a modified form of either type of nucleotide. The term includes single and double stranded forms.

**[0052]** The term "isolated polynucleotide" as used herein means a polynucleotide of genomic, cDNA, or synthetic origin or some combination thereof, which by virtue of its origin the "isolated polynucleotide" (1) is not associated with all or a portion of a polynucleotides with which the "isolated polynucleotide" is found in nature, (2) is operably linked to a polynucleotide to which it is not linked in nature, or (3) does not occur in nature as part of a larger sequence.

**[0053]** The term "naturally occurring nucleotides" as used herein includes deoxyribonucleotides and ribonucleotides. The term "modified nucleotides" as used herein includes nucleotides with modified or substituted sugar groups and the like. The term "oligonucleotide linkages" referred to herein includes oligonucleotides linkages such as phosphorothioate, phosphorodithioate, phosphoroselenoate, phosphorodiselenoate, phosphoroanilothioate, phosphoraniladate, phosphoroamidate, and the like. See *e.g.*, LaPlanche *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 14:9081 (1986); Stec *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 106:6077 (1984); Stein *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 16:3209 (1988); Zon *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design* 6:539 (1991); Zon *et al.*, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); U.S. Patent No. 5,151,510; Uhlmann and Peyman, *Chemical Reviews* 90:543 (1990), the disclosures of which are hereby incorporated by reference. An oligonucleotide can include a label for detection, if desired.

**[0054]** "Operably linked" sequences include both expression control sequences that are contiguous with the gene of interest and expression control sequences that act in *trans* or at a distance to control the gene of interest. The term "expression control sequence" as used herein means polynucleotide sequences that are necessary to effect the expression and processing of coding sequences to which they are ligated. Expression control sequences include appropriate transcription initiation, termination, promoter and enhancer sequences; efficient RNA processing signals such as splicing and polyadenylation signals; sequences that stabilize cytoplasmic mRNA; sequences that enhance translation efficiency (*i.e.*, Kozak consensus sequence); sequences that enhance protein stability; and when desired, sequences that enhance protein secretion. The nature of such

control sequences differs depending upon the host organism; in prokaryotes, such control sequences generally include promoter, ribosomal binding site, and transcription termination sequence; in eukaryotes, generally, such control sequences include promoters and transcription termination sequence. The term

5 "control sequences" is intended to include, at a minimum, all components whose presence is essential for expression and processing, and can also include additional components whose presence is advantageous, for example, leader sequences and fusion partner sequences.

**[0055]** The term "vector", as used herein, means a nucleic acid molecule capable

10 of transporting another nucleic acid to which it has been linked. In some cases, the vector is a plasmid, *i.e.*, a circular double stranded piece of DNA into which additional DNA segments may be ligated. In some cases, the vector is a viral vector, wherein additional DNA segments may be ligated into the viral genome. In some cases, the vectors are capable of autonomous replication in a host cell into

15 which they are introduced (*e.g.*, bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). In other cases, the vectors (*e.g.*, non-episomal mammalian vectors) can be integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable of directing the expression

20 of genes to which they are operatively linked. Such vectors are referred to herein as "recombinant expression vectors" (or simply, "expression vectors").

**[0056]** The term "recombinant host cell" (or simply "host cell"), as used herein, means a cell into which a recombinant expression vector has been introduced. It should be understood that "recombinant host cell" and "host cell" mean not only

25 the particular subject cell but also the progeny of such a cell. Because certain modifications may occur in succeeding generations due to either mutation or environmental influences, such progeny may not, in fact, be identical to the parent cell, but are still included within the scope of the term "host cell" as used herein.

**[0057]** The term "percent sequence identity" in the context of nucleotide

30 sequences means the residues in two sequences that are the same when aligned for maximum correspondence. There are a number of different algorithms known in the art which can be used to measure nucleotide sequence identity. For instance, polynucleotide sequences can be compared using FASTA, Gap or

Bestfit, which are programs in Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, which includes, e.g., the programs FASTA2 and FASTA3, provides alignments and percent sequence identity of the regions of the best overlap between the query and search sequences (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.* 266:227-258 (1996); Pearson, *J. Mol. Biol.* 276:71-84 (1998); incorporated herein by reference).

Unless otherwise specified, default parameters for a particular program or algorithm are used. For instance, percent sequence identity between nucleotide sequences can be determined using FASTA with its default parameters (a word size of 6 and the NOPAM factor for the scoring matrix) or using Gap with its default parameters as provided in GCG Version 6.1, incorporated herein by reference.

**[0058]** A reference to a nucleotide sequence encompasses its complement unless otherwise specified. Thus, a reference to a nucleic acid having a particular sequence should be understood to encompass its complementary strand, with its complementary sequence.

**[0059]** As used herein, the terms "percent sequence identity" and "percent sequence homology" are used interchangeably.

**[0060]** The term "substantial similarity" or "substantial sequence similarity," when referring to a nucleic acid or fragment thereof, means that when optimally aligned with appropriate nucleotide insertions or deletions with another nucleic acid (or its complementary strand), there is nucleotide sequence identity in at least about 85%, at least about 90%, and at least about 95%, 96%, 97%, 98% or 99% of the nucleotide bases, as measured by any well-known algorithm of sequence identity, such as FASTA, BLAST or Gap, as discussed above.

**[0061]** As applied to polypeptides, the term "substantial identity" means that two peptide sequences, when optimally aligned, such as by the programs GAP or BESTFIT using default gap weights as supplied with the programs, share at least 70%, 75% or 80% sequence identity, at least 90% or 95% sequence identity, and at least 97%, 98% or 99% sequence identity. In certain cases, residue positions that are not identical differ by conservative amino acid substitutions. A "conservative amino acid substitution" is one in which an amino acid residue is

substituted by another amino acid residue having a side chain R group with similar chemical properties (e.g., charge or hydrophobicity). In general, a conservative amino acid substitution will not substantially change the functional properties of a protein. In cases where two or more amino acid sequences differ  
5 from each other by conservative substitutions, the percent sequence identity may be adjusted upwards to correct for the conservative nature of the substitution.

Means for making this adjustment are well-known to those of skill in the art. See, e.g., Pearson, *Methods Mol. Biol.* 243:307-31 (1994). Examples of groups of amino acids that have side chains with similar chemical properties include 1)

10 aliphatic side chains: glycine, alanine, valine, leucine, and isoleucine; 2) aliphatic-hydroxyl side chains: serine and threonine; 3) amide-containing side chains: asparagine and glutamine; 4) aromatic side chains: phenylalanine, tyrosine, and tryptophan; 5) basic side chains: lysine, arginine, and histidine; 6) acidic side chains: aspartic acid and glutamic acid; and 7) sulfur-containing side  
15 chains: cysteine and methionine. Conservative amino acids substitution groups are: valine-leucine-isoleucine, phenylalanine-tyrosine, lysine-arginine, alanine-valine, glutamate-aspartate, and asparagine-glutamine.

**[0062]** Alternatively, a conservative replacement is any change having a positive value in the PAM250 log-likelihood matrix disclosed in Gonnet *et al.*, *Science*  
20 256:1443-45 (1992), incorporated herein by reference. A "moderately conservative" replacement is any change having a nonnegative value in the PAM250 log-likelihood matrix.

**[0063]** Sequence identity for polypeptides is typically measured using sequence analysis software. Protein analysis software matches sequences using measures  
25 of similarity assigned to various substitutions, deletions and other modifications, including conservative amino acid substitutions. For instance, GCG contains programs such as "Gap" and "Bestfit" which can be used with default parameters as specified by the programs to determine sequence homology or sequence identity between closely related polypeptides, such as homologous polypeptides  
30 from different species of organisms or between a wild type protein and a mutein thereof. See, e.g., GCG Version 6.1 (University of Wisconsin, WI). Polypeptide sequences also can be compared using FASTA using default or recommended parameters, see GCG Version 6.1. FASTA (e.g., FASTA2 and FASTA3) provides

40

alignments and percent sequence identity of the regions of the best overlap between the query and search sequences (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000)). Another preferred algorithm when comparing a sequence to a database containing a large number of sequences from different organisms is the computer program BLAST, especially blastp or tblastn, using default parameters as supplied with the programs. See, e.g., Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402 (1997).

**[0064]** CCR2 is a seven-transmembrane domain protein, and accordingly it has six loops. Loops 1, 3 and 5, counting from the extracellular N-terminus, are intracellular loops, while loops 2, 4 and 6 are extracellular. The first, second and third extracellular loops of CCR2 refer to loops 2, 4 and 6, respectively.

**[0065]** Throughout this specification and claims, the word "comprise," or variations such as "comprises" or "comprising," will be understood to imply the inclusion of a stated integer or group of integers but not the exclusion of any other integer or group of integers.

#### Human Anti-CCR2 Antibodies and Characterization Thereof

**[0066]** In some cases, human anti-CCR2 antibodies are provided. In some cases, human anti-CCR2 antibodies are produced by immunizing a non-human transgenic animal, e.g., a rodent, whose genome comprises human immunoglobulin genes so that the transgenic animal produces human antibodies. In some cases, the anti-CCR2 antibodies and antigen-binding portions include, but are not limited to, antibodies or antigen-binding portions (i) which bind to the first or second extracellular loop of CCR2, or both; (ii) which do not bind to the N-terminal end or the third extracellular loop of CCR2 or both; or (iii) which do both (i) and (ii). In another case, human anti-CCR2 antibodies that bind to a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:128 or SEQ ID NO:129 are provided. In another case, human anti-CCR2 antibodies bind to a polypeptide comprising an amino acid sequence 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, or 99% identical to SEQ ID NO:128 or SEQ ID NO:129. In another case, the anti-CCR2 antibodies and antigen-binding portions include, but are not limited to,



41

antibodies or antigen-binding portions which bind to the third extracellular loop of CCR2.

**[0067]** The  $V_H$ ,  $V_K$ ,  $V_\lambda$  genes are classified into families on the basis of sequence homology. Two  $V_H$ ,  $V_K$ , or  $V_\lambda$  genes belong to the same family if they share the same nucleotide sequence at more than 80% of the positions. An anti-CCR2 antibody may comprise a human kappa light chain ( $V_K$ ) or a human lambda light chain ( $V_\lambda$ ) or an amino acid sequence derived there from. In some cases comprising a lambda light chain, the light chain variable domain ( $V_L$ ) utilizes a human  $V_\lambda 1$ ,  $V_\lambda 2$ ,  $V_\lambda 3$ ,  $V_\lambda 4$ ,  $V_\lambda 5$ ,  $V_\lambda 6$ ,  $V_\lambda 7$ ,  $V_\lambda 8$ ,  $V_\lambda 9$ , or  $V_\lambda 10$  family gene (Williams S.C. *et al. J. Mol. Bio.* 264:220-232 (1996)).

**[0068]** In some cases comprising a kappa light chain, the light chain variable domain ( $V_L$ ) utilizes a human  $V_{KI}$ ,  $V_{KII}$ ,  $V_{KIII}$ ,  $V_{KIV}$ ,  $V_{KV}$ , or  $V_{KVI}$  family gene (Cox J. P. L., *et al., Eur. J. Immunol* 24:827-836 (1994)), preferably a  $V_{KI}$ ,  $V_{KII}$ ,  $V_{KIV}$ , or  $V_{KVI}$  family gene, preferably a  $V_{KI}$  or  $V_{KVI}$  family gene. In some cases, the light chain germline sequence is selected from human  $V_K$  sequences including, but not limited to, A1, A10, A11, A14, A17, A18, A19, A2, A20, A23, A26, A27, A3, A30, A5, A7, B2, B3, L1, L10, L11, L12, L14, L15, L16, L18, L19, L2, L20, L22, L23, L24, L25, L4/18a, L5, L6, L8, L9, O1, O11, O12, O14, O18, O2, O4, and O8. In certain cases, this light chain human germline gene is selected from V1-11, V1-13, V1-16, V1-17, V1-18, V1-19, V1-2, V1-20, V1-22, V1-3, V1-4, V1-5, V1-7, V1-9, V2-1, V2-11, V2-13, V2-14, V2-15, V2-17, V2-19, V2-6, V2-7, V2-8, V3-2, V3-3, V3-4, V4-1, V4-2, V4-3, V4-4, V4-6, V5-1, V5-2, V5-4, and V5-6. In certain cases, the light chain utilizes a human  $V_{KI}$  O12,  $V_{KII}$  A1, a  $V_{KIV}$  B3 or a  $V_{KVI}$  A26 germline gene.

**[0069]** An anti-CCR2 antibody may comprise a heavy chain variable domain ( $V_H$ ) that utilizes a human  $V_{H1}$ ,  $V_{H2}$ ,  $V_{H3}$ ,  $V_{H4}$ ,  $V_{H5}$ ,  $V_{H6}$  or  $V_{H7}$  family gene. In particular examples, this heavy chain human germline gene is selected from VH1-18, VH1-2, VH1-24, VH1-3, VH1-45, VH1-46, VH1-58, VH1-69, VH1-8, VH2-26, VH2-5, VH2-70, VH3-11, VH3-13, VH3-15, VH3-16, VH3-20, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-33, VH3-35, VH3-38, VH3-43, VH3-48, VH3-49, VH3-53, VH3-64, VH3-66, VH3-7, VH3-72, VH3-73, VH3-74, VH3-9, VH4-28, VH4-31, VH4-34, VH4-39, VH4-4, VH4-59, VH4-61, VH5-51, VH6-1, and VH7-81. In certain cases, the heavy chain utilizes a human  $V_{HI}$  1-46 or a  $V_{HIII}$  3-30 gene.

**[0070]** In particular cases, the light chain variable region and/or heavy chain variable region comprises a framework region or at least a portion of a framework region (e.g., containing 2 or 3 subregions, such as FR2 and FR3). In certain cases, at least FRL1, FRL2, FRL3, or FRL4 is fully human. In other examples, at least FRH1, FRH2, FRH3, or FRH4 is fully human. In some cases, at least FRL1, FRL2, FRL3, or FRL4 is a germline sequence (e.g., human germline) or comprises human consensus sequences for the particular framework (readily available at the sources of known human Ig sequences described herein). In other examples, at least FRH1, FRH2, FRH3, or FRH4 is a germline sequence (e.g., human germline) or comprises human consensus sequences for the particular framework.

**[0071]** In some cases, the  $V_L$  of the CCR2 antibody comprises one or more amino acid substitutions, deletions, and/or insertions relative to the germline amino acid sequence of the human gene. In some cases, the  $V_L$  of the anti-CCR2 antibody comprises 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10 amino acid substitutions relative to the germline amino acid sequence. In some cases, one or more of those substitutions, deletions, and/or insertions is in a CDR of the light chain. In some cases, the amino acid substitutions, deletions and/or insertions relative to germline are at one or more of the same positions as the substitution, deletion and/or insertion relative to germline in any one or more of the  $V_L$  of antibodies 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 or 4.40 A68G S230P. For example, the  $V_L$  of an anti-CCR2 antibody may contain one or more amino acid substitutions, deletions, and/or insertions compared to germline found in the  $V_L$  of antibody 4.40. In some cases, the amino acid changes are at one or more of the same positions, but involve a different substitution, deletion and/or insertion compared to germline. In some cases, substitution may represent conservative amino acid substitutions at such position(s) relative to the amino acid in the reference antibody. For example, if a particular position in one of these antibodies is substituted relative to germline and is glutamate, one may substitute aspartate at that position. Similarly, if an amino acid substitution compared to germline is serine, one may conservatively substitute threonine for serine at that position.

**[0072]** In some cases, the light chain of the human anti-CCR2 antibody comprises the variable domain ( $V_L$ ) amino acid sequence of antibody 4.40 (SEQ ID NO:101);

4.9 (SEQ ID NO:29); 4.22 (SEQ ID NO:65); 4.39 (SEQ ID NO:194); or 4.40 A68G S230P (SEQ ID NO:113); or said amino acid sequence having up to 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10 conservative amino acid substitutions and/or a total of up to 3 non-conservative amino acid substitutions. In some cases, the light chain may  
5 comprise CDR1, CDR2 and CDR3 independently selected from the light chain CDR1, CDR2 and CDR3, respectively of the light chain of antibody 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 or 4.40 A68G S230P, or CDRs each having less than 4 or less than 3 conservative amino acid substitutions and/or a total of three or fewer non-conservative amino acid substitutions. In some cases, the light chain of the anti-  
10 CCR2 antibody comprises a light chain CDR1, CDR2, and CDR3, each of which is independently selected from the light chain CDR1, CDR2 and CDR3 regions of monoclonal antibody 4.40 (SEQ ID NO:100); 4.9 (SEQ ID NO:28); 4.22 (SEQ ID NO:64); 4.39 (SEQ ID NO:193); or 4.40 A68G S230P (SEQ ID NO:112). In certain cases, the light chain of the anti-CCR2 antibody comprises the light chain  
15 CDR1, CDR2 and CDR3 of an antibody comprising the amino acid sequence of the V<sub>L</sub> region of an antibody selected from 4.40 (SEQ ID NO:101); 4.9 (SEQ ID NO:29); 4.22 (SEQ ID NO:65); 4.39 (SEQ ID NO:194); or 4.40 A68G S230P (SEQ ID NO:113); or said CDRs each having less than 4 or less than 3 conservative amino acid substitutions and/or a total of three or fewer non-conservative amino  
20 acid substitutions. Sequence identifiers are listed for the CDRs of certain antibodies in Table 8.

**[0073]** With regard to the heavy chain, in some cases, the variable domain (V<sub>H</sub>) utilizes a human V<sub>H</sub> 3-30, or V<sub>H</sub> 1-46 gene sequence. In some cases, the V<sub>H</sub> sequence of the anti-CCR2 antibody contains one or more amino acid  
25 substitutions, deletions and/or insertions (additions) relative to the germline amino acid sequence. In some cases, the variable domain of the heavy chain comprises 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, or 17 substitutions, deletions and/or insertions from the germline amino acid sequence. In some cases, the substitution is a non-conservative substitution compared to the germline amino  
30 acid sequence. In some cases, the substitution, deletion and/or insertion are in a CDR of the heavy chain. In some cases, the amino acid substitution, deletion and/or insertion are made at one or more of the same positions as the mutations from germline in any one or more of the V<sub>H</sub> of antibodies 4.40, 4.22, 4.39 or 4.9.

44

In other cases, the amino acid substitution, deletion and/or insertion are at one or more of the same positions but involve a different substitution, deletion and/or insertion than in the reference antibody. In some cases the antibody comprises a heavy chain CDR3 having the amino acid sequence of SEQ ID NO:202 or SEQ ID NO:203.

**[0074]** In some cases, the heavy chain comprises the  $V_H$  amino acid sequence of antibody 4.40 (SEQ ID NO:83); 4.22 (SEQ ID NO:47); 4.9 (SEQ ID NO:11); 4.39 (SEQ ID NO:176); or said  $V_H$  amino acid sequence having up to 1, 2, 3, 4, 6, 8, or 10 conservative amino acid substitutions and/or a total of up to 3 non-

conservative amino acid substitutions. In some cases, the heavy chain comprises the amino acid sequence from the beginning of the CDR1 to the end of the CDR3 of any one of the foregoing antibodies.

**[0075]** In some cases, the heavy chain comprises the heavy chain CDR1, CDR2 and CDR3 of antibody 4.40, 4.22, 4.39 or 4.9 or said CDRs each having less than 8, less than 6, less than 4, or less than 3 conservative amino acid substitutions and/or a total of three or fewer non-conservative amino acid substitutions.

**[0076]** In some cases, the heavy chain CDRs are independently selected from the CDRs of antibodies 4.40, 4.22, 4.39 or 4.9. In another case, the heavy chain comprises CDRs independently selected from two or more  $V_H$  regions selected from 4.40 (SEQ ID NO:83); 4.22 (SEQ ID NO:47); 4.39 (SEQ ID NO:176) or 4.9 (SEQ ID NO:11). In another case, the antibody comprises a light chain as disclosed above and a heavy chain as disclosed above. In a further case, the light chain CDRs and the heavy chain CDRs are from the same antibody.

**[0077]** One type of amino acid substitution that may be made is to change one or more cysteines in the antibody, which may be chemically reactive, to another residue, such as, without limitation, alanine or serine. In one case, there is a substitution of a non-canonical cysteine. The substitution can be made in a CDR or framework region of a variable domain or in the constant domain of an antibody. In some cases, the cysteine is canonical.

**[0078]** Another type of amino acid substitution that may be made is to change any potential proteolytic sites in the antibody. Such sites may occur in a CDR or framework region of a variable domain or in the constant domain of an antibody. Substitution of cysteine residues and removal of proteolytic sites may decrease

45

the risk of any heterogeneity in the antibody product and thus increase its homogeneity. Another type of amino acid substitution is to eliminate asparagine-glycine pairs, which form potential deamidation sites, by altering one or both of the residues. In some cases, amino acid substitution are used to insert or remove a glycosylation site. In some cases, the C-terminal lysine of the heavy chain of the anti-CCR2 antibody may be proteolytically or genetically removed. In various cases, the heavy and light chains of the anti-CCR2 antibodies may optionally include a signal sequence.

[0079] In one aspect, the antibodies are produced by a hybridoma.

[0080] Table 1 lists the sequence identifiers (SEQ ID NOs) of the nucleic acids encoding the full-length, and variable domain-comprising portions, of heavy and light chains, and the corresponding deduced amino acid sequences of exemplary antibodies.

TABLE 1

| Monoclonal Antibody     | HUMAN ANTI-CCR2 ANTIBODIES          |     |                         |     |             |     |         |     |
|-------------------------|-------------------------------------|-----|-------------------------|-----|-------------|-----|---------|-----|
|                         | SEQUENCE IDENTIFIER<br>(SEQ ID NO:) |     |                         |     |             |     |         |     |
|                         | Variable Domain Comprising Portion  |     |                         |     | Full Length |     |         |     |
|                         | Heavy (V <sub>H</sub> )             |     | Light (V <sub>L</sub> ) |     | Heavy       |     | Light   |     |
|                         | Protein                             | DNA | Protein                 | DNA | Protein     | DNA | Protein | DNA |
| 4.40.2                  | 83                                  | 74  | 101                     | 92  | 82          | 73  | 100     | 91  |
| 4.40.2<br>A68G<br>S230P | 83                                  | 74  | 113                     | 110 | 116         | 115 | 112     | 109 |
| 4.9.2                   | 11                                  | 2   | 29                      | 20  | 10          | 1   | 28      | 19  |
| 4.22.3                  | 47                                  | 38  | 65                      | 56  | 46          | 37  | 64      | 55  |
| 4.39.3                  | 176                                 | 167 | 194                     | 185 | 175         | 166 | 193     | 184 |

[0081] Also provided are heavy and/or light chain variants of certain of the above-listed human anti-CCR2 antibodies, comprising one or more amino acid substitutions. To designate the variants, the first letter is the one letter symbol for the amino acid of the naturally-occurring antibody chain, the number refers to the

46

position of the amino acid (wherein position one is the N-terminal amino acid), and the second letter is the one letter symbol for the variant amino acid. In some cases, heavy chain variants are provided. One such heavy chain variant is a hinge region stabilizing mutation to reduce formation of half-monomer (Angal, S. et al. *Molecular Immunology* 30:105-108 (1993)). One such hinge stabilizing mutation of the 4.40 antibody heavy chain variant has a proline substitution for serine at position 230 of SEQ ID NO:82. The DNA sequence encoding the S230P variant has a CCA codon beginning at position 688 of SEQ ID NO:115.

**[0082]** Also provided are variant light chains of monoclonal antibody 4.40. A68G is a 4.40 light chain variant, represented by SEQ ID NO:113, in which residue 68 is a glycine residue. In the DNA sequence, the A68G 4.40 variant is encoded by SEQ ID NO:109, in which the codon beginning at position 252 is GGG.

**[0083]** In other cases, antibodies containing combinations of amino acid variants can be produced. An example of a combination of variants is the anti-CCR2 antibody 4.40 A68G S230P, which comprises the light chain substitution A68G and the heavy chain substitution S230P in the context of the 4.40 antibody. Further combinations of a variant heavy chain and a variant light chain of 4.40 are included.

**[0084]** In one case, the anti-CCR2 antibody is 4.40, 4.22, 4.39, 4.40 A68G S230P or 4.9. In still further cases, included are antibodies comprising variable domain amino acid sequences with more than 80%, more than 85%, more than 90%, more than 95%, more than 96%, more than 97%, more than 98% or more than 99% sequence identity to an variable domain amino acid sequence of any of the above-listed human anti-CCR2 antibodies.

#### Class and Subclass of Anti-CCR2 Antibodies

**[0085]** The class and subclass of anti-CCR2 antibodies may be determined by any method known in the art. In general, the class and subclass of an antibody may be determined using antibodies that are specific for a particular class and subclass of antibody. Such antibodies are commercially available. The class and subclass can be determined by ELISA, or Western Blot as well as other techniques. Alternatively, the class and subclass may be determined by sequencing all or a portion of the constant domains of the heavy and/or light

97

chains of the antibodies, comparing their amino acid sequences to the known amino acid sequences of various class and subclasses of immunoglobulins, and determining the class and subclass of the antibodies.

[0086] In some cases, the anti-CCR2 antibody is a monoclonal antibody. The anti-CCR2 antibody can be an IgG, an IgM, an IgE, an IgA, or an IgD molecule. In one case, the anti-CCR2 antibody is an IgG, belonging to, e.g., an IgG1, IgG2, IgG3, or IgG4 subclass. In another case, the anti-CCR2 antibody is an IgG4. In still another case, the antibody is an IgG4 isoallotype (Ellison J. and Hood L., *PNAS* 79:1984-1988 (1982); & Brusco A. *et al.*, *Eur J. Immunogenetics* 25:349-355 (1998)).

#### Binding Affinity of Anti-CCR2 Antibodies to CCR2

[0087] In some cases, the anti-CCR2 antibodies bind to CCR2 with high affinity.

[0088] In some cases, the anti-CCR2 antibodies bind with high affinity to the first extracellular loop of CCR2, to the second extracellular loop of CCR2, or to an epitope formed by both the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> extracellular loops.

[0089] In a related case, the anti-CCR2 antibodies bind to a polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:128 or in SEQ ID NO:129.

[0090] In some cases, the anti-CCR2 antibodies do not bind to the third extracellular loop of CCR2 or to the N-terminal domain of CCR2.

[0091] In another case, the anti-CCR2 antibodies do not bind to a peptide consisting of the sequence set forth in SEQ ID NO:127 or in SEQ ID NO:130. In another case, the anti-CCR2 antibody binds to the first and/or second extracellular loops of CCR2, with a  $K_D$  of about  $2 \times 10^{-7}$  M or less, with a  $K_D$  of about  $2 \times 10^{-8}$  M or less, with a  $K_D$  of about  $2 \times 10^{-9}$  M or less, with a  $K_D$  of about  $1 \times 10^{-9}$  M or less, with a  $K_D$  of about  $9 \times 10^{-10}$  M or less, with a  $K_D$  of about  $8 \times 10^{-10}$  M or less, with a  $K_D$  of about  $7 \times 10^{-10}$  M or less, with a  $K_D$  of about  $6 \times 10^{-10}$  M or less, with a  $K_D$  of about  $5 \times 10^{-10}$  M or less, with a  $K_D$  of about  $4 \times 10^{-10}$  M or less, with a  $K_D$  of about  $3 \times 10^{-10}$  M or less, or with a  $K_D$  of about  $2 \times 10^{-10}$  M or less. In certain cases, the antibody binds to CCR2, or to the first and/or second extracellular loops of CCR2, with substantially the same  $K_D$  as an antibody selected from 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 or 4.40 A68G S230P. In still another case, the antibody binds to CCR2, or to the

48

first and/or second extracellular loops of CCR2, with substantially the same  $K_D$  as an antibody that comprises a heavy chain variable domain having the amino acid sequence of the  $V_H$  region found in SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:176 or SEQ ID NO:47. In still another case, the antibody binds to CCR2 with

5 substantially the same  $K_D$  as an antibody that comprises the CDRs of a light chain variable domain having the amino acid sequence of the  $V_L$  region found in SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:194 or SEQ ID NO:65, or that comprises the CDRs of a heavy chain variable domain having the amino acid sequence the  $V_H$  region found in SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:11, SEQ  
10 ID NO:176 or SEQ ID NO:47.

**[0092]** In some cases, the anti-CCR2 antibody may have a low dissociation rate constant ( $k_{off}$ ). In some cases, the anti-CCR2 antibody may bind to CCR2, or more preferably to the first and/or second extracellular loops of CCR2, with a  $k_{off}$  of  $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  or lower, a  $k_{off}$  of  $5.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  or lower or a  $k_{off}$  of  $2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  or  
15 lower. In some cases, the  $k_{off}$  may be substantially the same as an antibody described herein, including an antibody selected from 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 and 4.40 A68G S230P. In some cases, the antibody may bind to CCR2, or to the first and/or second extracellular loops of CCR2, with substantially the same  $k_{off}$  as an antibody that comprises the CDRs of a heavy chain, or the CDRs of a light chain,  
20 from an antibody selected from 4.40, 4.9 and 4.40 A68G S230P. In some cases, the antibody may bind to CCR2, or to the first and/or second extracellular loops of CCR2, with substantially the same  $k_{off}$  as an antibody that comprises (i) a heavy chain variable domain having the amino acid sequence of the  $V_H$  region found in SEQ ID NO:83, or SEQ ID NO:11, (ii) a light chain variable domain having the  
25 amino acid sequence of the  $V_L$  region found in SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:29, or (iii) both (i) and (ii). In still another case, the antibody may bind to CCR2, or to the first and/or second extracellular loops of CCR2, with substantially the same  $k_{off}$  as an antibody that comprises the CDRs of a light chain variable domain having the amino acid sequence of the  $V_L$  region found in SEQ ID  
30 NO:101, SEQ ID NO:113, or SEQ ID NO:29; and the CDRs of a heavy chain variable domain having the amino acid sequence of the  $V_H$  region found in SEQ ID NO:83 or SEQ ID NO:11.



**[0093]** The binding affinity and dissociation rate of an anti-CCR2 antibody to CCR2 can be determined by methods known in the art. The binding affinity can be measured by ELISAs, RIAs, flow cytometry, surface plasmon resonance, such as BIACORE™. The dissociation rate can be measured by surface plasmon resonance. One can determine whether an antibody has substantially the same  $K_D$  as an anti-CCR2 antibody by using methods known in the art. Example 5 exemplifies a method for determining affinity constants of anti-CCR2 monoclonal antibodies.

Identification of CCR2 Epitopes Recognized by Anti-CCR2 Antibodies

**[0094]** Provided are human anti-CCR2 monoclonal antibodies that binds to CCR2 and may compete or cross-compete with and/or binds the same epitope as: (a) an antibody selected from 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 and 4.40 A68G S230P; (b) an antibody that comprises a heavy chain variable domain having an amino acid sequence of the variable domain found in SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:176 or SEQ ID NO:47, (c) an antibody that comprises a light chain variable domain having an amino acid sequence of the variable domain found in SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:194, or SEQ ID NO:65, or (d) an antibody that comprises both a heavy chain variable domain as defined in (b) and a light chain variable domain as defined in (c). If two antibodies reciprocally compete with each other for binding to CCR2, they are said to cross-compete.

**[0095]** One can determine whether an antibody binds to the same epitope, competes or cross-competes for binding with an anti-CCR2 antibody provided herein by using methods known in the art. In one case, one allows the anti-CCR2 antibody provided herein to bind to CCR2 under saturating conditions and then measures the ability of the test antibody to bind to CCR2. If the test antibody is able to bind to CCR2 at the same time as the provided anti-CCR2 antibody, then the test antibody binds to a different epitope as the anti-CCR2 antibody. However, if the test antibody is not able to bind to CCR2 at the same time, then the test antibody binds to the same epitope, an overlapping epitope, or an epitope that is in close proximity to the epitope bound by the human anti-CCR2 antibody provided herein. To determine if a test antibody cross-competes with a reference

50

antibody, the experiment is conducted reversing the antibodies, i.e., one allows the test antibody to bind to CCR2 and then measures the ability of the anti-CCR2 antibody provided herein to bind CCR2. These experiments can be performed using ELISA, RIA, BIACORE™, or flow cytometry (FACS).

5 Inhibition of CCR2 Activity by Anti-CCR2 Antibody

[0096] In some cases, provided are anti-CCR2 antibodies that inhibit CCR2-mediated signaling. In other cases, provided are anti-CCR2 antibodies that inhibit MCP-1, MCP-2, MCP-3, and/or MCP-4 mediated signaling through CCR2. In other cases, provided are anti-CCR2 antibodies that inhibit the binding of MCP-1  
10 MCP-2, MCP-3 and/or MCP-4 to CCR2. In one case, the CCR2 is human CCR2. In some cases, the CCR2 is human CCR2A, CCR2B or both. In still another case, the anti-CCR2 antibody is a human antibody.

[0097] The IC<sub>50</sub> of an anti-CCR2 antibody can be measured in ligand binding assays such as ELISA, RIA, or related assays and cell-based assays such as  
15 chemotaxis assays of cells expressing CCR2. In various cases, the antibody or an antigen-binding portion thereof inhibits ligand binding between MCP-1 and CCR2 with an IC<sub>50</sub> of no more than 5 µg/ml, no more than 1 µg/ml, no more than 0.5 µg/ml, or no more than 0.20 µg/ml as measured by an ELISA assay.

[0098] In another case, an anti-CCR2 antibody that reduces activation of CCR2 in  
20 the presence of CCR2 ligands such as MCP-1 (CCL2), MCP-2, MCP-3, and/or MCP-4 is provided. In one case, the anti-CCR2 antibody may inhibit CCR2 ligand induced (i) G-protein activation, (ii) adenylate cyclase activation, (iii) mitogen-activated protein kinases (MAPKs) activation, (iv) cytosolic calcium mobilization, (v) ERK phosphorylation, (vi) chemotaxis, or (vii) actin polymerization. One can  
25 determine whether an anti-CCR2 antibody can prevent, inhibit or reduce activation of CCR2 in the presence of MCP-1 by determining the GTP/GDP ratio of G-proteins in cells labeled with radiolabeled GTP, by measuring GTPγS incorporation, by measuring cytosolic calcium influx using calcium chromophores, or by measuring the phosphorylation state of MAPKs in a cell. Assays for  
30 detecting CCR2 activation and/or MCP-1 binding to CCR2 are described, for example, in Gabrilin *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.* 327(2):533-40 (2005), and Jimenez-Sainz *et al.*, *Mol Pharmacol.* 64(3):773-82 (2003).

51

**[0099]** In one case, one would determine the levels of CCR2 activation using a chemotaxis assay. In some cases, the IC<sub>50</sub>, measured using a chemotaxis assay, is no more than 5 µg/ml, no more than 1 µg/ml, no more than 0.5 µg/ml, or no more than 0.20 µg/ml. Example 10 exemplifies one type of assay that measures inhibition of CCR2 by an anti-CCR2 antibody by monitoring calcium mobilization.

**[00100]** In another aspect, contacting a cell with the antibody may result in a down regulation of cell surface CCR2 expression after incubation with the antibody. In some cases, the incubation can be a short time period (e.g., 4 hours) or a longer time period (e.g., 24 hours). A down regulation of cell surface CCR2 expression can be measured using Western blotting, ELISA, or FACS analysis. In particular cases, contacting a cell with the antibody may result in at least a 6% decrease, at least a 10% decrease, at least a 20% decrease, at least a 30% decrease, or at least a 50% decrease of cell surface CCR2 expression as measured by Western blotting or ELISA.

**[00101]** In another aspect, the antibody reduces MCP-1 induced pERK phosphorylation. A down regulation of MCP-1 induced pERK phosphorylation can be measured using Western blotting, ELISA, or FACS analysis. In particular cases, the antibody produces at least a 6% decrease, at least a 10% decrease, at least a 20% decrease, at least a 30% decrease, or at least a 50% decrease of MCP-1 induced pERK phosphorylation as measured by FACS analysis.

#### Inhibition of Chemotaxis *In Vivo* with Anti-CCR2 Antibodies

**[00102]** According to some cases, provided are anti-CCR2 antibodies that inhibit the chemotaxis of immune cells *in vivo*. Immune cells whose chemotaxis is inhibited include peripheral blood mononuclear cells, THP cells, monocytes, memory T lymphocytes, dendritic cells, basophils, natural killer cells and adoptively transferred CCR2+ cells. In one case, the anti-CCR2 antibody inhibits immune cell chemotaxis in response to one or more of MCP-1, MCP-2, MCP-3 and MCP-4. In one case, the chemokine is MCP-1. In still another case, the chemokine is MCP-3. The anti-CCR2 antibody may inhibit chemotaxis to sites of inflammation or injury.

**[00103]** According to some cases, also provided are anti-CCR2 antibodies that inhibit the chemotaxis of non-immune cells, including but not limited to, fibroblast-

52

like synoviocytes (FLS) (see Garcia-Vicuna *et al.*, *Arthritis Rheum.* 50(12):3866-77 (2004)), adult neural stem cells (see Widera *et al.*, *Eur J Cell Biol.* 83(8):381-7 (2004)) and human fetal astrocytes (see Andjelkovic *et al.*, *J Neurosci Res.* 70(2):219-31 (2002)).

- 5 [00104] In one case, the antibody inhibits cell chemotaxis as compared to the chemotaxis of cells in an untreated animal. In another case, the anti-CCR2 antibody reduces chemotaxis by at least 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% or 100%. In one case, the inhibition of chemotaxis is measured at least 1 hour after the animals have started treatment
- 10 with the antibody. In another case, the inhibition of chemotaxis is measured at least 7 days after the animals have started treatment with the antibody. In another case, the anti-CCR2 antibody results in chemotaxis inhibition of at least 10% to 100%.

#### Species and Molecular Selectivity

- 15 [00105] In another aspect, the anti-CCR2 antibodies demonstrate both species and molecular selectivity. In some cases, the anti-CCR2 antibody binds to human and cynomolgus CCR2. The anti-CCR2 antibody may bind to additional CCR2 of non-human primate species. In some cases, the anti-CCR2 antibody does not bind to mouse or rat CCR2. Following the teachings of the specification, one may
- 20 determine the species selectivity for the anti-CCR2 antibody using methods well known in the art. For instance, one may determine the species selectivity using Western blot, flow cytometry, ELISA, immunoprecipitation or RIA. In one case, one may determine the species selectivity using flow cytometry. In another case, one may determine species specificity by assessing the ability of the antibody to
- 25 inhibit MCP-1 functional responses using cells from that species. This may include chemotaxis, actin polymerization, calcium mobilization, etc.

- [00106] In another case, the anti-CCR2 antibody has a selectivity for the polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:126 (human CCR2B) over the polypeptide consisting of the amino acid sequence set
- 30 forth in SEQ ID NO:131 (human CCR5). In another case, the anti-CCR2 antibody has selectivity for CCR2 over CCR5 of at least 2-fold, at least 5 fold, at least 10 fold, at least 25 fold, at least 50 fold, or at least 100 fold. In another case, the

human anti-CCR2 antibodies bind to a polypeptide comprising an amino acid sequence 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, or 99% identical to SEQ ID NO:126.

**[00107]** In another case, the anti-CCR2 antibody may have a selectivity for the polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:125

5 (human CCR2A) over the polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:131 (human CCR5) of at least 2-fold, at least 5 fold, at least 10 fold, at least 25 fold, at least 50 fold, or at least 100-fold. In another case, the human anti-CCR2 antibodies bind to a polypeptide comprising an amino acid sequence 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, or 99% identical to SEQ ID NO:125.

10 **[00108]** One can determine the selectivity of the anti-CCR2 antibody for CCR2 using methods well known in the art following the teachings of the specification. For instance one can determine the selectivity using Western blot, flow cytometry, ELISA, immunoprecipitation or RIA, and/or functional assays such as chemotaxis, calcium mobilization, or actin polymerization.

15 Methods of Producing Antibodies and Antibody Producing Cell Lines

*Immunization*

**[00109]** In some cases, human antibodies are produced by immunizing a non-human, transgenic animal comprising within its genome some or all of human immunoglobulin heavy chain and light chain loci with a CCR2 antigen. In one  
20 case, the non-human animal is a XENOMOUSE™ animal. (Amgen Fremont, Inc. (formerly Abgenix, Inc.), Fremont, CA).

**[00110]** XENOMOUSE™ mice are engineered mouse strains that comprise large fragments of human immunoglobulin heavy chain and light chain loci and are deficient in mouse antibody production. See, e.g., Green *et al.*, *Nature Genetics*  
25 7:13-21 (1994) and U.S. Patents 5,916,771, 5,939,598, 5,985,615, 5,998,209, 6,075,181, 6,091,001, 6,114,598, 6,130,364, 6,162,963 and 6,150,584. See also WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 96/33735, WO 98/16654, WO 98/24893, WO 98/50433, WO 99/45031, WO 99/53049, WO 00/09560, and WO 00/037504.

30 **[00111]** In another aspect, provided is a method for making anti-CCR2 antibodies from non-human, non-mouse animals by immunizing non-human transgenic

54

animals that comprise human immunoglobulin loci with a CCR2 antigen. One can produce such animals using the methods described in the above-cited documents. The methods disclosed in these documents can be modified as described in U.S. Patent 5,994,619, which is hereby incorporated by reference.

5 U.S. Patent 5,994,619 describes methods for producing novel cultured inner cell mass (CICM) cells and cell lines, derived from pigs and cows, and transgenic CICM cells into which heterologous DNA has been inserted. CICM transgenic cells can be used to produce cloned transgenic embryos, fetuses, and offspring. The '619 patent also describes methods of producing transgenic animals that are  
10 capable of transmitting the heterologous DNA to their progeny. In preferred cases the non-human animals are mammals, particularly rats, sheep, pigs, goats, cattle or horses.

**[00112]** XENOMOUSE™ mice produce an adult-like human repertoire of fully human antibodies and generate antigen-specific human antibodies. In some  
15 cases, the XENOMOUSE™ mice contain approximately 80% of the human antibody V gene repertoire through introduction of germline configuration fragments of the human heavy chain loci and kappa light chain loci. In other cases, XENOMOUSE™ mice further contain approximately all of the human lambda light chain locus. See Mendez *et al.*, *Nature Genetics* 15:146-156 (1997),  
20 Green and Jakobovits, *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998), and WO 98/24893, the disclosures of which are hereby incorporated by reference.

**[00113]** In another case, the antibodies are generated using VELOCIMOUSE™ technology (Regeneron Pharmaceuticals, Tarrytown, NY.) for immediate generation of genetically altered mice directly from modified embryonic stem (ES)  
25 cells (Poueymirou W.T., et al., *Nature Biotechnology* 25:91-99 (2007)).

**[00114]** In some cases, the non-human animal comprising human immunoglobulin genes are animals that have a human immunoglobulin "minilocus." In the minilocus approach, an exogenous Ig locus is mimicked through the inclusion of individual genes from the Ig locus. Thus, one or more V<sub>H</sub>  
30 genes, one or more D<sub>H</sub> genes, one or more J<sub>H</sub> genes, a mu constant domain, and a second constant domain (preferably a gamma constant domain) are formed into a construct for insertion into an animal. This approach is described, *inter alia*, in U.S. Patent Nos. 5,545,807, 5,545,806, 5,569,825, 5,625,126, 5,633,425,

55

5,661,016, 5,770,429, 5,789,650, 5,814,318, 5,591,669, 5,612,205, 5,721,367, 5,789,215, and 5,643,763, hereby incorporated by reference.

**[00115]** In another aspect, a method for making humanized anti-CCR2 antibodies is provided. In some cases, non-human animals are immunized with a CCR2 antigen as described herein under conditions that permit antibody production. Antibody-producing cells are isolated from the animals, and nucleic acids encoding the heavy and light chains of an anti-CCR2 antibody of interest are isolated. These nucleic acids are subsequently engineered using techniques known to those of skill in the art and as described further below to reduce the amount of non-human sequence, *i.e.*, to humanize the antibody to reduce the immune response in humans

**[00116]** In some cases, the CCR2 antigen is isolated and/or purified CCR2. In one case, the CCR2 antigen is human CCR2. In some cases, the CCR2 antigen is a fragment of CCR2. In some cases, the CCR2 fragment is an extracellular loop, the N-terminal domain or the C-terminal end of CCR2. In certain cases, the CCR2 fragment comprises the first or second extracellular loop of CCR2. In other cases, the CCR2 fragment comprises the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:128 or SEQ ID NO:129.

**[00117]** In other cases, the CCR2 fragment does not comprise the third extracellular loop or the N-terminal domain of CCR2.

**[00118]** In other cases, the CCR2 fragment does not comprise the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:127 or SEQ ID NO:130. In some cases, the CCR2 fragment comprises at least one epitope of CCR2. In other cases, the CCR2 antigen is a cell that expresses or over expresses CCR2 or an immunogenic fragment thereof on its surface. In some cases, the CCR2 antigen is a CCR2 fusion protein. In some cases, the CCR2 is a synthetic peptide immunogen.

**[00119]** Immunization of animals can be by any method known in the art. See, *e.g.*, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Methods for immunizing non-human animals such as mice, rats, sheep, goats, pigs, cattle and horses are well known in the art. See, *e.g.*, Harlow and Lane, *supra*, and U.S. Patent 5,994,619. In one case, the CCR2 antigen is administered with an adjuvant to stimulate the immune response.

56

Exemplary adjuvants include complete or incomplete Freund's adjuvant, RIBI (muramyl dipeptides) or ISCOM (immunostimulating complexes). Such adjuvants may protect the polypeptide from rapid dispersal by sequestering it in a local deposit, or they may contain substances that stimulate the host to secrete factors that are chemotactic for macrophages and other components of the immune system. If a polypeptide is being administered, the immunization schedule will involve two or more administrations of the polypeptide, spread out over several weeks. Example 1 exemplifies a method for producing anti-CCR2 monoclonal antibodies in XENOMOUSE™ mice.

10 *Production of Antibodies and Antibody-Producing Cell Lines*

[00120] After immunization of an animal with a CCR2 antigen, antibodies and/or antibody-producing cells can be obtained from the animal. In some cases, anti-CCR2 antibody-containing serum is obtained from the animal by bleeding or sacrificing the animal. The serum may be used as it is obtained from the animal, an immunoglobulin fraction may be obtained from the serum, or the anti-CCR2 antibodies may be purified from the serum.

[00121] In some cases, antibody-producing immortalized cell lines are prepared from cells isolated from the immunized animal. After immunization, the animal is sacrificed and peripheral blood, lymph node and/or splenic B cells are immortalized by any means known in the art. Methods of immortalizing cells include, but are not limited to, transfecting them with oncogenes, infecting them with an oncogenic virus and cultivating them under conditions that select for immortalized cells, subjecting them to carcinogenic or mutating compounds, fusing them with an immortalized cell, e.g., a myeloma cell, and inactivating a tumor suppressor gene. See, e.g., Harlow and Lane, supra. If fusion with myeloma cells is used, the myeloma cells preferably do not secrete immunoglobulin polypeptides (a non-secretory cell line). Immortalized cells are screened using CCR2, a portion thereof, or a cell expressing CCR2. In one case, the CCR2 portion (i) comprises the first and/or second extracellular loops of CCR2; (ii) comprises the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:128 and/or SEQ ID NO:129; (iii) does not comprise the third extracellular loop and/or the N-terminal domain of CCR2; (iv) does not comprise the amino acid sequence set



57

forth in SEQ ID NO:127 and/or SEQ ID NO:130; or (v) combinations thereof. In one case, the initial screening is performed using an enzyme-linked immunoassay (ELISA) or a radioimmunoassay. An example of ELISA screening is provided in WO 00/37504, incorporated herein by reference.

5 **[00122]** Anti-CCR2 antibody-producing cells, e.g., hybridomas, are selected, cloned and further screened for desirable characteristics, including robust growth, high antibody production and desirable antibody characteristics, as discussed further below. Hybridomas can be expanded *in vivo* in syngeneic animals, in animals that lack an immune system, e.g., nude mice, or in cell culture *in vitro*.

10 Methods of selecting, cloning and expanding hybridomas are well known to those of ordinary skill in the art.

**[00123]** In one aspect, the immunized animal is a non-human animal that expresses human immunoglobulin genes and the splenic B cells are fused to a myeloma cell line from the same species as the non-human animal. In an  
15 exemplary case, the immunized animal is a XENOMOUSE™ mouse and the myeloma cell line is a non-secretory mouse myeloma. In one case, the myeloma cell line is P3-X63-Ag8.653 (American Type Culture Collection). See, e.g., Example 1.

**[00124]** Screening the immortalized antibody-producing cells to identify an  
20 antibody directed to the first and/or second extracellular loop of CCR2 may be achieved by testing if the antibodies produced by the cell bind to a peptide comprising the amino acid sequence of the first or second extracellular loop of CCR2. Alternatively or in combination, antibodies produced by the cell may be tested for binding to chimeric chemokine receptors which have primarily the  
25 sequence of another chemokine receptor but sequences of the first and/or second extracellular loops of CCR2. See Example 8, which exemplifies the use of chimeras to map the epitope of anti-CCR2 antibodies. In a complementary case, antibodies produced by the cell which are known to bind to CCR2 may be tested for binding to chimeric chemokine receptors which have primarily the sequence of  
30 CCR2 but which lack the wild type first and/or second extracellular loops of CCR2, e.g., have the first and/or second extracellular loops from another cytokine receptor or contain mutations in one or both of these extracellular loops.

SA

**[00125]** In another aspect, provided are cells and cell lines (including hybridomas) that produce a human anti-CCR2 antibody. In one case, the human anti-CCR2 antibody produced by the cell, cell line or hybridoma is an antagonist of CCR2. In still another case, the human anti-CCR2 antibody (i) binds to the first and/or  
 5 second extracellular loops of CCR2; (ii) binds to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:128 and/or SEQ ID NO:129; (iii) does not bind to the third extracellular loop and/or the N-terminal domain of CCR2; (iv) does not bind to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:127 and/or SEQ ID NO:130; or (v) combinations thereof. In another case, the human anti-CCR2 antibody produced  
 10 by the cell, cell line or hybridoma does not bind to the third extracellular loop with high affinity, does not bind to the N-terminal domain of CCR2 with high affinity, or does not bind to either with high affinity.

**[00126]** In still another aspect, a transgenic animal is immunized with CCR2, primary cells, e.g., spleen or peripheral blood cells, are isolated from an  
 15 immunized transgenic animal and individual cells producing antibodies specific for the desired antigen are identified. For example, polyadenylated mRNA from each individual cell is isolated and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) is performed using sense primers that anneal to variable region sequences, e.g., degenerate primers that recognize most or all of the FR1 regions of human  
 20 heavy and light chain variable region genes and anti-sense primers that anneal to constant or joining (J) region sequences. cDNAs of the heavy and light chain variable domains are then cloned and expressed in any suitable host cell, e.g., a myeloma cell, as chimeric antibodies with respective immunoglobulin constant regions, such as the heavy chain and  $\kappa$  or  $\lambda$  constant domains. See Babcook,  
 25 J.S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7843-48 (1996), incorporated herein by reference. Anti-CCR2 antibodies may then be identified and isolated as described herein.

**[00127]** In another aspect, phage display techniques can be used to provide libraries containing a repertoire of antibodies with varying affinities for CCR2.

30 Primary B cells can be used directly as a source of DNA. The mixture of cDNAs obtained from B cell, e.g., derived from spleens, is used to prepare an expression library, for example, a phage display library transfected into *E.coli*. The resulting cells are tested for immunoreactivity to CCR2. Techniques for the identification of

59

high affinity human antibodies from such libraries are described by Griffiths *et al.*, *EMBO J.* 13:3245-3260 (1994); Nissim *et al.*, *ibid*, pp. 692-698 and by Griffiths *et al.*, *ibid*, 12:725-734, which are incorporated by reference. Ultimately, clones from the library are identified that produce binding affinities of a desired magnitude for the antigen and the DNA encoding the product responsible for such binding is recovered and manipulated for standard recombinant expression. Phage display libraries may also be constructed using previously manipulated nucleotide sequences and screened in a similar fashion. In general, the cDNAs encoding heavy and light chains are independently supplied or linked to form Fv analogs for production in the phage library.

**[00128]** The phage library is then screened for the antibodies with the highest affinities for CCR2 and the genetic material recovered from the appropriate clone. Further rounds of screening can increase affinity of the original antibody isolated.

#### Nucleic Acids, Vectors, Host Cells, and Recombinant Methods of Making Antibodies

##### *Nucleic Acids*

**[00129]** Also encompassed are nucleic acid molecules encoding anti-CCR2 antibodies or antigen-binding portions thereof. In some cases, different nucleic acid molecules encode the heavy chain and the light chain of an anti-CCR2 immunoglobulin. In other cases, the same nucleic acid molecule encodes a heavy chain and a light chain of an anti-CCR2 immunoglobulin. In one case, the nucleic acid encodes a CCR2 antibody, or antigen-binding portion thereof.

**[00130]** In some cases, the nucleic acid molecule encoding the variable domain of the light chain ( $V_L$ ) comprises a human  $V_k1$ ,  $V_k2$ ,  $V_k3$ ,  $V_k4$ ,  $V_k5$  or  $V_k6$  gene family segment, and a  $J_k1$ ,  $J_k2$ ,  $J_k4$ , or  $J_k5$  gene segment with or without mutations from the germline.

**[00131]** In some cases, the nucleic acid molecule encoding the light chain, encodes an amino acid sequence comprising 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10 substitutions from the germline amino acid sequence(s). In some cases, the nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence that encodes a  $V_L$  amino acid sequence comprising 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10 conservative amino acid substitutions and/or 1, 2, or 3 non-conservative substitutions compared to

germline  $V_K$ , and  $J_K$  sequences. Substitutions may be in the CDRs, the framework regions, or in the constant domain.

**[00132]** In some cases, the nucleic acid molecule encodes a  $V_L$  amino acid sequence comprising one or more variants compared to germline sequence that are identical to the variations found in the  $V_L$  of one of the antibodies 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 or 4.40 A68G S230P. In some cases, the nucleic acid encodes a  $V_L$  amino acid sequence comprising a mutation in one or more of the same positions as mutations from germline in a CCR2 antibody provided herein but that comprises a different substitution, in some cases a conservative substitution, compared to the substitution in the provided antibody.

**[00133]** In some cases, the nucleic acid molecule encodes at least three amino acid substitutions compared to the germline sequence found in the  $V_L$  of one of the antibodies 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 or 4.40 A68G S230P.

**[00134]** In some cases, the nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence that encodes the  $V_L$  amino acid sequence of monoclonal antibody 4.40 (SEQ ID NO:101), 4.9 (SEQ ID NO:29), 4.22 (SEQ ID NO:65), 4.39 (SEQ ID NO:194) or 4.40 A68G S230P (SEQ ID NO:113), or a variant or portion thereof. In some cases, the nucleic acid encodes an amino acid sequence comprising the light chain CDRs of one of said above-listed antibodies. In some cases, said portion is a contiguous portion comprising CDR1-CDR3.

**[00135]** In some cases, the nucleic acid molecule encodes a  $V_L$  amino acid sequence that is at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% or 99% identical to a  $V_L$  amino acid sequence of any one of a  $V_L$  region of antibodies 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 or 4.40 A68G S230P, or an amino acid sequence of a  $V_L$  region of any one of SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:194 or SEQ ID NO:65. Nucleic acid molecules include nucleic acids encoding the  $V_L$  region found in SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:29 or SEQ ID NO:65.

**[00136]** In another case, the nucleic acid encodes a full-length light chain of an antibody selected from 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 or 4.40 A68G S230P, or a light chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:193 or SEQ ID NO:28, or said light chain sequence comprising a mutation, such as one disclosed herein.

**[00137]** In still another case, the nucleic acid molecule encodes the variable domain of the heavy chain ( $V_H$ ) that comprises a human 3-30 or 1-46  $V_H$  gene sequence or a sequence derived there from. In various cases, the nucleic acid molecule utilizes a human 3-30  $V_H$  gene sequence, a human D1-7 gene sequence and a human  $J_H3B$  gene sequence; a human 1-46  $V_H$  gene sequence, a human D1-7 gene sequence and a human  $J_H3B$  gene sequence; or sequence derived from the human genes.

**[00138]** In some cases, the nucleic acid molecule encodes an amino acid sequence comprising 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 or 18 mutations compared to the germline amino acid sequence of the human V, D or J genes. In some cases, said mutations are in the  $V_H$  region. In some cases, said mutations are in the CDRs.

**[00139]** In some cases, the nucleic acid molecule encodes an amino acid sequence comprising one or more amino acid mutations compared to the germline sequence that are identical to amino acid mutations found in the  $V_H$  of monoclonal antibody 4.40, 4.22, 4.39 or 4.9. In some cases, the nucleic acid encodes at least three amino acid mutations compared to the germline sequences that are identical to at least three amino acid mutations found in one of the above-listed monoclonal antibodies.

**[00140]** In some cases, the nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence that encodes at least a portion of the  $V_H$  amino acid sequence of a monoclonal antibody selected from 4.40 (SEQ ID NO:83), 4.22 (SEQ ID NO:47), 4.39 (SEQ ID NO:176) or 4.9 (SEQ ID NO:11), a variant thereof, or said sequence having conservative amino acid mutations and/or a total of three or fewer non-conservative amino acid substitutions. In various cases the sequence encodes one or more CDRs, a CDR3 region, all three CDRs, a contiguous portion including CDR1-CDR3, or the entire  $V_H$  region, with or without a signal sequence.

**[00141]** In some cases, the nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence that encodes the amino acid sequence of one of SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:175 or SEQ ID NO:116, or said sequence having a signal sequence. In some preferred cases, the nucleic acid molecule comprises at least a portion of the nucleotide sequence of SEQ ID NO:73 or SEQ ID NO:115, or said sequence having a signal sequence. In some cases, said

62

portion encodes the V<sub>H</sub> region (with or without a signal sequence), a CDR3 region, all three CDRs, or a contiguous region including CDR1-CDR3.

**[00142]** In some cases, the nucleic acid molecule encodes a V<sub>H</sub> amino acid sequence that is at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% or 99% identical to the V<sub>H</sub> amino acid sequences of any one of V<sub>H</sub> region of antibodies 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 or 4.40 A68G S230P, or an amino acid sequence of a V<sub>H</sub> region of any one of SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:176 or SEQ ID NO:11. Also included are nucleic acids encoding the amino acid sequence of 4.40 (SEQ ID NO:83), 4.22 (SEQ ID NO:47), 4.39 (SEQ ID NO:176) or 4.9 (SEQ ID NO:11), or to a V<sub>H</sub> region thereof, or that has the nucleotide sequence of SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:167, SEQ ID NO:2 or that encodes a V<sub>H</sub> region thereof.

**[00143]** In another case, the nucleic acid encodes a full-length heavy chain of an antibody selected from 4.40, 4.22, 4.9, 4.39, or 4.40 A68G S230P, or a heavy chain having the amino acid sequence of SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:175 or SEQ ID NO:116, with or without a signal sequence, or a heavy chain comprising a mutation, such as one of the variants discussed herein. Further, the nucleic acid may comprise the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:166 or SEQ ID NO:115, or a nucleic acid molecule encoding a heavy chain comprising a mutation, such as one of the variants discussed herein.

**[00144]** A nucleic acid molecule encoding the heavy or light chain of an anti-CCR2 antibody or portions thereof can be isolated from any source that produces such antibody. In various cases, the nucleic acid molecules are isolated from a B cell isolated from an animal immunized with CCR2 or from an immortalized cell derived from such a B cell that expresses an anti-CCR2 antibody. Methods of isolating mRNA encoding an antibody are well-known in the art. See, e.g., Sambrook *et al.* The mRNA may be used to produce cDNA for use in the polymerase chain reaction (PCR) or cDNA cloning of antibody genes. In one case, the nucleic acid molecule is isolated from a hybridoma that has as one of its fusion partners a human immunoglobulin-producing cell from a non-human transgenic animal. In other cases, the human immunoglobulin producing cell is isolated from a XENOMOUSE™ animal. In another case, the human

immunoglobulin-producing cell is from a non-human, non-mouse transgenic animal, as described herein. In another case, the nucleic acid is isolated from a non-human, non-transgenic animal. The nucleic acid molecules isolated from a non-human, non-transgenic animal may be used, e.g., for humanized antibodies.

5 [00145] In some cases, a nucleic acid encoding a heavy chain of an anti-CCR2 antibody comprises a nucleotide sequence encoding a V<sub>H</sub> domain joined in-frame to a nucleotide sequence encoding a heavy chain constant domain from any source. Similarly, a nucleic acid molecule encoding a light chain of an anti-CCR2 antibody can comprise a nucleotide sequence encoding a V<sub>L</sub> domain joined in-  
10 frame to a nucleotide sequence encoding a light chain constant domain from any source.

[00146] In a further aspect, nucleic acid molecules encoding the variable domain of the heavy (V<sub>H</sub>) and/or light (V<sub>L</sub>) chains are "converted" to full-length antibody genes. In one case, nucleic acid molecules encoding the V<sub>H</sub> or V<sub>L</sub> domains are  
15 converted to full-length antibody genes by insertion into an expression vector already encoding heavy chain constant (C<sub>H</sub>) or light chain constant (C<sub>L</sub>) domains, respectively, such that the V<sub>H</sub> segment is operatively linked to the C<sub>H</sub> segment(s) within the vector, and/or the V<sub>L</sub> segment is operatively linked to the C<sub>L</sub> segment within the vector. In another case, nucleic acid molecules encoding the V<sub>H</sub> and/or  
20 V<sub>L</sub> domains are converted into full-length antibody genes by linking, e.g., ligating, a nucleic acid molecule encoding a V<sub>H</sub> and/or V<sub>L</sub> domains to a nucleic acid molecule encoding a C<sub>H</sub> and/or C<sub>L</sub> domain using standard molecular biological techniques. Nucleotide sequences of human heavy and light chain immunoglobulin constant domain genes are known in the art. See, e.g., Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., NIH Publ. No. 91-  
25 3242, 1991. Nucleic acid molecules encoding the full-length heavy and/or light chains may then be expressed from a cell into which they have been introduced and the anti-CCR2 antibody isolated.

[00147] The nucleic acid molecules may be used to recombinantly express anti-  
30 CCR2 antibodies. The nucleic acid molecules also may be used to produce chimeric antibodies, bispecific antibodies, single chain antibodies, immunoadhesins, diabodies, mutated antibodies and antibody derivatives, as described further below. If the nucleic acid molecules are derived from a non-

64

human, non-transgenic animal, the nucleic acid molecules may be used for antibody humanization, also as described herein.

**[00148]** In some cases, nucleic acids encoding a full-length heavy chain or a full-length light chain wherein the nucleotide sequence encoding the constant region amino acid sequence contain one or more mutations compared to a germline human constant region sequence are provided. For example, the nucleic acid may encode an amino acid substitution that improves a property of the antibody, by adding or removing a glycosylation site or encoding a substitutions that improves the stability or half-life of the antibody. The nucleic acid also may contain "silent" mutations to add or remove a restriction enzyme site, for example to facilitate cloning of the nucleic acid into a particular expression vector.

#### *Vectors*

**[00149]** Vectors are provided comprising nucleic acid molecules that encode the heavy chain and/or light chain of an anti-CCR2 antibody or an antigen-binding portions thereof. Also provided are vectors comprising nucleic acid molecules encoding fusion proteins, modified antibodies, antibody fragments, and probes thereof.

**[00150]** In some cases, the anti-CCR2 antibodies or antigen-binding portions are expressed by inserting DNAs encoding partial or full-length light and/or heavy chains, obtained as described herein, into expression vectors such that the genes are operatively linked to necessary expression control sequences such as transcriptional and translational control sequences. Expression vectors include plasmids, retroviruses, adenoviruses, adeno-associated viruses (AAV), plant viruses such as cauliflower mosaic virus, tobacco mosaic virus, cosmids, YACs, EBV derived episomes, and the like. In some instances the antibody gene is ligated into a vector such that transcriptional and translational control sequences within the vector serve their intended function of regulating the transcription and translation of the antibody gene. The expression vector and expression control sequences are chosen to be compatible with the expression host cell used. The antibody light chain gene and the antibody heavy chain gene can be inserted into separate vectors or into the same expression vector. The antibody genes are inserted into the expression vector by standard methods (e.g., ligation of



65

complementary restriction sites on the antibody gene fragment and vector, or blunt end ligation if no restriction sites are present).

**[00151]** A convenient vector is one that encodes a functionally complete human C<sub>H</sub> or C<sub>L</sub> immunoglobulin sequence, with appropriate restriction sites engineered so that any V<sub>H</sub> or V<sub>L</sub> sequence can be inserted and expressed, as described herein. In such vectors, splicing usually occurs between the splice donor site in the inserted J region and the splice acceptor site preceding the human C domain, and also at the splice regions that occur within the human C<sub>H</sub> exons.

Polyadenylation and transcription termination occur at native chromosomal sites downstream of the coding regions. The recombinant expression vector also can encode a signal peptide that facilitates secretion of the antibody chain from a host cell. The antibody chain gene may be cloned into the vector such that the signal peptide is linked in-frame to the amino terminus of the immunoglobulin chain. The signal peptide can be an immunoglobulin signal peptide or a heterologous signal peptide (*i.e.*, a signal peptide from a non-immunoglobulin protein).

**[00152]** In addition to the antibody chain genes, the recombinant expression vectors carry regulatory sequences that control the expression of the antibody chain genes in a host cell. It will be appreciated by those skilled in the art that the design of the expression vector, including the selection of regulatory sequences may depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed, the level of expression of protein desired, etc. Preferred regulatory sequences for mammalian host cell expression include viral elements that direct high levels of protein expression in mammalian cells, such as promoters and/or enhancers derived from retroviral LTRs, cytomegalovirus (CMV) (such as the CMV promoter/enhancer), Simian Virus 40 (SV40) (such as the SV40 promoter/enhancer), adenovirus, (*e.g.*, the adenovirus major late promoter (AdMLP)), polyoma and strong mammalian promoters such as native immunoglobulin and actin promoters. For further description of viral regulatory elements, and sequences thereof, see *e.g.*, U.S. Patent No. 5,168,062, U.S. Patent No. 4,510,245 and U.S. Patent No. 4,968,615. Methods for expressing antibodies in plants, including a description of promoters and vectors, as well as transformation of plants is known in the art. See, *e.g.*, United States Patent

66

6,517,529, incorporated herein by reference. Methods of expressing polypeptides in bacterial cells or fungal cells, e.g., yeast cells, are also well known in the art.

**[00153]** In addition to the antibody chain genes and regulatory sequences, the recombinant expression vectors may carry additional sequences, such as

5 sequences that regulate replication of the vector in host cells (e.g., origins of replication) and selectable marker genes. The selectable marker gene facilitates selection of host cells into which the vector has been introduced (see e.g., U.S. Patent Nos. 4,399,216, 4,634,665 and 5,179,017, incorporated herein by reference). For example, typically the selectable marker gene confers resistance  
10 to drugs, such as G418, hygromycin or methotrexate, on a host cell into which the vector has been introduced. Preferred selectable marker genes include the dihydrofolate reductase (DHFR) gene (for use in dhfr-host cells with methotrexate selection/amplification), the neo gene (for G418 selection), and the glutamate synthetase (GS) gene.

15 *Non-Hybridoma Host Cells and Methods of Recombinantly Producing Protein*

**[00154]** Nucleic acid molecules encoding anti-CCR2 antibodies and vectors comprising these nucleic acid molecules can be used for transfection of a suitable mammalian, plant, bacterial, insect or yeast host cell. Transformation can be by any known method for introducing polynucleotides into a host cell. Methods for  
20 introduction of heterologous polynucleotides into mammalian cells are well known in the art and include dextran-mediated transfection, calcium phosphate precipitation, polybrene-mediated transfection, protoplast fusion, electroporation, encapsulation of the polynucleotide(s) in liposomes, and direct microinjection of the DNA into nuclei. In addition, nucleic acid molecules may be introduced into  
25 mammalian cells by viral vectors. Methods of transforming cells are well known in the art. See, e.g., U.S. Patent Nos. 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461, and 4,959,455, incorporated herein by reference). Methods of transforming plant cells are well known in the art, including, e.g., Agrobacterium-mediated transformation, biolistic transformation, direct injection, electroporation and viral transformation.

30 Methods of transforming bacterial, insect cells, and yeast cells are also well known in the art.

GJ

[00155] Mammalian cell lines available as hosts for expression are well known in the art and include many immortalized cell lines available from the American Type Culture Collection (ATCC). These include, *inter alia*, Chinese hamster ovary (CHO) cells, NS0 cells, NSO cells, SP2 cells, HEK-293T cells, NIH-3T3 cells, HeLa cells, baby hamster kidney (BHK) cells, African green monkey kidney cells (COS), human hepatocellular carcinoma cells (e.g., Hep G2), A549 cells, and a number of other cell lines. Cell lines of particular preference are selected through determining which cell lines have high expression levels. Other cell lines that may be used are insect cell lines, such as Sf9 or Sf21 cells. When recombinant expression vectors encoding antibody genes are introduced into mammalian host cells, the antibodies are produced by culturing the host cells for a period of time sufficient to allow for expression of the antibody in the host cells or secretion of the antibody into the culture medium in which the host cells are grown. Antibodies can be recovered from the culture medium using standard protein purification methods. Plant host cells include, e.g., *Nicotiana*, *Arabidopsis*, duckweed, corn, wheat, potato, etc. Bacterial host cells include *E. coli* and *Streptomyces* species. Yeast host cells include *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*.

[00156] Further, expression of antibodies from production cell lines can be enhanced using a number of known techniques. For example, the glutamine synthetase gene expression system (the GS system) is a common approach for enhancing expression under certain conditions. The GS system is discussed in whole or part in connection with European Patent Nos. 216 846, 256 055, 323 997 and 338 841.

[00157] It is likely that antibodies expressed by different cell lines or in transgenic animals will have different glycosylation from each other. However, all antibodies encoded by the nucleic acid molecules provided herein, or comprising the amino acid sequences provided herein are part of the instant disclosure, regardless of the glycosylation of the antibodies.

### *Transgenic Animals and Plants*

[00158] Anti-CCR2 antibodies also can be produced transgenically through the generation of a mammal or plant that is transgenic for the immunoglobulin heavy

and light chain sequences of interest and production of the antibody in a recoverable form there from. In connection with the transgenic production in mammals, anti-CCR2 antibodies can be produced in, and recovered from, the milk of goats, cows, or other mammals. See, e.g., U.S. Patent Nos. 5,827,690, 5,756,687, 5,750,172, and 5,741,957, incorporated herein by reference. In some cases, non-human transgenic animals that comprise human immunoglobulin loci are immunized with CCR2 or an immunogenic portion thereof, as described herein. Methods for making antibodies in plants are described, e.g., in U.S. patents 6,046,037 and 5,959,177, incorporated herein by reference.

[00159] In some cases, non-human transgenic animals or plants are produced by introducing one or more nucleic acid molecules encoding an anti-CCR2 antibody into the animal or plant by standard transgenic techniques. See Hogan and United States Patent 6,417,429, *supra*. The transgenic cells used for making the transgenic animal can be embryonic stem cells or somatic cells or a fertilized egg.

The transgenic non-human organisms can be chimeric, nonchimeric heterozygotes, and nonchimeric homozygotes. See, e.g., Hogan *et al.*, Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual second ed., Cold Spring Harbor Press (1999); Jackson *et al.*, Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach, Oxford University Press (2000); and Pinkert, Transgenic

Animal Technology: A Laboratory Handbook, Academic Press (1999), all incorporated herein by reference. In some cases, the transgenic non-human animals have a targeted disruption and replacement by a targeting construct that encodes a heavy chain and/or a light chain of interest. In one case, the transgenic animals comprise and express nucleic acid molecules encoding heavy and light chains that specifically bind to CCR2, and preferably (i) bind to the first and/or second extracellular loops of CCR2; (ii) which do not bind to the N-terminal end or the third extracellular loop of CCR2 or both; or (iii) both. In one case, the transgenic animals comprise and express nucleic acid molecules encoding heavy and light chains that specifically bind to human CCR2. In some cases, the transgenic animals comprise nucleic acid molecules encoding a modified antibody such as a single-chain antibody, a chimeric antibody or a humanized antibody. The anti-CCR2 antibodies may be made in any transgenic animal. In one case, the non-human animals are mice, rats, sheep, pigs, goats, cattle or horses. The

non-human transgenic animal expresses said encoded polypeptides in blood, milk, urine, saliva, tears, mucus and other bodily fluids.

#### *Phage Display Libraries*

**[00160]** A method is provided for producing an anti-CCR2 antibody or antigen-binding portion thereof comprising the steps of synthesizing a library of human antibodies on phage, screening the library with CCR2 or a portion thereof, isolating phage that bind CCR2, and obtaining the antibody from the phage. By way of example, one method for preparing the library of antibodies for use in phage display techniques comprises the steps of immunizing a non-human animal comprising human immunoglobulin loci with CCR2 or an antigenic portion thereof to create an immune response, extracting antibody-producing cells from the immunized animal; isolating RNA encoding heavy and light chains of antibodies from the extracted cells, reverse transcribing the RNA to produce cDNA, amplifying the cDNA using primers, and inserting the cDNA into a phage display vector such that antibodies are expressed on the phage. Recombinant anti-CCR2 antibodies may be obtained in this way.

**[00161]** Recombinant anti-CCR2 human antibodies can be isolated by screening a recombinant combinatorial antibody library. The library may be a scFv phage display library, generated using human V<sub>L</sub> and V<sub>H</sub> cDNAs prepared from mRNA isolated from B cells. Methods for preparing and screening such libraries are known in the art. Kits for generating phage display libraries are commercially available (e.g., the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, catalog no. 27-9400-01; and the Stratagene SurfZAP™ phage display kit, catalog no. 240612). There also are other methods and reagents that can be used in generating and screening antibody display libraries (see, e.g., U.S. Patent No. 5,223,409; PCT Publication Nos. WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; Fuchs *et al.*, *Bio/Technology* 9:1370-1372 (1991); Hay *et al.*, *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85 (1992); Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281 (1989); McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990); Griffiths *et al.*, *EMBO J.* 12:725-734 (1993); Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992); Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991); Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580 (1992); Garrad *et al.*, *Bio/Technology*

9:1373-1377 (1991); Hoogenboom *et al.*, *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137 (1991); and Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982 (1991), all incorporated herein by reference.

**[00162]** In one case, to isolate and produce human anti-CCR2 antibodies with the  
5 desired characteristics, a human anti-CCR2 antibody as described herein is first  
used to select human heavy and light chain sequences having similar binding  
activity toward CCR2, using the epitope imprinting methods described in PCT  
Publication No. WO 93/06213, incorporated herein by reference. The antibody  
libraries used in this method may be scFv libraries prepared and screened as  
10 described in PCT Publication No. WO 92/01047, McCafferty *et al.*, *Nature*  
348:552-554 (1990); and Griffiths *et al.*, *EMBO J.* 12:725-734 (1993), all  
incorporated herein by reference. The scFv antibody libraries can be screened  
using human CCR2 as the antigen.

**[00163]** Once initial human V<sub>L</sub> and V<sub>H</sub> domains are selected, "mix and match"  
15 experiments are performed, in which different pairs of the initially selected V<sub>L</sub> and  
V<sub>H</sub> segments are screened for CCR2 binding to select preferred V<sub>L</sub>/V<sub>H</sub> pair  
combinations. Additionally, to further improve the quality of the antibody, the V<sub>L</sub>  
and V<sub>H</sub> segments of the preferred V<sub>L</sub>/V<sub>H</sub> pair(s) can be randomly mutated,  
preferably within the CDR3 region of V<sub>H</sub> and/or V<sub>L</sub>, in a process analogous to the  
20 in vivo somatic mutation process responsible for affinity maturation of antibodies  
during a natural immune response. This in vitro affinity maturation can be  
accomplished by amplifying V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> domains using PCR primers  
complimentary to the V<sub>H</sub> CDR3 or V<sub>L</sub> CDR3, respectively, which primers have  
been "spiked" with a random mixture of the four nucleotide bases at certain  
25 positions such that the resultant PCR products encode V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> segments into  
which random mutations have been introduced into the V<sub>H</sub> and/or V<sub>L</sub> CDR3  
regions. These randomly mutated V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> segments can be re-screened for  
binding to CCR2.

**[00164]** Following screening and isolation of an anti-CCR2 antibody from a  
30 recombinant immunoglobulin display library, nucleic acids encoding the selected  
antibody can be recovered from the display package (e.g., from the phage  
genome) and subcloned into other expression vectors by standard recombinant  
DNA techniques. If desired, the nucleic acid can further be manipulated to create

71

other antibody forms, as described herein. To express a recombinant human antibody isolated by screening of a combinatorial library, the DNA encoding the antibody is cloned into a recombinant expression vector and introduced into a mammalian host cells, as described herein.

## 5 *Class switching*

**[00165]** Another aspect provides a method for converting the class or subclass of an anti-CCR2 antibody to another class or subclass. In some cases, a nucleic acid molecule encoding a  $V_L$  or  $V_H$  that does not include sequences encoding  $C_L$  or  $C_H$  is isolated using methods well-known in the art. The nucleic acid molecule  
10 then is operatively linked to a nucleotide sequence encoding a  $C_L$  or  $C_H$  from a desired immunoglobulin class or subclass. This can be achieved using a vector or nucleic acid molecule that comprises a  $C_L$  or  $C_H$  chain, as described herein. For example, an anti-CCR2 antibody that was originally IgM can be class  
15 switched to an IgG. Further, the class switching may be used to convert one IgG subclass to another, e.g., from IgG1 or IgG2 to IgG4. Another method for producing an antibody comprising a desired isotype comprises the steps of isolating a nucleic acid encoding a heavy chain of an anti-CCR2 antibody and a nucleic acid encoding a light chain of an anti-CCR2 antibody, isolating the  
20 sequence encoding the  $V_H$  region, ligating the  $V_H$  sequence to a sequence encoding a heavy chain constant domain of the desired isotype, expressing the light chain gene and the heavy chain construct in a cell, and collecting the anti-CCR2 antibody with the desired isotype.

## *Deimmunized Antibodies*

**[00166]** In another aspect, the antibody may be deimmunized to reduce its  
25 immunogenicity using the techniques described in, e.g., PCT Publication Nos. WO98/52976 and WO00/34317 (incorporated herein by reference).

## *Mutated Antibodies*

**[00167]** In another aspect, the nucleic acid molecules, vectors and host cells may be used to make mutated anti-CCR2 antibodies. The antibodies may be mutated  
30 in the variable domains of the heavy and/or light chains, e.g., to alter a binding property of the antibody. For example, a mutation may be made in one or more of

72

the CDRs to increase or decrease the  $K_D$  of the antibody for CCR2, to increase or decrease  $k_{off}$ , or to alter the binding specificity of the antibody. Techniques in site-directed mutagenesis are well-known in the art. See, e.g., Sambrook *et al.* and Ausubel *et al.*, supra. In another case, one or more mutations are made at an amino acid residue that is known to be changed compared to the germline in monoclonal antibody 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 or 4.40 A68G S230P. The mutations may be made in a CDR or framework region of a variable domain, or in a constant domain. In one case, the mutations are made in a variable domain. In some cases, one or more mutations are made at an amino acid residue that is known to be changed compared to the germline in a CDR or framework region of a variable domain of an amino acid sequence selected from SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:176, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:194 or SEQ ID NO:113.

**[00168]** In another aspect, the framework region is mutated so that the resulting framework region(s) have the amino acid sequence of the corresponding germline gene. A mutation may be made in a framework region or constant domain to increase the half-life of the anti-CCR2 antibody. See, e.g., PCT Publication No. WO 00/09560, incorporated herein by reference. A mutation in a framework region or constant domain also can be made to alter or reduce the immunogenicity of the antibody, to provide a site for covalent or non-covalent binding to another molecule, to add or remove one or more glycosylation sites or to alter such properties as complement fixation, FcR binding and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). A single antibody may have mutations in any one or more of the CDRs or framework regions of the variable domain or in the constant domain.

**[00169]** In some cases, there are from 1 to 8, including any number in between, amino acid mutations in either the  $V_H$  or  $V_L$  domains of the mutated anti-CCR2 antibody compared to the anti-CCR2 antibody prior to mutation. In any of the above, the mutations may occur in one or more CDRs. Further, any of the mutations can be conservative amino acid substitutions. In some cases, there are no more than 5, 4, 3, 2, or 1 amino acid change in the constant domains.



73

*Modified Antibodies*

**[00170]** In another aspect, a fusion antibody or immunoadhesin may be made that comprises all or a portion of an anti-CCR2 antibody linked to another polypeptide.

In one case, only the variable domains of the anti-CCR2 antibody are linked to the

5 polypeptide. In still another case, the V<sub>H</sub> domain of an anti-CCR2 antibody is linked to a first polypeptide, while the V<sub>L</sub> domain of an anti-CCR2 antibody is linked to a second polypeptide that associates with the first polypeptide in a manner such that the V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> domains can interact with one another to form an antigen binding site. In still another case, the V<sub>H</sub> domain is separated from the V<sub>L</sub>

10 domain by a linker such that the V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> domains can interact with one another (see below under Single Chain Antibodies). The V<sub>H</sub>-linker-V<sub>L</sub> antibody is then linked to the polypeptide of interest. The fusion antibody is useful for directing a polypeptide to a CCR2-expressing cell or tissue. The polypeptide may be a therapeutic agent, such as a toxin, chemokine or other regulatory protein, or may

15 be a diagnostic agent, such as an enzyme that may be easily visualized, such as horseradish peroxidase. In addition, fusion antibodies can be created in which two (or more) single-chain antibodies are linked to one another. This is useful if one wants to create a divalent or polyvalent antibody on a single polypeptide chain, or if one wants to create a bispecific antibody.

20 **[00171]** To create a single chain antibody (scFv), the V<sub>H</sub>- and V<sub>L</sub>-encoding DNA fragments are operatively linked to another fragment encoding a flexible linker, e.g., encoding the amino acid sequence (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>, such that the V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> sequences can be expressed as a contiguous single-chain protein, with the V<sub>L</sub> and V<sub>H</sub> domains joined by the flexible linker. See, e.g., Bird *et al.*, *Science*

25 242:423-426 (1988); Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988); McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990). The single chain antibody may be monovalent, if only a single V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> are used, bivalent, if two V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> are used, or polyvalent, if more than two V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> are used. Bispecific or polyvalent antibodies may be generated that bind specifically to CCR2 and to

30 another molecule.

**[00172]** In another aspect, other modified antibodies may be prepared using anti-CCR2 antibody encoding nucleic acid molecules. For instance, "Kappa bodies" (Ill *et al.*, *Protein Eng.* 10: 949-57 (1997)), "Minibodies" (Martin *et al.*, *EMBO J.* 13:

77

5303-9 (1994)), "Diabodies" (Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)), or "Janusins" (Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991) and Traunecker *et al.*, *Int. J. Cancer* (Suppl.) 7:51-52 (1992)) may be prepared using standard molecular biological techniques following the teachings of the

5 specification.

**[00173]** Bispecific antibodies or antigen-binding fragments can be produced by a variety of methods including fusion of hybridomas or linking of Fab' fragments.

See, e.g., Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990),

Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992). In addition, bispecific

10 antibodies may be formed as "diabodies" or "Janusins." In some cases, the

bispecific antibody binds to two different epitopes of CCR2. In some cases, the bispecific antibody has a first heavy chain and a first light chain from monoclonal antibody 4.40, 4.9 or 4.40 A68G S230P and an additional antibody heavy chain and light chain. In some cases, the additional light chain and heavy chain also

15 are from one of the above-identified monoclonal antibodies, but are different from the first heavy and light chains.

**[00174]** In some cases, the modified antibodies described herein are prepared using one or more of the variable domains or CDRs from a human anti-CCR2 monoclonal antibody provided herein.

## 20 *Derivatized and Labeled Antibodies*

**[00175]** An anti-CCR2 antibody or antigen-binding portion can be derivatized or linked to another molecule (e.g., another peptide or protein). In general, the antibodies or portion thereof are derivatized such that the CCR2 binding is not affected adversely by the derivatization or labeling. Accordingly, the antibodies

25 and antibody portions are intended to include both intact and modified forms of the human anti-CCR2 antibodies described herein. For example, an antibody or antibody portion can be functionally linked (by chemical coupling, genetic fusion, noncovalent association or otherwise) to one or more other molecular entities, such as another antibody (e.g., a bispecific antibody or a diabody), a detection  
30 agent, a cytotoxic agent, a pharmaceutical agent, and/or a protein or peptide that can mediate association of the antibody or antibody portion with another molecule (such as a streptavidin core region or a polyhistidine tag).

[00176] One type of derivatized antibody is produced by crosslinking two or more antibodies (of the same type or of different types, e.g., to create bispecific antibodies). Suitable crosslinkers include those that are heterobifunctional, having two distinctly reactive groups separated by an appropriate spacer (e.g., m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester) or homobifunctional (e.g., disuccinimidyl suberate). Such linkers are available from Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

[00177] Another type of derivatized antibody is a labeled antibody. Useful detection agents with which an antibody or antigen-binding portion may be derivatized include fluorescent compounds, including fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, phycoerythrin, 5-dimethylamine-1-naphthalenesulfonyl chloride, lanthanide phosphors and the like. An antibody can also be labeled with enzymes that are useful for detection, such as horseradish peroxidase,  $\beta$ -galactosidase, luciferase, alkaline phosphatase, glucose oxidase and the like.

When an antibody is labeled with a detectable enzyme, it is detected by adding additional reagents that the enzyme uses to produce a reaction product that can be discerned. For example, when the agent horseradish peroxidase is present, the addition of hydrogen peroxide and diaminobenzidine leads to a colored reaction product, which is detectable. An antibody can also be labeled with biotin, and detected through indirect measurement of avidin or streptavidin binding. An antibody can also be labeled with a predetermined polypeptide epitope recognized by a secondary reporter (e.g., leucine zipper pair sequences, binding sites for secondary antibodies, metal binding domains, epitope tags). In some cases, labels are attached by spacer arms of various lengths to reduce potential steric hindrance.

[00178] An anti-CCR2 antibody can also be labeled with a radiolabeled amino acid. The radiolabel can be used for both diagnostic and therapeutic purposes. For instance, the radiolabel can be used to detect CCR2-expressing tumors by X-ray or other diagnostic techniques. Further, the radiolabel can be used therapeutically as a toxin for cancerous cells or tumors. Examples of labels for polypeptides include, but are not limited to, the following radioisotopes or radionuclides --  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ , and  $^{131}\text{I}$ .

**[00179]** An anti-CCR2 antibody can also be derivatized with a chemical group such as polyethylene glycol (PEG), a methyl or ethyl group, or a carbohydrate group. These groups are useful to improve the biological characteristics of the antibody, e.g., to increase serum half-life or to increase tissue binding.

5 **[00180]** In some cases, the anti-CCR2 antibody can be labeled with a paramagnetic, radioactive or fluorogenic ion or moiety that is detectable upon imaging.

**[00181]** In some cases, the paramagnetic ion is chromium (III), manganese (II), iron (III), iron (II), cobalt (II), nickel (II), copper (II), neodymium (III), samarium (III),  
10 ytterbium (III), gadolinium (III), vanadium (II), terbium (III), dysprosium (III), holmium (III) or erbium (III). In other cases, the radioactive ion is iodine123, technetium99, indium111, rhenium188, rhenium186, copper67, iodine131, yttrium90, iodine125, astatine211, and gallium67. In other cases, the anti-CCR2 antibody is labeled with an X-ray imaging agent such as lanthanum (III), gold (III)  
15 lead (II) and bismuth (III).

#### Pharmaceutical Compositions and Kits

**[00182]** Compositions comprising a human anti-CCR2 antibody with antagonist properties are provided. Such compositions are useful to treat a condition in which CCR2 has a role, including, but not limited to, liver fibrosis, renal fibrosis,  
20 pulmonary fibrosis, psoriasis; inflammatory disorders, allergic disorders, autoimmune diseases, graft rejection disorders, atherosclerosis, obesity, HIV infection, neuropathic pain, inflammation associated with ischemia, stenosis and restenosis, cancer, sepsis, scleroderma, and diabetes. In some cases, the treatment is of liver fibrosis mediated by hepatitis C virus (HCV), hepatitis B virus  
25 (HBV), non-alcohol steatohepatitis (NASH), and /or alcohol induced steatohepatitis (ASH). In some cases, the subject is in need of a reduction of leukocyte infiltration into tissues, such as tissues that are the sites of inflammatory responses. In some cases, the subject of treatment is a human. In other cases, the subject is a veterinary subject. Examples of tissues in need of reduced  
30 inflammation or reduced leukocyte infiltration include but are not limited to, connective tissue, cartilage, liver, lung, kidney, neural tissue including brain, spinal cord, and peripheral neural tissue, heart, blood vessels, esophagus,

stomach, small intestine, large intestine, colon, prostate, pancreas, urinary tract, ovaries, breasts, uterus, testis, penis, bone, muscle, thyroid gland, adrenal gland, pituitary, adipose tissue, bone marrow, blood, thymus, spleen, lymph nodes, skin, eye, ear or nose. In one case, the tissues are tissues having mucosal surfaces.

5 **[00183]** As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" means any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like that are physiologically compatible. Some examples of pharmaceutically acceptable carriers merely by way of illustration, are water, saline, phosphate buffered saline, dextrose, glycerol,  
10 ethanol and the like, as well as combinations thereof. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as mannitol, sorbitol, or sodium chloride in the composition. Additional examples of pharmaceutically acceptable substances are wetting agents or minor amounts of auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, preservatives or  
15 buffers, which enhance the shelf life or effectiveness of the antibody.

**[00184]** The compositions may be in a variety of forms, for example, liquid, semi-solid and solid dosage forms, such as liquid solutions (e.g., injectable and infusible solutions), dispersions or suspensions, tablets, pills, powders, liposomes and suppositories. The form depends on the intended mode of administration and  
20 therapeutic application. Typical compositions are in the form of injectable or infusible solutions, such as compositions similar to those used for passive immunization of humans. The preferred mode of administration is parenteral (e.g., intravenous, subcutaneous, intraperitoneal, intramuscular). In one case, the antibody is administered by intravenous infusion or injection. In still another case,  
25 the antibody is administered by intramuscular or subcutaneous injection.

**[00185]** Therapeutic compositions typically must be sterile and stable under the conditions of manufacture and storage. The composition can be formulated as a solution, microemulsion, dispersion, liposome, or other ordered structure suitable to high drug concentration. Sterile injectable solutions can be prepared by  
30 incorporating the anti-CCR2 antibody in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle that contains a basic

78

dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum drying and freeze-drying that yields a powder of the active ingredient plus any additional  
5 desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof. The proper fluidity of a solution can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Prolonged absorption of injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent that  
10 delays absorption, for example, monostearate salts and gelatin.

**[00186]** The antibodies may be administered by a variety of methods known in the art, although for many therapeutic applications, the preferred route/mode of administration is subcutaneous, intramuscular, or intravenous infusion. As will be appreciated by the skilled artisan, the route and/or mode of administration will  
15 vary depending upon the desired results. Other modes of administration include intraperitoneal, intrabronchial, transmucosal, intraspinal, intrasynovial, intraaortic, intranasal, ocular, otic, topical and buccal, and intratumor.

**[00187]** In certain cases, the active compound of the antibody compositions may be prepared with a carrier that will protect the antibody against rapid release, such  
20 as a controlled release formulation, including implants, transdermal patches, and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Many methods for the preparation of such formulations are patented or generally known to those skilled in the art.

25 See, e.g., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978).

**[00188]** Additional active compounds also can be incorporated into the compositions. In certain cases, an inhibitory anti-CCR2 antibody is co-formulated with and/or co-administered with one or more additional therapeutic, diagnostic, or  
30 prophylactic agents. Therapeutic agents include, without limitation, an anti-CCR2 antibody with a different fine specificity, antibodies that bind other targets, photosensitizers, androgen, estrogen, nonsteroidal anti-inflammatory agents, antihypertensive agents, analgesic agents, antidepressants, antibiotics, anti-

cancer agents, anesthetics, anti-emetics, anti-infectants, contraceptives, anti-diabetic agents, steroids, anti-allergy agents, chemotherapeutic agents, anti-migraine agents, agents for smoking cessation, anti-viral agents, immunosuppressants, thrombolytic agent, cholesterol-lowering agents and anti-obesity agents.

**[00189]** Therapeutic agents also include peptide analogues that inhibit CCR2, antibodies or other molecules that bind to MCP-1, MCP-2, MCP-3 or MCP-4 and prevent their binding to CCR2, and agents that inhibit CCR2 expression. In one case, the additional agents that inhibit CCR2 expression comprise an antisense nucleic acid capable of hybridizing to a CCR2 mRNA, such as a hairpin RNA or siRNA. Sequence-specific nucleic acids capable of inhibiting gene function by RNA interference are well-known in the art. Such combination therapies may require lower dosages of the inhibitory anti-CCR2 antibody as well as the co-administered agents, thus avoiding possible toxicities or complications associated with the various monotherapies.

**[00190]** In certain specific cases, the therapeutic agent(s) that is co-formulated with and/or co-administered with an inhibitory anti-CCR2 antibody is an antimicrobial agent. Antimicrobial agents include antibiotics (e.g. antibacterial), antiviral agents, antifungal agents, and anti-protozoan agents. Non-limiting examples of antimicrobial agents are sulfonamides, trimethoprim-sulfamethoxazole, quinolones, penicillins, and cephalosporins.

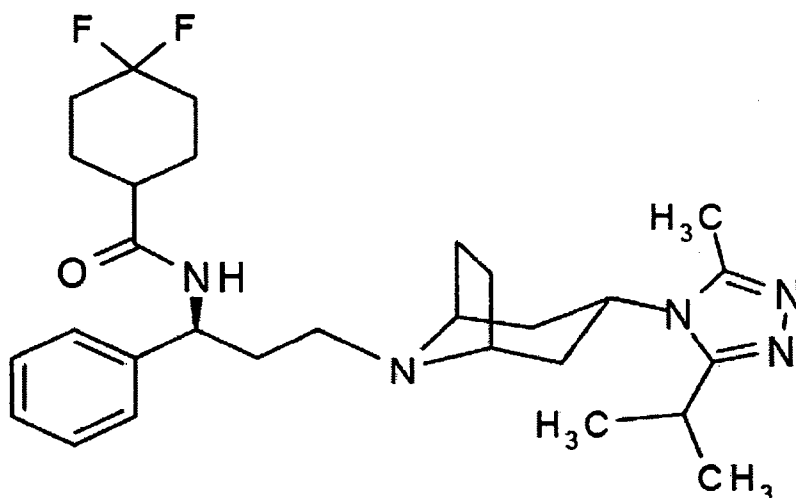
**[00191]** In certain specific cases, the therapeutic agent(s) that is co-formulated with and/or co-administered with an inhibitory anti-CCR2 antibody and a chemokine antagonist, a CCR2 antagonist, a MCP-1 antagonist or a CCR5 antagonist. The CCR2 antagonist or a MCP-1 antagonist include, but are not limited to: antibodies directed to MCP-1 (US Patent 7,202,343, US2005/0025768, US2006/0039913, US2006/0246069, & US2004/004/0047860); tetrahydropyranyl cyclopentyl benzylamide compounds (US2006/0116421); heteroaryl piperidine compounds (US2005/0250781); piperidinyl cyclopentyl aryl benzylamide compounds (US2006/0173013); cyclic amine compounds (US Patent 6,140,349 & US Patent 6,476,054); cyclopentyl compounds (US2002/0049222 & US Patent 6,545,023); tetrahydropyranyl cyclopentyl tetrahydropyridopyridine compounds (US2004/0167156, US Patent 6,812,234 & US Patent 7,230,008);

80

aminocyclopentyl fused heterotricyclicamide compounds (US2007/0004714);  
piperidinyl- $\alpha$ -aminoamide compounds (US2005/0250814); substituted  
pyrazole compounds (WO06/88813); tetrahydropyranyl cyclopentyl heterocyclic  
amide compounds (US2006/0178363); 7 and 8 membered heterocyclic  
5 cyclopentyl benzylamide compounds (US2006/0183731); benzoxazinyl-  
amidocyclopentyl-heterocyclic compounds (US2006/0069088); 3-  
aminocyclopentanecarboxamide compounds (US2007/0149532); nitrogen  
containing heterocyclic compounds (US2007/0155713); triazolyl phenyl  
bensenesulonamide compounds (WO08/10934); substituted pyrrolidine derivatives  
10 (US2004/0186140); substituted benzamide and substituted phenylcarbamate  
derivatives (US Patent 7,087,604); substituted cycloalkylamine compounds  
(US2005/0054626); substituted bicycloalkylamine compounds (US2005/0227960);  
pyrrolidinone and pyrrolidine-thione compounds (US2003/0149081, US Patent  
6,727,275 & US Patent 6,936,633); mercaptoimidazole compounds  
15 (US2007/0244138); substituted dipiperidine compounds (US2007/0197590);  
phenylamino substituted quaternary salt compounds (US2006/0293379); bicyclic  
and bridged nitrogen heterocycles (US2006/0074121); 3-  
aminocyclopentanecarboxamide compounds (US2006/0020133); 3-(4-  
heteroarylcylohexylamino)cyclopentanecarboxamide compounds  
20 (US2005/0267146); triazolo compounds (US Patent 6,492,364); heteroaryl  
sulfonamide compounds (US2006/0173019); aryl sulfonamides (US Patent  
6,939,885); bis-aryl sulfonamides (US Patent 7,227,035 & US2004/0167113);  
substituted benzamide compounds (US Patent 6,821,964); substituted diazepam  
compounds (US2007/0249589); Triazaspiro[5.5]undecane derivatives  
25 (US2005/267114); substituted piperidinecarboxamide compounds  
(US2003/0114443 & US6,562,978); benzazepine derivatives (US2004/0235822 &  
US Patent 7,262,185);

**[00192]** In selected cases the chemokine antagonist co-formulated or co-  
administered with the CCR2 antibodies is SELZENTRY™ (Maraviroc), which is  
30 chemically described as 4,4-difluoro-*N*-{[(1*S*)-3-[*exo*-3-(3-isopropyl-5-methyl-4*H*-  
1,2,4-triazol-4-yl)-8-azabicyclo[3.2.1]oct-8-yl]-1-  
phenylpropyl}cyclohexanecarboxamide:





[00193] In certain specific cases, the therapeutic agent(s) that is co-formulated with and/or co-administered with an inhibitory anti-CCR2 antibody is a CB-1 receptor antagonist. As used herein, the term "CB-1 receptor" refers to a G-protein coupled type 1 cannabinoid receptor. The term "antagonist" includes both full antagonists and partial antagonists, as well as inverse agonists. The CB-1 receptor antagonist may be selective to the CB-1 receptor. "CB-1 receptor selective" means that the compound has little or no activity to antagonize the cannabinoid-2 receptor (CB-2). The CB-1 antagonist may be at least about 10 fold selective for the CB-1 receptor in comparison to the CB-2 receptor. For example, the inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) for antagonizing the CB-1 receptor is about 10 or more times lower than the IC<sub>50</sub> for antagonizing the CB-2 receptor. Suitable CB-1 receptor antagonists include compounds disclosed in U.S. Patent Nos. 5,462,960; 5,596,106; 5,624,941 ; 5,747,524; 6,017,919; 6,028,084; 6,432,984; 6,476,060; 6,479,479; 6,518,264; and 6,566,356; U.S. Patent Publication Nos. 2003/0114495; 2004/0077650; 2004/0092520; 2004/0122074; 2004/0157838; 2004/0157839; 2004/0214837; 2004/0214838; 2004/0214855; 2004/0214856; 2004/0058820; 2004/0235926; 2004/0259887; 2005/0080087; 2005/0026983 and 2005/0101592; PCT Patent Publication Nos. WO 03/075660; WO 02/076949; WO 01/029007; WO 04/048317; WO 04/058145; WO 04/029204; WO 04/012671 ; WO 03/087037; WO 03/086288; WO 03/082191 ; WO 03/082190; WO 03/063781 ; WO 04/012671 ; WO 04/013120; WO 05/020988; WO 05/039550; WO 05/044785; WO 05/044822; and WO 05/049615; PCT Patent Application Serial Nos. PCT/IB2004/004050 filed on December 6, 2004; PCT/IB2004/004017 filed

82

on December 6, 2004; PCT/IB2004/004023 filed on December 6, 2004; and PCT/IB2004/004019 filed on December 6, 2004; and U.S. Provisional Application Nos. 60/523937 filed on November 21, 2003; 60/529908 filed on December 16, 2003; 60/529909 filed on December 16, 2003; 60/529910 filed on December 16, 2003; 60/530012 filed on December 16, 2003; and 60/564648 filed on April 21, 2004. All of the above patents and patent applications are incorporated herein by reference. Preferred CB-1 receptor antagonists for use in the methods include: rimonabant (SR141716A also known under the tradename Acomplia™) is available from Sanofi-Synthelabo or can be prepared as described in U.S. Patent No. 5,624,941; *N*-(piperidin-1-yl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (AM251) is available from Tocris™, Ellisville, MO; [5-(4-bromophenyl)-1-(2,4-dichloro-phenyl)-4-ethyl-*N*-(1-piperidiny)-1H-pyrazole-3-carboxamide] (SR147778) which can be prepared as described in US Patent No. 6,645,985; *N*-(piperidin-1-yl)-4,5-diphenyl-1-methylimidazole-2-carboxamide, *N*-(piperidin-1-yl)-4-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-chlorophenyl)-1-methylimidazole-2-carboxamide, *N*-(piperidin-1-yl)-4,5-di-(4-methylphenyl)-1-methylimidazole-2-carboxamide, *N*-cyclohexyl-4,5-di-(4-methylphenyl)-1-methylimidazole-2-carboxamide, *N*-(cyclohexyl)-4-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-chlorophenyl)-1-methylimidazole-2-carboxamide, and *N*-(phenyl)-4-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-chlorophenyl)-1-methylimidazole-2-carboxamide which can be prepared as described in PCT Patent Publication No. WO 03/075660; the hydrochloride, mesylate and besylate salt of 1-[9-(4-chloro-phenyl)-8-(2-chloro-phenyl)-9H-purin-6-yl]-4-ethylamino-piperidine-4-carboxylic acid which can be prepared as described in U.S. Patent Publication No. 2004/0092520; 1-[7-(2-chloro-phenyl)-8-(4-chloro-phenyl)-2-methyl-pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-yl]-3-ethylamino-azetidine-3-carboxylic acid amide and 1-[7-(2-chloro-phenyl)-8-(4-chloro-phenyl)-2-methyl-pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-yl]-3-methylamino-azetidine-3-carboxylic acid amide which can be prepared as described in U.S. Patent Publication No. 2004/0157839; 3-(4-chloro-phenyl)-2-(2-chloro-phenyl)-6-(2,2-difluoro-propyl)-2,4,5,6-tetrahydro-pyrazolo[3,4-c]pyridin-7-one, 2-(2-chloro-phenyl)-3-(4-ethyl-phenyl)-5-(2,2,2-trifluoro-ethyl)-4,5-dihydro-2H-pyrrolo[3,4-c]pyrazol-6-one, and 2-(2-chloro-phenyl)-3-(4-isopropyl-phenyl)-5-(2,2,2-trifluoro-ethyl)-4,5-dihydro-2H-pyrrolo[3,4-c]pyrazol-6-one which can be prepared as

83

described in U.S. Patent Publication No. 2004/0214855; 3-(4-chloro-phenyl)-2-(2-chloro-phenyl)-7-(2,2-difluoro-propyl)-6,7-dihydro-2H,5H-4-oxa-1,2,7-triazazulen-8-one which can be prepared as described in U.S. Patent Publication No. 2005/0101592; 2-(2-chloro-phenyl)-6-(2,2,2-trifluoro-ethyl)-3-(4-trifluoromethyl-phenyl)-2,6-dihydro-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-one which can be prepared as described in U.S. Patent Publication No. 2004/0214838; (S)-4-chloro-N-[[3-(4-chloro-phenyl)-4-phenyl-4,5-dihydro-pyrazol-1-yl]-methylamino-methylene]-benzenesulfonamide (SLV-319) and (S)-N-[[3-(4-chloro-phenyl)-4-phenyl-4,5-dihydro-pyrazol-1-yl]-methylamino-methylene]-4-trifluoromethyl-benzenesulfonamide (SLV-326) which can be prepared as described in PCT Patent Publication No. WO 02/076949; N-piperidino-5-(4-bromophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-ethylpyrazole-3-carboxamide which can be prepared as described in U.S. Patent No. 6,432,984; 1-[bis-(4-chloro-phenyl)-methyl]-3-[(3,5-difluoro-phenyl)-methanesulfonyl-methylene]-azetidine which can be prepared as described in U.S. Patent No. 6,518,264; 2-(5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yloxy)-N-(4-(4-chlorophenyl)-3-(3-cyanophenyl)butan-2-yl)-2-methylpropanamide which can be prepared as described in PCT Patent Publication No. WO 04/048317; 4-[[6-methoxy-2-(4-methoxyphenyl)-1-benzofuran-3-yl]carbonyl]benzonitrile (LY-320135) which can be prepared as described in U.S. Patent No. 5,747,524; 1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(4-fluorophenyl)-benzo[1,3]dioxole-5-sulfonyl]-piperidine which can be prepared as described in WO 04/013120; and [3-amino-5-(4-chlorophenyl)-6-(2,4-dichlorophenyl)-furo[2,3-b]pyridin-2-yl]-phenyl-methanone which can be prepared as described in WO 04/012671.

**[00194]** In certain specific cases, the therapeutic agent(s) that is co-formulated with and/or co-administered with an inhibitory anti-CCR2 antibody is an angiogenic factor. Angiogenic factors include, but are not limited to, basic fibroblast growth factor, acidic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor, angiogenin, transforming growth factor  $\alpha$  and  $\beta$  tumor necrosis factor, angiopoietin, platelet-derived growth factor, placental growth factor, hepatocyte growth factor, and proliferin.

**[00195]** In certain specific cases, the therapeutic agent(s) that is co-formulated with and/or co-administered with an inhibitory anti-CCR2 antibody is an thrombolytic agent. Thrombolytic agents include, but are not limited to, urokinase

84

plasminogen activator, urokinase, streptokinase, inhibitors of  $\alpha$ 2-plasmin inhibitor, and inhibitors of plasminogen activator inhibitor-1, angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors, spironolactone, tissue plasminogen activator (tPA), an inhibitor of interleukin 1 $\beta$ -converting enzyme, anti-thrombin III, and the like.

- 5 **[00196]** In certain specific cases, the therapeutic agent(s) that is co-formulated with and/or co-administered with an inhibitory anti-CCR2 antibody is an anti-obesity agent. Anti-obesity agents include, but are not limited to, an apo-B/MTP inhibitor, a 11 $\beta$ -hydroxy steroid dehydrogenase-1 inhibitor, peptide YY<sub>3-36</sub> or an analog thereof, a MCR-4 agonist, a CCK-A agonist, a monoamine reuptake
- 10 inhibitor, a sympathomimetic agent, a  $\beta_3$  adrenergic receptor agonist, a dopamine agonist, a melanocyte-stimulating hormone receptor analog, a 5-HT<sub>2c</sub> receptor agonist, a melanin concentrating hormone antagonist, leptin, a leptin analog, a leptin receptor agonist, a galanin antagonist, a lipase inhibitor, a bombesin agonist, a neuropeptide-Y receptor antagonist, a thyromimetic agent,
- 15 dehydroepiandrosterone or analog thereof, a glucocorticoid receptor antagonist, an orexin receptor antagonist, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, a ciliary neurotrophic factor, a human agouti-related protein antagonist, a ghrelin receptor antagonist, a histamine 3 receptor antagonist or inverse agonist, and a neuromedin U receptor agonist.
- 20 **[00197]** In certain specific cases, the therapeutic agent(s) that is co-formulated with and/or co-administered with an inhibitory anti-CCR2 antibody is a agent which inhibits the recruitment and/or adhesion of neutrophils and/or mononuclear cells to a site of vascular injury. Such therapeutic agents can, for example, inhibit the activity (e.g., binding activity, signaling activity) of a cell surface molecule
- 25 through which cellular adhesion, chemotaxis and/or homing are mediated. For example, antagonists of cellular adhesion molecules (e.g., integrins (e.g.,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3,  $\beta$ 4,  $\beta$ 5,  $\beta$ 6,  $\beta$ 7,  $\beta$ 8 integrins), selectins (e.g., E-selectin, P-selectin, L-selectin), cadherins (e.g., E-, P-, N-cadherins) and immunoglobulin superfamily adhesion molecules (e.g., LFA-2, LFA-3, CD44)) and antagonists of cytokine receptors
- 30 (e.g., antagonists of chemokine receptor function) can be co-formulated with and/or co-administered with an inhibitory anti-CCR2 antibody. In addition, agents which bind to ligands of cellular adhesion molecules or cytokines or chemokines and inhibit the binding of ligand to receptors expressed on neutrophils and/or

85

mononuclear cells can also be co-formulated with and/or co-administered with an inhibitory anti-CCR2 antibody.

**[00198]** In certain specific cases, the therapeutic agent(s) that is co-formulated with and/or co-administered with an inhibitory anti-CCR2 antibody is an cardiac therapeutic agent. Exemplary therapeutic agents intended to treat cardiac disorders include, but are not limited to, growth factors, angiogenic agents, calcium channel blockers, antihypertensive agents, inotropic agents, antiatherogenic agents, anti-coagulants,  $\beta$ -blockers, anti-arrhythmia agents, cardiac glycosides, antiinflammatory agents, antibiotics, antiviral agents, antifungal agents and agents that inhibit protozoan infections, and antineoplastic agents.

**[00199]** In certain specific cases, the cardiac therapeutic agent(s) that is co-formulated with and/or co-administered with an inhibitory anti-CCR2 antibody is a calcium channel blocker. Calcium channel blockers include, but are not limited to, dihydropyridines such as nifedipine, nicardipine, nimodipine, and the like; benzothiazepines such as diltiazem; phenylalkylamines such as verapamil; diarylaminopropylamine ethers such as bepridil; and benzimidole-substituted tetralines such as mibefradil.

**[00200]** In certain specific cases, the cardiac therapeutic agent(s) that is co-formulated with and/or co-administered with an inhibitory anti-CCR2 antibody is an antihypertensive agent. Antihypertensive agents include, but are not limited to, diuretics, including thiazides such as hydrochlorothiazide, furosemide, spironolactone, triamterene, and amiloride; antiadrenergic agents, including clonidine, guanabenz, guanfacine, methyldopa, trimethaphan, reserpine, guanethidine, guanadrel, phentolamine, phenoxybenzamine, prazosin, terazosin, doxazosin, propranolol, methoprolol, nadolol, atenolol, timolol, betaxolol, carteolol, pindolol, acebutolol, labetalol; vasodilators, including hydralazine, minoxidil, diazoxide, nitroprusside; and angiotensin converting enzyme inhibitors, including captopril, benazepril, enalapril, enalaprilat, fosinopril, lisinopril, quinapril, ramipril; angiotensin receptor antagonists, such as losartan; and calcium channel antagonists, including nifedine, amlodipine, felodipine XL, isadipine, nicardipine, benzothiazepines (e.g., diltiazem), and phenylalkylamines (e.g. verapamil).

86

**[00201]** In certain specific cases, the cardiac therapeutic agent(s) that is co-formulated with and/or co-administered with an inhibitory anti-CCR2 antibody is an anti-coagulant. Anti-coagulants include, but are not limited to, heparin, warfarin, hirudin, tick anti-coagulant peptide, low molecular weight heparins such as enoxaparin, dalteparin, and ardeparin, ticlopidine, danaparoid, argatroban, abciximab and tirofiban.

**[00202]** In certain specific cases, the cardiac therapeutic agent(s) that is co-formulated with and/or co-administered with an inhibitory anti-CCR2 antibody is an antiarrhythmic agent. Antiarrhythmic agents include, but are not limited to, sodium channel blockers (e.g., lidocaine, procainamide, encainide, flecanide, and the like), beta adrenergic blockers (e.g., propranolol), prolongers of the action potential duration (e.g., amiodarone), and calcium channel blockers (e.g., verapamil, diltiazem, nickel chloride, and the like). Delivery of cardiac depressants (e.g., lidocaine), cardiac stimulants (e.g., isoproterenol, dopamine, norepinephrine, etc.), and combinations of multiple cardiac agents (e.g., digoxin/quinidine to treat atrial fibrillation) is also of interest.

**[00203]** In certain specific cases, the cardiac therapeutic agent(s) that is co-formulated with and/or co-administered with an inhibitory anti-CCR2 antibody is an agent for treating congestive heart failure. Agents for treating congestive heart failure include, but are not limited to, a cardiac glycoside, inotropic agents, a extracellular loop diuretic, a thiazide diuretic, a potassium ion sparing diuretic, an angiotensin converting enzyme inhibitor, an angiotensin receptor antagonist, a nitro vasodilator, a phosphodiesterase inhibitor, a direct vasodilator, an  $\alpha$ 1-adrenergic receptor antagonist, a calcium channel blocker, and a sympathomimetic agent.

**[00204]** In certain specific cases, the cardiac therapeutic agent(s) that is co-formulated with and/or co-administered with an inhibitory anti-CCR2 antibody is an agent suitable for treating cardiomyopathies, such as but not limited to, dopamine, epinephrine, norepinephrine, and phenylephrine.

**[00205]** Also included are compositions for inhibiting viral infection, and in particular HIV-infection, in a mammal comprising an amount of an antibody in combination with an amount of an antiviral agent, wherein the amounts of the anti-CCR2 antibody and of antiviral agent are together effective in inhibiting viral

replication, viral infection of new cells or viral loads. Many antiviral agents are presently known in the art, including nucleoside analogues (e.g., AZT, 3TC, and ddI), protease inhibitors and chemokine receptor antagonists may inhibit HIV infection but not viral infections.

- 5 **[00206]** In another aspect, the anti-CCR2 antibody or fragment thereof may be co-administered with other therapeutic agents, such as antiinflammatory drugs or molecules, to a patient who has a inflammatory disorder, such as arthritis, atherosclerosis or multiple sclerosis. In one aspect, methods for the treatment of the inflammatory disorder in a mammal comprising administering to said mammal
- 10 a therapeutically effective amount of a compound in combination with an antiinflammatory agent are provided. Antiinflammatory agents include, but are not limited to, any known nonsteroidal antiinflammatory agent such as, salicylic acid derivatives (aspirin), para-aminophenol derivatives (acetaminophen), indole and indene acetic acids (indomethacin), heteroaryl acetic acids (ketorolac),
- 15 arylpropionic acids (ibuprofen), anthranilic acids (mefenamic acid), enolic acids (oxicams) and alkanones (nabumetone) and any known steroidal antiinflammatory agent which include corticosteroids and biologically active synthetic analogs with respect to their relative glucocorticoid (metabolic) and mineralocorticoid (electrolyte-regulating) activities. In another case, the anti-CCR2 antibody is
- 20 administered in combination with a non-steroidal anti-inflammatory drug such as aspirin (Bayer, Bufferin), ibuprofen (Motrin, Advil), naproxen sodium (Aleve), ketoprofen (Orudis KT), indomethacin (Indocin), etodolac (Lodine), diclofenac sodium (Voltaren), rofecoxib (Vioxx), celecoxib (Celebrex), nabumetone (Relafen) or in combination with a steroid such as prednisone, prednisolone,
- 25 dexamethasone, beclomethasone, budesonide, fluticasone or triamcinolone.
- [00207]** Additionally, other drugs used in the therapy of inflammation include but are not limited to antagonists such as all histamine and bradykinin receptor antagonists, leukotriene and prostaglandin receptor antagonists, and platelet activating factor receptor antagonists. In still another case, the antibody or
- 30 combination therapy is administered along with radiotherapy, chemotherapy, photodynamic therapy, surgery or other immunotherapy treatment *i.e.* therapy targeting the immune system. In yet still another case, the antibody will be administered with another antibody. For example, the anti-CCR2 antibody may

be administered with an antibody or other agent that is known to inhibit inflammation, e.g., an antibody or agent that inhibits alpha-4 integrin (US2004/0009169) or IL-8 receptor (US2004/0037830). Additional antibodies that may be coadministered with the anti-CCR2 antibodies are described in U.S. Patent Nos. 6,6965,50; 6,406,865; 6,352,832; and 6,084,075, the contents of which are incorporated by reference herein.

**[00208]** The compositions may include a "therapeutically effective amount" or a "prophylactically effective amount" of an antibody or antigen-binding portion. A "therapeutically effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired therapeutic result. A therapeutically effective amount of the antibody or antibody portion may vary according to factors such as the disease state, age, sex, and weight of the individual, and the ability of the antibody or antibody portion to elicit a desired response in the individual. A therapeutically effective amount is also one in which any toxic or detrimental effects of the antibody or antibody portion are outweighed by the therapeutically beneficial effects. A "prophylactically effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired prophylactic result. Typically, since a prophylactic dose is used in subjects prior to or at an earlier stage of disease, the prophylactically effective amount may be less than the therapeutically effective amount.

**[00209]** Dosage regimens can be adjusted to provide the optimum desired response (e.g., a therapeutic or prophylactic response). For example, a single bolus can be administered, several divided doses can be administered over time or the dose can be proportionally reduced or increased as indicated by the exigencies of the therapeutic situation. It is especially advantageous to formulate parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the mammalian subjects to be treated; each unit containing a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the dosage unit forms are dictated by and directly dependent on (a) the unique characteristics of the anti-CCR2 antibody or portion thereof and the particular therapeutic or prophylactic effect to



89

be achieved, and (b) the limitations inherent in the art of compounding such an antibody for the treatment of sensitivity in individuals.

**[00210]** An exemplary, non-limiting range for a therapeutically or prophylactically-effective amount of an antibody or antibody portion is 0.025 to 50 mg/kg, 0.1 to 50 mg/kg, 0.1-25, 0.1 to 10 or 0.1 to 3 mg/kg. In one case, the antibody is administered in a formulation as a sterile aqueous solution having a pH that ranges from about 5.0 to about 6.5 and comprising from about 1 mg/ml to about 200 mg/ml of antibody, from about 1 millimolar to about 100 millimolar of histidine buffer, from about 0.01 mg/ml to about 10 mg/ml of polysorbate 80 or polysorbate 20, from about 100 millimolar to about 400 millimolar of a non-reducing sugar selected from but not limited to trehalose or sucrose, from about 0.01 millimolar to about 1.0 millimolar of disodium EDTA dihydrate and optionally comprise a pharmaceutically acceptable antioxidant in addition to a chelating agent. Suitable antioxidants include, but are not limited to, methionine, sodium thiosulfate, catalase, and platinum. For example, the composition may contain methionine in a concentration that ranges from 1 mM to about 100 mM, and in particular, is about 27 mM. In some cases, a formulation contains 5 mg/ml of antibody in a buffer of 20mM sodium citrate, pH 5.5, 140mM NaCl, and 0.2 mg/ml polysorbate 80. It is to be noted that dosage values may vary with the type and severity of the condition to be alleviated. It is to be further understood that for any particular subject, specific dosage regimens should be adjusted over time according to the individual need and the professional judgment of the person administering or supervising the administration of the compositions, and that dosage ranges set forth herein are exemplary only and are not intended to limit the scope or practice of the claimed composition.

**[00211]** Another aspect provides kits comprising an anti-CCR2, or antigen-binding portion, or a composition comprising such an antibody or antigen-binding fragment. A kit may include, in addition to the antibody or composition, diagnostic or therapeutic agents. A kit can also include instructions for use in a diagnostic or therapeutic method, as well as packaging material such as, but not limited to, ice, dry ice, STYROFOAM™, foam, plastic, cellophane, shrink wrap, bubble wrap, cardboard and starch peanuts. In one case, the kit includes the antibody or a composition comprising it and a diagnostic agent that can be used in a method

90

described herein. In still another case, the kit includes the antibody or a composition comprising it and one or more therapeutic agents that can be used in a method described herein.

- 5 [00212] Compositions and kits for inhibiting cancer in a mammal comprising an amount of an antibody in combination with an amount of a chemotherapeutic agent, wherein the amounts of the compound, salt, solvate, or prodrug, and of the chemotherapeutic agent are together effective in inhibiting abnormal cell growth are provided. Many chemotherapeutic agents are presently known in the art. In some cases, the chemotherapeutic agent is selected from the group consisting of
- 10 mitotic inhibitors, alkylating agents, anti-metabolites, intercalating antibiotics, chemokine inhibitors, cell cycle inhibitors, enzymes, topoisomerase inhibitors, biological response modifiers, anti-hormones, e.g., anti-androgens, and anti-angiogenesis agents.

#### Diagnostic Methods of Use

- 15 [00213] In another aspect, diagnostic methods are provided. The anti-CCR2 antibodies can be used to detect CCR2 in a biological sample *in vitro* or *in vivo*. In one case, a method is provided for diagnosing the presence or location of an CCR2-expressing cells in a subject in need thereof, comprising the steps of injecting the antibody into the subject, determining the expression of CCR2 in the
- 20 subject by localizing where the antibody has bound, comparing the expression in the subject with that of a normal reference subject or standard, and diagnosing the presence or location of the cells. The anti-CCR2 antibodies may also be used as a marker for inflammation and/or for the infiltration of immune cells, such as monocytes, into a tissue.
- 25 [00214] The anti-CCR2 antibodies can be used in a conventional immunoassay, including, without limitation, an ELISA, an RIA, flow cytometry, tissue immunohistochemistry, Western blot or immunoprecipitation. The anti-CCR2 antibodies may be used to detect CCR2 from humans. In another case, the anti-CCR2 antibodies may be used to detect CCR2 from cynomolgus monkeys or
- 30 rhesus monkeys. In another case, the anti-CCR2 antibodies may be used to detect CCR2 from rodents, such as mice and rats.

91

**[00215]** Also provided is a method for detecting CCR2 in a biological sample comprising contacting the biological sample with an anti-CCR2 antibody and detecting the bound antibody. In one case, the anti-CCR2 antibody is directly labeled with a detectable label. In another case, the anti-CCR2 antibody (the first antibody) is unlabeled and a second antibody or other molecule that can bind the anti-CCR2 antibody is labeled. As is well known to one of skill in the art, a second antibody is chosen that is able to specifically bind the particular species and class of the first antibody. For example, if the anti-CCR2 antibody is a human IgG, then the secondary antibody could be an anti-human-IgG. Other molecules that can bind to antibodies include, without limitation, Protein A and Protein G, both of which are available commercially, e.g., from Pierce Chemical Co.

**[00216]** Suitable labels for the antibody or secondary antibody have been disclosed supra, and include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials and radioactive materials. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase,  $\beta$ -galactosidase, or acetylcholinesterase; examples of suitable prosthetic group complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; examples of suitable fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; an example of a luminescent material includes luminol; and examples of suitable radioactive material include  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  or  $^3\text{H}$ .

**[00217]** In other cases, CCR2 can be assayed in a biological sample by a competition immunoassay utilizing CCR2 standards labeled with a detectable substance and an unlabeled anti-CCR2 antibody. In this assay, the biological sample, the labeled CCR2 standards and the anti-CCR2 antibody are combined and the amount of labeled CCR2 standard bound to the unlabeled antibody is determined. The amount of CCR2 in the biological sample is inversely proportional to the amount of labeled CCR2 standard bound to the anti-CCR2 antibody.

**[00218]** One can use the immunoassays disclosed above for a number of purposes. For example, the anti-CCR2 antibodies can be used to detect CCR2 in cultured cells. In one case, the anti-CCR2 antibodies are used to determine the amount of CCR2 on the surface of cells that have been treated with various

compounds. This method can be used to identify compounds that modulate CCR2 protein levels. According to this method, one sample of cells is treated with a test compound for a period of time while another sample is left untreated. If the total CCR2 expression is to be measured, the cells are lysed and the total CCR2 expression is measured using one of the immunoassays described herein. The total CCR2 expression in the treated versus the untreated cells is compared to determine the effect of the test compound.

**[00219]** A preferred immunoassay for measuring total CCR2 expression is flow cytometry or immunohistochemistry. If the cell surface CCR2 expression is to be measured, the cells are not lysed, and the cell surface levels of CCR2 are measured using one of the immunoassays described herein. A preferred immunoassay for determining cell surface levels of CCR2 includes the steps of labeling the cell surface proteins with a detectable label, such as biotin or <sup>125</sup>I, immunoprecipitating the CCR2 with an anti-CCR2 antibody and then detecting the labeled CCR2.

**[00220]** Another immunoassay for determining the localization of CCR2, e.g., cell surface levels, is by using immunohistochemistry. An immunoassay to detect cell surface levels of CCR2 includes binding of an anti-CCR2 antibody labeled with an appropriate fluorophore, such as fluorescein or phycoerythrin, and detecting the primary antibody using flow cytometry. In another case, the anti-CCR2 antibody is unlabeled and a second antibody or other molecule that can bind the anti-CCR2 antibody is labeled. Methods such as ELISA, RIA, flow cytometry, Western blot, immunohistochemistry, cell surface labeling of integral membrane proteins and immunoprecipitation are well known in the art. See, e.g., Harlow and Lane, supra. In addition, the immunoassays can be scaled up for high throughput screening in order to test a large number of compounds for either activation or inhibition of CCR2.

**[00221]** The anti-CCR2 antibodies also can be used to determine the levels of CCR2 in a tissue or in cells derived from the tissue. In some cases, the tissue is a diseased tissue. In some cases, the tissue is a tissue biopsy. In some cases of the method, a tissue or a biopsy thereof is excised from a patient. The tissue or biopsy is then used in an immunoassay to determine, e.g., total CCR2 expression, cell surface levels of CCR2 or localization of CCR2 by the methods discussed

above. Such methods can be used to determine whether a tissue expresses high levels of CCR2, which could be indicative that the tissue is a target for treatment with anti-CCR2 antibody.

**[00222]** The antibodies also can be used *in vivo* to identify tissues and organs that express CCR2. In some cases, the anti-CCR2 antibodies are used to identify CCR2-expressing cells.

**[00223]** The method comprises the steps of administering a detectably labeled anti-CCR2 antibody or a composition comprising them to a patient in need of such a diagnostic test and subjecting the patient to imaging analysis to determine the location of the CCR2-expressing tissues. Imaging analysis is well known in the medical art, and includes, without limitation, X-ray analysis, magnetic resonance imaging (MRI) or computed tomography (CT). The antibody can be labeled with any agent suitable for *in vivo* imaging, for example a contrast agent, such as barium, which can be used for X-ray analysis, or a magnetic contrast agent, such as a gadolinium chelate, which can be used for MRI or CT. Other labeling agents include, without limitation, radioisotopes, such as <sup>99</sup>Tc. In another case, the anti-CCR2 antibody will be unlabeled and will be imaged by administering a second antibody or other molecule that is detectable and that can bind the anti-CCR2 antibody. In another case, a biopsy is obtained from the patient to determine whether the tissue of interest expresses CCR2.

**[00224]** In some cases, the detectably labeled anti-CCR2 comprises a fluorophore. In certain cases, the fluorophore is selected from the group consisting of a near-infrared fluorescent dye, dinitrophenyl, fluorescein and derivatives thereof, rhodamine, derivatives of rhodamine, phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin, o-phthaldehyde and fluorescamine, TEXAS RED<sup>TM</sup>, RHODAMINE GREEN<sup>TM</sup>, OREGON GREEN<sup>TM</sup>, CASCADE BLUE<sup>TM</sup>, phycoerythrin, CY3<sup>TM</sup>, CY5<sup>TM</sup>, CY2<sup>TM</sup>, CY7<sup>TM</sup>, coumarin, infrared 40, MR 200, IRD 40, ALEXA FLUOR<sup>TM</sup>, Tetramethylrhodamine, PACIFIC BLUE<sup>TM</sup>, SYBR<sup>TM</sup>, and BODIPY<sup>TM</sup>. In another case, the fluorophore includes one of the following compounds with their emission maxima indicated in nm in brackets, CY2<sup>TM</sup> (506), GFP (Red Shifted) (507), YO-PRO®-1 (509), YOYO®-1 (509), Calcein (517), FITC (518), FLUORX® (519), ALEXA® (520), Rhodamine 110 (520), 5-FAM (522), OREGON GREEN® 500 (522), OREGON GREEN® 488 (524),

94

RIBOGREEN® (525), RHODAMINE GREEN® (527), Rhodamine 123 (529),  
MAGNESIUM GREEN® (531), CALCIUM GREEN® (533), TO-PRO®-1 (533),  
TOTO®-1 (533), JOE (548), BODIPY® 530/550 (550), DiI (565), BODIPY® (568),  
BODIPY® 558/568 (568), BODIPY® 564/570 (570), CY3® (570), ALEXA® 546  
5 (570), TRITC (572), MAGNESIUM ORANGE® (575), Phycoerythrin R&B (575),  
Rhodamine Phalloidin (575), CALCIUM ORANGE® (576), Pyronin Y (580),  
Rhodamine B (580), TAMRA (582), RHODAMINE RED® (590), CY3.5® (596),  
ROX (608), CALCIUM CRIMSON™ (615), ALEXA® 594 (615), TEXAS RED™  
(615), Nile Red (628), YO-PRO®-3 (631), YOYO®-3 (631), R-phycocyanin (642),  
10 C-Phycocyanin (648), TO-PRO®-3 (660), TOTO®-3 (660), DiD DiIc(5) (665),  
CY5™ (670), Thiadicarbocyanine (671) and Cy5.5™ (694).

#### Therapeutic Methods of Use

**[00225]** In another aspect, provided are methods for inhibiting CCR2 activity by  
administering an anti-CCR2 antibody to a patient in need thereof. Any of the  
15 types of antibodies described herein may be used therapeutically. In various  
cases, the anti-CCR2 antibody is a human, chimeric or humanized antibody. In  
some cases, the antibody, or antigen-binding portion thereof, binds to the first  
and/or second extracellular loop of CCR2. The antibody, or antigen-binding  
portion thereof, preferably does not bind to the third extracellular loop or to the N-  
20 terminal domain of CCR2.

**[00226]** In still another case, the CCR2 is human and the patient is a human  
patient. Alternatively, the patient may be a mammal that expresses a CCR2 that  
the anti-CCR2 antibody cross-reacts with. The antibody may be administered to a  
non-human mammal expressing CCR2 with which the antibody cross-reacts for  
25 veterinary purposes or as an animal model of human disease. Such animal  
models may be useful for evaluating the therapeutic efficacy of antibodies.

**[00227]** In one aspect, methods are provided for treating, aiding in the treatment,  
preventing or aiding in the prevention of, a CCR2-mediated disorder in a subject  
by administering to the subject a therapeutically-effective amount of an anti-CCR2  
30 antibody. As used herein, the term "a CCR2-mediated disorder" is intended to  
include diseases and other disorders in which the presence of high levels of  
CCR2 expression or activity in a subject suffering from the disorder have been

95

shown to be, or are suspected of being, either responsible for the pathophysiology of the disorder or a factor that contributes to a worsening of the disorder. Such disorders may be evidenced, for example, by an increase in the levels of CCR2 on the cell surface in the affected cells or tissues of a subject suffering from the disorder, or by an increase in a CCR2-mediated activity in a cell type, such as in a basophil, monocyte or lymphocyte, that contributes to the pathology of the disorder or that contributes to the worsening of the disorder or by an increase in the level of CCR2 ligands, such as MCP-1, at an inflammatory site. The increase in CCR2 expression may be detected, for example, using an anti-CCR2 antibody.

An increase in CCR2 activity may be detected by an increase in activation of G-protein, F-actin polymerization or increased chemotaxis of CCR2-expressing cells, such as chemotaxis in response to MCP-1 or other CCR2 ligands.

**[00228]** In one aspect, the CCR2-mediated disorder is characterized by fibrosis.

The term "fibrosis" as used herein refers to a pathological condition characterized by excessive deposition and metabolism of fibrotic material (e.g., extracellular matrix) in response to tissue damage. In many cases, fibrosis represents a normal repair process (i.e., wound healing) gone awry due to chronic or excessive tissue insult leading to fibroblast or stellate cell activation and proliferation and collagen accumulation. Fibrosis conditions include fibroproliferative disorders that are associated with vascular diseases, such as cardiac disease, cerebral disease, and peripheral vascular disease, as well as all the main tissues and organ systems such as the eye, skin, kidney, lung, gut and liver (Wynn, *Nature Reviews* 4:583-594 (2004); Bataller, R and Brenner, D., *J. Clin. Invest.* 115:209-218 (2005)). Other sources are chemotherapeutic drugs, radiation-induced fibrosis, and injuries and burns. While fibrosis conditions cover a wide group of pathologies, it is believed that for most of these conditions, the general mechanisms leading to fibrotic tissue accumulation have many elements in common. Often the condition is initiated in response to an influx of inflammatory cells and perpetuated by the subsequent cytokine signaling pathways between the infiltrating cells (e.g., macrophages, T cells) and resident cells within the tissue (e.g., stellate, myofibroblast or Kupffer cells). For example, MCP-1 has been shown to play a role in several diseases of the lung (Rose CE Jr, Sung SS, Fu SM. *Microcirculation* 10:273-288 (2003)) and CCR2 deficient mice are protected

98

from development of lung fibrosis (Moore BB, et al. Protection from Pulmonary Fibrosis in the Absence of CCR2 Signaling. *J. Immunol.* 167: 4368-4377 (2001)), suggesting a key role of this receptor in the lung. Similarly, pericytes are a key fibrogenic cell type involved in the development of scleroderma and PDGF

5 receptor tyrosine kinase inhibitors (RTKI) have been shown to slow the proliferation of pericytes and suppress skin lesions in patients with this progressive disease. In the kidney, leukocyte infiltration plays a major role in mediating tubulointerstitial inflammation and fibrosis in chronic kidney disease. Vielhauer and colleagues have established that in a mouse model of obstructive  
10 nephropathy, expression of CCR2 and CCR5 on accumulating macrophages and CD3<sup>+</sup> lymphocytes correlates with progressive fibrosis at sites of tissue damage (Vielhauer V, et al. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12:1173-1187 (2001)).

**[00229]** As used herein the term "fibrosis" is also used synonymously with "fibroblast accumulation and collagen deposition". Fibroblasts are connective  
15 tissue cells, which are dispersed in connective tissue throughout the body. Fibroblasts secrete a nonrigid extracellular matrix containing type I and/or type III collagen. In response to an injury to a tissue, nearby fibroblasts or stellate cells migrate into the wound, proliferate, and produce large amounts of collagenous extracellular matrix. Collagen is a fibrous protein rich in glycine and proline that is  
20 a major component of the extracellular matrix and connective tissue, cartilage, and bone. Collagen molecules are triple-stranded helical structures called  $\alpha$ -chains, which are wound around each other in a ropelike helix. Collagen exists in several forms or types; of these, type I, the most common, is found in skin, tendon, and bone; and type III is found in skin, blood vessels, and internal organs.  
25 Exemplary fibrosis conditions include, but are not limited to, lung diseases associated with fibrosis, e.g., idiopathic pulmonary fibrosis, radiation induced fibrosis, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), scleroderma, bleomycin induced pulmonary fibrosis, chronic asthma, silicosis, asbestos induced pulmonary fibrosis, acute lung injury and acute respiratory distress (including  
30 bacterial pneumonia induced, trauma induced, viral pneumonia induced, ventilator induced, non-pulmonary sepsis induced, and aspiration induced); chronic nephropathies associated with injury/fibrosis (kidney fibrosis), e.g., lupus, diabetes, scleroderma, glomerular nephritis, focal segmental glomerular sclerosis,



IgA nephropathy, hypertension, allograft, Lupus, and Alport; gut fibrosis, e.g., scleroderma, and radiation induced gut fibrosis; liver fibrosis, e.g., cirrhosis, alcohol induced liver fibrosis, nonalcoholic steatohepatitis (NASH), biliary duct injury, primary biliary cirrhosis, infection or viral induced liver fibrosis (e.g. chronic HCV infection), and autoimmune hepatitis; head and neck fibrosis, e.g., radiation induced; corneal scarring, e.g., LASIX™, corneal transplant, and trabeculectomy; hypertrophic scarring and keloids, e.g., burn induced and surgical; and other fibrotic diseases, e.g., sarcoidosis, scleroderma, spinal cord injury/fibrosis, myelofibrosis, vascular restenosis, atherosclerosis, Wegener's granulomatosis, mixed connective tissue disease, and Peyronie's disease.

**[00230]** In one aspect, the CCR2-mediated disorder is characterized by pathological inflammation. The term "pathological inflammation" as used herein refers to an inappropriate and/or chronic inflammation associated with disorders including, but not limited to, asthma, atherosclerosis, AIDS dementia, diabetes, inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis, transplant rejection, graft versus host disease, multiple sclerosis (especially to inhibit further demyelination), tumors, tumor metastasis, nephritis, atopic dermatitis, psoriasis, myocardial ischemia and chronic prostatitis, obesity, metabolic syndrome. Such inflammation is characterized by a heightened response of inflammatory cells, including infiltrating leukocytes. Over time, such pathological inflammation often results in damage to tissue in the region of inappropriate inflammation. Accordingly, provided are methods of treating a subject having pathological inflammation comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody or antigen-binding portion thereof which binds to and inhibits CCR2.

**[00231]** The antibody or an antigen-binding fragments thereof, can also be used to treat disorders in which activation of the CCR2 by binding of chemokines, including MCP-1, MCP-2, MCP-3 and MCP-4, is implicated.

**[00232]** The antagonistic anti-CCR2 antibodies or antigen-binding fragments thereof (e.g., 4.40 and/or 4.9 or antigen-binding fragments thereof) can be used to treat inflammatory or allergic diseases and conditions, including respiratory allergic diseases such as asthma, allergic rhinitis, hypersensitivity lung diseases, hypersensitivity pneumonitis, interstitial lung diseases (ILD) (e.g., idiopathic pulmonary fibrosis, or ILD associated with rheumatoid arthritis, systemic lupus

98

erythematosus, ankylosing spondylitis, systemic sclerosis, Sjogren's syndrome, polymyositis or dermatomyositis), chronic obstructive pulmonary disease, anaphylaxis or hypersensitivity responses, drug allergies (e.g., to penicillin, cephalosporins), insect sting allergies, inflammatory bowel diseases, such as Crohn's disease and ulcerative colitis, spondyloarthropathies, scleroderma, psoriasis and inflammatory dermatoses such as dermatitis, eczema, atopic dermatitis, allergic contact dermatitis, urticaria, vasculitis (e.g., necrotizing, cutaneous, and hypersensitivity vasculitis).

**[00233]** The antagonistic anti-CCR2 antibodies or antigen-binding fragments

thereof (e.g., 4.40 and/or 4.9 or antigen-binding fragments thereof) can be used to treat autoimmune diseases. Examples of autoimmune disorders include, but are not limited to, Addison's Disease, hemolytic anemia, antiphospholipid syndrome, rheumatoid arthritis, dermatitis, allergic encephalomyelitis, glomerulonephritis, Goodpasture's Syndrome, Graves' Disease, Multiple Sclerosis, Myasthenia Gravis, Neuritis, Ophthalmia, Bullous Pemphigoid, Pemphigus, Polyendocrinopathies, Purpura, Reiter's Disease, Stiff-Man Syndrome, Autoimmune Thyroiditis, Systemic Lupus Erythematosus, Autoimmune Pulmonary Inflammation, Guillain-Barre Syndrome, insulin dependent diabetes mellitus, and autoimmune inflammatory eye disease.

**[00234]** In certain cases, the autoimmune disease treated with the antagonistic anti-CCR2 antibodies is Rheumatoid Arthritis (RA). A TH1 disorder, RA is a common human autoimmune disease with a prevalence of about 1% among Caucasians (Harris, B. J. *et al.*, 1997, In Textbook of Rheumatology 898-932), currently affecting 2.5 million Americans. RA is characterized by chronic inflammation of the synovial joints and infiltration by activated T cells, macrophages and plasma cells, leading to a progressive destruction of the articular cartilage. It is the most severe form of joint disease.

**[00235]** In still another aspect, the autoimmune disease treated with the antagonistic anti-CCR2 antibodies is Multiple Sclerosis (MS). MS, also a TH1 disorder, is the most common central nervous system (CNS) demyelinating disease, affecting 350,000 (0.1%) individuals in North America and 1.1 million worldwide. In general, MS is considered to be an autoimmune disease mediated in part by proinflammatory CD4 T (Th1) cells and monocytes that recognize

99

specific myelin polypeptides in association with MHC class II molecules expressed on antigen (Ag) presenting cells (APC).

**[00236]** The antagonistic anti-CCR2 antibodies or antigen-binding fragments thereof (e.g., 4.40 and/or 4.9 or antigen-binding fragments thereof) can be used to treat human type I or insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), a disease characterized by autoimmune destruction of the beta cells in the pancreatic islets of Langerhans. The depletion of beta cells results in an inability to regulate levels of glucose in the blood. In humans a long presymptomatic period precedes the onset of diabetes. During this period there is a gradual loss of pancreatic beta cell function. The development of disease is implicated by the presence of autoantibodies against insulin, glutamic acid decarboxylase, and the tyrosine phosphatase IA2 (IA2).

**[00237]** The antagonistic anti-CCR2 antibodies or antigen-binding fragments thereof (e.g., 4.40 and/or 4.9 or antigen-binding fragments thereof) also can be used to treat neuropathic pain. Mice lacking the CCR2 have been shown to have reduced neuropathic pain (Abbadie *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(13): 7947-52 (2003)). As used herein, the term "neuropathic pain" means pain resulting from injury to a nerve. Neuropathic pain is distinguished from nociceptive pain, which is the pain caused by acute tissue injury involving small cutaneous nerves or small nerves in muscle or connective tissue. Pain involving a nociceptive mechanism usually is limited in duration to the period of tissue repair and generally is alleviated by available analgesic agents or opioids as described in Myers, *Regional Anesthesia* 20:173-184 (1995). Neuropathic pain typically is long-lasting or chronic and often develops days or months following an initial acute tissue injury. Neuropathic pain can involve persistent, spontaneous pain as well as allodynia, which is a painful response to a stimulus that normally is not painful. Neuropathic pain also can be characterized by hyperalgesia, in which there is an accentuated response to a painful stimulus that usually is trivial, such as a pin prick.

**[00238]** The antagonistic anti-CCR2 antibodies are useful in alleviating neuropathic pain resulting from a disorder of peripheral nerve, dorsal root ganglia, spinal cord, brainstem, thalamus or cortex. The method is useful in alleviating neuropathic pain regardless of the etiology of the pain. For example, a method



can be used to alleviate neuropathic pain resulting from a peripheral nerve disorder such as neuroma; nerve compression; nerve crush, nerve stretch or incomplete nerve transection; mononeuropathy or polyneuropathy. A method also can be used to alleviate neuropathic pain resulting from a disorder such as

5 dorsal root ganglion compression; inflammation of the spinal cord; contusion, tumor or hemisection of the spinal cord; tumors of the brainstem, thalamus or cortex; or trauma to the brainstem, thalamus or cortex

**[00239]** The antagonistic anti-CCR2 antibodies or antigen-binding fragments thereof (e.g., 4.40 and/or 4.9 or functional fragments thereof) can be also be used

10 to treat atherosclerosis. Atherosclerotic plaque develops over several decades and involves inflammatory cell infiltration, smooth muscle cell proliferation, accumulation of extracellular matrix, fibrous cap formation, and angiogenesis. (Bayes-Genis *et al. Circ. Res.* 86:125-130 (2000)). Chemotaxis is involved in the early development of atherosclerosis. Cell populations migrate toward the inner

15 part of the vascular wall and originate the neointima, which leads to the formation of an atherosclerotic plaque. For example, monocyte chemotaxis is induced by monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), which is expressed early in the development of atherosclerosis in the injured arterial wall. (Furukawa *et al. Circ. Res.* 84:306-314 (1999); Han *et al. J. Lipid Res.* 40:1053 (1999)). Transplantation

20 of bone marrow from CCR2 *-/-* mice, but not from CCR2 *+/+* mice, into ApoE3-Leiden mice, a mouse strain susceptible for diet-induced atherosclerosis, decreases atherogenesis, suggesting that MCP-1 signaling through CCR2 contributes to atherosclerosis (Guo *et al. (2003) Arterioscler Thromb Vasc Biol.*;23(3):447-53). Accordingly, the CCR2 antagonist antibodies and in particular

25 the antagonist antibodies which bind to the first and/or second extracellular loop of CCR2, may be administered to a subject to reduce the incidence of, to treat, or to aid in the treatment of atherosclerosis.

**[00240]** The antagonistic anti-CCR2 antibodies or antigen-binding fragments thereof (e.g., 4.40 and/or 4.9 or antigen-binding fragments thereof) also can be

30 used to treat obesity. In obesity, adipose tissue has been demonstrated to contain large numbers of monocytes. These monocytes may contribute either to fat deposition or the development of various sequelae commonly associated with

101

Obesity commonly termed metabolic syndrome. Metabolic syndrome includes such alterations as the development of diabetes.

**[00241]** The antagonistic anti-CCR2 antibodies or antigen-binding fragments thereof (e.g., 4.40 and/or 4.9 or antigen-binding fragments thereof) can be also be used to treat stenosis or restenosis of the vasculature, particularly of the arteries, e.g., the coronary artery, such as stenosis or restenosis which results from vascular intervention (e.g., surgical, therapeutic or mechanical intervention), as well as neointimal hyperplasia. For example, restenosis, which typically produces a narrowing of the luminal opening of the vessel, can result from vascular injury including, but not limited to, that produced by vascular graft procedures, angioplasty, including angioplasty performed by balloon, atherectomy, laser or other suitable method (e.g., percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA)), stent placement (e.g., mechanical or biological endovascular stent placement), vascular bypass procedures or combinations thereof, as well as other procedures used to treat stenotic or occluded blood vessels.

**[00242]** The antagonistic anti-CCR2 antibodies or antigen-binding fragments thereof (e.g., 4.40 and/or 4.9 or antigen-binding fragments thereof) also can be used to treat graft rejection (e.g., in transplantation), including allograft rejection or graft-versus-host disease, and organ transplant-associated arteriosclerosis.

**[00243]** Antibodies and antigen-binding fragments thereof which are antagonists of CCR2 can be used as therapeutics for HIV infection. HIV-1 and HIV-2 are the etiologic agents of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in humans. AIDS results in part from the depletion of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in HIV infected individuals. HIV-1 infects primarily T lymphocytes, monocytes/macrophages, dendritic cells and, in the central nervous system, microglia. All of these cells express the CD4 glycoprotein, which serves as a receptor for HIV-1 and HIV-2. Efficient entry of HIV into target cells is dependent upon binding of the viral exterior envelope glycoprotein, gp120, to the amino-terminal CD4 domain.

**[00244]** Furthermore, CCR2 has been shown to act as a co-receptor for HIV-1 (Frade *et al.* (1997) *J Clin Invest.*;100(3):497-502). After virus binding, the HIV-1 envelope glycoproteins mediate the fusion of viral and host cell membranes to complete the entry process. Membrane fusion directed by HIV-1 envelope

102

glycoproteins expressed on the infected cell surface leads to cell--cell fusion, resulting in syncytia.

**[00245]** Antibodies and antigen-binding fragments thereof which are antagonists of CCR2 can be used as therapeutics for the treatment of a variety of ophthalmology conditions including Age Related Macular Degeneration (AMD), Uveitis, and Corneal Infections.

#### Age Related Macular Degeneration (AMD)

**[00246]** CCR2 has been shown to play role in the recruitment of macrophages in the development of choroidal neovascularization (CNV) that is observed in age related macular degeneration patients, as well as in angioid streaks, high myopia, ocular histoplasmosis patients (Tsutsumi, C. et al. *Journal of Leukocyte Biology* 74:25-32, 2003).

#### Uveitis

**[00247]** An association between single nucleotide polymorphisms of CCR2 and its ligand (MCP-1) has been demonstrated in patients with acute idiopathic anterior uveitis (Yeo, TK, et al. *Cytokine* 35:29-35 2006) and idiopathic immune-mediated posterior segment uveitis Ahad, MA, et al. *Mol Vis* 13:388-396 2007)

#### Corneal Infections (bacterial):

**[00248]** CCL2 has been shown to play a role in the regulation of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) recruitment during corneal infection (Xue, M. L, et al. *Immunology and Cell Biology* 85:525-531 2007). While PMNs are essential for eliminating bacteria and promoting wound healing in the cornea the persistence of these cells may result in chronic inflammatory disease.

**[00249]** Antibodies and antigen-binding fragments thereof which are antagonists of CCR2 can be used as therapeutics for the treatment of a variety of solid tumors and cancers, including chronic lymphocytic leukemia, chronic myelocytic leukemia, multiple myeloma, malignant myeloma, Hodgkin's disease, and carcinomas of the prostate, bladder, breast, cervix, colon, lung, liver or stomach solid tumors and cancers.

(03)

### Prostate Cancer

[00250] MCP-1 has been shown to act as a paracrine and autocrine factor for prostate cancer growth and invasion (Lu, Y. et al. *The Prostate* 66:1311-1318, 2006) and CCR2 expression has been shown to correlate with prostate cancer progression (Lu, Y. et al. *Journal of cellular biochemistry* 101:676-685, 2007). Systemic delivery of neutralizing anti-MCP-1 antibodies has been shown to induce prostate cancer tumor regression in mice (Loberg, R. D., *Cancer Res* 67:9417-9424 2007).

### Breast Cancer

[00251] Tumor associated macrophages are thought to play a critical role in tumor immune surveillance and development and the activation and recruitment of lymphocytes are regulated by chemokines including MCP-1. A significant association has been demonstrated for CCR2 polymorphism in breast cancer (Zafiroopoulos, A., N. et al. *Journal of medical genetics* 41:e59 2009). The CCL2/CCR2 pathway has also been shown to play a pivotal role in the recruitment to cancers, including breast, ovarian and gastric cancers, of myeloid suppressor cells, which promote tumor progression, angiogenesis and vasculoangiogenesis (Huang, B., et al. *Cancer letters* 252:86-92, 2007).

### Melanoma

[00252] Blocking of MCP-1 function has also been shown to inhibit the recruitment of tumor associated macrophages and prevent tumor angiogenesis and growth in malignant melanoma in mice (Koga, M. et al. *Biochemical and biophysical research communications* 365:279-284, 2008).

### Liver Cancer

[00253] Blocking of CCR2 has been shown to reduce trafficking of hepatic stellate cells, a main source of matrix metalloproteinase 2, which facilitates neovascularization during liver tumor formation (Yang, X. et al. *International journal of cancer* 118:335-345, 2006).

004

Cervical Cancer

[00254] CCR2 has been shown to play a role in macrophage recruitment leading to tumor angiogenesis in the development of cervical neoplasia from squamous intraepithelial lesions (Coelho, A., et al. *Gynecologic oncology* 96:760-764, 2005; 5 .Coelho, A., et al. *Gynecologic and obstetric investigation* 64:208-212, 2007).

Ovarian Cancer

[00255] The CCL2/CCR2 pathway has also been shown to play a pivotal role in the recruitment to cancers, including breast, ovarian and gastric cancers, of 10 myeloid suppressor cells, which promote tumor progression, angiogenesis and vasculoangiogenesis (Huang, B., et al. *Cancer letters* 252:86-92, 2007).

[00256] The antibody may be administered once or multiple times. The antibody may be administered from four times daily to once every six months or longer. 15 The administering may be on a schedule such as three times daily, twice daily, once daily, once every two days, once every three days, once weekly, once every two weeks, once every month, once every two months, once every three months and once every six months. The antibody may also be administered continuously via a minipump. The antibody may be administered via a mucosal, buccal, 20 intranasal, inhalable, intravenous, subcutaneous, intramuscular, parenteral, intratumor or topical route. The antibody may be administered locally or systemically.

[00257] The antibody may be administered once, at least twice or for at least the period of time until the condition is treated, palliated or cured. The antibody will 25 generally be administered as part of a pharmaceutical composition as described herein. The dosage of antibody will generally be in the range of 0.1-100 mg/kg, 0.5-50 mg/kg, 1-20 mg/kg, or 1-10 mg/kg. The serum concentration of the antibody may be measured by any method known in the art.

[00258] The examples below are for illustration only and are not to be construed 30 as limiting the scope in any manner.



105

EXAMPLE 1Generation of Hybridomas Producing Anti-CCR2 Antibody

**[00259]** Eight to ten week old XENOMOUSE™ mice that produce human IgG2 and IgG4 antibodies were immunized in their hind footpads with 300-19 cells  
5 transfected with CCR2B (Genbank MN000648, SEQ ID NO:204) ( $10^7$  cells/dose/mouse in TITERMAX™ Gold Adjuvant, Sigma, Catalog # T2684, lot # K1599; prepare 50/50 volume). The mice received five to nine booster injections in Aluminium Phosphate Gel Adjuvant (Catalog # 1452-250, batch #8937, HCl Biosector (5ul/mouse/boost)) and qCpG (IMMUNEASY™ Mouse Adjuvant)  
10 (Catalog # 303101; lot #11551249; Qiagen (15ul/mouse/boost)) over a three to eight week period. Four days before fusion, the mice were given a final injection in PBS. The spleen and lymph node lymphocytes from immunized mice were collected and fused with the non-secretory myeloma P3-X63-Ag8.653 cell line. The fused cells were subjected to HAT selection as previously described (Galfre  
15 and Milstein, *Methods Enzymol.* 73:3-46 (1981)). A panel of hybridomas all secreting CCR2-specific human antibodies was recovered. A number of antibodies were identified for binding to CCR2 as assessed by FACS analysis. Hybridomas were selected for further study, some of which are listed in Table 6.

**[00260]** The hybridomas indicated in Table 2 were deposited under terms in  
20 accordance with the Budapest Treaty with the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209. The hybridomas have been assigned the following accession numbers:

106

Table 2

| Antibody | Mouse<br>Hybridoma<br>Cell Line<br>Designation | Strain<br>Designation | ATCC<br>Designation | Deposit Date   |
|----------|------------------------------------------------|-----------------------|---------------------|----------------|
| 4.9.3    | PF11-4.9.3                                     | LN 15923              | PTA-6979            | Sept. 16, 2005 |
| 4.22.3   | PF11-4.22.3                                    | LN 15924              | PTA-6980            | Sept. 16, 2005 |
| 4.40.3   | PF11-4.40.3                                    | LN 15925              | PTA-6981            | Sept. 16, 2005 |
| 7.123.1  | PF11-7.123.1                                   | LN 15931              | PTA-7341            | Jan. 25, 2006  |
| 8.19.1.1 | PF11-8.19.1.1                                  | LN 15932              | PTA-7342            | Jan. 25, 2006  |

EXAMPLE 2

Sequencing of Anti-CCR2-Antibodies

- 5 [00261] To analyze the structure of antibodies produced, nucleic acids were cloned that encode heavy and light chain variable domain containing fragments from hybridomas producing anti-CCR2 monoclonal antibodies. The light chains and the light chains of the CCR2 antibodies were cloned and sequence verified as exemplified for the 4.40.2 antibody as follows:
- 10 Poly(A)<sup>+</sup> mRNA was isolated using an RNEASY™ MINI KIT (Qiagen) and cDNA synthesized from the mRNA with the ADVANTAGE RT-for-PCR kit (BD Biosciences) using oligo(dT) priming. The oligo(dT) primed cDNA was amplified for clone 4.40.2 using the primers listed in Table 3. Amplification was achieved using the PFUULTRA HIGH-FIDELITY Polymerase (Stratagene) and a PTC-200
- 15 DNA Engine (MJ Research) with cycling as follows: 2' at 95°C; 25X (20" at 95°C, 30" at 55°C, 30" at 72°C); 10' at 72°C. PCR amplicons were cloned into the heavy and light chain expression vectors. Vectors were then transformed into MAX EFFICIENCY DH5α chemically competent cells (Invitrogen) using the standard protocol. Clones were sequence verified using Grills 16<sup>th</sup> BDTv3.1/dGTP
- 20 chemistry (Applied Biosystems Inc) and a 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems Inc). From the nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of the antibodies, the gene usage was identified for each antibody

107

chain. Alignments to the "V Base sequence directory" (MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK; Tomlinson, et al., J. Mol. Biol., 227, 776–798 (1992); Hum. Mol. Genet., 3, 853–860 (1994); EMBO J., 14, 4628–4638 (1995)) were made using MACVECTOR™ and GENEWORKS™ software programs  
5 (Oxford Molecular Group, Campbell, CA, USA).

Table 3: Variable Domain Primers Designed for Amplifying 4.40.2 (5' to 3')

|                  |        |                                                |
|------------------|--------|------------------------------------------------|
| CCR2_440_VH_G2_F | VH3.30 | CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG<br>(SEQ ID NO:147)     |
| CCR2_440_VH_G2_R | JH3b   | GAAGAGACGGTGACCATTGTCCCTT<br>(SEQ ID NO:148)   |
| CCR2_440_VL_K_F  | A26    | GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGAC<br>(SEQ ID NO:149) |
| CCR2_440_VL_K_R  | JK4    | GTTTGATCTCCACCTTGGTCCCTC<br>(SEQ ID NO:150)    |

[00262] Table 4 sets forth the gene utilization of selected hybridoma antibody  
10 clones.

Table 4

Heavy and Light Chain Gene Utilization

| Clone  | Heavy Chain Germline |                |                | Kappa Light Chain Germline |                |
|--------|----------------------|----------------|----------------|----------------------------|----------------|
|        | V <sub>H</sub>       | D <sub>H</sub> | J <sub>H</sub> | V <sub>K</sub>             | J <sub>K</sub> |
| 4.9.3  | VH3-30               | D1-7           | JH3B           | O12                        | JK2            |
| 4.22.3 | VH1-46               | D1-7           | JH3B           | A1                         | JK5            |
| 4.39.3 | VH1-46               | D1-7           | JH3B           | B3                         | JK1            |
| 4.40.3 | VH3-30               | D1-7           | JH3B           | A26                        | JK4            |

15 [00263] Hybridoma clones were generated in IgG4 mice and once the sequences were obtained the variable domains were cloned into IgG1, IgG2, and IgG4 format expression vectors for comparison.

108

EXAMPLE 3

Mutagenesis of Anti-CCR2-Antibodies

Reversion to germline sequence in light chain variable region

[00264] The alanine residue at position 68 in the light chain of CCR2 4.40.2 was  
5 reverted to the germline residue, glycine, by site-directed mutagenesis as follows.  
The point mutation in the codon for amino acid residue 68 was changed using the  
primers in Table 5. Site-directed mutagenesis was performed using a  
QUIKCHANGE™ II Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) with the standard  
10 protocol including the following modifications to cycling: 2' at 96°C; 16X (50" at  
96°C, 10" at 68°C); 10' at 68°C. Mutagenized vector was transformed into XL1-  
Blue supercompetent cells. To verify that mutagenesis was successful, clones  
were sequenced using Grills 16<sup>th</sup> BDTv3.1/dGTP chemistry (Applied Biosystems  
Inc.) and a 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems Inc.).

Table 5: Mutagenesis Primers (5' to 3')

|                    |                                                         |
|--------------------|---------------------------------------------------------|
| CCR2_440_VK_G68A_F | GGCAGTGGATCTG <u>GG</u> ACAGATTTCACC<br>(SEQ ID NO:151) |
| CCR2_440_VK_G68A_R | GGTGAAATCTGTCC <u>C</u> AGATCCACTGCC<br>(SEQ ID NO:152) |

\*Changed nucleotide is bolded and underlined.

[00265] The resulting antibody was designated 4.40 A68G (SEQ ID NO:112),  
having a glycine at position 68 of the light chain variable region.

Generation of IgG4 heavy chain constant region with hinge-stabilizing mutation

[00266] The IgG4 heavy chain constant regions were isolated from a pCON-  
G4(pro) (Lonza, Basel, Switzerland) derived IgG4 expression vector, which has a  
hinge region stabilizing mutation from germline, Serine to Proline at amino acid  
230 (Angal, S. et al. *Molecular Immunology* 30:105-108 (1993)), in the context of  
25 the IgG4 L309 allotype (Brusco A. et al., *Eur J. Immunogenetics* 25:349-355  
(1998)).

[00267] A silent mutation (Lys, AAG→AAA) was introduced by PCR mutagenesis  
into the 11<sup>th</sup> nucleotide residue of the G4 CH1 exon of pCON-G4(pro) vector, to

109

remove an Apal recognition site to facilitate subcloning, using the following amplification primers:

**G4\_Foward**

ttatgctgggcccagctctgtccacaccgcgggtcacatggcaccacctctcttgcaGCTTCCACC  
5 AAAGGCCCATCCGTCTTCCCCC (SEQ ID NO:153)

(Hybridizing bases in CAPS (mutation of residue #11 of CH1 is BOLDDED); Non-hybridizing bases in lowercase)

**G4\_Reverse:**

tcatattctctagaTCATTTACCCAGAGACAGGGAGAGG (SEQ ID NO:154)

10 (Hybridizing bases in CAPs. Non-hybridizing bases with Xbal site in lowercase)

**[00268]** Amplification was achieved using Expand Hi-Fi Polymerase (Roche) and a PTC-200 DNA ENGINE™ (MJ Research) with thermal cycling as follows: 3' at 95°C; 22X (20" at 95°C, 30" at 58°C, 2'10" at 72°C); 10' at 72°C.

**[00269]** Another silent mutation (Thr, ACC→ACA) was introduced by PCR  
15 mutagenesis at nucleotide residue 209 of the G4 CH1 exon of the pCON-G4(pro) vector to remove a BstEII site in order to facilitate use of that enzyme for subcloning variable regions into the expression vector using the following primers:

**G4delBst\_F**

CAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCAG (SEQ ID NO:155)

20 **G4delBst\_R**

CTGCTGGAGGGCACTGTCACCACGCTG (SEQ ID NO:156).

**[00270]** Amplification was achieved using the QUIKCHANGE™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) and a PTC-200 DNA Engine (MJ Research) with thermal cycling as follows: 1' at 96°C; 14X (50" at 96°C, 15'48" at 68°C); 10' at  
25 72°C.

**[00271]** The resulting IgG4 constant region comprising the hinge region mutation and the two silent mutations, referred to as S230P, was then subcloned as an Apal/Xbal fragment into the Apal/Xbal sites of a DHFR antibody expression vector. The heavy chain variable region of the 4.40.2 antibody was then cloned  
30 into the expression vector comprising the G4 S230P constant region resulting in a full-length heavy chain construct. The 4.40 derived antibody having the light chain variable region A68G germline substitution and the heavy chain hinge region S230P substitution was designated 4.40 A68G S230P having the light chain

110  
amino sequence of SEQ ID NO:112 and the heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:116.

[00272] Supernatants from cells transfected with the expression vectors were collected and purified by standard Protein A affinity chromatography to isolate  
5 recombinant immunoglobulins. These proteins were then characterized by SDS-PAGE, light scatter, and spectrophotometry.

#### EXAMPLE 4

##### *In vitro* binding

10 [00273] Figure 1 shows the *in vitro* binding of AF-488 conjugated antibody 4.40 A68G S230P to human monocytes in whole blood (Figure 1A), to CCR2-transfected 300-19 cells (Figure 1B), and binding of different concentrations of 4.40 A68G S230P antibody to CCR2-transfected 300-19 cells as detected with anti-human PE (Figure 1C). Briefly, 1 million cells in a volume of 100ul were  
15 stained with the test antibody using Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, containing 2% heat inactivated Fetal Bovine Serum and 0.002% Sodium Azide. Fifteen minutes later, a secondary detection antibody was added. After 30 minutes, cells were washed in buffer, resuspended in 500ul and assessed for staining on a FACS CALIBUR. A total of 10,000 events per tube were assessed.  
20 The mean channel fluorescent intensity was assessed for each concentration of antibody as an indicator for the magnitude of staining.

#### EXAMPLE 5

##### Determination of Affinity Constants ( $K_D$ ) of Anti-CCR2 Monoclonal Antibodies

25 [00274] To assess the  $K_D$  of the antibodies for the CCR2, antibody binding to 300-19 cells expressing CCR2 was assessed by FACS in a 3 hour assay. Briefly, using a buffer of Dulbecco's Phosphate Buffered Saline containing 2% heat inactivated Fetal Bovine Serum, 0.002% Sodium Azide and 0.005mg/ml Cytochalasin-B (Sigma 6762), 1 million cells in a volume of 100ul were stained  
30 with the test antibody. Fifteen minutes later, a secondary detection antibody, R-Phycoerythrin conjugated Affini-pure F(ab') fragment Donkey anti-human IgG H+L (Jackson 709-116-149), was added. Tubes were gently shaken for 3 hours at room temperature. After 2 washes in buffer, cells were resuspended in 500ul of

buffer and assessed on a FACS CALIBUR™. A total of 10,000 events per tube were assessed. The mean channel fluorescent intensity was assessed for each concentration of antibody as an indicator for the magnitude of staining. These binding studies demonstrated that the 4.40 A68G S230P antibody binds to human CCR2 on transfected cells with a  $K_D$  of 0.085 ug/mL (0.58nM) (Figure 2). When saturation binding was assessed on cells expressing a CCR2/CCR5 chimera receptor having the first and second extracellular loops of the CCR2 (see Example 7), a similar concentration curve and  $K_D$  ( $K_D$  = 0.023 ug/mL (0.16nM)) were obtained as shown in Figure 6C.

### EXAMPLE 6

#### Inhibition of MCP-1 induced Chemotaxis

[00275] Human anti-CCR2 antibodies were evaluated for their ability to inhibit the chemotaxis of THP-1 monocytes (ATCC # TIB 202), in response to the CCR2 ligand, MCP-1 (CCL2). Chemotaxis was conducted in 96 well chemotaxis chambers purchased from NeuroProbe, Inc. (Gaithersburg, MD) as previously described (see Gladue RP *et al.*, *J Biol Chem* 278:40473-40480 (2003)). Briefly, CCL2 was diluted in RPMI 1640 medium (Roswell Park Memorial Institute) containing 0.1% BSA, and then added to the bottom wells of the chamber. A filter with 5  $\mu$ m pores (Neuroprobe) was placed between the upper and lower wells of the chamber. THP-1 cells were then added to the top chamber ( $8 \times 10^5$ ) in the presence or absence of various concentrations of the test antibodies. The apparatus was incubated for 3 hrs in a 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator at 37°C. After the incubation period, the non-migrating cells were removed from the upper chamber and the top of the filter was wiped. 2 mM cold EDTA was then added to the upper wells, and the chemotaxis chamber was incubated at 4°C for 20 minutes. The EDTA was then removed and the 96 well microtiter plate was centrifuged at 800 x g for 10 minutes. The filter was then removed, the culture medium discarded, and 0.2% FDA was added to the plates. The plates were then incubated for 1.5 hours at 37°C until a yellow color developed. The number of migrating cells was quantified by reading the intensity of the color on a microtiter plate reader at 490 nm. As shown in Table 6, several antibodies that inhibited THP1 chemotaxis to different degrees were identified.

C128

Table 6: Inhibition of MCP-1-induced THP-1 Chemotaxis

| Antibody Clone | IC50 (ug/ml) |
|----------------|--------------|
| 4.40.3         | 0.137        |
| 4.22.3         | 0.138        |
| 4.39.3         | 0.139        |
| 4.9.2          | 0.198        |
| 4.6.3          | 0.400        |
| 4.48.3         | 0.491        |
| 4.41.1         | 0.521        |
| 4.3.1          | 0.618        |
| 4.52.1         | 0.641        |
| 4.59.2         | 1.020        |
| 4.24.3         | 2.264        |

5 [00276] Similarly, the antibody 4.40 A68G S230P inhibited chemotaxis of THP-1 monocytes in response to MCP-1 (IC50 = 0.148 ug/ml) but not the CCR1/CCR5 ligand MIP-1, as shown in Figure 3.

Primary Monocyte Chemotaxis

10 [00277] Heparinized human whole blood was layered over ACCUSPIN HISTOPAQUE 1077 tubes (Sigma; St. Louis, MO) and spun down. The mononuclear cell fraction was collected and washed 3X with PBS, red blood cells (RBC's) were lysed with water, and the cells were resuspended at 4 x 10<sup>6</sup>/ml in RPMI (Gibco; Grand Isle, NY) with 0.1% BSA (Sigma) and 10 mM HEPES

15 (Gibco). Antibody dilutions or KLH control were added to 0.25 nM MCP-1 (Peprotech; Rocky Hill, NJ) and 30 ul were placed in the bottom of a 48 well Boyden chamber (Neuroprobe; Gaithersburg, MD); negative control was media alone. A 5 um PVP-free filter (Neuroprobe) was placed over this and the chamber sealed. Isolated mononuclear cells were incubated with antibody dilutions or KLH

20 control for 30 minutes at room temperature. Then 50 ul were added to the upper wells. The chamber was incubated for 90 minutes at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator. After incubation, the cells were aspirated out of the upper wells, the top of the filter was wiped, air-dried, stained with DIFF-QUIK™ (Dade-Behring; Newark, DE), and the number of migrating cells in 6 fields were counted.



The inhibition of chemotaxis of primary isolated human monocytes in response to MCP-1 by antibody 4.40 A68G S230P is shown in Figure 4.

[00278] Further, as exemplified with the 4.40 antibody, no inhibition of THP-1 cells was observed to the CCR1/CCR5 ligand MIP-1a (Figure 3).

5

EXAMPLE 7

CCR2/CCR1 Chimera Construction

[00279] Antibodies that inhibited MCP-1-induced chemotaxis were tested for binding to CCR2 chimeras to map their epitopes. This was accomplished by assessing the binding of the antibodies to 300-19 cells expressing different receptor chimeras consisting of extracellular loop (1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and/or 3<sup>rd</sup>) and N-terminal substitutions of the CCR2 with portions of the CCR1 (M = CCR2, R = CCR1).

10

15 Construction of chimera receptor MRRR

[00280] The MRRR chimeric receptor (N-terminus of CCR2 (M), 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, and 3<sup>rd</sup> extracellular loop of CCR1 (R) was constructed using the QUIKCHANGE® Site-Directed mutagenesis kit from Stratagene and the following mutagenesis primers to mutate the first ApaL restriction enzyme site in wild type human CCR1, cloned into the expression vector pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) to a BamHI site using the following primers:

20

sense primer 40A:

CGAGAGGGCCTTTGGGATCCAACTGCTGCC (SEQ ID NO:132)

anti-sense primer 40B:

25

GGCAGCAGTTGGATCCCAAAGGCCCTCTCG (SEQ ID NO:133)

[00281] The chimeric receptor containing a FLAG-tagged MMRR chimera (N-terminus and 1<sup>st</sup> extracellular loop of CCR2, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> extracellular loops of CCR1) cloned into pCMV-1 derived expression vector (Pharmacia; Piscataway, NJ) was provided by Israel Charo of the J. David Gladstone Institutes. The construction of the MMRR chimera (referred to as "2211" by the authors) is described in Montecarlo F. S. et al. (*Methods in Enzymology* 228:70-84 (1997)).

30

114

The first ApaL site in the chimera was mutated to a BamHI site using the following mutagenesis primers:

Sense primer: 41A:

GCAAATTGGGATCCAACTCCTGCC (SEQ ID NO:134)

5 Anti-sense primer: 41B:

GGCAGGAGTTGGATCCCAATTTGC (SEQ ID NO:135).

[00282] Each resulting mutated clone was cut with NdeI and BamHI. The fragment containing the vector from the CCR1/pcDNA3 BamHI mutant and the 632 basepair NdeI/BamHI fragment containing just the CCR2 N-terminus from the mutated MMRR/pcMV1 plasmid were gel isolated and ligated together resulting in the MMRR/pcDNA3 chimera.

[00283] The BamHI site in the MMRR chimera was mutated back to an ApaL site using the following mutagenesis primers:

Sense primer 41C:

15 GCAAATTGGGGCCCAACTGCTGCC (SEQ ID NO:136)

Anti-sense primer 41D:

GGCAGCAGTTGGGGCCCAATTTGC (SEQ ID NO:137).

[00284] The complete MMRR fragment was PCR amplified using sense primer 66C (SEQ ID NO:138) homologous to the FLAG tag region of the vector and anti-sense primer 66D (SEQ ID NO:139) homologous to the 3' end of CCR1 and containing a HindIII site.

Sense primer 66C

CTCTTGTCAGGGGTGTGGTCTCCGA (SEQ ID NO:138)

Anti-sense primer 66D

25 GATCGAAGCTTTCAGAACCCAGCAGAGATTCATG (SEQ ID NO:139)

[00285] This fragment was then subcloned into the PflMI and HindIII sites of a pMIG (Van Parijs, L. et al., *Immunity* 11:281-188 (1999)) derived retroviral construct (Figure 5), replacing an inserted gene (a mouse/human chimera) that was preceded by a FLAG tag followed by the SalI site and had the internal ribosomal entry site-enhanced green fluorescent protein site (IRESEGFP) removed.

115

Construction of chimera receptor RRRM and RMMR

[00286] The RRRM (N-terminus, 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> extracellular loops of CCR1, and 3<sup>rd</sup> extracellular loop CCR2) and RMMR (N-terminus and 3<sup>rd</sup> extracellular loop CCR1, and 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> extracellular loops of CCR2) chimeric receptors were made using a two step PCR method.

[00287] For the RRRM chimera, the third loop of human wild type CCR2 was first PCR amplified using the following primers:

Sense chimeric primer 89A:

GACTATACTTATTTCTGTTTTCATTGTCATTCTCCTGAACACC (SEQ ID NO:140)

Anti-sense primer 81B:

CGCCAAGCTTCATTATAAACAGCCGAGA (SEQ ID NO:141).

The wild type human CCR2 was cloned into retroviral-derived expression vector pMIG as a template. The N-terminal region through the second extracellular loop was PCR amplified using the following primers:

Sense primer 89C:

ACGCGTCGACGAAACTCCAAACACCACAGAG (SEQ ID NO:142)

Anti-sense chimeric primer 89B:

GTTTCAGGAGAATGACAATGAAAACAGAAATAAGTATAGTC (SEQ ID NO:143),

and wild type CCR1 was cloned into the expression vector pcDNA3 as a template.

[00288] These fragments were gel purified, combined and PCR-amplified together using the 5' and 3' end primers: 89C (SEQ ID NO:142) and 81B (SEQ ID NO:141). The resulting fragment was ligated into the Sall/HindII sites of the retroviral vector, pMIG containing an N-terminal FLAG tag and having the IRESE GFP removed.

Construction of the chimera receptor RMMR

[00289] The CCR1 third extracellular loop through the cytoplasmic tail was PCR-amplified using wild type CCR1 cloned into the expression vector pcDNA3 as a template and the following primers:

Sense chimeric primer 85A:

TCATTCTCCTGAACACCTTCCAAGACTTCCTGTTACCCCA (SEQ ID NO:144)

Anti-sense primer 78D:

GCCAAGCTTCCAGTGTGATGGATATCTGA (SEQ ID NO:145),

118

which hybridizes to an area of the vector 3' of the insert in the wild type CCR1/pcDNA3 plasmid.

[00290] A second fragment was PCR-amplified containing the N-terminus of CCR1 and an area containing the first and second extracellular loops of CCR2 using a FLAG tagged RMMM/pcDNA3 plasmid obtained from Israel Charo of the J. David Gladstone Institutes as a template. The construction of the RMMM chimera construct (referred to as "2111" by the authors) is described in Montecarlo, F. S. et al. (*Methods in Enzymology* 228:70-84 (1997)). The primers used were sense primer 66C (SEQ ID NO:138), which hybridizes to the FLAG tag and the anti-sense chimeric primer 85B:

TGGGTGAACAGGAAGTCTTGGAAGGTGTTTCAGGAGAATGA (SEQ ID NO:146).

These two fragments were gel purified, combined and PCR-amplified together using the 5' and 3' end primer: 66C (SEQ ID NO:138) and 78D (SEQ ID NO:144). This final fragment was digested with PflMI and HindIII and ligated into the pMIG retroviral vector containing a N-terminal FLAG tag and having the IRESEGFP removed.

#### Chimera expression

[00291] Retrovirus was produced from each chimera construct and used to transduce 300-19 cells. Expression was determined by FACS analysis using anti-FLAG epitope antibody M1 (Sigma; St. Louis, MO, catalog # F3040).

### EXAMPLE 8

#### Epitope mapping

[00292] Binding of antibodies to the CCR2/CCR1 chimeric receptors was assessed using FACS analysis. All receptors were tagged at the N-terminus with FLAG and also stained with the anti-FLAG antibody M1 such that receptor expression could be confirmed. Figures 6A & B illustrate the FACS staining of FLAG on the N-terminus with M1 antibody (Figure 6A) as compared to the staining of 4.40 (Figure 6B). Figure 6C illustrates a saturation binding curve of the 4.40 A68G S230P antibody on RMMR chimera transfected 300-19 cells. Saturation binding of the 4.40 A68G S230P antibody to 300-19 cells not transfected with CCR2 showed no binding at concentrations up to 10 ug/mL

117

(Figure 7A) while 300-19 cells transfected with fully human CCR2 displayed dose-dependent binding at concentrations above 0.01 ug/mL (Figure 7B). Moreover, saturation binding of the 4.40 A68G S230P antibody to chimeric receptors expressing only the N-terminus of CCR2 (MRRR) together with the 3 loop regions of CCR1 (Figure 7C) or the 3rd extracellular loop of CCR2 with the N-terminus and 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> loop regions of CCR1 (RRRM) failed to exhibit any significant binding at concentrations up to 10 ug/mL (Figure 7D). By contrast, saturation binding of the 4.40 A68G S230P antibody to chimeric receptors expressing the N-terminus and 3<sup>rd</sup> loop region of CCR1 and the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> loop regions of CCR2 (RMMR) showed significant dose-dependent binding at concentrations above 0.001 ug/mL (Figure 7E). Receptor expression on all of these receptor transfectants was confirmed by assessing the staining of FLAG on the N-terminus with an M1 antibody (Sigma #F3040).

Table 7: Epitope mapping

| Clone  | Full Length CCR2 (MMMM) | N-terminus of CCR2 (MRRR) | 1 <sup>st</sup> , 2 <sup>nd</sup> , and 3 <sup>rd</sup> loops of CCR2 (RMMM) | 1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup> loops of CCR2 (RMMR) | Chemotaxis IC50 (µg/ml) | Epitope                               |
|--------|-------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
| 4.40.2 | +                       | -                         | +                                                                            | +                                                        | 0.130                   | 1 <sup>st</sup> /2 <sup>nd</sup> loop |
| 4.9.2  | +                       | -                         | +                                                                            | +                                                        | 0.198                   | 1 <sup>st</sup> /2 <sup>nd</sup> loop |
| 4.52.3 | +                       | +                         | -                                                                            |                                                          | 0.642                   | N-terminus                            |
| 4.22.3 | +                       | -                         | +                                                                            | -                                                        | 0.137                   | 3 <sup>rd</sup> loop                  |
| 4.6.3  | +                       | +                         | +                                                                            |                                                          | 0.400                   | complex*                              |
| 4.48.3 | +                       | +                         | +                                                                            |                                                          | 0.491                   | complex                               |
| 4.3.1  | +                       | +                         | +                                                                            |                                                          | 0.618                   | complex                               |
| 4.59.2 | +                       | +                         | +                                                                            |                                                          | 1.020                   | complex                               |
| 4.41.1 | +                       | -                         | -                                                                            |                                                          | 0.521                   | complex                               |
| 4.24.3 | +                       | -                         | -                                                                            |                                                          | 2.264                   | complex                               |
| 4.39.3 | +                       | -                         | -                                                                            | -                                                        | 0.139                   | complex                               |

\*Complex = binds to wild type but does not bind to the chimeras

118

### Peptide ELISA

[00293] In addition, epitope binding to the first and/or second loop of CCR2 was also assessed using a peptide ELISA. A Reacti-Bind NEUTRAVIDIN™ Coated, High Binding Capacity ELISA plate (Pierce; Rockford, IL) was washed 3X with PBS/0.05% Tween20 and then coated with 100ul/well of 6 ug/ml biotinylated CCR2 loop 2 (SEQ ID NO:129) or loop 3 (SEQ ID NO:130) peptide (AnaSpec; San Jose, CA). The plate was incubated for 1 hour and then washed 3X. The CCR2 antagonist antibody 4.40.3 A68G S230P or other primary antibody, diluted in PBS/0.1% BSA/0.05% Tween20, was then added to the plate in serial dilution and incubated for 1 hour, as were other controls. The plate was washed 3X and 100ul/well HRP-Mouse anti-Human IgG4 secondary antibody (Zymed; So. San Francisco, CA) was added to all the wells at 1:5000 dilution and incubated for 1 hour. The plate was washed 3X and TMB substrate was added to all the wells and incubated for ~30 minutes. The color reaction was stopped with 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the absorbance reading was measured on a plate reader at 450nm (Figure 8). Antibodies, including antibodies 4.9 and 4.40, were identified that bound to the second extracellular loop peptide of the receptor and did not bind to the third loop.

### EXAMPLE 9

#### Binding Selectivity

[00294] The selectivity of the 4.40 A68G S230P antibody for human CCR2 was confirmed by the absence of binding to a closely related chemokine receptor, CCR5, as shown in Figure 9 and by the lack of inhibition of chemotaxis induced by the CCR5/CCR1 ligand MIP-1a (Figure 3). An anti-CCR5 antibody (Pharmingen, catalog #555992) bound to cells expressing CCR5 (Figure 9b) while the CCR2 antibody 4.40.3 A68G S230P showed no binding to these same cells (Figure 9a). For these studies, 300.19 cells engineered to express CCR5 were incubated with either the CCR2 selective antibody, 4.40 A68G S230P, or the CCR5-selective antibody for 30 minutes. Cells were then washed in FACS buffer (0.02% sodium azide, 2% heat inactivated fetal bovine serum in PBS) and analyzed for cell surface expression using a flow cytometer using standard methods.

119

### EXAMPLE 10

#### Calcium Mobilization

**[00295]** To determine if antibody 4.40 acts as a functional antagonist on CCR2 and does not possess any significant agonist properties, the effects of 4.40.3 on calcium mobilization of CCR2 transfected 300-19 cells was tested as previously described (Gladue RP *et al.*, *J Biol Chem* 278:40473-40480 (2003)). Human CCR2 transfected 300-19 cells were spun down and resuspended at  $2 \times 10^6$  cells/ml with PTI buffer (HBSS (Gibco, Grand Island, NY) with 10 mM Hepes (Gibco) and 4.0 mM  $\text{CaCl}_2$  (Sigma; St. Louis, MO)). The cells were loaded with 2 ul of indo-1 AM (Molecular Probes; Eugene, OR) per ml (2uM final) and incubated for 25 minutes at 37°C. The cells were then washed 2X with PTI buffer and suspended at  $1 \times 10^7$ /ml. Several concentrations of the antibody or appropriate controls were added to the cells and incubated for 30 minutes at room temperature. To a 1 mm square cuvette (Sarstedt; Germany), 1.8 ml of pre-warmed PTI buffer were added along with 200 ul of the cell suspension. The cells were excited and fluorescence was measured using equipment from Photon Technology Corporation International (PTI; Lawrenceville, NJ). The machine was paused and 20 ul of 100 nM MCP-1 (Peprotech; Rocky Hill, NJ) was added. After the response, the following reagents were added in this order to release and chelate total calcium: 20 ul of 18% Triton X-100; 20 ul of 3M Tris pH 8.5; 20 ul of 0.5M EGTA pH 8.5 (all from Sigma). The antibody 4.40 inhibited the ability of MCP-1 to induce calcium mobilization in a dose-responsive manner (Figure 10). Similar results were obtained with the 4.40 A68G S230P antibody.

### EXAMPLE 11

#### Inhibition of Chemotaxis Towards CCL2 and CCL7

**[00296]** To determine if the inhibition of chemotaxis by the 4.40 A68G S230P antibody is specific for MCP-1 or if it also applies to other CCR2 ligands, chemotaxis of THP-1 cells towards MCP-1(CCL2) was compared to that towards CCL3 (MIP-1a) as was shown in Figure 3. In addition the migration of CCR2 transfected 300-19 cells toward another CCR2 ligand, CCL7 (MCP-3) in the presence of antibody 4.40 A68G S230P was also assessed using a similar chemotaxis assay as described in Example 6. While the 4.40 A68G S230P

820

antibody inhibits chemotaxis towards both known CCR2 ligands, CCL2 (Figure 3) and CCL7 (Figure 11), Figure 3 shows it does not block chemotaxis towards the CCR1/CCR5 ligand, CCL3 (MIP-1a).

5

## EXAMPLE 12

### Actin Polymerization in Monocytes

#### Human Whole Blood Actin Polymerization

**[00297]** Monoclonal Antibody 4.40 A68G S230P also was tested for its ability to inhibit actin polymerization in human whole blood as shown in Figure 12. Blood was collected in EDTA vacutainer tubes (VWR; Boston, MA) and then incubated with dilutions of antibody or KLH control for 30 minutes at room temperature. Buffer control or 10  $\mu$ l of 100 nM MCP-1 (Peprtech; Rocky Hill, NJ) were added to a 48 well Corning plate (VWR). 100  $\mu$ l of blood was then added with gentle mixing and incubated for 40 seconds after which the reaction was stopped with 0.8 ml of stop/lyse reagent (10% of FACS lysing solution (Becton Dickinson; San Jose, CA), 20% of 16% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences; Ft. Washington, PA ), and 70% of H<sub>2</sub>O). The plate was incubated for 10 minutes at room temperature, spun down, and cells were transferred to a 96 well round bottom polypropylene plate, and washed 2X with PBS. 100  $\mu$ l of PBS were added per well. Then 50  $\mu$ l of staining reagent were added (10% of a 5mg/ml lysophosphatidylcholine (Sigma) in 10X HBSS, 80% of the 16% paraformaldehyde, and 10% of 6.6  $\mu$ M NBD phalloidin (Molecular Probes; Eugene, OR)). The cells were stained for one hour at room temperature in the dark. After incubation, cells were washed 2X with PBS containing 2% fetal bovine serum (Hyclone, Logan UT) and the fluorescence was quantified on a FACSCAN (Becton Dickinson) gated on monocytes. As shown in Figure 12, antibody 4.40 A68G S230P inhibited actin polymerization with an IC<sub>50</sub> of 0.168 $\mu$ g/ml.

#### Cynomolgus Monkey Whole Blood Actin Polymerization

**[00298]** Blood was collected in EDTA vacutainer tubes (VWR; Boston, MA) and then incubated with dilutions of antibody or isotype control for 30 minutes at room temperature. During this time 10  $\mu$ l of 100 nM MCP-1 (Peprtech; Rocky Hill, NJ; final concentration 10 nM) or buffer control (HBSS with no Ca<sup>+2</sup> or Mg<sup>+2</sup> (Gibco;



121

Grand Island, NY) and 0.2% BSA (Sigma; St. Louis, MO)) were added to a 48 well Corning plate (VWR). 100 ul of blood was then added with gentle mixing and incubated for 40 seconds. The reaction was stopped with 0.8 ml of stop/lyse reagent (10% of FACS lysing solution (Becton Dickinson; San Jose, CA), 20% of 5 16% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences; Ft. Washington, PA ), and 70% of H<sub>2</sub>O). The plate was incubated for 10 minutes, spun down, and washed 2X with PBS. The cells were then stained for one hour at room temperature in the dark with staining reagent (10% of a 5mg/ml lysophosphatidylcholine (Sigma) in 10X HBSS, 80% of the 16% paraformaldehyde, and 10% of 6.6 uM NBD 10 phalloidin (Molecular Probes; Eugene, OR)). After incubation, cells were washed 2X with PBS containing 2% fetal bovine serum (Hyclone, Logan UT) and the fluorescence was quantified on a FACSCAN (Becton Dickinson) gated on activated monocytes. As shown in Figure 13, antibody 4.40 A68G S230P inhibited whole blood actin polymerization in the cynomolgus monkey with an IC<sub>50</sub> 15 of 0.49 ug/ml.

### EXAMPLE 13

#### Collagen I mRNA quantification assay

[00299] Human hepatic stellate cell line, LI-90 (JCRB Cellbank, Japan), was 20 grown in flasks containing DME medium supplemented with 10% deactivated FBS, 100 U/ml Penicillin/100 ug/ml Streptomycin and 2 mM L-Gln (Invitrogen) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator. Cells were grown in 96-well tissue culture plates at 20,000 cells/well for 3 days and treated with 1000 nM of MCP-1 (PeproTech) and various concentrations of 4.40 A68G S230P for 48 hours at 25 37°C. The culture medium was removed and the cells were lysed by addition of 100 ul of lysing buffer supplied with QUANTIGENE™ Expression Kit (Panomics). The branched DNA assay was performed following the manufacturer's instructions. Briefly, samples of total RNA were loaded on a 96-well microtiter plate containing hybridization buffer and 50 fmol/ul of Col1A1/GAPDH probe set. 30 The captured mRNAs were hybridized to branched DNA molecules that contained alkaline phosphatase molecules by incubating at 46°C for 60 min. After further incubation with the chemiluminescent substrate at 46°C for 30 min, luminescence was quantified with a luminometer (ARVOsx, Perkin Elmer; Massachusetts, USA).

1252

The ratio of the luminescence of Col1A1 against GAPDH was calculated, and the data was analyzed by Prism 4.0 software to determine IC<sub>50</sub> values (GraphPad). As shown in Figure 14, 4.40 A68G S230P inhibited collagen IAI mRNA synthesis in LI90 cells induced by MCP-1 with an IC<sub>50</sub> value of 0.89 µg/mL (6.2 nM).

5

#### EXAMPLE 14

##### pERK phosphorylation

[00300] Human whole blood was freshly isolated from healthy volunteers. FACS analysis indicated a high level of phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (pERK) in CD14+ monocytes 6 min after addition of MCP-1. 4.40 A68G S230P inhibited MCP-1 induced pERK phosphorylation in whole blood in a dose-dependent manner (Figure 15). pERK phosphorylation in monocytes following ex vivo stimulation with MCP-1 can be utilized as a mechanism biomarker, thereby facilitating PK/PD and translational pharmacology. The IC<sub>50</sub> and IC<sub>90</sub> values obtained for the 4.40 A68G S230P antibody in this whole blood assay were 0.44 µg/mL (2.9 nM) and 0.89 µg/ml (6.1 nM), respectively.

#### EXAMPLE 15

##### Murine Acute Hepatitis Model

[00301] Efficacy of the 4.40 A68G S230P antibody was also examined using an acute mouse ConA model of hepatitis. For this study, transgenic mice were used in which mouse CCR2 had been replaced by human CCR2 since the 4.40 A68G S230P antibody does not recognize the rodent CCR2. The animals were given a single intraperitoneal injection of the mAb at 0.1, 0.3 or 1.0 mg/kg in saline. An IgG<sub>4</sub> isotype control antibody was administered to a separate group. Thirty minutes later the animals were given an i.v. tail vein injection (0.1 mL) of 15 mg/kg ConA in pyrogen-free saline. A control group was given saline without ConA. After 24 hours, blood samples were obtained and plasma liver enzymes analyzed. As shown in Figure 16, ALT and AST were markedly elevated in the control antibody group with values close to 25,000 U/L. By contrast, mice treated with 0.5 and 1.0 mg/kg 4.40 A68G S230P showed a significant reduction of their plasma liver enzymes by approximately 50% and 80%, respectively.

1253

EXAMPLE 17Therapeutic Effects In Animal Disease ModelsInflammation

- 5 **[00302]** The therapeutic effects of the human anti-CCR2 antibodies or antigen-binding fragments thereof, including the 4.40 and 4.9 antibodies, are tested using *in vivo* mammalian models of inflammation. Leukocyte infiltration is monitored upon intradermal injection of a chemokine, such as MCP-1, and an antibody or fragment thereof reactive with mammalian CCR2, such as the 4.40 antibody, into
- 10 a suitable animal, such as rabbit, mouse, rat, guinea pig or rhesus macaque (see e.g., Van Damme, J. et al., *J. Exp. Med.* 176:59-65 (1992); Zachariae, C. O. C. et al., *J. Exp. Med.* 171:2177-2182 (1990); Jose, P. J. et al., *J. Exp. Med.* 179: 881-887 (1994)). Skin biopsies are assessed histologically for infiltration of leukocytes (e.g., eosinophils and granulocytes). It is expected that the antagonistic anti-
- 15 CCR2 antibodies will decrease infiltration of leukocyte compared to control animals.

Multiple Sclerosis

- 20 **[00303]** The therapeutic effects of the antibodies or fragments thereof, including the 4.40 and 4.9 antibodies, are tested using *in vivo* mammalian models of multiple sclerosis. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is a T cell-mediated inflammatory disease of the central nervous system (CNS) that serves as an animal model for multiple sclerosis (MS) (see Steinman L, *Neuron* 24:511-514 (1999)). On day 0 and day 7 post-immunization (p.i.) with encephalitogenic
- 25 MOG<sub>35-55</sub> peptide, C57/J129 and/or C57BL/6 mice are sensitized for active EAE by subcutaneous (s.c.) injection (two sites, dorsal flank) with a total of 600 µg of encephalitogenic MOG<sub>35-55</sub> emulsified in incomplete Freund's adjuvant (IFA; Difco, Detroit, MI), containing 70 µg of *Mycobacterium tuberculosis*, H37Ra (Difco). On day 0 and day 2 p.i., each mouse also receives 500 ng of pertussis toxin (PTX;
- 30 List Biological Laboratories, Campbell, CA) intravenously (i.v.) via a tail vein. Some animals also receive an escalated dosage of anti-CCR2 antagonistic antibodies, such as the 4.40 antibody. Animals are assessed daily for clinical signs and evaluated according to the following scale: grade 0, no abnormalities;

127

grade 1, weak tail; grade 2, limp tail and weakness in hind-limbs; grade 3, hind-limb paraparesis; grade 4, tetraplegia; and grade 5, moribund or death.

[00304] In addition, light microscopy studies are performed on

glutaraldehyde/osmium-fixed tissue samples from the optic nerve, cerebrum,

- 5 cerebellum, and spinal cord. The tissue samples are dehydrated and embedded in epoxy resin from which 1- $\mu$ m sections are cut and stained with toluidine blue. Inflammation, demyelination, Wallerian degeneration (WD), and remyelination are scored on a scale of 0 to 5, as described previously (Cannella *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10100-10105 (1998)). It is expected that mice treated with anti-  
10 CCR2 antagonistic antibodies will exhibit reduced signs of clinical abnormalities, inflammation, demyelination and WD over control animals. It is further expected that such reduction will occur in a dosage-dependent manner.

#### Neuropathic Pain

- 15 [00305] The therapeutic effects of the antibodies or fragments thereof, including the 4.40 and 4.9 antibodies, are tested using *in vivo* mammalian models of neuropathic pain. C57BL mice are divided into two groups. The experimental group is administered anti-CCR2 antagonistic antibodies daily, such as the 4.40 antibody, via tail vein injection while a second group is not administered the  
20 antibody. The two groups are tested at time intervals after the initiation of treatment in the following assays:

- Rota-rod.** Initially, mice are trained on the rota-rod for 3 min at a speed of 10 rpm. For testing, the speed is set at 10 rpm for 60 s and subsequently accelerated to 600 rpm. The time taken for mice to fall after the beginning of the  
25 acceleration is recorded.

- Hot plate.** Mice are habituated to the hot-plate apparatus with temperature set at 45°C for 2 min. Subsequently, mice are placed on the hot-plate and the temperature is sequentially changed to 52.5°C and 55.5°C (cutoff set at 30 s) each and then to 58.5°C (cutoff set at 20 s). The time when mice either lick their  
30 paws or jump is recorded.

**Formalin test.** For 4 days before testing, mice are acclimated for 2 hours every day on the test platform. On the day of the study, mice are placed for 1 hour on the test platform and subsequently are administered 10  $\mu$ l of 2% formalin

in the plantar surface of the left paw. The time mice spend either licking or lifting the injected paw is recorded over 2-minute periods at 5-minute intervals for 50 min.

**Thermal and mechanical stimulation.** Thermal sensitivity is assessed by measuring paw withdrawal latencies to a radiant heat stimulus (Hargreaves *et al.*, *Pain* 32:77-88 (1988)). Mechanical sensitivity is determined with calibrated von Frey filaments by using the up-and-down paradigm (Chaplan *et al.*, *J. Neurosci. Methods* 53, 55-63 (1994)).

**Nerve injury.** Mice are anesthetized with a mixture of ketamine (50 mg/kg, i.m.) and medetomidine (1 mg/kg, i.m.). An incision is made just below the hip bone, parallel to the sciatic nerve. The nerve is exposed and any adhering tissue is removed from the nerve. A tight ligature with 6-0 silk suture thread around one-third to one-half of the diameter of the sciatic nerve is made. Muscles are closed with suture thread and the wound, with wound clips. The response of the mice to mechanical stimulation is tested before and up to 15 days after nerve injury.

[00306] It is expected that the mice treated with anti-CCR2 antagonistic antibodies will exhibit reduced signs neuropathic pain compared to control mice.

Table 8: CDR Sequences (SEQ ID NO:)

| Antibody | V <sub>H</sub> CDR1 | V <sub>H</sub> CDR2 | V <sub>H</sub> CDR3 | V <sub>L</sub> CDR1 | V <sub>L</sub> CDR2 | V <sub>L</sub> CDR3 |
|----------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 4.9      | 12                  | 13                  | 14                  | 30                  | 31                  | 32                  |
| 4.22     | 48                  | 49                  | 50                  | 66                  | 67                  | 68                  |
| 4.40     | 84                  | 85                  | 86                  | 102                 | 103                 | 104                 |
| 4.39     | 177                 | 178                 | 179                 | 195                 | 196                 | 197                 |

20

126

## We Claim:

1. An isolated human monoclonal antibody or an antigen-binding portion thereof that specifically binds to human CCR2, wherein the antibody
  - 5 a) binds to an epitope contained within a first extracellular loop of human CCR2;
  - b) binds to an epitope contained within a second extracellular loop of human CCR2; or
  - c) binds to an epitope contained within both the first and second
  - 10 extracellular loops of human CCR2.
2. The human monoclonal antibody or antigen-binding portion according to claim 1, wherein said antibody or antigen-binding portion possesses at least one of the following properties:
  - 15 a) has selectivity for human CCR2 that is at least 100 times greater than its selectivity for human CCR5;
  - b) binds to human CCR2 with a  $K_D$  of  $2.0 \times 10^{-7}$  M or less;
  - c) competes with MCP-1 and/or MCP-3 for binding to CCR2;
  - d) reduces  $Ca^{2+}$  mobilization in response to MCP-1;
  - 20 e) reduces Collagen I mRNA synthesis in response to MCP-1;
  - f) reduces pERK phosphorylation in human monocytes in response to MCP-1;
  - g) reduces chemotaxis of human monocytes in response to MCP-1; and
  - h) reduces actin polymerization in human monocytes in response to
  - 25 MCP-1.
3. The human monoclonal antibody or antigen-binding portion according to claim 1, wherein the first extracellular loop of human CCR2 comprises an amino acid sequence of SEQ ID NO:128; and the second extracellular loop of human
- 30 CCR2 comprises an amino acid sequence of SEQ ID NO:129.
4. An isolated human monoclonal antibody or an antigen-binding portion thereof that specifically binds to human CCR2, comprising a heavy chain variable ( $V_H$ )

127

domain amino acid sequence comprising a CDR1, a CDR2, and a CDR3 selected from the group consisting of:

- a) a V<sub>H</sub> CDR1 as set forth in SEQ ID NO:12, a V<sub>H</sub> CDR2 as set forth in SEQ ID NO:13, and a V<sub>H</sub> CDR3 as set forth in SEQ ID NO:14;
- 5 b) a V<sub>H</sub> CDR1 as set forth in SEQ ID NO:48, a V<sub>H</sub> CDR2 as set forth in SEQ ID NO:49, and a V<sub>H</sub> CDR3 as set forth in SEQ ID NO:50;
- c) a V<sub>H</sub> CDR1 as set forth in SEQ ID NO:84, a V<sub>H</sub> CDR2 as set forth in SEQ ID NO:85, and a V<sub>H</sub> CDR3 as set forth in SEQ ID NO:86; and
- 10 d) a V<sub>H</sub> CDR1 as set forth in SEQ ID NO:177, a V<sub>H</sub> CDR2 as set forth in SEQ ID NO:178, and a V<sub>H</sub> CDR3 as set forth in SEQ ID NO:179.

5. The isolated human antibody or antigen-binding portion according to claim 4, further comprising a light chain variable (V<sub>L</sub>) domain amino acid sequence comprising a CDR1, a CDR2, and a CDR3 selected from the group consisting of:

- a) a V<sub>L</sub> CDR1 as set forth in SEQ ID NO:30, a V<sub>L</sub> CDR2 as set forth in SEQ ID NO:31, and a V<sub>L</sub> CDR3 as set forth in SEQ ID NO:32;
- b) a V<sub>L</sub> CDR1 as set forth in SEQ ID NO:66, a V<sub>L</sub> CDR2 as set forth in SEQ ID NO:67, and a V<sub>L</sub> CDR3 as set forth in SEQ ID NO:68;
- 20 c) a V<sub>L</sub> CDR1 as set forth in SEQ ID NO:102, a V<sub>L</sub> CDR2 as set forth in SEQ ID NO:103, and a V<sub>L</sub> CDR3 as set forth in SEQ ID NO:104; and
- d) a V<sub>L</sub> CDR1 as set forth in SEQ ID NO:195, a V<sub>L</sub> CDR2 as set forth in SEQ ID NO:196, and a V<sub>L</sub> CDR3 as set forth in SEQ ID NO:197.

- 25 6. An isolated human antibody or an antigen-binding portion thereof that specifically binds to human CCR2, comprising a light chain variable (V<sub>L</sub>) domain amino acid sequence comprising a CDR1, a CDR2, and a CDR3 selected from the group consisting of:

- a) a V<sub>L</sub> CDR1 as set forth in SEQ ID NO:30, a V<sub>L</sub> CDR2 as set forth in SEQ ID NO:31, and a V<sub>L</sub> CDR3 as set forth in SEQ ID NO:32;
- 30 b) a V<sub>L</sub> CDR1 as set forth in SEQ ID NO:66, a V<sub>L</sub> CDR2 as set forth in SEQ ID NO:67, and a V<sub>L</sub> CDR3 as set forth in SEQ ID NO:68;

128

c) a V<sub>L</sub> CDR1 as set forth in SEQ ID NO:102, a V<sub>L</sub> CDR2 as set forth in SEQ ID NO:103, and a V<sub>L</sub> CDR3 as set forth in SEQ ID NO:104; and

d) a V<sub>L</sub> CDR1 as set forth in SEQ ID NO:195, a V<sub>L</sub> CDR2 as set forth in SEQ ID NO:196, and a V<sub>L</sub> CDR3 as set forth in SEQ ID NO:197.

5

7. The isolated antibody or antigen-binding portion according to claim 5, comprising: a V<sub>H</sub> CDR1 as set forth in SEQ ID NO:84, a V<sub>H</sub> CDR2 as set forth in SEQ ID NO:85, a V<sub>H</sub> CDR3 as set forth in SEQ ID NO:86, a V<sub>L</sub> CDR1 as set forth in SEQ ID NO:102, a V<sub>L</sub> CDR2 as set forth in SEQ ID NO:103, and a V<sub>L</sub> CDR3 as set forth in SEQ ID NO:104.

10

8. An isolated human monoclonal antibody or an antigen-binding portion thereof that specifically binds to human CCR2, comprising a heavy chain CDR3 having an amino acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:202 and SEQ ID NO:203.

15

9. An isolated human monoclonal antibody or an antigen-binding portion thereof that specifically binds to human CCR2, comprising a heavy chain variable (V<sub>H</sub>) domain amino acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:176, SEQ ID NO:11 having a conservative amino acid substitution, SEQ ID NO:47 having a conservative amino acid substitution, SEQ ID NO:83 having a conservative amino acid substitution, SEQ ID NO:176 having a conservative amino acid substitution, SEQ ID NO:11 having a germline amino acid substitution compared to SEQ ID NO:162, SEQ ID NO:47 having a germline amino acid substitution compared to SEQ ID NO:158, SEQ ID NO:83 having a germline amino acid substitution compared to SEQ ID NO:160, SEQ ID NO:176 having a germline amino acid substitution compared to SEQ ID NO:164, an amino acid sequence at least 90% identical to SEQ ID NO:11, an amino acid sequence at least 90% identical to SEQ ID NO:47, an amino acid sequence at least 90% identical to SEQ ID NO:83, and an amino acid sequence at least 90% identical to SEQ ID NO:176.

20

25

30



10. An isolated human monoclonal antibody or an antigen-binding portion thereof that specifically binds to CCR2, comprising a light chain variable ( $V_L$ ) domain amino acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:29 having a conservative amino acid substitution, SEQ ID NO:66 having a conservative amino acid substitution, SEQ ID NO:101 having a conservative amino acid substitution, SEQ ID NO:113 having a conservative amino acid substitution, SEQ ID NO:194 having a conservative amino acid substitution, SEQ ID NO:29 having a germline amino acid substitution compared to SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:66 having a germline amino acid substitution compared to SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:101 having a germline amino acid substitution compared to SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:113 having a germline amino acid substitution compared to SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:194 having a germline amino acid substitution compared to SEQ ID NO:165, an amino acid sequence at least 90% identical to SEQ ID NO:29, an amino acid sequence at least 90% identical to SEQ ID NO:66, an amino acid sequence at least 90% identical to SEQ ID NO:101, an amino acid sequence at least 90% identical to SEQ ID NO:113, and an amino acid sequence at least 90% identical to SEQ ID NO:194.
11. The isolated human monoclonal antibody or antigen-binding portion according to claim 8, further comprising a light chain variable ( $V_L$ ) domain amino acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:29 having a conservative amino acid substitution, SEQ ID NO:66 having a conservative amino acid substitution, SEQ ID NO:101 having a conservative amino acid substitution, SEQ ID NO:113 having a conservative amino acid substitution, SEQ ID NO:194 having a conservative amino acid substitution, SEQ ID NO:29 having a germline amino acid substitution compared to SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:66 having a germline amino acid substitution compared to SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:101 having a germline amino acid substitution compared to SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:113 having a germline amino acid substitution compared to SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:194 having a germline amino acid substitution compared to SEQ ID NO:165, an amino acid sequence at least 90%

Y30

identical to SEQ ID NO:29, an amino acid sequence at least 90% identical to SEQ ID NO:66, an amino acid sequence at least 90% identical to SEQ ID NO:101, an amino acid sequence at least 90% identical to SEQ ID NO:113, and an amino acid sequence at least 90% identical to SEQ ID NO:194.

5

12. An isolated human monoclonal antibody or an antigen-binding portion that specifically binds to CCR2, comprising:

a) at least one heavy chain CDR1, CDR2 and/or CDR3 independently selected from the heavy chain of an antibody selected from the group consisting of:  
10 monoclonal antibodies 4.40 (ATCC Accession No. PTA-6981), 4.22 (ATCC Accession No. PTA-6980), 4.39, and 4.9 (ATCC Accession No. PTA-6979); or

b) at least one light chain CDR1, CDR2 and/or CDR3 independently selected from the light chain of an antibody selected from the group consisting of: monoclonal antibodies 4.40, 4.22, 4.39, and 4.9; or

15 c) at least one heavy chain CDR1, CDR2 and/or CDR3 independently selected from the heavy chain of an antibody selected from the group consisting of: monoclonal antibodies 4.40, 4.22, 4.39, and 4.9 and at least one light chain CDR1, CDR2 and/or CDR3 independently selected from the light chain of an antibody selected from the group consisting of monoclonal antibodies 4.40, 4.22, 4.39, and  
20 4.9.

13. An isolated human monoclonal antibody that specifically binds to human CCR2, comprising a heavy chain having an amino sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:116;  
25 SEQ ID NO:175, SEQ ID NO:10 having a conservative amino acid substitution, SEQ ID NO:46 having a conservative amino acid substitution, SEQ ID NO:82 having a conservative amino acid substitution, SEQ ID NO:116 having a conservative amino acid substitution, SEQ ID NO:175 having a conservative amino acid substitution, SEQ ID NO:10 having a germline amino acid  
30 substitution compared to SEQ ID NO:162, SEQ ID NO:46 having a germline amino acid substitution compared to SEQ ID NO:158, SEQ ID NO:82 having a germline amino acid substitution compared to SEQ ID NO:160, SEQ ID NO:116 having a germline amino acid substitution compared to SEQ ID NO:160, and

C31

SEQ ID NO:175 having a germline amino acid substitution compared to SEQ ID NO:164.

14. The isolated human monoclonal antibody of claim 13 further comprising a light  
5 chain having an amino sequence selected from the group consisting of: SEQ ID  
NO:28, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:193,  
SEQ ID NO:28 having a conservative amino acid substitution, SEQ ID NO:64  
having a conservative amino acid substitution, SEQ ID NO:100 having a  
conservative amino acid substitution, SEQ ID NO:112 having a conservative  
10 amino acid substitution, SEQ ID NO:193 having a conservative amino acid  
substitution, SEQ ID NO:28 having a germline amino acid substitution  
compared to SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:64 having a germline amino acid  
substitution compared to SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:100 having a germline  
amino acid substitution compared to SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:112 having a  
15 germline amino acid substitution compared to SEQ ID NO:161, and SEQ ID  
NO:193 having a germline amino acid substitution compared to SEQ ID  
NO:165.

15. The isolated human monoclonal antibody or antigen binding portion according  
20 to claim 14, the antibody having the heavy chain and the light chain selected  
from the group consisting of:

- a) the heavy chain having an amino acid sequence of SEQ ID NO:10 and  
the light chain having an amino acid sequence of SEQ ID NO:28,
- b) the heavy chain having an amino acid sequence of SEQ ID NO:46 and  
25 the light chain having an amino acid sequence of SEQ ID NO:64,
- c) the heavy chain having an amino acid sequence of SEQ ID NO:82 and  
the light chain having an amino acid sequence of SEQ ID NO:100,
- d) the heavy chain having an amino acid sequence of SEQ ID NO:82 and  
the light chain having an amino acid sequence of SEQ ID NO:112,
- 30 e) the heavy chain having an amino acid sequence of SEQ ID NO:116 and  
the light chain having an amino acid sequence of SEQ ID NO:112, and
- f) the heavy chain having an amino acid sequence of SEQ ID NO:175 and  
the light chain having an amino acid sequence of SEQ ID NO:193.

(32)

16. The isolated human monoclonal antibody or antigen-binding portion according to claim 15, wherein the heavy chain amino acid sequence is SEQ ID NO:116 and the light chain amino acid sequence is SEQ ID NO:112.
- 5
17. The isolated human monoclonal antibody or antigen-binding portion according to claim 5, further comprising one or more V<sub>H</sub> FR1, FR2, FR3 or FR4 and/or V<sub>L</sub> FR1, FR2, FR3 or FR4 amino acid sequence of an antibody selected from the group consisting of: 4.40, 4.40 A68G S230P, 4.39, 4.22, and 4.9.
- 10
18. The isolated human monoclonal antibody or antigen-binding portion according to claim 17, further comprising a heavy chain constant domain.
19. The isolated human monoclonal antibody or antigen-binding portion according to claim 18, further comprising a light chain constant domain.
- 15
20. A pharmaceutical composition comprising the antibody or antigen-binding portion according to claim 1 and a pharmaceutically acceptable carrier.
- 20
21. An isolated cell line that produces the antibody or antigen-binding portion according to claim 1.
22. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence that encodes the antibody or antigen-binding portion according to claim 1.
- 25
23. A vector comprising the nucleic acid molecule according to claim 22, wherein the vector optionally comprises an expression control sequence operably linked to the nucleic acid molecule.
- 30
24. A method for treating, preventing or alleviating the symptoms of a CCR2-mediated disorder in a subject in need thereof, comprising the step of administering to said subject the antibody or antigen-binding portion according to claim 1.

(33)

25. The method of claim 24, wherein the subject is afflicted with one or more conditions or disorders selected from the group consisting of an inflammatory disorder, an allergic disorder, an autoimmune disorder, a graft rejection disorder, atherosclerosis, obesity, HIV infection, neuropathic pain, stenosis, restenosis, multiple sclerosis, a fibrotic condition, age-related macular degeneration, uveitis, corneal infection, and cancer.

26. The method of claim 25, wherein said fibrotic condition is liver fibrosis.

27. The method of claim 26, wherein said liver fibrosis is the result of hepatitis C virus (HCV) infection, hepatitis B virus (HBV) infection, alcoholic steatohepatitis (ASH), or non-alcoholic steatohepatitis (NASH).

28. Use of the antibody or antigen-binding portion according to claim 1 for the manufacture of a medicament for treating, preventing or alleviating the symptoms of a CCR2-mediated disorder in a subject in need thereof.

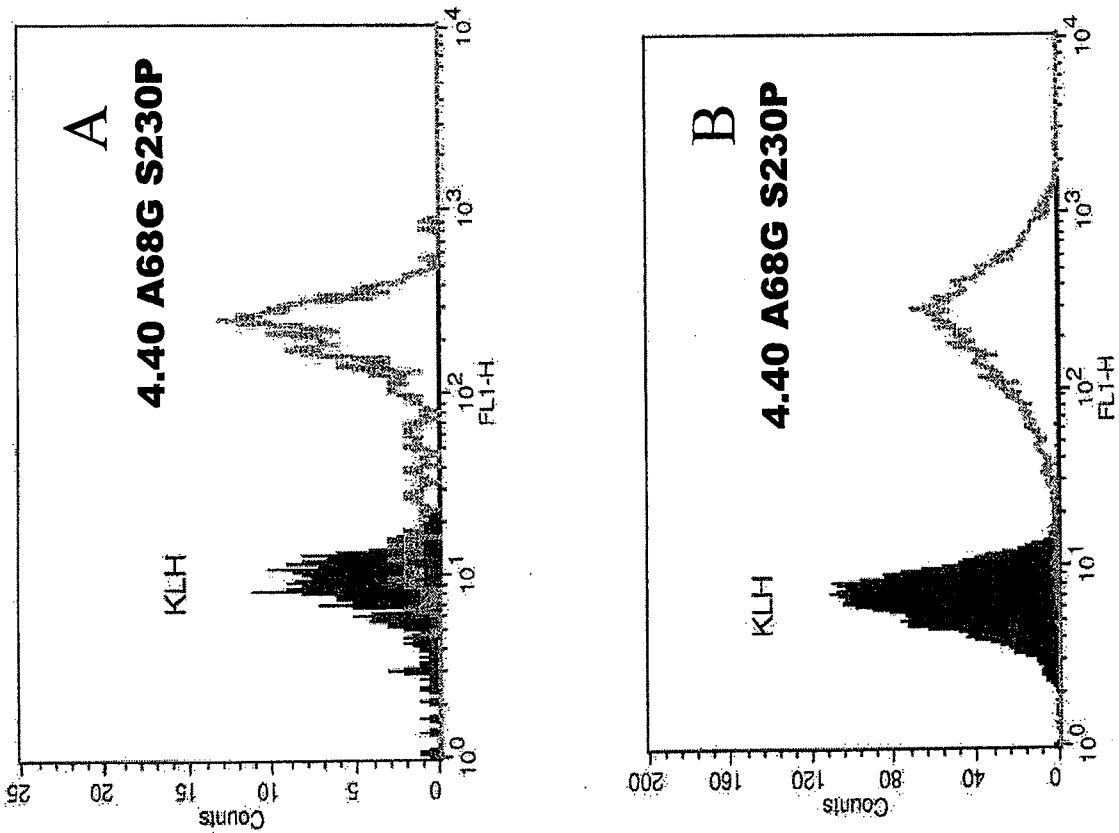
29. The use according to claim 28, wherein the subject is afflicted with one or more conditions or disorders selected from the group consisting of an inflammatory disorder, an allergic disorder, an autoimmune disorder, a graft rejection disorder, atherosclerosis, obesity, HIV infection, neuropathic pain, stenosis, restenosis, multiple sclerosis, a fibrotic condition, age-related macular degeneration, uveitis, corneal infection, and cancer.

30. The use according to claim 29, wherein said fibrotic condition is liver fibrosis.

31. The use according to claim 30, wherein said liver fibrosis is the result of hepatitis C virus (HCV) infection, hepatitis B virus (HBV) infection, alcoholic steatohepatitis (ASH), or non-alcoholic steatohepatitis (NASH).

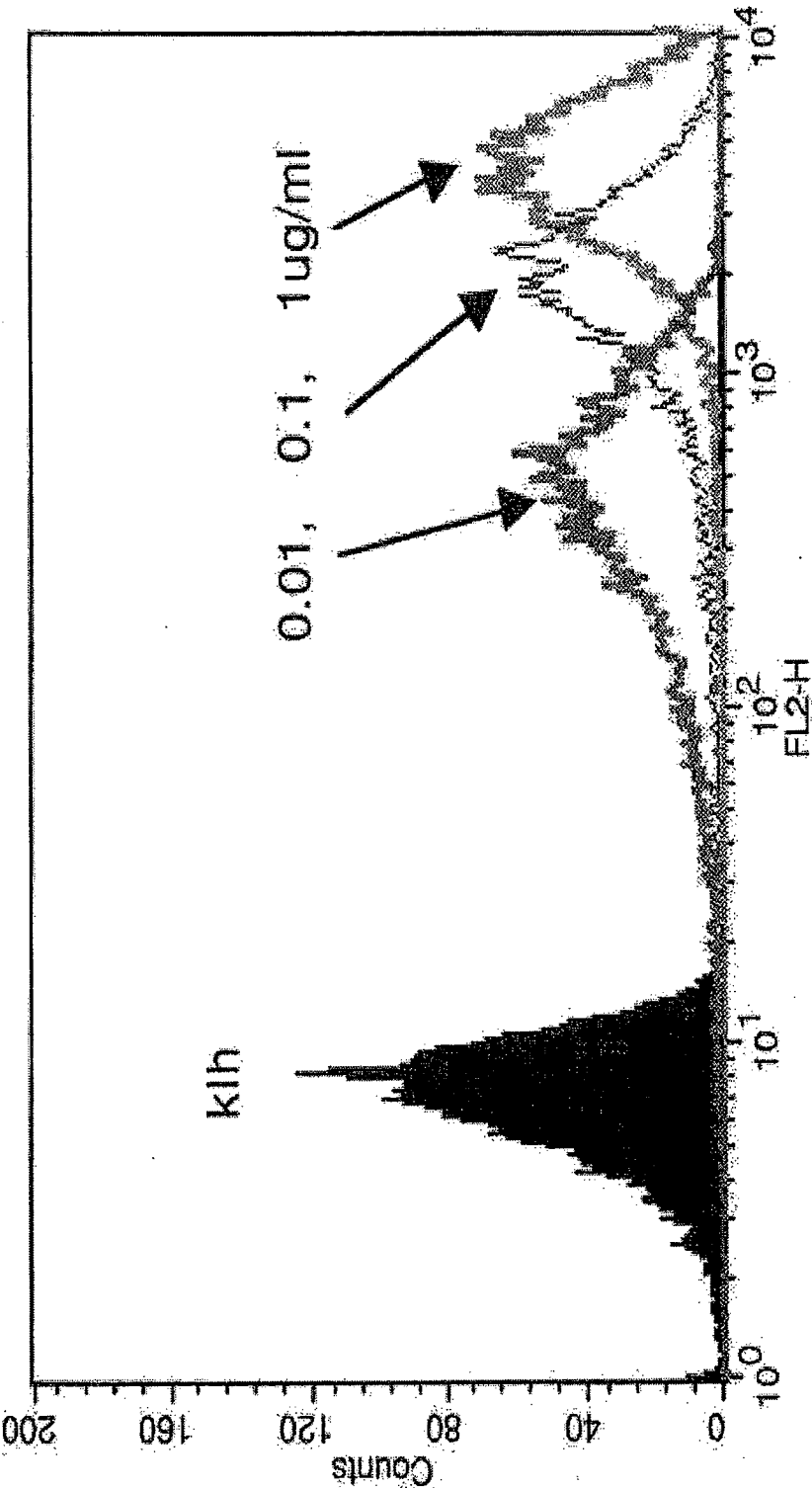
134

Figure 1



135

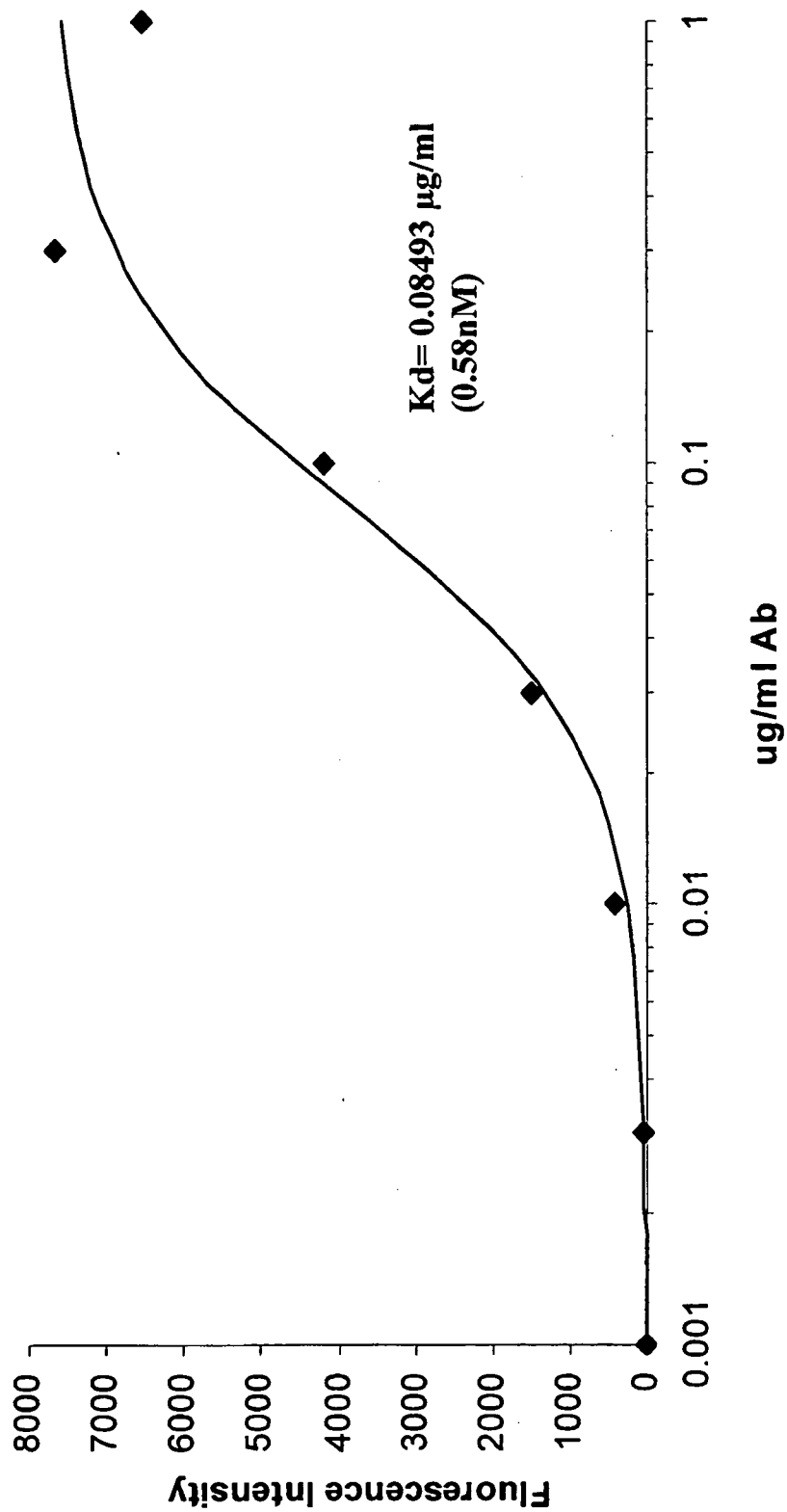
Figure 1C



3/22

13b

Figure 2

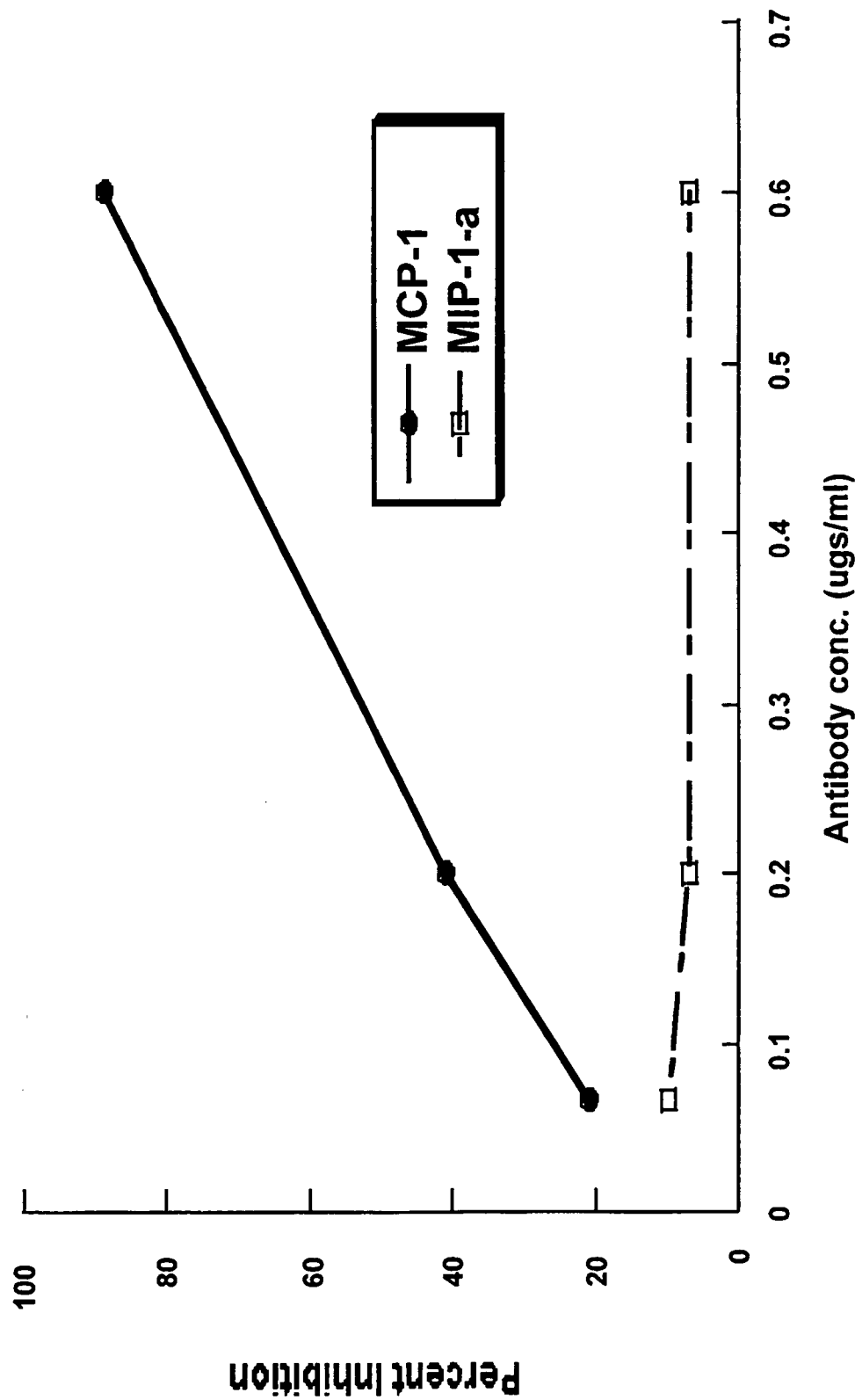




(37)

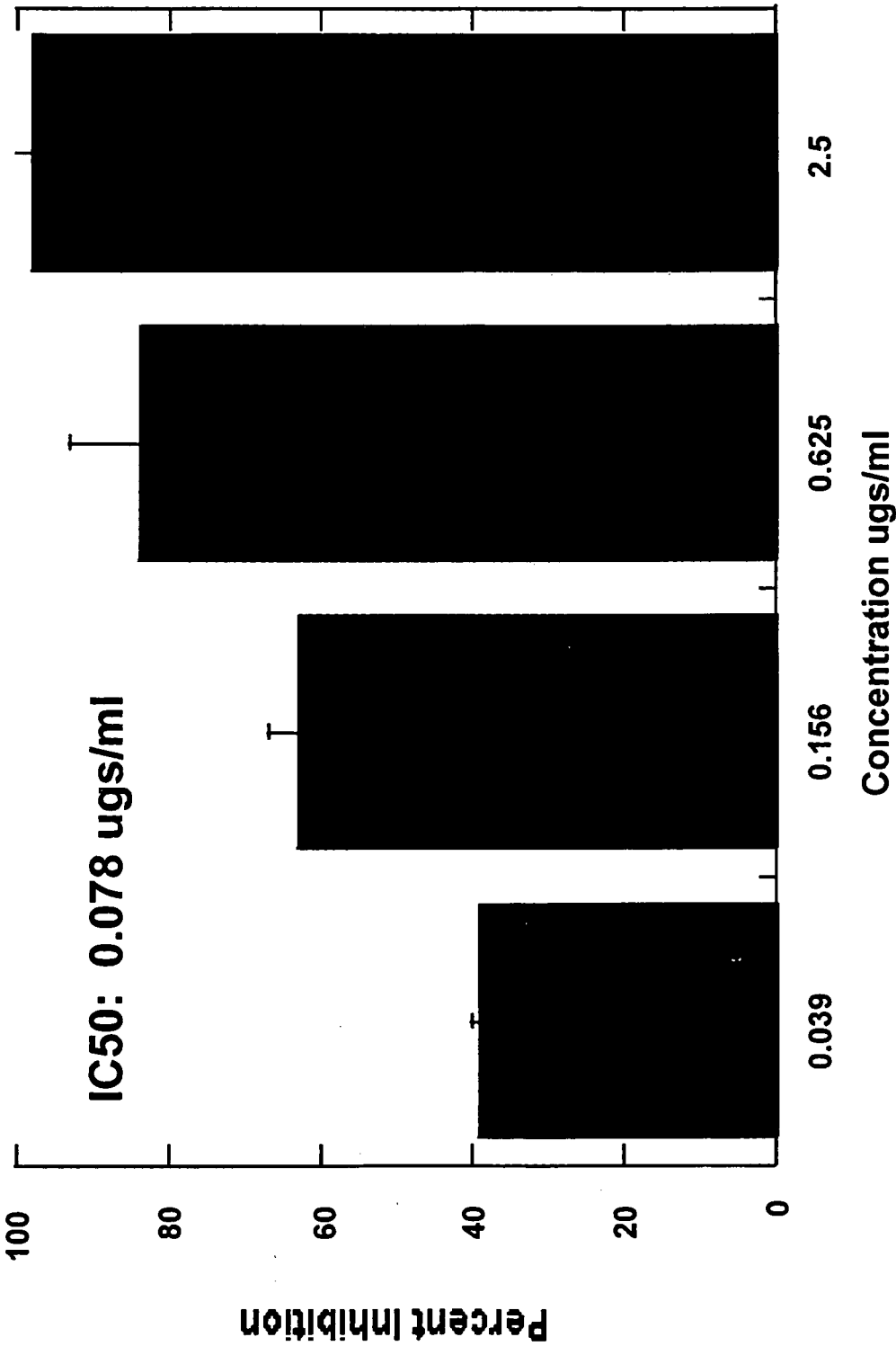
4/22

Figure 3



138

Figure 4



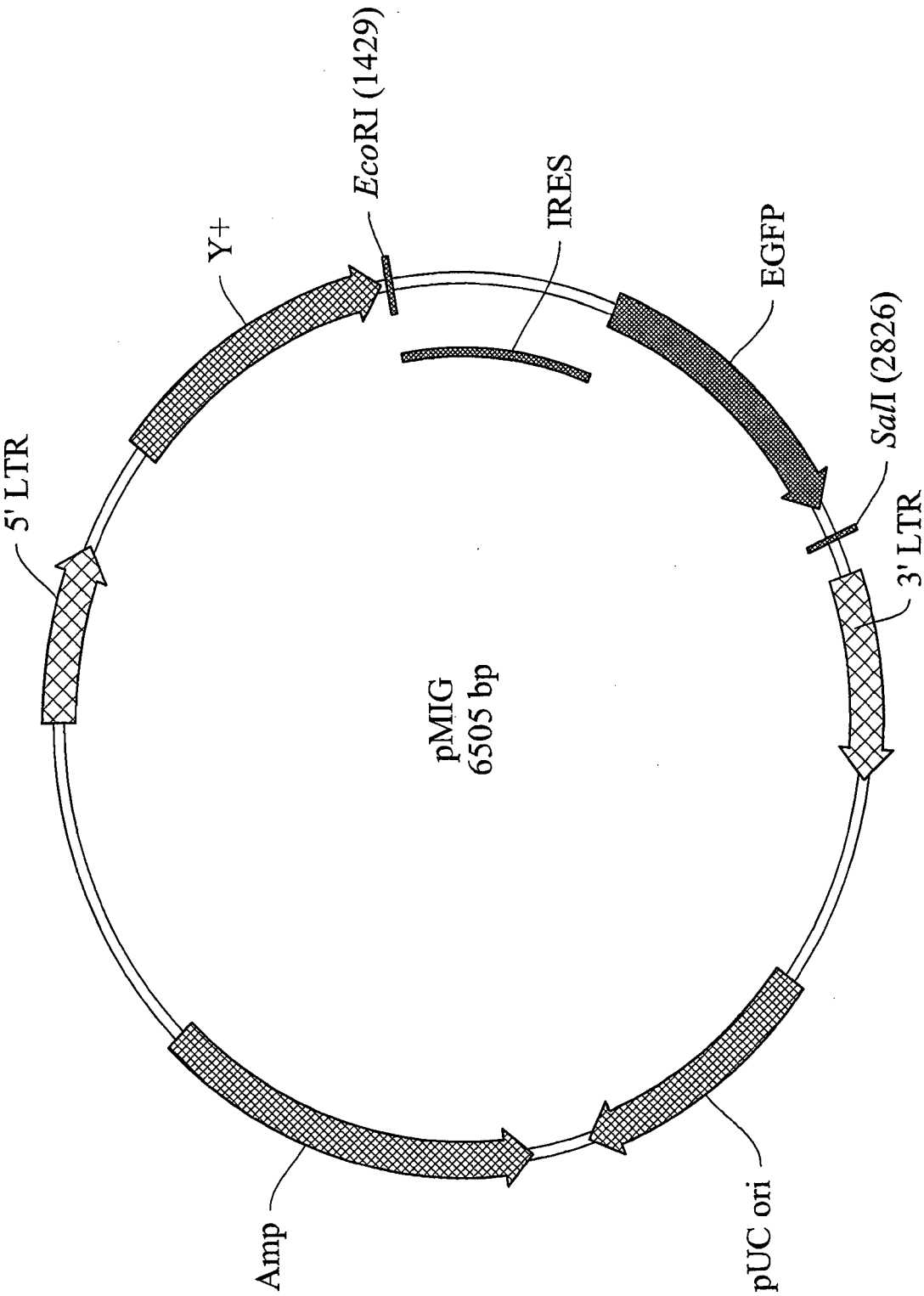
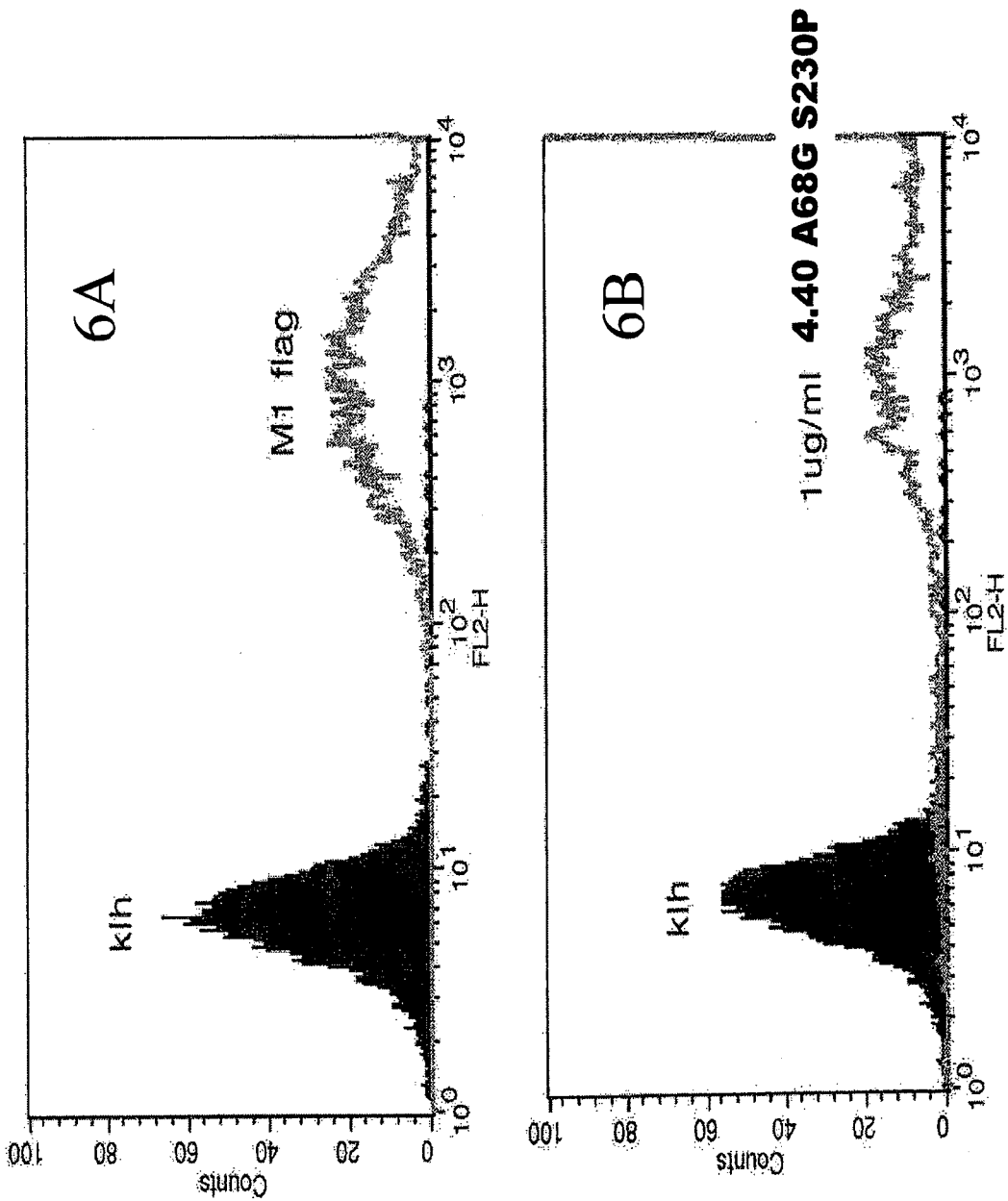


Figure 5

7/22

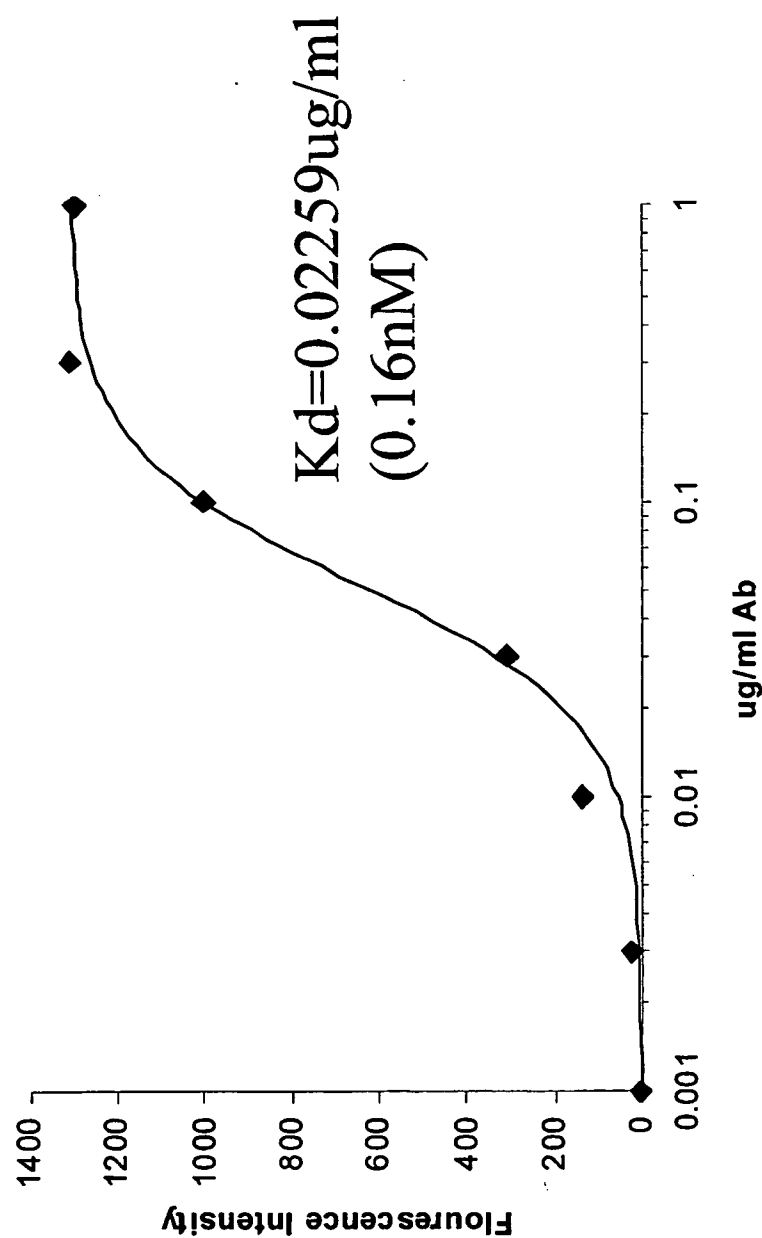
20

Figure 6A & B



71

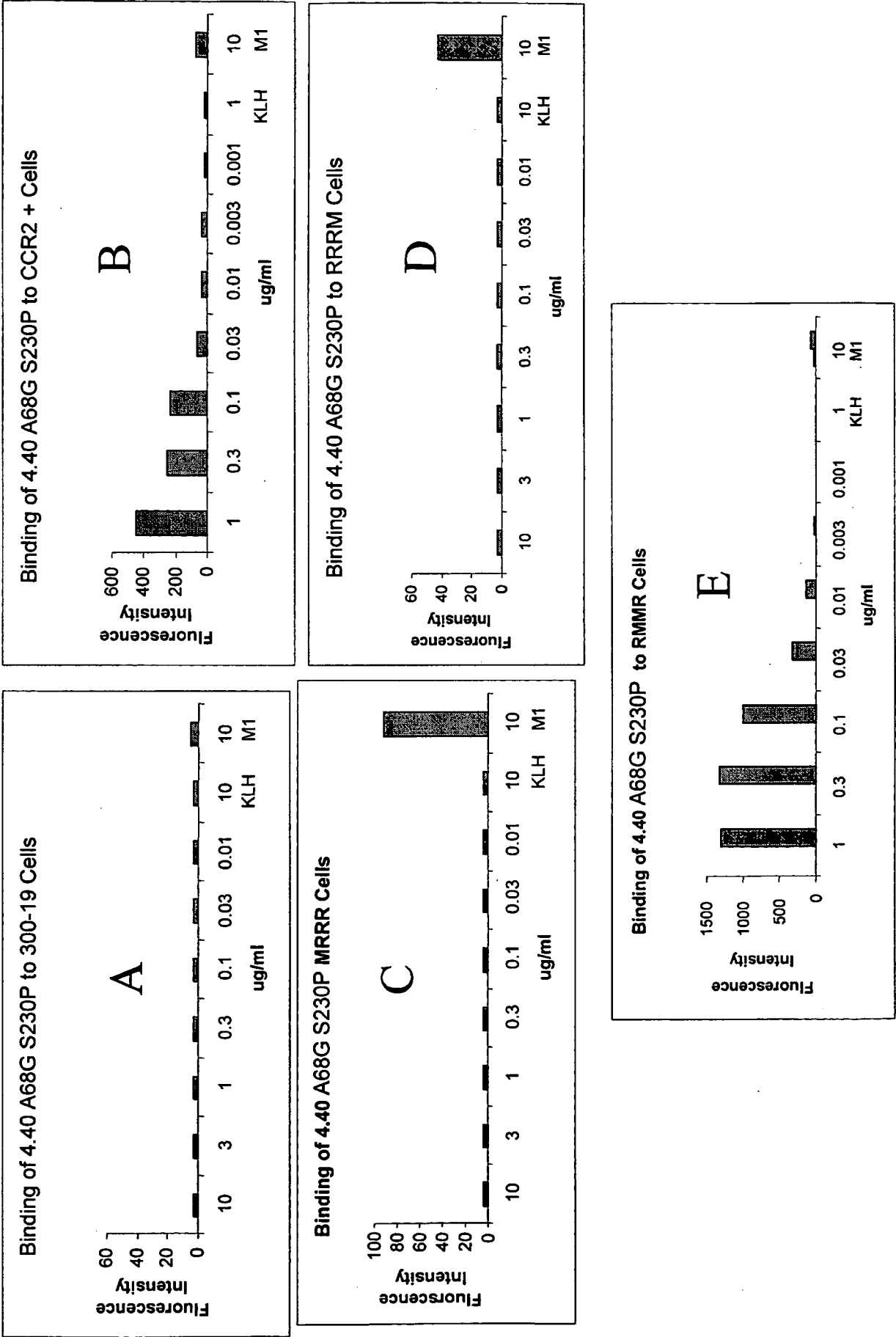
Figure 6C



9/22

172

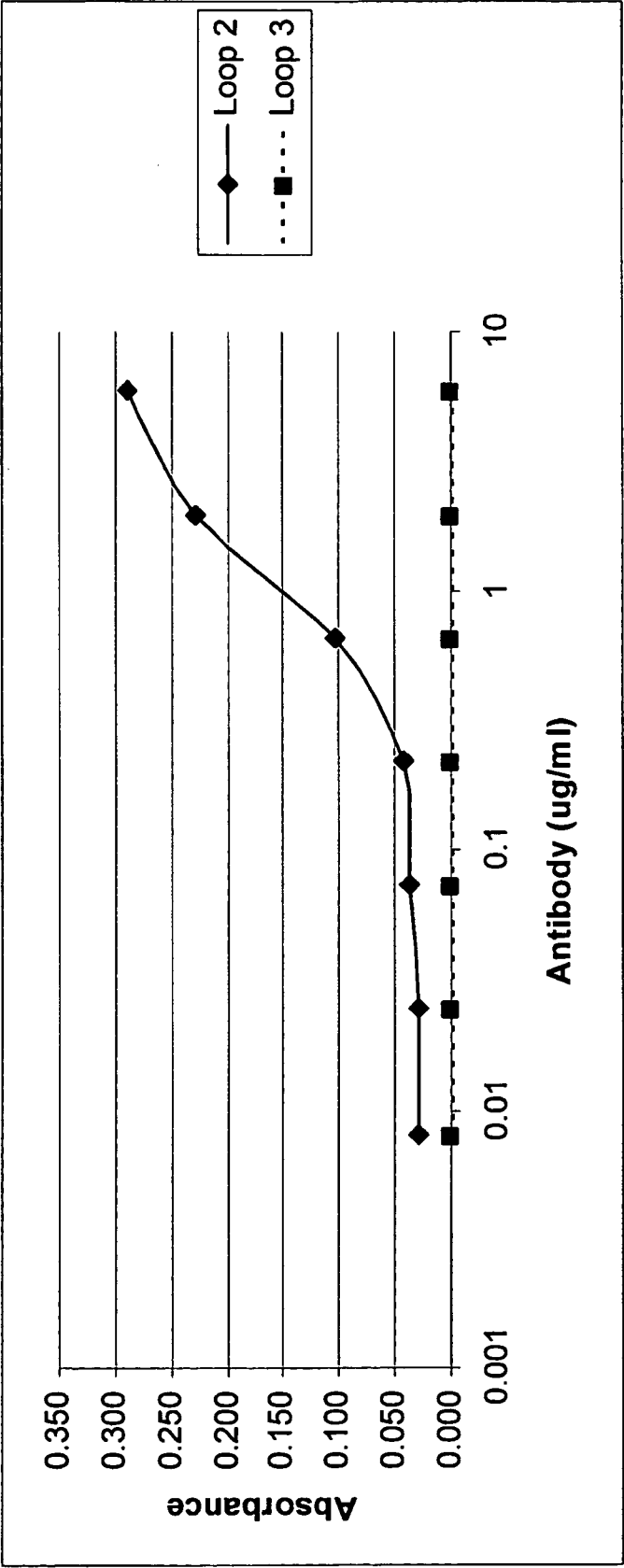
Figure 7



10/22

143

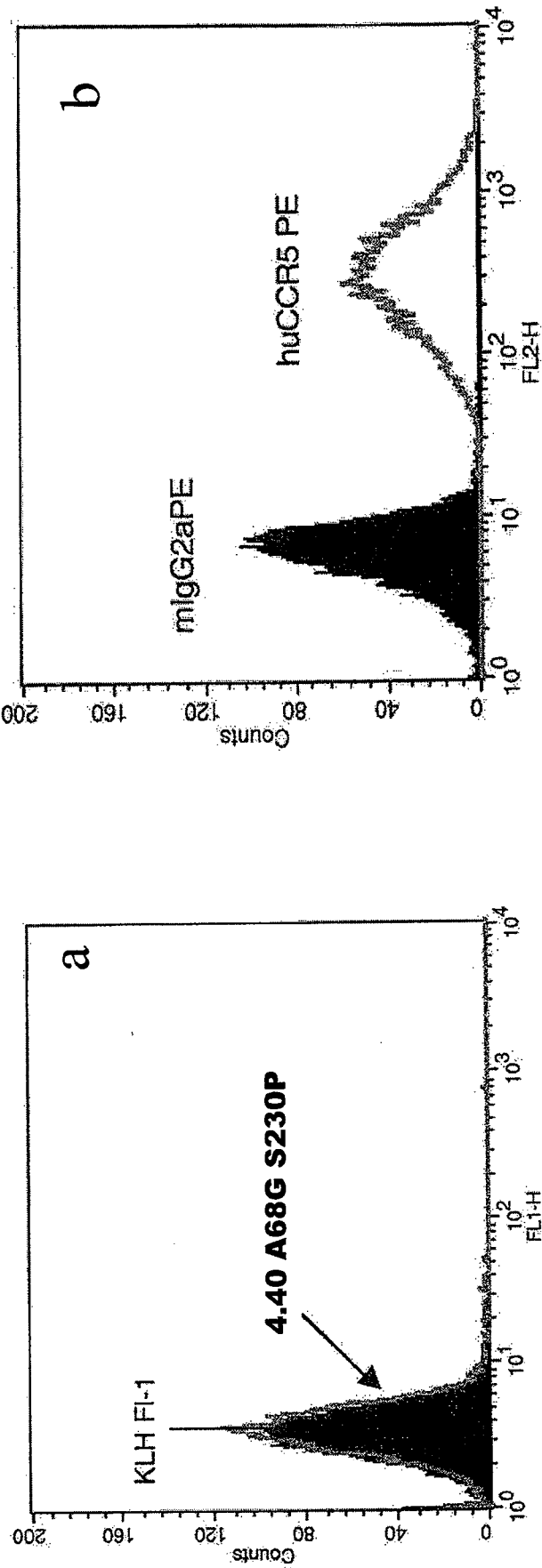
Figure 8



11/22

44

Figure 9

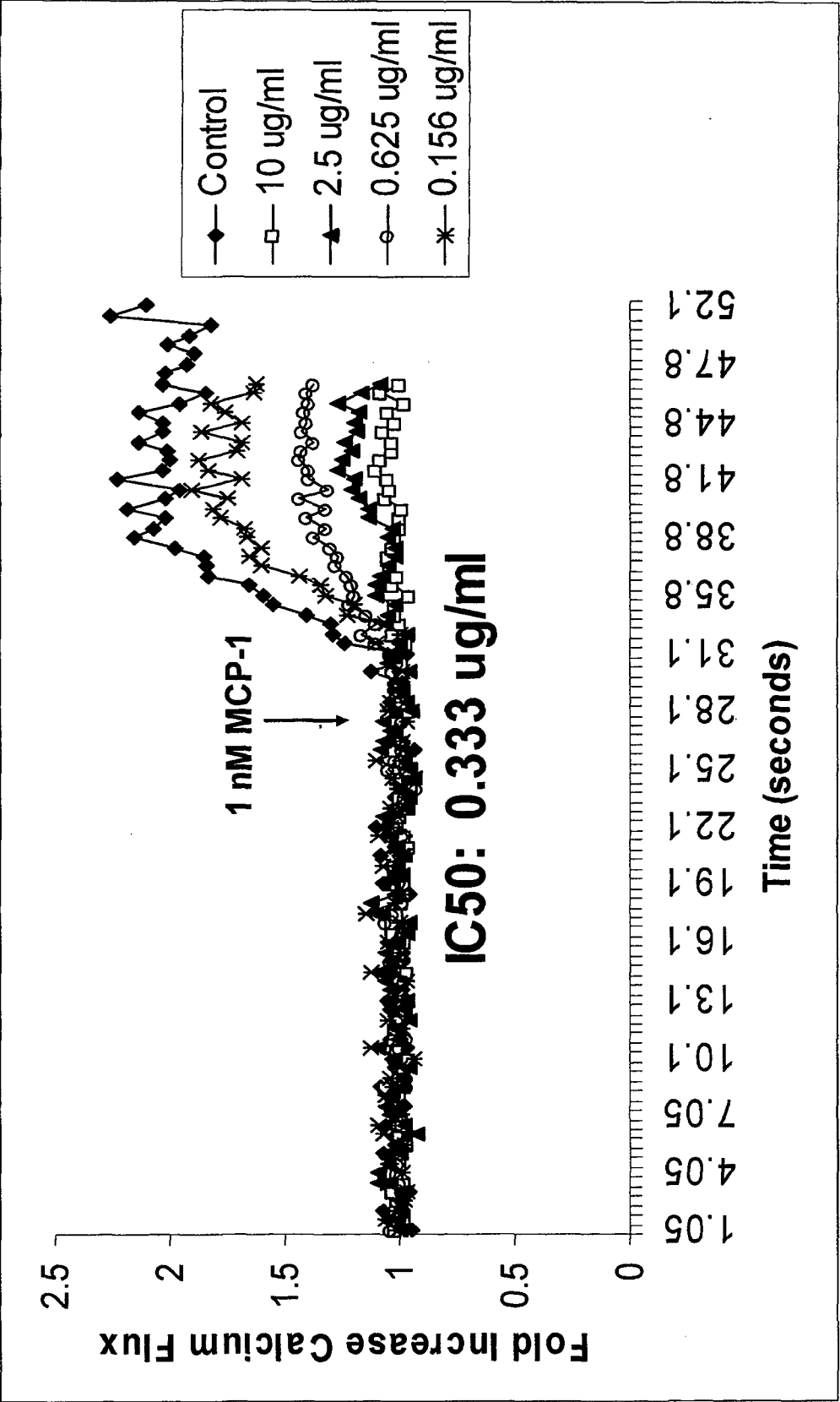




12/22

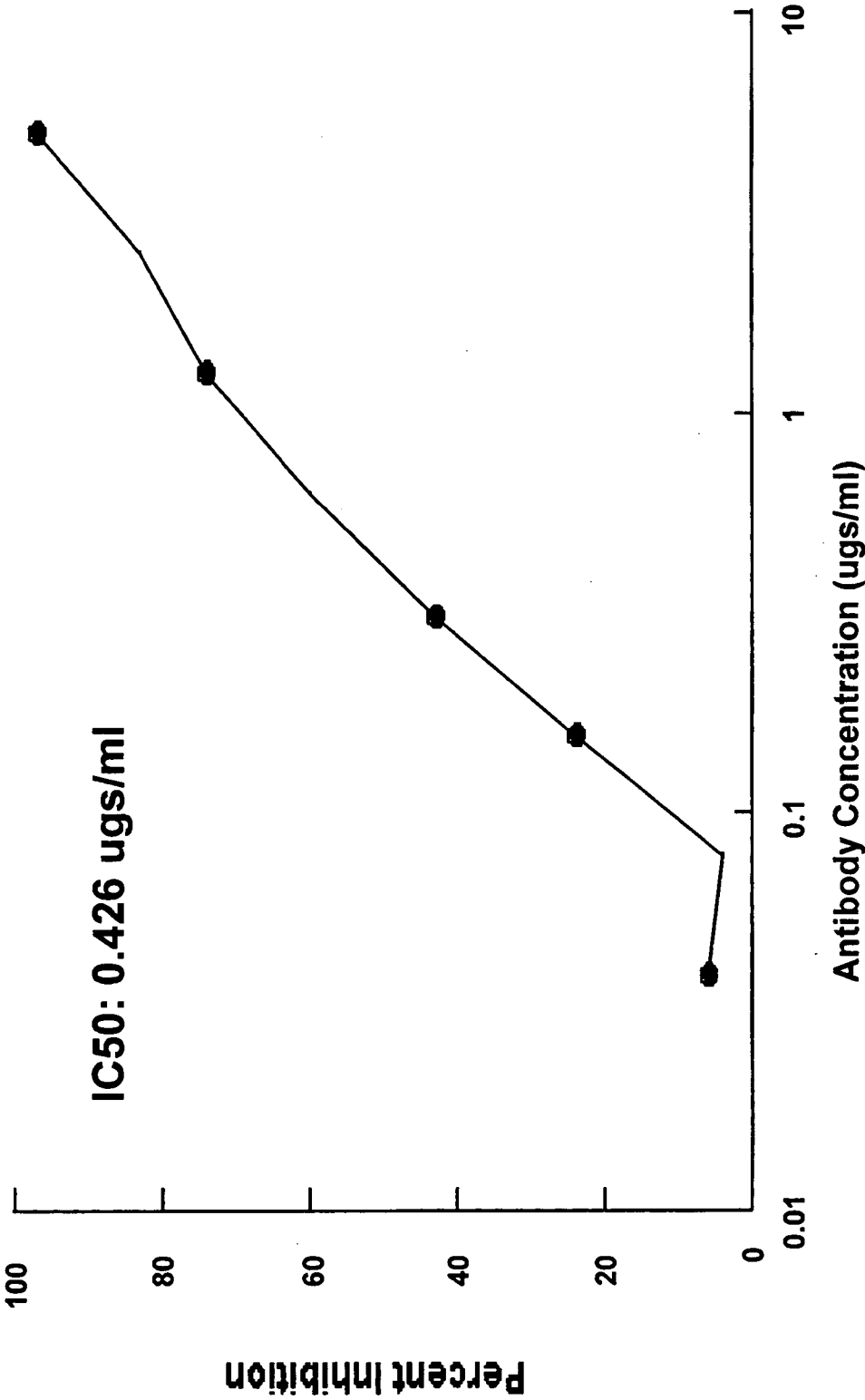
145

Figure 10



14/26

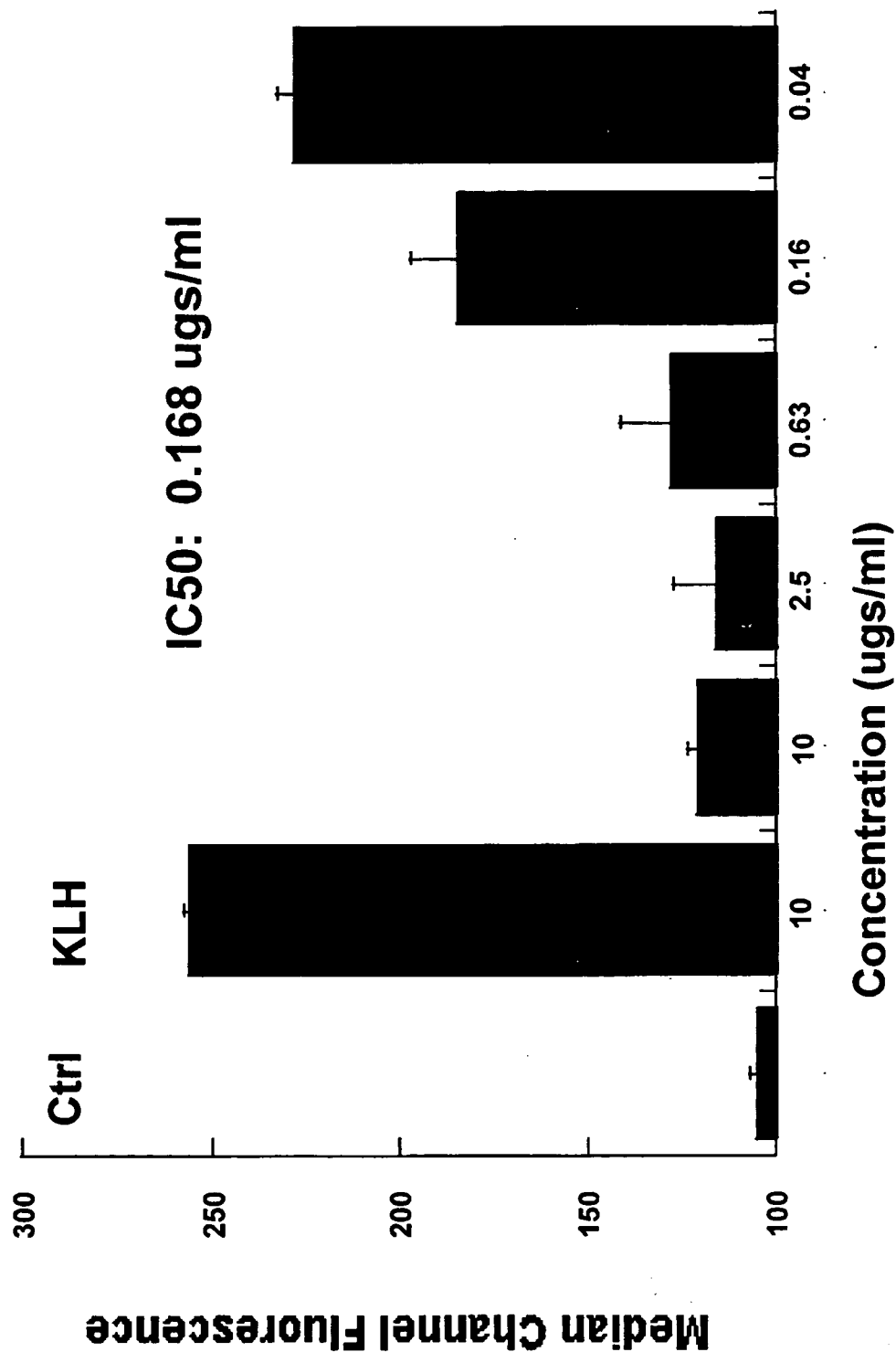
Figure 11



14/22

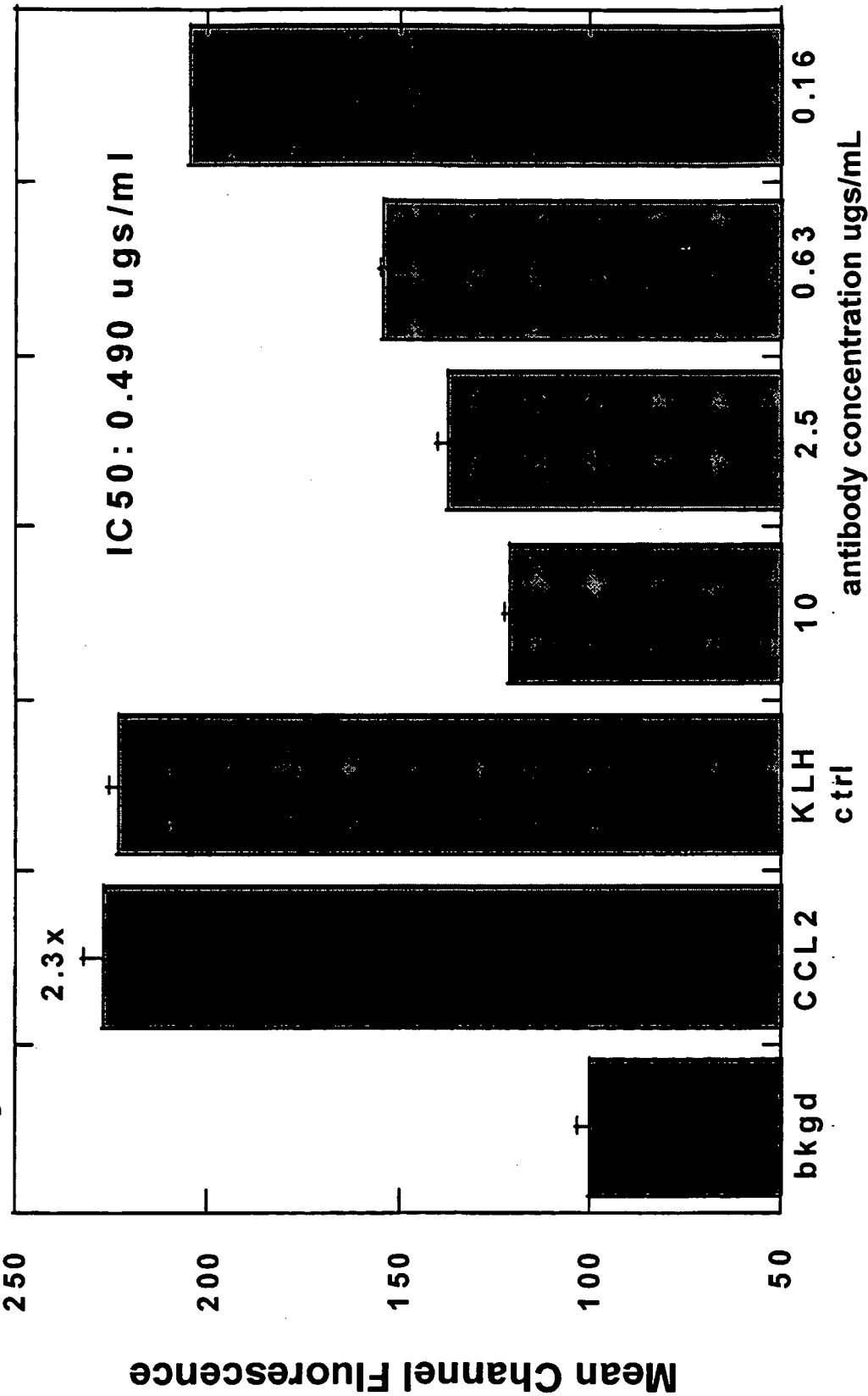
172

Figure 12



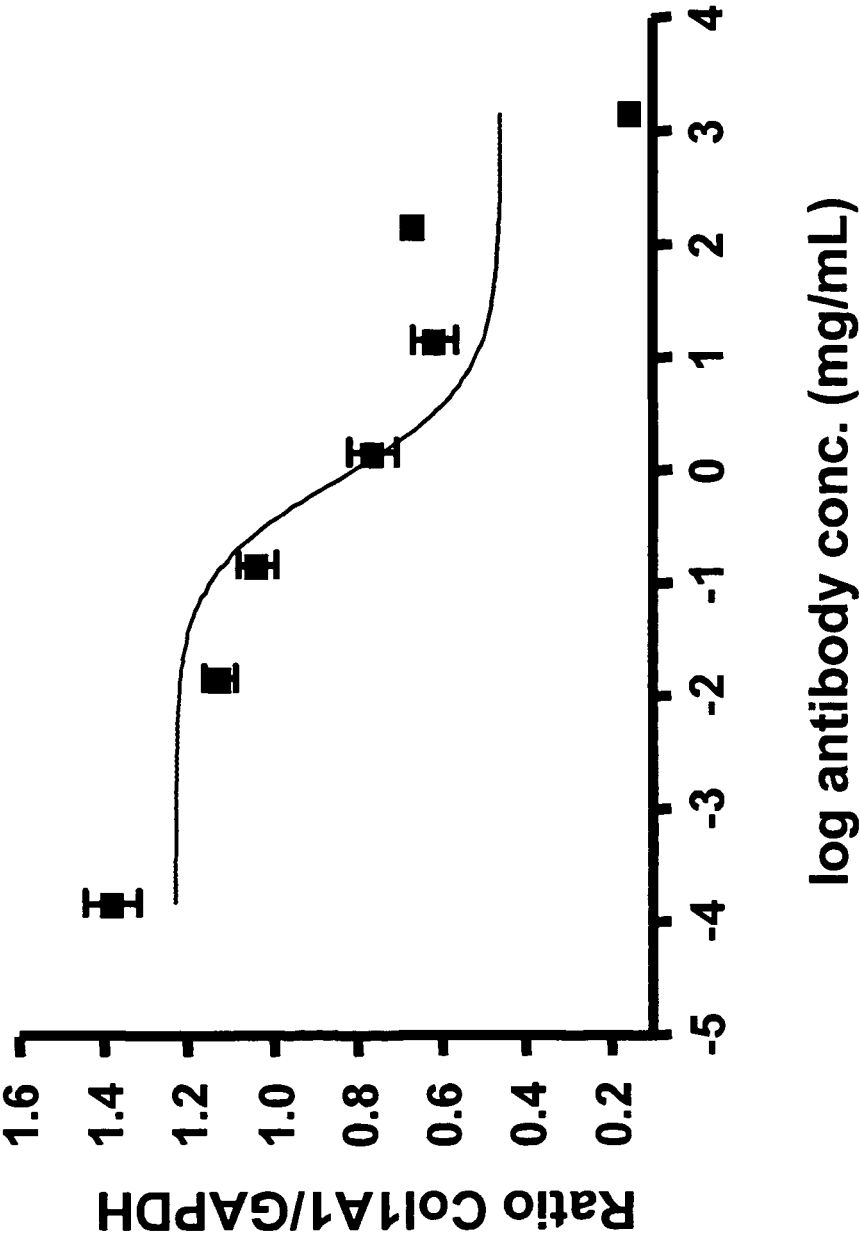
178

Figure 13



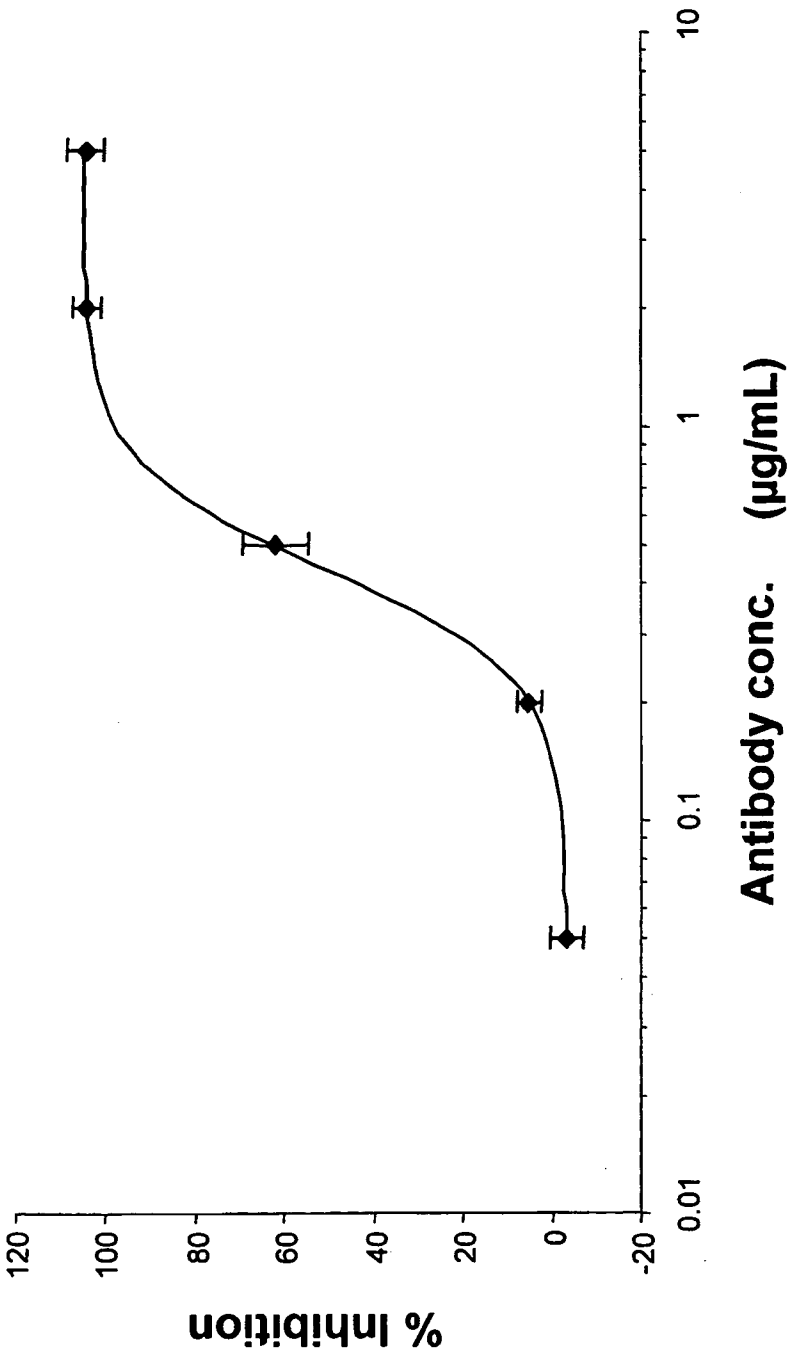
149

Figure 14



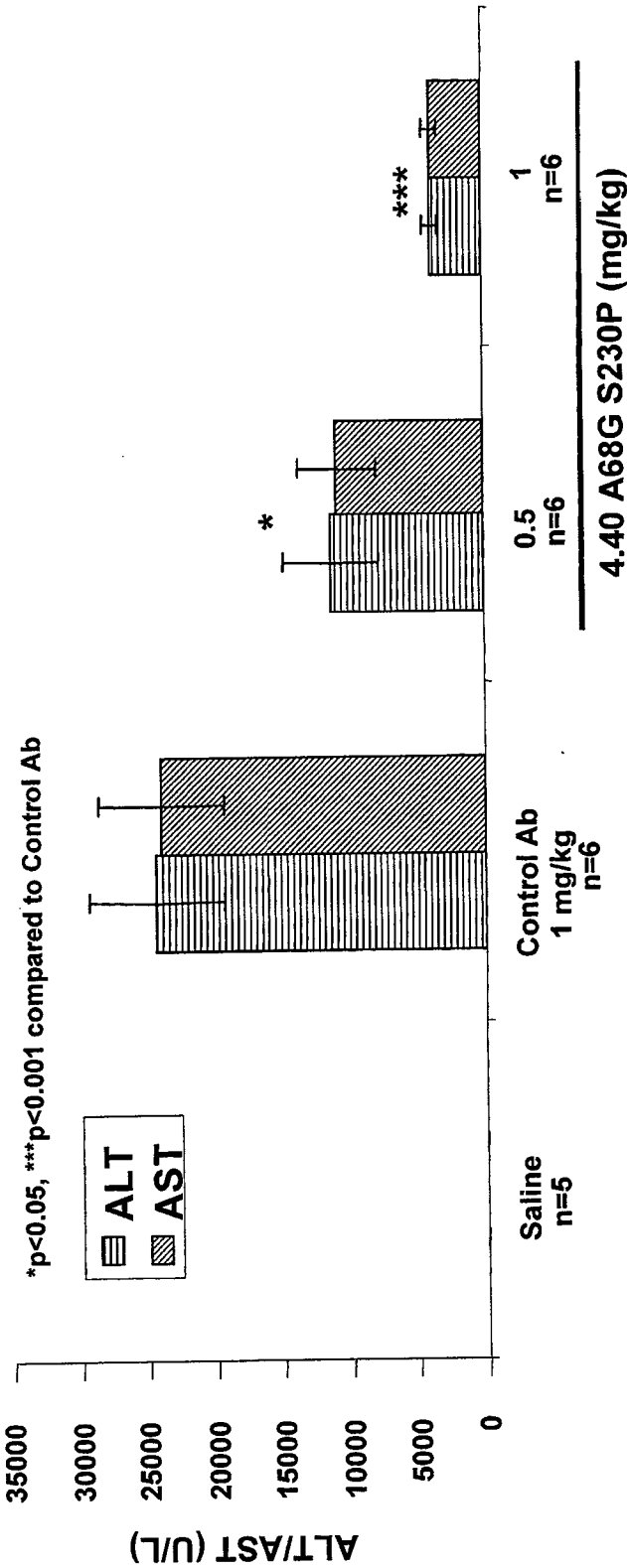
150

Figure 15



151

Figure 16



152

Figure 17a

$V_H$

Germline QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIINPSSGGSTSYAQKFQG

4.22.3 -----I-----M-----T-----

Germline RVTMTRDTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARE##YNWNY#AFDIWGQGTMTVSS SEQ ID NO:158

4.22.3 ---L-----D-----RW-K--FDV-----

$V_L$

Germline DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLLIYKVSNWDS

4.22.3 -----P-----L-----A

Germline GVPDRFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHTWPIITFGQGTREIK SEQ ID NO:159

4.22.3 -----F---###-GRS--V-----



153

Figure 17b

$V_H$

Germline    QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG  
4.40.2       -----L-----L-----K-----

Germline    RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR##YNWNY##AFDIWGQGTMTVSS    SEQ ID NO:160  
4.40.2       -----DQAYWT-FD-----

$V_L$

Germline    EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSFS  
4.40.2       -----

Germline    GVPSRFGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCHQSSSLPLTFGGGTKVEIK    SEQ ID NO:161  
4.40.2       -----A-----

184

Figure 17c

V<sub>H</sub>

Germline QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG

4.9.2 -----GT-----R-----

Germline RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR##YNNWY##AFDIWGQGTMTVSS SEQ ID NO:162

4.9.2 -----K-----R-----DQAY-K-FD-----

V<sub>L</sub>

Germline DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQS

4.9.2 -----T-----

Germline GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKLEIK SEQ ID NO:163

4.9.2 -----NS-CS-----

155

Figure 17D

V<sub>H</sub>

Germline QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQG  
4.39.3 -----I-----M-----P-----  
Germline RVTMTRDTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR##YNWNY#AFDIEWGQGTMTVSS SEQ ID NO:164  
4.39.3 -----D-----F-----ERW-K--FD-----

V<sub>L</sub>

Germline DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES  
4.39.3 -----  
Germline GVPDRFSGSGGTFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPWTFGQGTKVEIK SEQ ID NO:165  
4.39.3 -----Q-----R-----

## ANTICUERPOS PARA CCR2

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La infiltración de leucocitos en sitios de inflamación se cree que es regulada por las  
5 proteínas 8-10 kD como quimioquinas. Estas quimioquinas se clasifican en cuatro grupos,  
dependiendo del espacio entre sus residuos de cisteína N-terminal, designados CC, CXC, XC y  
CX3C. Las quimioquinas pueden mediar un rango de efectos pro-inflamatorios en los leucocitos,  
tales como accionamiento de la quimiotaxis, desgranulación, síntesis de mediadores de lípidos y  
activación de la integrina (Oppenheim, J. J. *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:617-648 (1991);  
10 Baggiolini, M., *et al.*, *Adv. Immunol.*, 55:97-179 (1994); Miller, M. D. y Krangel, M. S., *Crit. Rev.*  
*Immunol.*, 12:17-46 (1992)).

Una quimioquina, Proteína Quimiotáctica de Monocito 1 (MCP-1), también conocida como  
CCL2, actúa en los monocitos, linfocitos y células dendríticas para inducir la quimiotaxis, la  
15 liberación de gránulos, la liberación de citoquina y el estallido respiratorio. Los estudios han  
sugerido que la MCP-1 está implicada en la patología de las enfermedades tales como la artritis  
reumatoide, la arterioesclerosis, las enfermedades granulomatosas, la enfermedad pulmonar  
obstructiva crónica (EPOC), obesidad/diabetes, dolor neuropático, cáncer y esclerosis múltiple  
(Koch, J. *Clin. Invest.* 90:772-79 (1992); Hosaka *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.* 97:451-457 (1994);  
20 Schwartz *et al.*, *Am. J. Cardiol.* 71(6):9B-14B (1993); Schimmer *et al.*, *J. Immunol.* 160:1466-1471  
(1998); Flory *et al.*, *Lab. Invest.* 69:396-404 (1993); Gong *et al.*, *J. Exp. Med.* 186:131-137 (1997);  
Salcedo *et al.* *Blood* 96(1) 34-40 (2000); Bracke *et al.*, *Inflammation & Allergy – Drug Targets* 6: 75-  
79 (2007); Chung *Current Drug Targets – Inflammation & Allergy* 4: 619-625 (2005).

25 CCR2 es un receptor quimiotáctico acoplado a la proteína G de dominio siete-  
transmembrana que se une a MCP-1 así como otras quimioquinas incluyendo CCL8 (MCP-2),  
CCL7 (MCP-3) y CCL13 (MCP-4) (Charo, I. F., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 91:2752-2756  
(1994); Myers, S. J., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:5786-5792 (1995); Gong *et al.*, *J. Biol Chem*

272:11682-11685 (1997); Garcia-Zepeda *et al.*, *J. Immunol.* 157:5613-5626 (1996)). CCR2 también es conocido como CMKBR2 y CKR2. Two alternatively-spliced forms of the CCR2, CCR2A and CCR2B, have been cloned which differ in their C-termini (Wong *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272:1038-1045). En los estudios de señalización, ambas CCR2A y CCR2B median la movilización del calcio dependiente del agonista y la inhibición del adenilato ciclasa. El CCR2 se expresa en los monocitos, las células T y las células dendríticas e interactúa con las quimioquinas secretadas por las células endoteliales, los monocitos y los fibroblastos sinoviales.

El rol biológico del CCR2 se ha probado a través del uso de CCR2 en ratones modificados genéticamente mediante la inactivación de genes (knock-out) (Boring *et al.*, *J Clin Invest.* 100(10):2552-61 (1997); Boring *et al.*, *Nature* 394(6696):894-7 (1998); De Paolo *et al.*, *J Immunol.* 171(7):3560-7 (2003); Gaupp *et al.*, *Am J Pathol.* 162(1):139-50(2003)). Los ratones CCR2<sup>-/-</sup> tienen defectos significantes en ambas las respuestas a la hipersensibilidad de tipo retrasada y la producción de las citoquinas de tipo Th1 y son generalmente menos susceptibles a desarrollar encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Además para modular las respuestas inmunes, CCR2 es un co-receptor para VIH (Connor *et al.*, *J. Exp. Med.* 185:621-628 (1997); Frade *et al.*, *J Clin Invest.* 100(3):497-502(1997)).

Debido a la implicación de la MCP-1 y su receptor CCR2 en respuestas inmunes indeseables, los antagonistas CCR2 pueden ser agentes terapéuticos prometedores. Sin embargo se han descrito pocos antagonistas CCR2 (Ver Ogilvie *et al.*, *Blood* 97(7):1920-4 (2001)). Además, existe una necesidad de composiciones novedosas y mejoradas que unirán CCR2 y bloquearán la señalización CCR2 mediada por su ligando.

## SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Se proporcionan anticuerpos aislados o porciones de unión al antígeno del mismo, que específicamente enlazan CCR2, CCR2 particularmente de humanos, y puede actuar como un antagonista CCR2 y composiciones que comprenden dichos anticuerpos o porciones. Se incluyen

anticuerpos o porciones de unión al antígeno que se unen al CCR2 en un epítipo más que la porción N-terminal o el tercer bucle de CCR2. Dichos anticuerpos pueden unirse al primero y/o segundo bucles extracelulares de CCR2.

5 Se proporcionan las composiciones que comprenden (i) la cadena ligera y/o pesada, los dominios variables de las mismas o las porciones de unión al antígeno de las mismas de dicho anticuerpo anti-CCR2 o las moléculas de ácido nucleico de las mismas y (ii) un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones además pueden comprender otro componente, tal como un agente terapéutico o un agente de diagnóstico.

10

También se proporcionan los métodos de diagnóstico y terapéuticos. Similarmente, se proporcionan los anticuerpos anti-CCR2 y las porciones de los mismos para la fabricación de medicamentos para tratar las enfermedades inflamatorias y no inflamatorias.

15

Se proporcionan vectores y células huésped que comprenden las moléculas del ácido nucleico, así como los métodos para producir recombinantemente los polipéptidos codificados por las moléculas del ácido nucleico. También se proporcionan las líneas celulares aisladas que producen un anticuerpo anti-CCR2 o una porción de unión al antígeno.

20

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25

Las Figuras 1A, 1B & 1C son gráficas que muestran la unión de un anticuerpo CCR2 a las células como se prueba por el análisis FACS. La Figura 1A es una gráfica que ilustra la unión del anticuerpo CCR2 conjugado AF-488 (ALEXA FLUOR® 488, Invitrogen) 4.40 A68G S230P a los monocitos de sangre completamente humana comparados con un anticuerpo de control KLH como se valoró por el análisis FACS. La Figura 1B es una gráfica que ilustra la unión del anticuerpo CCR2 conjugado AF-488 4.40 A68G S230P para las células 300-19 que expresan el CCR2 de humano como se prueba por el análisis FACS. La Figura 1C es una gráfica que ilustra la unión de

diferentes concentraciones del anticuerpo 4.40 A68G S230P para las células CCR2 300-19 transfectadas como se detecta con el PE anti-humano.

La Figura 2 ilustra la unión relacionada con la dosis del anticuerpo 4.40 A68G S230P para las células CCR2 300-19 transfectadas en una prueba de unión de saturación.

La Figura 3 ilustra la habilidad del anticuerpo 4.40 A68G S230P para inhibir la quimiotaxis de las células THP-1 en respuesta a la MCP-1 del ligando CCR2 pero no en respuesta a la MIP-1a del ligando CCR1/CCR5.

10

La Figura 4 ilustra la habilidad del anticuerpo 4.40 A68G S230P para inhibir la quimiotaxis de los monocitos de humano primarios en respuesta a la MCP-1.

La Figura 5 muestra el mapa del plásmido de un vector retroviral para la expresión de las quimeras CCR1-CCR2.

Las Figuras 6A y 6B ilustran la unión del anticuerpo 4.40 A68G S230P para las células 300-19 que expresan un receptor quimérico que consiste de solamente los bucles primeros y segundos extracelulares de CCR2 y el término N y el tercer bucle de CCR1. La Figura 6C representa una prueba de unión de saturación de 4.40 A68G S230P para las células 300-19 transfectadas del receptor quimérico como se mide por el análisis FACS.

La Figura 7 muestra el análisis de unión de saturación (curva en la tercera hora de saturación) del anticuerpo 4.40 A68G S230P en (A) células de control 300-19; (B) células 300-19 transfectadas que expresan la longitud completa CCR2; (C) células 300-19 transfectadas que expresan la quimera MRRR (M1) marcada etiquetada de CCR2 (M) marcada-etiquetada para asegurar la expresión del receptor y las regiones de bucle de CCR1 (R)]; células 300-19 transfectadas que expresan la quimera RRRM (M1) marcada-etiquetada [término N y el primero y

segundo bucle de CCR1 (R) marcada etiquetada para asegurar la expresión del receptor y el tercer bucle de CCR2 (M)] y (E) las células 300-19 transfectadas que expresan la quimera RMMR (M1) marcada etiquetada [término N y el tercer bucle de CCR1 (R) marcada etiquetada para asegurar la expresión del receptor y el primero y segundo bucles de CCR2 (M)].

5

La Figura 8 muestra la unión del anticuerpo 4.40 A68G S230P para las regiones del péptido del bucle 2 ó el bucle 3 de CCR2 como se analizó en un examen ELISA de captura.

La Figura 9 muestra dos gráficas que ilustran los FACS de inmuno marcación de las células 300-19 que expresan el CCR5 recombinante con el anticuerpo 4.40.3 A68G S230P AF-488 conjugado (panel A) o con un anticuerpo anti-CCR5 (panel B).

La Figura 10 ilustra la inhibición de la actividad inducida por MCP-1 para el anticuerpo 4.40 A68G S230P como se analizó por la movilización del calcio en las células 300-19 CCR2 transfectadas.

La Figura 11 demuestra la inhibición de la quimiotaxis MCP-3 inducida de las células 300-19 CCR2 transfectadas por el anticuerpo 4.40 A68G S230P.

La Figura 12 ilustra la inhibición de la polimerización de la actina del monocito de humano en la respuesta a MCP-1 en la sangre completa por el anticuerpo 4.40 A68G S230P.

La Figura 13 ilustra la inhibición de la polimerización de la actina del monocito en la respuesta del mono cinomolgo hembra a MCP-1 en sangre completa por el anticuerpo 4.40 A68G S230P.

La Figura 14 muestra la inhibición dosis dependiente de la síntesis de mARN de colágeno 1 en la línea celular hHSC, LI90 por el anticuerpo 4.40 A68G S230P.



La Figura 15 de muestra la inhibición dosis dependiente de la fosforilación pERK en sangre completa de humano en 10 nM MCP-1 por el anticuerpo 4.40 A68G S230P.

La Figura 16 muestra la disminución de las actividades de la alanina transaminasa en plasma (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST) en ratones modificados genéticamente mediante la introducción o modificación de genes (knock in) CCR2 de humano por el anticuerpo 4.40 A68G S230P 24 horas después de una sola inyección ConA.

Las Figuras 17A-17D muestra una alineación de las secuencias del aminoácido germinal de las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada comparadas a las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo 4.22.3, 4.40.2, 4.39.3 y 4.9.2 (solo se muestran errores para el anticuerpo 4.22.3, 4.40.2, 4.39.3 y 4.9.2). Los CDRs son aberturas desalineadas y subrayadas indicadas por el signo de gato (#).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

### Definiciones y Técnicas Generales

A menos que se defina de otra manera en este documento, los términos científicos y técnicos usados en este documento tendrán los significados que se entienden comúnmente por aquellos ordinarios en la técnica. Además, a menos que se requiera de otra manera por el texto, los términos singulares incluirán pluralidades y términos plurales incluirán el singular. Todas las publicaciones y otras referencias mencionadas en este documento se incorporan como referencia en su totalidad. Generalmente, la nomenclatura usada en conexión con y las técnicas de, célula y cultivo de tejido, biología molecular, inmunología, microbiología, genéticas, proteína y química del ácido nucleico e hibridación descritos en este documento son aquellos bien conocidos y comúnmente usados en la técnica. En caso de conflicto, la presente especificación, incluyendo las definiciones tendrán el control.

Los métodos y las técnicas son generalmente realizados de acuerdo con los métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describen en varias referencias generales y más específicas que se citan y se divulgan a través de la presente especificación a menos que de otra manera se indique. Ver, *por ejemplo*, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992); y Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), todo de las cuales se incorpora en este documento como referencia. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo a las especificaciones del fabricante, como se llevan a cabo comúnmente en la técnica como se describe en este documento. La nomenclatura usada en conexión con y los procedimientos de laboratorio y técnicas de química analítica, química orgánica sintética y química farmacéutica y medicinal descritos en este documento son aquellos bien conocidos y comúnmente usados en la técnica. Las técnicas estándares se usan para las síntesis químicas, los análisis químicos, la preparación farmacéutica, la formulación y la liberación y el tratamiento de los pacientes.

Los siguientes términos, a menos que se indique de otra manera, se entenderá que tienen los siguientes significados:

El término "polipéptido" comprende las proteínas artificiales y nativas, fragmentos de proteína y los análogos de polipéptido de una secuencia de proteínas. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

El término "proteína aislada", "polipéptido aislado" o "anticuerpo aislado" es una proteína, polipéptido o anticuerpo que por virtud de su origen o fuente de derivación (1) no se asocia con los componentes naturalmente asociados que lo acompañan en su estado nativo, (2) es libre de otras proteínas de las mismas especies, (3) se expresa por una célula de una especie diferente o (4) no ocurre en la naturaleza. Además, un polipéptido que es químicamente sintetizado o sintetizado en

un sistema celular diferente de la célula de la cual naturalmente se origina se "aislará" de sus componentes naturalmente asociados. Una proteína también puede suministrarse sustancialmente libre de componentes naturalmente asociados mediante aislamiento, usando las técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la técnica.

5

Los ejemplos de anticuerpos aislados incluyen un anticuerpo anti-CCR2 que ha sido purificado por afinidad usando CCR2 o una porción del mismo, un anticuerpo anti-CCR2 que se ha sintetizado por un hibridoma u otra línea celular *in vitro* y un anticuerpo anti-CCR2 de humano derivado de un ratón transgénico.

10

Una proteína o polipéptido es "sustancialmente puro", "sustancialmente homogéneo", o "sustancialmente purificado" cuando al menos aproximadamente 60 a 75% de una muestra exhibe una sola especie de polipéptido. El polipéptido o proteína puede ser monomérico o multimérico. Una proteína o polipéptido sustancialmente puro comprenderá típicamente aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de peso/peso de una muestra de proteína, más usualmente aproximadamente 95% y puede ser más del 99% puro. La pureza u homogeneidad de la proteína puede indicarse por un número de medios bien conocidos en la técnica, tales como la electroforesis de gel de poliacrilamida de una muestra de proteína, seguida por la visualización de una banda de polipéptido simple a tinción del gel con un tinte bien conocido en la técnica. Para ciertos propósitos, puede proporcionarse mayor resolución mediante usar la HPLC u otros medios bien conocidos en la técnica para la purificación.

El término "anticuerpo análogo" como se usa en este documento, se refiere a un anticuerpo que comprende un segmento que tiene identidad sustancial para una porción de una secuencia de aminoácido y que tiene al menos una de las siguientes propiedades: (1) unión específica a CCR2 bajo condiciones de unión apropiadas, (2) habilidad para inhibir al menos una actividad biológica de CCR2. Típicamente, los anticuerpos análogos comprenden una sustitución de aminoácido conservadora (o inserción u omisión) con respecto a la secuencia nativa. Los análogos típicamente

(64)

son al menos 20 o 25 aminoácidos de largos, al menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 o 200 aminoácidos de largos o más largos y pueden comúnmente ser tan largos como una cadena pesada de longitud completa o cadenas ligeras de los anticuerpos. Algunos casos incluyen anticuerpos análogos con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 sustituciones de la  
5 secuencia del aminoácido germinal.

En ciertos casos, las sustituciones de aminoácidos para un anticuerpo anti-CCR2 o la porción de unión al antígeno del mismo son aquellos que: (1) reducen la susceptibilidad a proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a oxidación, (3) alteran la afinidad a la unión para formar  
10 complejos de proteínas, (4) agregan o remueven los sitios de glucosilación y (5) confieren o modifican otras propiedades funcionales o fisicoquímicas de dichos análogos, pero aún retienen la unión específica a CCR2. Los análogos pueden incluir varias muteinas de una secuencia otra que la secuencia del péptido de ocurrencia normal. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos múltiples o simples tales como pueden hacerse las sustituciones conservadoras de aminoácidos en  
15 la secuencia de ocurrencia normal en una porción del polipéptido fuera de los dominios que forman los contactos intermoleculares. Una sustitución conservadora de aminoácido no debe cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia madre, es decir, un reemplazo de aminoácidos no debe alterar la hoja  $\beta$  anti-paralela que conforma el dominio de unión de la inmunoglobulina que ocurre en la secuencia madre o desestabiliza otros tipos de estructura  
20 secundaria que caracteriza la secuencia madre. En general, la glicina y la prolina no deberían usarse en una hoja  $\beta$  anti-paralela. Los ejemplos de estructuras secundaria y terciaria del polipéptido reconocido por la técnica se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman y Cía., Nueva York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)); y Thornton *et al.*, *Nature*  
25 354:105 (1991), incorporadas en este documento como referencia.

En donde se refieren un "anticuerpo" en este documento, se entiende normalmente que también puede usarse una porción de unión al antígeno del mismo. Una porción de unión al

165

antígeno compete con el anticuerpo intacto para la unión específica. Ver generalmente, Fundamental Immunology, Cp. 7 (Paul, W., ed., segunda ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (incorporada en su totalidad como referencia para todos los propósitos). Las porciones de unión al antígeno pueden producirse mediante las técnicas de ADN recombinantes o mediante la división química o enzimática de los anticuerpos intactos. En algunos casos, las porciones de unión al antígeno Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, dAb, y los fragmentos de región de determinación complementaria (RDC), los anticuerpos de cadena simple (por ejemplo, scFv), los anticuerpos quiméricos, los polipéptidos y diacuerpos que contienen al menos una porción de un anticuerpo que es suficiente para conferir la unión al antígeno específica a los polipéptidos.

10

Del término N al término C, ambos dominios variables de cadena ligera y pesada maduros de un anticuerpo comprenden las regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La cesión de los aminoácidos a cada dominio en este documento es de acuerdo con las definiciones de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Md. (1987 y 1991)); Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); o Chothia *et al.*, *Nature* 342:878-883 (1989).

Como se usa en este documento, un anticuerpo que se refiere mediante un número es el mismo como un anticuerpo monoclonal que se obtiene del hibridoma del mismo número. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 4.40 es el mismo anticuerpo como uno obtenido del hibridoma 4.40 o un subclon del mismo. Los subclones secuenciales se designan por el ejemplo 4.40.1; 4.40.2 y 4.40.3 y tienen las mismas secuencias y funcionalidad.

Como se usa en este documento, un fragmento Fd significa un anticuerpo que consiste de los dominios V<sub>H</sub> y C<sub>H</sub>1; un fragmento Fv consiste de los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de un brazo simple de un anticuerpo y un fragmento dAb (Ward *et al.*, *Nature* 341:544-546 (1989)) consiste de un dominio V<sub>H</sub>.

156

En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo de cadena simple (por ejemplo, (por ejemplo, scFv) en el cual los dominios  $V_L$  y  $V_H$  se emparejan para formar una molécula monovalente vía un enlace sintético que los habilita para hacerse como una cadena de polipéptido simple. (Ver, por ejemplo, Bird *et al.*, *Science* 242:423-426 (1988) y Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 85:5879-5883 (1988).) En algunos casos, los anticuerpos son diacuerpos, es decir, son anticuerpos divalentes en los cuales los dominios  $V_H$  y  $V_L$  se expresan en una cadena de polipéptido simple, pero usando un enlace que es muy corto para permitir emparejarse entre los dos dominios en la misma cadena, por lo tanto forzando a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión al antígeno. (Ver por ejemplo, Holliger P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 90:6444-6448 (1993), y Poljak R. J. *et al.*, *Structure* 2:1121-1123 (1994).) En algunos casos, uno o más CDRs de un anticuerpo en este documento pueden incorporarse en una molécula ya sea covalentemente o no covalentemente para hacer una inmunoadhesina que específicamente se enlaza a CCR2. En dichos casos, los CDR(s) pueden incorporarse como parte de una cadena de polipéptido más grande, pueden ser covalentemente unidos a otra cadena de polipéptido o puede incorporarse no covalentemente. En los casos que tiene uno o más sitios de unión, los sitios de unión pueden ser idénticos uno con el otro o pueden ser diferentes.

Como se usa en este documento, el término "anticuerpo de humano" significa cualquier anticuerpo en el cual las secuencias de dominio constante y variable son secuencias de humano. El término comprende anticuerpos con secuencias derivadas de genes de humano, pero las cuales se han cambiado, es decir para disminuir la inmunogenicidad posible, incrementar la afinidad, eliminar las cisteínas que pueden causar desdoblamiento, etc. El término abarca dichos anticuerpos producidos recombinantemente en células de no humanos, que pueden impartir glicosilación no típicamente de células de humanos. Estos anticuerpos pueden prepararse en una variedad de formas, como se describe en este documento.

El término "anticuerpo quimérico" como se usa en este documento significa un anticuerpo que comprende regiones de dos o más diferentes anticuerpos. En un caso, uno o más de los CDRs del anticuerpo quimérico se derivan de un anticuerpo anti-CCR2 de humano. En otro caso, todos los CDRs se derivaron de anticuerpos anti-CCR2 de humano. En otro caso, los CDRs de más de uno de los anticuerpos anti-CCR2 de humano son combinados en un anticuerpo quimérico. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender un CDR1 de la cadena ligera de un primer anticuerpo anti-CCR2 de humano, un CDR2 de la cadena ligera de un segundo anticuerpo CCR2 de humano y un CDR3 de la cadena ligera de un tercer anticuerpo anti-CCR2 de humano y CDRs de la cadena pesada pueden derivarse de uno o más de otros anticuerpos anti-CCR2. Además, las regiones variables pueden derivarse de uno o más de los anticuerpos anti-CCR2 de los cuales uno o más de los CDRs se toman o de uno o más anticuerpos de humano diferentes.

En algunos casos, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo anti-CCR2 de humanos. Un anticuerpo anti-CCR2 de humano comprende la secuencia de aminoácidos de una o más regiones variables y/o la secuencia de aminoácidos de al menos una porción de la región constante de uno o más anticuerpos anti-CCR2 y los CDRs derivados de un anticuerpo anti-CCR2 de no humano.

Los fragmentos o análogos de los anticuerpos o las moléculas de inmunoglobulina pueden prepararse rápidamente por aquellos expertos en la técnica siguiendo las enseñanzas en esta especificación. El término carboxi y amino preferidos de los fragmentos o análogos ocurren cerca de los límites de los dominios funcionales.

El término "resonancia de plasmón de superficie" como se usa en este documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de las interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteína dentro de una matriz biosensora, por ejemplo usando el sistema BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, N.J.). Para descripciones adicionales, ver Jonsson U. *et al.*, *Ann. Biol. Clin.*

51:19-26 (1993); Jonsson U. *et al.*, *Biotechniques* 11:620-627 (1991); Jonsson B. *et al.*, *J. Mol. Recognit.* 8:125-131 (1995); y Jonsson B. *et al.*, *Anal. Biochem.* 198:268-277 (1991).

El término " $K_D$ " se refiere a la constante de disociación del equilibrio de una interacción  
5 antígeno-anticuerpo particular. Un anticuerpo se dice que se une específicamente a un antígeno  
cuando la constante de disociación es  $\leq 1$  mM,  $\leq 100$  nM, ó  $\leq 10$  nM. En ciertos casos, el  $K_D$  es 1  
pM a 500 pM. En otros casos, el  $K_D$  es entre 500 pM a 1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M a 100 nM, o 100 mM a 10 nM.

El término "epítoto" incluye cualquier proteína determinante capaz de la unión específica  
10 a una inmunoglobulina o el receptor de las células T o de otra manera interactuar con una  
molécula. Los determinantes epitópicos generalmente consisten de agrupamientos de superficie  
químicamente activa de moléculas tales como aminoácidos o carbohidratos o cadenas laterales de  
azúcar y generalmente tienen características estructurales de tres dimensiones específicas, así  
como características de carga específica. Un epítoto puede ser "lineal" o "conformacional". En un  
15 epítoto lineal, todos los puntos de interacción entre la proteína y la molécula de interacción (tal  
como un anticuerpo) ocurren linealmente a lo largo de la secuencia de aminoácidos primaria de la  
proteína. En un epítoto conformacional, los puntos de interacción ocurren a través de los residuos  
de aminoácido en la proteína que se separan uno del otro. Una vez que un epítoto deseado en un  
antígeno se determina, es posible generar anticuerpos para ese epítoto, por ejemplo usando las  
20 técnicas descritas en la presente especificación. Alternativamente, durante el proceso de  
descubrimiento, la generación y caracterización de los anticuerpos puede elucidar la información  
acerca de los epítopos deseables. De esta información, posteriormente es posible analizar  
competitivamente los anticuerpos para su unión al mismo epítoto. Un avance para lograr esto es  
llevar a cabo estudios de competición y competición cruzada uno con otro para unirse al CCR2, por  
25 ejemplo, los anticuerpos compiten para unirse al antígeno. Un proceso de alto rendimiento para  
"unir" anticuerpos con base en su competición cruzada se describe en la Solicitud de Patente  
Internacional No. WO 03/48731.



Como se usa en este documento los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaciones siguen su uso convencional. Ver, Immunology - A Synthesis (segunda edición, E.S. Golub y D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), incorporada en este documento como referencia.

5

El término "polinucleótido" como se refiere en este documento significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases en longitud, ya sean ribonucleótidos o deoxiribonucleótidos o una forma modificada del tipo de nucleótido. El término incluye formas de doble hebra o hebra simple.

10

El término "polinucleótido aislado" como se usa en este documento significa un polinucleótido de cADN genómico o de origen sintético o alguna combinación de los mismos, el cual por virtud de su origen, el "polinucleótido aislado" (1) no se asocia con todo o una porción de un polinucleótido con el cual el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza, (2) se une operativamente a un polinucleótido al cual no se une en la naturaleza o (3) no ocurre en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

El término "nucleótidos de ocurrencia natural" como se usa en este documento incluye deoxiribonucleótidos y ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados" como se usa en este documento incluye nucleótidos con grupos de azúcares sustituidos o modificados y los similares. El término "uniones de oligonucleótidos" se refiere en este documento que incluye uniones de oligonucleótidos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforoaniladato, fosforoamidato y los similares. Ver por ejemplo, LaPlanche *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 14:9081 (1986); Stec *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 106:6077 (1984); Stein *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 16:3209 (1988); Zon *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design* 6:539 (1991); Zon *et al.*, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp.87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Patente Estadounidense No. 5,151,510; Uhlmann y Peyman, *Chemical Reviews* 90:543 (1990), las descripciones de las cuales se incorporan en este

documento como referencias. Un oligonucleótido puede incluir una etiqueta para detección, si se desea.

Las secuencias "operativamente unidas" incluyen ambas secuencias de control de la expresión que son contiguas con el gen de interés y las secuencias de control de la expresión que actúan en *trans* o en una distancia para el control del gen de interés. El término "secuencia de control de expresión" como se usa en este documento significa las secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y procesamiento de las secuencias de codificación a las cuales se ligan. Las secuencias de control de expresión incluyen el inicio de la transcripción, la terminación, las secuencias del promotor y del mejorador; las señales de procesamiento del ARN eficientes tales como señales de poliadenilación y empalme; secuencias que estabilizan el mRNA citoplásmico; secuencias que mejoran la eficiencia de la traducción (es decir, secuencia de consenso Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína y cuando se desea, las secuencias que mejoran la secreción de las proteínas. La naturaleza de dichas secuencias de control difieren dependiendo del organismo huésped; en procariotas, dichas secuencias de control generalmente incluyen el promotor, el sitio de unión ribosomal y la secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotas, generalmente dichas secuencias de control incluyen promotores y la secuencia de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" se intenta que incluyan en un mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y procesamiento, y también pueden incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa por ejemplo, secuencias líderes y secuencias asociadas de fusión.

El término "vector" como se usa en este documento, significa una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha unido. En algunos casos, el vector es un plásmido, es decir, una pieza de doble hebra circular de ADN en que los segmentos de ADN adicionales pueden ligarse. En algunos casos, el vector es un vector viral, en donde los segmentos de ADN adicional pueden ligarse dentro del genoma viral. En algunos casos, los vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped dentro de la cual se introducen (por

A1

ejemplo, los vectores bacteriales que tienen un origen bacterial de replicación y vectores de mamíferos episomales). En otros casos, los vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episomales) pueden integrarse dentro del genoma de una célula huésped en la introducción dentro de la célula huésped y por lo tanto se replican junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los cuales se unen operativamente. Dichos vectores son referidos en este documento como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente "vectores de expresión").

El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped") como se usa en este documento, significa una célula dentro de la cual un vector de expresión recombinante se ha introducido. Debe entenderse que la "célula huésped recombinante" y la "célula huésped" significa no solamente la célula sujeto particular sino también sus descendientes de dicha célula. Porque ciertas modificaciones pueden ocurrir en las generaciones venideras debido a la mutación o influencias ambientales, dichos descendientes no pueden de hecho ser idénticos a la célula madre pero aún se incluyen dentro del alcance del término "célula huésped" como se usa en este documento.

El término "porcentaje de la identidad de secuencia" en el contexto de las secuencias de nucleótidos significa los residuos en dos secuencias que son los mismos cuando se alinean para máxima correspondencia. Existe un número de diferentes algoritmos conocidos en la técnica que pueden usarse para medir la identidad de secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos pueden compararse usando FASTA, Gap o Bestfit que son programas de Wisconsin Package Versión 10.0 Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA que incluye, por ejemplo, los programas FASTA2 y FASTA3, proporciona alineaciones y el porcentaje de la identidad de secuencia de las regiones de superposición entre las secuencias de búsqueda y averiguación (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.* 266:227-258 (1996); Pearson, *J. Mol. Biol.* 276:71-84 (1998); incorporadas a este documento como referencia). A menos que se especifique

de otra manera, los parámetros por defecto (una tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM factor para la matriz de puntuación) o usando Gap con sus parámetros por defecto como se proporciona en GCG Versión 6.1, incorporado en este documento como referencia.

5 Una referencia a una secuencia de nucleótidos abarca su complemento a menos que se especifique de otra manera. Además, una referencia a un ácido nucleico que tiene una secuencia particular deberá entenderse que abarca su hebra complementaria con su secuencia complementaria.

10 Como se usa en este documento, los términos "porcentaje de identidad de secuencia" y "porcentaje de homología de secuencia se usan intercambiamente".

El término "similitud sustancial" o "similitud de secuencia sustancial" cuando se refiere a un ácido nucleico o fragmento del mismo significa que cuando se alinean óptimamente con las inserciones o eliminaciones del nucleótido apropiado con otro ácido nucleico (o su hebra complementaria), existe una identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente 85%, al menos 90%, y al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las bases de nucleótidos, como se mide por cualquier algoritmo bien conocido de identidad de secuencia, tal como FASTA, BLAST o Gap, como se divulgó anteriormente.

20

Como se aplica a los polipéptidos, el término "identidad sustancial" significa que dos o más secuencias de péptido, cuando se alinean óptimamente, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando los pesos de intervalo por defecto como se suministran con los programas, comparten al menos 70%, 75% o 80% de la identidad de secuencia, en al menos 90% o 95% de identidad de secuencia y al menos 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia. En ciertos casos, las posiciones de los residuos que no son idénticas difieren por las sustituciones conservadoras de aminoácidos. Una "sustitución del aminoácido conservador" es una en la cual un residuo de aminoácido se sustituye mediante otro residuo de aminoácidos que tiene un grupo R de cadena

25

lineal con propiedades químicas similares (es decir, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución conservadora de aminoácido no cambia sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en donde dos o más secuencias de aminoácido difieren una de la otra por las sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia puede ajustarse ascendientemente para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Los medios para hacer este ajuste son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, Ver por ejemplo, Pearson, *Methods Mol. Biol.* 243:307-31 (1994). Los ejemplos de los grupos de aminoácidos que tienen cadenas lineales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas lineales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; 2) cadenas lineales alifáticas-hidroxilo: serina y treonina; 3) cadenas lineales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas lineales aromáticas: fenilalanina, tirosina, y triptofano; 5) cadenas lineales básicas: lisina, arginina, e histidina; 6) cadenas lineales ácidas: ácido aspártico y ácido glutámico y 7) cadenas lineales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservadores son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato, y asparagina-glutamina.

Alternativamente, un reemplazo conservador es cualquier cambio que tiene un valor positivo en la matriz de probabilidad log PAM250 descrito en Gonnet *et al.*, *Science* 256:1443-45 (1992), incorporada en este documento como referencia. Un reemplazo "moderadamente conservador" es cualquier cambio que tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad log PAM250.

La identidad de secuencia para los polipéptidos se mide típicamente usando el programa de análisis de secuencia. Los programas de análisis de proteína igualan las secuencias usando las mediciones de similitud asignadas a varias sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones incluyendo las sustituciones conservadoras de aminoácidos. Por ejemplo, el GCG contiene programas tales como "Gap" y "Bestfit" que pueden usarse con parámetros por defecto como los especificados por los programas para determinar la homología de secuencia o identidad de

12-1

secuencia entre los polipéptidos cercanamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína tipo salvaje y una muteína de la misma.

Ver por ejemplo, GCG Versión 6.1 (Universidad de Wisconsin, WI). Las secuencias de polipéptidos también pueden compararse usando FASTA por defecto o los parámetros recomendados, ver GCG

5 Versión 6.1. FASTA (es decir, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineaciones y el porcentaje de la identidad de secuencia de las regiones de mejor traslapo entre las secuencias de búsqueda y averiguación (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000)). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia a una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa de computadora

10 BLAST, especialmente blastp o tblastn, usando parámetros por defecto como se suministra con los programas. Ver por ejemplo, Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402 (1997).

CCR2 es una proteína de dominio de siete transmembranas y por consiguiente tiene seis

15 bucles. Los bucles 1, 3 y 5 contando desde el término N extracelular, son bucles intracelulares, mientras los bucles 2, 4 y 6 son extracelulares. El primero, segundo y tercer bucles extracelulares de CCR2 se refieren a los bucles 2, 4 y 6, respectivamente.

A través de toda esta especificación y las reivindicaciones, la palabra "comprende" o las

20 variaciones tales como "comprenden" o "comprendiendo" se entenderá que implica la inclusión de un número entero establecido o un grupo de números enteros pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

#### Anticuerpos Anti-CCR2 de Humano y Caracterización de los Mismos

25 En algunos casos, se proporcionan anticuerpos anti-CCR2 de humanos. En algunos casos, los anticuerpos anti-CCR2 de humano se producen mediante la inmunización de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un roedor, cuyo genoma comprende genes de inmunoglobulina de humano de manera que el animal transgénico produzca anticuerpos de

(35)

humano. En algunos casos, los anticuerpos anti-CCR2 y las porciones de unión al antígeno incluyen pero no se limitan a anticuerpos o porciones de unión al antígeno (i) que se unen al primero o segundo bucle extracelular del CCR2; o ambos; (ii) los cuales no se unen al extremo N-terminal o el tercer bucle extracelular de CCR2 o ambos (iii) el cual hace ambos (i) y (ii). En otro caso, se proporcionan los anticuerpos anti-CCR2 de humano que se unen a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:128 o SEQ ID NO:129. En otro caso, los anticuerpos anti-CCR2 de humano se unen a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99% idénticos a la SEQ ID NO:128 o SEQ ID NO:129. En otro caso, los anticuerpos anti-CCR2 y las porciones de unión al antígeno incluyen pero no se limitan a anticuerpos o porciones de unión al antígeno las cuales se unen al tercer bucle extracelular de CCR2.

Los genes  $V_H$ ,  $V_K$ ,  $V_\lambda$  se clasifican en familias en la base de la homología de secuencia. Dos genes  $V_H$ ,  $V_K$ , o  $V_\lambda$  pertenecen a la misma familia si comparten la misma secuencia de nucleótidos en más de 80% de las posiciones. Un anticuerpo anti-CCR2 puede comprender una cadena ligera kappa de humano ( $V_K$ ) o una cadena ligera lambda de humano ( $V_\lambda$ ) o una secuencia de aminoácidos derivada de los mismos. En algunos casos comprendiendo una cadena ligera lambda, el dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) usa un gen de la familia  $V_\lambda 1$ ,  $V_\lambda 2$ ,  $V_\lambda 3$ ,  $V_\lambda 4$ ,  $V_\lambda 5$ ,  $V_\lambda 6$ ,  $V_\lambda 7$ ,  $V_\lambda 8$ ,  $V_\lambda 9$ , o  $V_\lambda 10$  (Williams S.C. *et al. J. Mol. Bio.* 264:220-232 (1996)).

20

En algunos casos comprendiendo una cadena ligera kappa, el dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) usa un gen de la familia  $V_{K I}$ ,  $V_{K II}$ ,  $V_{K III}$ ,  $V_{K IV}$ ,  $V_{K V}$ , o  $V_{K VI}$  de humano (Cox J. P. L., *et al., Eur. J. Immunol* 24:827-836 (1994)), preferiblemente un gen de la familia  $V_{K I}$ ,  $V_{K II}$ ,  $V_{K IV}$ , o  $V_{K VI}$ , de preferencia un gen de la familia  $V_{K I}$  o  $V_{K VI}$ . En algunos caso, la secuencia germinal de cadena ligera se selecciona de las secuencias  $V_K$  de humano, incluyendo pero no limitadas a A1, A10, A11, A14, A17, A18, A19, A2, A20, A23, A26, A27, A3, A30, A5, A7, B2, B3, L1, L10, L11, L12, L14, L15, L16, L18, L19, L2, L20, L22, L23, L24, L25, L4/18a, L5, L6, L8, L9, O1, O11, O12, O14, O18, O2, O4, y O8. En ciertos casos, este gen germinal de humano de cadena ligera se

178

selecciona de V1-11, V1-13, V1-16, V1-17, V1-18, V1-19, V1-2, V1-20, V1-22, V1-3, V1-4, V1-5, V1-7, V1-9, V2-1, V2-11, V2-13, V2-14, V2-15, V2-17, V2-19, V2-6, V2-7, V2-8, V3-2, V3-3, V3-4, V4-1, V4-2, V4-3, V4-4, V4-6, V5-1, V5-2, V5-4, y V5-6. En ciertos casos, la cadena ligera usa un gen germinal V<sub>K</sub>I O12, V<sub>K</sub>II A1, un V<sub>K</sub>IV B3 o un V<sub>K</sub>VI A26 de humano.

5

Un anticuerpo anti-CCR2 puede comprende un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) que usa un gen de la familia V<sub>H</sub>1, V<sub>H</sub>2, V<sub>H</sub>3, V<sub>H</sub>4, V<sub>H</sub>5, V<sub>H</sub>6 o V<sub>H</sub>7 de humano. En ejemplos particulares, este gen germinal de cadena pesada de humano se selecciona VH1-18, VH1-2, VH1-24, VH1-3, VH1-45, VH1-46, VH1-58, VH1-69, VH1-8, VH2-26, VH2-5, VH2-70, VH3-11, VH3-13, 10 VH3-15, VH3-16, VH3-20, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-33, VH3-35, VH3-38, VH3-43, VH3-48, VH3-49, VH3-53, VH3-64, VH3-66, VH3-7, VH3-72, VH3-73, VH3-74, VH3-9, VH4-28, VH4-31, VH4-34, VH4-39, VH4-4, VH4-59, VH4-61, VH5-51, VH6-1, y VH7-81. En ciertos casos, la cadena pesada usa un gen V<sub>H</sub>I 1-46 o un V<sub>H</sub>III 3-30.

15

En casos particulares, la región variable de la cadena ligera y/o la región variable de la cadena pesada comprenden una región variable o al menos una porción de una región variable (es decir conteniendo 2 ó 3 subregiones, tales como FR2 y FR3). En ciertos casos, al menos FRL1, FRL2, FRL3, o FRL4 es completamente de humano. En otros ejemplos, al menos FRH1, FRH2, FRH3, o FRH4 es completamente de humano. En algunos casos, al menos FRL1, FRL2, FRL3, o 20 FRL4 es una secuencia germinal (por ejemplo, línea germinal de humano) o comprende secuencias de consenso humano para la variable particular (rápidamente disponible en las fuentes de secuencias Ig de humano conocidas descritas en este documento). En otros ejemplos, al menos FRH1, FRH2, FRH3, o FRH4 es una secuencia germinal (por ejemplo, línea germinal de humano) o comprende secuencias de consenso de humano para la variable particular.

25

En algunos casos, el V<sub>L</sub> del anticuerpo CCR2 comprende una o más sustituciones de aminoácidos, eliminaciones y/o inserciones relativas a la secuencia del aminoácido germinal del gen de humanos. En algunos casos, el V<sub>L</sub> del anticuerpo anti-CCR2 comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,



8, 9, o 10 sustituciones de aminoácido relativas a la secuencia de aminoácidos germinal. En algunos casos, una o más de aquellas sustituciones, eliminaciones, y/o inserciones es en un CDR de la cadena ligera. En algunos casos, las sustituciones, eliminaciones y/o inserciones relativas a la línea germinal están en una o más de las mismas posiciones como la sustitución, eliminación y/o inserción relativa a la línea germinal en cualquiera de uno o más de los V<sub>L</sub> de los anticuerpos 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 o 4.40 A68G S230P. Por ejemplo, el V<sub>L</sub> de un anticuerpo anti-CCR2 puede contener uno o más sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos comparados con la línea germinal encontrado en el V<sub>L</sub> del anticuerpo 4.40. En algunos casos, los cambios en el aminoácido son en uno o más de las mismas porciones, pero involucra una sustitución, eliminación y/o inserción diferente comparada con la línea germinal. En algunos casos, la sustitución puede representar sustituciones de aminoácidos en dichas posiciones relativas al aminoácido en el anticuerpo de referencia. Por ejemplo, si una posición particular en uno de estos anticuerpos se sustituye relativa a la germinal y es glutamato, se puede sustituir el aspartato en esa posición. Similarmente, si una sustitución de aminoácido comparada a la línea germinal es serina, se puede conservativamente sustituir la treonina por la serina en esa posición.

En algunos casos, la cadena ligera del anticuerpo anti-CCR2 de humano comprende la secuencia del aminoácido de dominio variable (V<sub>L</sub>) del anticuerpo 4.40 (SEQ ID NO:101); 4.9 (SEQ ID NO:29); 4.22 (SEQ ID NO:65); 4.39 (SEQ ID NO:194); o 4.40 A68G S230P (SEQ ID NO:113); o dicha secuencia de aminoácido que tiene más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 sustituciones conservadoras de aminoácido y/o un total de más de 3 sustituciones no conservadoras de aminoácidos. En algunos casos, la cadena ligera puede comprender CDR1, CDR2 y CDR3 independientemente seleccionado de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera, respectivamente de la cadena ligera del anticuerpo 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 o 4.40 A68G S230P, o CDRs cada uno teniendo menos de 4 o menos de 3 sustituciones conservadoras de aminoácidos y/o un total de tres o menos sustituciones no conservadoras de aminoácidos. En algunos casos, la cadena ligera del anticuerpo anti-CCR2 comprende una cadena ligera CDR1, CDR2, y CDR3, cada uno de los cuales se selecciona independientemente de las regiones de cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3

178

del anticuerpo monoclonal 4.40 (SEQ ID NO:100); 4.9 (SEQ ID NO:28); 4.22 (SEQ ID NO:64); 4.39 (SEQ ID NO:193); o 4.40 A68G S230P (SEQ ID NO:112). En ciertos casos, la cadena ligera del anticuerpo anti-CCR2 comprende la cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la región  $V_L$  de un anticuerpo seleccionado de 4.40 (SEQ ID NO:101); 4.9 (SEQ ID NO:29); 4.22 (SEQ ID NO:65); 4.39 (SEQ ID NO:194); o 4.40 A68G S230P (SEQ ID NO:113); o dichos CDRs cada uno teniendo menos de 4 o menos de 3 sustituciones conservadoras de aminoácidos y/o un total de tres o menos sustituciones no conservadoras de aminoácidos. Los identificadores de la secuencia se listan para los CDRs de ciertos anticuerpos en la Tabla 8.

10

Con respecto a la cadena pesada, en algunos casos, el dominio variable ( $V_H$ ) usa un  $V_H$  3-30 de humano, o una secuencia de gen  $V_H$  1-46. En algunos casos, la secuencia  $V_H$  del anticuerpo anti-CCR2 contiene una o más sustituciones, eliminaciones y/o inserciones (adiciones) de aminoácidos relativas a la secuencia de aminoácidos. En algunos casos, el dominio variable de la cadena pesada comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, o 17 sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. En algunos casos, la sustitución es una sustitución no conservadora comparada con la secuencia del aminoácido de la línea germinal. En algunos casos, la sustitución, la eliminación y/o inserción está en un CDR de la cadena pesada. En algunos casos, la sustitución, eliminación y/o inserción del aminoácido se hace en uno o más de las mismas posiciones como las mutaciones de la línea germinal en cualquiera de uno o más de los  $V_H$  de los anticuerpos 4.40, 4.22, 4.39 o 4.9. En otros casos, la sustitución, eliminación y/o inserción del aminoácido, está en una o más de las mismas posiciones pero involucra una sustitución, eliminación y/o inserción diferente que en el anticuerpo de referencia. En algunos casos, el anticuerpo comprende una cadena pesada CDR3 teniendo la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:202 o SEQ ID NO:203.

20

25

En algunos casos, la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos  $V_H$  del anticuerpo 4.40 (SEQ ID NO:83); 4.22 (SEQ ID NO:47); 4.9 (SEQ ID NO:11); 4.39 (SEQ ID

179

NO:176); o dicha secuencia de aminoácidos V<sub>H</sub> teniendo más de 1, 2, 3, 4, 6, 8, o 10 sustituciones conservadoras de aminoácidos y/o un total de más de 3 sustituciones de aminoácidos no conservadoras. En algunos casos, la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos del inicio del CDR1 al término del CDR3 de cualquiera de uno de los anticuerpos precedentes.

5

En algunos casos, la cadena pesada comprende la cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo 4.40, 4.22, 4.39 o 4.9 o dichos CDRs cada uno teniendo menos de 8, menos de 6, menos de 4, o menos de 3 sustituciones conservadoras de aminoácidos y/o un total de tres o menos sustituciones no conservadoras de aminoácidos

10

En algunos casos, los CDRs de cadena pesada se seleccionan independientemente de los CDRs de los anticuerpos 4.40, 4.22, 4.39 o 4.9. En otro caso, la cadena pesada comprende CDRs independientemente seleccionados de dos o más regiones V<sub>H</sub> seleccionadas de 4.40 (SEQ ID NO:83); 4.22 (SEQ ID NO:47); 4.39 (SEQ ID NO:176) o 4.9 (SEQ ID NO:11). En otro caso, el anticuerpo comprende una cadena ligera como se describió anteriormente y una cadena pesada como se describió anteriormente. En un caso futuro, los CDRs de cadena ligera y los CDRs de cadena pesada son del mismo anticuerpo.

15

Un tipo de sustitución del aminoácido que puede hacerse es para cambiar una o más cisteínas en el anticuerpo, que puede reaccionar químicamente para otro residuo, tal como sin limitación alanina o serina. En un caso, existe una sustitución de una cisteína no canónica. La sustitución puede hacerse en un CDR o la región variable de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. En algunos casos, la cisteína es canónica.

20

Otro tipo de sustitución de aminoácido que puede hacerse es para cargar cualquier sitio proteolítico potencial en el anticuerpo. Dichos sitios pueden ocurrir en un CDR o una región variable de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. La sustitución de los residuos de cisteína y la remoción de los sitios proteolíticos puede disminuir el riesgo de cualquier

25

180

heterogeneidad en el producto de anticuerpos y además incrementa su homogeneidad. Otro tipo de sustitución de aminoácido es para eliminar los pares de asparagina-glicina, que forman los sitios de desaminación potencial mediante alterar uno o ambos de los residuos. En algunos casos, la lisina C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo anti-CCR2 puede removerse proteolíticamente o genéticamente. En varios casos, las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos anti-CCR2 pueden incluir opcionalmente una secuencia de señal.

En un aspecto, los anticuerpos se producen por un hibridoma.

La Tabla 1 lista los identificadores de secuencia (SEQ ID Nos) de los ácidos nucleicos que codifican las porciones que comprenden el dominio variable y la longitud completa de las cadenas ligeras y pesadas y las secuencias de aminoácidos deducidas correspondientes de los anticuerpos ejemplarizadores.

TABLA 1

| ANTICUERPOS ANTI-CCR2 DE HUMANO |                                            |     |                          |     |                   |     |          |     |
|---------------------------------|--------------------------------------------|-----|--------------------------|-----|-------------------|-----|----------|-----|
| Anticuerpo Monoclonal           | IDENTIFICADOR DE LA SECUENCIA (SEQ ID NO:) |     |                          |     |                   |     |          |     |
|                                 | Porción que Comprende el Dominio Variable  |     |                          |     | Longitud Completa |     |          |     |
|                                 | Pesada (V <sub>H</sub> )                   |     | Ligera (V <sub>L</sub> ) |     | Pesada            |     | Ligera   |     |
|                                 | Proteína                                   | ADN | Proteína                 | ADN | Proteína          | ADN | Proteína | ADN |
| 4.40.2                          | 83                                         | 74  | 101                      | 92  | 82                | 73  | 100      | 91  |
| 4.40.2 A68G S230P               | 83                                         | 74  | 113                      | 110 | 116               | 115 | 112      | 109 |
| 4.9.2                           | 11                                         | 2   | 29                       | 20  | 10                | 1   | 28       | 19  |
| 4.22.3                          | 47                                         | 38  | 65                       | 56  | 46                | 37  | 64       | 55  |
| 4.39.3                          | 176                                        | 167 | 194                      | 185 | 175               | 166 | 193      | 184 |

También se proporcionan variantes de cadena ligera y/o cadena pesada de ciertos anticuerpos anti-CCR2 de humano, que comprende una o más sustituciones de aminoácidos. Para designar las variantes, la primera letra es un símbolo de letra para el aminoácido de la cadena del anticuerpo de ocurrencia natural, el número se refiere a la posición del aminoácido (en donde la posición uno es el aminoácido N-terminal) y la segunda letra es un símbolo de letra para el variante del aminoácido. En algunos casos, se proporcionan las variantes de cadena pesada. Una dicha variante de cadena pesada es una región bisagra que estabiliza la mutación para reducir la formación de medio monómero (Angal, S. et al. *Molecular Immunology* 30:105-108 (1993)). Una dicha mutación de estabilización de bisagra de la variante de la cadena pesada del anticuerpo 4.40 tiene una sustitución prolina para la serina en la posición 230 de la SEQ ID NO:82. La secuencia del ADN que codifica la variante S230P tiene un codón CCA iniciando en la posición 688 de la SEQ ID NO:115.

También se proporcionan las variantes de cadena ligera del anticuerpo monoclonal 4.40. A68G es una variante de cadena ligera 4.40, representado por SEQ ID NO:113, en la cual el residuo 68 es un residuo glicina. En la secuencia de ADN, la variante A68G 4.40 se codifica por la SEQ ID NO:109, en la cual el codón iniciando en la posición position 252 es GGG.

En otros casos, pueden producirse anticuerpos que contienen las combinaciones de las variantes del aminoácido. Un ejemplo de una combinación de variantes es el anticuerpo anti-CCR2 4.40 A68G S230P, que comprende la sustitución de la cadena ligera A68G y la sustitución de la cadena pesada S230P en el contexto del anticuerpo 4.40. Además se incluyen las combinaciones de una variante de cadena pesada y una de cadena ligera 4.40.

En un caso, el anticuerpo anti-CCR2 es 4.40, 4.22, 4.39, 4.40 A68G S230P o 4.9. En aún casos adicionales, se incluyen anticuerpos que comprenden secuencias de aminoácidos de dominio variable con más de 80%, más de 85%, más de 90%, más de 95%, más de 96%, más de

97%, más de 98% o más de 99% de identidad de secuencia para una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cualquiera de los anticuerpos anti-CCR2 de humano anteriormente listados.

#### Clase y Subclase de Anticuerpos anti-CCR2

5            La clase y subclase de anticuerpos anti-CCR2 puede determinarse por cualquier método conocido en la técnica. En general, la clase y subclase de un anticuerpo puede determinarse usando anticuerpos que son específicos para una clase y subclase particular de anticuerpo. Dichos anticuerpos son comercialmente disponibles. La clase y la subclase puede determinarse por ELISA, o Hibridación Western así como otras técnicas. Alternativamente, la clase y subclase pueden

10           determinarse mediante la secuenciación de todos o una porción de los dominios constantes de las cadenas pesada y/o ligera de los anticuerpos, comparando sus secuencias de aminoácidos para las secuencias de aminoácidos conocidos de varias clases y subclases de inmunoglobulinas y determinar la clase y subclase de los anticuerpos.

15           En algunos casos, el anticuerpo anti-CCR2 es un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo anti-CCR2 puede ser una molécula IgG, una IgM, una IgE, una IgA, o una IgD. En un caso, el anticuerpo anti-CCR2 es una IgG, perteneciendo a por ejemplo una subclase IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. En otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 es un IgG4. En aún otro caso, el anticuerpo es un isoalotipo IgG4 (Ellison J. y Hood L., *PNAS* 79:1984-1988 (1982); & Brusco A. *et al.*, *Eur J. Immunogenetics* 25:349-355 (1998)).

20

#### Afinidad de Unión de los Anticuerpos anti-CCR2 a CCR2

En algunos casos, los anticuerpos anti-CCR2 se unen a CCR2 con alta afinidad.

25           En algunos casos, los anticuerpos anti-CCR2 se unen con alta afinidad al primer bucle extracelular de CCR2, al segundo bucle extracelular de CCR2, o a un epítipo formado por ambos bucles el 1<sup>ro</sup> y el 2<sup>do</sup> bucles extracelulares.

En un caso relacionado, los anticuerpos anti-CCR2 se unen a un polipéptido que consiste de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:128 o en SEQ ID NO:129.

En algunos casos, los anticuerpos anti-CCR2 no se unen al tercer bucle extracelular de CCR2 o al dominio N-terminal de CCR2.

En otro caso, los anticuerpos anti-CCR2 no se unen a un péptido que consiste de la secuencia establecida en la SEQ ID NO:127 o en la SEQ ID NO:130. En otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 se une al primero y/o segundo bucle extracelular de CCR2, con un  $K_D$  de aproximadamente  $2 \times 10^{-7}$  M o menor, con un  $K_D$  de aproximadamente  $2 \times 10^{-8}$  M o menor, con un  $K_D$  de aproximadamente  $2 \times 10^{-9}$  M o menor, con un  $K_D$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-9}$  M o menor, con un  $K_D$  de aproximadamente  $9 \times 10^{-10}$  M o menor, con un  $K_D$  de aproximadamente  $8 \times 10^{-10}$  M o menor, con un  $K_D$  de aproximadamente  $7 \times 10^{-10}$  M o menor, con un  $K_D$  de aproximadamente  $6 \times 10^{-10}$  M o menor, con un  $K_D$  de aproximadamente  $5 \times 10^{-10}$  M o menor, con un  $K_D$  de aproximadamente  $4 \times 10^{-10}$  M o menor, con un  $K_D$  de aproximadamente  $3 \times 10^{-10}$  M o menor, o con un  $K_D$  de aproximadamente  $2 \times 10^{-10}$  M o menor. En ciertos casos, el anticuerpo se une a CCR2, o al primero y/o segundo bucle extracelular de CCR2, con sustancialmente el mismo  $K_D$  como un anticuerpo seleccionado de 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 o 4.40 A68G S230P. En aún otro caso, el anticuerpo se une a CCR2, o al primero y/o segundo bucle extracelular de CCR2, con sustancialmente el mismo  $K_D$  como un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácido de la región  $V_H$  encontrada en la SEQ ID NO:83, la SEQ ID NO:11, la SEQ ID NO:176 o la SEQ ID NO:47. En aún otro caso, el anticuerpo se une a CCR2 con sustancialmente el mismo  $K_D$  como un anticuerpo que comprende los CDRs de un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la región  $V_L$  encontrada en la SEQ ID NO:101, la SEQ ID NO:113, la SEQ ID NO:29, la SEQ ID NO:194 o la SEQ ID NO:65, o que comprende los CDRs de un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la región o  $V_H$  encontrada en la SEQ ID NO:83, la SEQ ID NO:11, la SEQ ID NO:176 o la SEQ ID NO:47.

En algunos casos, el anticuerpo anti-CCR2 puede tener una constante de proporción de baja disociación ( $k_{off}$ ). En algunos casos, el anticuerpo anti-CCR2 puede unirse a CCR2, o más preferiblemente al primero y/o segundo bucle extracelular de CCR2, con un  $k_{off}$  de  $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  o menor, un  $k_{off}$  de  $5.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  o menor o un  $k_{off}$  de  $2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  o menor. En algunos casos, el  $k_{off}$  puede ser sustancialmente el mismo como un anticuerpo descrito en este documento, incluyendo un anticuerpo seleccionado de 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 y 4.40 A68G S230P. En algunos casos, el anticuerpo puede unirse a CCR2, o al primero y/o segundo bucle extracelular de CCR2, con sustancialmente el mismo  $k_{off}$  como un anticuerpo que comprende los CDRs de una cadena pesada, o los CDRs de una cadena ligera, de un anticuerpo seleccionado de 4.40, 4.9 y 4.40 A68G S230P. En algunos casos, el anticuerpo puede unirse a CCR2, o al primero y/o segundo bucle extracelular de CCR2, con sustancialmente el mismo  $k_{off}$  como un anticuerpo que comprende (i) un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la región  $V_H$  encontrada en la SEQ ID NO:83, o la SEQ ID NO:11, (ii) un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la región  $V_L$  encontrada en la SEQ ID NO:101, la SEQ ID NO:113, la SEQ ID NO:29, o (iii) ambas (i) y (ii). En aún otro caso, el anticuerpo puede unirse a CCR2, o al primero y/o segundo bucle extracelular de CCR2, con sustancialmente el mismo  $k_{off}$  como un anticuerpo que comprende los CDRs de un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la región  $V_L$  encontrada en la SEQ ID NO:101, la SEQ ID NO:113, o la SEQ ID NO:29; y los and de un dominio variable de cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos de la región  $V_H$  encontrada en la SEQ ID NO:83 o la SEQ ID NO:11.

La afinidad de enlace y proporción de disociación de un anticuerpo anti-CCR2 para CCR2 puede determinarse mediante los métodos conocidos en la técnica. La afinidad de enlace puede medirse por ELISAs, RIAs, citometría de flujo, resonancia de plasmón de superficie, tal como BIACORE™. La proporción de disociación puede medirse por la resonancia de plasmón de superficie. Se puede determinar si un anticuerpo tiene sustancialmente el mismo  $T_h K_D$  como un anticuerpo anti-CCR2 mediante usar los métodos conocidos en la técnica. El ejemplo 5 ejemplifica un método para determinar las constantes de afinidad de los anticuerpos monoclonales anti-CCR2.



### Identificación de los Epítopes CCR2 Reconocidos por los Anticuerpos anti-CCR2

Se proporcionan anticuerpos monoclonales anti-CCR2 de humano que se unen a CCR2 y pueden competir o competir en forma cruzada con y/o unirse al mismo epítope como: (a) un anticuerpo seleccionado de 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 y 4.40 A68G S230P; (b) un anticuerpo que  
5 comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos del dominio variable encontrado en la SEQ ID NO:83, la SEQ ID NO:11, la SEQ ID NO:176 o la SEQ ID NO:47, (c) un anticuerpo que comprende un dominio de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos del dominio variable encontrado en la SEQ ID NO:101, la SEQ ID NO:113, la SEQ ID NO:29, la SEQ ID NO:194, o la SEQ ID NO:65, o (d) un anticuerpo que comprende ambos un  
10 dominio variable de cadena pesada como se define en (b) y un dominio variable de cadena ligera como se define en (c). Si dos anticuerpos compiten recíprocamente uno con el otro para unirse al CCR2, ellos se dice que compiten en forma cruzada.

Se puede determinar si un anticuerpo se une al mismo epítope, compite o compite en  
15 forma cruzada para unirse con un anticuerpo anti-CCR2 proporcionado en este documento mediante usar los métodos conocidos en la técnica. En un caso, se permite que el anticuerpo anti-CCR2 proporcionado en este documento se una al CCR2 bajo condiciones de saturación y posteriormente mide la habilidad del anticuerpo de prueba para unirse al CCR2. Si el anticuerpo de prueba es capaz de unirse a CCR2 al mismo tiempo como se proporcionó el anticuerpo anti-CCR2,  
20 posteriormente el anticuerpo de prueba se une a un epítope diferente como el anticuerpo anti-CCR2. Sin embargo, si el anticuerpo de prueba no es capaz de unirse al CCR2 al mismo tiempo, posteriormente el anticuerpo de prueba se une al mismo epítope, un epítope de traslapo o un epítope que está en proximidad cercana al epítope se une por el anticuerpo anti-CCR2 de humano proporcionado en este documento. Para determinar si un anticuerpo de prueba compite en forma  
25 cruzada con un anticuerpo de referencia, el experimento se lleva a cabo invirtiendo los anticuerpos, es decir, se permitió que el anticuerpo de prueba se uniera al CCR2 y posteriormente se midió la habilidad del anticuerpo anti-CCR2 proporcionado para unirse a CCR2. Estos experimentos pueden realizarse usando ELISA, RIA, BIACORE™, o citometría de flujo (FACS).

### Inhibición de la Actividad CCR2 por el Anticuerpo anti-CCR2

En algunos casos, se proporcionan anticuerpos anti-CCR2 que inhibe la señalización mediada por CCR2. En otros casos, se proporcionan anticuerpos anti-CCR2 que inhiben la señalización mediada por MCP-1, MCP-2, MCP-3, y/o MCP-4 a través de CCR2. En otros casos, se proporcionan anticuerpos anti-CCR2 que inhiben la unión de MCP-1 MCP-2, MCP-3 y/o MCP-4 a CCR2. En un caso, el CCR2 es CCR2 de humano. En algunos casos, el CCR2 es CCR2A, CCR2B o ambos de humano. En aún otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 es un anticuerpo de humano.

El  $IC_{50}$  de un anticuerpo anti-CCR2 puede medirse en las pruebas de unión al ligando tales como ELISA, RIA, o pruebas relacionadas y pruebas basadas en células tales como pruebas quimiotaxis de las células que expresan CCR2. En varios casos, El anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo inhibe la unión al ligando entre MCP-1 y CCR2 con un  $IC_{50}$  de no más de 5  $\mu\text{g/ml}$ , no más de 1  $\mu\text{g/ml}$ , no más de 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , o no más de 0.20  $\mu\text{g/ml}$  como se mide por una prueba de ELISA.

En otro caso, se proporciona un anticuerpo anti-CCR2 que reduce la activación de CCR2 en la presencia de los ligandos CCR2 tales como MCP-1 (CCL2), MCP-2, MCP-3, y/o MCP-4. En un caso, el anticuerpo anti-CCR2 puede inhibir el ligando CCR2 inducido (i) G-activación de la proteína, (ii) activación del adenilato ciclasa, (iii) activación de las proteínas cinasas activadas por el mitogen (MAPKs), (iv) movilización de calcio citosólico, (v) ERK fosforilación, (vi) quimiotaxis, o (vii) polimerización de la actina. Se puede determinar si un anticuerpo anti-CCR2 puede prevenir, inhibir o reducir la activación de CCR2 en la presencia de MCP-1 mediante determinar la proporción GTP/GDP de las proteínas G en las células marcadas con radiomarcado GTP, mediante medir la incorporación de GTPgS, mediante la medición del influjo de calcio citosólico usando los cromóforos de calcio o mediante medir el estado de fosforilación de MAPKs en una célula. Las pruebas para detectar la activación CCR2 y/o MCP-1 para la unión a CCR2 se

describen, por ejemplo en Gabrilin *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.* 327(2):533-40 (2005), y Jimenez-Sainz *et al.*, *Mol Pharmacol.* 64(3):773-82 (2003).

En un caso, se determinarían los niveles de la activación de CCR2 usando una prueba de. En algunos casos, el  $IC_{50}$ , medido usando una prueba de quimiotaxis no es más de 5  $\mu\text{g/ml}$ , no más de 1  $\mu\text{g/ml}$ , no más de 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , o no más de 0.20  $\mu\text{g/ml}$ . El ejemplo 10 ejemplifica un tipo de prueba que mide la inhibición de CCR2 por un anticuerpo anti-CCR2 mediante monitorear la movilización del calcio.

En otro aspecto, contactar una célula con el anticuerpo puede resultar en una regulación descendente de la expresión CCR2 de la superficie celular después de la incubación con el anticuerpo. En algunos casos, la incubación puede ser en un periodo corto de tiempo (*por ejemplo*, 4 horas) o en un periodo de tiempo mayor (*por ejemplo*, 24 horas). Una regulación descendente de la expresión CCR2 de la superficie celular puede medirse usando la hibridación Western, el análisis ELISA, o FACS. En casos particulares, contactar una célula con el anticuerpo puede resultar en una disminución de al menos un 6%, una disminución al menos de un 10%, una disminución de al menos un 20%, una disminución de al menos un 30% o una disminución de al menos un 50% de la expresión CCR2 de la superficie celular como se mide por la hibridación Western o ELISA.

En otro aspecto, el anticuerpo reduce la fosforilación pERK inducida por MCP-1. Una regulación descendente de la fosforilación pERK inducida por MCP-1 puede medirse usando la hibridación Western, ELISA, o el análisis FACS. En casos particulares, el anticuerpo produce al menos una disminución del 6%, al menos una disminución del 10%, al menos una disminución del 20%, al menos una disminución del 30% o al menos una disminución del 50% de la fosforilación pERK inducida con MCP-1 como se mide por el análisis FACS.

### Inhibición de la Quimiotaxis *In Vivo* con anticuerpos anti-CCR2

De acuerdo con algunos casos, se proporcionan anticuerpos anti-CCR2 que inhiben la quimiotaxis de las células inmunes *in vivo*. Las células inmune cuya quimiotaxis se inhibe incluyen células mononucleares de la sangre periférica, células THP, monocitos, linfocitos T de la memoria, células dendríticas, basófilos, células eliminadoras naturales y células CCR2+ adoptivamente transferidas. En un caso, el anticuerpo anti-CCR2 inhibe la quimiotaxis de las células inmunes en respuesta de uno o más de MCP-1, MCP-2, MCP-3 y MCP-4. En un caso, la quimioquinas es MCP-1. En aún otro caso, la quimioquinas es MCP-3. El anticuerpo anti-CCR2 puede inhibir la quimiotaxis en sitios de inflamación o lesión.

De acuerdo a algunos casos, también se proporcionan anticuerpos anti-CCR2 que inhiben la quimiotaxis de las células no inmunes, incluyendo pero no limitadas a sinoviocitos tipo fibroblasto (FLS) (ver Garcia-Vicuna *et al.*, *Arthritis Rheum.* 50(12):3866-77 (2004)), células troncales neurales adultas (ver Widera *et al.*, *Eur J Cell Biol.* 83(8):381-7 (2004)) y astrocitos fetales de humanos (ver Andjelkovic *et al.*, *J Neurosci Res.* 70(2):219-31 (2002)).

En un caso, el anticuerpo inhibe la quimiotaxis celular como se compara a la quimiotaxis de células en un animal no tratado. En otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 reduce la quimiotaxis por al menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100%. En un caso, la inhibición de la quimiotaxis se mide al menos 1 hora después de que se ha empezado el tratamiento de los animales con el anticuerpo. En otro caso, la inhibición de la quimiotaxis se mide al menos 7 días después de que se ha empezado el tratamiento de los animales con el anticuerpo. En otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 resulta en la inhibición de la quimiotaxis de al menos 10% a 100%.

### Especies y Selectividad Molecular

En otro aspecto, los anticuerpos anti-CCR2 demuestran ambas, especies y selectividad molecular. En algunos casos, el anticuerpo anti-CCR2 se une al CCR2 de mono cinomolgo y de

humano. El anticuerpo anti-CCR2 puede unirse al CCR2 adicional de especies primates no humanas. En algunos casos, el anticuerpo anti-CCR2 no se une al CCR2 de ratón o rata. Siguiendo las enseñanzas de la especificación, se puede determinar las especies selectivamente para el anticuerpo anti-CCR2 usando los métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede determinarse la selectividad para el anticuerpo anti-CCR2 usando los métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede determinarse la selectividad de las especies usando la hibridación Western, citometría de flujo, ELISA; inmunoprecipitación o RIA. En un caso, pueden determinarse la selectividad de las especies usando la citometría de flujo. En otro caso, puede determinarse la especificidad de las especies mediante valorar la habilidad del anticuerpo para inhibir las respuestas funcionales MCP-1 usando células de esas especies. Esto puede incluir quimiotaxis, polimerización de la actina, movilización del calcio, etc.

En otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 tiene una selectividad para el polipéptido que consiste de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:126 (CCR2B de humano) sobre el polipéptido que consiste de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:131 (CCR5 de humano). En otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 tiene la selectividad para CCR2 sobre CCR5 de al menos 2-veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o al menos 100 veces. En otro caso, los anticuerpos anti-CCR2 de humano se unen a polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica a la SEQ ID NO:126.

En otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 puede tener una selectividad para el polipéptido que consiste de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:125 (CCR2A de humano) sobre el polipéptido que consiste de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:131 (CCR5 de humano) de al menos 2-veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o al menos 100-veces. En otro caso, los anticuerpos anti-CCR2 de humano se unen a un polipéptido que corresponde a una secuencia de aminoácidos 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica a la SEQ ID NO:125.

Se puede determinar la selectividad del anticuerpo anti-CCR2 para CCR2 usando métodos bien conocidos en la técnica siguiendo las enseñanzas de la especificación. Por ejemplo se puede determinar la selectividad usando la hibridación Western, citometría de flujo, ELISA, inmunoprecipitación o RIA, y/o pruebas funcionales tales como quimiotaxis, movilización del calcio o polimerización de la actina.

#### Métodos para Producir Anticuerpo y Líneas Celulares que Producen los Anticuerpos

##### *Inmunización*

En algunos casos, los anticuerpos de humanos se producen por la inmunización de un animal transgénico, no humano que comprende dentro de su genoma algo o todo del loci de cadena ligera o cadena pesada de la inmunoglobulina de humano con un antígeno CCR2. En un caso, el animal no humano es un animal XENOMOUSE™. (Amgen Fremont, Inc. (formalmente Abgenix, Inc.), Fremont, CA).

Los ratones XENOMOUSE™ son hebras de ratones tratados con ingeniería genética que comprenden grandes fragmentos de loci de cadena ligera y cadena pesada de la inmunoglobulina de humano y son deficientes en la producción de anticuerpos de ratón. Ver, *por ejemplo*, Green *et al.*, *Nature Genetics* 7:13-21 (1994) y las Patentes Estadounidenses 5,916,771, 5,939,598, 5,985,615, 5,998,209, 6,075,181, 6,091,001, 6,114,598, 6,130,364, 6,162,963 y 6,150,584. Ver también WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 96/33735, WO 98/16654, WO 98/24893, WO 98/50433, WO 99/45031, WO 99/53049, WO 00/09560, y WO 00/037504.

En otro aspecto, se proporciona un método para elaborar anticuerpos anti-CCR2 de animales no humanos, mediante inmunizar animales transgénicos no humano que comprenden loci de inmonuglobulina de humano con un antígeno CCR2. Se pueden producir dichos animales usando los métodos descritos en los documentos arriba citados. Los métodos descritos en estos documentos pueden modificarse como se describe en la Patente Estadounidense 5,994,619, que

se incorpora en este documento como referencia. La Patente Estadounidense 5,994,619 describe métodos para producir células de masa celular interna cultivadas novedosas (CICM) y las líneas celulares, derivadas de cerdos y vacas y células CICM transgénicas dentro de las cuales el ADN heterólogo se ha insertado. Las células transgénicas pueden usarse para producir embriones transgénicos clonados, fetos y progenitura. La patente '619 también describe métodos para producir animales transgénicos que son capaces de transmitir el ADN heterólogo a su progenitura. En casos preferidos los animales no humanos son mamíferos, particularmente ratas, ovejas, cerdos, cabras, vacas o caballos.

Los ratones XENOMOUSE™ producen un repertorio humano como adultos de anticuerpos completamente de humanos y generan anticuerpos humanos de humano anti-específicos. En algunos casos, los ratones XENOMOUSE™ contienen aproximadamente 80% del repertorio del gen V de anticuerpo de humano a través de la introducción de los fragmentos de la configuración de la línea germinal de loci de cadena pesada de humano y loci de cadena ligera kappa, los ratones XENOMOUSE™ además contiene aproximadamente todo el locus de cadena ligera lambda de humano. Ver Mendez *et al.*, *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green y Jakobovits, *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998), y WO 98/24893, las descripciones de las cuales se incorporan en este documento como referencia.

En otro caso, los anticuerpos se generan usando la tecnología VELOCIMOUSE™ (Regeneron Pharmaceuticals, Tarrytown, NY.) para generación inmediata de los ratones genéticamente alterados directamente de las células troncales embríonicamente (ES) (Poueymirou W.T., et al., *Nature Biotechnology* 25:91-99 (2007)).

En algunos casos, el animal no humano que comprende genes de inmunoglobulina de humano son animales que tiene un "minilocus" de inmunoglobulina de humano. En la aproximación minilocus, un locus Ig exógeno se imita a través de la inclusión de genes individuales del locus Ig. Además uno o más genes V<sub>H</sub>, uno o más genes D<sub>H</sub>, uno o más genes J<sub>H</sub>, un dominio constante

mu, y un segundo dominio constante (preferiblemente un dominio constante gamma) se forman dentro de una construcción para inserción en un animal. Esta aproximación se describe, *inter alia*, en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,545,807, 5,545,806, 5,569,825, 5,625,126, 5,633,425, 5,661,016, 5,770,429, 5,789,650, 5,814,318, 5,591,669, 5,612,205, 5,721,367, 5,789,215, y 5,643,763, incorporadas en este documento como referencia.

En otro aspecto, se proporciona un método para preparar anticuerpos anti-CCR2 de humano. En algunos casos, los animales no humanos se inmunizados con un antígeno CCR2 como se describe en este documento bajo condiciones que permiten la producción de anticuerpos.

Las células que producen el anticuerpo se aíslan de los animales y se aíslan los ácidos nucleicos que codifican las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo anti-CCR2 de interés. Estos ácidos nucleicos se tratan con ingeniería genética subsecuentemente usando las técnicas conocidas por aquellos expertos en la técnica y como se describen posteriormente para reducir la cantidad de la secuencia de no humano, es decir para humanizar el anticuerpo para reducir la respuesta inmune en humanos.

En algunos casos, el antígeno CCR2 es CCR2 asilado y/o purificado. En un caso, el antígeno CCR2 es CCR2 de humano. En algunos casos, el antígeno CCR2 es un fragmento de CCR2. En algunos casos, el fragmento CCR2 es un bucle extracelular, el dominio N-terminal o el extremo C-terminal de CCR2. En ciertos, casos, el fragmento CCR2 comprende el primero o el segundo bucle extracelular de CCR2. En otros casos, el fragmento CCR2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:128 o la SEQ ID NO:129.

En otros casos, el fragmento CCR2 no comprende el tercer bucle extracelular o el dominio N-terminal de CCR2.

En otros casos, el fragmento CCR2 no comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:127 o la SEQ ID NO:130. En algunos casos, el fragmento CCR2



comprende al menos un epítoto de CCR2. En otros casos, el antígeno CCR2 es una célula que expresa o sobre expresa el CCR2 o un fragmento inmunogénico del mismo en su superficie. En algunos casos, el antígeno CCR2 es una proteína de fusión CCR2. En algunos casos, el CCR2 es un inmunógeno de péptido sintético.

5

La inmunización de los animales puede ser mediante cualquier método conocido en la técnica. Ver, *por ejemplo*, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Los métodos para la inmunización de los animales no humanos tales como ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, vacas y caballos son bien conocidos en la técnica.

10 Ver, *por ejemplo*, Harlow y Lane, *supra*, y la Patente Estadounidense 5,994,619. En un caso, el antígeno CCR2 se administra con un adyuvante para estimular la respuesta inmune. Los adyuvantes ejemplarizadores incluyen el adyuvante Freund completo o RIBI (dipéptidos muramilo) o ISCOM (complejos de inmunomarcación). Dichos adyuvantes pueden proteger el polipéptido de dispersión rápida mediante secuestrarlo en un depósito local o pueden contener sustancias que

15 estimulan al huésped para secretar los factores que son quimiotácticos para los macrófagos y otros componentes del sistema inmune. Si un polipéptido está siendo administrado, el programa de inmunización involucraría dos o más administraciones del polipéptido, se dispersan a varias semanas. El Ejemplo 1 ejemplifica un método para producir anticuerpos monoclonales anti-CCR2 en los ratones XENOMOUSE™.

20

#### *Producción de Anticuerpos y Líneas Celulares que Producen al Anticuerpo*

Después de la inmunización de un animal con un antígeno CCR2, pueden obtenerse anticuerpos y/o células que producen el anticuerpo del animal. En algunos casos, el suero que contiene el anticuerpo anti-CCR2 se obtiene del animal mediante sangrar o sacrificar el animal. El

25 suero puede usarse como si se obtuviera del animal, una fracción de la inmunoglobulina puede obtenerse del suero o los anticuerpos anti-CCR2 puede purificarse del suero.

En algunos casos, las líneas celulares inmortalizadas que se producen en el anticuerpo se preparan de células aisladas del animal inmunizado. Después de la inmunización, el animal se sacrifica y la sangre periférica, el nódulo linfático y/o las células B esplénicas se inmortalizan por cualquier medio conocido en la técnica. Los métodos para inmortalizar las células incluyen pero no se limitan a transfectarlas con oncogenes, infectarlas con un virus oncogénico y cultivarlas bajo condiciones que seleccionan las células inmortalizadas, sometiéndolas a compuestos de mutación o carcinogénicos, fusionándolas con una célula inmortalizada *por ejemplo*, una célula mieloma y la inactivación del gen supresor del tumor. Ver, *por ejemplo*, Harlow y Lane, supra. Si la fusión con la célula mieloma se usa, las células mieloma de preferencia no secretan los polipéptidos de inmunoglobulina (una línea celular no secretoria). Las células inmortalizadas se analizan usando el CCR2, una porción del mismo o una célula que expresa CCR2. En un caso, la porción CCR2 (i) comprende el primero y/o el segundo bucle extracelular de CCR2; (ii) comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:128 y/o la SEQ ID NO:129; (iii) no comprende el tercer bucle extracelular y/o el dominio N-terminal de CCR2; (iv) no comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:127 y/o la SEQ ID NO:130; o (v) combinaciones de los mismos. En un caso, el análisis inicial se realiza usando una prueba inmuno enzimática (ELISA) o una radio inmuno prueba. Un ejemplo del análisis ELISA se proporciona en WO 00/37504, incorporada en este documento como referencia.

Las células que producen el anticuerpo anti-CCR2, *por ejemplo*, hibridomas, se seleccionan, clonan y además se analizan por características deseables, incluyendo el crecimiento robusto, la producción alta de anticuerpos y las características deseables de anticuerpos, como se divulga posteriormente en forma adicional. Los hibridomas pueden expandirse *in vivo* en animales singenésicos, en animales que carecen de un sistema inmune *por ejemplo*, ratones desnudos o en el cultivo celular *in vitro*. Los métodos de selección, clonación y expansión de hibridomas son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

195

En un aspecto, el animal inmunizado es un animal no humano que expresa los genes de inmunoglobulina de humano y las células B esplénicas se fusionan a una línea celular mieloma de la misma especie como el animal no humano. En un caso ejemplarizador, el animal inmunizado es un ratón XENOMOUSE™ y la línea celular del mieloma es un mieloma de ratón no secretor. En un caso, la línea celular del mieloma es P3-X63-Ag8.653 (Colección de Cultivo de Tipo Americano). Ver, *por ejemplo*, Ejemplo 1.

Analizando las células de producción de anticuerpos inmortalizados para identificar un anticuerpo dirigido al primer y/o segundo bucle extracelular de CCR2 puede lograrse mediante probar si los anticuerpos producidos por la célula se unen a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos del primero o segundo bucle extracelular de CCR2. Alternativamente o en combinación, los anticuerpos producidos por la célula pueden probarse para unirse a los receptores de la quimioquina quimérica que tiene primeramente la secuencia de otro receptor de la quimioquina excepto las secuencias del primero y/o segundo bucles extracelulares de CCR2. Ver el Ejemplo 8, que ejemplifica el uso de las quimeras para mapear el epítipo de los anticuerpos anti-CCR2. En un caso complementario, los anticuerpos producidos por la célula que se conocen por unirse al CCR2 pueden probarse para unirse a los receptores de la quimioquina quimérica que tienen primeramente la secuencia de CCR2 pero que carecen del tipo salvaje y/o los segundos bucles extracelulares de CCR2, es decir, tienen el primero y/o segundo bucles extracelulares de otro receptor citoquina o contienen mutaciones en uno o ambos bucles extracelulares.

En otro aspecto, se proporcionan células y líneas celulares (incluyendo hibridomas) que producen un anticuerpo anti-CCR2 de humano. En un caso, el anticuerpo anti-CCR2 de humano producido por la célula, la línea celular o el hibridoma es un antagonista de CCR2. En aún otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 de humano (i) se une al primero y/o segundo bucles extracelulares de CCR2; (ii) se une a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:128 y/o SEQ ID NO:129; (iii) no se une al tercer bucle extracelular y/o el dominio N-terminal de CCR2, (iv) no se une a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:127 y/o la SEQ ID NO:130; o (v)

96

combinaciones de las mismas. En otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 de humano producido por la célula, la línea celular o el hibridoma no se unen al tercer bucle extracelular con alta afinidad, no se une al dominio N-terminal de CCR2 con alta afinidad o no se une a cualquiera con alta afinidad.

5           En aún otro aspecto, un animal transgénico se inmuniza con CCR2, células primarias, por ejemplo, células sanguíneas periféricas o del bazo, se aíslan de un animal transgénico inmunizado y se identifican las células individuales produciendo anticuerpos específicos para el antígeno deseado. Por ejemplo, el mRNA poliadenilado de cada célula individual se aísla y se realiza la reacción de cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) usando los iniciadores de  
10   sentido que se alinean a las secuencias de región variable, *por ejemplo*, degeneran los iniciadores que reconocen la mayoría o todo de las regiones FR1 de los genes de la región variable de cadena ligera y de cadena pesada de humano y los iniciadores anti-sentido que se alinean a la constante o las secuencias de región de unión (J). Los cADNs de los dominios variables de cadena ligera y pesada posteriormente se clonan y se expresan en cualquier célula huésped apropiada, *por*  
15 *ejemplo*, una célula mieloma, como anticuerpos quiméricos con las regiones constantes de inmunoglobulina respectiva, tales como los dominios constantes,  $\kappa$  o  $\lambda$ . Ver Babcook, J.S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 93: 7843-48 (1996), incorporada en este documento como referencia. Los anticuerpos anti-CCR2 posteriormente pueden identificarse y aislarse como se describe en este documento.

20

En otro aspecto, las técnicas de despliegue del fago pueden usarse para proporcionar bibliotecas que contienen un repertorio de anticuerpos con afinidades variables para CCR2. Las células primarias B pueden usarse directamente como una fuente de ADN. La mezcla de cADNs obtenida de la célula B, *por ejemplo*, derivada de los bazos se usa para preparar una biblioteca de  
25   expresión, por ejemplo, una biblioteca de expresión del fago transfectada en *E.coli*. Las células resultantes se prueban para inmunoreactividad a CCR2. Las técnicas para la identificación de anticuerpos de humano de alta afinidad de dichas bibliotecas se describen por Griffiths *et al.*, *EMBO J.* 13:3245-3260 (1994); Nissim *et al.*, *ibid*, pp. 692-698 y por Griffiths *et al.*, *ibid*, 12:725-

734, que se incorporan como referencia. Por último, se identifica que los clones de la biblioteca producen las afinidades de unión de una magnitud deseada para el antígeno y el ADN que codifica el producto responsable para dicha unión se recupera y se manipula para la expresión recombinante estándar. Las bibliotecas de despliegue fago también pueden construirse usando 5 secuencias de nucleótidos previamente manipuladas y analizadas en un mismo diseño. En general los cADNs que codifican las cadenas ligera y pesada se suministran independientemente o se unen para formar análogos Fv para la producción en la biblioteca fago.

La biblioteca fago posteriormente se analiza para los anticuerpos con las afinidades más 10 altas para CCR2 y el material genético recuperado del clon apropiado. Además los análisis adicionales pueden incrementar la afinidad del anticuerpo original aislado.

#### Ácidos Nucleicos, Células Huésped y Métodos Recombinantes para Preparar Anticuerpos

##### *Ácidos Nucleicos*

15 También se contemplan las moléculas de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos anti-CCR2 o las porciones de unión al antígeno de las mismas. En algunos casos, las moléculas de ácido nucleico diferente codifican la cadena ligera y la cadena pesada de una inmunoglobulina anti-CCR2. En otros casos, la misma molécula de ácido nucleico codifica una cadena ligera y cadena pesada de una inmunoglobulina anti-CCR2. En un caso, el ácido nucleico codifica un anticuerpo 20 CCR2 o una porción de unión al antígeno del mismo.

En algunos casos, la molécula de ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena ligera ( $V_L$ ) comprende un segmento de la familia de genes  $V_k1$ ,  $V_k2$ ,  $V_k3$ ,  $V_k4$ ,  $V_k5$  de humano o el  $V_k6$  y un segmento del gen  $J_k1$ ,  $J_k2$ ,  $J_k4$ , o  $J_k5$  con o sin mutaciones de la línea 25 germinal.

En algunos casos, la molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera, codifica una secuencia de aminoácidos que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 sustituciones de la

secuencia de aminoácido(s) de la línea germinal. En algunos casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos  $V_L$  que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 sustituciones de aminoácidos conservadores y/o 1, 2, o 3 sustituciones no conservadoras comparadas con las secuencias de línea germinal  $V_K$  y  $J_K$ . Las 5 sustituciones pueden ser en los CDRs, las regiones variables o en el dominio constante.

En algunos casos, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos  $V_L$  que comprende una o más variantes comparadas con la secuencia de línea germinal que son idénticas a las variaciones encontradas en el  $V_L$  de uno de los anticuerpos 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 o 10 4.40 A68G S230P. En algunos casos, el ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos  $V_L$  que comprende una mutación en una o más de las mismas posiciones como las mutaciones de la línea germinal en un anticuerpo CCR2 proporcionado en este documento pero que comprende una sustitución diferente, en algunos casos una sustitución conservadora comparada a la sustitución en el anticuerpo proporcionado.

En algunos casos, la molécula de ácido nucleico codifica al menos tres sustituciones de aminoácidos comparados a la secuencia de línea germinal encontrada en el  $V_L$  de uno de los anticuerpos 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 o 4.40 A68G S230P.

En algunos casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos  $V_L$  del anticuerpo monoclonal 4.40 (SEQ ID NO:101), 4.9 (SEQ ID NO:29), 4.22 (SEQ ID NO:65), 4.39 (SEQ ID NO:194) o 4.40 A68G S230P (SEQ ID NO:113), o una variante o porción del mismo. En algunos casos, el ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos comprendiendo los CDRs de cadena ligera de uno de dichos anticuerpos arriba listados. En algunos casos, dicha porción es una porción contigua que 25 comprende CDR1-CDR3.

En algunos casos, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos  $V_L$  que es al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos  $V_L$  de cualquiera de uno de una región  $V_L$  de anticuerpos 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 o 4.40 A68G S230P, o una secuencia de aminoácidos de una región  $V_L$  de cualquiera de una de las

5 SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:194 o SEQ ID NO:65. Las moléculas de ácido nucleico incluyen ácidos nucleicos que codifican la región  $V_L$  encontrada en la SEQ ID NO:101, la SEQ ID NO:113, la SEQ ID NO:29 o la SEQ ID NO:65.

En otro caso, el ácido nucleico codifica una cadena ligera de longitud completa de un

10 anticuerpo seleccionado de 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 o 4.40 A68G S230P, o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de secuencia de SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:193 o SEQ ID NO:28, o dicha secuencia de cadena ligera que comprende una mutación, tal como una descrita en este documento.

En aún otro caso, la molécula de ácido nucleico codifica el dominio variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) que comprende una secuencia de gen de humano 3-30 o 1-46  $V_H$  o una secuencia derivada de los mismos. En varios casos, la molécula de ácido nucleico usa una secuencia de gen 3-30  $V_H$  de humano, una secuencia de gen D1-7 de humano y una secuencia de gen  $J_H3B$  de humano, una secuencia de gen 1-46  $V_H$  de humano, una secuencia de gen D1-7 de humano y una

15

20 secuencia de gen  $J_H3B$  de humano o una secuencia derivada de los genes humanos.

En algunos casos, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 mutaciones comparadas con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal de los genes V, D o J de humano. En

25 algunos casos, dichas mutaciones están en la región  $V_H$ . En algunos casos, dichas mutaciones están en los CDRs.

En algunos casos, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos que comprende una o más mutaciones comparadas con la secuencia de la línea germinal que son idénticas a las mutaciones de aminoácidos encontradas en el V<sub>H</sub> del anticuerpo monoclonal 4.40, 4.22, 4.39 o 4.9. En algunos casos, el ácido nucleico codifica al menos tres mutaciones de aminoácidos comparadas a las secuencias de la línea germinal que son idénticas a al menos tres mutaciones de aminoácidos encontradas en uno de los anticuerpos monoclonales anteriormente listados.

En algunos casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una porción de la secuencia de aminoácidos V<sub>H</sub> de un anticuerpo monoclonal seleccionado de secuencia de 4.40 (SEQ ID NO:83), 4.22 (SEQ ID NO:47), 4.39 (SEQ ID NO:176) o 4.9 (SEQ ID NO:11), una variante del mismo, o dicha secuencia que tiene mutaciones de aminoácidos conservadores y/o un total de tres o menos sustituciones no conservadoras de aminoácidos. En varios casos, la secuencia codifica uno o más CDRs, una región CDR3, todos os tres CDRs, una porción contigua que incluye CDR1-CDR3 o la región V<sub>H</sub> completa, con o sin una secuencia señal.

En algunos casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de una de las SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:175 o SEQ ID NO:116, o dicha secuencia que tiene una secuencia señal. En algunos casos preferidos, la molécula de ácido nucleico comprende al menos una porción de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:73 o SEQ ID NO:115, o dicha secuencia que tiene una secuencia de señal. En algunos casos, dicha porción codifica la región V<sub>H</sub> (con o sin secuencia señal), una región CDR3, todos los tres CDRs, o una región contigua que incluye CDR1-CDR3.

En algunos casos, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos V<sub>H</sub> que es al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idéntica para la secuencia



de aminoácidos V<sub>H</sub> de cualquiera de uno de la región V<sub>H</sub> de los anticuerpos 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 o 4.40 A68G S230P, o una secuencia de aminoácidos de una región V<sub>H</sub> de cualquiera de una de las SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:176 o SEQ ID NO:11. También se incluyen los ácidos nucleicos que codifican la secuencia de aminoácidos de 4.40 (SEQ ID NO:83), 4.22 (SEQ ID NO:47), 4.39 (SEQ ID NO:176) o 4.9 (SEQ ID NO:11), o para una región o V<sub>H</sub> de los mismos o que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:167, SEQ ID NO:2 o que codifica una V<sub>H</sub> del mismo.

En otro caso, el ácido nucleico codifica una cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo seleccionado de 4.40, 4.22, 4.9, 4.39, o 4.40 A68G S230P, o a cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:175 o SEQ ID NO:116, con o sin una señal secuencia, o una cadena pesada comprendiendo una mutación, tal como una de las variantes divulgada en este documento. Además, el ácido nucleico puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:166 o SEQ ID NO:115, o una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada comprendiendo una mutación, tal como una de las variantes divulgada en este documento.

Una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CCR2 o porciones del mismo puede aislarse de cualquier fuente que produce dicho anticuerpo. En varios casos, las moléculas de ácido nucleico se aíslan de una célula B aislada de un animal inmunizado con CCR2 o de una célula inmortalizada derivada de dicha célula B que expresa un anticuerpo anti-CCR2. Los métodos para aislar el mRNA que codifican un anticuerpo son bien conocidos en la técnica. Ver, *por ejemplo*, Sambrook *et al.* El mRNA puede usarse para producir cADN para usarse en la reacción de cadena de polimerasa (PCR) o cADN para la clonación de los genes del anticuerpo. En un caso, la molécula de ácido nucleico se aísla de un hibridoma que tiene uno de sus compuestos participantes de fusión, una célula que produce la inmunoglobulina de humano de un animal transgénico no humano. En otros casos, la célula que

produce la inmunoglobulina de humano se aísla de un animal XENOMOUSE™. En otro caso, la célula que produce la inmunoglobulina de humano es de un animal transgénico de no ratón, de no humano, como se describe en este documento. En otro caso, el ácido nucleico se aísla de un animal no transgénico, no humano. Las moléculas de ácido nucleico aisladas de un animal no transgénico no humano pueden usarse, *por ejemplo*, para anticuerpos humanizados.

En algunos casos, un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CCR2 comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio  $V_H$  unido en la variable a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio constante de cadena pesada de cualquier fuente. Similarmente, una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CCR2 puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio  $V_L$  unido en la variable a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio constante de cadena ligera de cualquier fuente.

En un aspecto adicional, las moléculas de ácido nucleico que codifican el dominio variable de las cadenas pesada ( $V_H$ ) y/o ligera ( $V_L$ ) se convierten a genes de anticuerpos de longitud completa. En un caso, las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios  $V_H$  o  $V_L$  se convierten en genes de anticuerpos de longitud completa mediante la inserción en un vector de expresión que ya codifica los dominios de constante de cadena pesada ( $C_H$ ) o constante de cadena ligera ( $C_L$ ), respectivamente, de manera que el segmento  $V_H$  se une operativamente al segmento ( $s$ )  $C_H$  dentro del vector y/o el segmento  $V_L$  se une operativamente al segmento  $C_L$  dentro del vector. En otro caso, las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios  $V_H$  y/o  $V_L$  se convierten en genes de anticuerpos de longitud completa mediante unirse por ejemplo, ligación, una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio  $V_H$  y/o  $V_L$  a una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio  $C_H$  y/o  $C_L$  usando técnicas biológicas moleculares estándar. Las secuencias de nucleótidos de los genes de dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de humano se conocen en la técnica. Ver, *por ejemplo*, Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ava Ed., NIH Publ. No. 91-3242, 1991. Las moléculas de ácido

nucleico que codifican las cadenas ligeras y/o pesadas de longitud completa posteriormente pueden expresarse de una célula en la cual se han introducido y el anticuerpo anti-CCR2 se aísla.

Las moléculas de ácido nucleico pueden usarse recombinantemente para expresar los anticuerpos anti-CCR2. Las moléculas de ácido nucleico también pueden usarse para producir anticuerpos quiméricos, anticuerpos bioespecíficos, anticuerpos de cadena simple, diacuerpos, anticuerpos mutados y derivados de anticuerpos, como se describe en forma adicional posteriormente. Si las moléculas de ácido nucleico se derivan de un animal no transgénico no humano, las moléculas de ácido nucleico pueden usarse para la humanización de anticuerpos, también como se describe en este documento.

En algunos casos, se proporcionan los ácidos nucleicos que codifican una cadena pesada de longitud completa o una cadena ligera de longitud completa en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de región constante contiene una o más mutaciones comparadas a una secuencia de región constante de humano de línea germinal. Por ejemplo, el ácido nucleico puede codificar una sustitución de aminoácidos que mejora una propiedad del anticuerpo mediante agregar o remover un sitio de glicosilación o que codifica una sustitución que mejora la estabilidad o media vida del anticuerpo. El ácido nucleico también puede contener mutaciones en "silencio" para agregar o remover un sitio de enzima de restricción, por ejemplo para facilitar la clonación del ácido nucleico en un vector de expresión particular.

### Vectores

Los vectores se proporcionan comprendiendo las moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo anti-CCR2 o porciones de unión al antígeno de los mismos. También se proporcionan vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión, anticuerpos modificados, fragmentos de anticuerpos y sondas de los mismos.

En algunos casos, los anticuerpos anti-CCR2 o las porciones de unión al antígeno se expresan por la inserción de los ADNs que codifican las cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa, obtenidas como se describe en este documento en los vectores de expresión de manera que los genes se unan operativamente a las secuencias de control de expresión necesarias tales como las secuencias de control translacional y transcripcional. Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, adenovirus, adenovirus asociados (AAV), virus de plantas tales como virus del mosaico de la coliflor, virus del mosaico del tabaco, cósmidos, YACs, episomas EBV derivadas y los similares. En algunos ejemplos, el gen del anticuerpo se liga en un vector de manera que las secuencias de control translacional y transcripcional dentro del vector sirven para su función intentada de regular la traducción y transcripción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan para ser compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de cadena ligera del anticuerpo y el gen de cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse dentro de vectores separados o en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpos se insertan dentro del vector de expresión mediante métodos estándares (*por ejemplo*, ligación de los sitios de restricción en el fragmento y vector del gen de anticuerpos o ligación de extremo contundente si no están presentes los sitios de restricción).

Un vector conveniente es uno que codifica una secuencia de inmunoglobulina de humano funcionalmente completa  $C_H$  o  $C_L$ , con sitios de restricción apropiados tratados con ingeniería genética de manera que cualquier secuencia  $V_H$  o  $V_L$  puede insertarse y expresarse como se describe en este documento. En dichos vectores, el empalme usualmente ocurre entre el sitio donador del empalme en la región J insertada y el sitio aceptor del empalme precediendo el dominio C de humano y también en las regiones de empalme que ocurren dentro de los exones  $C_H$  de humano. La poliadenilación y la terminación de la transcripción ocurren en sitios cromosomales nativos descendentes de las regiones de codificación. El vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilita la secreción del anticuerpo de una célula huésped. El gen de cadena de anticuerpos puede clonarse en el vector de manera que el péptido señal se una en la variable al término amino de la cadena de inmunoglobulina. El péptido señal

puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

Además del gen de cadena de anticuerpos, los vectores de expresión recombinantes

5 portan las secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena de anticuerpos en una célula huésped. Se apreciará por aquellos expertos en la técnica que el diseño del vector de expresión incluyendo la selección de las secuencias reguladoras puede depender de dichos factores como la selección de la célula huésped a transformarse, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión de la célula

10 huésped de mamífero incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteína en las células de mamífero, tales promotores y/o mejoradores derivados de los LTRs retrovirales, citomegalovirus (CMV) (tales como el mejorador/promotor CMV), el virus de Simio 40 (SV40) (tales como el promotor/mejorador SV40), adenovirus, (*por ejemplo*, el promotor tardío principal del adenovirus (AdMLP)), polioma y promotores de mamíferos fuertes tales como inmunoglobulina

15 nativa y promotores actina. Para una descripción adicional de los elementos reguladores virales y las secuencias de los mismos, ver *por ejemplo*, la Patente Estadounidense No. 5,168,062, la Patente Estadounidense No. 4,510,245 y la Patente Estadounidense No. 4,968,615. Los métodos para expresar los anticuerpos en las plantas incluyendo una descripción de promotores y vectores, así como la transformación de plantas se conoce en la técnica. Ver, *por ejemplo*, la Patente

20 Estadounidense 6,517,529, incorporada en este documento como referencia. Los métodos para expresar los polipéptidos en las células bacteriales o las células fúngicas, *por ejemplo*, células de almidón también son bien conocidas en la técnica.

Además de los genes de la cadena de anticuerpos y las secuencias reguladoras, los

25 vectores de expresión recombinantes pueden portar secuencias adicionales tales como secuencias que regulan la replicación del vector en las células huésped (por ejemplo, orígenes de la replicación) y los genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de la células huésped en las cuales el vector se ha introducido (*ver por ejemplo*, las

Patentes Estadounidenses Nos. 4,399,216, 4,634,665 y 5,179,017, incorporadas en este documento como referencia.). Por ejemplo, típicamente el gen marcador selectable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato en una célula huésped en la cual el vector se ha introducido. Los genes marcadores selectables preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para usarse en las células huésped dhfr con selección/amplificación metotrexato), el gen neo (para la selección G418) y el gen de glutamato sintetasa (GS).

#### *Células Huésped No Hibridomas y Métodos para Producir Recombinantemente la Proteína*

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos anti-CCR2 y los vectores que comprenden estas moléculas de ácidos nucleicos pueden usarse para la transfección de una célula huésped de almidón, de plantas, bacterial, de insecto o mamífero apropiada. La transformación puede ser mediante cualquier método conocido para introducir los polinucleótidos en una célula huésped. Los métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en las células de mamíferos son bien conocidos en la técnica e incluyen la transfección mediada con dextrano, la precipitación de fosfato de calcio, la transfección mediada con polibreno, la fusión de protoplasto, electroporación, encapsulación de los polinucleótidos en liposomas y micro inyección directa del ADN en los núcleos. Además, las moléculas del ácido nucleico pueden introducirse en las células de mamíferos mediante los vectores virales. Los métodos para transformar las células son bien conocidos en la técnica. Ver *por ejemplo*, las Patentes Estadounidenses Nos. 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461, y 4,959,455, incorporadas en este documento como referencia). Los métodos para transformar las células de plantas son bien conocidos en la técnica, incluyendo *por ejemplo*, transformación mediada por agrobacterias, transformación biolística, inyección directa, electroporación y transformación viral. Los métodos de transformación bacterial, células de insectos y células de levadura también son bien conocidos en la técnica.

Las líneas celulares de mamíferos disponibles como huésped para la expresión son bien conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles en la



Colección de Cultivos de Tipo Americano (ATCC). Estas incluyen *inter alia*, células de ovario de hámster chino (CHO), células NS0, células NSO, células SP2, células HEK-293T, células NIH-3T3, células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono verde africano (COS), células de carcinoma hepatocelular de humano (*por ejemplo*, Hep G2), células A549, y un

5 número de otras líneas celulares. Las líneas celulares de preferencia particular se seleccionan a través de determinar que líneas celulares tienen altos niveles de expresión. Otras líneas celulares que pueden usarse son líneas celulares de insectos, tales como las células Sf9 o Sf21. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican los genes de anticuerpos se introducen en las células huésped de mamíferos, los anticuerpos se producen mediante cultivar las células huésped

10 por un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el cual las células huésped se cultivan. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando los métodos estándar de purificación de proteínas. Las células huésped de plantas incluyen *por ejemplo*, *Nicotiana*, *Arabidopsis*, lenteja acuática, maíz, trigo, papa, etc. Las células huésped bacteriales incluyen especies *E. coli* y

15 *Streptomyces*. Las células huésped de levadura incluyen *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

Además, la expresión de los anticuerpos de la producción de las líneas celulares puede mejorarse usando un número de técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión del gen

20 de glutamina sintetasa (el sistema GS) es un avance común para el mejoramiento de la expresión bajo ciertas condiciones. El sistema GS se describe en su totalidad o en parte en conexión con las Patentes Europeas Nos. 216 846, 256 055, 323 997 y 338 841.

Es probable que los anticuerpos expresados por las diferentes líneas celulares o en

25 animales transgénicos tendrán diferente glicosilación una de la otra. Sin embargo, todos los anticuerpos codificados por las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en este documento o comprendiendo las secuencias de ácido nucleico proporcionadas en este documento son parte de la presente divulgación, independientemente de la glicosilación de los anticuerpos.

### *Animales y Plantas Transgénicas*

Los anticuerpos anti-CCR2 también pueden producirse transgénicamente a través de la generación de un mamífero o planta que es transgénico para las secuencias de cadena ligera y cadena pesada de la inmunoglobulina de interés y la producción del anticuerpo en una forma recuperable a partir de ellos. En conexión con la producción transgénica en los mamíferos, los anticuerpos anti-CCR2 pueden producirse en y recuperarse de la leche de cabras, vacas u otros mamíferos. Ver, *por ejemplo*, las Patentes Estadounidenses Nos. 5,827,690, 5,756,687, 5,750,172, y 5,741,957, incorporadas en este documento como referencia. En algunos casos, los animales no transgénicos no humanos que comprenden el loci de inmunoglobulina de humano se inmunizan con CCR2 o una porción inmunogénica del mismo, como se describe en este documento. Los métodos para producir los anticuerpos en las plantas se describen *por ejemplo*, en las Patentes Estadounidenses 6,046,037 y 5,959,177, incorporadas en este documento como referencia.

En algunos casos, las plantas o animales transgénicos no humanos se producen mediante la introducción de una o más de las moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo anti-CCR2 en el animal o la planta mediante técnicas estándares transgénicas. Ver Hogan y la Patente Estadounidense 6,417,429, *supra*. Las células transgénicas usadas para producir el animal transgénico pueden ser células troncales embriónicas o células somáticas o un huevo fertilizado. Los organismos no humanos transgénicos pueden ser quiméricos, heterocigotos no quiméricos y homocigotos no quiméricos. Ver, *por ejemplo*, Hogan *et al.*, Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual segunda ed., Cold Spring Harbor Press (1999); Jackson *et al.*, Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach, Oxford University Press (2000); y Pinkert, Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook, Academic Press (1999), todas incorporadas en este documento como referencia. En algunos casos, los animales no humanos transgénicos tienen una desestabilización señalada y el reemplazo por una construcción de señalización que codifica una cadena pesada y/o una cadena ligera de interés. En un caso, los animales transgénicos comprenden y expresan las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas ligera y pesada que específicamente se unen a CCR2 y de preferencia (i) se unen al



primero y/o segundo bucles extracelulares de CCR2; (ii) que no se une al extremo N-terminal o el tercer bucle extracelular de CCR2 o ambos; o (iii) ambos. En un caso, los animales transgénicos comprenden y expresan las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada y ligera que específicamente se unen al CCR2 de humano. En algunos casos, los animales transgénicos comprenden las moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo modificado tal como un anticuerpo de cadena simple, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos anti-CCR2 pueden producirse en cualquier animal transgénico. En un caso, los animales no humanos son ratones, ratas, ovejas, cerdos, cabras, vacas o caballos. El animal transgénico no humano expresa dichos polipéptidos codificados en la sangre, leche, orina, saliva, lágrimas, mocos y otros fluidos corporales.

#### *Bibliotecas de Despliegue Fago*

Se proporciona un método para producir un anticuerpo anti-CCR2 o una porción de unión al antígeno del mismo que comprende las etapas de sintetizar una biblioteca de anticuerpos de humano en fago, analizar la biblioteca con CCR2 o una porción del mismo, aislar el fago que une al CCR2 y obtener el anticuerpo del fago. Por medio de ejemplo, un método para preparar la biblioteca de los anticuerpos para usarse en las técnicas de despliegue del fago comprende las etapas de inmunizar un animal no humano que comprende loci de inmunoglobulina de humano con CCR2 o una porción antigénica del mismo para crear una respuesta inmune, extrayendo las células que producen el anticuerpo del animal inmunizado; aislando el ARN que codifica las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos de las células extraídas, la transcripción inversa del ARN para producir el cADN; amplificando el cADN usando los iniciadores e insertando el cADN en un vector de despliegue fago de manera que los anticuerpos se expresan en el fago. Los anticuerpos anti-CCR2 recombinantes pueden obtenerse en esta forma.

Los anticuerpos anti-CCR2 recombinantes pueden aislarse mediante analizar una biblioteca de anticuerpos combinatoria recombinante. La biblioteca puede ser una biblioteca de despliegue fago scFv, generada usando los cADNS  $V_L$  y  $V_H$  de humano preparados del mRNA

ZJO

aislado de las células B. Los métodos para preparar y analizar dichas bibliotecas se conocen en la técnica. Los equipos para generar las bibliotecas de despliegue fago están comercialmente disponibles (*por ejemplo*, el Sistema de Anticuerpos Fago Recombinantes Pharmacia, catálogo no. 27-9400-01; y el equipo de despliegue fago Stratagene SurfZAP™, catálogo no. 240612). También

5 existen otros métodos y reactivos que pueden usarse en la generación y análisis de las bibliotecas de despliegue de anticuerpos (ver, *por ejemplo*, las Patentes Estadounidenses No. 5,223,409; las Publicaciones de PCT Nos. WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; Fuchs *et al.*, *Bio/Technology* 9:1370-1372 (1991); Hay *et al.*, *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85 (1992); Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281 (1989);

10 McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990); Griffiths *et al.*, *EMBO J.* 12:725-734 (1993); Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992); Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991); Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 89:3576-3580 (1992); Garrad *et al.*, *Bio/Technology* 9:1373-1377 (1991); Hoogenboom *et al.*, *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137 (1991); y Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 88:7978-7982 (1991), todas incorporadas en este documento como referencia.

15

En un caso, para aislar y producir los anticuerpos anti-CCR2 de humano con las características deseadas, un anticuerpo anti-CCR2 de humano como se describe en este documento primero se usa para seleccionar las secuencias de cadena ligera y pesada de humano que tiene actividad de unión similar hacia el CCR2, usando los métodos de impresión epítipo

20 descritos en la Publicación de PCT No. WO 93/06213, incorporada en este documento como referencia. Las bibliotecas del anticuerpo usadas en este método pueden ser bibliotecas scFv preparadas y analizadas como se describen en la Publicación de PCT No. WO 92/01047, McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990); y Griffiths *et al.*, *EMBO J.* 12:725-734 (1993), todas incorporadas en este documento como referencia. Las bibliotecas del anticuerpo scFv pueden ser

25 analizadas usando el CCR2 de humano como el antígeno.

Una vez que los dominios iniciales de humano V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> se seleccionan, los experimentos de "mezclado" e "igualación" se realizan, en los cuales los diferentes pares de los segmentos V<sub>L</sub> y

$V_H$  inicialmente seleccionados se analizan para CCR2 uniéndose para seleccionar las combinaciones de pares  $V_L/V_H$  preferidos. Adicionalmente, para mejorar la calidad del anticuerpo, los segmentos  $V_L$  y  $V_H$  del par (es)  $V_L/V_H$  preferidos pueden mutarse aleatoriamente, de preferencia dentro de la región CDR3 de  $V_H$  y/o  $V_L$ , en un proceso análogo para el proceso de mutación somática en vivo responsable de la maduración por afinidad de los anticuerpos durante una respuesta inmune natural. Esta en maduración por afinidad in vitro puede llevarse a cabo mediante amplificar los dominios  $V_H$  y  $V_L$  usando los iniciadores PCR complementarios para  $V_H$  CDR3 o  $V_L$  CDR3, respectivamente, cuyos iniciadores se han "asegurado" con una mezcla aleatoria de las cuatro bases de nucleótidos en ciertas posiciones de manera que los productos PCR resultantes codifican los segmentos  $V_H$  y  $V_L$  dentro de los cuales las mutaciones aleatorias se han introducido en las regiones CDR3  $V_H$  y/o  $V_L$ . Estos segmentos  $V_H$  y  $V_L$  aleatoriamente mutados pueden re-examinarse para unirse al CCR2.

Siguiendo el análisis y aislamiento de un anticuerpo anti-CCR2 de una biblioteca de despliegue de inmunoglobulina recombinante, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo seleccionado pueden recuperarse del paquete de despliegue (*por ejemplo*, del genoma fago) y subclonado en otros vectores de expresión mediante las técnicas de ADN recombinantes estándar. Si se desea, el ácido nucleico puede además manipularse para crear otras formas de anticuerpo, como se describe en este documento. Para expresar un anticuerpo de humano recombinante aislado mediante el análisis de una biblioteca combinatoria, el ADN que codifica el anticuerpo se clona en un vector de expresión recombinante y se introduce en unas células huésped de mamífero, como se describe en este documento.

#### *Intercambio de Clase*

Otro aspecto proporciona un método para convertir la clase o subclase de un anticuerpo anti-CCR2 para otra clase o subclase. En algunos casos, una molécula de ácido nucleico que codifica un  $V_L$  o  $V_H$  que no incluye las secuencias que codifican  $C_L$  o  $C_H$  se aíslan usando los métodos bien conocidos en la técnica. La molécula de ácido nucleico posteriormente se une a una

secuencia de nucleótidos que codifica un  $C_L$  o  $C_H$  de una clase o subclase de la inmunoglobulina deseada. Esto puede lograrse usando un vector o una molécula de ácido nucleico que comprende una cadena  $C_L$  o  $C_H$  como se describe en este documento. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CCR2 que fue originalmente IgM puede ser una clase intercambiada a un IgG. Además, el intercambio de clase puede usarse para convertir una subclase IgG a otra, es decir, de IgG1 o IgG2 a IgG4. Otro método para producir un anticuerpo que comprende un isotipo deseado comprende las etapas de aislar un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CCR2 y un ácido nucleico que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CCR2, aislando la secuencia que codifica la región  $V_H$ , ligando la secuencia  $V_H$  a una secuencia para una secuencia que codifica un dominio constante de cadena pesada del isotipo deseado, expresando el gen de cadena ligera y la construcción de cadena pesada en una célula y coleccionando el anticuerpo anti-CCR2 con el isotipo deseado.

#### *Anticuerpos Desinmunizados*

En otro aspecto, el anticuerpo puede desinmunizarse para reducir su inmunogenicidad usando las técnicas descritas en *por ejemplo*, las Publicaciones de PCT Nos. WO98/52976 y WO00/34317 (incorporadas en este documento como referencia).

#### *Anticuerpos Mutados*

En otro aspecto, las moléculas de ácido nucleico, los vectores y las células huésped pueden usarse para producir los anticuerpos anti-CCR2. Los anticuerpos pueden mutarse en los dominios variables de las cadenas pesada y/o ligera, *por ejemplo*, para alterar una propiedad de unión del anticuerpo. Por ejemplo, una mutación puede hacerse en uno o más de los CDRs para incrementar o disminuir el  $K_D$  del anticuerpo para CCR2, para incrementar o disminuir el  $k_{off}$ , o para alterar la especificidad del anticuerpo. Las técnicas de mutagénesis dirigidas en sitio son bien conocidas en la técnica. Ver, *por ejemplo*, Sambrook *et al.* y Ausubel *et al.*, supra. En otro caso, una o más mutaciones se hacen en un residuo de aminoácidos que es conocido por cambiar comparado con la línea germinal en el anticuerpo monoclonal 4.40, 4.9, 4.22, 4.39 o 4.40 A68G

S230P. Las mutaciones pueden hacerse en una región variable o CDR de un dominio variable o en un dominio constante. En un caso, las mutaciones se hacen en un dominio variable. En algunos casos, una o más mutaciones se producen en un residuo de aminoácidos que es conocido por cambiarse comparado con la línea germinal en un CDR o región variable de un dominio variable de una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:176, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:194 o SEQ ID NO:113.

En otro aspecto, la región variable se muta de manera que la (s) región (es) variable resultante tienen la secuencia de aminoácidos del gen de línea germinal correspondiente. Una mutación puede hacerse en una región variable o dominio constante para incrementar la media vida del anticuerpo anti-CCR2. Ver, *por ejemplo*, la Publicación de PCT No. WO 00/09560, incorporada en este documento como referencia. Una mutación en una región variable o dominio constante también puede hacerse para alterar o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo para proporcionar un sitio para la unión covalente o no covalente para otra molécula para agregar o remover uno o más sitios de glicosilación o para alterar dichas propiedades como la fijación de complemento, la unión FcR y la citotoxicidad mediada por la célula dependiente del anticuerpo (ADCC). Un anticuerpo simple puede tener mutaciones en cualquiera de una o más de las regiones variables o CDRs de dominio variable o en el dominio constante.

En algunos casos, existen de 1 a 8, incluyendo cualquier número entre las mutaciones de aminoácidos en los dominios  $V_H$  o  $V_L$  del anticuerpo anti-CCR2 mutado comparado con el anticuerpo anti-CCR2 antes de la mutación. En cualquiera de los anteriores, las mutaciones pueden ocurrir en uno o más CDRs. Además, cualquiera de las mutaciones puede ser mutaciones conservadoras de aminoácidos. En algunos casos, existen no más de 5, 4, 3, 2, o 1 cambios de aminoácidos en los dominios constantes.

### Anticuerpos Modificados

En otro aspecto, un anticuerpo de fusión o inmunoadhesina puede producirse que comprende todo o una porción de un anticuerpo anti-CCR2 unido a otro polipéptido. En un caso, solamente los dominios variables del anticuerpo anti-CCR2 se unen al polipéptido. En aún otro caso, el dominio  $V_H$  de un anticuerpo anti-CCR2 se une a un primer polipéptido, mientras el dominio  $V_L$  de un anticuerpo anti-CCR2 se une a un segundo polipéptido que se asocia con el primer polipéptido en una manera tal que los dominios  $V_H$  y  $V_L$  pueden interactuar uno con el otro para formar un sitio de unión al antígeno. En aún otro caso, el dominio  $V_H$  se separa del dominio  $V_L$  mediante un vinculador tal como los dominios  $V_H$  y  $V_L$  pueden interactuar uno con el otro (ver posteriormente bajo el nombre de Anticuerpos de Cadena Simple). El anticuerpo  $V_H$ -vinculador- $V_L$  posteriormente se une al polipéptido de interés. El anticuerpo de fusión es útil para dirigir un polipéptido a una célula o tejido de expresión CCR2. El polipéptido puede ser un agente terapéutico, tal como una toxina, quimioquina u otra proteína reguladora, o puede ser un agente de diagnóstico, tal como una enzima, que puede ser fácilmente visualizada tal como la peroxidasa de rábano picante. Además, los anticuerpos de fusión pueden crearse en los cuales dos (o más) anticuerpos de cadena simple se unen uno con otro. Esto es útil si se desea crear un anticuerpo divalente o polivalente en una cadena de polipéptido simple o si se desea crear un anticuerpo biespecífico.

Para crear un anticuerpo de cadena simple (scFv), los fragmentos de ADN que codifican  $V_H$ - y  $V_L$ - se unen cooperativamente a otro fragmento que codifica un vinculador flexible, *por ejemplo*, codificando la secuencia de aminoácidos  $(Gly_4-Ser)_3$ , tal como las secuencias  $V_H$  y  $V_L$  pueden expresarse como una proteína de cadena simple contigua, con los dominios  $V_L$  y  $V_H$  unidos por el vinculador flexible. Ver, *por ejemplo*, Bird *et al.*, *Science* 242:423-426 (1988); Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 85:5879-5883 (1988); McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990). El anticuerpo de cadena simple puede ser monovalente, si solamente un  $V_H$  y  $V_L$  simple se usan, bivalente si dos  $V_H$  y  $V_L$  se usan o polivalente, si más de dos  $V_H$  y  $V_L$  se usan. Los anticuerpos

polivalentes o biespecíficos pueden generarse que se unen específicamente a CCR2 y a otra molécula.

En otro aspecto, los anticuerpos modificados pueden prepararse usando el anticuerpo anti-CCR2 que codifica las moléculas de ácido nucleico. Por ejemplo, "cuerpos Kappa" (Ill *et al.*, *Protein Eng.* 10: 949-57 (1997)), "Mini cuerpos" (Martin *et al.*, *EMBO J.* 13: 5303-9 (1994)), "Diacuerpos" (Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 90: 6444-6448 (1993)), o "Janusinas" (Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991) y Traunecker *et al.*, *Int. J. Cancer* (Suppl.) 7:51-52 (1992)) pueden prepararse usando las técnicas biológicas moleculares estándares siguiendo las enseñanzas de la especificación.

Los anticuerpos bioespecíficos o fragmentos de unión al antígeno pueden producirse por una variedad de métodos que incluyen la fusión de hibridomas o unión de los fragmentos Fab'. Ver, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990), Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992). Además los anticuerpos bioespecíficos pueden formarse como "diacuerpos" o "Janusinas". En algunos casos, el anticuerpo biespecífico se une a dos epítopes diferentes de CCR2. En algunos casos, el anticuerpo biespecífico tiene una primera cadena pesada y una primera cadena ligera del anticuerpo monoclonal 4.40, 4.9 o 4.40 A68G S230P y una cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo adicional. En algunos casos, la cadena pesada y la cadena ligera adicional también son de uno de los anticuerpos monoclonales arriba identificados pero son diferentes de las primeras cadenas ligera y pesada.

En algunos casos, los anticuerpos modificados descritos en este documento se preparan usando uno o más de los dominios variables o CDRs de un anticuerpo monoclonal anti-CCR2 de humano proporcionado en este documento.

### *Anticuerpos Marcados y Derivatizados*

Un anticuerpo o anti-CCR2 o porción de unión al antígeno puede derivatizarse o unirse a otra molécula (*es decir*, otro péptido o proteína). En general, los anticuerpos o la porción de los mismos se derivatizan de manera que el CCR2 que se une no se afecta adversamente por la derivatización o marcado. Por consiguiente, los anticuerpos y las porciones de anticuerpo se intenta que incluyan tanto las formas intactas y modificadas de los anticuerpos anti-CCR2 de humano descritas en este documento. Por ejemplo, un anticuerpo o una porción de anticuerpo puede unirse funcionalmente (mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más de otras entidades moleculares, tales como el otro anticuerpo (*por ejemplo*, un anticuerpo o un diacuerpo biespecífico), un agente de detección, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar la asociación del anticuerpo o la porción del anticuerpo con otra molécula (tal como una región central estreptavidina o una etiqueta de polihistidina).

Un tipo de anticuerpo derivatizado se produce mediante la reticulación de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de diferentes tipos, *por ejemplo*, para crear anticuerpos biespecíficos). Los reticulantes apropiados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, teniendo dos grupos distintamente reactivos separados por un espaciador apropiado (*por ejemplo*, éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) o homobifuncional (*por ejemplo*, suberato de disuccinimidilo). Dichos vinculadores están disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Otro tipo de anticuerpo derivatizado es un anticuerpo marcado. Los agentes de detección útiles con los cuales un anticuerpo o porción de enlace al antígeno pueden derivatizarse incluyen compuestos fluorescentes incluyendo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, fósforos de lantánido y los similares. Un anticuerpo también puede marcarse con enzimas que son útiles para la detección, tales como la peroxidasa de rábano picante,  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y los similares. Cuando un anticuerpo se marca con una enzima detectable, se detecta mediante



agregar reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción que puede discernirse. Por ejemplo, cuando el agente de la peroxidasa de rábano picante está presente, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Un anticuerpo también puede marcarse con biotina, y detectarse a través de la medición indirecta de avidina o unión de estreptavidina. Un anticuerpo también puede marcarse con un epítipo de polipéptido predeterminado reconocido por un reportero secundario (es decir, secuencias de par de cierre de leucina, sitios de unión para los anticuerpos secundarios, dominios de unión metálica, etiquetas de epítipo). En algunos casos, las marcas se unen por los brazos del espaciador de varias longitudes para reducir la barrera estérica potencial.

10

Un anticuerpo anti-CCR2 también pueden marcarse con un aminoácido radiomarcado. La radiomarcación puede usarse para ambos propósitos terapéuticos y de diagnóstico. Por ejemplo, el radiomarcado puede usarse para detectar los tumores de expresión CCR2 mediante los rayos X u otras técnicas de diagnóstico. Además, el radiomarcado puede usarse terapéuticamente como una toxina para las células o tumores cancerosos. Los ejemplos de marcas para los polipéptidos incluyen pero no se limitan a los radioisótopos o radionúclidos siguientes --  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ , y  $^{131}\text{I}$ .

15

Un anticuerpo anti-CCR2 también puede derivatizarse con un grupo químico tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo o un grupo de carbohidratos. Estos grupos son útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, es decir, para incrementar la media vida del suero o para incrementar la unión del tejido.

20

En algunos casos, el anticuerpo anti-CCR2 puede marcarse con un paramagnético, radioactivo o fluorogénico o porción que es detectable en la formación de imágenes.

25

En algunos casos, el ión paramagnético es cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio

(II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) o erbio (III). En otros casos, el ión radioactivo es yodo123, technetio99, indio111, renio188, renio186, cobre67, yodo131, itrio90, yodo125, astatino211, y galio67. En otros casos, el anticuerpo anti-CCR2 se marca con un agente de formación de imágenes de rayos X tal como lantano (III), oro (III) plomo (II) y bismuto (III).

5

#### Composiciones Farmacéuticas y Equipos

Se proporcionan las composiciones que comprenden un anticuerpo anti-CCR2 con propiedades. Dichas composiciones son útiles para tratar una condición en las cuáles el CCR2 tiene un rol incluyendo pero no limitadas a fibrosis de hígado, fibrosis renal, fibrosis pulmonar, 10 soriasis, enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunes, enfermedades de rechazo de injerto, arterioesclerosis, obesidad, infección de VIH, dolor neuropático, inflamación asociada con isquemia, estenosis y restenosis, cáncer, asepsia, escleroderma y diabetes. En algunos casos, el tratamiento es de fibrosis de hígado mediada por el virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis B (VHB), esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) 15 y/o esteatohepatitis inducida por alcohol (EHA). En algunos casos, el sujeto está en necesidad de una reducción de infiltración de leucocitos en los tejidos, tal como los tejidos que son los sitios de las respuestas inflamatorias. En algunos casos, el sujeto del tratamiento es un humano. En otros casos, el sujeto es un sujeto veterinario. Los ejemplos de los tejidos en necesidad de inflamación reducida o infiltración de leucocitos reducida incluyen pero no se limitan a tejido conectivo, 20 cartilago, hígado, pulmón, riñón, tejido neural incluyendo cerebro, espina dorsal y tejido neural periférico, corazón, vasos sanguíneos, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, colon, próstata, páncreas, tracto urinario, ovarios, pecho, útero, testículos, pene, huesos, músculo, glándula tiroidea, glándula adrenal, pituitaria, tejido adiposo, médula ósea, sangre, timo, bazo, nodos linfáticos, piel, ojo, oreja o nariz. En un caso, los tejidos son tejidos que tienen superficies 25 mucosales.

Como se usa en este documento, "portador farmacéuticamente aceptable" significa cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacteriales y

antifúngicos, agentes de retraso de la absorción e isotónicos y los similares que son fisiológicamente compatibles. Algunos ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables solamente por medio de ilustración, son agua, solución salina, solución estabilizada con fosfato, dextrosa, etanol glicerol y los similares, así como las combinaciones de los mismos. En muchos

5 casos, será preferible incluir agentes isotónicos por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Los ejemplos adicionales de sustancias farmacéuticamente aceptables son agentes humectantes o cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes emulsificantes o humectantes, preservativos o estabilizantes, que mejoran la vida autónoma o efectividad del anticuerpo.

10

Las composiciones pueden estar en una variedad de formas, por ejemplo, formas de dosis líquida, semi-sólida y sólida, tales como soluciones líquidas (*por ejemplo*, soluciones de infusión e inyectables), dispersiones o suspensiones, tabletas, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma depende de la forma de administración y la aplicación terapéutica. Las

15 composiciones típicas están en la forma de soluciones inyectables o de infusión, tales como las composiciones similares a aquellas usadas para la inmunización pasiva de humanos. El modo preferido de administración es parenteral (*es decir*, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). En un caso, el anticuerpo se administra mediante infusión o inyección intravenosa. En aún otro caso, el anticuerpo se administra mediante inyección intramuscular o subcutánea.

20

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de producción y almacenaje. La composición puede formularse como una solución, una microemulsión, dispersión, liposomas u otra estructura ordenada apropiada para alta concentración del fármaco. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante

25 incorporar el anticuerpo anti-CCR2 en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes anteriormente enumerados, como se requiera, seguidos por la esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básica y los otros

ingredientes requeridos de aquellos anteriormente enumerados. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectable estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y secado por congelamiento que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución filtrada previamente estéril del mismo. La fluidez apropiada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de surfactantes. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede proporcionarse aproximadamente mediante incluirse en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo sales monoestearato y gelatina.

10

Los anticuerpos pueden administrarse por una variedad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, el modo/ruta preferida de administración es subcutánea, intramuscular o infusión intravenosa. Como se apreciará por el experto en la técnica, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Otros modos de administración incluyen intraperitoneal, intrabronquial, transmucosal, intraespinal, intrasinovial, intraaórtica, intranasal, ocular, ótica, tópica y bucal, e intratumoral.

15

En algunos casos, el compuesto activo de las composiciones del anticuerpo pueden prepararse con un portador que protegerá el anticuerpo en contra de la liberación rápida, tal como una liberación controlada de la formulación, incluyendo implantes, parches intradérmicos y sistemas de liberación microencapsulada. Los polímeros biocompatibles biodegradables pueden usarse, tal como acetato de etileno vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones se patentan o generalmente son conocidos por aquellos expertos en la técnica. Ver, *por ejemplo*, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978).

20

25

Los compuestos activos adicionales también pueden incorporarse en las composiciones.

En ciertos casos, un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es co-formulado con y/o co-administrado con uno o más agentes terapéuticos, de diagnóstico o profilácticos adicionales. Los agentes terapéuticos incluyen, sin limitación, un anticuerpo anti-CCR2 con una especificidad fina diferente, anticuerpos que se unen a otros blancos, fotosensibilizadores, andrógenos, estrógenos, agentes anti-inflamatorios no esteroideos, agentes anti-hipertensivos, agentes analgésicos, antidepresivos, antibióticos, agentes anti-cáncer, anestésicos, anti-eméticos, anti-infecciones, contraceptivos, agentes anti-diabéticos, agentes anti-alergias, agentes quimioterapéuticos, agentes anti-migraña, agentes para dejar de fumar, agentes anti-virales, inmunosupresores, agentes trombolíticos, agentes que disminuyen el colesterol y agentes anti-obesidad.

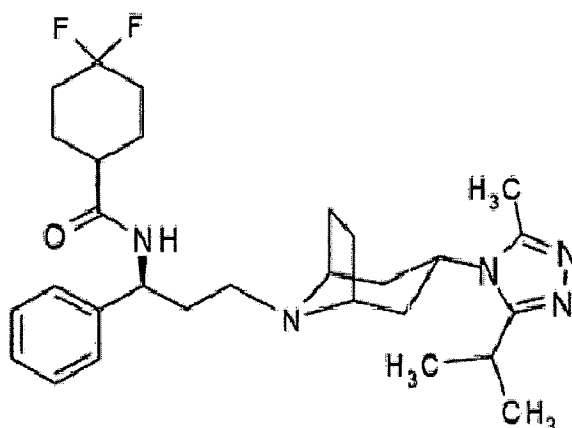
Los agentes terapéuticos también incluyen análogos péptidos que inhiben el CCR2, anticuerpos u otras moléculas que se unen a MCP-1, MCP-2, MCP-3 o MCP-4 y previenen su unión a CCR2 y los agentes que inhiben la expresión CCR2. En un caso, los agentes adicionales que inhiben la expresión CCR2 comprenden un ácido nucleico antisentido capaz de hibridarse a un mRNA CCR2, tal como un ARN de horquilla o siARN. Los ácidos nucleicos de secuencia específica capaces de inhibir la función de los genes mediante la interferencia de ARN son bien conocidos en la técnica. Dichas terapias por combinación pueden requerir dosis más bajas del anticuerpo anti-CCR2 inhibidor así como los agentes co-administrados, además evitando las toxicidades posibles o complicaciones asociadas con las varias monoterapias.

En ciertos casos específicos, los agentes terapéuticos que son co-formulados con y/o co-administrados con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor son un agente antimicrobial. Los agentes antimicrobiales incluyen antibióticos (es decir, antibacteriales), agentes antivirales, agentes antifúngicos y agentes anti-protozoarios. Los ejemplos no limitantes de los agentes antimicrobiales son sulfonamidas, trimetoprim-sulfametoxazola, quinolinonas, penicilinas y cefalosporinas.

En ciertos casos específicos, el agente terapéutico (s) que se co-formula con y/o se administra con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor y un antagonista quimioquina, un antagonista CCR2, un antagonista MCP-1 o un antagonista CCR5. El antagonista CCR2 o un antagonista MCP-1 pero no se limitan a: anticuerpos dirigidos a MCP-1 (Patente Estadounidense 7,202,343, US2005/0025768, US2006/0039913, US2006/0246069, & US2004/004/0047860); compuestos tetrahidropiranyl ciclopentil bencilamida (US2006/0116421); compuestos heterarilopiperidina (US2005/0250781); compuestos piperidinil ciclopentil aril bencilamida (US2006/0173013); compuestos amina cíclica (Patente Estadounidense 6,140,349 & Patente Estadounidense 6,476,054); compuestos ciclopentilo (US2002/0049222 & Patente Estadounidense 6,545,023); compuestos tetrahidropiranyl ciclopentil tetrahidropiridopiridina (US2004/0167156, Patente Estadounidense 6,812,234 & Patente Estadounidense 7,230,008); compuestos aminociclopentil heterotriciclicamida fusionados (US2007/0004714); compuestos piperidinil-alfa-aminoamida (US2005/0250814); compuestos pirazola sustituidos (WO06/88813); compuestos tetrahidropiranyl ciclopentil amida heterocíclicos (US2006/0178363); compuestos ciclopentil bencilamida heterocíclico de 7 y 8 miembros (US2006/0183731); compuestos benzoxazinil-amidociclopentil-heterocíclicos (US2006/0069088); compuestos 3-aminociclopentanocarboxamida (US2007/0149532); compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno (US2007/0155713); compuestos triazolil fenil bencenosulonamida (WO08/10934); derivados pirrolinda sustituida (US2004/0186140); derivados benzamida sustituida y fenilcarbamato sustituido (Patente Estadounidense 7,087,604); compuestos cicloalquilamina sustituidos (US2005/0054626); compuestos bicicloalquilamina sustituida (US2005/0227960); compuestos pirrolidinona y pirrolidinona (US2003/0149081, Patente Estadounidense 6,727,275 & Patente Estadounidense 6,936,633); compuestos mercaptoimidazola (US2007/0244138); compuestos dipiperidina sustituida (US2007/0197590); compuestos de sal cuaternaria de fenilamino sustituido (US2006/0293379); heterociclos de nitrógeno punteado y bicíclico (US2006/0074121); compuestos 3-aminociclopentanocarboxamida (US2006/0020133); compuestos 3-(4-heteroarilciclohexilamino)ciclopentanocarboxamida (US2005/0267146); compuestos triazolo (Patente Estadounidense 6,492,364); compuestos heteroaril sulfonamida (US2006/0173019); aril

sulfonamidas (Patente Estadounidense 6,939,885); bis-aril sulfonamidas (Patente Estadounidense 7,227,035 & US2004/0167113); compuestos benzamida sustituida (Patente Estadounidense 6,821,964); compuestos diazepam substituidos (US2007/0249589); derivados Triazaespiro[5.5]undecano (US2005/267114); compuestos piperidinacarboxamida sustituidos (US2003/0114443 & US6,562,978); derivados benzazepina (US2004/0235822 & Patente Estadounidense 7,262,185);

En casos seleccionados, el antagonista quimioquina co-formulado o co-administrado con los anticuerpos CCR2 es SELZENTRY™ (Maraviroc), que es químicamente descrito como 4,4-difluoro-*N*-{(1*S*)-3-[*exo*-3-(3-isopropil-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-4-il)-8-azabicyclo[3.2.1]oct-8-il]-1-fenilpropil}ciclohexanocarboxamida:



En ciertos casos, el agente (s) terapéutico que se co-formula con y/o co-administra con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es un antagonista receptor CB-1. Como se usa en este documento, el término "receptor CB-1" se refiere a una proteína G acoplada al receptor cannabinoide de tipo 1. El término "antagonista" incluye tanto los antagonistas completos y los antagonistas parciales, así como los agonistas inversos. El antagonista del receptor CB-1 puede ser selectivo para el receptor CB-1. El "receptor selectivo CB-1" significa que el compuesto tiene poca o ninguna actividad para antagonizar el receptor cannabinoide-2 (CB-2). El antagonista CB-1 puede ser al menos 10 veces selectivo para el receptor CB-1 en comparación con el receptor CB-2. Por ejemplo, la concentración inhibidora (IC50) para antagonizar el receptor CB-1 es aproximadamente 10 o más veces menor que el IC50 para antagonizar el receptor CB-2. Los

antagonistas del receptor CB-1 apropiados incluyen los compuestos descritos en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,462,960; 5,596,106; 5,624,941 ; 5,747,524; 6,017,919; 6,028,084; 6,432,984; 6,476,060; 6,479,479; 6,518,264; y 6,566,356; Publicaciones de Patente Estadounidenses Nos. 2003/0114495; 2004/0077650; 2004/0092520; 2004/0122074; 2004/0157838; 2004/0157839; 2004/0214837; 2004/0214838; 2004/0214855; 2004/0214856; 2004/0058820; 2004/0235926; 2004/0259887; 2005/0080087; 2005/0026983 y 2005/0101592; Publicaciones de Patente de PCT Nos. WO 03/075660; WO 02/076949; WO 01/029007; WO 04/048317; WO 04/058145; WO 04/029204; WO 04/012671 ; WO 03/087037; WO 03/086288; WO 03/082191 ; WO 03/082190; WO 03/063781 ; WO 04/012671 ; WO 04/013120; WO 05/020988; WO 05/039550; WO 05/044785; WO 05/044822; y WO 05/049615: Solicitud de Patente de PCT Nos. de Serie PCT/IB2004/004050 presentada en Diciembre 6, 2004; PCT/IB2004/004017 presentada en Diciembre 6, 2004; PCT/IB2004/004023 presentada en Diciembre 6, 2004; y PCT/IB2004/004019 presentada en Diciembre 6, 2004; y las Solicitudes Provisionales Estadounidenses Nos. 60/523937 presentada en Noviembre 21 , 2003; 60/529908 presentada en Diciembre 16, 2003; 60/529909 presentada en Diciembre 16, 2003; 60/529910 presentada en Diciembre 16, 2003; 60/530012 presentada en Diciembre 16, 2003; y 60/564648 presentada en Abril 21 , 2004. Todas de las anteriores patentes y solicitudes de patente se incorporan en este documento como referencia. Los antagonistas del receptor CB-1 preferidos para usarse en los métodos incluyen: rimonabant (SR141716A también conocido bajo la marca registrada Acomplia™) está disponible en Sanofi-Synthelabo o pueden prepararse como se describe en la Patente Estadounidense No. 5,624,941; *N*-(piperidin-1-il)-1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-yodofenil)-4-metil-1H-pirazola-3-carboxamida (AM251) está disponible en Tocris™, Ellisville, MO; [5-(4-bromofenil)-1-(2,4-dicloro-fenil)-4-etil-*N*-(1-piperidinil)-1H-pirazola-3-carboxamida] (SR147778) que puede prepararse como se describe en la Patente Estadounidense No. 6,645,985; *N*-(piperidin-1-il)-4,5-difenil-1-metilimidazol-2-carboxamida, *N*-(piperidin-1-il)-4-(2,4-diclorofenil)-5-(4-clorofenil)-1-metilimidazol-2-carboxamida, *N*-(piperidin-1-il)-4,5-di-(4-metilfenil)-1-metilimidazol-2-carboxamida, *N*-ciclohexil-4,5-di-(4-metilfenil)-1-metilimidazol-2-carboxamida, *N*-(ciclohexil)-4-(2,4-diclorofenil)-5-(4-clorofenil)-1-metilimidazol-2-carboxamida, y *N*-(fenil)-4-(2,4-diclorofenil)-5-(4-clorofenil)-1-



metilimidazol-2-carboxamida que pueden prepararse como se describe en la Publicación de Patente de PCT No. WO 03/075660; la sal clorhídrica, el mesilato y besilato de ácido 1-[9-(4-clorofenil)-8-(2-cloro-fenil)-9H-purin-6-il]-4-etilamino-piperidina-4-carboxílico que pueden prepararse como se describe en la Publicación de Patente Estadounidense No. 2004/0092520; amida del

5 ácido 1-[7-(2-cloro-fenil)-8-(4-cloro-fenil)-2-metil-pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-il]-3-etilamino-azetidina-3-carboxílico y amida del ácido 1-[7-(2-cloro-fenil)-8-(4-cloro-fenil)-2-metil-pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-il]-3-metilamino-azetidina-3-carboxílico que pueden prepararse como se describe en la Publicación de Patente Estadounidense No. 2004/0157839; 3-(4-cloro-fenil)-2-(2-cloro-fenil)-6-(2,2-difluoro-propil)-2,4,5,6-tetrahidro-pirazolo[3,4-c]piridin-7-ona, 2-(2-cloro-fenil)-3-(4-etil-fenil)-

10 5-(2,2,2-trifluoro-etil)-4,5-dihidro-2H-pirrol[3,4-c]pirazol-6-ona, y 2-(2-cloro-fenil)-3-(4-isopropil-fenil)-5-(2,2,2-trifluoro-etil)-4,5-dihidro-2H-pirrol[3,4-c]pirazol-6-ona que puede prepararse como se describe en la Publicación de Patente Estadounidense No. 2004/0214855; 3-(4-cloro-fenil)-2-(2-cloro-fenil)-7-(2,2-difluoro-propil)-6,7-dihidro-2H,5H-4-oxa-1,2,7-triaza-azulen-8-ona que puede prepararse como se describe en la Publicación de Patente Estadounidense No. 2005/0101592; 2-

15 (2-cloro-fenil)-6-(2,2,2-trifluoro-etil)-3-(4-trifluorometil-fenil)-2,6-dihidro-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona que puede prepararse como se describe en la Publicación de Patente Estadounidense No. 2004/0214838; (S)-4-cloro-N-[[3-(4-cloro-fenil)-4-fenil-4,5-dihidro-pirazol-1-il]-metilamino-metileno]-bencenosulfonamida (SLV-319) y (S)-N-[[3-(4-cloro-fenil)-4-fenil-4,5-dihidro-pirazol-1-il]-metilamino-metileno]-4-trifluorometil-bencenosulfonamida (SLV-326) que pueden prepararse como se describe

20 en la Publicación de Patente de PCT No. WO 02/076949; N-piperidino-5-(4-bromofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-etilpirazola-3-carboxamida que puede prepararse como se describe en la Patente Estadounidense No. 6,432,984; 1-[bis-(4-cloro-fenil)-metil]-3-[(3,5-difluoro-fenil)-metanosulfonil-metileno]-azetidina que puede prepararse como se describe en la Patente Estadounidense No. 6,518,264; 2-(5-(trifluorometil)piridin-2-iloxi)-N-(4-(4-clorofenil)-3-(3-cianofenil)butan-2-il)-2-

25 metilpropanamida que puede prepararse como se describe en la Publicación de Patente de PCT No. WO 04/048317; 4-[[6-metoxi-2-(4-metoxifenil)-1-benzofuran-3-il]carbonil]benzonitrilo (LY-320135) que puede prepararse como se describe en la Patente Estadounidense No. 5,747,524; 1-[2-(2,4-diclorofenil)-2-(4-fluorofenil)-benzo[1,3]dioxola-5-sulfonil]-piperidina que puede prepararse

como se describe en WO 04/013120; y [3-amino-5-(4-clorofenil)-6-(2,4-diclorofenil)-furo[2,3-b]piridin-2-il]-fenil-metanona que puede prepararse como se describe en WO 04/012671.

En ciertos casos específicos, el agente (s) terapéutico que se co-fórmula con y/o co-administra con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es un factor angiogénico. Los factores angiogénicos incluyen pero no se limitan a factor del crecimiento del fibroblasto básico, factor del crecimiento de fibroblasto ácido, factor de crecimiento endotelial vascular, angiogenina, factor de crecimiento de transformación  $\alpha$  y factor de necrosis tumoral  $\beta$ , angiopoietina, factor del crecimiento derivados de plaquetas, factor de crecimiento placentar, factor de crecimiento de hepatocitos, y proliferina.

En ciertos casos específicos, el agente (s) terapéutico que se co-formula con y/o se co-administra con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es un agente trombolítico. Los agentes trombolítico incluyen pero no se limitan a activador del plasminógeno de uroquinasa, uroquinasa, estreptoquinasa, inhibidores de  $\alpha$ 2-plasmino e inhibidores del inhibidor-1 del activador plasminógeno, inhibidores de enzima del convertidor angiotensina (ACE), espirolactona, activador del plasminógeno de tejido (tPA), un inhibidor de la enzima  $1\beta$ -del convertidor interleuquina, anti-trombina III y los similares.

En ciertos casos específicos, el agente (s) terapéutico que se co-formula con y/o co-administra con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es un agente anti-obesidad. Los agentes anti-obesidad incluyen pero no se limitan al inhibidor apo-B/MTP, un inhibidor dehidrogenasa-1  $11\beta$ -hidroxi esteroide, péptido YY<sub>3-36</sub> o un análogo del mismo, un agonista MCR-4, un agonista CCK-4, un inhibidor de reingesta monoamina, un agente simpatomimético, un agonista del receptor adrenérgico  $\beta_3$ , un agonista dopamina, un análogo del receptor de hormona de estimulación de melanocito, un agonista del receptor 5-HT<sub>2c</sub>, un antagonista de la hormona de concentración de melanina, leptina, un análogo de leptina, un agonista del receptor de leptina, un antagonista galanina, un inhibidor lipasa, un agonista bombesina, un antagonista del receptor neuropéptido-Y,

un agente tiromimético, dehidroepiandrosterona o análogo de la misma, un antagonista del receptor glucocorticoide, un antagonista del receptor orexina, un agonista del receptor péptido 1 como glucagon, un factor neurotrófico ciliar, un antagonista de proteína agouti-relacionado, un antagonista del receptor grelin, un antagonista del receptor 3 histamina o agonista inverso y un  
5 agonista del receptor U neuromedin.

En ciertos casos específicos, el agente (s) terapéutico que se co-formula con y/o se co-administra con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es un agente que inhibe el reclutamiento y/o adhesión de los neutrófilos y/o las células mononucleares para un sitio de lesión vascular. Dichos  
10 agentes terapéuticos, por ejemplo pueden inhibir la actividad (por ejemplo, la actividad de unión, actividad de señalización) de una molécula de superficie celular a través de la adhesión celular, se median la quimiotaxis, y/o la búsqueda. Por ejemplo, los antagonistas de las moléculas de adhesión celular (por ejemplo, integrinas (es decir, integrinas  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$ ,  $\beta 7$ ,  $\beta 8$ ), selectinas (es decir, E-selectina, P-selectina, L-selectina), cadherinas (es decir, E-, P-, N-cadherinas) y moléculas de adhesión de la superfamilia de la inmunoglobulina (es decir, LFA-2,  
15 LFA-3, CD44)) y antagonistas de los receptores citoquina (es decir, antagonistas de la función del receptor quimioquina) pueden ser co-formulados y/o co-administrados con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor. Además, los agentes que se unen a los ligandos de las moléculas de adhesión celular o citoquinas o quimioquinas e inhiben la unión al ligando de los receptores expresados en  
20 los neutrófilos y/o las células mononucleares también pueden co-formularse con y/o co-administrarse con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor.

En ciertos casos específicos, el agente (s) terapéutico que se co-formula con y/o co-administra con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es un agente terapéutico cardíaco. Los agentes  
25 terapéuticos ejemplarizadores intentados para tratar las enfermedades cardíacas incluyen pero no se limitan a factores del crecimiento, agentes angiogénicos, bloqueadores del canal de calcio, agentes antidepresivos, agentes inotrópicos, agentes antiaterogénicos, anticoagulantes,  $\beta$ -bloqueadores, agentes anti-arritmias, glicósidos cardíacos, agentes antiinflamatorios, antibióticos,

agentes antivirales, agentes antifúngicos y agentes que inhiben las infecciones por protozoarios y agentes antineoplásicos.

En ciertos casos específicos, el agente (s) terapéutico que se co-formula con y/o co-administra con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es un bloqueador del canal de calcio. Los bloqueadores del canal de calcio incluyen pero no se limitan a dihidropiridinas tales como nifedipina, nicardipina, nimodipina y los similares; benzotiazepinas tal como dilitazem; fenilalquilaminas tal como verapamilo; éteres de diarilaminopropilamina tal como bepridilo; y tetralinas bencimidola-substituidas tal como mibefradilo.

10

En ciertos casos específicos, el agente (s) cardiaco terapéutico que se co-formula con y/o co-administra con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es un agente antihipertensivo. Los agentes antihipertensivos incluyen pero no se limitan a diuréticos, incluyendo tiazidas, tal como hidroclorotiazida, furosemida, espironolactona, triamtereno, y amilorida; agentes antiadrenérgicos, incluyendo clonidina, guanabenz, guanfacina, metildopa, trimetafán, reserpina, guanetidina, guanadrel, fentolamina, fenoxibenzamina, prazosin, terazosin, doxazosin, propanolol, metoprolol, nadolol, atenolol, timolol, betaxolol, carteolol, pindolol, acebutolol, labetalol; vasodiladores, incluyendo hidralizina, minoxidil, diazoxida, nitroprusido; e inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, incluyendo captopril, benazepril, enalapril, enalaprilat, fosinopril, lisinopril, quinapril, ramipril; antagonistas del receptor de la angiotensina, tal como losartan; y antagonistas del canal de calcio, incluyendo nifedina, amlodipina, felodipina XL, isadipina, nicardipina, benzotiazepinas (por ejemplo, dilitazem), y fenilalquilaminas (por ejemplo, verapamilo).

20

En ciertos casos específicos, el agente (s) cardiaco terapéutico que se co-formula con y/o co-administra con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es un anti-coagulante. Los anticoagulantes incluyen pero no se limitan a heparina, warfarina, hirudina, péptido anticoagulante grueso, heparinas de bajo peso molecular tales como enoxaparina, dalteparina, y ardeparina, ticlopidina, danaparoid, argatrobán, abciximab y tirofiban.

25

En ciertos casos específicos, el agente (s) cardiaco terapéutico que se co-formula con y/o co-administra con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es un agente antiarrítmico. Los agentes antiarrítmicos incluyen pero no se limitan a bloqueadores del canal de sodio (por ejemplo, lidocaína, procainamida, encainida, flecanida, y los similares), bloqueadores beta adrenérgicos (por ejemplo, propranolol), prolongadores de la duración potencial de la acción (por ejemplo, amiodarona), y bloqueadores del canal de calcio (por ejemplo, verapamilo, diltiazem, cloruro de níquel y los similares). Liberación de los depresores cardiacos (por ejemplo, lidocaína), estimulantes cardiacos (por ejemplo, isoproterenol, dopamina, norepinefrina, etc.), y las combinaciones de los agentes cardiacos múltiples (por ejemplo, digoxina/quinidina para tratar la fibrilación atrial) también son de interés

En ciertos casos específicos, el agente (s) cardiaco terapéutico que se co-formula con y/o co-administra con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es un agente para tratar la falla cardiaca congestiva. Los agentes para tratar la falla cardiaca congestiva incluyen pero no se limitan a glicósido cardiaco, agentes inotrópicos, un diurético de bucle extracelular, un diurético tiazida, un diurético de ahorro del ión de potasio, un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina, un antagonista receptor de la angiotensina, un nitro vasodilatador, un inhibidor de la fosfodiesterasa, un vasodilatador directo, un antagonista del receptor  $\alpha$ 1-adrenérgico, un bloqueador del canal de calcio y un agente simpatomimético.

20

En ciertos casos específicos, el agente (s) cardiaco terapéutico que se co-formula con y/o co-administra con un anticuerpo anti-CCR2 inhibidor es un agente apropiado para tratar las cardiomiopatías, tales como pero no limitados a dopamina, epinefrina, norepinefrina, y fenilefrina.

25

También se incluyen las composiciones para inhibir la infección viral y en particular la infección por VIH, en un mamífero que comprende una cantidad de un anticuerpo en combinación con una cantidad de un agente antiviral, en donde las cantidades del anticuerpo anti-CCR2 y un agente antiviral son efectivos juntos en la inhibición de la replicación viral, la infección viral de

nuevas células o cargas virales. Muchos agentes antivirales son actualmente conocidos en la técnica, incluyendo los análogos nucleósidos (*por ejemplo*, AZT, 3TC, y ddI), los inhibidores de proteasa y los antagonistas del receptor quimioquina pueden inhibir la infección por VIH pero no las infecciones virales.

5

En otro aspecto, el anticuerpo anti-CCR2 o el fragmento del mismo puede co-administrarse con otro agente terapéutico, tales como fármacos o moléculas antiinflamatorias a un paciente quién tiene una enfermedad inflamatoria, tal como artritis, arterioesclerosis o esclerosis múltiple. En un aspecto, se proporcionan los métodos para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria en un mamífero comprendiendo administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto en combinación con un agente antiinflamatorio. Los agentes inflamatorios incluyen pero no se limitan a cualquier agente antiinflamatorio no esteroidal tales como derivados del ácido salicílico (aspirina), derivados del para-aminofenol (acetaminofén), indola y ácidos acéticos indeno (indometacina), ácidos acéticos heteroarilo (ketorolaco), ácidos arilpropiónicos (ibuprofeno), ácidos antranílicos (ácido mefenámico), ácidos enólicos (oxicams) y alcanonas (nabumetona) y cualquier agente antiinflamatorio esteroidal que incluye corticosteroides y análogos sintéticos biológicamente activos con respecto a sus actividades glucocorticoides (metabólicas) y mineralcorticoides (que regulan los electrolitos). En otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 se administra en combinación con un fármaco anti-inflamatorio no esteroidal tal como la aspirina (Bayer, Bufferin), ibuprofeno (Motrim, Advil), naproxeno sódico (Aleve), ketoprofeno (Orudis KT), indometacina (Indocin), etodolac (Lodine), diclofenaco sódico (Voltaren), rofecoxib (Vioxx), celecoxib (Celebrex), nabumetona (Relafen) o en combinación con un esteroide tal como prednisona, prednisolona, dexametasona, beclometasona, budesonida, fluticasona o triamcinolona.

25

Adicionalmente, otros fármacos usados en la terapia de inflamación incluyen pero no se limitan a antagonistas tales como toda la histamina y los antagonistas del receptor bradiquinina, leucotrieno y antagonistas del receptor prostaglandina y los antagonistas del receptor del factor de activación de plaquetas. En aún otro caso, el anticuerpo o la terapia por combinación se administra

junto con radioterapia, quimioterapia, terapia fotodinámica, cirugía u otro tratamiento de inmunoterapia, es decir, terapia dirigida al sistema inmune. En aún otro caso, el anticuerpo se administrará con otro anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CCR2 puede administrarse con un anticuerpo u otro agente que se conoce por inhibir la inflamación, es decir, un anticuerpo o agente que inhibe la alfa-4-integrina (US2004/0009169) o el receptor IL-8 (US2004/0037830). Los anticuerpos adicionales que pueden co-administrarse con los anticuerpo anti-CCR2 se describen en las Patentes Estadounidenses Nos. 6,696,50; 6,406,865; 6,352,832; y 6,084,075, los contenidos de las cuales se incorporan en este documento como referencia.

Las composiciones pueden incluir una "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "cantidad profilácticamente efectiva" de un anticuerpo o porción de unión al antígeno. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva en dosis o para periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o la porción de anticuerpo puede variar de acuerdo con los factores tales como estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individual y la habilidad del anticuerpo o la porción del anticuerpo para producir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva también es una en la cual cualquier efecto perjudicial o tóxico del anticuerpo o la porción del anticuerpo se excede en peso por los efectos terapéuticamente benéficos. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosis y por periodos de tiempo necesarios para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, dado que una dosis profiláctica se usa en sujetos antes de o en estado temprano de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva puede ser menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

Los regímenes de dosis pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, un bolo simple puede administrarse, varias dosis divididas pueden administrarse después de tiempo o la dosis puede reducirse proporcionalmente o incrementarse como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en la forma de dosis

unitaria para la fácil administración y la uniformidad de la dosis. La forma de dosis unitaria como se usa en este documento se refiere a unidades fisiológicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos mamíferos a tratarse, cada unidad conteniendo una cantidad predeterminada del compuesto activo calculado para producir el efecto deseado terapéutico en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosis unitaria se dicta por y depende directamente de (a) las características únicas del anticuerpo anti-CCR2 o la porción del mismo y el efecto profiláctico o terapéutico particular a lograrse y (b) las limitaciones inherentes en la técnica para la sintetización de dicho anticuerpo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

10

Un rango no limitante ejemplarizador para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de un anticuerpo o porción de anticuerpo es 0.025 a 50 mg/kg, 0.1 a 50 mg/kg, 0.1-25, 0.1 a 10 o 0.1 a 3 mg/kg. En un caso, el anticuerpo se administra en una formulación como una solución acuosa estéril que tiene un pH que oscila desde aproximadamente 5.0 a aproximadamente 6.5 y comprendiendo de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml del anticuerpo, de aproximadamente 1 milimolar a aproximadamente 100 milimolares de estabilizador de histidina, de aproximadamente 0.01 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml de polisorbato 80 o polisorbato 20, de aproximadamente 100 milimolares a aproximadamente 400 milimolares de un azúcar de no reducción seleccionado de pero no limitado a trehalosa o sacarosa, de aproximadamente 0.01 milimolar a aproximadamente 1.0 milimolar de dihidrato de EDTA disódica y opcionalmente comprende un antioxidante farmacéuticamente aceptable además de un agente de quelación. Los antioxidantes apropiados incluyen pero no se limitan a metionina, tiosulfato de sodio, catalasa y platino. Por ejemplo, la composición puede contener metionina en una concentración que oscila de 1 mM a aproximadamente 100 mM, y en particular, es aproximadamente 27 mM. En algunos casos, una formulación contiene 5 mg/ml del anticuerpo en un estabilizador de 20 mM de citrato de sodio, pH 5.5, 140mM NaCl, y 0.2 mg/ml polisorbato 80. Es para notarse que los valores de dosis pueden variar con el tipo y severidad de la condición a aliviarse. Además se entiende que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosis

15

20

25



específicas deben ajustarse con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones y que los rangos de dosis establecidos en este documento son ejemplarizadores solamente y no se intenta que limiten el alcance y la práctica de la composición reclamada.

5

Otro aspecto proporciona equipos que comprenden un anti-CCR2 o la porción de unión al antígeno o una composición que comprende dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. Un equipo puede incluir además del anticuerpo o composición, los agentes terapéuticos o de diagnóstico. Un equipo también puede incluir instrucciones para usarse en un método de diagnóstico o terapéutico, así como material de empaque tal como pero no limitado a, hielo, hielo seco, STYROFOAM<sup>TM</sup>, espuma, plástico, celofán, envoltura encogida, envoltura de burbujas, cartoncillo y maní de almidón. En un caso, el equipo incluye el anticuerpo o una composición que lo comprende y un agente de diagnóstico que puede usarse en un método descrito en este documento. En aún otro caso, el equipo incluye el anticuerpo o una composición que lo comprende y uno o más agentes terapéuticos que pueden usarse en un método descrito en este documento.

Se proporcionan composiciones y equipos para inhibición del cáncer en un mamífero que comprenden una cantidad de un anticuerpo en combinación con una cantidad de un agente quimioterapéutico, en donde las cantidades del compuesto, sal, solvato o profármaco y del agente quimioterapéutico son efectivas juntas en la inhibición del crecimiento celular anormal. Muchos agentes quimioterapéuticos son actualmente conocidos en la técnica. En algunos casos, el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste de inhibidores mitóticos, agentes de alquilación, anti-metabolitos, antibióticos de intercalación, inhibidores de la quimioquina, inhibidores del ciclo celular, enzimas, inhibidores topoisomerasa, modificadores de la respuesta biológica, anti-hormonas, *por ejemplo* anti-andrógenos y agentes anti-angiogénesis.

### Métodos de Diagnóstico de Uso

En otro aspecto, se proporcionan métodos de diagnóstico. Los anticuerpos anti-CCR2 pueden usarse para detectar el CCR2 en una muestra biológica *in vitro* o *in vivo*. En un caso, se proporciona un método para diagnosticar la presencia o localizar una célula de la expresión CCR2 en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo las etapas de inyectar el anticuerpo en el sujeto, determinando la expresión de CCR2 en el sujeto mediante la localización en donde el anticuerpo se ha unido, comparando la expresión en el sujeto con esa de un sujeto de referencia normal o estándar y diagnosticando la presencia o ubicación de las células. Los anticuerpos anti-CCR2 también pueden usarse como un marcador de la inflamación y/o para la infiltración de las células inmune, tales como monocitos en un tejido.

Los anticuerpos anti-CCR2 pueden usarse en una inmunopruueba convencional, incluyendo sin limitación una ELISA, una citometría de flujo, una RIA, inmunohistoquímica de tejido, hibridación Western o inmunoprecipitación. Los anticuerpos anti-CCR2 pueden usarse para detectar el CCR2 de humanos. En otro caso, los anticuerpos anti-CCR2 pueden usarse para detectar el CCR2 de monos cinomolgos o monos rhesus. En otro caso, los anticuerpos anti-CCR2 pueden usarse para detectar el CCR2 de roedores, tales como ratas y ratones.

También se proporciona un método para detectar el CCR2 en una muestra biológica que comprende contactar la muestra biológica con un anticuerpo anti-CCR2 y detectar el antígeno de unión. En un caso, el anticuerpo anti-CCR2 se marca directamente con un marcador detectable. En otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 (el primer anticuerpo) no se marca y un segundo anticuerpo u otra molécula que puede unirse al anticuerpo anti-CCR2 se marca. Como es bien sabido por un experto en la técnica, un segundo anticuerpo se selecciona que es capaz de unirse específicamente a las especies particulares y la clase del primer anticuerpo. Por ejemplo, si el anticuerpo anti-CCR2 es un IgG de humano, entonces el anticuerpo secundario podría ser un anti-humano-IgG. Otras moléculas que pueden unirse a los anticuerpos incluyen sin limitación Proteína

A y Proteína G, ambas de las cuales están disponibles comercialmente, por ejemplo en Pierce Chemical Co.

Los marcadores apropiados para el anticuerpo o el anticuerpo secundario se han descrito  
5 supra e incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales  
luminiscentes y materiales reactivos. Los ejemplos de enzimas apropiadas incluyen peroxidasa de  
rábano picante, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, o acetilcolinasterasa; ejemplos de complejos  
del grupo prostético incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales  
fluorescentes incluyen umbelliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina,  
10 diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material  
luminiscente incluye luminol, y ejemplos del material radioactivo apropiado incluyen  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  o  $^3\text{H}$ .

En otros casos, el CCR2 puede probarse en una muestra biológica por una  
inmunopruera de competición usando los CCR2 estándares marcados con una sustancia  
15 detectable y un anticuerpo anti-CCR2 no marcado. En esta prueba, la muestra biológica, los CCR2  
estándares marcados y el anticuerpo anti-CCR2 se combinan y se determina la cantidad de CCR2  
estándar marcado unido al anticuerpo no marcado. La cantidad de CCR2 en la muestra biológica  
es inversamente proporcional a la cantidad de CCR2 estándar marcado unido al anticuerpo anti-  
CCR2.

20

Se pueden usar las inmunopuebas anteriormente descritas para un número de  
propósitos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CCR2 pueden usarse para detectar el CCR2 en  
células cultivadas. En un caso, los anticuerpos anti-CCR2 se usan para determinar la cantidad de  
CCR2 en la superficie de las células que se han tratado con varios compuestos. Este método  
25 puede usarse para identificar los compuestos que modulan los niveles de proteína CCR2. De  
acuerdo a este método, una muestra de células se trata con un compuesto de prueba para un  
periodo de tiempo mientras otra muestra se deja sin tratar. Si la expresión CCR2 total es para  
medirse, las células se lisan y la expresión de CCR2 total se mide usando una de las

inmunopruebas descritas en este documento. La expresión CCR2 total en las tratadas en contra de las células no tratadas se compara para determinar el efecto del compuesto de prueba.

Una inmunoprueba preferida para medir la expresión CCR2 total es la citometría de flujo o la inmunohistoquímica. Si la expresión CCR2 de la superficie celular es para medirse. Las células no se lisan y los niveles de la superficie celular de los CCR2 se miden usando una de las inmunopruebas descritas en este documento. Una inmunoprueba preferida para determinar los niveles de superficie celular de CCR2 incluye las etapas de marcación de las proteínas de la superficie celular con un marcador detectable, tal como biotina o  $^{125}\text{I}$ , inmuno precipitando el CCR2 con un anticuerpo anti-CCR2 y posteriormente detectando el CCR2 marcado.

Otra inmunoprueba para determinar la localización de CCR2, *por ejemplo*, los niveles de superficie celular es mediante usar la inmunohistoquímica. Una inmunoprueba para detectar los niveles de superficie celular de CCR2 incluye la unión de un anticuerpo anti-CCR2 marcado con una fluorofora apropiada, tal como fluoresceína o ficoeritrina y detectar el anticuerpo primario usando citometría de flujo. En otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 no se marca y un segundo anticuerpo u otra molécula que puede unirse al anticuerpo anti-CCR2 se marca. Los métodos tales como ELISA, RIA, citometría de flujo, hibridación Western, inmunohistoquímica, marcación de la superficie celular de las proteínas membrana integrales y la inmunoprecipitación son bien conocidos en la técnica. Ver, *por ejemplo*, Harlow y Lane, supra. Además, las inmunopruebas pueden escalarse ascendentemente para el análisis completo alto para probar un gran número de compuestos ya sea por activación o inhibición de CCR2.

Los anticuerpos anti-CCR2 también pueden usarse para determinar los niveles de CCR2 en un tejido o en las células derivadas del tejido. En algunos casos, el tejido es un tejido enfermo. En algunos casos, el tejido es una biopsia de tejido. En algunos casos del método, un tejido o una biopsia del mismo se extirpa de un paciente. El tejido o biopsia posteriormente se usa en una inmunoprueba para determinar, *por ejemplo*, la expresión de CCR2 total, los niveles de superficie

celular de CCR2 o la localización de CCR2 por los métodos anteriormente descritos. Dichos métodos pueden usarse para determinar si un tejido expresa los altos niveles de CCR, que podrían ser indicativos de que el tejido es un blanco para el tratamiento con el anticuerpo anti-CCR2.

- 5 Los anticuerpos también pueden usarse *in vivo* para identificar los tejidos y órganos que expresan CCR2. En algunos casos, los anticuerpos anti-CCR2 se usan para identificar las células que expresan el CCR2.

El método comprende las etapas de administrar un anticuerpo anti-CCR2  
10 detectablemente marcado o una composición que los comprende a un paciente en necesidad de dicha prueba de diagnóstico y someter al paciente a análisis de imágenes para determinar la ubicación de los tejidos que expresan CCR2. El análisis de imágenes es bien conocido por el médico de la técnica e incluye sin limitación, análisis de rayos X, imágenes de resonancia magnética (IRM), o tomografía computarizada (TC). El anticuerpo puede marcarse con cualquier  
15 agente apropiado para la formación de imágenes *in vivo*, por ejemplo un agente de contraste, que puede usarse para el análisis de rayos X o un agente de contraste magnético, tal como un quelato gadolinio, que puede usarse para la IRM o TC. Otros agentes de marcado incluyen sin limitación radioisótopos, tal como <sup>99</sup>Tc. En otro caso, el anticuerpo anti-CCR2 no se marcará y se formarán  
imágenes mediante la administración de un segundo anticuerpo u otra molécula que es detectable  
20 y que puede unirse al anticuerpo anti-CCR2. En otro caso, una biopsia se obtiene del paciente para determinar si el tejido de interés expresa CCR2.

En algunos casos, el anti-CCR2 detectablemente marcado comprende una fluorofora. En ciertos casos, la fluorofora se selecciona del grupo que consiste de un tinte fluorescente infrarrojo  
25 cercano, finitrofenilo, fluoresceína y derivados de los mismos, rodamina, derivados de rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído y fluorecamina, TEXAS RED™, RHODAMINE GREEN™, OREGON GREEN™, CASCADE BLUE™, ficoeritrina, CY3™, CY5™, CY2™, CY7™, coumarina, infrarrojo 40, MR 200, IRD 40, ALEXA FLUOR™, Tetrametilrodamina, PACIFIC

BLUE<sup>TM</sup>, SYBR<sup>TM</sup>, y BODIPY<sup>TM</sup>. En otro caso, la fluorofora incluye uno de los siguientes compuestos con su máxima emisión indicada en nm en paréntesis, CY2<sup>TM</sup> (506), GFP (Rojo Intercambiado) (507), YO-PRO®-1 (509), YOYO®-1 (509), Calceína (517), FITC (518), FLUORX® (519), ALEXA® (520), Rodamina 110 (520), 5-FAM (522), OREGON GREEN® 500 (522), OREGON GREEN® 488 (524), RIBOGREEN® (525), RHODAMINE GREEN® (527), Rodamina 123 (529), MAGNESIUM GREEN® (531), CALCIUM GREEN® (533), TO-PRO®-1 (533), TOTO®-1 (533), JOE (548), BODIPY® 530/550 (550), Dil (565), BODIPY® (568), BODIPY® 558/568 (568), BODIPY® 564/570 (570), CY3® (570), ALEXA® 546 (570), TRITC (572), MAGNESIUM ORANGE® (575), Ficoeritrina R&B (575), Rodamina Faloidina (575), CALCIUM ORANGE® (576), Pironina Y (580), Rodamina B (580), TAMRA (582), RHODAMINE RED® (590), CY3.5® (596), ROX (608), CALCIUM CRIMSON<sup>TM</sup> (615), ALEXA® 594 (615), TEXAS RED<sup>TM</sup> (615), Rojo Nilo (628), YO-PRO®-3 (631), YOYO®-3 (631), R-ficocianina (642), C-ficocianina (648), TO-PRO®-3 (660), TOTO®-3 (660), DiD DiIC(5) (665), CY5<sup>TM</sup> (670), Tiadicarbocianina (671) y Cy5.5<sup>TM</sup> (694).

#### Métodos Terapéuticos de Uso

En otro aspecto, se proporcionan métodos para inhibir la actividad CCR2 mediante administrar un anticuerpo anti-CCR2 a un paciente en necesidad del mismo. Cualquiera de los tipos de anticuerpos descritos en este documento puede usarse terapéuticamente. En varios casos, el anticuerpo anti-CCR2 es un anticuerpo de humano, quimérico o humanizado. En algunos casos, el anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo, se une al primero y/o segundo bucle extracelular del CCR2. El anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo, de preferencia no se une al tercer bucle extracelular o al dominio N-terminal de CCR2.

En aún otro caso, el CCR2 es de humano y el paciente es un paciente humano. Alternativamente, el paciente puede ser un mamífero que expresa un CCR2 que se reticula con el anticuerpo anti-CCR2: El anticuerpo puede administrarse a un mamífero no humano que expresa CCR2 con el cual el anticuerpo reticula para propósitos veterinarios o como un modelo animal de

enfermedad de humano. Dichos modelos animales pueden ser útiles para la evaluación de la eficacia terapéutica de los anticuerpos.

En un aspecto, se proporcionan métodos para tratar, ayudar en el tratamiento, prevenir o  
5 ayudar en la prevención de una enfermedad mediada por CCR2, en un sujeto mediante la  
administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-CCR2.  
Como se usa en este documento, el término “una enfermedad CCR2-mediada” se intenta que  
incluya enfermedades y otras enfermedades en las cuales la presencia de altos niveles de la  
expresión o actividad de CCR2 en un sujeto que sufre de una enfermedad se ha demostrado o se  
10 sospecha que son, responsables de la patofisiología de la enfermedad o un factor que contribuye a  
que empeore la enfermedad. Dichas enfermedades pueden evidenciarse, por ejemplo, por un  
incremento en los niveles de CCR2 en la superficie celular en las células o tejidos afectados de un  
sujeto que sufre de la enfermedad, o mediante un incremento en una actividad mediada por CCR2  
en un tipo celular, tal como un basófilo, monocito o linfocito, que contribuye a la patología de la  
15 enfermedad o que contribuye al empeoramiento de la enfermedad o mediante un incremento en el  
nivel de los ligandos CCR2, tal como MCP-1, en un sitio inflamatorio. El incremento en la expresión  
CCR2 puede detectarse, por ejemplo usando un anticuerpo anti-CCR2. Un incremento en la  
actividad CCR2 puede detectarse por un incremento en la activación de la proteína G, la  
polimerización de F-actina o la quimiotaxis incrementada de las células que expresan CCR2, tal  
20 como quimiotaxis en respuesta a MCP-1 u otros ligandos CCR2.

En un aspecto, la enfermedad CCR2 mediada se caracteriza por la fibrosis. El término  
“fibrosis” como se usa en este documento se refiere a una condición patológica caracterizada por la  
deposición excesiva y metabolismo del material fibrótico (es decir, matriz extracelular) en respuesta  
25 al daño del tejido. En muchos casos, la fibrosis representa un proceso de reparación normal (es  
decir, curación de la herida) que está avanzando mal debido al insulto del tejido excesivo o crónico  
que conduce a la acumulación de colágeno y la proliferación y activación celular de estrella o del  
fibroblasto. Las condiciones de fibrosis incluyen enfermedades fibroproliferativas que se asocian

con las enfermedades vasculares, tales como la enfermedad cardíaca, la enfermedad cerebral y la enfermedad vascular periférica, así como todos los tejidos principales y los sistemas orgánicos tales como ojo, piel, riñón, pulmón, intestino e hígado (Wynn, *Nature Reviews* 4:583-594 (2004); Bataller, R y Brenner, D., *J. Clin. Invest.* 115:209-218 (2005)). Otras fuentes son fármacos quimioterapéuticos, fibrosis inducida por radiación y lesiones y quemaduras. Mientras las condiciones de la fibrosis cubren un amplio grupo de patologías, se cree que para la mayoría de estas condiciones, los mecanismos generales que conducen a la acumulación del tejido fibrótico tienen muchos elementos en común. Comúnmente la condición es iniciada en respuesta a un influjo de las células inflamatorias y perpetuadas por las rutas de señalización de la citoquina subsecuente entre las células de infiltración (por ejemplo, células T, macrófagos) y las células residentes dentro del tejido (por ejemplo células Kupffer o miofibroblasto, de estrella). Por ejemplo, MCP-1 ha demostrado que juega un rol en varias enfermedades de los pulmones (Rose CE Jr, Sung SS, Fu SM. *Microcirculation* 10:273-288 (2003)) y los ratones deficientes de CCR2 se protegen del desarrollo de fibrosis pulmonar (Moore BB, et al. Protection from Pulmonary Fibrosis in the Absence of CCR2 Signaling. *J. Immunol.* 167: 4368-4377 (2001)), sugiriendo un rol clave de este receptor en los pulmones. Similarmente, los pericitos son un tipo de célula fibrogénica clave en el desarrollo de esclerodema e inhibidores de la cinasa tirosina del receptor PDGF (RTKI) han demostrado que disminuyen la proliferación de pericitos y suprimen las lesiones de la piel en pacientes con esta enfermedad progresiva. En el riñón, la infiltración de leucocitos juega un rol principal en la mediación de la inflamación túbulo-intersticial y la fibrosis en la enfermedad de riñón crónica. Vielhauer y sus colegas establecieron que en un modelo de ratón de nefropatía obstructiva, la expresión de CCR2 y CCR5 en la acumulación de macrófagos y linfocitos CD3<sup>+</sup> se correlaciona con la fibrosis progresiva en sitios de daño al tejido (Vielhauer V, et al. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12:1173-1187 (2001)).

25

Como se usa en este documento, el término "fibrosis" también se usa en forma de sinónimo con "deposición de colágeno y acumulación de fibroblasto". Los fibroblastos son células de tejido conectivo, que se dispersan en el tejido conectivo a través del cuerpo. Los fibroblastos



secretan una matriz extracelular no rígida que contiene el colágeno tipo I y/o tipo III. En respuesta a una lesión a un tejido, los fibroblastos cercanos o las células de estrella migran dentro de la herida, proliferan y producen grandes cantidades de matriz extracelular de colágeno. El colágeno es una proteína fibrosa rica en glicina y prolina que es un componente principal de la matriz extracelular y el tejido conectivo, el cartílago y el hueso. Las moléculas de colágeno son estructuras de hebras triples helicoidales llamadas  $\alpha$ -cadenas, que se enredan alrededor de cada una de la hélice como tira. El colágeno sale en varias formas o tipos, de estos, el tipo I, el más común, se encuentra en la piel, el tendón y el hueso y el tipo III encontrado en la piel, los vasos sanguíneos y los órganos internos. Las condiciones ejemplarizadoras de la fibrosis incluyen pero no se limitan a enfermedades pulmonares asociadas con la fibrosis, por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis inducida por radiación, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), escleroderma, fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, asma crónica, silicosis, fibrosis pulmonar inducida por asbestos, lesión pulmonar aguda y diestrés respiratorio agudo (incluyendo neumonía bacterial inducida, trauma inducido, neumonía viral inducida, inducida por ventilador, sépsis no pulmonar inducida y aspiración inducida); nefropatías crónicas asociadas con lesión/fibrosis (fibrosis del riñón), por ejemplo, lupus, diabetes, escleroderma, nefritis glomerular, esclerosis glomerular de segmento focal, nefropatía IgA, hipertensión, aloinjerto, Lupus y Alport, fibrosis intestinal, por ejemplo, escleroderma y fibrosis intestinal inducida por radiación; fibrosis del hígado, por ejemplo, cirrosis, fibrosis de hígado inducida por el alcohol, esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), lesión al conducto biliar, cirrosis biliar primaria, infección o fibrosis de hígado inducida viral (por ejemplo, infección VHC crónica), y hepatitis autoinmune; fibrosis del cuello y cabeza, por ejemplo, radiación inducida; cicatrización corneal, por ejemplo, LASIX™, trasplante corneal y traceculectomía, cicatrización hipertrófica y queloides, por ejemplo, quemadura inducida y quirúrgica y otras enfermedades fibróticas, por ejemplo, sarcoidosis, escleroderma, lesión a la médula espinal/fibrosis, mielofibrosis, restenosis vascular, arterioesclerosis, granulomatosis de Wagner, enfermedad mezclada del tejido conectivo y enfermedad de Peirorie.

En un aspecto, la enfermedad CCR2-mediada se caracteriza por la inflamación patológica. El término "inflamación patológica" como se usa en este documento se refiere a una inflamación inapropiada y/o crónica asociada con las enfermedades incluyendo pero no limitadas a asma, arterioesclerosis, demencia por SIDA, diabetes, enfermedad del colon irritable, artritis reumatoide, rechazo del transplante, enfermedad de rechazo de injerto por el huésped, esclerosis múltiple (especialmente para inhibir la demielinación adicional), tumores, metástasis tumoral, nefritis, dermatitis atópica, soriasis, isquemia al miocardio and prostatitis crónica, obesidad, síndrome metabólico. Dicha inflamación se caracteriza por una respuesta elevada de las células inflamatorias, incluyendo la infiltración de leucocitos. En el tiempo, dicha inflamación patológica comúnmente resulta en daño al tejido en la región de la inflamación inapropiada. Por consiguiente, se proporcionan métodos para tratar a un sujeto que tiene inflamación patológica comprendiendo la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo que se une a e inhibe el CCR2.

El anticuerpo o fragmentos de unión al antígeno del mismo, también pueden usarse para tratar las enfermedades en las cuales la activación del CCR2 mediante la unión de las quimioquinas, incluyendo MCP-1, MCP-2, MCP-3 y MCP-4, se implica.

Los anticuerpos anti-CCR2 antagonísticos o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos (*por ejemplo*, 4.40 y/o 4.9 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos) pueden usarse para tratar las enfermedades y condiciones alérgicas o inflamatorias incluyendo enfermedades alérgicas respiratorias tales como asma, rinitis alérgica, enfermedades pulmonares por hipersensibilidad, neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades pulmonares intersticiales (ILD), (*por ejemplo*, fibrosis pulmonar idiopática o ILD asociada con artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, espondilitis anquilosante, esclerosis sistémica, síndrome de Sjogren, polimiositis o dermatomiositis), enfermedad pulmonar obstructiva crónica, anafilaxias o respuestas a la hipersensibilidad; alergias a los fármacos (*por ejemplo*, a penicilina, cefalosporinas), alergias a piquetes de insectos, enfermedades de inflamación del intestino, tales como enfermedad de Crohn

y colitis ulcerativa, espondiloartropatías, escleroderma, soriasis y dermatosis inflamatoria tales como dermatitis, eczema, dermatitis atópica, dermatitis por contacto alérgico, urticaria, vasculitis (*por ejemplo*, necrosis, vasculitis por hipersensibilidad y cutánea).

5 Los anticuerpos anti-CCR2 antagonísticos o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos (*por ejemplo*, 4.40 y/o 4.9 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos) pueden usarse para tratar enfermedades autoinmunes. Los ejemplos de las enfermedades autoinmunes incluyen pero no se limitan a Enfermedad de Adisson, anemia hemolítica, síndrome de antifosfolípidos, artritis reumatoide, dermatitis, encefalomiелitis alérgica, glomerulonefritis, Síndrome  
10 de Goodpasture, Enfermedad de Graves, Esclerosis Múltiple, Miastenia Gravis, Neuritis, Oftalmia, Pénfigo Bulboso, Pénfigo, Poliendocrinopatías, Púrpura, Enfermedad de Reiter, Síndrome de la Persona Rígida, Tiroiditis Autoinmune, Lupus Sistémico Eritematoso, Inflamación Pulmonar Autoinmune, Síndrome de Guillain-Barre, diabetes mellitus dependiente de la insulina y enfermedad del ojo inflamatorio autoinmune.

15

En ciertos casos, la enfermedad autoinmune tratada con los anticuerpos anti-CCR2 antagonísticos es Artritis Reumatoide (AR). Una enfermedad TH1, la AR es una enfermedad autoinmune común de humanos con una prevalencia de aproximadamente 1% entre los caucásicos (Harris, B. J. *et al.*, 1997, En el Libro de Reumatología 898-932), actualmente  
20 afectando a 2.5 millones de americanos. La AR se caracteriza por la inflamación crónica de las coyunturas sinoviales mediante las células T activadas, los macrófagos y las células del plasma, conduciendo a una destrucción progresiva del cartílago articular. Es la forma más severa de la enfermedad de las coyunturas.

25

En aún otro aspecto, la enfermedad autoinmune tratada con los anticuerpos anti-CCR2 antagonísticos es la Esclerosis Múltiple (EM). La EM también es una enfermedad TH1, es la enfermedad de demielinación del sistema nervioso central (SNC) más común, afectando a 350,000 (0.1%) individuos en Norte América y 1.1 millones en todo el mundo. En general, la EM se

considera que es una enfermedad autoinmune mediada en parte por las células CD4 T proinflamatorias (Th1) y los monocitos que reconocen los polipéptidos mielina específicos en asociación con las moléculas clase II MHC expresadas en las células que presentan (APC) el antígeno (Ag).

5

Los anticuerpos anti-CCR2 antagonísticos o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos (*por ejemplo*, 4.40 y/o 4.9 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos) pueden usarse para tratar la diabetes mellitus dependiente de la insulina o tipo I de humano (DMID), una enfermedad caracterizada por la destrucción autoinmune de las células beta en las isletas pancreáticas de Langerhans. La reducción drástica de las células beta resulta en una inhabilidad para regular los niveles de glucosa en la sangre. En humanos un periodo presintomático largo precede al inicio de la diabetes. Durante este periodo existe una pérdida gradual de la función celular beta pancreática. El desarrollo de la enfermedad se implica por la presencia de los anticuerpos en contra de la insulina, la decarboxilasa del ácido glutámico y la tirosina fosfatasa IA2 (IA2).

10

15

Los anticuerpos anti-CCR2 antagonísticos o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos (*por ejemplo*, 4.40 y/o 4.9 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos) pueden usarse para tratar el dolor neuropático. Los ratones que carecen de CCR2 han demostrado que tienen dolor neuropático reducido (Abbadie *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EUA*. 100(13): 7947-52 (2003)). Como se usa en este documento, el término "dolor neuropático" significa el dolor resultante de lesión a un nervio. El dolor neuropático se distingue del dolor nociceptivo, el cual es el dolor causado por la lesión aguda al tejido involucrando los nervios pequeños cutáneos o los nervios pequeños en el músculo o el tejido conectivo. El dolor que involucra un mecanismo nociceptivo usualmente se limita en duración al periodo de reparación del tejido y generalmente se alivia por los agentes analgésicos disponibles u opiáceos como se describe en Myers, *Regional Anesthesia* 20:173-184 (1995). El dolor neuropático típicamente es de gran duración o crónico y comúnmente se desarrolla en días o meses siguiendo a una lesión inicial aguda del tejido. El dolor neuropático

20

25

puede involucrar dolor espontáneo, persistente así como alodinia, que es una respuesta dolorosa a un estímulo que normalmente no es doloroso. El dolor neuropático también puede caracterizarse por hiperalgesia, en la cual existe una respuesta acentuada a un estímulo doloroso que usualmente es trivial, tal como el pinchazo de un alfiler.

5

Los anticuerpos anti-CCR2 antagonísticos son útiles en aliviar el dolor neuropático resultado de una enfermedad del nervio periférico, los ganglios de la raíz dorsal, médula espinal, tallo cerebral, tálamo o corteza. El método es útil en aliviar el dolor neuropático independientemente de la etiología del dolor. Por ejemplo, un método puede usarse para aliviar el dolor neuropático resultante de una enfermedad del nervio periférico tal como neuroma; compresión del nervio; aplastamiento del nervio, estrechamiento del nervio o transección incompleta del nervio; mononeuropatía o polineuropatía. Un método también puede usarse para aliviar el dolor neuropático resultante de una enfermedad tal como compresión de los ganglios de la raíz dorsal; inflamación de la médula espinal; contusión, tumor o semisección de la médula espinal; tumores del tallo cerebral, tálamo o corteza o trauma del tallo cerebral, tálamo o corteza.

Los anticuerpos anti-CCR2 antagonísticos o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos (*por ejemplo*, 4.40 y/o 4.9 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos) también pueden usarse para tratar la arterioesclerosis. La placa de arterioesclerosis se desarrolla en varias décadas e involucra la infiltración celular inflamatoria, la proliferación celular del músculo liso, la acumulación de la matriz extracelular, la formación de capas fibrosas y la angiogénesis. (Bayes-Genis *et al. Circ. Res.* 86:125-130 (2000)). La quimiotaxis está involucrada en el desarrollo temprano de la arterioesclerosis. Las poblaciones celulares migran hacia la parte interna de la pared celular y originan la neo-íntima que conduce a la formación de una placa arterioesclerótica. Por ejemplo la quimiotaxis de monocitos se induce por la proteína 1 quimio-atrayente de monocitos (MCP-1) que se expresa en forma temprana en el desarrollo de la arterioesclerosis en la pared arterial dañada (Furukawa *et al. Circ. Res.* 84:306-314 (1999); Han *et al. J. Lipid Res.* 40:1053 (1999)). La trasplantación de la médula espinal de CCR2  $-/-$  ratón, pero no de CCR2  $+/+$  ratón, en

ratones ApoE3-Leiden, una hebra de ratón susceptible a la arterioesclerosis inducida por la dieta, disminuye la arteriogénesis, sugiriendo que la señalización MCP-1 a través del CCR2 contribuye a la arterioesclerosis (Guo et al. (2003) *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*;23(3):447-53). Por consiguiente, los anticuerpos CCR2 antagonistas y en particular los anticuerpos antagonistas que se unen al primer y/o segundo bucle extracelular de CCR2 pueden administrarse a un sujeto para reducir la incidencia de, para tratar o para ayudar en el tratamiento de la arterioesclerosis.

Los anticuerpos anti-CCR2 antagonísticos o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos (*por ejemplo*, 4.40 y/o 4.9 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos) también pueden usarse para tratar la obesidad. En la obesidad, el tejido adiposo se ha demostrado que contiene grandes números de monocitos. Estos monocitos pueden contribuir a la deposición de grasa o el desarrollo de varias secuelas comúnmente asociadas con el síndrome metabólico comúnmente llamado obesidad. El síndrome metabólico incluye dichas alteraciones como el desarrollo de la diabetes.

Los anticuerpos anti-CCR2 antagonísticos o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos (*por ejemplo*, 4.40 y/o 4.9 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos) pueden usarse también para tratar la estenosis o restenosis de la vasculatura, particularmente de las arterias, *por ejemplo*, las arterias coronarias tales como la estenosis y restenosis que resultan de la intervención vascular (*por ejemplo*, intervención mecánica, terapéutica o quirúrgica), así como la hiperplasia neo-intima. Por ejemplo, restenosis que típicamente produce un estrechamiento de la abertura del lumen del vaso que resulta de la lesión vascular incluyendo pero no limitada a esa producida por los procedimientos de injertos vasculares, angioplastia, incluyendo angioplastia perforada por balón, arterioctomía, láser u otro método apropiado (*por ejemplo*, angioplastia coronaria trans-lumen percutánea ACTP)), colocación del tubo delgado en la vena (*por ejemplo*, colocación del tubo delgado endovascular biológica o mecánica), procedimientos de derivación vascular o combinaciones de los mismos, así como otros procedimientos usados para tratar los vasos sanguíneos ocluidos o estenóticos.

245

Los anticuerpos anti-CCR2 antagonísticos o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos (*por ejemplo*, 4.40 y/o 4.9 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos) pueden usarse también para tratar el rechazo al trasplante (*por ejemplo*, en la trasplantación), incluyendo el rechazo al aloinjerto o enfermedad del huésped en contra del injerto y arterioesclerosis asociada con el trasplante.

Los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno que son antagonistas de CCR2 pueden usarse como terapéuticos para la infección de VIH. VIH-1 y VIH-2 son los agentes etiológicos del síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida (SIDA) en humanos. El SIDA resulta en parte de la disminución exagerada de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en los individuos infectados con VIH. El VIH-1 infecta primeramente a los linfocitos T, monocitos/macrófagos, células dendríticas y en el sistema nervioso central, la microglía. Todas de estas células expresan la glicoproteína CD4, que sirve como un receptor para el VIH-1 y VIH-2. La entrada eficiente del VIH en contacto con las células blanco es dependiente de la unión de la glicoproteína del sobre exterior viral, gp120 para el dominio CD4 amino terminal.

Por lo tanto, el CCR2 ha demostrado que actúa como un co-receptor del VIH-1 (Frade *et al.* (1997) *J Clin Invest.*;100(3):497-502). Después de la unión del virus, las glicoproteínas del sobre VIH-1 median la fusión de las membranas celulares del huésped y virales para completar el proceso de entrada. La fusión de la membrana dirigida por las glicoproteínas del sobre del VIH-1 expresadas en la superficie de la célula infectada conduce a la célula—fusión celular, resultante en sincitio.

Los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno de los mismos que son antagonistas del CCR2 pueden usarse como terapéuticos para el tratamiento de una variedad de condiciones oftalmológicas incluyendo la Degeneración Macular Relacionada con la Edad (DMRE), Uveítis e Infecciones Corneales.

### Degeneración Macular Relacionada con la Edad (DMRE)

El CCR2 ha demostrado que juega un rol en el reclutamiento de macrófagos en el desarrollo de la neovascularización coroidal (NVC) que se observa en los pacientes con degeneración macular relacionada con la edad, así como en las estrías angioides, miopía alta, 5 pacientes con histoplasmosis ocular (Tsutsumi, C. et al. *Journal of Leukocyte Biology* 74:25-32, 2003).

### Uveítis

Una asociación entre los polimorfismos de nucleótidos simples de CCR2 y sus ligando 10 (MCP-1) se ha demostrado en pacientes con uveítis anterior idiopática aguda (Yeo, TK, et al. *Cytokine* 35:29-35 2006) y uveítis de segmento posterior inmune mediada idiopática (Ahad, MA, et al. *Mol Vis* 13:388-396 2007)

### Infecciones Corneales (bacteriales):

15 El CCR2 ha demostrado que juega un rol en la regulación del reclutamiento de los neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) durante la infección corneal (Xue, M. L, et al. *Immunology and Cell Biology* 85:525-531 2007). Mientras los PMNs son esenciales para eliminar las bacterias y promover la curación de la herida en la córnea, la persistencia de estas células puede resultar en enfermedad inflamatoria crónica.

20 Los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno de los mismos que son antagonistas del CCR2 pueden usarse como terapéuticos para el tratamiento de una variedad de tumores sólidos y cánceres, incluyendo leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, mieloma múltiple, mieloma maligno, enfermedad de Hodgkin y carcinomas de la próstata, vejiga, 25 mama, cervix, colon, pulmón, hígado o cánceres o tumores sólidos del estómago.



### Cáncer de Próstata

El MCP-1 ha demostrado que actúa como un factor paracrino y autocrino para el crecimiento e invasión del cáncer de próstata (Lu, Y. et al. *The Prostate* 66:1311-1318, 2006) y la expresión CCR2 ha demostrado que se correlaciona con el progreso del cáncer de próstata (Lu, Y. et al. *Journal of cellular biochemistry* 101:676-685, 2007). La liberación sistémica de los anticuerpos anti-MCP-1 para neutralización ha demostrado que induce la regresión del tumor de cáncer de próstata en ratones (Loberg, R. D., *Cancer Res* 67:9417-9424 2007).

### Cáncer de Mama

Los macrófagos asociados con los tumores se cree que juegan un rol crítico en la supervivencia y desarrollo inmune del tumor y la activación y reclutamiento de los linfocitos se regulan por las quimioquinas incluyendo MCP-1. Una asociación significativa se ha demostrado para el polimorfismo CCR2 en el cáncer de mama (Zafiropoulos, A., N. et al. *Journal of medical genetics* 41:e59 2009). La ruta CCL2/CCR2 también ha demostrado que juega un rol giratorio en el reclutamiento de los cánceres, incluyendo el de mama, de ovarios y cánceres gástricos, de las células supresoras mieloides, que promueven la progresión del tumor, la angiogénesis y la vasculoangiogénesis (Huang, B., et al. *Cancer letters* 252:86-92, 2007).

### Melanoma

El bloqueo de la función MCP-1 también ha demostrado que inhibe el reclutamiento de los macrófagos asociados con el tumor y prevenir la angiogénesis tumoral y el crecimiento en el melanoma maligno en ratones (Koga, M. et al. *Biochemical and biophysical research communications* 365:279-284, 2008).

### Cáncer de Hígado

El bloqueo de CCR2 ha demostrado que reduce el tráfico de las células de estrella hepáticas, una fuente principal de la matriz de metaloproteínasa 2, que facilita la

neovascularización durante la formación del tumor del hígado (Yang, X. et al. *International journal of cancer* 118:335-345, 2006).

#### Cáncer Cervical

- 5 CCR2 ha demostrado jugar un rol en el reclutamiento del macrófago conduciendo a la angiogénesis del tumor en el desarrollo de la neoplasia cervical de las lesiones intrapiteliales escamosas (Coelho, A., et al. *Gynecologic oncology* 96:760-764, 2005; Coelho, A., et al. *Gynecologic and obstetric investigation* 64:208-212, 2007).

#### 10 Cáncer de Ovario

La ruta CCL2/CCR2 también ha demostrado jugar un rol giratorio en el reclutamiento para cánceres, incluyendo cánceres de ovario, mama y gástrico, de células supresoras mieloides, que promueven el progreso del tumor, angiogénesis y vasculoangiogénesis (Huang, B., et al. *Cancer letters* 252:86-92, 2007).

15

El anticuerpo puede administrarse una vez o múltiples veces. El anticuerpo puede administrarse de cuatro veces al día a una vez cada seis meses o más. La administración puede ser en una programación tal como tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez cada semana, una vez cada dos semanas, una vez cada mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses y una vez cada seis meses. El anticuerpo también puede administrarse continuamente vía una mini bomba. El anticuerpo puede administrarse vía una ruta mucosal, bucal, intranasal, inhalable, intravenosa, subcutánea, intramuscular, parenteral, intratumoral o tópica. El anticuerpo puede administrarse localmente o sistémicamente.

25

El anticuerpo puede administrarse una vez, al menos dos veces o por al menos u periodo de tiempo hasta que la condición se trate, sea paliativa o se cure. El anticuerpo generalmente se administrará como parte de una composición farmacéutica como se describió en este documento.

La dosis de anticuerpo generalmente estará en el rango de 0.1-100 mg/kg, 0.5-50 mg/kg, 1-20 mg/kg, o 1-10 mg/kg. La concentración en suero del anticuerpo puede medirse por cualquier método conocido en la técnica.

- 5 Los ejemplos posteriores son para ilustración solamente y no se construyen como limitantes del alcance en ninguna manera.

#### EJEMPLO 1

##### Generación de Hibridomas que Producen el Anticuerpo anti-CCR2

- 10 Se inmunizaron ratones XENORATÓN™ de ocho a diez semanas que producen anticuerpos IgG2 e IgG4 en sus plantas de los pies traseros con 300-19 células transfectadas con CCR2B (Genbank MN000648, SEQ ID NO:204) ( $10^7$  células/dosis/ratón en TITERMAX™ adyuvante de oro, Sigma, # de Catálogo T2684, lote # K1599; preparó 50/50 volumen). Los ratones recibieron cinco a nueve inyecciones supletorias en Adyuvante de Gel de Fosfato de
- 15 Aluminio (# de Catálogo 1452-250, lote #8937, HCl Bicsector (5ul/ratón/impulsor)) y qCpG (IMMUNEASY™ Adyuvante de Ratón) (# de Catálogo 303101; lote #11551249; Qiagen (15ul/ratón/impulsor)) en un periodo de tres a ocho semanas. Cuatro días antes de la fusión, a los ratones se les dio una inyección final en PBS. Los linfocitos del nodo de linfa y del bazo de los ratones inmunizados se coleccionaron y fusionaron con la línea celular P3-X63-Ag8.653 del
- 20 mieloma no secretor. Las células fusionadas se sometieron a la selección HAT como se describió previamente (Galfre y Milstein, *Methods Enzymol.* 73:3-46 (1981)). Se recuperó un panel de hibridomas todos secretando los anticuerpos de humano CCR2 específicos. Un número de anticuerpos se identificó para unirse al CCR2 como se probó por el análisis FACS. Los hibridomas se seleccionaron para estudio adicional, algunos de los cuales se listan en la Tabla 6.

25

Los hibridomas indicados en la Tabla 2 se depositaron bajo términos de acuerdo con el Tratado de Budapest con la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209. Los hibridomas se han asignado a los números de acceso siguientes:

Tabla 2

| Anticuerpo | Designación de la Línea Celular del Hibridoma de Ratón | Designación de la Hebra | Designación ATCC | Fecha de Depósito |
|------------|--------------------------------------------------------|-------------------------|------------------|-------------------|
| 4.9.3      | PF11-4.9.3                                             | LN 15923                | PTA-6979         | Sept. 16, 2005    |
| 4.22.3     | PF11-4.22.3                                            | LN 15924                | PTA-6980         | Sept. 16, 2005    |
| 4.40.3     | PF11-4.40.3                                            | LN 15925                | PTA-6981         | Sept. 16, 2005    |
| 7.123.1    | PF11-7.123.1                                           | LN 15931                | PTA-7341         | Ene. 25, 2006     |
| 8.19.1.1   | PF11-8.19.1.1                                          | LN 15932                | PTA-7342         | Ene. 25, 2006     |

EJEMPLO 2

Secuenciación de los Anticuerpos Anti-CCR2

Para analizar la estructura de los anticuerpos producidos, los ácidos nucleicos se clonaron los que codifican el dominio variable de cadena pesada y ligera que contienen fragmentos de hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales anti-CCR2. Las cadenas ligeras y las cadenas ligeras de los anticuerpos CCR2 se clonan y la secuencia se verifica como ejemplarizadora para el anticuerpo 4.40.2 como sigue:

Poli(A)<sup>+</sup> mARN se aisló usando un MINI EQUIPO RNEASY™ (Qiagen) y el cADN sintetizado del mARN con el equipo ADVANTAGE RT-para-PCR (BD Biosciences) usando oligo(dT) iniciación. El oligo(dT) cADN iniciado se amplificó para el clon 4.40.2 usando los iniciadores listados en la Tabla 3. La amplificación se logró usando la Polimerasa PFUULTRA ALTA-FIDELIDAD (Stratagene) y un PTC-200 ADN Engine (Búsqueda MJ) con ciclización como sigue: 2' a 95°C; 25X (20" a 95°C, 30" a 55°C, 30" a 72°C); 10' a 72°C. Los amplicones se clonaron en los vectores de expresión de cadena pesada y ligera. Los vectores posteriormente se transformaron en las células químicamente potentes EFFICIENCY DH5α (Invitrogen) usando el protocolo estándar. Los clones se secuenciaron verificando el uso de las Rejillas 16<sup>avo</sup> BDTv3.1/química dGTP (Applied Biosystems Inc) y un Analizador de ADN 3730xl (Applied Biosystems Inc). De las secuencias de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos predichos, el uso del gel se identificó para cada cadena de anticuerpos. Las alineaciones para el "directorio de secuencia Base V" (MRC Centre for Protein Engineering,

Cambridge, UK; Tomlinson, et al., J. Mol. Biol., 227, 776–798 (1992); Hum. Mol. Genet., 3, 853–860 (1994); EMBO J., 14, 4628–4638 (1995)) se produjeron usando los programas MACVECTOR™ y GENEWORKS™ (Oxford Molecular Group, Campbell, CA, EUA).

Tabla 3: Iniciadores de Dominio Variable Designados para la Amplificación 4.40.2 (5' para 3')

|                  |        |                                                |
|------------------|--------|------------------------------------------------|
| CCR2_440_VH_G2_F | VH3.30 | CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG<br>(SEQ ID NO:147)     |
| CCR2_440_VH_G2_R | JH3b   | GAAGAGACGGTGACCATTGTCCCTT<br>(SEQ ID NO:148)   |
| CCR2_440_VL_K_F  | A26    | GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGAC<br>(SEQ ID NO:149) |
| CCR2_440_VL_K_R  | JK4    | GTTTGATCTCCACCTTGGTCCCTC<br>(SEQ ID NO:150)    |

La Tabla 4 establece la utilización de los genes de los clones del anticuerpo hibridoma seleccionado.

Tabla 4

Uso del Gen de Cadena Ligera y Pesada

| Clon   | Línea Germinal de Cadena Pesada |                |                | Línea Germinal de Cadena Ligera Kappa |                |
|--------|---------------------------------|----------------|----------------|---------------------------------------|----------------|
|        | V <sub>H</sub>                  | D <sub>H</sub> | J <sub>H</sub> | V <sub>K</sub>                        | J <sub>K</sub> |
| 4.9.3  | VH3-30                          | D1-7           | JH3B           | O12                                   | JK2            |
| 4.22.3 | VH1-46                          | D1-7           | JH3B           | A1                                    | JK5            |
| 4.39.3 | VH1-46                          | D1-7           | JH3B           | B3                                    | JK1            |
| 4.40.3 | VH3-30                          | D1-7           | JH3B           | A26                                   | JK4            |

Los clones de hibridoma se generaron en los ratones Ig4 y una vez que las secuencias se obtuvieron, los dominios variables se clonaron en los vectores de expresión del formato IgG1, IgG2, e IgG4 para comparación.

EJEMPLO 3

Mutagénesis de los Anticuerpos Anti-CCR2

Reversión a la secuencia de la línea germinal en la región variable de cadena ligera

El residuo alanina en la posición 68 en la cadena ligera del CCR2 4.40.2 se reversionó al residuo de línea germinal, mediante la mutagénesis en sitio dirigida como sigue. El punto de mutación en el codón para el residuo 68 del aminoácido se cambió usando los iniciadores en la

5 Tabla 5. La mutagénesis en sitio dirigida se realizó usando un equipo de Mutagénesis en Sitio Dirigida QUIKCHANGE™ II (Stratagene) con el protocolo estándar incluyendo las modificaciones siguientes para la ciclización: 2' a 96°C; 16X (50" a 96°C, 10" a 68°C); 10' a 68°C. El vector mutagenizado se transformó en las células super competentes XL1-Azul. Para verificar que la mutagénesis fue exitosa, los clones se secuenciaron usando las Rejillas 16<sup>avo</sup> BDTv3.1/química

10 dGTP (Applied Biosystems Inc.) y un Analizador de ADN 3730xl (Applied Biosystems Inc.).

Tabla 5: Iniciadores de la Mutagénesis (5' a 3')

|                    |                                                         |
|--------------------|---------------------------------------------------------|
| CCR2_440_VK_G68A_F | GGCAGTGGATCTG <b>G</b> GACAGATTTCACC<br>(SEQ ID NO:151) |
| CCR2_440_VK_G68A_R | GGTGAAATCTGTC <b>C</b> CAGATCCACTGCC<br>(SEQ ID NO:152) |

\*El nucleótido cambiado está en negritas y subrayado.

El anticuerpo resultante se designó 4.40 A68G (SEQ ID NO:112), teniendo una glicina en la posición 68 de la región variable de cadena ligera.

Generación de la región constante de cadena pesada IgG4 con mutación de estabilización-horquilla

Las regiones constantes de cadena pesada IgG4 se aislaron de un vector de expresión IgG4 derivado pCON-G4(pro) (Lonza, Basel, Suiza), que tiene una mutación de estabilización de

25 región de horquilla de la línea germinal, Serina a Prolina en el aminoácido 230 (Angal, S. et al. *Molecular Immunology* 30:105-108 (1993)), en el contexto del alotipo IgG4 L309 (Brusco A. et al., *Eur J. Immunogenetics* 25:349-355 (1998)).

Una mutación silenciosa (Lys, AAG→AAA) se introdujo por la mutagénesis de PCR en el 11<sup>avo</sup> residuo de nucleótidos del exón G4 CH1 del vector pCON-G4(pro) para remover el sitio de reconocimiento Apal para facilitar la subclonación usando los siguientes iniciadores de amplificación:

5 G4\_Delantero

ttatgctgggcccagctctgtccacaccgcggtcacatggcaccacctctcttgaGCTTCCACCAAAGGCCCATCCGTC  
TTCCCCC (SEQ ID NO:153)

(Bases de hibridación en MAYÚSCULAS (mutación del residuo #11 de CH1 está en NEGRITAS);

Las base de No hibridación en minúsculas)

10 G4\_Inversa:

tcatattctctagaTCATTTACCCAGAGACAGGGAGAGG (SEQ ID NO:154)

(Bases de hibridación en MAYÚSCULAS. Las bases de No hibridación con el sitio XbaI en minúsculas)

15 La amplificación se logró usando la polimerasa Hi-Fi expandida (Roche) y un PTC-200 ADN ENGINE™ (MJ Research) con ciclización térmica como sigue: 3' a 95°C; 22X (20" a 95°C, 30" a 58°C, 2'10" a 72°C); 10' a 72°C.

20 Otra mutación silenciosa (Thr, ACC→ACA) se introdujo mediante la mutagénesis PCR en el residuo de nucleótidos 209 del exón G4 CH1 del vector pCON-G4(pro) para remover un sitio BstEII para facilitar el uso de esa enzima para la subclonación de las regiones variables en el vector de expresión usando los siguientes iniciadores:

G4delBst\_F

CAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCAG (SEQ ID NO:155)

25 G4delBst\_R

CTGCTGGAGGGCACTGTCAACCACGCTG (SEQ ID NO:156).

La amplificación se logró usando el Equipo de Mutagénesis Dirigida en Sitio QUIKCHANGE™ (Stratagene) y un PTC-200 ADN Engine (Búsqueda MJ) con ciclización térmica como sigue: 1' a 96°C; 14X (50" a 96°C, 15'48" a 68°C); 10' a 72°C.

5 La región constante IgG4 resultante que comprende la mutación de la región de horquilla y las dos mutaciones silenciosas, referidas como S230P, posteriormente se subclonó como un fragmento Apal/XbaI en los sitios Apal/XbaI de un vector de expresión del anticuerpo DHFR. La región variable de cadena pesada del anticuerpo 4.40.2 posteriormente se coló en el vector de expresión que comprende la región constante G4 S230P resultante en la construcción de cadena  
10 pesada de longitud completa. El anticuerpo 4.40 derivado que tiene la sustitución de la línea germinal A68G de la región variable de cadena ligera y la sustitución de la región de horquilla de cadena pesada S230P se designó 4.40 A68G S230P teniendo la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la SEQ ID NO:112 y la secuencia del aminoácido de la cadena pesada de la SEQ ID NO:116.

15 Los sobrenadantes de las células transfectadas con los vectores de expresión se colectaron y se purificaron mediante la cromatografía de afinidad de Proteína Estándar A para aislar las inmunoglobulinas recombinantes. Estas proteínas posteriormente se caracterizaron por SDS-PAGE, espectrofotometría y dispersión de luz.

20

#### EJEMPLO 4

##### Unión In vitro

La Figura 1 muestra la unión *in vitro* del anticuerpo conjugado AF-488 4.40 A68G S230P para los monocitos en la sangre completa (Figura 1A), para las células transfectadas CCR2 300-19  
25 (Figura 1B), y la unión de diferentes concentraciones del anticuerpo 4.40 A68G S230P para las células transfectadas CCR2 300-19 como se detectó con el PE anti-humano (Figura 1C). Brevemente, 1 millón de células en un volumen de 100ul se marcaron con el anticuerpo de prueba usando la Solución Salina Estabilizada de Fosfato de Dulbenco conteniendo 2% de Suero Bovino



Fetal y 0.002% de Azido de Sodio. Quince minutos más tarde, se agregó un anticuerpo de detección secundaria. Después de 30 minutos se lavó en estabilizador, se resuspendió en 500 ul y se analizó para marcado en un FACS CALIBUR. Un total de 10,000 eventos por tubo se analizaron. La intensidad de fluorescente de canal medio se analizó para cada concentración del anticuerpo como un indicador para la magnitud del marcado.

### EJEMPLO 5

#### Determinación de las Constantes de Afinidad ( $K_D$ ) de los Anticuerpos Anti-CCR2 Monoclonales

Para analizar el  $K_D$  de los anticuerpos para el CCR2, la unión del anticuerpo 300-19 a las células que expresan CCR2 se analizó por FACS en una prueba de 3 horas. Brevemente, usando un Solución Salina Estabilizada de Fosfato de Dulbenco conteniendo 2% del Suero de Bovino Fetal inactivado en calor, 0.002% de Azido de Sodio y 0.005 mg/ml de Citocalasina-B (Sigma 6762), 1 millón de células en un volumen de 100 ul se marcaron con el anticuerpo de prueba. Quince minutos más tarde, se agregó un anticuerpo de detección secundaria, fragmento R-Ficoeritrina conjugada Affini-pura F(ab') IgG H+L (Jackson 709-116-149) de Burro anti-humano. Los tubos se agitaron suavemente por 3 horas a temperatura ambiente. Después de 2 lavadas en estabilizador, las células se resuspendieron en 500 ul del estabilizador y se analizaron en un FACS CALIBUR™. Un total de 10,000 eventos por tubo se analizaron. La intensidad de fluorescente de canal medio se analizó para cada concentración del anticuerpo como un indicador para la magnitud del marcado. Estos estudios de unión demostraron que el anticuerpo 4.40 A68G S230P se une al CCR2 de humano en las células transfectadas con un  $K_D$  de 0.085 ug/mL (0.58nM) (Figura 2). Cuando la unión de saturación se analiza en las células que expresan un receptor quimera CCR2/CCR5 que tiene el primero y segundo bucle extracelular del CCR2 (ver el Ejemplo 7), una curva de concentración similar y  $K_D$  ( $K_D$  = 0.023 ug/mL (0.16nM)) se obtuvieron como se muestra en la Figura 6C.

## EJEMPLO 6

### Inhibición de la Quimiotaxis de MCP-1 inducida

Los anticuerpos anti-CCR de humano se evaluaron por su habilidad para inhibir la quimiotaxis de los monocitos THP-1 (ATCC # TIB 202), en respuesta al ligando CCR2, MCP-1 (CCL2). La quimiotaxis se llevó a cabo en cámaras de quimiotaxis de 96 pozos compradas en NeuroProbe, Inc. (Gaithersburg, MD) como previamente se describe (ver Gladue RP *et al.*, *J Biol Chem* 278:40473-40480 (2003)). Brevemente el CCR2 se diluyó en medio RPMI 1640 (Instituto Roswell Park Memorial) conteniendo 0.1% de BSA y posteriormente se agregó a los pozos inferiores de la cámara. Un filtro con poros de 5 de  $\mu\text{m}$  (Neuroprobe) se colocó entre los pozos inferiores y superiores de la cámara. Las células THP-1 posteriormente se agregaron a la cámara superior ( $8 \times 10^5$ ) en la presencia o ausencia de varias concentraciones de los anticuerpos de prueba. El aparato se incubó por 3 horas en una incubadora humidificadora con 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ . Después del periodo de incubación, las células de no migración se removieron de la cámara superior y la parte superior del filtro se humedeció. 2 mM de EDTA frío posteriormente se agregaron a los pozos superiores y la cámara de quimiotaxis se incubó a  $4^\circ\text{C}$  por 20 minutos. El EDTA posteriormente se removió y la placa de micro titulación de 96 pozos se centrifugó en  $800 \times g$  por 10 minutos. El filtro posteriormente se removió, el medio de cultivo se desechó y 0.2% de FDA se agregó a las placas. Las placas posteriormente se incubaron por 1.5 horas a  $37^\circ\text{C}$  hasta que se desarrolló un color amarillo. El número de células de migración se cuantificó mediante leer la intensidad del color en un lector de la placa de micro titulación en 490 nm. Como se muestra en la Tabla 6 se identifican varios anticuerpos que inhiben la quimiotaxis THP1 para diferentes grados.

259

Tabla 6: Inhibición de la Quimiotaxis THP-1 MCP-1 Inducida

| Clon del Anticuerpo | IC50 (ug/ml) |
|---------------------|--------------|
| 4.40.3              | 0.137        |
| 4.22.3              | 0.138        |
| 4.39.3              | 0.139        |
| 4.9.2               | 0.198        |
| 4.6.3               | 0.400        |
| 4.48.3              | 0.491        |
| 4.41.1              | 0.521        |
| 4.3.1               | 0.618        |
| 4.52.1              | 0.641        |
| 4.59.2              | 1.020        |
| 4.24.3              | 2.264        |

Similarmente, el anticuerpo 4.40 A68G S230P inhibió la quimiotaxis de los monocitos THP-1 en respuesta a MCP-1 (IC50 = 0.148 ug/ml) pero no el ligando CCR1/CCR5 MIP-1, como se muestra en la Figura 3.

Quimiotaxis de Monocitos Primarios

La sangre completa de humano heparinizada se colocó en capas sobre tubos ACCUSPIN HISTOPAQUE 1077 (Sigma; St. Louis, MO) y se giró descendentemente. La fracción de célula mononuclear se colectó y se lavó 3X con PBS, las células de glóbulos rojos (RBC's) se lisaron con agua y las células se resuspendieron en 4 x 10<sup>6</sup>/ml en RPMI (Gibco; Grand Isle, NY) con 0.1% BSA (Sigma) y 10 mM HEPES (Gibco). Las diluciones del anticuerpo o el control KLH se agregaron a 0.25 nM MCP-1 (Peprotech; Rocky Hill, NJ) y 30 ul se colocaron en el inferior de una cámara Boyden de 48 pozos (Neuroprobe; Gaithersburg, MD); el control negativo fue de medio solo. Un filtro de 5 um de PVP libre (Neuroprobe) se colocó sobre esta y la cámara se selló. Las células mononucleares aisladas se incubaron con las diluciones de anticuerpo o el control KLH por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 50 ul a los pozos superiores. La cámara se incubó por 90 minutos a 37°C en una incubadora humidificada a 5% de CO<sub>2</sub>. Después de la incubación, las células se aspiraron fuera de los pozos superiores, la parte superior del filtro

se humedeció, se secó al aire, se marcó con DIFF-QUIK™ (Dade-Behring; Newark, DE), y el número de células de migración en los 6 campos se contaron. La inhibición de la quimiotaxis de los monocitos de humano aislados primarios en respuesta al MCP-1 por el anticuerpo 4.40 A68G S230P se muestra en la Figura 4.

5

Además, como se ejemplifica con el anticuerpo 4.40, no se observó inhibición de las células THP-1 al ligando CCR1/CCR5 MIP-1a (Figura 3).

### EJEMPLO 7

#### 10 Construcción Quimera CCR2/CCR1

Los anticuerpos que inhiben la quimiotaxis MCP-1-inducida se probaron para la unión a las quimeras CCR2 para mapear sus epítopes. Esto se llevó a cabo mediante analizar la unión de los anticuerpos a las células 300-19 que expresan las diferentes quimeras del receptor que consisten el bucle extracelular (1<sup>ero</sup>, 2<sup>do</sup> y/o 3<sup>ro</sup>) y las sustituciones N-terminal de CCR2 con las porciones del CCR1 (M = CCR2, R = CCR1).

15

#### Construcción del receptor quimera MRRR

El receptor quimérico MRRR (N-término de CCR2 (M), 1<sup>ero</sup>, 2<sup>do</sup>, y 3<sup>er</sup> bucle extracelular de CCR1 (R) se construyó usando el equipo de mutagénesis en Sitio-Dirigida QUIKCHANGE® de Stratagene y los siguientes iniciadores de la mutagénesis para mutar el primer sitio de la enzima de restricción ApaL en el CCR1 de humano tipo salvaje, clonado en el vector de expresión pcADN3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) a un sitio BamHI usando los siguientes iniciadores:

20

Iniciador sentido 40A:

CGAGAGGGCCTTTGGGATCCAACTGCTGCC (SEQ ID NO:132)

25

Iniciador anti-sentido 40B:

GGCAGCAGTTGGATCCCAAAGGCCCTCTCG (SEQ ID NO:133)

261

El receptor quimérico conteniendo una quimera FLAG-etiquetada MMRR (N-término y 1<sup>er</sup> bucle extracelular de CCR2, 2<sup>do</sup> y 3<sup>er</sup> bucles extracelulares de CCR1) clonados en el vector de expresión pCMV-1 derivado (Pharmacia; Piscataway, NJ) se proporcionó por Israel Charo de los Institutos J. David Gladstone. La construcción de la quimera MMRR (referida como "2211" por los autores) se describió en Monteclaro F. S. et al. (*Methods in Enzymology* 228:70-84 (1997)). El primer sitio ApaL en la quimera se mutó a un sitio BamH1 usando los siguientes iniciadores de mutagénesis:

Iniciador sentido: 41A:

GCAAATTGGGATCCAACTCCTGCC (SEQ ID NO:134)

10      Iniciador anti-sentido: 41B:

GGCAGGAGTTGGATCCCAATTTGC (SEQ ID NO:135).

Cada clon mutado resultante se corto con NdeI y BamHI. El fragmento conteniendo el vector del mutante CCR1/pcADN3 BamHI y el fragmento NdeI/BamHI del par base 632 conteniendo justo el CCR2 N-término del plásmido MMRR/pCMV1 plásmido fueron gel aislado y ligado junto resultando en la quimera MRRR/pcADN3.

El sitio BamHI en la quimera MRRR se mutó de nuevo a un sitio ApaL usando los siguientes iniciadores de mutagénesis:

20      Iniciador sentido 41C:

GCAAATTGGGGCCCAACTGCTGCC (SEQ ID NO:136)

Iniciador anti-sentido 41D:

GGCAGCAGTTGGGCCCAATTTGC (SEQ ID NO:137).

25      El fragmento MRRR completo fue PCR amplificado usando el sentido 66C (SEQ ID NO:138) homólogo a la región de marcación FLAG del vector y el iniciador anti-sentido 66D (SEQ ID NO:139) homólogo al 3' extremo de CCR1 y conteniendo un sitio HindIII.

Iniciador sentido 66C

2625

CTCTTGTGCCAGGGTGTGGTCTCCGA (SEQ ID NO:138)

Iniciador anti-sentido 66D

GATCGAAGCTTTCAGAACCCAGCAGAGAGTTCATG (SEQ ID NO:139).

5 Este fragmento posteriormente se subclonó en los sitios PflMI y HindIII de un pMIG (Van Parijs, L. et al., *Immunity* 11:281-188 (1999)) derivó en construcción retroviral (Figura 5), reemplazando un gen insertado (un ratón/quimera de humano) que fue precedido por una marca FLAG seguida por el sitio Sal1 y tuvo removido el sitio de proteína fluorescente verde en sitio mejorado en la entrada ribosomal interna (IRESEGFP).

10

Construcción del receptor quimera RRRM y RMMR

El RRRM (N-término, 1<sup>er</sup> y 2<sup>do</sup> bucles extracelulares de CCR1, y 3<sup>er</sup> bucle extracelular CCR2) y RMMR (N-término y 3<sup>er</sup> bucle extracelular CCR1, y 2<sup>do</sup> y 3<sup>er</sup> bucles extracelulares de CCR2) de los receptores quiméricos se produjeron usando un método PCR de dos etapas.

15

Para la quimera RRRM, el tercer bucle de CCR2 de tipo salvaje de humano fue primero PCR amplificado usando los siguientes iniciadores:

Iniciador quimérico sentido 89A:

GACTATACTTATTTCTGTTTTATTGTCATTCTCCTGAACACC (SEQ ID NO:140)

20

Iniciador anti-sentido 81B:

CGCCAAGCTTCATTATAAACCAGCCGAGA (SEQ ID NO:141).

25

El CCR2 de humano de tipo salvaje se clonó en el vector de expresión retroviral derivado pMIG como una plantilla. La región N-terminal a través del segundo bucle extracelular fue PCR amplificado usando los siguientes iniciadores:

Iniciador sentido 89C:

ACGCGTCGACGAACTCCAAACACCACAGAG (SEQ ID NO:142)

Iniciador quimérico anti-sentido 89B:

GTTTCAGGAGAATGACAATGAAAACAGAAATAAGTATAGTC (SEQ ID NO:143),

y el tipo salvaje CCR1 se clonó en el vector de expresión pcADN3 como una plantilla.

Estos fragmentos se purificaron en gel, se combinaron y se amplificaron por PCR usando los iniciadores de extremo 5' y 3': 89C (SEQ ID NO:142) y 81B (SEQ ID NO:141). El fragmento  
5 resultante se ligó en los sitios Sall/HindII del vector retroviral, pMIG conteniendo un marcador FAG N-terminal y teniendo IRESEGFP removido.

#### Construcción del receptor quimera RMMR

El tercer bucle extracelular CCR1 a través de la cola citoplásmica fue PCR amplificada  
10 usando el CCR1 de tipo salvaje clonado en el vector de expresión pcADN3 como una plantilla y los siguientes iniciadores:

Iniciador quimérico sentido 85A:

TCATTCTCCTGAACACCTTCCAAGACTTCCTGTTACCCCA (SEQ ID NO:144)

Iniciador anti-sentido 78D:

15 GCCAAGCTTCCAGTGTGATGGATATCTGA (SEQ ID NO:145),

que hibrida a un área del vector 3' de la inserción en el plásmido tipo salvaje CCR1/pcADN3.

Un segundo fragmento se amplificó con PCR conteniendo el N-término de CCR1 y un  
área conteniendo el primero y segundo bucles extracelulares de CCR2 usando a plásmido  
20 marcado FLAG RMMM/pcADN3 obtenido de Israel Charo de los Institutos J. David Gladstone como una plantilla. La construcción de la construcción quimera de RMMM (referida como "2111" por los autores) se describe en Monteclaro, F. S. et al. (*Methods in Enzymology* 228:70-84 (1997)). Los iniciadores fueron iniciador sentido 66C (SEQ ID NO:138), que hibrida a la etiqueta FLAG y el iniciador quimérico anti-sentido 85B:

25 TGGGTGAACAGGAAGTCTTGAAGGTGTTTCAGGAGAATGA (SEQ ID NO:146).

Estos dos fragmentos se purificaron en gel, se combinaron con PCR amplificada juntos usando el iniciador del extremo 5' y 3': 66C (SEQ ID NO:138) y 78D (SEQ ID NO:144). Este

267

fragmento final se digirió con PflMI y HindIII y se ligó en el vector retroviral pMIG conteniendo una etiqueta FLAG N-terminal y teniendo el IRESEGFP removido.

### Expresión Quimérica

El retrovirus se produjo de cada construcción quimérica y se usó para transducir las  
5 células 300-19. La expresión se determinó por el análisis FACS usando un anticuerpo del epítipo anti-FLAG M1 (Sigma; St. Louis, MO, # de Catálogo F3040).

### EJEMPLO 8

#### Mapeo del Epítipo

10 La unión de los anticuerpos a los receptores quiméricos CCR2/CCR1 se analizó usando el análisis FACS. Todos los receptores se marcaron en el N-término con FLAG y también se marcaron con el anticuerpo anti-FLAG M1 de manera que la expresión del receptor podría confirmarse. Las Figuras 6A & B ilustran el marcado FACS del FLAG en el N-término con el anticuerpo M1 (Figura 6A) como se compara con el marcado de 4.40 (Figura 6B). La Figura 6C  
15 ilustra una curva de unión de saturación del anticuerpo 4.40 A68G S230P en la quimera RMMR de las células 300-19 transfectadas. La unión de saturación del anticuerpo 4.40 A68G S230P a las células 300-19 no transfectadas con CCR2 no muestran la unión en las concentraciones arriba de 10 ug/mL (Figura 7A) mientras las células 300-19 transfectadas con el CCR2 de humano desplegó unión dosis dependiente en las concentraciones arriba de 0.01 ug/mL (Figura 7B). Además, la  
20 unión de saturación del anticuerpo 4.40 A68G S230P a los receptores quiméricos que expresan solamente el N-término de CCR2 (MRRR) junto con las 3 regiones bucle de CCR1 (Figura 7C) o el 3<sup>er</sup> bucle extracelular de CCR2 con el N-término y las regiones del 1<sup>er</sup> y 2<sup>do</sup> bucles de CCR1 (RRRM) fallaron en exhibir cualquier unión significativa en concentraciones arriba de 10 ug/mL (Figura 7D). En contraste, la unión de saturación del anticuerpo 4.40 A68G S230P a los receptores  
25 quiméricos que expresan el N-término y la 3<sup>ra</sup> región del bucle de CCR1 y las 1<sup>ra</sup> y 2<sup>da</sup> regiones del bucle de CCR2 (RMMR) mostraron unión dosis dependiente en concentraciones arriba de 0.001 ug/mL (Figura 7E). La expresión del receptor en todos los transfectantes del receptor se



285

confirmaron mediante analizar el marcado del FAG en el término N con un anticuerpo M1 (Sigma #F3040).

Tabla 7: Mapeo del Epítotope

5  
  
  
  
10  
  
  
  
  
  
  
  
  
15

| Clon   | CCR2 de longitud completa (MMMM) | N- término de CCR2 (MRRR) | 1 <sup>er</sup> , 2 <sup>do</sup> , y 3 <sup>er</sup> bucles de CCR2 (RMMM) | 1 <sup>er</sup> y 2 <sup>do</sup> bucles de CCR2 (RMMR) | Quimiotaxis IC50 (µg/ml) | Epítotope                              |
|--------|----------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------------------|
| 4.40.2 | +                                | -                         | +                                                                           | +                                                       | 0.130                    | 1 <sup>er</sup> /2 <sup>do</sup> bucle |
| 4.9.2  | +                                | -                         | +                                                                           | +                                                       | 0.198                    | 1 <sup>er</sup> /2 <sup>do</sup> bucle |
| 4.52.3 | +                                | +                         | -                                                                           |                                                         | 0.642                    | N-término                              |
| 4.22.3 | +                                | -                         | +                                                                           | -                                                       | 0.137                    | 3 <sup>er</sup> bucle                  |
| 4.6.3  | +                                | +                         | +                                                                           |                                                         | 0.400                    | complejo*                              |
| 4.48.3 | +                                | +                         | +                                                                           |                                                         | 0.491                    | complejo                               |
| 4.3.1  | +                                | +                         | +                                                                           |                                                         | 0.618                    | complejo                               |
| 4.59.2 | +                                | +                         | +                                                                           |                                                         | 1.020                    | complejo                               |
| 4.41.1 | +                                | -                         | -                                                                           |                                                         | 0.521                    | complejo                               |
| 4.24.3 | +                                | -                         | -                                                                           |                                                         | 2.264                    | complejo                               |
| 4.39.3 | +                                | -                         | -                                                                           | -                                                       | 0.139                    | complejo                               |

\*Complejo = se une al tipo salvaje pero no se une a las quimeras

Péptido ELISA

Además de la unión del epítotope al primero y/o segundo bucle de CCR2 también se analizó usando un péptido ELISA. Una unión Reacti NEUTRAVIDIN<sup>TM</sup> Cubierta, placa para ELISA de Unión de Alta Capacidad (Pierce; Rockford, IL) se lavó 3X con PBS/0.05% Tween20 y posteriormente se cubrió con 100ul/pozo de 6 ug/ml bucle 2 CCR2 biotinilado (SEQ ID NO:129) o péptido del bucle 3 (SEQ ID NO:130) (AnaSpec; San José, CA). La placa se incubó por 1 hora y posteriormente se lavó 3X. El anticuerpo antagonista CCR2 4.40.3 A68G S230P u otro anticuerpo primario, se diluyó en PBS/0.1% BSA/0.05% Tween20, posteriormente se agregó a la placa en dilución serial y se incubó por 1 hora como fue con los otros controles. La placa se lavó 3X y se agregó 100ul/pozo de anticuerpo secundario HRP-Ratón anti-Humano IgG4 (Zymed; So. San Francisco, CA) a todos los pozos en una dilución 1:5000 y se incubó por 1 hora. La placa se lavó

256

3X y se agregó el sustrato TMB a todos los pozos y se incubó por ~30 minutos. La reacción de color se detuvo con 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y la lectura de absorbencia se midió en un lector de placas en 450nm (Figura 8). Los anticuerpos, incluyendo los anticuerpos 4.9 y 4.40 se identificaron que se unen al segundo péptido del bucle extracelular del receptor y no se une al tercer bucle.

5

### EJEMPLO 9

#### Selectividad de Unión

La selectividad del anticuerpo 4.40 A68G S230P para el CCR2 de humano se confirmó por la ausencia de la unión a un receptor quimioquina cercanamente relacionado, CCR5, como se muestra en la Figura 9 y por la carencia de inhibición de la quimiotaxis inducida por el ligando CCR5/CCR1 MIP-1a (Figura 3). Un anticuerpo anti-CCR5 (Pharmingen, # de Catálogo 555992) se unió a éstas mismas células (Figura 9A). Para estos estudios, 300.19 células tratadas con ingeniería genética para expresar el CCR5 se incubaron con el anticuerpo selectivo CCR2 4.40.3 A68G S230P o el anticuerpo CCR5 selectivo por 30 minutos. La células se lavaron en estabilizador FACS (0.02% de azido de sodio, 2% de suero de bovino fetal inactivado en PBS) y se analizó para la expresión de la superficie celular usando un citómetro de flujo usando métodos estándares.

### EJEMPLO 10

#### Movilización de Calcio

Para determinar si el anticuerpo 4.40 actúa como un antagonista funcional en CCR2 y no posee cualquier propiedad agonista significativa, los efectos de 4.40.3 en la movilización del calcio de las células 300.12 CCR2 transfectadas se probaron como se describió previamente (Gladue RP *et al.*, *J Biol Chem* 278:40473-40480 (2003)). Las células 300-19 CCR2 transfectadas de humano se agitaron descendientemente y se resuspendieron en  $2 \times 10^6$  células/ml con estabilizador PTI (HBSS (Gibco, Grand Island, NY) con 10 mM de Hepes (Gibco) y 4.0 mM CaCl<sub>2</sub> (Sigma; St. Louis, MO)). Las células se cargaron con 2 ul de indo-1 AM (Sondas Moleculares; Eugene, OR) por ml (2uM final) y se incubaron por 25 minutos en 37°C. Las células posteriormente se lavaron 2X con estabilizador PTI y se suspendieron en  $1 \times 10^7$ /ml. Varias concentraciones del anticuerpo o los

267

controles apropiados se agregaron a las células y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente. A un tubo cuadrado de 1 mm (Sarstedt; Alemania), 1.8 ml de estabilizador PTI precalentado se agregaron junto con 200 ul de la suspensión celular. Las células se excitaron y se midió la fluorescencia usando el equipo de Photon Technology Corporation International (PTI; Lawrenceville, NJ). La máquina se pausó y se agregaron 20 ul de 100 nM MCP-1 (Peprotech; Rocky Hill, NJ). Después de la respuesta, los reactivos siguientes se agregaron en este orden para liberar y templar el calcio total 20 ul de 18% Triton X-100; 20 ul de 3M Tris pH 8.5; 20 ul de 0.5M EGTA pH 8.5 (todos de Sigma). El anticuerpo 4.40 inhibió la habilidad de MCP-1 para inducir la movilización del calcio en una manera en respuesta a la dosis (Figura 10). Resultados similares se obtuvieron con el anticuerpo 4.40 A68G S230P.

#### EJEMPLO 11

##### Inhibición de la Quimiotaxis hacia CCL2 y CCL7

Para determinar si la inhibición de la quimiotaxis por el anticuerpo 4.40 A68G S230P es específica para MCP-1 o si también aplica para otros ligandos CCR2, la quimiotaxis de las células THP-1 hacia MCP-1(CCL2) se comparó a esa hacia CCL3 (MIP-1a) como se muestra en la Figura 3. Además de la migración de las células 300-19 CCR2 transfectadas hacia otro ligando CCR2, CCL7 (MCP-3) en la presencia del anticuerpo 4.40 A68G S230P también se analizó usando una prueba de quimiotaxis similar como se describe en el Ejemplo 6. Mientras el anticuerpo 4.40 A68G S230P inhibe la quimiotaxis hacia ambos ligandos CCR2, CCL2 (Figura 3) y CCL7 (Figura 11) conocidos, la Figura 3 muestra que no se bloquea la quimiotaxis hacia el ligando CCR1/CCR5, CCL3 (MIP-1a).

#### EJEMPLO 12

##### Polimerización de Actina en Monocitos

##### Polimerización de la Actina en Glóbulos Blancos de Humano

El anticuerpo monoclonal 4.40 A68G S230P también se probó por su habilidad para inhibir la polimerización en la sangre completa de humanos como se muestra en la Figura 12. La

sangre se colectó en tubos vacutainer EDTA (VWR; Boston, MA) y posteriormente se incubaron con diluciones del anticuerpo o el KLH de control por 30 minutos a temperatura ambiente. El estabilizador de control o 10  $\mu$ l de 100 nM MCP-1 (Peprotech; Rocky Hill, NJ) se agregaron a una placa Corning de 48 pozos (VWR). 100  $\mu$ l de sangre posteriormente se agregaron con mezclado suave y se incubaron por 40 segundos después de los cuales la reacción se detuvo con 0.8 ml de reactivo de detención/lisado (10% de la solución de lisado FACS (Becton Dickinson; San José, CA), 20% de 16% paraformaldehído (Electron Microscopy Sciences; Ft. Washington, PA ), y 70% de H<sub>2</sub>O). La placa se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, se agitó descendientemente y las células se transfectaron a una placa de polipropileno de fondo redondo de 96 pozos y se lavaron 2X con PBS. 100  $\mu$ l de PBS se agregaron por placa. Posteriormente 50  $\mu$ l de reactivo de marcado se agregaron (10% de una lisofosfatidilcolina 5mg/ml (Sigma) en 10X HBSS, 80% del 16% de paraformaldehído, y 10% de 6.6  $\mu$ M NBD falacidina (Sondas Moleculares; Eugene, OR)). Las células se marcaron por una hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de la incubación, las células se lavaron 2X con PBS conteniendo 2% de suero de bovino fetal (Hyclone, Logan UT) y la fluorescencia se cuantificó en un FACSCAN (Becton Dickinson) con una cerca de monocitos activados. Como se muestra en la Figura 12, el anticuerpo 4.40 A68G S230P inhibió la polimerización de la actina con un IC<sub>50</sub> de 0.168  $\mu$ g/ml.

#### Polimerización de la Actina en la Sangre Completa de Monos Cinomolgos

La sangre se colectó en tubos vacutainer EDTA (VWR; Boston, MA) y posteriormente se incubó con diluciones de anticuerpos o isotipo de control por 30 minutos a temperatura ambiente. Durante este tiempo 10  $\mu$ l de 100 nM MCP-1 (Peprotech; Rocky Hill, NJ; concentración final 10 nM) o estabilizador de control (HBSS sin Ca<sup>+2</sup> o Mg<sup>+2</sup> (Gibco; Grand Island, NY) y 0.2% BSA (Sigma; St. Louis, MO)) se agregaron a una placa Corning de 48 pozos (VWR). Posteriormente se agregaron 100  $\mu$ l de sangre con mezclado suave y se incubaron por 48 segundos. La reacción se detuvo con 0.8 ml de reactivo de lisado/detección (10% de solución de lisado FACS (Becton Dickinson; San José, CA), 20% de 16% de paraformaldehído (Electron Microscopy Sciences; Ft. Washington, PA ), y 70% de H<sub>2</sub>O). La placa se incubó por 10 minutos, se agitó descendientemente y se lavó 2X con

PBS. Las células se marcaron por una hora a temperatura ambiente en la oscuridad con agente de marcado (10% de un lisofosfolidilcolina 5mg/ml (Sigma) en 10X HBSS, 80% del 16% de paraformaldehído, y 10% de 6.6  $\mu$ M NBD falacina (Sondas Moleculares; Eugene, OR)). Después de la incubación, las células se lavaron 2X con PBS conteniendo 2% de suero de bovino fetal (Hyclone, Logan UT) y la fluorescencia se cuantificó en un FACSCAN (Becton Dickinson) con una cerca de monocitos activados. Como se muestra en la Figura 13, el anticuerpo 4.40 A68G S230P inhibió la polimerización de la actina en sangre completo en los monos cinomolgos con un  $IC_{50}$  de 0.49  $\mu$ g/ml.

## 10 EJEMPLO 13

### Prueba de Cuantificación del mRNA en el Colágeno I

La línea celular de estrella hepática de humano, LI-90 (JCRB Cellbank, Japón), se cultivó en matraces conteniendo medio DME suplementado con 10% de FBS deactivado, 100 U/ml de Penicilina/100  $\mu$ g/ml de Estreptomina y 2 de mM L-Gln (Invitrogen) a 37°C en una incubadora humidificado 5% CO<sub>2</sub>. Las células se cultivaron en placas de cultivo de tejido de 96 pozos en 20,000 células/pozo por 3 días y se trataron con 1000 nM de MCP-1 (PeproTech) y varias concentraciones de 4.40 A68G S230P por 48 horas a 37°C. El medio de cultivo se removió y las células se lisaron mediante la adición de 100  $\mu$ l del estabilizador de lisado suministrado con el Equipo de Expresión QUANTÍGENOE™ (Panomics). La prueba de ADN ramificado se realizó usando las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras de ARN total se cargaron en una placa de micro titulación de 96 pozos conteniendo el estabilizador de hibridación y 50 fmol/ $\mu$ l del equipo de sonda Col1A1/GAPDH. Los mARNs capturados se hibridaron para las moléculas de ADN ramificado que contenían moléculas de fosfatasa alcalina por la incubación a 46°C por 60 min. Después de la incubación adicional con el sustrato quimioluminiscente en 46°C por 30 min, la luminiscencia se cuantificó con un luminómetro (ARVOsx, Perkin Elmer; Massachusetts, EUA). La proporción de la luminiscencia de Col1A1 en contra de GAPDH se calculó y los datos se analizaron por el programa Prism 4.0 para determinar los valores  $IC_{50}$  (GraphPad). Como se muestra en la

Figura 14, 4.40 A68G S230P inhibió la síntesis del colágeno IAl mRNA en las células LI90 inducidas por MCP-1 con un valor  $IC_{50}$  de 0.89  $\mu\text{g/mL}$  (6.2 nM).

#### EJEMPLO 14

##### 5 Fosforilación pERK

La sangre completa de humano se aisló recientemente de voluntarios sanos. El análisis FACS indicó un alto nivel de fosforilación de la quinasa regulada por la señal extracelular (pERK) en monocitos CD14+ 6 min después de la adición de MCP-1. 4.40 A68G S230P inhibió la fosforilación MCP-1 pERK p inducida en la sangre completa en una manera dosis dependiente (Figura 15). La fosforilación pERK en monocitos siguiendo la estimulación *ex vivo* con MCP-1 puede usarse como un mecanismo biomarcador, por lo tanto facilitando PK/PD y la farmacología de translación. Los valores  $IC_{50}$  y  $IC_{90}$  obtenidos para el anticuerpo 4.40 A68G S230P en esta prueba de sangre completa fueron 0.44  $\mu\text{g/mL}$  (2.9 nM) y 0.89  $\mu\text{g/mL}$  (6.1 nM), respectivamente.

##### 15 EJEMPLO 15

##### Modelo de Hepatitis Aguda Murina

La eficacia del anticuerpo 4.40 A68G S230P también se examinó usando un modelo ConA de ratón de hepatitis aguda. Para este estudio, se usaron ratones transgénicos en los cuales el CCR2 de ratón había sido reemplazado por el CCR2 de humano dado que el anticuerpo 4.40 A68G S230P no reconoce el CCR2 de roedor. Se les dio a los animales una inyección intraperitoneal simple del mAb en 0.1, 0.3 o 1.0 mg/kg en solución salina. Un anticuerpo de control de isotipo IgG<sub>4</sub> se administró a un grupo separado. Treinta minutos después se les dio a los animales una inyección i.v. en la cola (0.1 mL) de 15 mg/kg ConA en solución salina libre de pirógeno. Un grupo de control se le dio solución salina sin CoA. Después de 24 horas, las muestras de sangre se obtuvieron y se analizaron las enzimas del plasma del hígado. Como se muestra en la Figura 16, ALT y AST fueron marcadamente elevadas en el grupo del anticuerpo de control con valores cercanos a 25,000 U/L. Por contraste los ratones tratados con 0.5 y 1.0 mg/kg de 4.40

A68G S230P mostraron una reducción significativa de sus enzimas en el plasma del hígado por aproximadamente 50% y 80% respectivamente.

## 5 EJEMPLO 16

### Efecto Terapéutico en Modelos Animales de Enfermedad

#### Inflamación

Los efectos terapéuticos de los anticuerpos anti-CCR2 o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos incluyendo los anticuerpos 4.40 y 4.9 se probaron usando modelos de mamíferos *in vivo* de inflamación. La infiltración de leucocitos se monitoreo en la inyección intradérmica de una quimioquina, tal como MCP-1 y un anticuerpo o fragmento del mismo reactivo con el CCR2 de mamífero, tal como el anticuerpo 4.40 en un animal apropiado, tal como conejo, ratón, rata, puerquito de guinea o macaco rhesus (ver *por ejemplo.*, Van Damme, J. et al., *J. Exp. Med.* 176:59-65 (1992); Zachariae, C. O. C. et al., *J. Exp. Med.* 171:2177-2182 (1990); Jose, P. J. et al., *J. Exp. Med.* 179: 881-887 (1994)). Las biopsias de la piel se analizaron histológicamente para infiltración de leucocitos (*por ejemplo*, eosinofilos y granulocitos). Se espera que los anticuerpos anti-CCR2 antagonísticos disminuirán la infiltración de leucocitos comparado con los animales de control.

## 20 Esclerosis múltiple

Los efectos terapéuticos de los anticuerpos o fragmentos de los mismos, incluyendo los anticuerpos 4.40 y 4.9 se probaron usando modelos de mamíferos *in vivo* de esclerosis múltiple. La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) es una enfermedad inflamatoria mediada por las células T del sistema nervioso central (SNC) que sirve como un modelo animal para la esclerosis múltiple (EM) (ver Steinman L, *Neuron* 24:511-514 (1999)). En el día 0 y el día 7 de la post-inmunización (p.i.) con péptido MOG<sub>35-55</sub> encefalitogénico, los ratones C57/J129 y/o C57BL/6 se sensibilizaron para EAE activo por la inyección subcutánea (s.c.) (dos sitios, flanco dorsal) con un total de 600 µg de MOG<sub>35-55</sub> encefalitogénico emulsificado en adyuvante de Freund incompleto

(IFA; Difco, Detroit, MI), conteniendo 70 µg de *Mycobacterium tuberculosis*, H37Ra (Difco). En el día 1 y el día 2 p.i., cada ratón también recibió 500 mg de toxina pertussis (PTX; List Biological Laboratories, Campbell, CA) intravenosamente (i.v.) vía una vena en la cola. Algunos animales también recibieron una dosis escalada de los anticuerpos anti-CCR2 antagonísticos tal como el anticuerpo 4.40. Los animales se analizaron diariamente para signos clínicos y se evaluaron de acuerdo con la escala siguiente: grado 0, no anormalidades; grado 1, cola débil; grado 2; debilidad en los miembros traseros y cola flácida; grado 3, paraparesis en miembros traseros; grado 4, tetraplegia y grado 5 moribundo o muerto.

Además, los estudios en microscopio de luz se realizaron en muestras de tejido osmio fijado/glutaraldehído del nervio óptico, el cerebro, el cerebelo y la médula espinal. Las muestras de tejido se deshidrataron y se incrustaron en resina epoxi de la cual secciones de 1-µm se cortaron y se marcaron con azul de toluidina. La inflamación, la desmielinación y la degeneración Wallerian (DW) y la remielinación se calificaron en la escala de 0 a 5, como se describió previamente (Cannella *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EUA* 95:10100-10105 (1998)). Se espera que los ratones tratados con los anticuerpos anti-CCR2 antagonísticos exhiban signos reducidos de las anormalidades clínicas, la inflamación, la demielinación y la DW sobre los animales de control. Además se espera que dicha reducción ocurra en una manera dosis dependiente.

## Dolor Neuropático

Los efectos terapéuticos de los anticuerpos o fragmentos del mismo, incluyendo los anticuerpos 4.40 y 4.9 se prueban en modelos de mamíferos *in vivo* de dolor neuropático. Los ratones C57BL se dividieron en dos grupos. El grupo experimental se administró con anticuerpos anti-CCR2 antagonísticos diariamente, tal como el anticuerpo 4.40 vía inyección en la vena de la cola mientras un segundo grupo no se administró con el anticuerpo. Los dos grupos se probaron en intervalos de tiempo desde la iniciación del tratamiento en las siguientes pruebas:

**Barra Giratoria.** Inicialmente, los ratones se entrenaron en una barra giratoria por 3 min en una velocidad de 10 rpm. Para la prueba, la velocidad se estableció en 10 rpm por 60 s y



subsecuentemente se aceleró a 600 rpm. El tiempo tomado para los ratones cayó después de que se registró el inicio de la aceleración.

**Plato Caliente.** Los ratones se habituaron al aparato del plato caliente con la temperatura establecida en 45°C por 2 min. Subsecuentemente, los ratones se colocaron en el plato caliente y la temperatura se cambió secuencialmente a 52.5°C y 55.5°C (el corte se estableció en 30 s) cada uno y posteriormente a 58.5°C (el corte se estableció en 20 s). El tiempo cuando el ratón levantó sus patas o saltó se registró.

**Prueba de Formalina.** Por 4 días antes de la prueba, los ratones se aclimataron por 2 horas cada día en la plataforma de prueba. En el día del estudio, los ratones se colocaron por 1 hora en la plataforma de prueba y subsecuentemente fueron administrados con 10 µl de 2% de formalina en la superficie planar de la pata izquierda. El tiempo que le tomó al ratón levantar o sacudir la pata se registró en periodos de 2 minutos en intervalos de 5 minutos por 50 min.

**Estimulación Mecánica y Térmica.** La sensibilidad térmica se analizó mediante medir las latencias del retiro de la pata a un estímulo de calor radiante (Hargreaves *et al.*, *Pain* 32:77-88 (1988)). La sensibilidad mecánica se determinó con los filamentos von Frey calibrados usando el paradigma de arriba y abajo (Chaplan *et al.*, *J. Neurosci. Methods* 53, 55-63 (1994)).

**Lesión al Nervio.** Los ratones se anestesiaron con una mezcla de ketamina (50 mg/kg, i.m.) y medetomidina (1 mg/kg, i.m.). Una incisión se hace justo debajo del hueso de la cadera paralela al nervio ciático. El nervio se expone y cualquier tejido de adherencia se remueve del nervio. Se hace una ligadura apretada con hilos sutura de seda 6.0 alrededor de un tercio a la mitad del diámetro del nervio ciático. Los músculos se cierran con hilos de sutura y la herida con broches para heridas. La respuesta del ratón a la estimulación mecánica se probó antes y a más de 15 días después de la lesión al nervio.

Se espera que los ratones tratados con los anticuerpos anti-CCR2 antagonísticos exhibirán signos reducidos de dolor neuropático comparados a los ratones de control.

Tabla 8: Secuencias CDR (SEQ ID NO:)

274

| Anticuerpo | V <sub>H</sub> CDR1 | V <sub>H</sub> CDR2 | V <sub>H</sub> CDR3 | V <sub>L</sub> CDR1 | V <sub>L</sub> CDR2 | V <sub>L</sub> CDR3 |
|------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 4.9        | 12                  | 13                  | 14                  | 30                  | 31                  | 32                  |
| 4.22       | 48                  | 49                  | 50                  | 66                  | 67                  | 68                  |
| 4.40       | 84                  | 85                  | 86                  | 102                 | 103                 | 104                 |
| 4.39       | 177                 | 178                 | 179                 | 195                 | 196                 | 197                 |

5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal de humano aislado o una porción de unión al antígeno del mismo que especialmente se une al CCR2 de humano en donde el anticuerpo

10

- a) se une a un epítoto contenido dentro de un primer bucle extracelular del CCR2 de humano;
- b) se une a un epítoto contenido dentro de un segundo bucle extracelular del CCR2 de humano; o
- c) se une a un epítoto contenido dentro de ambos el primero y segundo bucles extracelulares del CCR2 de humano.

15

2. El anticuerpo monoclonal de humano o una porción de unión al antígeno de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo posee al menos una de las siguientes propiedades:

20

- a) tiene una selectividad para el CCR2 de humano que es al menos 100 veces mayor que su selectividad para el CCR5 de humano;
- b) se une al CCR2 de humano con un K<sub>D</sub> de 2.0 x 10<sup>-7</sup> M o menor;
- c) compite con el MCP-1 y/o MCP-3 para unirse al CCR2;
- d) reduce la movilización de Ca<sup>2+</sup> en respuesta a MCP-1;
- e) reduce la síntesis de mARN de Colágeno I en respuesta a MCP-1;
- f) reduce la fosforilación pERK en monocitos de humano en respuesta a MCP-1;
- g) reduce la quimiotaxis de monocitos de humano en respuesta a MCP-1; y
- h) reduce la polimerización de actina en monocitos de humano en respuesta a MCP-1.

25

3. El anticuerpo monoclonal de humano o una porción de unión al antígeno de conformidad con la reivindicación 1, en donde el primer bucle extracelular del CCR2 de humano comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:128; y el segundo bucle extracelular del CCR2 de humano comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:129.

5 4. Un anticuerpo monoclonal de humano aislado o una porción de unión al antígeno del mismo que específicamente se une al CCR2 de humano, que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable ( $V_H$ ) de cadena pesada comprendiendo un CDR1, un CDR2, y un CDR3 seleccionado del grupo que consiste de:

a) un  $V_H$  CDR1 como se establece en la SEQ ID NO:12, un  $V_H$  CDR2 como se establece en la SEQ ID NO:13, y un  $V_H$  CDR3 como se establece en la SEQ ID NO:14;

b) un  $V_H$  CDR1 como se establece en la SEQ ID NO:48, un  $V_H$  CDR2 como se establece en la SEQ ID NO:49, y un  $V_H$  CDR3 como se establece en la SEQ ID NO:50;

c) un  $V_H$  CDR1 como se establece en la SEQ ID NO:84, un  $V_H$  CDR2 como se establece en la SEQ ID NO:85, y un  $V_H$  CDR3 como se establece en la SEQ ID NO:86; y

15 d) un  $V_H$  CDR1 como se establece en la SEQ ID NO:177, un  $V_H$  CDR2 como se establece en la SEQ ID NO:178, y un  $V_H$  CDR3 como se establece en la SEQ ID NO:179.

5. El anticuerpo monoclonal de humano aislado o la porción de unión al antígeno del mismo de conformidad con la reivindicación 4, que además comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable ( $V_L$ ) de cadena ligera comprendiendo un CDR1, un CDR2, y un CDR3 seleccionado del grupo que consiste de:

a) un  $V_L$  CDR1 como se establece en la SEQ ID NO:30, un  $V_L$  CDR2 como se establece en la SEQ ID NO:31, y un  $V_L$  CDR3 como se establece en la SEQ ID NO:32;

b) un  $V_L$  CDR1 como se establece en la SEQ ID NO:66, un  $V_L$  CDR2 como se establece en la SEQ ID NO:67, y un  $V_L$  CDR3 como se establece en la SEQ ID NO:68;

25 c) un  $V_L$  CDR1 como se establece en la SEQ ID NO:102, un  $V_L$  CDR2 como se establece en la SEQ ID NO:103, y un  $V_L$  CDR3 como se establece en la SEQ ID NO:104; y

d) un  $V_L$  CDR1 como se establece en la SEQ ID NO:195, un  $V_L$  CDR2 como se establece en la SEQ ID NO:196, y un  $V_L$  CDR3 como se establece en la SEQ ID NO:197.

6. Un anticuerpo de humano aislado o una porción de unión al antígeno del mismo que específicamente une al CCR2 de humano, que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) comprendiendo un CDR1, un CDR2, y un CDR3 seleccionado del grupo que consiste de:

a) un  $V_L$  CDR1 como se establece en la SEQ ID NO:30, un  $V_L$  CDR2 como se establece en la SEQ ID NO:31, y un  $V_L$  CDR3 como se establece en la SEQ ID NO:32;

b) un  $V_L$  CDR1 como se establece en la SEQ ID NO:66, un  $V_L$  CDR2 como se establece en la SEQ ID NO:67, y un  $V_L$  CDR3 como se establece en la SEQ ID NO:68;

c) un  $V_L$  CDR1 como se establece en la SEQ ID NO:102, un  $V_L$  CDR2 como se establece en la SEQ ID NO:103, y un  $V_L$  CDR3 como se establece en la SEQ ID NO:104; y

d) un  $V_L$  CDR1 como se establece en la SEQ ID NO:195, un  $V_L$  CDR2 como se establece en la SEQ ID NO:196, y un  $V_L$  CDR3 como se establece en la SEQ ID NO:197.

7. El anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno de conformidad con la reivindicación 5, que comprende un  $V_H$  CDR1 como se establece en la SEQ ID NO:84, un  $V_H$  CDR2 como se establece en la SEQ ID NO:85, un  $V_H$  CDR3 como se establece en la SEQ ID NO:86, un  $V_L$  CDR1 como se establece en la SEQ ID NO:102, un  $V_L$  CDR2 como se establece en la SEQ ID NO:103, y un  $V_L$  CDR3 como se establece en la SEQ ID NO:104.

8. Un anticuerpo monoclonal de humano aislado o una porción de unión al antígeno del mismo que específicamente se une al CCR2 de humano, comprendiendo un CDR3 de cadena pesada teniendo una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:202 y SEQ ID NO:203.



9. Un anticuerpo monoclonal de humano aislado o una porción de unión al antígeno del mismo que específicamente se une al CCR2 de humano, comprendiendo una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:176, SEQ ID NO:11 que tiene una  
5 sustitución conservadora de aminoácido, SEQ ID NO:47 que tiene una sustitución conservadora de aminoácido, SEQ ID NO:83 que tiene una sustitución conservadora de aminoácido, SEQ ID NO:176 que tiene una sustitución conservadora de aminoácido, SEQ ID NO:11 que tiene una sustitución de la línea germinal del aminoácido comparada a la SEQ ID NO:162, SEQ ID NO:47 que tiene una sustitución de la línea germinal del aminoácido comparada a la SEQ ID NO:158,  
10 SEQ ID NO:83 que tiene una sustitución de la línea germinal del aminoácido comparada a la SEQ ID NO:160, SEQ ID NO:176 que tiene una sustitución de la línea germinal del aminoácido comparada a la SEQ ID NO:164, una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO:11, una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO:47, una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO:83, y una secuencia de  
15 aminoácidos al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO:176.

10. Un anticuerpo monoclonal de humano aislado o una porción de unión al antígeno del mismo que específicamente se une al CCR2, comprendiendo una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:29,  
20 SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:29 que tiene una sustitución conservadora de aminoácido, SEQ ID NO:66 que tiene una sustitución conservadora de aminoácido, SEQ ID NO:101 que tiene una sustitución conservadora de aminoácido, SEQ ID NO:113 que tiene una sustitución conservadora de aminoácido, SEQ ID NO:194 que tiene una sustitución conservadora de aminoácido, SEQ ID NO:29 que tiene una sustitución de la línea  
25 germinal del aminoácido comparada a la SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:66 que tiene una sustitución de la línea germinal del aminoácido comparada a la SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:101 que tiene una sustitución de la línea germinal del aminoácido comparada a la SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:113 que tiene una sustitución de la línea germinal del aminoácido comparada a la

SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:194 que tiene una substitución de la línea germinal del aminoácido comparada a la SEQ ID NO:165, una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO:29, una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO:66 , una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO:101, una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO:113, y una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO:194.

11. El anticuerpo monoclonal de humano aislado o una porción de unión al antígeno del mismo de conformidad con la reivindicación 8, que además comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:29 que tiene una substitución conservadora de aminoácido, SEQ ID NO:66 que tiene una substitución conservadora de aminoácido, SEQ ID NO:101 que tiene una substitución conservadora de aminoácido, SEQ ID NO:113 que tiene una substitución conservadora de aminoácido, SEQ ID NO:194 que tiene una substitución conservadora de aminoácido, SEQ ID NO:29 que tiene una substitución de la línea germinal del aminoácido comparada a la SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:66 que tiene una substitución de la línea germinal del aminoácido comparada a la SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:101 que tiene una substitución de la línea germinal del aminoácido comparada a la SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:113 que tiene una substitución de la línea germinal del aminoácido comparada a la SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:194 que tiene una substitución de la línea germinal del aminoácido comparada a la SEQ ID NO:165, una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO:29, una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO:66, una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO:101, una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO:113, and una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO:194.

12. Un anticuerpo monoclonal de humano aislado o una porción de unión al antígeno que específicamente se une al CCR2, comprendiendo:

279

a) al menos un CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena pesada independientemente seleccionado la cadena pesada de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de anticuerpos monoclonales 4.40 (No. de Acceso ATCC PTA-6981), 4.22 (No. de Acceso ATCC PTA-6980), 4.39, y 4.9 (No. de Acceso ATCC PTA-6979); o

5 b) al menos un CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera independientemente seleccionado de la cadena ligera de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de: anticuerpos monoclonales 4.40, 4.22, 4.39, y 4.9; o

c) al menos un CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena pesada independientemente seleccionado de la cadena pesada de un anticuerpo seleccionado del grupo  
10 que consiste de: anticuerpos monoclonales 4.40, 4.22, 4.39, y 4.9 y al menos un CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera independientemente seleccionado de la cadena ligera de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de los anticuerpos monoclonales 4.40, 4.22, 4.39, y 4.9.

13. Un anticuerpo monoclonal de humano aislado que específicamente se une al  
15 CCR2 de humano, comprendiendo una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:116; SEQ ID NO:175, SEQ ID NO:10 que tiene una sustitución conservadora de aminoácido, SEQ ID NO:46 que tiene una sustitución conservadora de aminoácido, SEQ ID NO:82 que tiene una sustitución conservadora de aminoácido, SEQ ID NO:116 que tiene una sustitución conservadora de aminoácido, SEQ ID NO:175 que tiene una sustitución conservadora de aminoácido, SEQ ID NO:10 que tiene una sustitución de la línea germinal del aminoácido comparada a la SEQ ID NO:162, SEQ ID NO:46 que tiene una sustitución de la línea germinal del aminoácido comparada a la SEQ ID NO:158, SEQ ID NO:82 que tiene una sustitución de la línea germinal del aminoácido comparada a la SEQ ID NO:160, SEQ ID NO:116 que tiene una  
20 sustitución de la línea germinal del aminoácido comparada a la SEQ ID NO:160, y SEQ ID  
25 NO:175 que tiene una sustitución de la línea germinal del aminoácido comparada a la SEQ ID NO:164.

14. El anticuerpo monoclonal de humano aislado de conformidad con la reivindicación 13, que además comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:28 que tiene una sustitución conservadora de aminoácido, SEQ ID NO:64 que tiene una sustitución conservadora de aminoácido, SEQ ID NO:100 que tiene una sustitución conservadora de aminoácido, SEQ ID NO:112 que tiene una sustitución conservadora de aminoácido, SEQ ID NO:193 que tiene una sustitución conservadora de aminoácido, SEQ ID NO:28 que tiene una sustitución de la línea germinal del aminoácido comparada a la SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:64 que tiene una sustitución de la línea germinal del aminoácido comparada a la SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:100 que tiene una sustitución de la línea germinal del aminoácido comparada a la SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:112 que tiene una sustitución de la línea germinal del aminoácido comparada a la SEQ ID NO:161, y SEQ ID NO:193 que tiene una sustitución de la línea germinal del aminoácido comparada a la SEQ ID NO:165.

15. El anticuerpo monoclonal de humano aislado o la porción de unión al antígeno de conformidad con la reivindicación 14, el anticuerpo teniendo la cadena pesada y la cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste de:

a) la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:10 y la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:28,

b) la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:46 y la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:64,

c) la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:82 y la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:100,

d) la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:82 y la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:112,

e) la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:116 y la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:112, and



f) la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:175 y la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:193.

16. El anticuerpo monoclonal de humano aislado o la porción de unión al antígeno de conformidad con la reivindicación 15, en donde la secuencia de aminoácidos de cadena pesada es la SEQ ID NO:116 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera es la SEQ ID NO:112.

17. El anticuerpo monoclonal de humano aislado o la porción de unión al antígeno de conformidad con la reivindicación 5, que además comprende uno o más de V<sub>H</sub> FR1, FR2, FR3 o FR4 y/o V<sub>L</sub> FR1, FR2, FR3 o secuencia de aminoácidos FR4 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de: 4.40, 4.40 A68G S230P, 4.39, 4.22, y 4.9.

18. El anticuerpo monoclonal de humano aislado o la porción de unión al antígeno de conformidad con la reivindicación 17, que además comprende un dominio constante de cadena pesada.

19. El anticuerpo monoclonal de humano aislado o la porción de unión al antígeno de conformidad con la reivindicación 18, que además comprende un dominio constante de cadena ligera.

20. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o porción de unión al antígeno de conformidad con la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.

21. Una línea celular aislada que produce el anticuerpo o la porción de unión al antígeno de conformidad con la reivindicación 1.

22. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o la porción de unión al antígeno de conformidad con la reivindicación 1.

5            23. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 22, en donde el vector opcionalmente comprende una secuencia de control de la expresión operablemente unido a la molécula de ácido nucleico.

10           24. Un método para tratar, prevenir o aliviar los síntomas de una enfermedad mediada por CCR2 en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo la etapa de administrar a dicho sujeto el anticuerpo o porción de unión al antígeno de conformidad con la reivindicación 1.

15           25. El método de conformidad con la reivindicación 24, en donde el sujeto está afligido con una o más condiciones o enfermedades seleccionadas del grupo que consiste de una enfermedad inflamatoria, una enfermedad alérgica, una enfermedad autoinmune, una enfermedad por rechazo al injerto, arterioesclerosis, obesidad, infección por VIH, dolor neuropático, estenosis, restenosis, esclerosis múltiple, una condición fibrótica, degeneración macular relacionada con la edad, uveítis, infección corneal y cáncer.

20           26. El método de conformidad con la reivindicación 25, en donde la condición fibrótica es fibrosis de hígado.

25           27. El método de conformidad con la reivindicación 26, en donde dicha fibrosis en hígado es el resultado de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC), infección por el virus de la hepatitis B (VHB), esteatohepatitis alcohólica (EHA), o esteatohepatitis no non-alcohólica (EHNA).

28. El uso del anticuerpo o porción de unión al antígeno de conformidad con la reivindicación 1, para la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir o aliviar los síntomas de una enfermedad mediada por CCR2 en un sujeto en necesidad del mismo.

5            29. El de conformidad con la reivindicación 28, en donde el sujeto está afligido con una o más condiciones o enfermedades seleccionadas del grupo que consiste de una enfermedad inflamatoria, una enfermedad alérgica, una enfermedad autoinmune, una enfermedad por rechazo al injerto, arterioesclerosis, obesidad, infección por VIH, dolor neuropático, estenosis, restenosis, esclerosis múltiple, una condición fibrótica, degeneración macular relacionada con la edad, uveítis,  
10            infección corneal y cáncer.

             30. El uso de conformidad con la reivindicación 29, en donde dicha condición fibrótica es fibrosis de hígado.

15            31. El de conformidad con la reivindicación 30, en donde dicha fibrosis en hígado es el resultado de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC), infección por el virus de la hepatitis B (VHB), esteatohepatitis alcohólica (EHA), o esteatohepatitis no non-alcohólica (EHNA).

**RESUMEN**

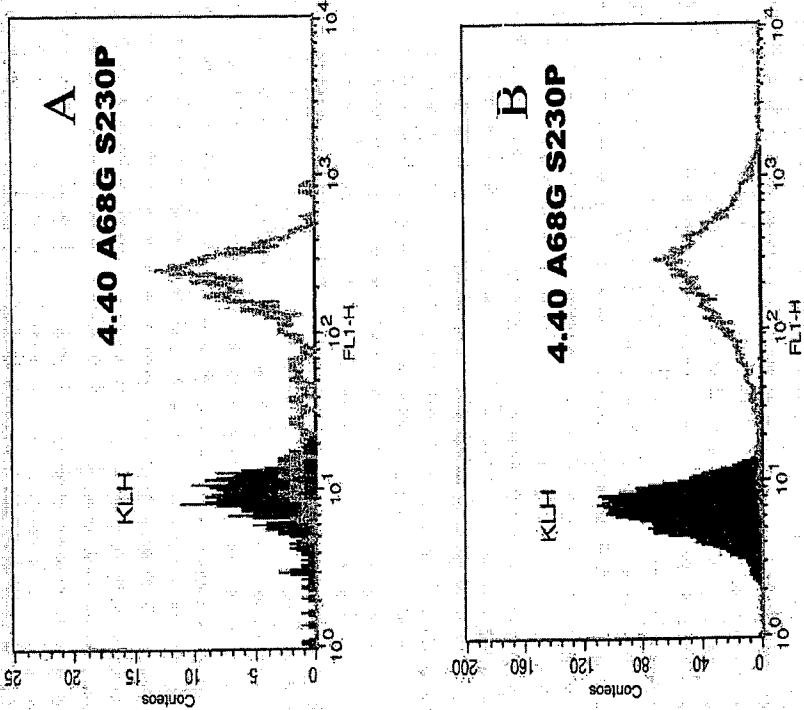
Se proporcionan anticuerpos que incluyen anticuerpos de humano y porciones de unión  
5 al antígeno de los mismos que específicamente se unen a CCR2, específicamente CCR2 de  
humano y que pueden funcionar para inhibir el CCR2. Los anticuerpos anti-CCR2 incluyen aquellos  
que se unen al primero y/o segundo bucles extracelulares de CCR2. También se proporcionan los  
anticuerpos anti-CCR2 de humano y las porciones de unión al antígeno de los mismos. Las  
inmunoglobulinas de cadena ligera y cadena pesada derivadas de los anticuerpos anti-CCR2 de  
10 humano y las moléculas de ácido nucleico que codifican dichas inmunoglobulinas se proporcionan.  
Se proporcionan métodos para producir los anticuerpos anti-CCR2 de humano o las porciones de  
unión al antígeno, las composiciones que comprenden estos anticuerpos o las porciones de unión  
al antígeno, los métodos de uso de los anticuerpos y las porciones de unión al antígeno y las  
composiciones para diagnóstico y tratamiento. También se proporcionan los métodos de terapia  
15 con genes usando las moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de inmunoglobulina  
pesadas y/o ligeras que comprenden los anticuerpos anti-CCR2 de humano o las porciones de  
unión al antígeno de los mismos.

20

25

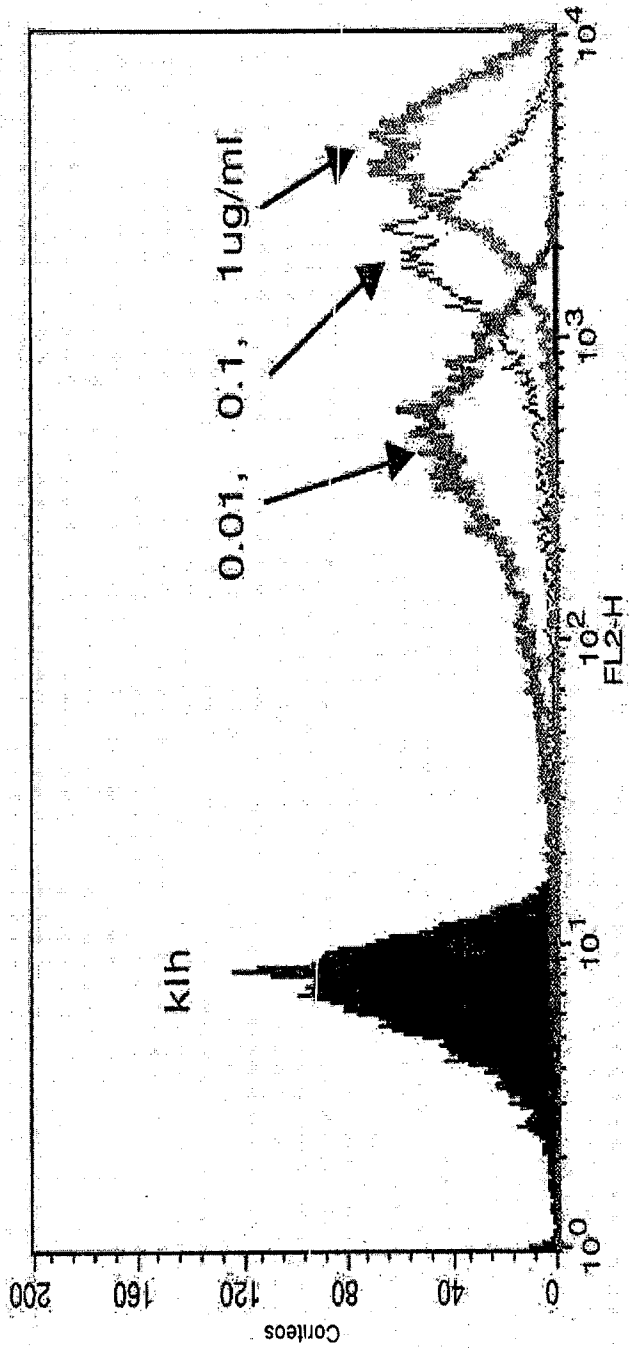
288

Figure 1



2/22

Figura 1C



282

3/22

Figura 2

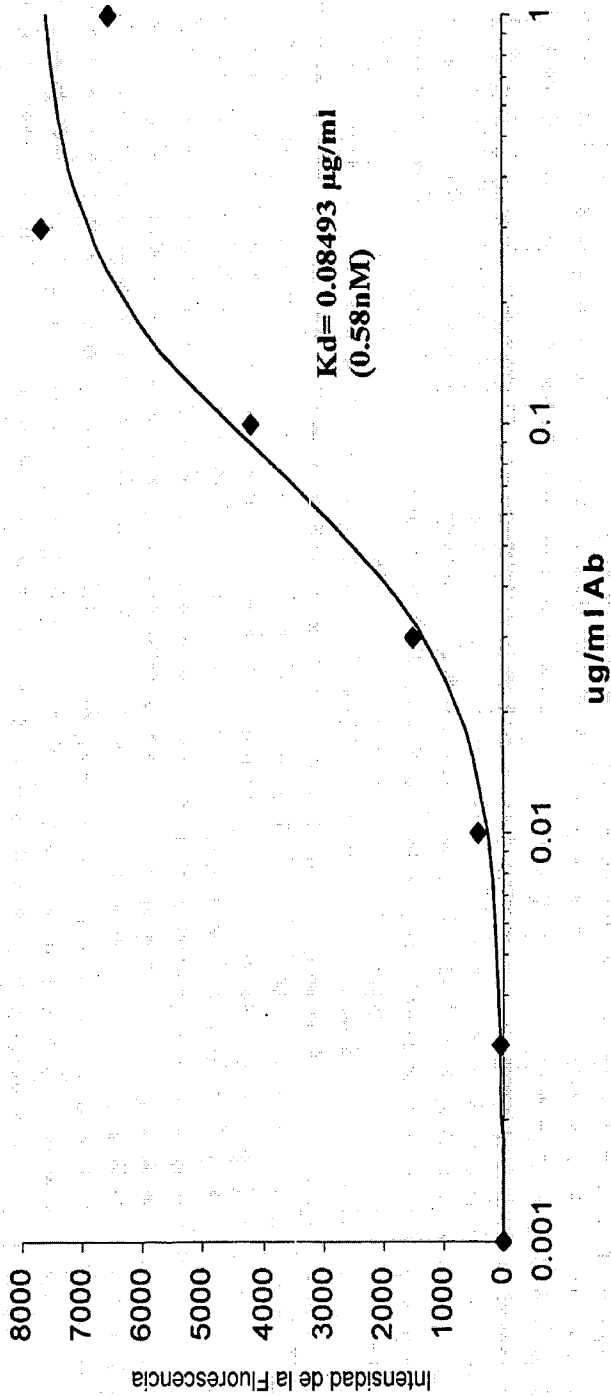
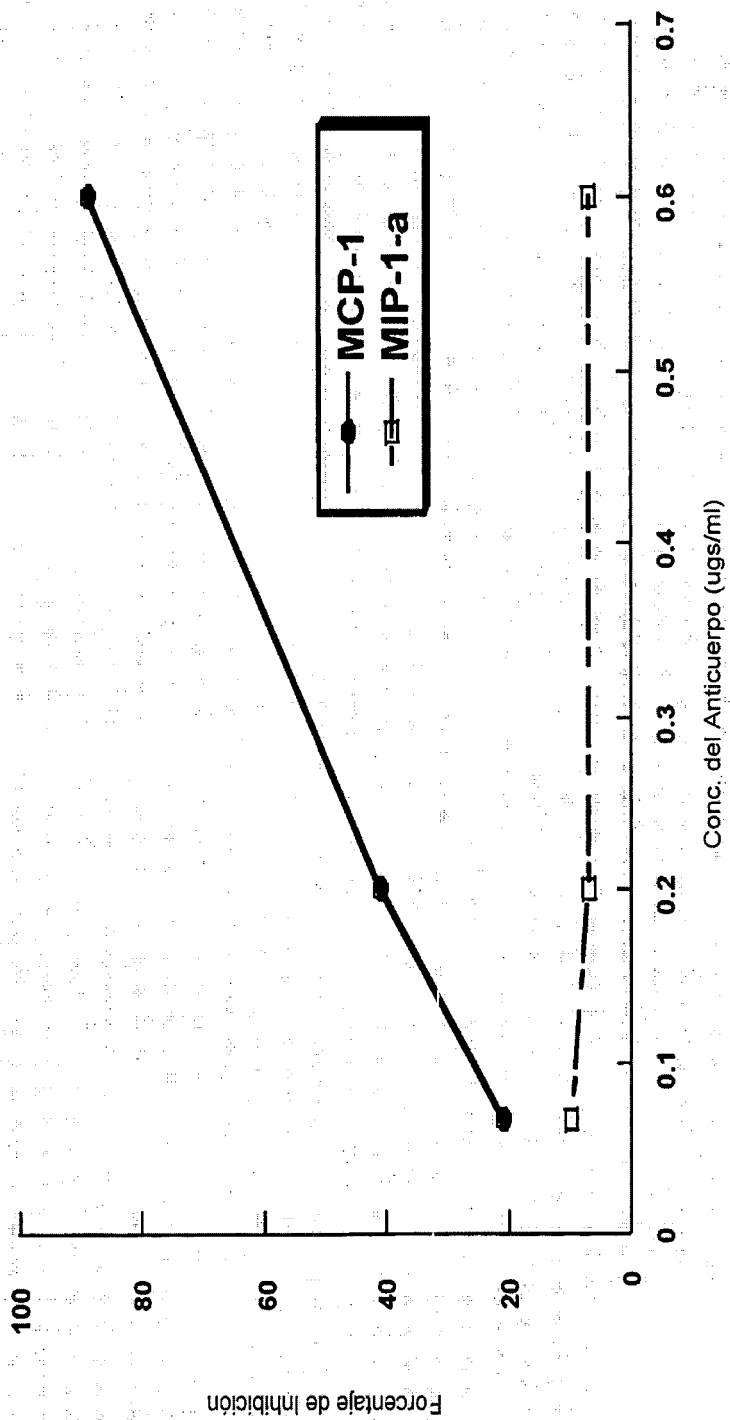


Figura 3

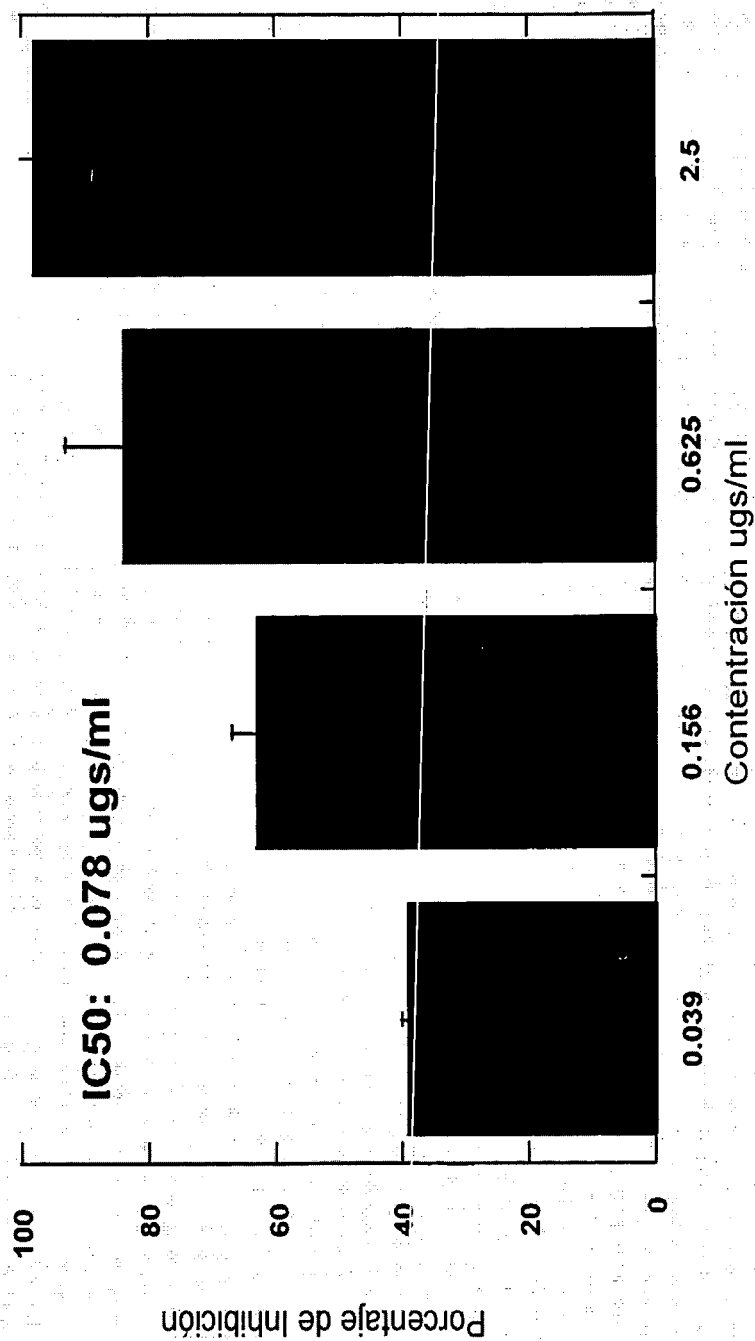




289

5/22

Figura 4



6/22

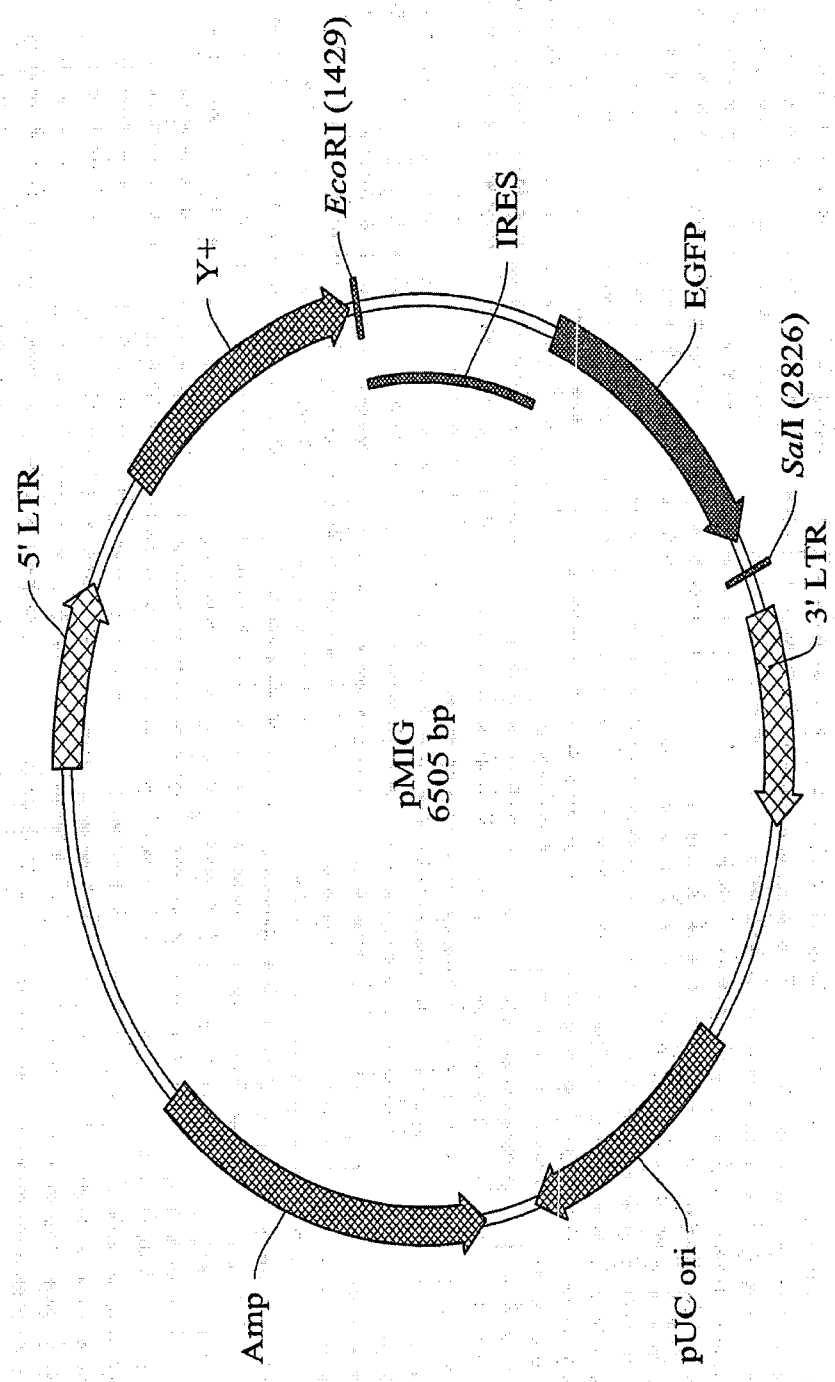
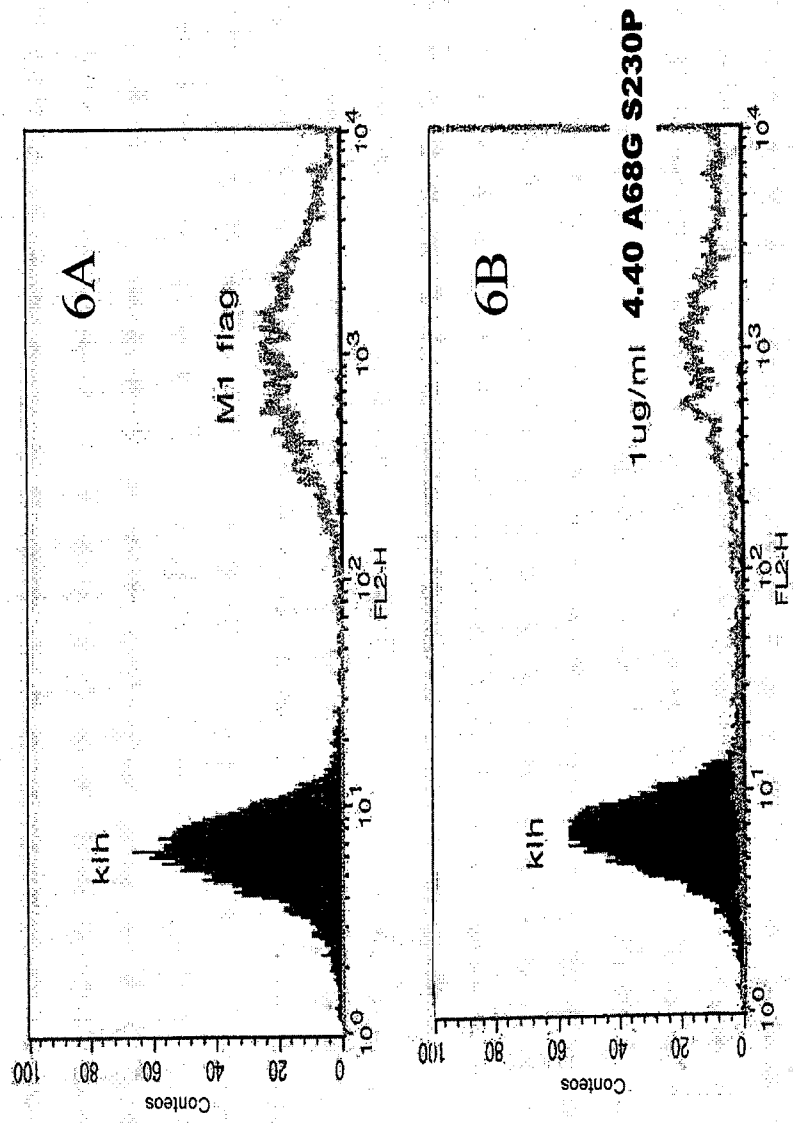


Figura 5

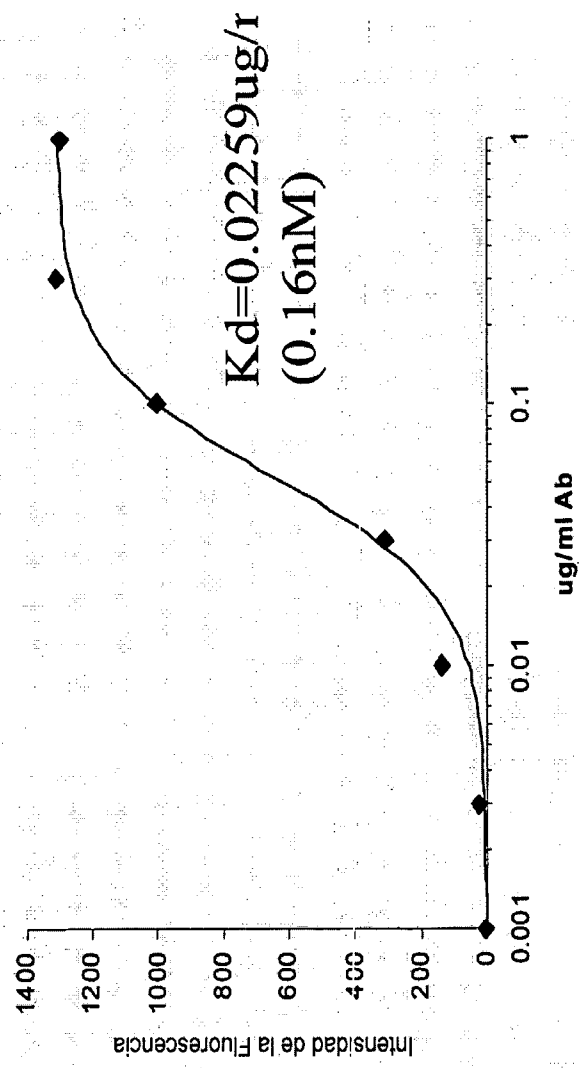
Figura 6A & B



7/22

162

Figura 6C

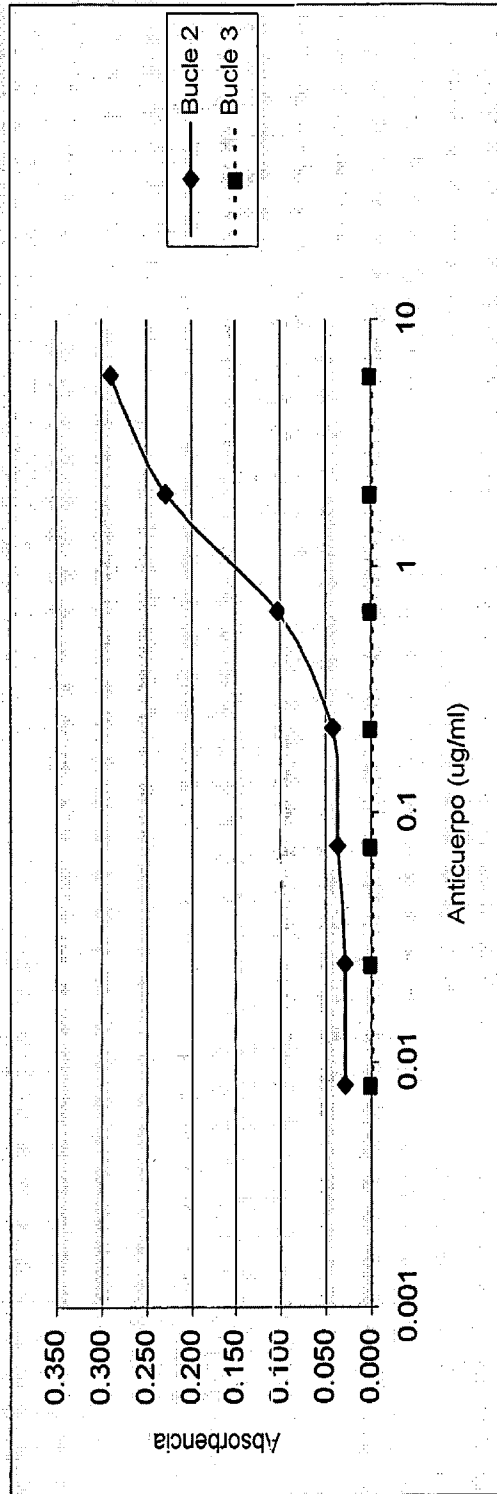




294

10/22

Figura 8



11/22

Figura 9

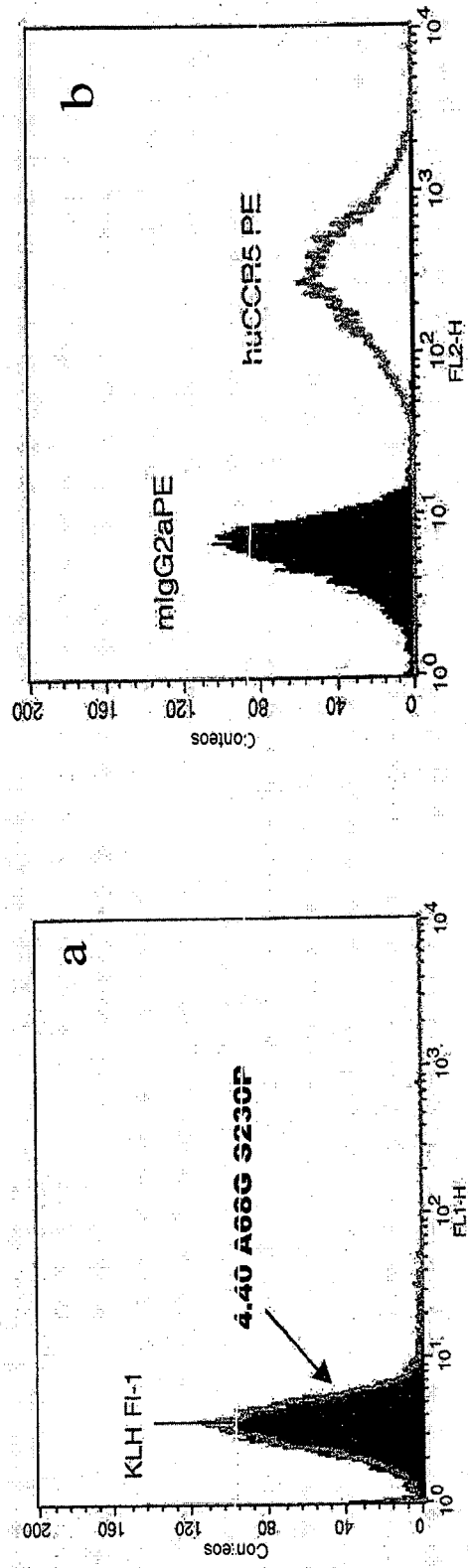


Figura 10

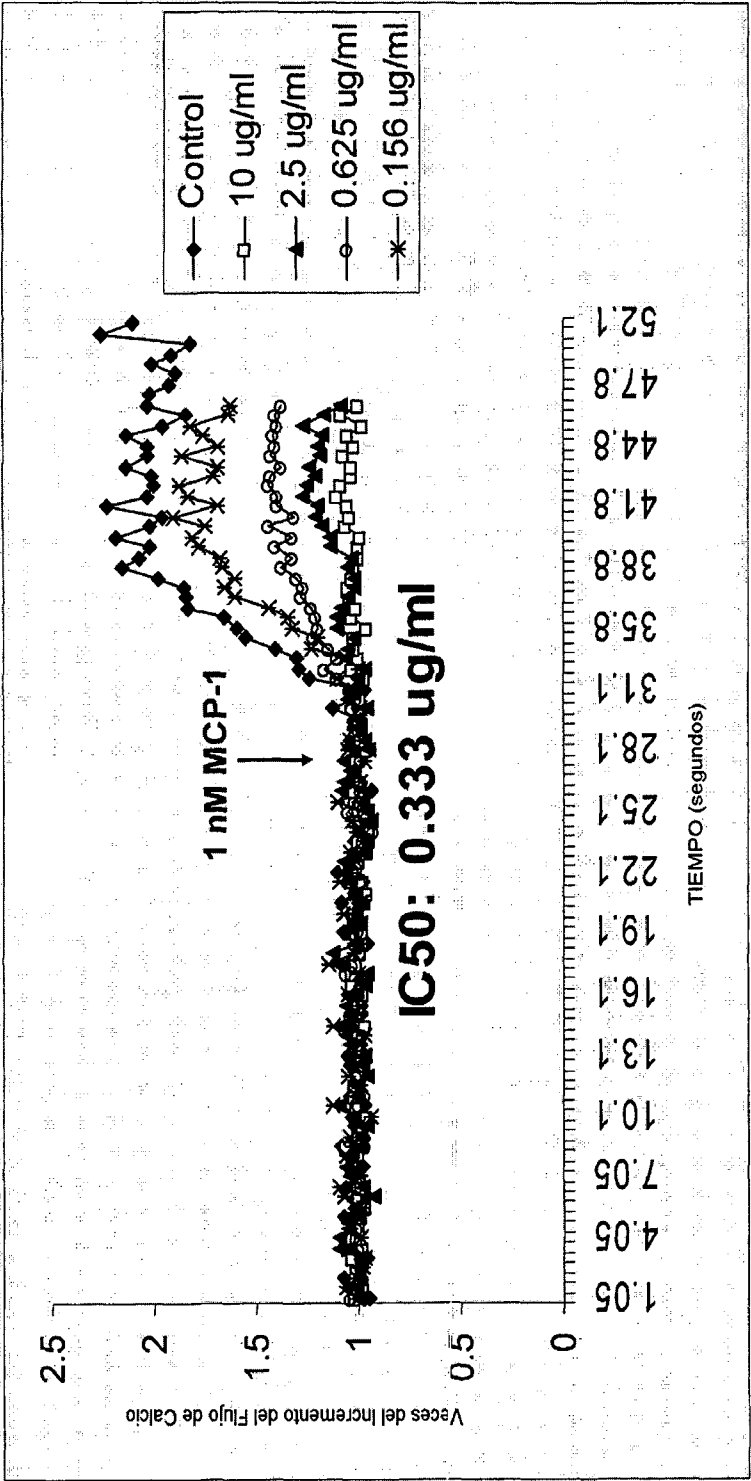
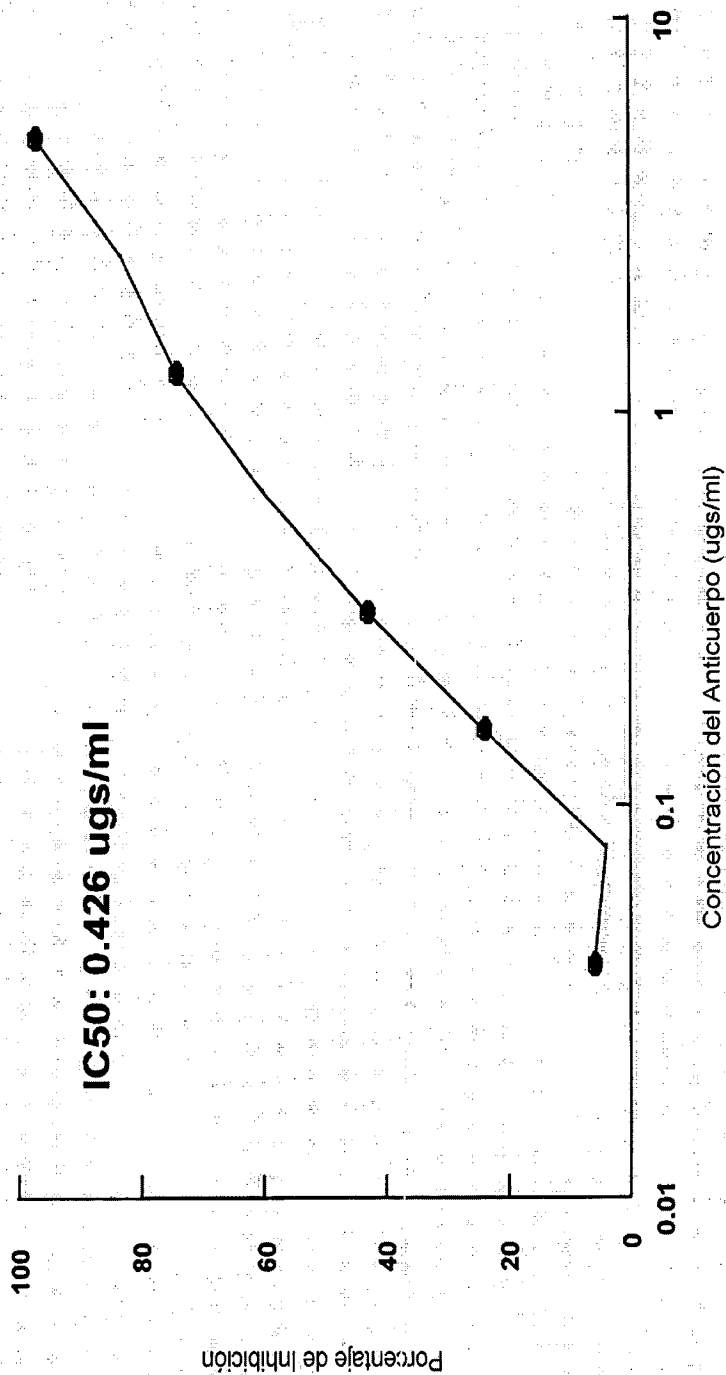




Figura 11



298

14/22

Figura 12

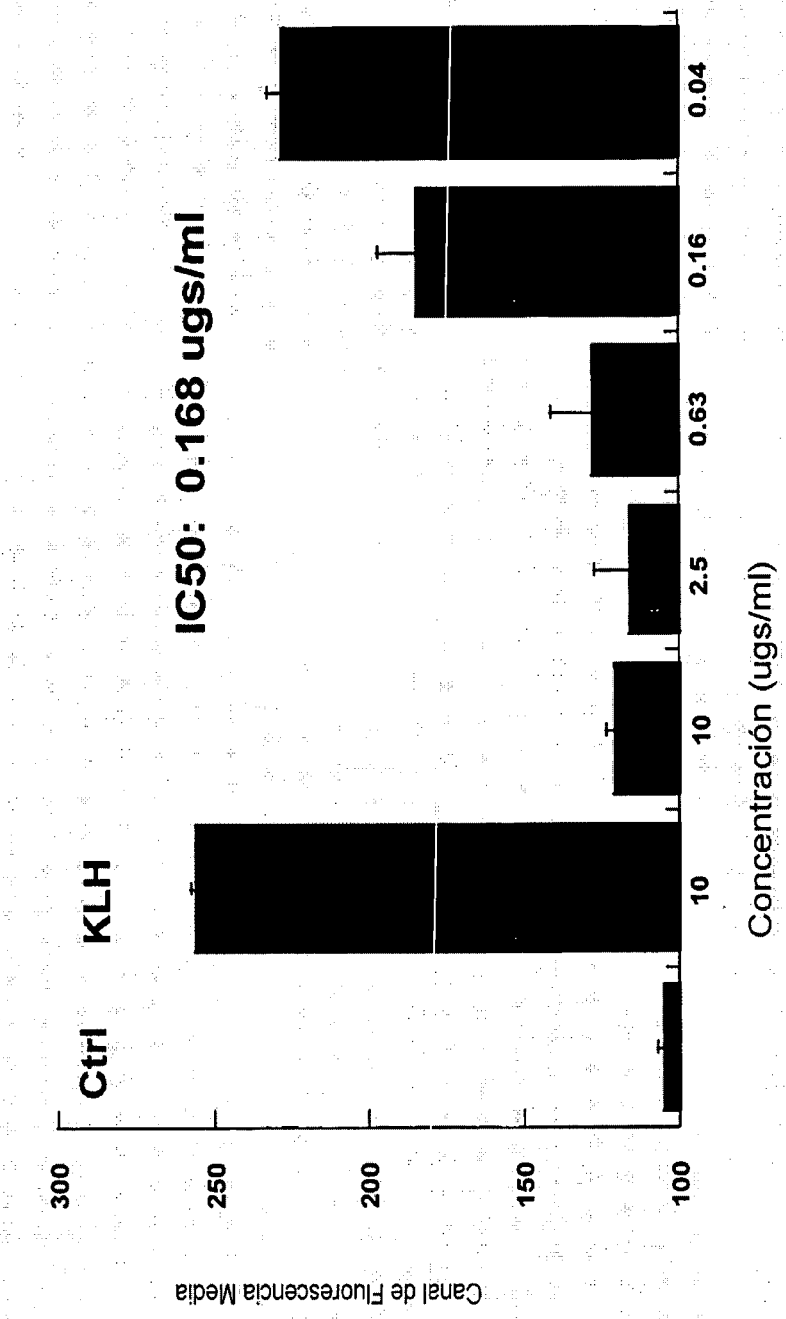
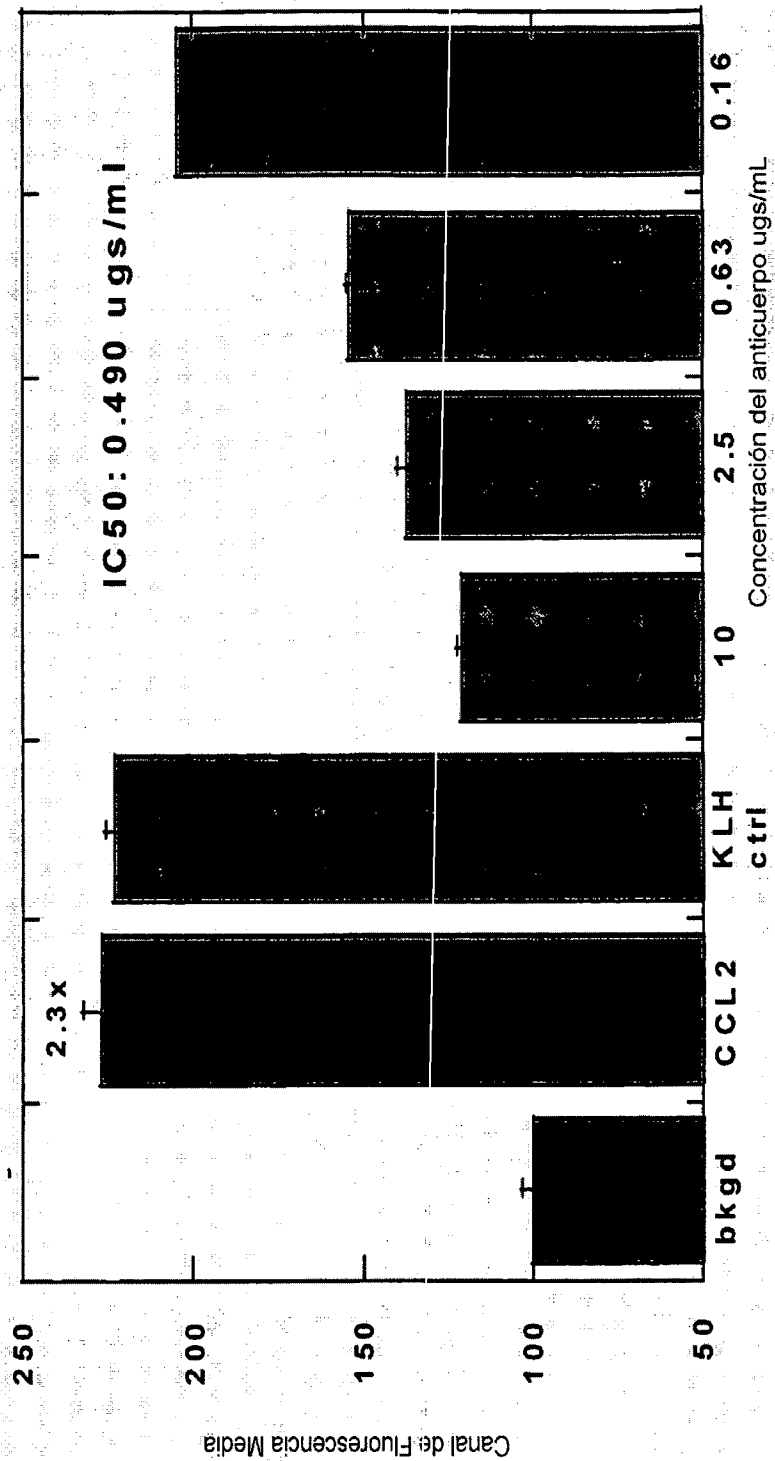


Figura 13



308

Figura 14

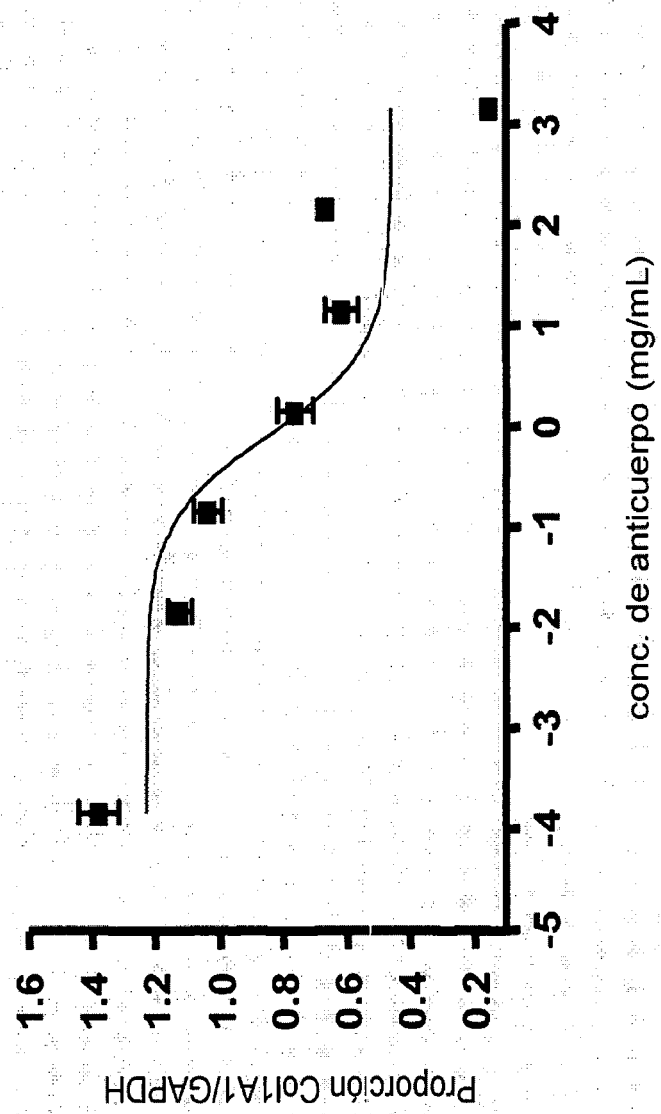
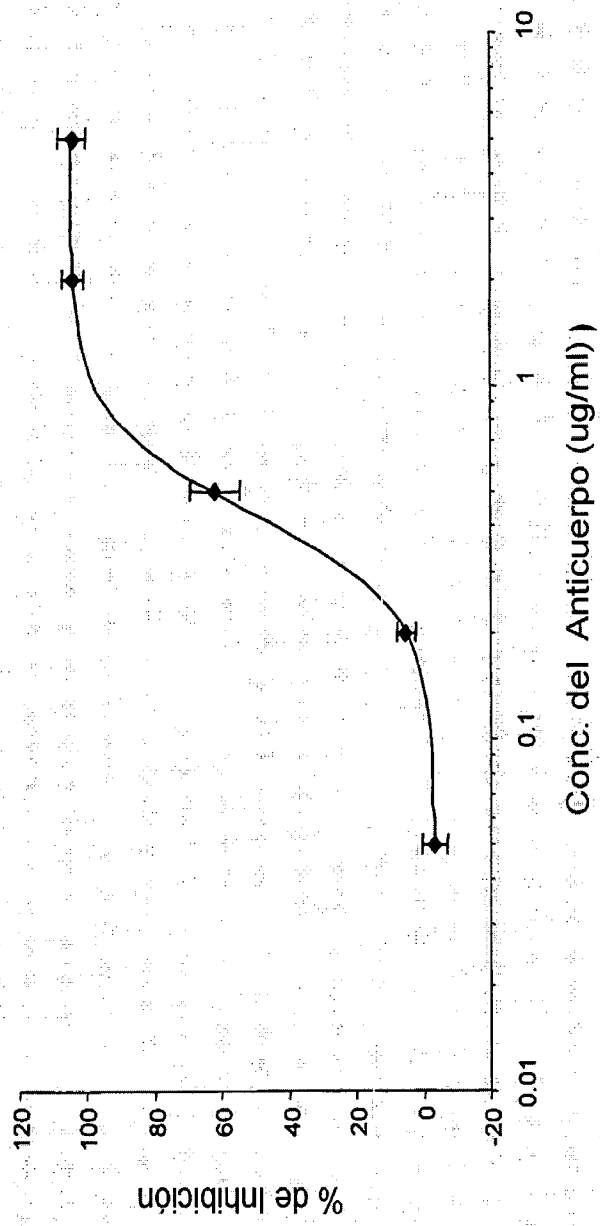


Figura 15



302

18/22

Figura 16

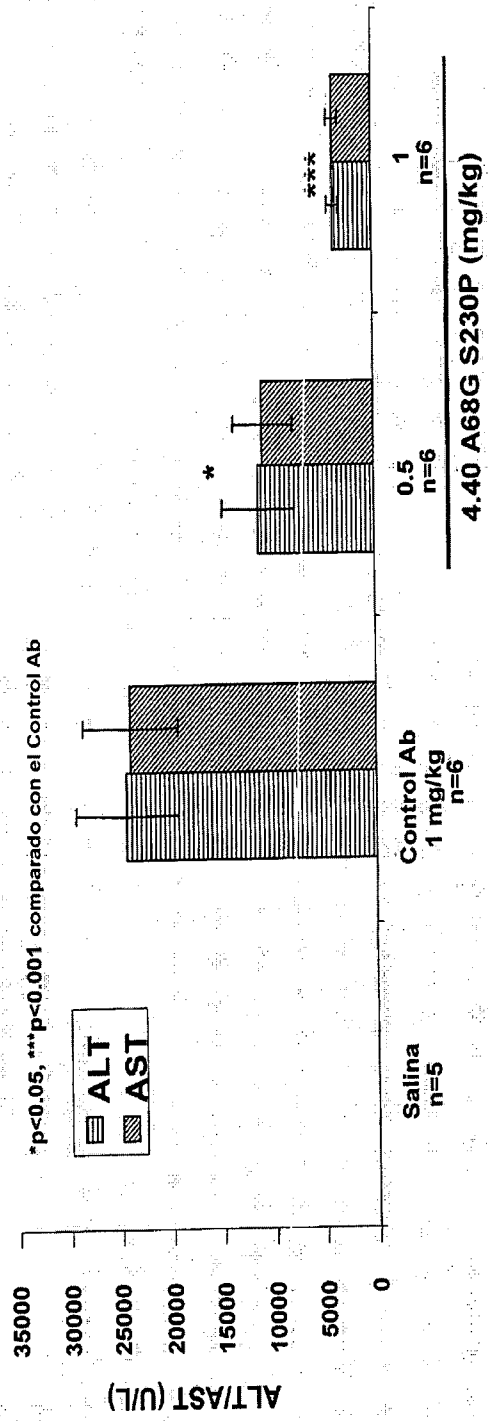


Figura 17A

V<sub>H</sub>

Línea Germinal QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYMHWRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFOG

4.22.3 -----I-----M-----T-----

Línea Germinal

RVTMTRDTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARE#YNWNY#AFDIWGQGTMTVSS SEQ ID NO:158

4.22.3 ---L-----D-----RW-K--FDV-----

V<sub>L</sub>

Línea Germinal DVVMTQSPPLSLPVTGLQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLLIYKVSNWDS

4.22.3 -----P-----L-----A

Línea Germinal

GVPDRFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCMQGTHTWPIITFGQGTREIK SEQ ID NO:159

4.22.3 -----F---##-GRS--V-----

304

Figura 17B

V<sub>H</sub>

|                |                                                                       |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Línea Germinal | QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG    |
| 4.40.2         | -----L-----L-----K-----                                               |
| Línea Germinal | RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR#YNWNY##AFDIWGQGTMTVSS SEQ ID NO:160 |
| 4.40.2         | -----DQAYWT-FD-----                                                   |

V<sub>L</sub>

|                |                                                                  |
|----------------|------------------------------------------------------------------|
| Línea Germinal | EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSFS         |
| 4.40.2         | -----                                                            |
| Línea Germinal | GVPSRFSGSGGTDFTLTINSLEAEDAATYYCHQSSSLPLTFGGGTKVEIK SEQ ID NO:161 |
| 4.40.2         | -----A-----                                                      |



305

Figura 17C

V<sub>H</sub>

Línea Germinal QVQLVESGGGVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG  
4.9.2 -----GT-----R-----

Línea Germinal RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR#YNWNY##AFDIWGQGTMTVSS SEQ ID NO:162  
4.9.2 -----K-----R-----DQAY-K-FD-----

V<sub>L</sub>

Línea Germinal DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS  
4.9.2 -----T-----

Línea Germinal GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKLEIK SEQ ID NO:163  
4.9.2 -----NS-CS-----

Figura 17D

V<sub>H</sub>

|                |                                                                        |
|----------------|------------------------------------------------------------------------|
| Linea Germinal | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQG       |
| 4.39.3         | -----I-----M-----P-----                                                |
| Linea Germinal | RVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR##YNWNY#AFDIWGQGTMTVTSS SEQ ID NO:164 |
| 4.39.3         | -----D-----F-----ERW-K--FD-----                                        |

V<sub>L</sub>

|                |                                                                  |
|----------------|------------------------------------------------------------------|
| Linea Germinal | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES   |
| 4.39.3         | -----                                                            |
| Linea Germinal | GVPDRFSGSGCTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPWTFGQGTKVEIK SEQ ID NO:165 |
| 4.39.3         | -----Q-----R-----                                                |

300

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3  
SEQUENCE LISTING

<110> Pfizer Inc  
<120> CCR2 antibodies  
<130> PC032985  
<160> 203  
<170> PatentIn version 3.5  
<210> 1  
<211> 1350  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 1  
caggtgcagc tgggtggagtc tggggggagggc gtggtccagc ctgggagggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatggca tgcactgggt ccgccaggct 120  
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt caaacatatg atggaagaaa taaatactat 180  
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa aacgttgtat 240  
ctgcaaatga acagactgag agctgaggac acggctgtgt attattgtgc gagagatcag 300  
gcgtactgga agtactttga tgcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360  
tcttcagctt ccaccaaggg cccatccgtc tccccctgg cgccctgctc caggagcacc 420  
tccgagagca cagccgccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480  
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttccccggc tgtcctacag 540  
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg 600  
aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaagggtgga caagagagtt 660  
gagtccaaat atggtccccc atgcccata tgcacagcac ctgagttcct ggggggacca 720  
tcagtcttcc tggtccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gacccctgag 780  
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 840  
gtggatggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc 900  
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 960  
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa 1020  
gccaaagggc agccccgaga gccacagggtg tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg 1080  
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1140  
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200  
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag cagggtggcag 1260  
gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag 1320  
aagagcctct ccctgtctct gggtaaatga 1350

<210> 2  
<211> 366  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 2  
caggtgcagc tgggtggagtc tggggggagggc gtggtccagc ctgggagggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

308

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt caaacatatg atggaagaaa taaatactat | 180 |
| gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa aacgttgat  | 240 |
| ctgcaaatga acagactgag agctgaggac acggctgtgt attattgtgc gagagatcag | 300 |
| gcgtactgga agtactttga tgcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc | 360 |
| tcttca                                                            | 366 |

<210> 3  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| <400> 3<br>agttatggca tgcac | 15 |
|-----------------------------|----|

<210> 4  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| <400> 4<br>gttcaaacat atgatggaag aaataaatac tatgcagact ccgtgaagg c | 51 |
|--------------------------------------------------------------------|----|

<210> 5  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

|                                                       |    |
|-------------------------------------------------------|----|
| <400> 5<br>gatcaggcgt actggaagta ctttgatgct tttgatatc | 39 |
|-------------------------------------------------------|----|

<210> 6  
 <211> 90  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

|                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| <400> 6<br>caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc | 60 |
| tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt                                              | 90 |

<210> 7  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

|                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------|----|
| <400> 7<br>tgggtccgcc aggctccagg caaggggctg gagtgggtgg ca | 42 |
|-----------------------------------------------------------|----|

<210> 8  
 <211> 96  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| <400> 8<br>cgattcacca tctccagaga caattccaag aaaacgttgt atctgcaaat gaacagactg | 60 |
| agagctgagg acacggctgt gtattattgt gcgaga                                      | 96 |

<210> 9  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 9

309

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3  
tggggccaaag ggacaatggt caccgtctct tca

<210> 10  
<211> 449  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 10

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

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

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

Ala Val Gln Thr Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gln Ala Tyr Trp Lys Tyr Phe Asp Ala Phe Asp Ile Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr  
130 135 140

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

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

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

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp  
195 200 205

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

Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro  
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp  
Página 3

310

260 LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
275 280 285

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

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys  
325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
370 375 380

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

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

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
435 440 445

Lys

- <210> 11
- <211> 122
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 11

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

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

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

Ala Val Gln Thr Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Leu Tyr

311

65 LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3  
70 75 80

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

Ala Arg Asp Gln Ala Tyr Trp Lys Tyr Phe Asp Ala Phe Asp Ile Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 12  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 12  
Ser Tyr Gly Met His  
1 5

<210> 13  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 13  
Val Gln Thr Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 14  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 14  
Asp Gln Ala Tyr Trp Lys Tyr Phe Asp Ala Phe Asp Ile  
1 5 10

<210> 15  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 15  
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

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

<210> 16  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 16  
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala  
Página 5

312

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

1 5 10

<210> 17  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 17

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

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

<210> 18  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 18

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

<210> 19  
<211> 645  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 19

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctacat ctgtaggaga cagagtcacc  | 60  |
| atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca  | 120 |
| gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca  | 180 |
| aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct  | 240 |
| gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacaatt ccccgtagcag ttttggccag | 300 |
| gggaccaagc tggagatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcc   | 360 |
| tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgtttgtg gcctgctgaa gaacttctat  | 420 |
| cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag | 480 |
| gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg  | 540 |
| ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc  | 600 |
| ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag                  | 645 |

<210> 20  
<211> 321  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 20

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctacat ctgtaggaga cagagtcacc  | 60  |
| atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca  | 120 |
| gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca  | 180 |
| aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct  | 240 |
| gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacaatt ccccgtagcag ttttggccag | 300 |
| gggaccaagc tggagatcaa a                                            | 321 |



313

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

|                                                                   |              |    |
|-------------------------------------------------------------------|--------------|----|
| <210>                                                             | 21           |    |
| <211>                                                             | 33           |    |
| <212>                                                             | DNA          |    |
| <213>                                                             | Homo sapiens |    |
| <400>                                                             | 21           |    |
| cgggcaagtc agagcattag cagctattta aat                              |              | 33 |
| <210>                                                             | 22           |    |
| <211>                                                             | 21           |    |
| <212>                                                             | DNA          |    |
| <213>                                                             | Homo sapiens |    |
| <400>                                                             | 22           |    |
| gctgcatcca gtttgcaaag t                                           |              | 21 |
| <210>                                                             | 23           |    |
| <211>                                                             | 27           |    |
| <212>                                                             | DNA          |    |
| <213>                                                             | Homo sapiens |    |
| <400>                                                             | 23           |    |
| caacagagtt acaattcccc gtgcagt                                     |              | 27 |
| <210>                                                             | 24           |    |
| <211>                                                             | 69           |    |
| <212>                                                             | DNA          |    |
| <213>                                                             | Homo sapiens |    |
| <400>                                                             | 24           |    |
| gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctacat ctgtaggaga cagagtcacc |              | 60 |
| atcacttgc                                                         |              | 69 |
| <210>                                                             | 25           |    |
| <211>                                                             | 45           |    |
| <212>                                                             | DNA          |    |
| <213>                                                             | Homo sapiens |    |
| <400>                                                             | 25           |    |
| tggtatcagc agaaaccagg gaaagcccct aagctcctga tctat                 |              | 45 |
| <210>                                                             | 26           |    |
| <211>                                                             | 96           |    |
| <212>                                                             | DNA          |    |
| <213>                                                             | Homo sapiens |    |
| <400>                                                             | 26           |    |
| ggggtcccat caaggttcag tggcagtgga tctgggacag atttcactct caccatcagc |              | 60 |
| agtctgcaac ctgaagattt tgcaacttac tactgt                           |              | 96 |
| <210>                                                             | 27           |    |
| <211>                                                             | 30           |    |
| <212>                                                             | DNA          |    |
| <213>                                                             | Homo sapiens |    |
| <400>                                                             | 27           |    |
| tttggccagg ggaccaagct ggagatcaaa                                  |              | 30 |
| <210>                                                             | 28           |    |
| <211>                                                             | 214          |    |
| <212>                                                             | PRT          |    |
| <213>                                                             | Homo sapiens |    |
| <400>                                                             | 28           |    |

314

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Asn Ser Pro Cys  
85 90 95

Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Lys Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 29  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 29

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

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

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

315

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Asn Ser Pro Cys  
85 90 95

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

<210> 30  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 30

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn  
1 5 10

<210> 31  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 31

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
1 5

<210> 32  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 32

Gln Gln Ser Tyr Asn Ser Pro Cys Ser  
1 5

<210> 33  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 33

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
20

<210> 34  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 34

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

316

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

<210> 35  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 35

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

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 36  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 36

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
1 5 10

<210> 37  
<211> 1350  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 37

|             |             |             |            |             |             |      |
|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| cagggtgcagc | tggtgcagtc  | tggggctgag  | gtgaagaagc | ctggggcctc  | agtgaagggt  | 60   |
| tcctgcaagg  | catctggata  | caccttcacc  | agctactata | tgcactggat  | acgacaggcc  | 120  |
| cctggacaag  | ggcttgagtg  | gatgggaatg  | atcaacccta | gtggtggtag  | cacaacctac  | 180  |
| gcacagaagt  | tccagggcag  | agtcaccttg  | accagggaca | cgccacgag   | cacagtctac  | 240  |
| atggacctga  | gcagcctgag  | atctgaggac  | acggccgtat | attactgtgc  | gagagagaga  | 300  |
| tggtataagt  | ggaacttcga  | tgtttttgat  | atctggggcc | aagggacaat  | ggtcaccgtc  | 360  |
| tcttcagctt  | ccaccaaggg  | cccatccgtc  | ttccccctgg | cgccctgctc  | caggagcacc  | 420  |
| tccgagagca  | cagccgccct  | gggctgcctg  | gtcaaggact | acttccccga  | accggtgacg  | 480  |
| gtgtcgtgga  | actcaggcgc  | cctgaccagc  | ggcgtgcaca | ccttcccggc  | tgtcctacag  | 540  |
| tcctcaggac  | tctactccct  | cagcagcgtg  | gtgaccgtgc | cctccagcag  | cttgggcacg  | 600  |
| aagacctaca  | cctgcaacgt  | agatcacaag  | cccagcaaca | ccaagggtgga | caagagagtt  | 660  |
| gagtcctaat  | atggtccccc  | atgcccata   | tgcccagcac | ctgagttcct  | ggggggacca  | 720  |
| tcagtcttcc  | tgttcccccc  | aaaacccaag  | gacactctca | tgatctcccg  | gacccctgag  | 780  |
| gtcacgtgcg  | tggtggtgga  | cgtgagccag  | gaagaccccg | agggtccagtt | caactggtac  | 840  |
| gtggatggcg  | tggaggtgca  | taatgccaag  | acaaagccgc | gggaggagca  | gttcaacagc  | 900  |
| acgtaccgtg  | tggtcagcgt  | cctcaccgtc  | ctgcaccagg | actggctgaa  | cggcaaggag  | 960  |
| tacaagtgca  | agggtctcaa  | caaaggcctc  | ccgtcctcca | tcgagaaaac  | catctccaaa  | 1020 |
| gccaaagggc  | agccccgaga  | gccacagggtg | tacaccctgc | ccccatcca   | ggaggagatg  | 1080 |
| accaagaacc  | agggtcagcct | gacctgcctg  | gtcaaaggct | tctaccccag  | cgacatcgcc  | 1140 |
| gtggagtggg  | agagcaatgg  | gcagccggag  | aacaactaca | agaccacgcc  | tcccgtgctg  | 1200 |
| gactccgacg  | gctccttctt  | cctctacagc  | aggctaaccg | tggacaagag  | cagggtggcag | 1260 |

3A

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3                           |      |
| gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag   | 1320 |
| aagagcctct ccctgtctct gggtaaatga                                    | 1350 |
| <210> 38                                                            |      |
| <211> 366                                                           |      |
| <212> DNA                                                           |      |
| <213> Homo sapiens                                                  |      |
| <400> 38                                                            |      |
| caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaagggtt | 60   |
| tcctgcaagg catctggata caccttcacc agctactata tgcactggat acgacaggcc   | 120  |
| cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg atcaacccta gtggtggtag cacaacctac   | 180  |
| gcacagaagt tccagggcag agtcaccttg accagggaca cgtccacgag cacagtctac   | 240  |
| atggacctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtat attactgtgc gagagagaga   | 300  |
| tggtataagt ggaacttcga tgtttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc   | 360  |
| tcttca                                                              | 366  |
| <210> 39                                                            |      |
| <211> 15                                                            |      |
| <212> DNA                                                           |      |
| <213> Homo sapiens                                                  |      |
| <400> 39                                                            |      |
| agctactata tgcac                                                    | 15   |
| <210> 40                                                            |      |
| <211> 51                                                            |      |
| <212> DNA                                                           |      |
| <213> Homo sapiens                                                  |      |
| <400> 40                                                            |      |
| atgatcaacc ctagtgggtgg tagcacaacc tacgcacaga agttccaggg c           | 51   |
| <210> 41                                                            |      |
| <211> 39                                                            |      |
| <212> DNA                                                           |      |
| <213> Homo sapiens                                                  |      |
| <400> 41                                                            |      |
| gagagatggt ataagtggaa cttcgatggt tttgatatc                          | 39   |
| <210> 42                                                            |      |
| <211> 90                                                            |      |
| <212> DNA                                                           |      |
| <213> Homo sapiens                                                  |      |
| <400> 42                                                            |      |
| caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaagggtt | 60   |
| tcctgcaagg catctggata caccttcacc                                    | 90   |
| <210> 43                                                            |      |
| <211> 42                                                            |      |
| <212> DNA                                                           |      |
| <213> Homo sapiens                                                  |      |
| <400> 43                                                            |      |
| tggatacgac agggcccctgg acaagggctt gagtggatgg ga                     | 42   |
| <210> 44                                                            |      |
| <211> 96                                                            |      |

318

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 44  
agagtcacct tgaccagggg caggtccacg agcacagtct acatggacct gagcagcctg 60  
agatctgagg acacggccgt atattactgt gcgaga 96

<210> 45  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 45  
tggggccaag ggacaatggt caccgtctct tca 33

<210> 46  
<211> 449  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 46

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

Tyr Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Met Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Arg Trp Tyr Lys Trp Asn Phe Asp Val Phe Asp Ile Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr  
130 135 140

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

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

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

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp  
195 200 205

319

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

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

Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro  
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp  
260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
275 280 285

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

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys  
325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
370 375 380

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

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

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
435 440 445

Lys

- <210> 47
- <211> 122
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 47

Gln val Gln Leu val Gln Ser Gly Ala Glu val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

320

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

Tyr Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Met Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Arg Trp Tyr Lys Trp Asn Phe Asp Val Phe Asp Ile Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 48  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 48

Ser Tyr Tyr Met His  
1 5

<210> 49  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 49

Met Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
1 5 10 15

Gly

<210> 50  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 50

Glu Arg Trp Tyr Lys Trp Asn Phe Asp Val Phe Asp Ile  
1 5 10

<210> 51  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 51

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
Página 14



321

1 5 LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
20 25 30

<210> 52  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 52

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

<210> 53  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 53

Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Asp  
1 5 10 15

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

<210> 54  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 54

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

<210> 55  
<211> 648  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 55

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60  
atctcctgca ggtctagtca aagccccgta tacagtgatg gaaacaccta cttgaattgg 120  
cttcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt ataaggtttc taactgggac 180  
gctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240  
agcaggggtgg aggctgagga tgttgggttt tattacactg gccgatcgat caccgtcggc 300  
caagggacac gactggagat taaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360  
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420  
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480  
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540  
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600  
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttag 648

<210> 56  
<211> 324

302

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

|             |              |            |                                  |     |
|-------------|--------------|------------|----------------------------------|-----|
| <212>       | DNA          |            |                                  |     |
| <213>       | Homo sapiens |            |                                  |     |
| <400>       | 56           |            |                                  |     |
| gatgttgtga  | tgactcagtc   | tccactctcc | ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc | 60  |
| atctcctgca  | ggcttagtca   | aagccccgta | tacagtgatg gaaacaccta cttgaattgg | 120 |
| cttcagcaga  | ggccaggcca   | atctccaagg | cgcctaattt ataaggtttc taactgggac | 180 |
| gctgggggtcc | cagacagatt   | cagcggcagt | gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc | 240 |
| agcaggggtgg | aggctgagga   | tgttgggttt | tattacactg gccgatcgat caccgtcggc | 300 |
| caagggacac  | gactggagat   | taaa       |                                  | 324 |
| <210>       | 57           |            |                                  |     |
| <211>       | 48           |            |                                  |     |
| <212>       | DNA          |            |                                  |     |
| <213>       | Homo sapiens |            |                                  |     |
| <400>       | 57           |            |                                  |     |
| aggtctagtc  | aaagccccgt   | atacagtgat | ggaaacacct acttgaat              | 48  |
| <210>       | 58           |            |                                  |     |
| <211>       | 21           |            |                                  |     |
| <212>       | DNA          |            |                                  |     |
| <213>       | Homo sapiens |            |                                  |     |
| <400>       | 58           |            |                                  |     |
| aaggtttcta  | actgggacgc   | t          |                                  | 21  |
| <210>       | 59           |            |                                  |     |
| <211>       | 18           |            |                                  |     |
| <212>       | DNA          |            |                                  |     |
| <213>       | Homo sapiens |            |                                  |     |
| <400>       | 59           |            |                                  |     |
| actggccgat  | cgatcacc     |            |                                  | 18  |
| <210>       | 60           |            |                                  |     |
| <211>       | 69           |            |                                  |     |
| <212>       | DNA          |            |                                  |     |
| <213>       | Homo sapiens |            |                                  |     |
| <400>       | 60           |            |                                  |     |
| gatgttgtga  | tgactcagtc   | tccactctcc | ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc | 60  |
| atctcctgc   |              |            |                                  | 69  |
| <210>       | 61           |            |                                  |     |
| <211>       | 45           |            |                                  |     |
| <212>       | DNA          |            |                                  |     |
| <213>       | Homo sapiens |            |                                  |     |
| <400>       | 61           |            |                                  |     |
| tggcttcagc  | agaggccagg   | ccaatctcca | aggcgcctaa tttat                 | 45  |
| <210>       | 62           |            |                                  |     |
| <211>       | 93           |            |                                  |     |
| <212>       | DNA          |            |                                  |     |
| <213>       | Homo sapiens |            |                                  |     |
| <400>       | 62           |            |                                  |     |
| gggggtcccag | acagattcag   | cggcagtggg | tcaggcactg atttcacact gaaaatcagc | 60  |
| aggggtggagg | ctgaggatgt   | tgggttttat | tac                              | 93  |

323

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

<210> 63  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 63  
gtcggccaag ggacacgact ggagattaaa

30

<210> 64  
<211> 215  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 64

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Pro Val Tyr Ser  
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Trp Asp Ala Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Phe Tyr Tyr Thr Gly Arg Ser  
85 90 95

Ile Thr Val Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala  
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser  
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu  
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser  
145 150 155 160

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 65  
<211> 108  
<212> PRT

324

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

<213> Homo sapiens

<400> 65

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Pro Val Tyr Ser  
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Trp Asp Ala Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Phe Tyr Tyr Thr Gly Arg Ser  
85 90 95

Ile Thr Val Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 66

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Arg Ser Ser Gln Ser Pro Val Tyr Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn  
1 5 10 15

<210> 67

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Lys Val Ser Asn Trp Asp Ala  
1 5

<210> 68

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Thr Gly Arg Ser Ile Thr  
1 5

<210> 69

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

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

225

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys  
20

<210> 70  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 70

Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr  
1 5 10 15

<210> 71  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 71

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

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Phe Tyr Tyr  
20 25 30

<210> 72  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 72

Val Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
1 5 10

<210> 73  
<211> 1350  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 73  
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctggact caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120  
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atattatatg atggaaagaa taaatactat 180  
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcag 300  
gcgtactgga cctactttga tgcttttgat atctggggcc aagggaacaat ggtcaccgtc 360  
tcttcagctt ccaccaaggg cccatccgtc ttccccctgg cgccctgctc caggagcacc 420  
tccgagagca cagccgccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480  
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca cttccccgc tgcctacag 540  
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttggggcag 600  
aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaagggtgga caagagagtt 660  
gagtccaaat atggtccccc atgcccatca tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca 720  
tcagtcttcc tggtccccc aaaacccaag gacactctca tgatctccc gaccctgag 780  
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagacccc aggtccagtt caactggtac 840

326

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc | 900  |
| acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag | 960  |
| tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa | 1020 |
| gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg | 1080 |
| accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctacccag cgacatcgcc  | 1140 |
| gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg | 1200 |
| gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag caggtggcag | 1260 |
| gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag | 1320 |
| aagagcctct ccctgtctct gggtaaatga                                  | 1350 |

<210> 74  
<211> 366  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| <400> 74                                                           |     |
| caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc | 60  |
| tcctgtgcag cctctggact caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct  | 120 |
| ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atattatatg atggaaagaa taaatactat  | 180 |
| gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat  | 240 |
| ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcag  | 300 |
| gcgtactgga cctactttga tgcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc  | 360 |
| tcttca                                                             | 366 |

<210> 75  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

|                  |    |
|------------------|----|
| <400> 75         |    |
| agctatggca tgcac | 15 |

<210> 76  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| <400> 76                                                 |    |
| gttatattat atgatggaaa gaataaatac tatgcagact ccgtgaaggg c | 51 |

<210> 77  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

|                                            |    |
|--------------------------------------------|----|
| <400> 77                                   |    |
| gatcaggcgt actggaccta ctttgatgct tttgatatc | 39 |

<210> 78  
<211> 90  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| <400> 78                                                           |    |
| caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc | 60 |

327

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

tcctgtgcag cctctggact caccttcagt 90

<210> 79  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 79  
tgggtccgcc aggtccagg caaggggctg gagtgggtgg ca 42

<210> 80  
<211> 96  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 80  
cgattcacca tctccagaga caattccaag aacacgctgt atctgcaaat gaacagcctg 60

agagctgagg acacggctgt gtattactgt gcgaga 96

<210> 81  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 81  
tggggccaag ggacaatggt caccgtctct tca 33

<210> 82  
<211> 449  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 82

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Gln Ala Tyr Trp Thr Tyr Phe Asp Ala Phe Asp Ile Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr  
130 135 140

328

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Lys | Thr | Tyr | Thr | Cys | Asn | Val | Asp |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Arg | Val | Glu | Ser | Lys | Tyr |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Gly | Pro | Pro | Cys | Pro | Ser | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Phe | Leu | Gly | Gly | Pro |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | Gln | Glu | Asp |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Pro | Glu | Val | Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Phe | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Gly | Leu | Pro | Ser | Ser | Ile | Glu | Lys |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Leu | Pro | Pro | Ser | Gln | Glu | Glu | Met | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Arg | Leu | Thr | Val | Asp | Lys |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Ser | Arg | Trp | Gln | Glu | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Leu | Gly |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |



329

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

Lys

<210> 83  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 83

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Gln Ala Tyr Trp Thr Tyr Phe Asp Ala Phe Asp Ile Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 84  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 84

Ser Tyr Gly Met His  
1 5

<210> 85  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 85

Val Ile Leu Tyr Asp Gly Lys Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 86  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

330

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

<400> 86

Asp Gln Ala Tyr Trp Thr Tyr Phe Asp Ala Phe Asp Ile  
1 5 10

<210> 87

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

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

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

<210> 88

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

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

<210> 89

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

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

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

<210> 90

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

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

<210> 91

<211> 645

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 91

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc | 60  |
| atcacctgcc gggccagtca gagcattggt agtagcttac actggtacca gcagaaacca | 120 |
| gatcagtctc caaagctcct catcaagtat gcttcccagt ccttctcagg ggtcccctcg | 180 |
| aggttcagtg gcagtggatc tgcgacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct | 240 |
| gaagatgctg caacgtatta ctgtcatcag agtagtagtt taccgctcac tttcggcgga | 300 |

331

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcc    | 360 |
| tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat  | 420 |
| cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag | 480 |
| gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg  | 540 |
| ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc  | 600 |
| ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag                  | 645 |

<210> 92  
<211> 321  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| <400> 92                                                           |     |
| gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc  | 60  |
| atcacctgcc gggccagtc gagcattggt agtagcttac actggtacca gcagaaacca   | 120 |
| gatcagtcctc caaagctcct catcaagtat gcttcccagt ccttctcagg ggtcccctcg | 180 |
| aggttcagtg gcagtggatc tgcgacagat ttcacctca ccatcaatag cctggaagct   | 240 |
| gaagatgctg caacgtatta ctgtcatcag agtagtagtt taccgctcac ttccggcgga  | 300 |
| gggaccaagg tggagatcaa a                                            | 321 |

<210> 93  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| <400> 93                             |    |
| cgggccagtc agagcattgg tagtagctta cac | 33 |

<210> 94  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

|                         |    |
|-------------------------|----|
| <400> 94                |    |
| tatgcttccc agtccttctc a | 21 |

<210> 95  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| <400> 95                      |    |
| catcagagta gtagtttacc gctcact | 27 |

<210> 96  
<211> 69  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| <400> 96                                                          |    |
| gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc | 60 |
| atcacctgc                                                         | 69 |

<210> 97  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

<400> 97  
tggtagcagc agaaaccaga tcagtctcca aagctcctca tcaag 45

```
<210> 98
<211> 96
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

<400> 98  
gggggtcccct cgaggttcag tggcagtgga tctgcgacag atttcaccct caccatcaat 60  
agcctggaag ctgaagatgc tgcaacgtat tactgt 96

```
<210> 99
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

<400> 99  
ttcggcggag ggaccaaggt ggagatcaaa 30

|       |              |
|-------|--------------|
| <210> | 100          |
| <211> | 214          |
| <212> | PRT          |
| <213> | Homo sapiens |

$\langle 400 \rangle$  100

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys  
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser  
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala  
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

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

333

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3  
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 101  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 101

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys  
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser  
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala  
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 102  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 102

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His  
1 5 10

<210> 103  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 103

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser  
1 5

<210> 104  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 104

334

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Leu Thr  
1 5

<210> 105  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 105

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys  
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys  
20

<210> 106  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 106

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys  
1 5 10 15

<210> 107  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 107

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr  
1 5 10 15

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

<210> 108  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 108

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
1 5 10

<210> 109  
<211> 645  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 109

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc | 60  |
| atcacctgcc gggccagtc gagcattggt agtagcttac actggtacca gcagaaacca  | 120 |
| gatcagtcctc caaagctcct catcaagtat gcttcccagt cttctcagg ggtcccctcg | 180 |
| aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct | 240 |
| gaagatgctg caacgtatta ctgtcatcag agtagtagtt taccgctcac tttcggcgga | 300 |
| gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcga | 360 |

535

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

|                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------|-----|
| tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgtttgtgt gcctgctgaa taactttctat | 420 |
| cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag   | 480 |
| gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg   | 540 |
| ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc   | 600 |
| ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag                   | 645 |

<210> 110  
<211> 321  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 110

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc | 60  |
| atcacctgcc gggccagtca gagcattggt agtagcttac actggtacca gcagaaacca | 120 |
| gatcagtctc caaagctcct catcaagtat gcttcccagt ctttctcagg ggtcccctcg | 180 |
| aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct | 240 |
| gaagatgctg caacgtatta ctgtcatcag agtagtagtt taccgctcac tttcggcgga | 300 |
| gggaccaagg tggagatcaa a                                           | 321 |

<210> 111  
<211> 96  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 111

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| gggggtcccct cgaggttcag tggcagtgga tctgggacag atttcaccct caccatcaat | 60 |
| agcctggaag ctgaagatgc tgcaacgtat tactgt                            | 96 |

<210> 112  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 112

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

736

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 113  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 113

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys  
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser  
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala  
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 114  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 114

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



337

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3  
Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 115  
<211> 1350  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 115  
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctggact caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120  
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atattatatg atggaaagaa taaatactat 180  
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcag 300  
gcgtactgga cctactttga tgcttttgat atctggggcc aagggaacaat ggtcaccgtc 360  
tcttcagctt ccaccaaggg cccatccgtc ttccccctgg cgccctgctc caggagcacc 420  
tccgagagca cagccgcctt gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480  
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgcctacag 540  
tcctcaggac tctactcctt cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg 600  
aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt 660  
gagtccaaat atggtcccc atgcccacca tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca 720  
tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gacccctgag 780  
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 840  
gtggatggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc 900  
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 960  
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa 1020  
gccaaagggc agccccgaga gccacagggtg tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg 1080  
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1140  
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200  
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag caggtggcag 1260  
gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag 1320  
aagagcctct ccctgtctct gggtaaatga 1350

<210> 116  
<211> 449  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 116  
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30  
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

338

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

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

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

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

Ala Arg Asp Gln Ala Tyr Trp Thr Tyr Phe Asp Ala Phe Asp Ile Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr  
130 135 140

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

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

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

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp  
195 200 205

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

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro  
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp  
260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
275 280 285

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

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys  
325 330 335

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

339

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 355 360 365  
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 370 375 380  
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385 390 395  
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys  
 405 410 415  
 Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420 425 430  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
 435 440 445

Lys

<210> 117  
 <211> 389  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 117

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

340

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val  
165 170 175

Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe Gly Val Val Thr Ser Val  
180 185 190

Ile Thr Trp Leu Val Ala Val Phe Ala Ser Val Pro Gly Ile Ile Phe  
195 200 205

Thr Lys Cys Gln Lys Glu Asp Ser Val Tyr Val Cys Gly Pro Tyr Phe  
210 215 220

Pro Arg Gly Trp Asn Asn Phe His Thr Ile Met Arg Asn Ile Leu Gly  
225 230 235 240

Leu Val Leu Pro Leu Leu Ile Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly Ile Leu  
245 250 255

Lys Thr Leu Leu Arg Cys Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg Ala Val  
260 265 270

Arg Val Ile Phe Thr Ile Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp Thr Pro  
275 280 285

Tyr Asn Ile Val Ile Leu Leu Asn Thr Phe Gln Asp Phe Leu Phe Thr  
290 295 300

His Glu Cys Glu Gln Ser Arg His Leu Asp Leu Ala Val Gln Val Thr  
305 310 315 320

Glu Val Ile Ala Tyr Thr His Cys Cys Val Asn Pro Val Ile Tyr Ala  
325 330 335

Phe Val Gly Glu Arg Phe Arg Lys Tyr Leu Arg Gln Leu Phe His Arg  
340 345 350

Arg Val Ala Val His Leu Val Lys Trp Leu Pro Phe Leu Ser Val Asp  
355 360 365

Arg Leu Glu Arg Val Ser Ser Thr Ser Pro Ser Thr Gly Glu His Glu  
370 375 380

Leu Ser Ala Gly Phe  
385

<210> 118  
<211> 1167  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 118  
atggacagca aaggttcgtc gcagaaaggg tccgcctgc tcctgctgct ggtggtgtca 60  
aatctactct tgtgccaggg tgtggtctcc gattacaaag atgatgatga tgtcgacgaa 120  
actccaaaca ccacagagga ctatgacacg accacagagt ttgactatgg ggatgcaact 180  
ccgtgccaga aggtgaacga gagggccttt ggggcccaac tcctgcctcc gctctactcg 240  
Página 34

341

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| ctggtgttca tctttggttt tgtgggcaac atgctggctg tcctcatctt aataaactgc  | 300  |
| aaaaagctga agtgcttgac tgacatttac ctgctcaacc tggccatctc tgatctgctt  | 360  |
| tttcttatta ctctccatt gtgggctcac tctgctgcaa atgagtgggt ctttgggaat   | 420  |
| gcaatgtgca aattattcac agggctgtat cacatcggtt attttggcgg aatcttcttc  | 480  |
| atcatctcc tgacaatcga tagatacctg gctattgtcc atgctgtgtt tgctttaaaa   | 540  |
| gccaggacgg tcacctttgg ggtggtgaca agtgatgatca cctggttggt ggctgtgttt | 600  |
| gcttctgtcc caggaatcat ctttactaaa tgccagaaag aagattctgt ttatgtctgt  | 660  |
| ggcccttatt ttccacgagg atggaataat ttccacacaa taatgaggaa cttttgggg   | 720  |
| ctggtcctgc cgctgctcat catggtcatc tgctactcgg gaatcctgaa aaccctgctt  | 780  |
| cggtgtcgaa acgagaagaa gaggcatagg gcagtgagag tcattcttcac catcatgatt | 840  |
| gtttactttc tcttctggac tccctataac attgtcattc tcctgaacac cttccaagac  | 900  |
| ttcctgttca cccatgagtg tgagcagagc agacatttggt acctggctgt gcaagtgacg | 960  |
| gaggtgatcg cctacacgca ctgctgtgtc aaccagtgta tctacgcctt cgttggtgag  | 1020 |
| aggttccgga agtacctgcg gcagttgttc cacaggcgtg tggctgtgca cctgggttaa  | 1080 |
| tggtccctt tcctctccgt ggacaggctg gagagggtca gctccacatc tccctccaca   | 1140 |
| ggggagcatg aactctctgc tgggttc                                      | 1167 |

<210> 119  
<211> 394  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 119

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| Met | Asp | Ser | Lys | Gly | Ser | Ser | Gln | Lys | Gly | Ser | Arg | Leu | Leu | Leu | Leu | 1   | 5   | 10  | 15 |
| Leu | Val | Val | Ser | Asn | Leu | Leu | Leu | Cys | Gln | Gly | Val | Val | Ser | Asp | Tyr | 20  | 25  | 30  |    |
| Lys | Asp | Asp | Asp | Asp | Val | Asp | Glu | Thr | Pro | Asn | Thr | Thr | Glu | Asp | Tyr | 35  | 40  | 45  |    |
| Asp | Thr | Thr | Thr | Glu | Phe | Asp | Tyr | Gly | Asp | Ala | Thr | Pro | Cys | Gln | Lys | 50  | 55  | 60  |    |
| Val | Asn | Glu | Arg | Ala | Phe | Gly | Ala | Gln | Leu | Leu | Pro | Pro | Leu | Tyr | Ser | 65  | 70  | 75  | 80 |
| Leu | Val | Phe | Val | Ile | Gly | Leu | Val | Gly | Asn | Ile | Leu | Val | Val | Leu | Val | 85  | 90  | 95  |    |
| Leu | Val | Gln | Tyr | Lys | Arg | Leu | Lys | Asn | Met | Thr | Ser | Ile | Tyr | Leu | Leu | 100 | 105 | 110 |    |
| Asn | Leu | Ala | Ile | Ser | Asp | Leu | Leu | Phe | Leu | Phe | Thr | Leu | Pro | Phe | Trp | 115 | 120 | 125 |    |
| Ile | Asp | Tyr | Lys | Leu | Lys | Asp | Asp | Trp | Val | Phe | Gly | Asp | Ala | Met | Cys | 130 | 135 | 140 |    |

342

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

Lys Ile Leu Ser Gly Phe Tyr Tyr Thr Gly Leu Tyr Ser Glu Ile Phe  
145 150 155 160

Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala  
165 170 175

Val Phe Ala Leu Arg Ala Arg Thr Val Thr Phe Gly Val Ile Thr Ser  
180 185 190

Ile Ile Ile Trp Ala Leu Ala Ile Leu Ala Ser Met Pro Gly Leu Tyr  
195 200 205

Phe Ser Lys Thr Gln Trp Glu Phe Thr His His Thr Cys Ser Leu His  
210 215 220

Phe Pro His Glu Ser Leu Arg Glu Trp Lys Leu Phe Gln Ala Leu Lys  
225 230 235 240

Leu Asn Leu Phe Gly Leu Val Leu Pro Leu Leu Val Met Ile Ile Cys  
245 250 255

Tyr Thr Gly Ile Ile Lys Ile Leu Leu Arg Arg Pro Asn Glu Lys Lys  
260 265 270

Ser Lys Ala Val Arg Leu Ile Phe Val Ile Met Ile Ile Phe Phe Leu  
275 280 285

Phe Trp Thr Pro Tyr Asn Leu Thr Ile Leu Ile Ser Val Phe Gln Glu  
290 295 300

Phe Phe Gly Leu Ser Asn Cys Glu Ser Thr Ser Gln Leu Asp Gln Ala  
305 310 315 320

Thr Gln Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr His Cys Cys Ile Asn Pro  
325 330 335

Ile Ile Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe Arg Arg Tyr Leu Ser Val  
340 345 350

Phe Phe Arg Lys His Ile Thr Lys Arg Phe Cys Lys Gln Cys Pro Val  
355 360 365

Phe Tyr Arg Glu Thr Val Asp Gly Val Thr Ser Thr Asn Thr Pro Ser  
370 375 380

Thr Gly Glu Gln Glu Val Ser Ala Gly Leu  
385 390

<210> 120  
<211> 1182  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 120  
atggacagca aaggttcgtc gcagaaaggg tccgcctgct tcctgctgct ggtggtgtca 60  
aatctactct tgtgccaggg tgtggtctcc gattacaaag atgatgatga tgtcgacgaa 120  
Página 36

343

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| actccaaaca ccacagagga ctatgacacg accacagagt ttgactatgg ggatgcaact  | 180  |
| ccgtgccaga aggtgaacga gagggccttt ggggcccaac tgctgcccc tctgtactcc   | 240  |
| ttggtatttg tcattggcct gggtggaac atcctggtgg tcctggctct tgtgcaatac   | 300  |
| aagaggctaa aaaacatgac cagcatctac ctctgaacc tggccatttc tgacctgctc   | 360  |
| ttcctgttca cgcttcctt ctggatcgac tacaagttga aggatgactg ggtttttggt   | 420  |
| gatgccatgt gtaagatcct ctctgggttt tattacacag gcttgtagag cgagatcttt  | 480  |
| ttcatcatcc tgctgacgat tgacaggtac ctggccatcg tccacgccgt gtttgacctg  | 540  |
| cgggcacgga ccgtcacttt tgggtgtcatc accagcatca tcatttgggc cctggccatc | 600  |
| ttggcttcca tgccaggctt atacttttcc aagaccaat gggaattcac tcaccacacc   | 660  |
| tgcagccttc actttcctca cgaaagccta cgagagtggg agctgtttca ggctctgaaa  | 720  |
| ctgaacctct ttgggctggg attgcctttg ttggtcatga tcatctgcta cacagggatt  | 780  |
| ataaagattc tgctaagacg accaaatgag aagaaatcca aagctgtccg tttgattttt  | 840  |
| gtcatcatga tcactttttt tctcttttgg accccctaca atttgactat acttatttct  | 900  |
| gttttccagg aattcttcgg cctgagtaac tgtgaaagca ccagtcaact ggaccaagcc  | 960  |
| acgcaggtga cagagactct tgggatgact cactgctgca tcaatcccat catctatgcc  | 1020 |
| ttcgttgggg agaagttcag aaggtatctc tcggtgttct tccgaaagca catcaccaag  | 1080 |
| cgcttctgca aacaatgtcc agttttctac agggagacag tggatggagt gacttcaaca  | 1140 |
| aacacgcctt ccactgggga gcaggaagtc tcggctgggt ta                     | 1182 |

<210> 121  
<211> 390  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 121

Met Asp Ser Lys Gly Ser Ser Gln Lys Gly Ser Arg Leu Leu Leu Leu  
1 5 10 15

Leu Val Val Ser Asn Leu Leu Leu Cys Gln Gly Val Val Ser Asp Tyr  
20 25 30

Lys Asp Asp Asp Asp Val Asp Glu Thr Pro Asn Thr Thr Glu Asp Tyr  
35 40 45

Asp Thr Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Gly Asp Ala Thr Pro Cys Gln Lys  
50 55 60

Val Asn Glu Arg Ala Phe Gly Ala Gln Leu Leu Pro Pro Leu Tyr Ser  
65 70 75 80

Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn Met Leu Val Val Leu Ile  
85 90 95

Leu Ile Asn Cys Lys Lys Leu Lys Cys Leu Thr Asp Ile Tyr Leu Leu  
100 105 110

Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu Ile Thr Leu Pro Leu Trp  
115 120 125

344

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

Ala His Ser Ala Ala Asn Glu Trp Val Phe Gly Asn Ala Met Cys Lys  
130 135 140

Leu Phe Thr Gly Leu Tyr His Ile Gly Tyr Phe Gly Gly Ile Phe Phe  
145 150 155 160

Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val  
165 170 175

Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe Gly Val Val Thr Ser Val  
180 185 190

Ile Thr Trp Leu Val Ala Val Phe Ala Ser Val Pro Gly Ile Ile Phe  
195 200 205

Thr Lys Cys Gln Lys Glu Asp Ser Val Tyr Val Cys Gly Pro Tyr Phe  
210 215 220

Pro Arg Gly Trp Asn Asn Phe His Thr Ile Met Arg Asn Ile Leu Gly  
225 230 235 240

Leu Val Leu Pro Leu Leu Ile Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly Ile Leu  
245 250 255

Lys Thr Leu Leu Arg Cys Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg Ala Val  
260 265 270

Arg Val Ile Phe Thr Ile Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp Thr Pro  
275 280 285

Tyr Asn Ile Val Ile Leu Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe Gly Leu  
290 295 300

Ser Asn Cys Glu Ser Thr Ser Gln Leu Asp Gln Ala Thr Gln Val Thr  
305 310 315 320

Glu Thr Leu Gly Met Thr His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Ala  
325 330 335

Phe Val Gly Glu Lys Phe Arg Arg Tyr Leu Ser Val Phe Phe Arg Lys  
340 345 350

His Ile Thr Lys Arg Phe Cys Lys Gln Cys Pro Val Phe Tyr Arg Glu  
355 360 365

Thr Val Asp Gly Val Thr Ser Thr Asn Thr Pro Ser Thr Gly Glu Gln  
370 375 380

Glu Val Ser Ala Gly Leu  
385 390

<210> 122  
<211> 1170  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens



345

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| <400> 122                                                          |      |
| atggacagca aaggttcgtc gcagaaaggg tccgcctgc tcctgctgct ggtggtgtca   | 60   |
| aatctactct tgtgccaggg tgtggtctcc gattacaaag atgatgatga tgtcgacgaa  | 120  |
| actccaaaca ccacagagga ctatgacacg accacagagt ttgactatgg ggatgcaact  | 180  |
| ccgtgccaga aggtgaacga gagggccttt ggggcccaac tcctgcctcc gctctactcg  | 240  |
| ctggtgttca tctttggttt tgtgggcaac atgctggctg tcctcatctt aataaactgc  | 300  |
| aaaaagctga agtgcttgac tgacatttac ctgctcaacc tggccatctc tgatctgctt  | 360  |
| tttcttatta ctctccatt gtgggctcac tctgctgcaa atgagtgggt ctttggaat    | 420  |
| gcaatgtgca aattattcac agggctgtat cacatcggtt attttggcgg aatcttcttc  | 480  |
| atcatcctcc tgacaatcga tagatacctg gctattgtcc atgctgtggt tgctttaaaa  | 540  |
| gccaggacgg tcaccttgg ggtggtgaca agtgatgatca cctggttggg ggctgtgttt  | 600  |
| gcttctgtcc caggaatcat ctttactaaa tgccagaaag aagattctgt ttatgtctgt  | 660  |
| ggcccttatt ttccacgagg atggaataat ttccacacaa taatgaggaa cattttgggg  | 720  |
| ctggtcctgc cgctgctcat catggtcatc tgctactcgg gaatcctgaa aaccctgctt  | 780  |
| cgggtgtcgaa acgagaagaa gaggcatagg gcagtgagag tcatcttcac catcatgatt | 840  |
| gtttactttc tcttctggac tccctataac attgtcattc tcctgaacac cttccaggaa  | 900  |
| ttcttcggcc tgagtaactg tgaaagcacc agtcaactgg accaagccac gcaggtgaca  | 960  |
| gagactcttg ggatgactca ctgctgcac aatcccatca tctatgcctt cgttggggag   | 1020 |
| aagttcagaa ggtatctctc ggtgttcttc cgaaagcaca tcaccaagcg cttctgcaaa  | 1080 |
| caatgtccag ttttctacag ggagacagtg gatggagtga cttcaacaaa cacgccttcc  | 1140 |
| actggggagc aggaagtctc ggctgggttta                                  | 1170 |

- <210> 123
- <211> 400
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 123

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

346

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

Cys Leu Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu  
115 120 125

Phe Leu Ile Thr Leu Pro Leu Trp Ala His Ser Ala Ala Asn Glu Trp  
130 135 140

Val Phe Gly Asn Ala Met Cys Lys Leu Phe Thr Gly Leu Tyr His Ile  
145 150 155 160

Gly Tyr Phe Gly Gly Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg  
165 170 175

Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe Ala Leu Arg Ala Arg Thr Val  
180 185 190

Thr Phe Gly Val Ile Thr Ser Ile Ile Ile Trp Ala Leu Ala Ile Leu  
195 200 205

Ala Ser Met Pro Gly Leu Tyr Phe Ser Lys Thr Gln Trp Glu Phe Thr  
210 215 220

His His Thr Cys Ser Leu His Phe Pro His Glu Ser Leu Arg Glu Trp  
225 230 235 240

Lys Leu Phe Gln Ala Leu Lys Leu Asn Leu Phe Gly Leu Val Leu Pro  
245 250 255

Leu Leu Val Met Ile Ile Cys Tyr Thr Gly Ile Ile Lys Ile Leu Leu  
260 265 270

Arg Arg Pro Asn Glu Lys Lys Ser Lys Ala Val Arg Leu Ile Phe Val  
275 280 285

Ile Met Ile Ile Phe Phe Leu Phe Trp Thr Pro Tyr Asn Leu Thr Ile  
290 295 300

Leu Ile Ser Val Phe Gln Asp Phe Leu Phe Thr His Glu Cys Glu Gln  
305 310 315 320

Ser Arg His Leu Asp Leu Ala Val Gln Val Thr Glu Val Ile Ala Tyr  
325 330 335

Thr His Cys Cys Val Asn Pro Val Ile Tyr Ala Phe Val Gly Glu Arg  
340 345 350

Phe Arg Lys Tyr Leu Arg Gln Leu Phe His Arg Arg Val Ala Val His  
355 360 365

Leu Val Lys Trp Leu Pro Phe Leu Ser Val Asp Arg Leu Glu Arg Val  
370 375 380

Ser Ser Thr Ser Pro Ser Thr Gly Glu His Glu Leu Ser Ala Gly Phe  
385 390 395 400

347

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

<211> 1200  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 124  
atggacagca aaggttcgtc gcagaaaggg tcccgcctgc tcctgctgct ggtggtgtca 60  
aatctactct tgtgccaggg tgtggtctcc gattacaaag atgatgatga tgtcgacctg 120  
tccacatctc gttctcgggt tatcagaaat accaacgaga gcggtgaaga agtcaccacc 180  
ttttttgatt atgattacgg tgctccctgt cataaatttg acgtgaagca aattggggcc 240  
caactcctgc ctccgctcta ctgctgggtg ttcatctttg gttttgtggg caacatgctg 300  
gtcgtcctca tcttaataaa ctgcaaaaag ctgaagtgtc tgactgacat ttacctgctc 360  
aacctggcca tctctgatct gctttttctt attactctcc cattgtgggc tcactctgct 420  
gcaaatgagt gggctctttg gaatgcaatg tgcaaattat tcacagggtc gtatcacatc 480  
ggttattttg gcggaatctt tttcatcatc ctgctgacga ttgacaggtc cctggccatc 540  
gtccacgccg tgtttgctt gcgggcacgg accgtcactt ttggtgtcat caccagcatc 600  
atcatttggg ccttggccat cttggcttcc atgccaggct tatacttttc caagacccaa 660  
tggaattca ctaccacac ctgcagcctt cactttcctc acgaaagcct acgagagtgg 720  
aagctgtttc aggtctgaa actgaacctc tttgggctgg tattgccttt gttggtcatg 780  
atcatctgct acacagggat tataaagatt ctgctaagac gaccaaata gaagaaatcc 840  
aaagctgtcc gtttgatttt tgtcatcatg atcatctttt ttctcttttg gaccccctac 900  
aatttgacta tacttatttc tgttttccaa gacttcctgt tcacccatga gtgtgagcag 960  
agcagacatt tggacctggc tgtgcaagtg acggagggtg tcgcctacac gcactgctgt 1020  
gtcaaccag tgatctacgc cttcgttggt gagagggtcc ggaagtacct gcggcagttg 1080  
ttccacaggc gtgtggctgt gcacctgggt aaatggctcc ccttcctctc cgtggacagg 1140  
ctggagaggg tcagctccac atctccctcc acaggggagc atgaactctc tgctgggttc 1200

<210> 125  
<211> 374  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 125  
Met Leu Ser Thr Ser Arg Ser Arg Phe Ile Arg Asn Thr Asn Glu Ser  
1 5 10 15  
Gly Glu Glu Val Thr Thr Phe Phe Asp Tyr Asp Tyr Gly Ala Pro Cys  
20 25 30  
His Lys Phe Asp Val Lys Gln Ile Gly Ala Gln Leu Leu Pro Pro Leu  
35 40 45  
Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn Met Leu Val Val  
50 55 60  
Leu Ile Leu Ile Asn Cys Lys Lys Leu Lys Cys Leu Thr Asp Ile Tyr  
65 70 75 80  
Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu Ile Thr Leu Pro  
85 90 95

348

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

Leu Trp Ala His Ser Ala Ala Asn Glu Trp Val Phe Gly Asn Ala Met  
100 105 110

Cys Lys Leu Phe Thr Gly Leu Tyr His Ile Gly Tyr Phe Gly Gly Ile  
115 120 125

Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His  
130 135 140

Ala Val Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe Gly Val Val Thr  
145 150 155 160

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

Ile Phe Thr Lys Cys Gln Lys Glu Asp Ser Val Tyr Val Cys Gly Pro  
180 185 190

Tyr Phe Pro Arg Gly Trp Asn Asn Phe His Thr Ile Met Arg Asn Ile  
195 200 205

Leu Gly Leu Val Leu Pro Leu Leu Ile Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly  
210 215 220

Ile Leu Lys Thr Leu Leu Arg Cys Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg  
225 230 235 240

Ala Val Arg Val Ile Phe Thr Ile Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp  
245 250 255

Thr Pro Tyr Asn Ile Val Ile Leu Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe  
260 265 270

Gly Leu Ser Asn Cys Glu Ser Thr Ser Gln Leu Asp Gln Ala Thr Gln  
275 280 285

Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile  
290 295 300

Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe Arg Ser Leu Phe His Ile Ala Leu  
305 310 315 320

Gly Cys Arg Ile Ala Pro Leu Gln Lys Pro Val Cys Gly Gly Pro Gly  
325 330 335

Val Arg Pro Gly Lys Asn Val Lys Val Thr Thr Gln Gly Leu Leu Asp  
340 345 350

Gly Arg Gly Lys Gly Lys Ser Ile Gly Arg Ala Pro Glu Ala Ser Leu  
355 360 365

Gln Asp Lys Glu Gly Ala  
370

349

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

<211> 360  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 126

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Leu | Ser | Thr | Ser | Arg | Ser | Arg | Phe | Ile | Arg | Asn | Thr | Asn | Glu | Ser |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Gly | Glu | Glu | Val | Thr | Thr | Phe | Phe | Asp | Tyr | Asp | Tyr | Gly | Ala | Pro | Cys |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| His | Lys | Phe | Asp | Val | Lys | Gln | Ile | Gly | Ala | Gln | Leu | Leu | Pro | Pro | Leu |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Tyr | Ser | Leu | Val | Phe | Ile | Phe | Gly | Phe | Val | Gly | Asn | Met | Leu | Val | Val |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Leu | Ile | Leu | Ile | Asn | Cys | Lys | Lys | Leu | Lys | Cys | Leu | Thr | Asp | Ile | Tyr |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |
| Leu | Leu | Asn | Leu | Ala | Ile | Ser | Asp | Leu | Leu | Phe | Leu | Ile | Thr | Leu | Pro |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Leu | Trp | Ala | His | Ser | Ala | Ala | Asn | Glu | Trp | Val | Phe | Gly | Asn | Ala | Met |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Cys | Lys | Leu | Phe | Thr | Gly | Leu | Tyr | His | Ile | Gly | Tyr | Phe | Gly | Gly | Ile |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Phe | Phe | Ile | Ile | Leu | Leu | Thr | Ile | Asp | Arg | Tyr | Leu | Ala | Ile | Val | His |
|     |     | 130 |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Ala | Val | Phe | Ala | Leu | Lys | Ala | Arg | Thr | Val | Thr | Phe | Gly | Val | Val | Thr |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Ser | Val | Ile | Thr | Trp | Leu | Val | Ala | Val | Phe | Ala | Ser | Val | Pro | Gly | Ile |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Ile | Phe | Thr | Lys | Cys | Gln | Lys | Glu | Asp | Ser | Val | Tyr | Val | Cys | Gly | Pro |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Tyr | Phe | Pro | Arg | Gly | Trp | Asn | Asn | Phe | His | Thr | Ile | Met | Arg | Asn | Ile |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Leu | Gly | Leu | Val | Leu | Pro | Leu | Leu | Ile | Met | Val | Ile | Cys | Tyr | Ser | Gly |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Ile | Leu | Lys | Thr | Leu | Leu | Arg | Cys | Arg | Asn | Glu | Lys | Lys | Arg | His | Arg |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Ala | Val | Arg | Val | Ile | Phe | Thr | Ile | Met | Ile | Val | Tyr | Phe | Leu | Phe | Trp |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Thr | Pro | Tyr | Asn | Ile | Val | Ile | Leu | Leu | Asn | Thr | Phe | Gln | Glu | Phe | Phe |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Gly | Leu | Ser | Asn | Cys | Glu | Ser | Thr | Ser | Gln | Leu | Asp | Gln | Ala | Thr | Gln |

350

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3  
280 285

275

Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile  
290 295 300

Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe Arg Arg Tyr Leu Ser Val Phe Phe  
305 310 315 320

Arg Lys His Ile Thr Lys Arg Phe Cys Lys Gln Cys Pro Val Phe Tyr  
325 330 335

Arg Glu Thr Val Asp Gly Val Thr Ser Thr Asn Thr Pro Ser Thr Gly  
340 345 350

Glu Gln Glu Val Ser Ala Gly Leu  
355 360

<210> 127  
<211> 42  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 127

Met Leu Ser Thr Ser Arg Ser Arg Phe Ile Arg Asn Thr Asn Glu Ser  
1 5 10 15

Gly Glu Glu Val Thr Thr Phe Phe Asp Tyr Asp Tyr Gly Ala Pro Cys  
20 25 30

His Lys Phe Asp Val Lys Gln Ile Gly Ala  
35 40

<210> 128  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 128

Ser Ala Ala Asn Glu Trp Val Phe Gly Asn Ala Met Cys Lys  
1 5 10

<210> 129  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 129

Thr Lys Cys Gln Lys Glu Asp Ser Val Tyr Val Cys Gly Pro Tyr Phe  
1 5 10 15

Pro Arg Gly Trp Asn Asn Phe His Thr Ile Met Arg  
20 25

<210> 130  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 130

351

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3  
Gln Glu Phe Phe Gly Leu Ser Asn Cys Glu Ser Thr Ser Gln Leu Asp  
1 5 10 15

Gln

<210> 131  
<211> 352  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 131

Met Asp Tyr Gln Val Ser Ser Pro Ile Tyr Asp Ile Asn Tyr Tyr Thr  
1 5 10 15

Ser Glu Pro Cys Gln Lys Ile Asn Val Lys Gln Ile Ala Ala Arg Leu  
20 25 30

Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn  
35 40 45

Met Leu Val Ile Leu Ile Leu Ile Asn Cys Lys Arg Leu Lys Ser Met  
50 55 60

Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Phe Phe Leu  
65 70 75 80

Leu Thr Val Pro Phe Trp Ala His Tyr Ala Ala Ala Gln Trp Asp Phe  
85 90 95

Gly Asn Thr Met Cys Gln Leu Leu Thr Gly Leu Tyr Phe Ile Gly Phe  
100 105 110

Phe Ser Gly Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu  
115 120 125

Ala Val Val His Ala Val Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe  
130 135 140

Gly Val Val Thr Ser Val Ile Thr Trp Val Val Ala Val Phe Ala Ser  
145 150 155 160

Leu Pro Gly Ile Ile Phe Thr Arg Ser Gln Lys Glu Gly Leu His Tyr  
165 170 175

Thr Cys Ser Ser His Phe Pro Tyr Ser Gln Tyr Gln Phe Trp Lys Asn  
180 185 190

Phe Gln Thr Leu Lys Ile Val Ile Leu Gly Leu Val Leu Pro Leu Leu  
195 200 205

Val Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly Ile Leu Lys Thr Leu Leu Arg Cys  
210 215 220

Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg Ala Val Arg Leu Ile Phe Thr Ile  
225 230 235 240

352

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp Ala Pro Tyr Asn Ile Val Leu Leu  
245 250 255

Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe Gly Leu Asn Asn Cys Ser Ser Ser  
260 265 270

Asn Arg Leu Asp Gln Ala Met Gln Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr  
275 280 285

His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe  
290 295 300

Arg Asn Tyr Leu Leu Val Phe Phe Gln Lys His Ile Ala Lys Arg Phe  
305 310 315 320

Cys Lys Cys Cys Ser Ile Phe Gln Gln Glu Ala Pro Glu Arg Ala Ser  
325 330 335

Ser Val Tyr Thr Arg Ser Thr Gly Glu Gln Glu Ile Ser Val Gly Leu  
340 345 350

<210> 132  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 132  
cgagagggcc tttgggatcc aactgctgcc 30

<210> 133  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 133  
ggcagcagtt ggatcccaaa ggccctctcg 30

<210> 134  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 134  
gcaaattggg atccaactcc tgcc 24

<210> 135  
<400> 135  
000

<210> 136  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 136  
gcaaattggg gcccaactgc tgcc 24

<210> 137  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 137



353

|                                                 |  |    |
|-------------------------------------------------|--|----|
| LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3       |  |    |
| ggcagcagtt gggccccaat ttgc                      |  | 24 |
| <210> 138                                       |  |    |
| <211> 26                                        |  |    |
| <212> DNA                                       |  |    |
| <213> Homo sapiens                              |  |    |
| <400> 138                                       |  |    |
| ctcttgtgcc aggggtgtggt ctccga                   |  | 26 |
| <210> 139                                       |  |    |
| <211> 35                                        |  |    |
| <212> DNA                                       |  |    |
| <213> Homo sapiens                              |  |    |
| <400> 139                                       |  |    |
| gatcgaagct ttcagaaccc agcagagagt tcatg          |  | 35 |
| <210> 140                                       |  |    |
| <211> 43                                        |  |    |
| <212> DNA                                       |  |    |
| <213> Homo sapiens                              |  |    |
| <400> 140                                       |  |    |
| gactatactt atttctgttt tcattgtcat tctcctgaac acc |  | 43 |
| <210> 141                                       |  |    |
| <211> 29                                        |  |    |
| <212> DNA                                       |  |    |
| <213> Homo sapiens                              |  |    |
| <400> 141                                       |  |    |
| cgccaagctt cattataaac cagccgaga                 |  | 29 |
| <210> 142                                       |  |    |
| <211> 31                                        |  |    |
| <212> DNA                                       |  |    |
| <213> Homo sapiens                              |  |    |
| <400> 142                                       |  |    |
| acgcgtcgac gaaactccaa acaccacaga g              |  | 31 |
| <210> 143                                       |  |    |
| <211> 40                                        |  |    |
| <212> DNA                                       |  |    |
| <213> Homo sapiens                              |  |    |
| <400> 143                                       |  |    |
| gttcaggaga atgacaatga aaacagaaat aagtatagtc     |  | 40 |
| <210> 144                                       |  |    |
| <211> 39                                        |  |    |
| <212> DNA                                       |  |    |
| <213> Homo sapiens                              |  |    |
| <400> 144                                       |  |    |
| cattctcctg aacaccttcc aagacttcct gttcaccca      |  | 39 |
| <210> 145                                       |  |    |
| <211> 29                                        |  |    |
| <212> DNA                                       |  |    |
| <213> Homo sapiens                              |  |    |
| <400> 145                                       |  |    |
| gccaagcttc cagtgtgatg gatatctga                 |  | 29 |

354

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

|             |              |            |
|-------------|--------------|------------|
| <210>       | 146          |            |
| <211>       | 40           |            |
| <212>       | DNA          |            |
| <213>       | Homo sapiens |            |
| <400>       | 146          |            |
| tggggtgaaca | ggaagtcttg   | gaaggtgttc |
| aggagaatga  |              | 40         |
| <210>       | 147          |            |
| <211>       | 23           |            |
| <212>       | DNA          |            |
| <213>       | Homo sapiens |            |
| <400>       | 147          |            |
| caggtgcagc  | tggtggagtc   | tgg        |
|             |              | 23         |
| <210>       | 148          |            |
| <211>       | 25           |            |
| <212>       | DNA          |            |
| <213>       | Homo sapiens |            |
| <400>       | 148          |            |
| gaagagacgg  | tgaccattgt   | ccctt      |
|             |              | 25         |
| <210>       | 149          |            |
| <211>       | 27           |            |
| <212>       | DNA          |            |
| <213>       | Homo sapiens |            |
| <400>       | 149          |            |
| gaaattgtgc  | tgactcagtc   | tccagac    |
|             |              | 27         |
| <210>       | 150          |            |
| <211>       | 24           |            |
| <212>       | DNA          |            |
| <213>       | Homo sapiens |            |
| <400>       | 150          |            |
| gtttgatctc  | caccttggtc   | cctc       |
|             |              | 24         |
| <210>       | 151          |            |
| <211>       | 27           |            |
| <212>       | DNA          |            |
| <213>       | Homo sapiens |            |
| <400>       | 151          |            |
| ggcagtgat   | ctgggacaga   | tttcacc    |
|             |              | 27         |
| <210>       | 152          |            |
| <211>       | 27           |            |
| <212>       | DNA          |            |
| <213>       | Homo sapiens |            |
| <400>       | 152          |            |
| ggtgaaatct  | gtcccagatc   | cactgcc    |
|             |              | 27         |
| <210>       | 153          |            |
| <211>       | 88           |            |
| <212>       | DNA          |            |
| <213>       | Homo sapiens |            |
| <400>       | 153          |            |
| ttatgctggg  | cccagctctg   | tcccacaccg |
| cggtcacatg  | gcaccacctc   | tcttgagct  |
|             |              | 60         |
| tccaccaaag  | gcccacccgt   | cttcccc    |
|             |              | 88         |
| <210>       | 154          |            |

355

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

|                                                                    |              |      |  |
|--------------------------------------------------------------------|--------------|------|--|
| <211>                                                              | 39           |      |  |
| <212>                                                              | DNA          |      |  |
| <213>                                                              | Homo sapiens |      |  |
| <400>                                                              | 154          |      |  |
| tcatattctc tagatcattt acccagagac agggagagg                         |              | 39   |  |
| <210>                                                              | 155          |      |  |
| <211>                                                              | 27           |      |  |
| <212>                                                              | DNA          |      |  |
| <213>                                                              | Homo sapiens |      |  |
| <400>                                                              | 155          |      |  |
| cagcgtggtg acagtgccct ccagcag                                      |              | 27   |  |
| <210>                                                              | 156          |      |  |
| <211>                                                              | 27           |      |  |
| <212>                                                              | DNA          |      |  |
| <213>                                                              | Homo sapiens |      |  |
| <400>                                                              | 156          |      |  |
| ctgctggagg gcactgtcac cacgctg                                      |              | 27   |  |
| <210>                                                              | 157          |      |  |
| <211>                                                              | 12754        |      |  |
| <212>                                                              | DNA          |      |  |
| <213>                                                              | Homo sapiens |      |  |
| <400>                                                              | 157          |      |  |
| ccccacctgt aggtttggca agctagctta agtaacgcca ttttgcaagg catggaaaat  |              | 60   |  |
| acataactga gaatagagaa gttcagatca aggttaggaa ggggtggaca tccaaaccgt  |              | 120  |  |
| tcgatcgaat tcattgcggt aaaacgttcc gtacctttta tgtattgact cttatctctt  |              | 180  |  |
| caagtctagt tccaatcctt cagagagaca gcagaatatg ggccaaacag gatatctgtg  |              | 240  |  |
| gtaagcagtt cctgccccgg ctccaggcca agaacagatg gtccccagat gcggtcccg   |              | 300  |  |
| gtctctctgt cgtcttatac ccggtttgtc ctatagacac cattcgtcaa ggacggggcc  |              | 360  |  |
| gagtcccggg tcttgtctac caggggtcta cgccaggcg cctcagcagt ttctagagaa   |              | 420  |  |
| ccatcagatg tttccagggt gcccacagga cctgaaaatg accctgtgcc ttatttgaac  |              | 480  |  |
| taaccaatca gttcgcttct ggagtcgtca aagatctctt ggtagtctac aaagggtccca |              | 540  |  |
| cggggttcct ggacttttac tgggacacgg aataaacttg attggttagt caagcgaaga  |              | 600  |  |
| cgcttctgtt cgcgcgcttc tgctccccga gctcaataaa agagcccaca acccctcact  |              | 660  |  |
| cggcgcgcca gtcctccgat agactgcgtc gcccgggtac gcgaagacaa gcgcgcgaag  |              | 720  |  |
| acgaggggct cgagttatct tctcgggtgt tggggagtga gccgcgcggt caggaggcta  |              | 780  |  |
| tctgacgcag cgggccccatg ccccccccc cccgtattcc caataaagcc tcttgcgtgt  |              | 840  |  |
| tgcatccgaa tcgtggactc gctgacctt gggaggggtct cctcagattg attgactgcc  |              | 900  |  |
| gggggggggg gggcataagg gttatttcgg agaacgacaa acgtaggctt agcacctgag  |              | 960  |  |
| cgactaggaa ccctcccaga ggagtctaac taactgacgg caccctcggg gtctttcatt  |              | 1020 |  |
| tggaggttcc accgagattt ggagacccct gcctagggac caccgacccc cccgccggga  |              | 1080 |  |
| ggtaagctgg ccagcggctg gtggagcccc cagaaagtaa acctccaagg tggctctaaa  |              | 1140 |  |
| cctctgggga cggatccctg gtggctgggg gggcgggcct ccattcgacc ggtcgccagc  |              | 1200 |  |
| tttcgtgtct gtctctgtct ttgtgcgtgt ttgtgccggc atctaagtgt tgcgcctgcg  |              | 1260 |  |
| tctgtactag ttagctaact agctctgtat ctggcggacc aaagcacaga cagagacaga  |              | 1320 |  |

356

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

|             |             |             |            |             |             |      |
|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| aacacgcaca  | aacacggccg  | tagattacaa  | acgcggacgc | agacatgac   | aatcgattga  | 1380 |
| tcgagacata  | gaccgcctgg  | cgtggtggaa  | ctgacgagtt | ctgaacaccc  | ggccgcaacc  | 1440 |
| ctgggagacg  | tcccagggac  | tttgggggccc | gtttttgttg | cccgaacctga | ggaagggagt  | 1500 |
| gcaccacctt  | gactgctcaa  | gacttgtggg  | ccggcgttgg | gacctctgc   | agggtcctg   | 1560 |
| aaacccccgg  | caaaaacacc  | gggctggact  | ccttccctca | cgatgtggaa  | tccgacccccg | 1620 |
| tcaggatatg  | tggttctggt  | aggagacgag  | aacctaaaac | agttccccgcc | tccgtctgaa  | 1680 |
| tttttgcttt  | cggtttggaa  | gctacacctt  | aggctggggc | agtcctatac  | accaagacca  | 1740 |
| tcctctgctc  | ttggattttg  | tcaagggcgg  | aggcagactt | aaaaacgaaa  | gccaaacctt  | 1800 |
| ccgaagccgc  | gcgtcttgtc  | tgctgcagcg  | ctgcagcatc | gttctgtgtt  | gtctctgtct  | 1860 |
| gactgtgttt  | ctgtatttgt  | ctgaaaatta  | gggccagact | ggcttcggcg  | cgcagaacag  | 1920 |
| acgacgtcgc  | gacgtcgtag  | caagacacaa  | cagagacaga | ctgacacaaa  | gacataaaca  | 1980 |
| gacttttaat  | cccggctctga | gttaccactc  | ccttaagttt | gaccttaggt  | cactggaaag  | 2040 |
| atgtcgagcg  | gatcgtcac   | aaccagtcgg  | tagatgtcaa | gaagagacgt  | tgggttacct  | 2100 |
| caatggtgag  | ggaattcaaa  | ctggaatcca  | gtgacctttc | tacagctcgc  | ctagcgagtg  | 2160 |
| ttggtcagcc  | atctacagtt  | cttctctgca  | acccaatgga | tctgctctgc  | agaatggcca  | 2220 |
| acctttaacg  | tcggatggcc  | gcgagacggc  | acctttaacc | gagacctcat  | caccaggtt   | 2280 |
| aagatcaagg  | tcttttcacc  | agacgagacg  | tcttaccggt | tggaaattgc  | agcctaccgg  | 2340 |
| cgctctgccg  | tggaaattgg  | ctctggagta  | gtgggtccaa | ttctagttcc  | agaaaagtgg  | 2400 |
| tggcccgcat  | ggacaccag   | accaggtccc  | ctacatcgtg | acctgggaag  | ccttggcttt  | 2460 |
| tgacccccct  | ccctgggtca  | agccctttgt  | acaccctaag | accgggcgta  | cctgtgggtc  | 2520 |
| tgggtccagg  | gatgtagcac  | tggacccttc  | ggaaccgaaa | actgggggga  | gggacccagt  | 2580 |
| tcgggaaaca  | tgtgggattc  | cctccgcctc  | ctcttccctc | atccgccccg  | tctctcccc   | 2640 |
| ttgaacctcc  | tcgttcgacc  | ccgcctcgat  | cctcccttta | tccaagccctc | actccttctc  | 2700 |
| ggaggcgag   | gagaaggagg  | taggcggggc  | agagaggggg | aacttggagg  | agcaagctgg  | 2760 |
| ggcggagcta  | ggagggaaat  | aggtcgggag  | tgaggaagag | taggcgccga  | gatctctcga  | 2820 |
| ggttaaacct  | aagctatgga  | cagcaaagg   | tcgtcgcaga | aagggtcccc  | cctgctcctg  | 2880 |
| ctgctggtgg  | tgtcaaactc  | atccgcggct  | ctagagagct | ccaatttgaa  | ttcgatacct  | 2940 |
| gtcgtttcca  | agcagcgtct  | ttcccagggc  | ggacgaggac | gacgaccacc  | acagtttaga  | 3000 |
| actcttgtgc  | caggggtgtg  | tctccgatta  | caaagatgat | gatgatagcg  | ctgaagacaa  | 3060 |
| taatatgtta  | cctcagttca  | tccacggcat  | actatcaaca | tgagaacacg  | gtccacacc   | 3120 |
| agaggcta    | gtttctacta  | ctactatcgc  | gacttctgtt | attatacaat  | ggagtcaagt  | 3180 |
| agggtgccgta | tgatagttgt  | tctcattctc  | tatttacacg | aagtatccaa  | gagcttgatg  | 3240 |
| aaggggccac  | cacaccgtat  | gactacgatg  | atggtgagcc | ttgtcataaa  | accagtgtga  | 3300 |
| agagtaagag  | ataaatgtgc  | ttcatagggt  | ctcgaactac | ttccccgggtg | gtgtggcata  | 3360 |
| ctgatgctac  | taccactcgg  | aacagtat    | ttgtcacact | agcaaattgg  | agcttggatc  | 3420 |
| ctgcctccgc  | tctactcgct  | ggtgttcac   | tttggttttg | tgggcaacat  | gctggctcgc  | 3480 |
| ctcatcttaa  | taaactgcaa  | tcgtttaacc  | tcgaacctag | gacggaggcg  | agatgagcga  | 3540 |

357

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| ccacaagtag aaacccaaaac acccgttgta cgaccagcag gagtagaatt atttgacgtt | 3600 |
| aaagctgaag tgcttgactg acattttacct gctcaacctg gccatctctg atctgctttt | 3660 |
| tcttattact ctccattgtt gggctcactc tgctgcaaatt ttctgacttc acgaactgac | 3720 |
| tgtaaattgga cgagttggac cggtagagac tagacgaaaa agaataatga gagggtaaca | 3780 |
| cccagtgag acgacgttta gagtgggtct ttgggaatgc aatgtgcaaa ttattcacag   | 3840 |
| ggctgtatca catcggttat ttggcgga tcttcttcat catcctcctg acaatcgata    | 3900 |
| ctcaccaga aacccttacg ttacacgttt aataagtgtc ccgacatagt gtagccaata   | 3960 |
| aaaccgcctt agaagaagta gtaggaggac tgtagctat gatacctggc tattgtccat   | 4020 |
| gctgtgtttg ctttaaaagc caggacggtc acctttgggg tggtgacaag tgtgatcacc  | 4080 |
| tggttggtgg ctgtgtttgc ctatggaccg ataacaggta cgacacaaac gaaattttcg  | 4140 |
| gtcctgccag tggaacccc accactgttc aactagtgg accaaccacc gacacaaacg    | 4200 |
| ttctgtccca ggaatcatct ttactaaatg ccagaaagaa gattctgttt atgtctgtgg  | 4260 |
| cccttatttt ccacgaggat ggaataattt ccacacaata aagacagggc ccttagtaga  | 4320 |
| aatgatttac ggtctttctt ctaagacaaa tacagacacc ggaataaaa ggtgctccta   | 4380 |
| ccttattaaa ggtgtgttat atgaggaaca ttttggggct ggtcctgccg ctgctcatca  | 4440 |
| tggtcatctg ctactcggga atcctgaaaa ccctgcttcg gtgtcgaaac gagaagaaga  | 4500 |
| tactccttgt aaaaccccga ccaggacggc gacgagtagt accagtagac gatgagccct  | 4560 |
| taggactttt gggacgaagc cacagctttg ctcttcttct ggcatagggc agtgagagtc  | 4620 |
| atcttcacca tcatgattgt ttactttctc ttctggactc cctataatat tgtcattctc  | 4680 |
| ctgaacacct tccaggaatt ccgtatcccg tctctctcag tagaagtggg agtactaaca  | 4740 |
| aatgaaagag aagacctgag ggatattata acagtaagag gacttgtgga aggtccttaa  | 4800 |
| cttcggcctg agtaactgtg aaagcaccag tcaactggac caagccacgc aggtgacaga  | 4860 |
| gactcttggg atgactcact gctgcatcaa tcccatcatc gaagccggac tcattgacac  | 4920 |
| ttctgtggtc agttgacctg gttcgggtgcg tccactgtct ctgagaacct tactgagtga | 4980 |
| cgacgtagtt agggtagtag tatgccttcg ttggggagaa gttcagaagg tatctctcgg  | 5040 |
| tgttcttccg aaagcacatc accaagcgct tctgcaaaca atgtccagtt ttctacaggg  | 5100 |
| atacgggaagc aaccctctt caagtcttcc atagagagcc acaagaaggc ttctgtgtag  | 5160 |
| tggttcgcga agacgtttgt tacagggtcaa aagatgtccc agacagtgga tggagtgact | 5220 |
| tcaacaaaca cgcttccac tggggagcag gaagtctcgg ctggtttata atgactcgag   | 5280 |
| ctctctagag ggcccgttt tctgtcacct acctactga agttgtttgt gcggaagggtg   | 5340 |
| acctctcgtc cttcagagcc gaccaaatat tactgagctc gagagatctc ccgggcaaac  | 5400 |
| acctgcagcc aagcttatcg ataaaataaa agattttatt tagtctccag aaaaaggggg  | 5460 |
| gaatgaaaga cccacctgt aggtttggca agctagctta tggacgtcgg ttcgaatagc   | 5520 |
| tattttattt tctaaaataa atcagagggtc tttttcccc ctactttct ggggtggaca   | 5580 |
| tccaaaccgt tcgatcgaat agtaacgcca ttttgcaagg catggaaaat acataactga  | 5640 |
| gaatagagaa gttcagatca aggttaggaa cagagagaca gcagaatatg ggccaaacag  | 5700 |
| tcattgcggt aaaacgttcc gtacctttta tgtattgact cttatctctt caagtctagt  | 5760 |
| tccaatcctt gtctctctgt cgtcttatac ccggtttgtc gatatctgtg gtaagcagtt  | 5820 |

358

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

|             |             |            |             |             |             |      |
|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| cctgccccgg  | ctcagggcca  | agaacagatg | gtccccagat  | gcggtcccg   | cctcagcagt  | 5880 |
| ttctagagaa  | ccatcagatg  | ctatagacac | cattcggtcaa | ggacggggcc  | gagtccccgt  | 5940 |
| tcttgtctac  | caggggtcta  | cgccagggcg | ggagtcgtca  | aagatctctt  | ggtagtctac  | 6000 |
| tttccaggg   | gccccaaagga | cctgaaaatg | accctgtgcc  | ttatttgaac  | taaccaatca  | 6060 |
| gttcgcttct  | cgcttctgtt  | cgcgcgcttc | tgctccccga  | aaagggtcca  | cggggttcct  | 6120 |
| ggacttttac  | tgggacacgg  | aataaacttg | attgggttagt | caagcgaaga  | gcgaagacaa  | 6180 |
| gcgcgcgaag  | acgaggggct  | gctcaataaa | agagcccaca  | accctcact   | cggcgcgcca  | 6240 |
| gtcctccgat  | agactgcgtc  | gcccgggtac | ccgtgtatcc  | aataaacctt  | cttgagttg   | 6300 |
| cgagttat    | tctcgggtgt  | tggggagtga | gccgcgcggt  | caggaggcta  | tctgacgcag  | 6360 |
| cgggcccatg  | ggcacatagg  | ttatttggga | gaacgtcaac  | catccgactt  | gtggtctcgc  | 6420 |
| tgttccttgg  | gaggggtctcc | tctgagtgat | tgactacccg  | tcagcggggg  | tctttcatgg  | 6480 |
| gtaacagttt  | cttgaagttg  | gtaggctgaa | caccagagcg  | acaaggaacc  | ctcccagagg  | 6540 |
| agactcacta  | actgatgggc  | agtcgcccc  | agaaagtacc  | cattgtcaaa  | gaacttcaac  | 6600 |
| gagaacaaca  | ttctgaggg   | aggagtcgaa | tattaagtaa  | tcctgactca  | attagccact  | 6660 |
| gttttgaatc  | cacatactcc  | aatactcctg | aaatagttca  | ctcttggtgt  | aagactccca  | 6720 |
| tcctcagctt  | ataattcatt  | aggactgagt | taatcgggtga | caaaacttag  | gtgtatgagg  | 6780 |
| ttatgaggac  | tttatcaagt  | ttatggacag | cgagaaaga   | gctggggaga  | attgtgaaat  | 6840 |
| tgttatccgc  | tcacaattcc  | acacaacata | cgagccggaa  | gcataaagt   | taaagcctgg  | 6900 |
| aatacctgtc  | gcgtctttct  | cgacccctct | taacacttta  | acaataggcg  | agtgttaagg  | 6960 |
| tggtgtgtat  | gctcggcctt  | cgtatttcac | atttcggacc  | gggtgccta   | gagtgagcta  | 7020 |
| actcacatta  | attgcgttgc  | gctcactgcc | cgctttccag  | tcgggaaacc  | tgctcgtcca  | 7080 |
| gctgcattaa  | tgaatcggcc  | ccacggatta | ctcactcgat  | tgagtgtaat  | taacgcaacg  | 7140 |
| cgagtgcagg  | gcgaaaggtc  | agcccttttg | acagcacgg   | cgacgtaat   | acttagccgg  | 7200 |
| aacgcgcggg  | gagaggcggt  | ttgcgtattg | ggcgctcttc  | cgcttcctcg  | ctcactgact  | 7260 |
| cgctgcgctc  | ggtcgttcgg  | ctgcggcgag | cggtatcagc  | ttgcgcgccc  | ctctccgcca  | 7320 |
| aacgcataac  | ccgcgagaag  | gcgaaggagc | gagtgactga  | gcgacgcgag  | ccagcaagcc  | 7380 |
| gacgccgctc  | gccatagtcg  | tcactcaaag | gcggtaatac  | ggttatccac  | agaatcaggg  | 7440 |
| gataacgcag  | gaaagaacat  | gtgagcaaaa | ggccagcaaa  | aggccaggaa  | ccgtaaaaag  | 7500 |
| agtgagtttc  | cgccattatg  | ccaatagggt | tcttagtccc  | ctattgcgtc  | ctttcttgta  | 7560 |
| cactcgtttt  | ccggtcgttt  | tccggtcctt | ggcatttttc  | gccgcgttgc  | tggcgttttt  | 7620 |
| ccataggctc  | cgccccctg   | acgagcatca | caaaaatcga  | cgctcaagtc  | agagggtggcg | 7680 |
| aaacccgaca  | ggactataaa  | cggcgcaacg | accgcaaaaa  | ggatatccgag | gcggggggac  | 7740 |
| tgctcgtagt  | gttttttagct | gcgagttcag | tctccaccgc  | tttgggctgt  | cctgatattt  | 7800 |
| gataaccaggc | gtttccccct  | ggaagctccc | tcgtgcgctc  | tcctgttccg  | accctgccgc  | 7860 |
| ttaccggata  | cctgtccgcc  | tttctccctt | cgggaagcgt  | ctatgggtccg | caaaggggga  | 7920 |
| ccttcgaggg  | agcacgcgag  | aggacaaggc | tgggacggcg  | aatggcctat  | ggacaggcgg  | 7980 |
| aaagagggaa  | gcccttcgca  | ggcgctttct | catagctcac  | gctgtaggta  | tctcagttcg  | 8040 |

359

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

|             |             |             |             |             |             |       |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| gtgtaggtcg  | ttcgctccaa  | gctgggctgt  | gtgcacgaac  | cccccgttca  | gcccgaaccgc | 8100  |
| ccgcgaaaga  | gtatcgagtg  | cgacatccat  | agagtcaagc  | cacatccagc  | aagcgagggtt | 8160  |
| cgacccgaca  | cacgtgcttg  | gggggcaagt  | cgggctggcg  | tgcgccttat  | ccggtaacta  | 8220  |
| tcgtcttgag  | tccaacccgg  | taagacacga  | cttatcgcca  | ctggcagcag  | ccactggtaa  | 8280  |
| caggattagc  | agagcgagggt | acgcggaata  | ggccattgat  | agcagaaactc | aggttggggcc | 8340  |
| attctgtgct  | gaatagcgggt | gaccgtcgtc  | ggtgaccatt  | gtcctaatacg | tctcgctcca  | 8400  |
| atgtaggcgg  | tgctacagag  | ttcttgaagt  | ggtggcctaa  | ctacggctac  | actagaagga  | 8460  |
| cagtatttgg  | tatctgcgct  | ctgctgaagc  | cagttacctt  | tacatccgcc  | acgatgtctc  | 8520  |
| aagaacttca  | ccaccggatt  | gatgccgatg  | tgatcttcct  | gtcataaacc  | atagacgcga  | 8580  |
| gacgacttcg  | gtcaatggaa  | cggaaaaaga  | gttggttagct | cttgatccgg  | caaacaaacc  | 8640  |
| accgctggta  | gcggtgggtt  | ttttgtttgc  | aagcagcaga  | ttacgcgcag  | aaaaaaagga  | 8700  |
| gcctttttct  | caaccatcga  | gaactaggcc  | gtttgtttgg  | tggcgaccat  | cgccaccaa   | 8760  |
| aaaacaaacg  | ttcgctcgtct | aatgcgcgct  | tttttttcct  | tctcaagaag  | atcctttgat  | 8820  |
| cttttctacg  | gggtctgacg  | ctcagtggaa  | cgaaaactca  | cgtaaaggga  | ttttggtcac  | 8880  |
| gagattatca  | aaaaggatct  | agagttcttc  | taggaaacta  | gaaaagatgc  | cccagactgc  | 8940  |
| gagtcacctt  | gcttttgagt  | gcaattccct  | aaaaccagta  | ctctaatagt  | ttttcctaga  | 9000  |
| tcacctagat  | ccttttaaat  | taaaaatgaa  | gttttaaadc  | aatctaaagt  | atatatgagt  | 9060  |
| aaacttggtc  | tgacagttac  | caatgcttaa  | tcagtgaggc  | agtggatcta  | ggaaaattta  | 9120  |
| atttttactt  | caaaatttag  | ttagatttca  | tatatactca  | tttgaaccag  | actgtcaatg  | 9180  |
| gttacgaatt  | agtcactccg  | acctatctca  | gcgatctgtc  | tatttcgttc  | atccatagtt  | 9240  |
| gcctgactcc  | ccgtcgtgta  | gataactacg  | atacgggagg  | gcttaccatc  | tggccccagt  | 9300  |
| tggatagagt  | cgctagacag  | ataaagcaag  | taggtatcaa  | cggactgagg  | ggcagcacat  | 9360  |
| ctattgatgc  | tatgccctcc  | cgaatggtag  | accgggggtca | gctgcaatga  | taccgcgaga  | 9420  |
| cccacgctca  | ccggtccag   | atttatcagc  | aataaaccag  | ccagccggaa  | gggcccagcg  | 9480  |
| cagaagtgggt | cctgcaactt  | cgacgttact  | atggcgctct  | gggtgcgagt  | ggccgagggtc | 9540  |
| taaatagtcg  | ttatttggtc  | ggtcggcctt  | cccggctcgc  | gtcttcacca  | ggacgttgaa  | 9600  |
| tatccgcctc  | catccagtct  | attaattggt  | gccgggaagc  | tagagtaagt  | agttcgccag  | 9660  |
| ttaatagttt  | gcgcaacggt  | gttgccattg  | ctacaggcat  | ataggcggag  | gtagggtcaga | 9720  |
| taattaacaa  | cggcccttcg  | atctcattca  | tcaagcggtc  | aattatcaaa  | cgcgttgcaa  | 9780  |
| caacggtaac  | gatgtccgta  | cgtgggtgtca | cgctcgtcgt  | ttggtatggc  | ttcattcagc  | 9840  |
| tccggttccc  | aacgatcaag  | gcgagttaca  | tgatccccca  | tgtt:gtgcaa | aaaagcggtt  | 9900  |
| gcaccacagt  | gcgagcagca  | aaccataccg  | aagtaagtcg  | aggccaaggg  | ttgctagttc  | 9960  |
| cgctcaatgt  | actaggggggt | acaacacggt  | ttttcgccaa  | agctccttcg  | gtcctccgat  | 10020 |
| cgttgtcaga  | agtaagttgg  | ccgcagtgtt  | atcactcatg  | gttatggcag  | cactgcataa  | 10080 |
| ttctcttact  | gtcatgccat  | tcgaggaagc  | caggaggcta  | gcaacagtct  | tcattcaacc  | 10140 |
| ggcgtcacia  | tagtgagtac  | caataccgtc  | gtgacgtatt  | aagagaatga  | cagtacggta  | 10200 |
| ccgtaagatg  | cttttctgtg  | actggtgagt  | actcaaccaa  | gtcattctga  | gaatagtgtg  | 10260 |
| tgcggcgacc  | gagttgctct  | tgccccgcgt  | caatacggga  | ggcattctac  | gaaaagacac  | 10320 |

360

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

|             |            |             |            |             |             |       |
|-------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------|
| tgaccactca  | tgagttggtt | cagtaagact  | cttatcacat | acgccgctgg  | ctcaacgaga  | 10380 |
| acggggccgca | gttatgccct | taataccgcg  | ccacatagca | gaactttaaa  | agtgtcatc   | 10440 |
| attgaaaaac  | gttcttcggg | gcgaaaactc  | tcaaggatct | taccgctggt  | gagatccagt  | 10500 |
| attatggcgc  | ggtgtatcgt | cttgaaattt  | tcacgagtag | taaccttttg  | caagaagccc  | 10560 |
| cgcttttgag  | agttcctaga | atggcgacaa  | ctctaggtca | tcgatgtaac  | ccactcgtgc  | 10620 |
| acccaactga  | tcttcagcat | cttttacttt  | caccagcggt | tctggtgag   | caaaaacagg  | 10680 |
| aaggcaaaat  | gccgcaaaaa | agctacattg  | ggtgagcacg | tgggttgact  | agaagtcgta  | 10740 |
| gaaaatgaaa  | gtggtcgcaa | agaccctc    | gtttttgtcc | ttccgtttta  | cggcgttttt  | 10800 |
| aggggaataag | ggcgacacgg | aaatgttgaa  | tactcatact | cttccctttt  | caatattatt  | 10860 |
| gaagcattta  | tcagggttat | tgtctcatga  | gcggatacat | tcccttattc  | ccgctgtgcc  | 10920 |
| tttacaactt  | atgagtatga | gaaggaaaaa  | gttataataa | cttcgtaaat  | agtcaccaata | 10980 |
| acagagtact  | cgcctatgta | atttgaatgt  | atttagaaaa | ataaacaat   | aggggttccg  | 11040 |
| cgcacatttc  | cccgaaaagt | gccacctgac  | gtctaagaaa | ccattattat  | catgacatta  | 11100 |
| taaacttaca  | taaatctttt | tatttgttta  | tccccaaggc | gcgtgtaaag  | gggcttttca  | 11160 |
| cgggtggactg | cagattcttt | ggtaataata  | gtactgtaat | acctataaaa  | ataggcgtat  | 11220 |
| cacgaggccc  | tttcgtctcg | cgcgtttcgg  | tgatgacggt | gaaaacctct  | gacacatgca  | 11280 |
| gctcccggag  | acggtcacag | tggatatattt | tatccgcata | gtgctccggg  | aaagcagagc  | 11340 |
| gcgcaaagcc  | actactgcca | cttttgaga   | ctgtgtacgt | cgagggcctc  | tgccagtgtc  | 11400 |
| cttgtctgta  | agcggatgcc | gggagcagac  | aagcccgtca | gggcgcgtca  | gcgggtgttg  | 11460 |
| gcgggtgtcg  | gggctggctt | aactatgcgg  | catcagagca | gaacagacat  | tcgcctacgg  | 11520 |
| ccctcgtctg  | ttcgggcagt | ccgcgcagt   | cgcccaaac  | cgccacagc   | cccgaccgaa  | 11580 |
| ttgatacgcc  | gtagtctcgt | gattgtactg  | agagtgcacc | atatgcggtg  | tgaaataaccg | 11640 |
| cacagatgcg  | taaggagaaa | ataccgcac   | aggcgccatt | cgccattcag  | gctgcgcaac  | 11700 |
| ctaacatgac  | tctcacgtgg | tatacgccac  | actttatggc | gtgtctacgc  | attcctcttt  | 11760 |
| tatggcgtag  | tccgcggtaa | gcggtaagtc  | cgacgcgttg | tgttgggaag  | ggcgatcggt  | 11820 |
| gcgggcctct  | tcgctattac | gccagctggc  | gaaaggggga | tgtgctgcaa  | ggcgattaag  | 11880 |
| ttgggtaacg  | ccagggtttt | acaaccttc   | ccgctagcca | cgcccgaga   | agcgataatg  | 11940 |
| cggtcgaccg  | ctttccccct | acacgacgtt  | ccgctaattc | aacccattgc  | ggtcccaaaa  | 12000 |
| cccagtcacg  | acgttgtaaa | acgacggcgc  | aaggaatggt | gcatgcaagg  | agatggcgcc  | 12060 |
| caacagtccc  | ccggccacgg | ggcctgccac  | cataccacg  | gggtcagtgc  | tgcaacattt  | 12120 |
| tgctgccgcg  | ttccttacca | cgtacgttcc  | tctaccgcgg | gttgtcaggg  | ggccggtgcc  | 12180 |
| ccggacggtg  | gtatgggtgc | ccgaaacaag  | cgctcatgag | cccgaagtgg  | cgagcccgat  | 12240 |
| cttccccatc  | ggtgatgtcg | gcgatatagg  | cgccagcaac | cgcacctgtg  | gcgccggtga  | 12300 |
| ggctttgttc  | gcgagtactc | gggcttcacc  | gctcgggcta | gaaggggtag  | ccactacagc  | 12360 |
| cgctatatcc  | gcggtcggtg | gcgtggacac  | cgcgccact  | tgccggccac  | gatgcgtccg  | 12420 |
| gcgtagaggc  | gattagtcca | atttgtaaaa  | gacaggatat | cagtgggtcca | ggctctagtt  | 12480 |
| ttgactcaac  | aatatcacca | acggccggtg  | ctacgcaggc | cgcactctccg | ctaatacaggt | 12540 |



261

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3  
taaacaattt ctgtcctata gtcaccaggt cccgagatcaa aactgagttg ttatagtggg 12600  
gctgaagcct atagagtacg agccatagat aaaataaaag attttattta gtctccagaa 12660  
aaagggggga tgaaagacga cttcgatat ctcagtctcg gtatctattt tattttctaa 12720  
aataaatcag aggtcttttt cccccctact ttct 12754

<210> 158  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 158

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

<210> 159  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 159

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
1 5 10 15  
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser  
20 25 30  
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45  
Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Trp Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60  
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

362

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3  
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
85 90 95

Thr His Trp Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 160  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 160

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Asn Trp Asn Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 161  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 161

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys  
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser  
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Leu  
Página 56

363

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 162  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 162

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

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

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

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60

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

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

Arg Tyr Asn Trp Asn Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 163  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 163

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr  
85 90 95

364

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

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

<210> 164  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 164

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Tyr Asn Trp Asn Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 165  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 165

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

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
85 90 95

365

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
100 105 110

Lys

<210> 166  
<211> 1350  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 166  
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaagggtt 60  
tcctgcaagg catctggata caccttcacc agctactata tacattgggt gcgacaggcc 120  
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg atcaatccta gtggtggtcg cacaagctac 180  
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240  
atggacctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt ttactgtgc gagagagaga 300  
tggataagt ggaacttcga tgcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcacctgc 360  
tcctcagctt ccaccaaggg cccatccgtc ttccccctgg cgccctgctc caggagcacc 420  
tccgagagca cagccgccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480  
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca cttcccggc tgcctacag 540  
tcctcaggac tctactcct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg 600  
aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag ccagcaaca ccaagggtgga caagagagtt 660  
gagtccaat atggtcccc atgcccata tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca 720  
tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gacccctgag 780  
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 840  
gtggatggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc 900  
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacctgc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 960  
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa 1020  
gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg 1080  
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1140  
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200  
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag caggtggcag 1260  
gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag 1320  
aagagcctct ccctgtctct gggtaaatga 1350

<210> 167  
<211> 366  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 167  
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaagggtt 60  
tcctgcaagg catctggata caccttcacc agctactata tacattgggt gcgacaggcc 120  
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg atcaatccta gtggtggtcg cacaagctac 180  
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240

366

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| atggacctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt tttactgtgc gagagagaga  | 300 |
| tggtataagt ggaacttcga tgcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc  | 360 |
| tcctca                                                             | 366 |
| <210> 168                                                          |     |
| <211> 15                                                           |     |
| <212> DNA                                                          |     |
| <213> Homo sapiens                                                 |     |
| <400> 168                                                          |     |
| agctactata tacat                                                   | 15  |
| <210> 169                                                          |     |
| <211> 51                                                           |     |
| <212> DNA                                                          |     |
| <213> Homo sapiens                                                 |     |
| <400> 169                                                          |     |
| atgatcaatc ctagtgggtgg tcgcacaagc tacgcacaga agttccaggg c          | 51  |
| <210> 170                                                          |     |
| <211> 39                                                           |     |
| <212> DNA                                                          |     |
| <213> Homo sapiens                                                 |     |
| <400> 170                                                          |     |
| gagagatggt ataagtggaa cttcgatgct tttgatatc                         | 39  |
| <210> 171                                                          |     |
| <211> 90                                                           |     |
| <212> DNA                                                          |     |
| <213> Homo sapiens                                                 |     |
| <400> 171                                                          |     |
| caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt | 60  |
| tcctgcaagg catctggata caccttcacc                                   | 90  |
| <210> 172                                                          |     |
| <211> 42                                                           |     |
| <212> DNA                                                          |     |
| <213> Homo sapiens                                                 |     |
| <400> 172                                                          |     |
| tgggtgagac agggccctgg acaagggctt gagtggatgg ga                     | 42  |
| <210> 173                                                          |     |
| <211> 96                                                           |     |
| <212> DNA                                                          |     |
| <213> Homo sapiens                                                 |     |
| <400> 173                                                          |     |
| agagtcacca tgaccaggga cacgtccacg agcacagtct acatggacct gagcagcctg  | 60  |
| agatctgagg acacggccgt gttttactgt gcgaga                            | 96  |
| <210> 174                                                          |     |
| <211> 33                                                           |     |
| <212> DNA                                                          |     |
| <213> Homo sapiens                                                 |     |
| <400> 174                                                          |     |
| tggggccaag ggacaatggt caccgtctcc tca                               | 33  |

367

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

<210> 175  
<211> 449  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 175

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30  
  
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45  
  
Gly Met Ile Asn Pro Ser Gly Gly Pro Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60  
  
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
65 70 75 80  
  
Met Asp Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys  
85 90 95  
  
Ala Arg Glu Arg Trp Tyr Lys Trp Asn Phe Asp Ala Phe Asp Ile Trp  
100 105 110  
  
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
115 120 125  
  
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr  
130 135 140  
  
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
145 150 155 160  
  
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
165 170 175  
  
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
180 185 190  
  
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp  
195 200 205  
  
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr  
210 215 220  
  
Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro  
225 230 235 240  
  
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
245 250 255  
  
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp  
260 265 270

368

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3  
Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
275 280 285

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

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys  
325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
370 375 380

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

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

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
435 440 445

Lys

<210> 176  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 176

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Met Ile Asn Pro Ser Gly Gly Pro Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
65 70 75 80



369

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

Met Asp Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Glu Arg Trp Tyr Lys Trp Asn Phe Asp Ala Phe Asp Ile Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 177  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 177

Ser Tyr Tyr Ile His  
1 5

<210> 178  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 178

Met Ile Asn Pro Ser Gly Gly Pro Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
1 5 10 15

Gly

<210> 179  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 179

Glu Arg Trp Tyr Lys Trp Asn Phe Asp Ala Phe Asp Ile  
1 5 10

<210> 180  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 180

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
20 25 30

<210> 181  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 181

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

370

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

<210> 182  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 182

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Asp  
1 5 10 15

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

<210> 183  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 183

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

<210> 184  
<211> 663  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 184  
gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60  
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120  
tggtaccaac agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctacacgg 180  
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240  
atcagcagcc agcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttacagtact 300  
cctcggacgt tcggccaagg gaccaagggtg gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360  
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420  
ctgctgaaga acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgccctc 480  
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 540  
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600  
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 660  
tag 663

<210> 185  
<211> 339  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 185  
gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60  
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120  
tggtaccaac agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctacacgg 180  
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240  
atcagcagcc agcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttacagtact 300  
cctcggacgt tcggccaagg gaccaagggtg gaaatcaaa 339

371

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

|                                                                    |              |    |
|--------------------------------------------------------------------|--------------|----|
| <210>                                                              | 186          |    |
| <211>                                                              | 51           |    |
| <212>                                                              | DNA          |    |
| <213>                                                              | Homo sapiens |    |
| <400>                                                              | 186          |    |
| aagtcagcc agagtgtttt atacagctcc aacaataaga actacttagc t            |              | 51 |
| <210>                                                              | 187          |    |
| <211>                                                              | 21           |    |
| <212>                                                              | DNA          |    |
| <213>                                                              | Homo sapiens |    |
| <400>                                                              | 187          |    |
| tgggcatcta cacgggaatc c                                            |              | 21 |
| <210>                                                              | 188          |    |
| <211>                                                              | 27           |    |
| <212>                                                              | DNA          |    |
| <213>                                                              | Homo sapiens |    |
| <400>                                                              | 188          |    |
| cagcaatatt acagtactcc tcggacg                                      |              | 27 |
| <210>                                                              | 189          |    |
| <211>                                                              | 69           |    |
| <212>                                                              | DNA          |    |
| <213>                                                              | Homo sapiens |    |
| <400>                                                              | 189          |    |
| gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc   |              | 60 |
| atcaactgc                                                          |              | 69 |
| <210>                                                              | 190          |    |
| <211>                                                              | 45           |    |
| <212>                                                              | DNA          |    |
| <213>                                                              | Homo sapiens |    |
| <400>                                                              | 190          |    |
| tggtaccaac agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttac                  |              | 45 |
| <210>                                                              | 191          |    |
| <211>                                                              | 96           |    |
| <212>                                                              | DNA          |    |
| <213>                                                              | Homo sapiens |    |
| <400>                                                              | 191          |    |
| gggggtccctg accgattcag tggcagcggg tctgggacag atttcactct caccatcagc |              | 60 |
| agccagcagg ctgaagatgt ggcagtttat tactgt                            |              | 96 |
| <210>                                                              | 192          |    |
| <211>                                                              | 30           |    |
| <212>                                                              | DNA          |    |
| <213>                                                              | Homo sapiens |    |
| <400>                                                              | 192          |    |
| ttcggccaag ggaccaaggt ggaaatcaaa                                   |              | 30 |
| <210>                                                              | 193          |    |
| <211>                                                              | 220          |    |
| <212>                                                              | PRT          |    |
| <213>                                                              | Homo sapiens |    |
| <400>                                                              | 193          |    |

372

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

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

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

Ile Ser Ser Gln Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215 220

<210> 194  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 194

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

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

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

373

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3  
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

Ile Ser Ser Gln Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
100 105 110

Lys

<210> 195  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 195

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu  
1 5 10 15

Ala

<210> 196  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 196

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
1 5

<210> 197  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 197

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Arg Thr  
1 5

<210> 198  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 198

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys  
20

<210> 199  
<211> 15  
<212> PRT

374

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

<213> Homo sapiens

<400> 199

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

<210> 200

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 200

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

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

<210> 201

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 201

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
1 5 10

<210> 202

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X = E or D

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X = Q, N, R, K or H

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X = A, G, W or Y

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X = W, Y, K, R or H

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> X = K, R, H, W, Y, T or S

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> X = Y, W, N or Q

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X = A, G or V

375

LISTADO SECUENCIAS - COLO 15413 841 004 3

<400> 202

Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Phe Asp Xaa Phe Asp Ile  
1 5 10

<210> 203  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> X = D or E

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(2)  
<223> X = Q or R

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> X = A or W

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5)..(5)  
<223> X = W or K

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6)..(6)  
<223> X = W or K

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (7)..(7)  
<223> X = Y or N

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (10)..(10)  
<223> X = A or V

<400> 203

Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Phe Asp Xaa Phe Asp Ile  
1 5 10

376

PCT/US2009/004711

ATCC

10801 University Blvd • Manassas, VA 20110-2209 • Telephone: 703-365-2700 • FAX: 703-365-2745

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF  
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3  
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.

To: (Name and Address of Depositor or Attorney)

Pfizer Global R&D  
Attn: Dr. Ing-Kae Wang  
Groton Labs  
Eastern Point Road  
Groton, Connecticut 06340

Deposited on Behalf of: Pfizer, Inc.

Identification Reference by Depositor:

Mouse hybridoma cell line: LN 15923  
Mouse hybridoma cell line: LN 15925  
Mouse hybridoma cell line: LN 15924

Patent Deposit Designation

PTA-6979  
PTA-6980  
PTA-6981

The deposits were accompanied by:    a scientific description, a proposed taxonomic description indicated above. The deposits were received September 16, 2005 by this International Depository Authority and have been accepted.

AT YOUR REQUEST:   X   We will inform you of requests for the strains for 30 years.

The strains will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strains, and ATCC is instructed by the United States Patent & Trademark Office or the depositor to release said strains.

If the cultures should die or be destroyed during the effective term of the deposit, it shall be your responsibility to replace them with living cultures of the same.

The strains will be maintained for a period of at least 30 years from date of deposit, or five years after the most recent request for a sample, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

The viability of the cultures cited above was tested October 25, 2005. On that date, the cultures were viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Manassas, VA 20110-2209 USA.

Signature of person having authority to represent ATCC:

Marie Harris  
Marie Harris, Patent Specialist, ATCC Patent Depository

Date: October 29, 2005

cc: Kathleen A. Ramney  
Docket or Case No.: 32985



377

PCT/US2009/004711

ATCC

10801 University Blvd • Manassas, VA 20110-2209 • Telephone: 703-365-2700 • FAX: 703-365-2745

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF  
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3  
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.

To: (Name and Address of Depositor or Attorney)

Pfizer, Inc.  
Attn: Dr. Ing-Kae Wang  
Pfizer Global R&D  
Groton Labs  
Eastern Point Road  
Groton, CT 06340

Deposited on Behalf of: Pfizer, Inc.

Identification Reference by Depositor:  
Cell line: LN 15931  
Cell line: LN 15932

Patent Deposit Designation  
PTA-7341  
PTA-7342

The deposits were accompanied by: X a scientific description, a proposed taxonomic description indicated above. The deposits were received January 31, 2006 by this International Depository Authority and have been accepted.

AT YOUR REQUEST: X We will inform you of requests for the strains for 30 years.

The strains will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strains, and ATCC is instructed by the United States Patent & Trademark Office or the depositor to release said strains.

If the cultures should die or be destroyed during the effective term of the deposit, it shall be your responsibility to replace them with living cultures of the same.

The strains will be maintained for a period of at least 30 years from date of deposit, or five years after the most recent request for a sample, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

The viability of the cultures cited above was tested June 1, 2006. On that date, the cultures were viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Manassas, VA 20110-2209 USA.

Signature of person having authority to represent ATCC:

  
Tanya Nudnelly, Patent Specialist, ATCC Patent Depository

Date: July 25, 2006

cc: Kathleen A. Ranney  
(Ref: Docket or Case No: 32985)

0006590063W1

IN THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE  
OF THE PATENT COOPERATION TREATY

Applicants : Pfizer Inc. et al.  
Filed : Herewith  
For : ANTIBODIES TO CCR2

VIA EXPRESS MAIL (LABEL NO. EM 209744457 US)

HON. COMMISSIONER FOR PATENTS  
P.O. Box 1450  
Alexandria, Virginia 22313-1450

Date: 17 August 2009

MAIL STOP PCT - RO/US

INDICATIONS RELATING TO THE  
EXPERT SOLUTION IN RESPECT OF DEPOSITED  
BIOLOGICAL MATERIAL REFERRED TO IN THE DESCRIPTION

Sir:

The indications relating to deposited biological material are all contained in the description. The following additional indications are not required to be part of the description and should be treated as "separate indications." They relate only to the expert solution.

The additional indications made below relate to the deposited biological material referred to as Mouse hybridoma cell line: LN 15923 in the description on

The deposit was made with:

American Type Culture Collection (ATCC)  
10801 University Boulevard  
Manassas, Virginia 20110-2209  
United States of America

on 16 September 2005 (16.09.2005), under Deposit Number PTA-6979.

The additional indications are:

For CA (Canada) designation:

In respect of the designation of Canada, samples of the deposited biological material will be made available until the grant of the Canadian patent, or until the date on which the application is refused, or is abandoned and no longer subject to reinstatement, or is withdrawn, as provided in Rules 107 and 108 of the Patent Rules under the Canadian Patent Act, only by the issue of a sample to an independent expert nominated by the Commissioner (Rule 104(4)).

For HR (Croatia) designation:

In respect of the designation of Croatia, samples of the deposited biological material shall be made available between the publication of the application and the granting of the patent only to an independent expert. Should a patent be granted, notwithstanding cancellation or revocation of the patent, samples shall be made available to anyone requesting them, only if the person requesting them undertakes, for the term during which the patent is force: 1) not to make them or any material derived from them available to third parties; 2) not to use them or any material derived from them except for experimental or research purposes, unless the applicant for or owner of the patent, as applicable, expressly waives such undertaking.

For DK (Denmark) designation:

In respect of the designation of Denmark, samples of the deposited biological material, until the application has been laid open to public inspection (by the Danish Patent and Trademark Office), or has been finally decided upon by the Danish Patent and Trademark Office without having been laid open to public inspection, the furnishing of a sample shall only be effected to an expert in the art. Any request made by a third party for the furnishing of a sample shall indicate the expert to be used. That expert may be any person entered on a list of recognized experts drawn up by the Danish Patent and Trademark Office or any person approved by the applicant in the individual case.

For EP (European Patent) designation:

In respect of the designation of the EPO, samples of the deposited biological material will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent, or until 20 years from the date of filing if the application is refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, as provided in Rule 28(3) of the Implementing Regulations under the EPC, only by the issue of a sample to an expert nominated by requester (Rule 28(4) EPC).

For FI (Finland) designation:

In respect of the designation of Finland, until the publication of the mention of grant by the National Board of Patents and Registration, or for 20 years from the date of filing if the application has been finally decided upon without resulting in the grant of a patent by the National Board of Patents and Registration, the furnishing of samples of the deposited biological material will be made available only to an expert in the art.

For DE (Germany) designation:

In respect of the designation of Germany, until the grant of a patent or for 20 years from the date of filing if the application is refused or withdrawn, samples of the deposited biological material shall only be issued to an independent expert nominated by the applicant.

For GB (United Kingdom) designation:

In respect of the designation of the United Kingdom, the applicant(s) hereby give(s) notice of my/our intention that the furnishing of samples of the deposited biological material will be made available only to an expert in the art.

For IS (Iceland) designation:

In respect of the designation of Iceland, until a patent has been granted by the Icelandic Patent Office, or a final decision taken by the Icelandic Patent Office if the application has been finally decided upon without resulting in the grant of a patent, the furnishing of samples of the deposited biological material will only be effected to an expert in the art.

For MG (Macedonia) designation:

In respect of the designation of Macedonia, the furnishing of samples of the deposited biological material to a third party is subject to the condition that the party: (a) has a right to demand that a sample of the viable biological or microbiological material be made available; (b) has undertaken to ensure that the applicant does not authorize access to the sample of the deposited

viable biological material to any third party before the expiry of the prescribed period of validity of the patent.

For NO (Norway) designation:

In respect of the designation of Norway, until the application has been laid open to public inspection (by the Norwegian Patent Office), or has been finally decided upon by the Norwegian Patent Office without having been laid open to public inspection, the furnishing of a sample of the deposited biological material shall only be effected to an expert in the art. Any request made by a third party for the furnishing of a sample shall indicate the expert to be used. The expert may be any person entered on a list of recognized experts drawn up by the Norwegian Patent Office or any person approved by the applicant in the individual case.

For ES (Spain) designation:

In respect of the designation of Spain, until the publication of the mention of the grant of a Spanish patent or for 20 years from the date of filing if the application is refused or withdrawn, a sample of the biological material shall be made available as provided in Article 45 SPL only to an independent expert.

For SG (Singapore) designation:

Applicant(s) hereby give notice of my/our intention that samples of the above-identified culture shall be available only to experts in accordance with paragraph 3 of the Fourth Schedule to the Patents Rules 1995.

For SE (Sweden) designation:

In respect of the designation of Sweden, until the application has been laid open to public inspection (by the Swedish Patent Office), or has been finally decided upon by the Swedish Patent Office without having been laid open to public inspection, the furnishing of samples of the deposited biological material will be made available only to an expert in the art.

For CH (Switzerland) designation:

In respect of the designation of Switzerland, the furnishing of samples to a third party is subject to the condition that the party indicates to the depositary institution its name and address for the purpose of information of the depositor and undertakes: (a) not to make available the deposited culture or a culture derived from it to a third party; (b) not to use the culture outside the purview of the law; (c) to produce, in case of a dispute, evidence that the obligations under items (a) and (b) have not been violated.

0006590063W1

IN THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE  
OF THE PATENT COOPERATION TREATY

Applicants : Pfizer Inc. et al.  
Filed : Herewith  
For : ANTIBODIES TO CCR2

VIA EXPRESS MAIL (LABEL NO. EM 209744457 US)

HON. COMMISSIONER FOR PATENTS  
P.O. Box 1450  
Alexandria, Virginia 22313-1450

Date: 17 August 2009

MAIL STOP PCT - RO/US

INDICATIONS RELATING TO THE  
EXPERT SOLUTION IN RESPECT OF DEPOSITED  
BIOLOGICAL MATERIAL REFERRED TO IN THE DESCRIPTION

Sir:

The indications relating to deposited biological material are all contained in the description. The following additional indications are not required to be part of the description and should be treated as "separate indications." They relate only to the expert solution.

The additional indications made below relate to the deposited biological material referred to as Mouse hybridoma cell line: LN 15925 in the description on

The deposit was made with:

American Type Culture Collection (ATCC)  
10801 University Boulevard  
Manassas, Virginia 20110-2209  
United States of America

on 16 September 2005 (16.09.2005), under Deposit Number PTA-6980.

The additional indications are:

For CA (Canada) designation:

In respect of the designation of Canada, samples of the deposited biological material will be made available until the grant of the Canadian patent, or until the date on which the application is refused, or is abandoned and no longer subject to reinstatement, or is withdrawn, as provided in Rules 107 and 108 of the Patent Rules under the Canadian Patent Act, only by the issue of a sample to an independent expert nominated by the Commissioner (Rule 104(4)).

For HR (Croatia) designation:

In respect of the designation of Croatia, samples of the deposited biological material shall be made available between the publication of the application and the granting of the patent only to an independent expert. Should a patent be granted, notwithstanding cancellation or revocation of the patent, samples shall be made available to anyone requesting them, only if the person requesting them undertakes, for the term during which the patent is force: 1) not to make them or any material derived from them available to third parties; 2) not to use them or any material derived from them except for experimental or research purposes, unless the applicant for or owner of the patent, as applicable, expressly waives such undertaking.

For DK (Denmark) designation:

In respect of the designation of Denmark, samples of the deposited biological material, until the application has been laid open to public inspection (by the Danish Patent and Trademark Office), or has been finally decided upon by the Danish Patent and Trademark Office without having been laid open to public inspection, the furnishing of a sample shall only be effected to an expert in the art. Any request made by a third party for the furnishing of a sample shall indicate the expert to be used. That expert may be any person entered on a list of recognized experts drawn up by the Danish Patent and Trademark Office or any person approved by the applicant in the individual case.



For EP (European Patent) designation:

In respect of the designation of the EPO, samples of the deposited biological material will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent, or until 20 years from the date of filing if the application is refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, as provided in Rule 28(3) of the Implementing Regulations under the EPC, only by the issue of a sample to an expert nominated by requester (Rule 28(4) EPC).

For FI (Finland) designation:

In respect of the designation of Finland, until the publication of the mention of grant by the National Board of Patents and Registration, or for 20 years from the date of filing if the application has been finally decided upon without resulting in the grant of a patent by the National Board of Patents and Registration, the furnishing of samples of the deposited biological material will be made available only to an expert in the art.

For DE (Germany) designation:

In respect of the designation of Germany, until the grant of a patent or for 20 years from the date of filing if the application is refused or withdrawn, samples of the deposited biological material shall only be issued to an independent expert nominated by the applicant.

For GB (United Kingdom) designation:

In respect of the designation of the United Kingdom, the applicant(s) hereby give(s) notice of my/our intention that the furnishing of samples of the deposited biological material will be made available only to an expert in the art.

For IS (Iceland) designation:

In respect of the designation of Iceland, until a patent has been granted by the Icelandic Patent Office, or a final decision taken by the Icelandic Patent Office if the application has been finally decided upon without resulting in the grant of a patent, the furnishing of samples of the deposited biological material will only be effected to an expert in the art.

For MG (Macedonia) designation:

In respect of the designation of Macedonia, the furnishing of samples of the deposited biological material to a third party is subject to the condition that the party: (a) has a right to demand that a sample of the viable biological or microbiological material be made available; (b) has undertaken to ensure that the applicant does not authorize access to the sample of the deposited

viable biological material to any third party before the expiry of the prescribed period of validity of the patent.

For NO (Norway) designation:

In respect of the designation of Norway, until the application has been laid open to public inspection (by the Norwegian Patent Office), or has been finally decided upon by the Norwegian Patent Office without having been laid open to public inspection, the furnishing of a sample of the deposited biological material shall only be effected to an expert in the art. Any request made by a third party for the furnishing of a sample shall indicate the expert to be used. The expert may be any person entered on a list of recognized experts drawn up by the Norwegian Patent Office or any person approved by the applicant in the individual case.

For ES (Spain) designation:

In respect of the designation of Spain, until the publication of the mention of the grant of a Spanish patent or for 20 years from the date of filing if the application is refused or withdrawn, a sample of the biological material shall be made available as provided in Article 45 SPL only to an independent expert.

For SG (Singapore) designation:

Applicant(s) hereby give notice of my/our intention that samples of the above-identified culture shall be available only to experts in accordance with paragraph 3 of the Fourth Schedule to the Patents Rules 1995.

For SE (Sweden) designation:

In respect of the designation of Sweden, until the application has been laid open to public inspection (by the Swedish Patent Office), or has been finally decided upon by the Swedish Patent Office without having been laid open to public inspection, the furnishing of samples of the deposited biological material will be made available only to an expert in the art.

For CH (Switzerland) designation:

In respect of the designation of Switzerland, the furnishing of samples to a third party is subject to the condition that the party indicates to the depositary institution its name and address for the purpose of information of the depositor and undertakes: (a) not to make available the deposited culture or a culture derived from it to a third party; (b) not to use the culture outside the purview of the law; (c) to produce, in case of a dispute, evidence that the obligations under items (a) and (b) have not been violated.

388

0006590063W1

IN THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE  
OF THE PATENT COOPERATION TREATY

Applicants : Pfizer Inc. et al.  
Filed : Herewith  
For : ANTIBODIES TO CCR2

VIA EXPRESS MAIL (LABEL NO. EM 209744457 US)

HON. COMMISSIONER FOR PATENTS  
P.O. Box 1450  
Alexandria, Virginia 22313-1450

Date: 17 August 2009

MAIL STOP PCT - RO/US

INDICATIONS RELATING TO THE  
EXPERT SOLUTION IN RESPECT OF DEPOSITED  
BIOLOGICAL MATERIAL REFERRED TO IN THE DESCRIPTION

Sir:

The indications relating to deposited biological material are all contained in the description. The following additional indications are not required to be part of the description and should be treated as "separate indications." They relate only to the expert solution.

The additional indications made below relate to the deposited biological material referred to as Mouse hybridoma cell line: LN 15924 in the description on

The deposit was made with:

American Type Culture Collection (ATCC)  
10801 University Boulevard  
Manassas, Virginia 20110-2209  
United States of America

on 16 September 2005 (16.09.2005), under Deposit Number PTA-6981.

The additional indications are:

For CA (Canada) designation:

In respect of the designation of Canada, samples of the deposited biological material will be made available until the grant of the Canadian patent, or until the date on which the application is refused, or is abandoned and no longer subject to reinstatement, or is withdrawn, as provided in Rules 107 and 108 of the Patent Rules under the Canadian Patent Act, only by the issue of a sample to an independent expert nominated by the Commissioner (Rule 104(4)).

For HR (Croatia) designation:

In respect of the designation of Croatia, samples of the deposited biological material shall be made available between the publication of the application and the granting of the patent only to an independent expert. Should a patent be granted, notwithstanding cancellation or revocation of the patent, samples shall be made available to anyone requesting them, only if the person requesting them undertakes, for the term during which the patent is force: 1) not to make them or any material derived from them available to third parties; 2) not to use them or any material derived from them except for experimental or research purposes, unless the applicant for or owner of the patent, as applicable, expressly waives such undertaking.

For DK (Denmark) designation:

In respect of the designation of Denmark, samples of the deposited biological material, until the application has been laid open to public inspection (by the Danish Patent and Trademark Office), or has been finally decided upon by the Danish Patent and Trademark Office without having been laid open to public inspection, the furnishing of a sample shall only be effected to an expert in the art. Any request made by a third party for the furnishing of a sample shall indicate the expert to be used. That expert may be any person entered on a list of recognized experts drawn up by the Danish Patent and Trademark Office or any person approved by the applicant in the individual case.

For EP (European Patent) designation:

In respect of the designation of the EPO, samples of the deposited biological material will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent, or until 20 years from the date of filing if the application is refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, as provided in Rule 28(3) of the Implementing Regulations under the EPC, only by the issue of a sample to an expert nominated by requester (Rule 28(4) EPC).

For FI (Finland) designation:

In respect of the designation of Finland, until the publication of the mention of grant by the National Board of Patents and Registration, or for 20 years from the date of filing if the application has been finally decided upon without resulting in the grant of a patent by the National Board of Patents and Registration, the furnishing of samples of the deposited biological material will be made available only to an expert in the art.

For DE (Germany) designation:

In respect of the designation of Germany, until the grant of a patent or for 20 years from the date of filing if the application is refused or withdrawn, samples of the deposited biological material shall only be issued to an independent expert nominated by the applicant.

For GB (United Kingdom) designation:

In respect of the designation of the United Kingdom, the applicant(s) hereby give(s) notice of my/our intention that the furnishing of samples of the deposited biological material will be made available only to an expert in the art.

For IS (Iceland) designation:

In respect of the designation of Iceland, until a patent has been granted by the Icelandic Patent Office, or a final decision taken by the Icelandic Patent Office if the application has been finally decided upon without resulting in the grant of a patent, the furnishing of samples of the deposited biological material will only be effected to an expert in the art.

For MG (Macedonia) designation:

In respect of the designation of Macedonia, the furnishing of samples of the deposited biological material to a third party is subject to the condition that the party: (a) has a right to demand that a sample of the viable biological or microbiological material be made available; (b) has undertaken to ensure that the applicant does not authorize access to the sample of the deposited

viable biological material to any third party before the expiry of the prescribed period of validity of the patent.

For NO (Norway) designation:

In respect of the designation of Norway, until the application has been laid open to public inspection (by the Norwegian Patent Office), or has been finally decided upon by the Norwegian Patent Office without having been laid open to public inspection, the furnishing of a sample of the deposited biological material shall only be effected to an expert in the art. Any request made by a third party for the furnishing of a sample shall indicate the expert to be used. The expert may be any person entered on a list of recognized experts drawn up by the Norwegian Patent Office or any person approved by the applicant in the individual case.

For ES (Spain) designation:

In respect of the designation of Spain, until the publication of the mention of the grant of a Spanish patent or for 20 years from the date of filing if the application is refused or withdrawn, a sample of the biological material shall be made available as provided in Article 45 SPL only to an independent expert.

For SG (Singapore) designation:

Applicant(s) hereby give notice of my/our intention that samples of the above-identified culture shall be available only to experts in accordance with paragraph 3 of the Fourth Schedule to the Patents Rules 1995.

For SE (Sweden) designation:

In respect of the designation of Sweden, until the application has been laid open to public inspection (by the Swedish Patent Office), or has been finally decided upon by the Swedish Patent Office without having been laid open to public inspection, the furnishing of samples of the deposited biological material will be made available only to an expert in the art.

For CH (Switzerland) designation:

In respect of the designation of Switzerland, the furnishing of samples to a third party is subject to the condition that the party indicates to the depositary institution its name and address for the purpose of information of the depositor and undertakes: (a) not to make available the deposited culture or a culture derived from it to a third party; (b) not to use the culture outside the purview of the law; (c) to produce, in case of a dispute, evidence that the obligations under items (a) and (b) have not been violated.



0006590063W1

IN THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE  
OF THE PATENT COOPERATION TREATY

Applicants : Pfizer Inc. et al.  
Filed : Herewith  
For : ANTIBODIES TO CCR2

VIA EXPRESS MAIL (LABEL NO. EM 209744457 US)

HON. COMMISSIONER FOR PATENTS  
P.O. Box 1450  
Alexandria, Virginia 22313-1450

Date: 17 August 2009

MAIL STOP PCT - RO/US

INDICATIONS RELATING TO THE  
EXPERT SOLUTION IN RESPECT OF DEPOSITED  
BIOLOGICAL MATERIAL REFERRED TO IN THE DESCRIPTION

Sir:

The indications relating to deposited biological material are all contained in the description. The following additional indications are not required to be part of the description and should be treated as "separate indications." They relate only to the expert solution.

The additional indications made below relate to the deposited biological material referred to as Cell line: LN 15931 in the description on

The deposit was made with:

American Type Culture Collection (ATCC)  
10801 University Boulevard  
Manassas, Virginia 20110-2209  
United States of America

on 31 January 2006 (31.01.2006), under Deposit Number PTA-7341.

The additional indications are:

For CA (Canada) designation:

In respect of the designation of Canada, samples of the deposited biological material will be made available until the grant of the Canadian patent, or until the date on which the application is refused, or is abandoned and no longer subject to reinstatement, or is withdrawn, as provided in Rules 107 and 108 of the Patent Rules under the Canadian Patent Act, only by the issue of a sample to an independent expert nominated by the Commissioner (Rule 104(4)).

For HR (Croatia) designation:

In respect of the designation of Croatia, samples of the deposited biological material shall be made available between the publication of the application and the granting of the patent only to an independent expert. Should a patent be granted, notwithstanding cancellation or revocation of the patent, samples shall be made available to anyone requesting them, only if the person requesting them undertakes, for the term during which the patent is force: 1) not to make them or any material derived from them available to third parties; 2) not to use them or any material derived from them except for experimental or research purposes, unless the applicant for or owner of the patent, as applicable, expressly waives such undertaking.

For DK (Denmark) designation:

In respect of the designation of Denmark, samples of the deposited biological material, until the application has been laid open to public inspection (by the Danish Patent and Trademark Office), or has been finally decided upon by the Danish Patent and Trademark Office without having been laid open to public inspection, the furnishing of a sample shall only be effected to an expert in the art. Any request made by a third party for the furnishing of a sample shall indicate the expert to be used. That expert may be any person entered on a list of recognized experts drawn up by the Danish Patent and Trademark Office or any person approved by the applicant in the individual case.

For EP (European Patent) designation:

In respect of the designation of the EPO, samples of the deposited biological material will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent, or until 20 years from the date of filing if the application is refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, as provided in Rule 28(3) of the Implementing Regulations under the EPC, only by the issue of a sample to an expert nominated by requester (Rule 28(4) EPC).

For FI (Finland) designation:

In respect of the designation of Finland, until the publication of the mention of grant by the National Board of Patents and Registration, or for 20 years from the date of filing if the application has been finally decided upon without resulting in the grant of a patent by the National Board of Patents and Registration, the furnishing of samples of the deposited biological material will be made available only to an expert in the art.

For DE (Germany) designation:

In respect of the designation of Germany, until the grant of a patent or for 20 years from the date of filing if the application is refused or withdrawn, samples of the deposited biological material shall only be issued to an independent expert nominated by the applicant.

For GB (United Kingdom) designation:

In respect of the designation of the United Kingdom, the applicant(s) hereby give(s) notice of my/our intention that the furnishing of samples of the deposited biological material will be made available only to an expert in the art.

For IS (Iceland) designation:

In respect of the designation of Iceland, until a patent has been granted by the Icelandic Patent Office, or a final decision taken by the Icelandic Patent Office if the application has been finally decided upon without resulting in the grant of a patent, the furnishing of samples of the deposited biological material will only be effected to an expert in the art.

For MG (Macedonia) designation:

In respect of the designation of Macedonia, the furnishing of samples of the deposited biological material to a third party is subject to the condition that the party: (a) has a right to demand that a sample of the viable biological or microbiological material be made available; (b) has undertaken to ensure that the applicant does not authorize access to the sample of the deposited

viable biological material to any third party before the expiry of the prescribed period of validity of the patent.

For NO (Norway) designation:

In respect of the designation of Norway, until the application has been laid open to public inspection (by the Norwegian Patent Office), or has been finally decided upon by the Norwegian Patent Office without having been laid open to public inspection, the furnishing of a sample of the deposited biological material shall only be effected to an expert in the art. Any request made by a third party for the furnishing of a sample shall indicate the expert to be used. The expert may be any person entered on a list of recognized experts drawn up by the Norwegian Patent Office or any person approved by the applicant in the individual case.

For ES (Spain) designation:

In respect of the designation of Spain, until the publication of the mention of the grant of a Spanish patent or for 20 years from the date of filing if the application is refused or withdrawn, a sample of the biological material shall be made available as provided in Article 45 SPL only to an independent expert.

For SG (Singapore) designation:

Applicant(s) hereby give notice of my/our intention that samples of the above-identified culture shall be available only to experts in accordance with paragraph 3 of the Fourth Schedule to the Patents Rules 1995.

For SE (Sweden) designation:

In respect of the designation of Sweden, until the application has been laid open to public inspection (by the Swedish Patent Office), or has been finally decided upon by the Swedish Patent Office without having been laid open to public inspection, the furnishing of samples of the deposited biological material will be made available only to an expert in the art.

297

For CH (Switzerland) designation:

In respect of the designation of Switzerland, the furnishing of samples to a third party is subject to the condition that the party indicates to the depositary institution its name and address for the purpose of information of the depositor and undertakes: (a) not to make available the deposited culture or a culture derived from it to a third party; (b) not to use the culture outside the purview of the law; (c) to produce, in case of a dispute, evidence that the obligations under items (a) and (b) have not been violated.

398

0006590063W1

IN THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE  
OF THE PATENT COOPERATION TREATY

Applicants : Pfizer Inc. et al.  
Filed : Herewith  
For : ANTIBODIES TO CCR2

VIA EXPRESS MAIL (LABEL NO. EM 209744457 US)

HON. COMMISSIONER FOR PATENTS  
P.O. Box 1450  
Alexandria, Virginia 22313-1450

Date: 17 August 2009

MAIL STOP PCT - RO/US

INDICATIONS RELATING TO THE  
EXPERT SOLUTION IN RESPECT OF DEPOSITED  
BIOLOGICAL MATERIAL REFERRED TO IN THE DESCRIPTION

Sir:

The indications relating to deposited biological material are all contained in the description. The following additional indications are not required to be part of the description and should be treated as "separate indications." They relate only to the expert solution.

The additional indications made below relate to the deposited biological material referred to as Cell line: LN 15932 in the description on

The deposit was made with:

American Type Culture Collection (ATCC)  
10801 University Boulevard  
Manassas, Virginia 20110-2209  
United States of America

on 31 January 2006 (31.01.2006), under Deposit Number PTA-7342.

The additional indications are:

For CA (Canada) designation:

In respect of the designation of Canada, samples of the deposited biological material will be made available until the grant of the Canadian patent, or until the date on which the application is refused, or is abandoned and no longer subject to reinstatement, or is withdrawn, as provided in Rules 107 and 108 of the Patent Rules under the Canadian Patent Act, only by the issue of a sample to an independent expert nominated by the Commissioner (Rule 104(4)).

For HR (Croatia) designation:

In respect of the designation of Croatia, samples of the deposited biological material shall be made available between the publication of the application and the granting of the patent only to an independent expert. Should a patent be granted, notwithstanding cancellation or revocation of the patent, samples shall be made available to anyone requesting them, only if the person requesting them undertakes, for the term during which the patent is force: 1) not to make them or any material derived from them available to third parties; 2) not to use them or any material derived from them except for experimental or research purposes, unless the applicant for or owner of the patent, as applicable, expressly waives such undertaking.

For DK (Denmark) designation:

In respect of the designation of Denmark, samples of the deposited biological material, until the application has been laid open to public inspection (by the Danish Patent and Trademark Office), or has been finally decided upon by the Danish Patent and Trademark Office without having been laid open to public inspection, the furnishing of a sample shall only be effected to an expert in the art. Any request made by a third party for the furnishing of a sample shall indicate the expert to be used. That expert may be any person entered on a list of recognized experts drawn up by the Danish Patent and Trademark Office or any person approved by the applicant in the individual case.

For EP (European Patent) designation:

In respect of the designation of the EPO, samples of the deposited biological material will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent, or until 20 years from the date of filing if the application is refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, as provided in Rule 28(3) of the Implementing Regulations under the EPC, only by the issue of a sample to an expert nominated by requester (Rule 28(4) EPC).

For FI (Finland) designation:

In respect of the designation of Finland, until the publication of the mention of grant by the National Board of Patents and Registration, or for 20 years from the date of filing if the application has been finally decided upon without resulting in the grant of a patent by the National Board of Patents and Registration, the furnishing of samples of the deposited biological material will be made available only to an expert in the art.

For DE (Germany) designation:

In respect of the designation of Germany, until the grant of a patent or for 20 years from the date of filing if the application is refused or withdrawn, samples of the deposited biological material shall only be issued to an independent expert nominated by the applicant.

For GB (United Kingdom) designation:

In respect of the designation of the United Kingdom, the applicant(s) hereby give(s) notice of my/our intention that the furnishing of samples of the deposited biological material will be made available only to an expert in the art.

For IS (Iceland) designation:

In respect of the designation of Iceland, until a patent has been granted by the Icelandic Patent Office, or a final decision taken by the Icelandic Patent Office if the application has been finally decided upon without resulting in the grant of a patent, the furnishing of samples of the deposited biological material will only be effected to an expert in the art.

For MG (Macedonia) designation:

In respect of the designation of Macedonia, the furnishing of samples of the deposited biological material to a third party is subject to the condition that the party: (a) has a right to demand that a sample of the viable biological or microbiological material be made available; (b) has undertaken to ensure that the applicant does not authorize access to the sample of the deposited



viable biological material to any third party before the expiry of the prescribed period of validity of the patent.

For NO (Norway) designation:

In respect of the designation of Norway, until the application has been laid open to public inspection (by the Norwegian Patent Office), or has been finally decided upon by the Norwegian Patent Office without having been laid open to public inspection, the furnishing of a sample of the deposited biological material shall only be effected to an expert in the art. Any request made by a third party for the furnishing of a sample shall indicate the expert to be used. The expert may be any person entered on a list of recognized experts drawn up by the Norwegian Patent Office or any person approved by the applicant in the individual case.

For ES (Spain) designation:

In respect of the designation of Spain, until the publication of the mention of the grant of a Spanish patent or for 20 years from the date of filing if the application is refused or withdrawn, a sample of the biological material shall be made available as provided in Article 45 SPL only to an independent expert.

For SG (Singapore) designation:

Applicant(s) hereby give notice of my/our intention that samples of the above-identified culture shall be available only to experts in accordance with paragraph 3 of the Fourth Schedule to the Patents Rules 1995.

For SE (Sweden) designation:

In respect of the designation of Sweden, until the application has been laid open to public inspection (by the Swedish Patent Office), or has been finally decided upon by the Swedish Patent Office without having been laid open to public inspection, the furnishing of samples of the deposited biological material will be made available only to an expert in the art.

ep2

For CH (Switzerland) designation:

In respect of the designation of Switzerland, the furnishing of samples to a third party is subject to the condition that the party indicates to the depositary institution its name and address for the purpose of information of the depositor and undertakes: (a) not to make available the deposited culture or a culture derived from it to a third party; (b) not to use the culture outside the purview of the law; (c) to produce, in case of a dispute, evidence that the obligations under items (a) and (b) have not been violated.

403

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2009/004711

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>INV. C07K16/28 C07K14/715 C12N5/12 A61P25/00 A61P37/00<br>A61P31/00                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                      |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>C07K C12N<br><br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br><br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)<br>EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, CHEM ABS Data                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                      |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                      |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Relevant to claim No.                                                |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | WO 03/066830 A (GENETASTIX CORP [US]; HUA SHAOBING [US]; PAULING MICHELLE H [US]; ZHU) 14 August 2003 (2003-08-14) abstract; claims 14,21,44                                                                                                                                                                                                                               | 1-31                                                                 |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | HAN KI HOON ET AL: "Role of the first extracellular loop in the functional activation of CCR2: The first extracellular loop contains distinct domains necessary for both agonist binding and transmembrane signaling" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 45, 5 November 1999 (1999-11-05), pages 32055-32062, XP002558598 ISSN: 0021-9258 abstract figures 2,3 | 1-31                                                                 |
| -/--                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                      |
| * Special categories of cited documents :<br><div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>           'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br/>           'E' earlier document but published on or after the International filing date<br/>           'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br/>           'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br/>           'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed         </div> <div>           'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br/>           'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br/>           'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.<br/>           'G' document member of the same patent family         </div> </div> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                      |
| Date of the actual completion of the international search<br><br>17 May 2010                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Date of mailing of the international search report<br><br>03/08/2010 |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel: (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Authorized officer<br><br>Lechner, Oskar                             |

401

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2009/004711

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                       |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Relevant to claim No. |
| A                                                    | <p>           FRADE J M ET AL: "The amino-terminal domain of the CCR2 chemokine receptor acts as coreceptor for HIV-1 infection."<br/>           THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION 1<br/>           AUG 1997,<br/>           vol. 100, no. 3,<br/>           1 August 1997 (1997-08-01), pages 497-502,<br/>           XP002558600<br/>           ISSN: 0021-9738<br/>           the whole document         </p>                    | 1-31                  |
| A                                                    | <p>           FRADE J M ET AL: "Characterization of the CCR2 chemokine receptor: functional CCR2 receptor expression in B cells."<br/>           JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 1 DEC 1997,<br/>           vol. 159, no. 11,<br/>           1 December 1997 (1997-12-01), pages 5576-5584, XP002558601<br/>           ISSN: 0022-1767<br/>           the whole document         </p>                                     | 1                     |
| A                                                    | <p>           WO 00/05265 A (LEUKOSITE INC [US]; LAROSA GREGORY J [US]; HORVATH CHRISTOPHER [US]; N) 3 February 2000 (2000-02-03)<br/>           abstract; claims 1-6         </p>                                                                                                                                                                                                                                                      | 1-31                  |
| A                                                    | <p>           WO 97/31949 A (PHARMACIA &amp; UPJOHN AB [SE]; CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION [ES]; LIND) 4 September 1997 (1997-09-04)<br/>           abstract; tables 1,3         </p>                                                                                                                                                                                                                                                  | 1-31                  |
| A                                                    | <p>           RODRIGUEZ-FRADE-JM ET AL.: "CCR2"[Online] 2000, XP002558599<br/>           DOI: 10.1006/rwcy.2000.22002<br/>           Retrieved from the Internet:<br/>           URL: <a href="http://apresslp.gvpi.net/apcyto/lpext.dll?f=objects&amp;fn=c22002.pdf">http://apresslp.gvpi.net/apcyto/lpext.dll?f=objects&amp;fn=c22002.pdf</a><br/>           [retrieved on 2009-12-02]<br/>           the whole document         </p> | 1-31                  |
| A                                                    | <p>           DAWSON JANET ET AL: "Targeting monocyte chemoattractant protein-1 signalling in disease."<br/>           EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC TARGETS, vol. 7, no. 1, February 2003 (2003-02), pages 35-48, XP09014960<br/>           ISSN: 1744-7631<br/>           the whole document         </p>                                                                                                                             | 1-31                  |
| A                                                    | <p>           WO 2006/013427 A (PFIZER PROD INC [US]; CORNELIUS PETER [US]; GLADUE RONALD PAUL [US]; G) 9 February 2006 (2006-02-09)<br/>           the whole document         </p>                                                                                                                                                                                                                                                     | 1-31                  |
|                                                      | -/--                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                       |

405

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2009/004711

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                       |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Relevant to claim No. |
| A                                                    | SAITOH ET AL: "Viral envelope protein gp64 transgenic mouse facilitates the generation of monoclonal antibodies against exogenous membrane proteins displayed on baculovirus"<br>JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 322, no. 1-2, 14 April 2007 (2007-04-14), pages 104-117, XP022040569<br>ISSN: 0022-1759<br>abstract | 1-31                  |
| A                                                    | -----<br>LONBERG ET AL: "Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms"<br>CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, OXFORD, GB, vol. 20, no. 4, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 450-459, XP025771204<br>ISSN: 0952-7915 [retrieved on 2008-07-21]<br>the whole document                                                                        | 1-31                  |
| A                                                    | -----<br>JAIN ET AL: "Engineering antibodies for clinical applications"<br>TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 25, no. 7, 1 July 2007 (2007-07-01), pages 307-316, XP022116341<br>ISSN: 0167-7799<br>the whole document                                                                                                                     | 1-31                  |
| A                                                    | -----<br>MELLADO MARIO ET AL: "Chemokine receptor 2 blockade prevents asthma in a cynomolgus monkey model"<br>JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, vol. 324, no. 2, February 2008 (2008-02), pages 769-775, XP002582322<br>ISSN: 0022-3565<br>the whole document                                                                                          | 1-31                  |
| A                                                    | -----<br>TSUI PING ET AL: "Generation, characterization and biological activity of CCL2 (MCP-1/JE) and CCL12 (MCP-5) specific antibodies"<br>HUMAN ANTIBODIES, IOS PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 16, no. 3-4, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 117-125, XP009101113<br>ISSN: 1093-2607<br>the whole document                                                                 | 1-31                  |

406

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2009/004711

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:  
1-3, 20-31(completely); 4-19(partially)
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

407

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-31(partially)

Claims 1-31 only as far as and if relating to invention 1  
An isolated human monoclonal antibody or an antigen-binding portion thereof that specifically binds to an epitope contained within the first extracellular loop of human CCR2, cells expressing, nucleic acids encoding and vectors comprising said nucleic acid as well as therapeutic uses of said Ab

---

2. claims: 1-31(partially)

Claims 1-31 only as far as and if relating to invention 2  
An isolated human monoclonal antibody or an antigen-binding portion thereof that specifically binds to an epitope contained within a second extracellular loop of human CCR2, cells expressing, nucleic acids encoding and vectors comprising said nucleic acid as well as therapeutic uses of said Ab

---

3. claims: 1-31(partially)

Claims 1-31 only as far as and if relating to invention 3  
An isolated human monoclonal antibody or an antigen-binding portion thereof that specifically binds to an epitope contained within both the first and second extracellular loops of human CCR2, cells expressing, nucleic acids encoding and vectors comprising said nucleic acid as well as therapeutic uses of said Ab

---

4. claims: 4-19(partially)

Claims 4-19 only as far as and if relating to invention 4  
The isolated human mAb 4.22, represented by VL SeqID 64-72, VH SeqID 46-54) or an antigen-binding portion thereof that specifically binds to an epitope contained within the third extracellular loop of human CCR2, cells expressing, nucleic acids encoding and vectors comprising said nucleic acid as well as therapeutic uses of said Ab

---

5. claims: 4-19(partially)

48

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Claims 4-19 only as far as and in relating to invention 5:  
The isolated human mAb 4.39 represented by Vh SeqID 175-183  
and VL SeqID 193-203 or an antigen-binding portion thereof  
that specifically binds to an epitope contained within full  
length human CCR2, cells expressing, nucleic acids encoding  
and vectors comprising said nucleic acid as well as  
therapeutic uses of said Ab

---



409

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2009/004711

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 03066830                               | A | 14-08-2003          | AU 2003209059 A1           | 02-09-2003          |
| WO 0005265                                | A | 03-02-2000          | AT 446973 T                | 15-11-2009          |
|                                           |   |                     | AU 764825 B2               | 28-08-2003          |
|                                           |   |                     | AU 2003213475 A1           | 14-08-2003          |
|                                           |   |                     | AU 2006206064 A1           | 28-09-2006          |
|                                           |   |                     | AU 2009200820 A1           | 19-03-2009          |
|                                           |   |                     | CA 2336250 A1              | 03-02-2000          |
|                                           |   |                     | EP 2058333 A2              | 13-05-2009          |
|                                           |   |                     | EP 1098908 A2              | 16-05-2001          |
|                                           |   |                     | ES 2335948 T3              | 06-04-2010          |
|                                           |   |                     | JP 4057243 B2              | 05-03-2008          |
|                                           |   |                     | JP 2002521021 T            | 16-07-2002          |
|                                           |   |                     | JP 2007262074 A            | 11-10-2007          |
|                                           |   |                     | JP 2009143926 A            | 02-07-2009          |
|                                           |   |                     | US 6312689 B1              | 06-11-2001          |
|                                           |   |                     | US 6352832 B1              | 05-03-2002          |
|                                           |   |                     | US 2002037285 A1           | 28-03-2002          |
|                                           |   |                     | US 2002150570 A1           | 17-10-2002          |
|                                           |   |                     | US 2002051781 A1           | 02-05-2002          |
|                                           |   |                     | US 2003165494 A1           | 04-09-2003          |
|                                           |   |                     | US 2002028436 A1           | 07-03-2002          |
|                                           |   |                     | US 2002015700 A1           | 07-02-2002          |
|                                           |   |                     | US 2002012664 A1           | 31-01-2002          |
|                                           |   |                     | US 2002051782 A1           | 02-05-2002          |
|                                           |   |                     | US 2008268536 A1           | 30-10-2008          |
|                                           |   |                     | US 2008241923 A1           | 02-10-2008          |
|                                           |   |                     | US 2009142339 A1           | 04-06-2009          |
|                                           |   |                     | US 2008241136 A1           | 02-10-2008          |
| WO 9731949                                | A | 04-09-1997          | AT 258560 T                | 15-02-2004          |
|                                           |   |                     | AU 724037 B2               | 07-09-2000          |
|                                           |   |                     | AU 2110497 A               | 16-09-1997          |
|                                           |   |                     | DE 69727382 D1             | 04-03-2004          |
|                                           |   |                     | DE 69727382 T2             | 04-11-2004          |
|                                           |   |                     | DK 914345 T3               | 10-05-2004          |
|                                           |   |                     | EP 0914345 A1              | 12-05-1999          |
|                                           |   |                     | ES 2210496 T3              | 01-07-2004          |
|                                           |   |                     | JP 2000510685 T            | 22-08-2000          |
|                                           |   |                     | PT 914345 E                | 31-05-2004          |
|                                           |   |                     | US 6084075 A               | 04-07-2000          |
| WO 2006013427                             | A | 09-02-2006          | AU 2005268545 A1           | 09-02-2006          |
|                                           |   |                     | BR PI0513953 A             | 20-05-2008          |
|                                           |   |                     | CA 2575612 A1              | 09-02-2006          |
|                                           |   |                     | CN 101005855 A             | 25-07-2007          |
|                                           |   |                     | EP 1778285 A2              | 02-05-2007          |
|                                           |   |                     | JP 2008508253 T            | 21-03-2008          |
|                                           |   |                     | KR 20080044360 A           | 20-05-2008          |
|                                           |   |                     | US 2009196823 A1           | 06-08-2009          |
|                                           |   |                     | ZA 200700823 A             | 29-10-2008          |

410

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

To:

GUNNISON, Jane T.  
Ropes & Gray LLP  
1211 Avenue of the Americas  
New York, New York 10036-8704  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

|                                                                   |                                                                           |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Date of mailing (day/month/year)<br>10 February 2011 (10.02.2011) |                                                                           |
| Applicant's or agent's file reference<br>0006590063W1             | IMPORTANT NOTIFICATION                                                    |
| International application No.<br>PCT/US2009/004711                | International filing date (day/month/year)<br>17 August 2009 (17.08.2009) |

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant      ☐ the inventor      ☐ the agent      ☐ the common representative

|                  |                      |                    |
|------------------|----------------------|--------------------|
| Name and Address | State of Nationality | State of Residence |
|                  | Telephone No.        |                    |
|                  | Facsimile No.        |                    |
|                  | E-mail address       |                    |

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person      ☐ the name      ☐ the address      ☐ the nationality      ☐ the residence

|                                                                                                                      |                                                                               |                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Name and Address<br>AMGEN FREMONT INC.<br>6701 Kaiser Drive<br>Fremont, California 94555<br>United States of America | State of Nationality<br>US                                                    | State of Residence<br>US |
|                                                                                                                      | Telephone No.                                                                 |                          |
|                                                                                                                      | Facsimile No.                                                                 |                          |
|                                                                                                                      | E-mail address<br><input type="checkbox"/> Notifications by e-mail authorized |                          |

3. Further observations, if necessary:  
The person identified in Box 2 should be added to the record as applicant for all designated States except the United States of America.

4. A copy of this notification has been sent to:

|                                                                                |                                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office                       | <input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority |
| <input type="checkbox"/> the International Searching Authority                 | <input checked="" type="checkbox"/> the designated Offices concerned       |
| <input type="checkbox"/> the Authority(ies) specified for supplementary search | <input type="checkbox"/> the elected Offices concerned                     |
|                                                                                | <input type="checkbox"/> other:                                            |

|                                                                                               |                                                            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer<br><br>Taylor Sean                      |
| Facsimile No. +41 22 338 89 65                                                                | e-mail pt02.pct@wipo.int<br>Telephone No. +41 22 338 74 02 |

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2009/004711

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

To:

G'UNNISON, Jane T.  
Ropes & Gray LLP  
1211 Avenue of the Americas  
New York, New York 10036-8704  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

|                                                                   |                                                                           |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Date of mailing (day/month/year)<br>10 February 2011 (10.02.2011) | IMPORTANT NOTIFICATION                                                    |
| Applicant's or agent's file reference<br>0006590063W1             |                                                                           |
| International application No.<br>PCT/US2009/004711                | International filing date (day/month/year)<br>17 August 2009 (17.08.2009) |

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant      ☒ the inventor      ☐ the agent      ☐ the common representative

|                                                                                                              |                      |                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|--------------------|
| Name and Address<br>BELOUSKI, Shelley Sims<br>GREEN, Larry L.<br>LIANG, Meina L.<br>United States of America | State of Nationality | State of Residence |
|                                                                                                              | Telephone No.        |                    |
|                                                                                                              | Facsimile No.        |                    |
|                                                                                                              | E-mail address       |                    |

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person      ☐ the name      ☐ the address      ☐ the nationality      ☐ the residence

|                                                                                  |                                                                               |                    |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Name and Address<br>BELOUSKI, Shelley Sims<br>GREEN, Larry L.<br>LIANG, Meina L. | State of Nationality                                                          | State of Residence |
|                                                                                  | Telephone No.                                                                 |                    |
|                                                                                  | Facsimile No.                                                                 |                    |
|                                                                                  | E-mail address<br><input type="checkbox"/> Notifications by e-mail authorized |                    |

3. Further observations, if necessary:  
The persons identified in Box 2 are now recorded as applicants for the United States of America only and inventors for all designated States.

4. A copy of this notification has been sent to:

|                                                                                |                                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office                       | <input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority |
| <input type="checkbox"/> the International Searching Authority                 | <input checked="" type="checkbox"/> the designated Offices concerned       |
| <input type="checkbox"/> the Authority(ies) specified for supplementary search | <input type="checkbox"/> the elected Offices concerned                     |
|                                                                                | <input type="checkbox"/> other:                                            |

|                                                                                               |                                                            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer<br><br>Taylor Sean                      |
| Facsimile No. +41 22 338 89 65                                                                | e-mail pt02.pct@wipo.int<br>Telephone No. +41 22 338 74 02 |

42

|                                                                                                                                      |                                                       |                                                                                                                                                                             |                               |                           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| <br><b>Industria y Comercio</b><br>SUPERINTENDENCIA |                                                       | <b>SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO</b><br><b>DIVISION DE NUEVAS CREACIONES</b><br><b>EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN</b><br><b>SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT</b> |                               |                           |
| (21) N° de solicitud:                                                                                                                |                                                       | (51) Int Cl: <b>C07K 016/028</b>                                                                                                                                            |                               |                           |
| 22) Fecha de solicitud:                                                                                                              |                                                       | (71) Solicitante(s) <b>PFIZER INC Y AMGEN FREMONT INC.</b>                                                                                                                  |                               |                           |
| (30) Prioridad                                                                                                                       | (31) <b>Prioridad</b><br><b>61/189,357</b>            | (32) <b>Fecha</b><br><b>18/08/2008</b>                                                                                                                                      | (33) <b>País</b><br><b>US</b> |                           |
|                                                                                                                                      |                                                       | (72) Inventor(es) <b>SHELLEY SIMS BELOUSKI</b><br><b>Y OTROS</b>                                                                                                            |                               |                           |
|                                                                                                                                      |                                                       | (74) Apoderado: <b>LUZ CLEMENCIA DE PAEZ</b>                                                                                                                                |                               |                           |
| (85)                                                                                                                                 | Fecha limite inicio fase nacional: 18/03/2011         |                                                                                                                                                                             | (87)                          | Publicación internacional |
| (86)                                                                                                                                 | Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT |                                                                                                                                                                             | Fecha:                        | 25/02/2010                |
|                                                                                                                                      | Fecha de presentación de la solicitud: 17/08/2009     |                                                                                                                                                                             | N° publicación:               | <b>WO 2010/021697 A3</b>  |
|                                                                                                                                      | No. de solicitud PCT/US2009/004711                    |                                                                                                                                                                             |                               |                           |
| (54) Titulo: <b>ANTICUERPOS PARA CCR2</b>                                                                                            |                                                       |                                                                                                                                                                             |                               |                           |

**Reivindicación(es):**

1. Un anticuerpo monoclonal de humano aislado o una porción de unión al antígeno del mismo que especialmente se une al CCR2 de humano en donde el anticuerpo
- a) se une a un epítoto contenido dentro de un primer bucle extracelular del CCR2 de humano;
  - b) se une a un epítoto contenido dentro de un segundo bucle extracelular del CCR2 de humano; o
  - c) se une a un epítoto contenido dentro de ambos el primero y segundo bucles extracelulares del CCR2 de humano.
2. El anticuerpo monoclonal de humano o una porción de unión al antígeno de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo posee al menos una de las siguientes propiedades:
- a) tiene una selectividad para el CCR2 de humano que es al menos 100 veces mayor que su selectividad para el CCR5 de humano;
  - b) se une al CCR2 de humano con un  $K_D$  de  $2.0 \times 10^{-7}$  M o menor;
  - c) compete con el MCP-1 y/o MCP-3 para unirse al CCR2;
  - d) reduce la movilización de  $Ca^{2+}$  en respuesta a MCP-1;
  - e) reduce la síntesis de mRNA de Colágeno I en respuesta a MCP-1;
  - f) reduce la fosforilación pERK en monocitos de humano en respuesta a MCP-1;
  - g) reduce la quimiotaxis de monocitos de humano en respuesta a MCP-1; y
  - h) reduce la polimerización de actina en monocitos de humano en respuesta a MCP-1.
3. El anticuerpo monoclonal de humano o una porción de unión al antígeno de conformidad con la reivindicación 1, en donde el primer bucle extracelular del CCR2 de humano comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:128; y el segundo bucle extracelular del CCR2 de humano comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:129.
4. Un anticuerpo monoclonal de humano aislado o una porción de unión al antígeno del mismo que específicamente se une al CCR2 de humano, que comprende una secuencia

- de aminoácidos de dominio variable ( $V_H$ ) de cadena pesada comprendiendo un CDR1, un CDR2, y un CDR3 seleccionado del grupo que consiste de:
- a) un  $V_H$  CDR1 como se establece en la SEQ ID NO:12, un  $V_H$  CDR2 como se establece en la SEQ ID NO:13, y un  $V_H$  CDR3 como se establece en la SEQ ID NO:14;
  - b) un  $V_H$  CDR1 como se establece en la SEQ ID NO:48, un  $V_H$  CDR2 como se establece en la SEQ ID NO:49, y un  $V_H$  CDR3 como se establece en la SEQ ID NO:50;
  - c) un  $V_H$  CDR1 como se establece en la SEQ ID NO:84, un  $V_H$  CDR2 como se establece en la SEQ ID NO:85, y un  $V_H$  CDR3 como se establece en la SEQ ID NO:86; y
  - d) un  $V_H$  CDR1 como se establece en la SEQ ID NO:177, un  $V_H$  CDR2 como se establece en la SEQ ID NO:178, y un  $V_H$  CDR3 como se establece en la SEQ ID NO:179.
5. El anticuerpo monoclonal de humano aislado o la porción de unión al antígeno del mismo de conformidad con la reivindicación 4, que además comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable ( $V_L$ ) de cadena ligera comprendiendo un CDR1, un CDR2, y un CDR3 seleccionado del grupo que consiste de:
- a) un  $V_L$  CDR1 como se establece en la SEQ ID NO:30, un  $V_L$  CDR2 como se establece en la SEQ ID NO:31, y un  $V_L$  CDR3 como se establece en la SEQ ID NO:32;
  - b) un  $V_L$  CDR1 como se establece en la SEQ ID NO:66, un  $V_L$  CDR2 como se establece en la SEQ ID NO:67, y un  $V_L$  CDR3 como se establece en la SEQ ID NO:68;
  - c) un  $V_L$  CDR1 como se establece en la SEQ ID NO:102, un  $V_L$  CDR2 como se establece en la SEQ ID NO:103, y un  $V_L$  CDR3 como se establece en la SEQ ID NO:104; y
  - d) un  $V_L$  CDR1 como se establece en la SEQ ID NO:195, un  $V_L$  CDR2 como se establece en la SEQ ID NO:196, y un  $V_L$  CDR3 como se establece en la SEQ ID NO:197.
6. Un anticuerpo de humano aislado o una porción de unión al antígeno del mismo que específicamente une al CCR2 de humano, que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) comprendiendo un CDR1, un CDR2, y un CDR3 seleccionado del grupo que consiste de:

773

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 004484

Bogotá D.C., 17 de 2011 - 16:59:31

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 411745283 | 17/01/2011 | 49.592.000.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO                                          | CONCEPTO                           | Vr. UNIDITARIO | Vr. CONCEPTO |
|-------|-----------------------------------------------------|------------------------------------|----------------|--------------|
| 1     | 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL | 99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS | 478.000.00     | 478.000.00   |
|       |                                                     |                                    |                | \$478.000.00 |

SON: \*\*CUATROCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-030038-00000-0000

Fecha: 2011-03-11 11:17:55  
Tra. 11 PATENTEIYII  
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVASCR  
Eve: 378 FASENACIONALI  
Folios: 417

0610: 15413-841-0043

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 17 de 2011 - 16:59:38

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

**NIT : 800.176.089-2**

414

**Industria y Comercio**  
SUPERINTENDENCIA

**RECIBO DE CAJA**

**No. 11 - 0018655**

Bogotá D.C., Marzo 01 de 2011 - 17:09:59

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 411748374 | 01/03/2011 | 36.726.000.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO                       | CONCEPTO                                                  | Vr. UNDITARIO | Vr. CONCEPTO       |
|-------|----------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------|--------------------|
| 1     | 50005-01-08 PRORROGA DE TERMINOS | 1609 S.DISTINTIVOS PRORROGA DE TERMINOS O PLAZO ADICIONAL | 87.000.00     | 87.000.00          |
|       |                                  |                                                           |               | <b>\$87.000.00</b> |

**SON: \*\*OCHENTA Y SIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*\***

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



**No. 11-030038- -00000-0000**

Fecha: 2011-03-11 11:17:55 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 417

Colo: 15413- 841-004-3

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3, 4, 5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: [www.sic.gov.co](http://www.sic.gov.co) e-mai: [info@sic.gov.co](mailto:info@sic.gov.co) Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 1 de 2011 - 17:10:06

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

NIT : 800.176.089-2

-/-

415



**RECIBO DE CAJA**

**No. 11 - 0018711**

Bogotá D.C., Marzo 01 de 2011 - 17:09:59

**RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS**

NI 860.041.367

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 411748374 | 01/03/2011 | 36.726.000.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO              | CONCEPTO                                   | Vr.UNDITARIO | Vr.CONCEPTO         |
|-------|-------------------------|--------------------------------------------|--------------|---------------------|
| 1     | 50005-01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN | 571.000.00   | 571.000.00          |
|       |                         |                                            |              | <b>\$571.000.00</b> |

**SON: \*\*QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\***

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



**No. 11-030038- -00000-0000**

Fecha: 2011-03-11 11:17:55 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 417

Código: 15413-841-004-3

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Etapas 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.: Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 1 de 2011 - 17:10:08

## SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



## RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0021170

Bogotá D.C., Marzo 08 de 2011 - 06:26:54

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

## \*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 411748352 | 07/03/2011 | 29.679.000.00 |

## \*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO                                          | CONCEPTO                           | Vr.UNDITARIO | Vr.CONCEPTO |
|-------|-----------------------------------------------------|------------------------------------|--------------|-------------|
| 1     | 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL | 99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS | 1.000.00     | 1.000.00    |
|       |                                                     |                                    |              | \$1.000.00  |

SON: \*\*MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*\*

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-030038-00000-0000

Fecha: 2011-03-11 11:17:55

Trá: 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Eve: 378 FASENACIONALI  
Folios: 417

Código: 15413-841-004-3

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 8 de 2011 - 06:27:02



## SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

4777



## RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0021171

Bogotá D.C., Marzo 08 de 2011 - 06:26:54

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

## \*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 411748352 | 07/03/2011 | 29.679.000.00 |

## \*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO                                          | CONCEPTO                           | Vr. UNDITARIO | Vr. CONCEPTO |
|-------|-----------------------------------------------------|------------------------------------|---------------|--------------|
| 1     | 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL | 99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS | 1.000.00      | 1.000.00     |
|       |                                                     |                                    |               | \$1.000.00   |

SON: \*\*MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*\*

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-030038-00000-0000

Fecha: 2011-03-11 11:17:55 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 417

C.O.L.O.: 15413-841-004-3

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 8 de 2011 - 06:27:02

  
**Industria y Comercio**  
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



**No. 11-030038- -00000-0000**

Fecha: 2011-03-11 11:17:55    Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII    Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION    Folios: 417

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE U ☐

☐

Indicación que se solicita una patente.

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒

Indicación que se solicita una PCT

☒

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☒

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐



Bogotá D.C.,  
2020

Doctor(a)  
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA  
Apoderado(a) y/o Representante de  
AMGEN FREMONT, INC

|            |                            |                   |
|------------|----------------------------|-------------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 11 030038         |
|            | Solicitud internacional    | PCT/US2009/004711 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 18/03/2011        |
|            | Trámite                    | 11                |
|            | Evento                     | 378               |
|            | Actuación                  | 430               |
|            | Oficio No.                 | <b>07036</b>      |

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ  
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha **29 ABR. 2011**  
adpa11