



No. 12-075923-00000-0000

Fecha: 2012-05-09 11:42:54
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 252

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. **EXPEDIENTE No.** _____

54. **TÍTULO** _____ ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES ANTI-NGF HUMANOS COMO

INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA VÍA DE NGF

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** _____

71. **SOLICITANTE** _____ AMGEN INC. y MEDAREX , INC

THOUSAND OAKS, CALIFORNIA Y

DOMICILIO _____ PRINCETON, NUEVA JERSEY, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. **APODERADO** _____ LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. **BOGOTÁ, D. C.,** _____



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-075923- -00000-0000

Fecha: 2012-05-09 11:42:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 252

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: AMGEN INC. y MEDAREX, INC

Sociedades constituidas y existentes bajo las leyes del Estado Delaware Estados Unidos de América.

Dirección: One Amgen Center Drive,
Thousand Oaks,
California 91320,
Estados Unidos de América

y

707 State Road Princeton,
Nueva Jersey 08540,
Estados Unidos de América

Respectivamente

Domicilio: Thousand Oaks,
California,
Estados Unidos de América

y

Princeton,
Nueva Jersey,
Estados Unidos de América

Respectivamente

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

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 35.456.344

T.P 23.555

4

INVENTOR (ES)
(72)

1. Kenneth D. WILD

1604 Meander Drive,
Simi Valley,
California 93065,
Estados Unidos de América

2. James J.s. TREANOR

454 Upper Lake Road,
Sherwood,
California 91361,
Estados Unidos de América

3. Haichun HUANG

4329 Crestwood Street,
Fremont,
California 94538,
Estados Unidos de América

4. Heather INOUE

6733 Limonite Court,
Carlsbad,
California 92009,
Estados Unidos de América

	5. Tie J. ZHANG 5077 Via Camino, Thousand Oaks, California 91320, Estados Unidos de América	6. Frank MARTIN 865 Fernhill Court, Newbury Park, California 91320, Estados Unidos de América
--	--	--

5

PCT (86)
 Solicitud Internacional No. PCT/US2010/051960 Fecha: 08 de octubre de 2010
 Publicación Internacional No. WO 2011/049758 A1 Fecha: 28 de abril de 2011

6

Título (54)
ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES ANTI-NGF HUMANOS COMO INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA VÍA DE NGF

7

Clasificación Internacional (51) A61K 039/395

8	Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>US</u>	(32) Fecha <u>09 de octubre de 2009</u>	(31) Número de Solicitud <u>12/576,522</u>
---	--	---	---	--

9

Comprobante de pago No.: <u>12-0041883</u>	Fecha: <u>27 de abril de 2012</u>
Comprobante de pago No.: <u>12-0039277</u>	Fecha: <u>23 de abril de 2012</u>
Comprobante de pago No.: <u>12-0036506</u>	Fecha: <u>16 de abril de 2012</u>
Comprobante de pago No.: <u>12-0032595</u>	Fecha: <u>02 de abril de 2012</u>
Comprobante de pago No.: <u>12-0032596</u>	Fecha: <u>02 de abril de 2012</u>

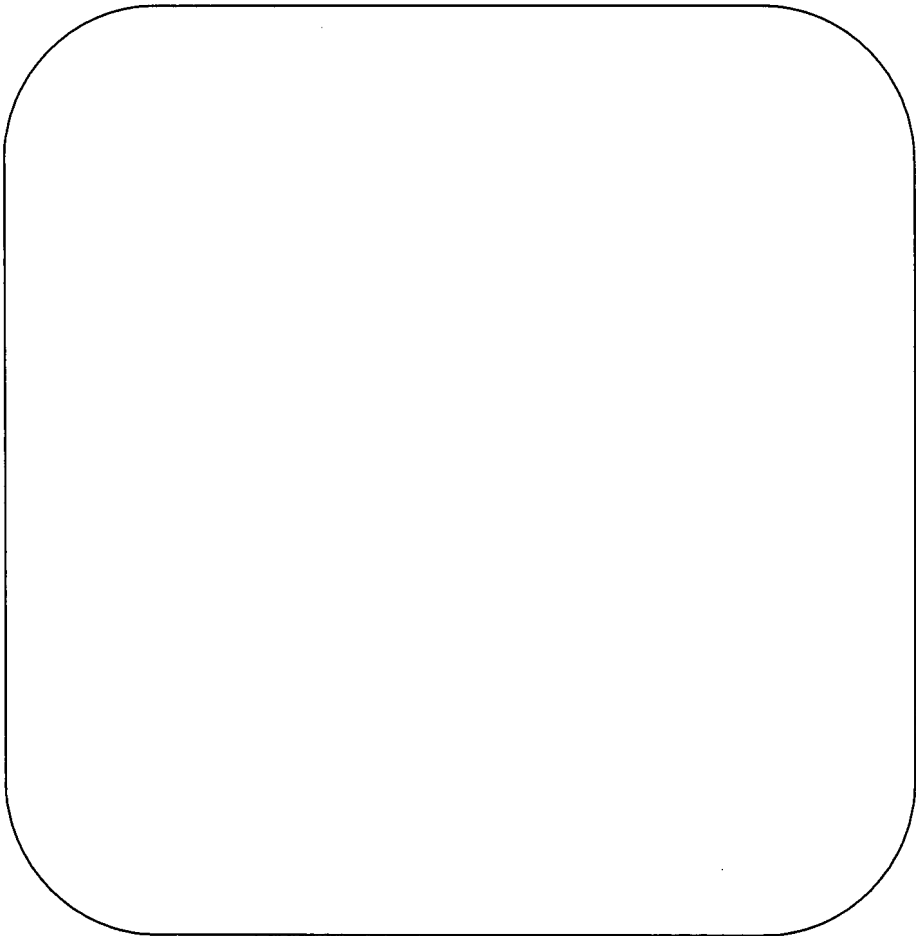
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 590.000.00.
- ☒ Comprobante de pago por 15 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$450.000.00.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes de **AMGEN INC. y MEDAREX, INC.**
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia de la carátula de la Publicación Internacional WO 2011/049758 A1
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☒ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ 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.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA : Luz Clemencia de Paez

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

SCT

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2011/049758 A1

Descripción:

Páginas 111 en español

Reivindicaciones: Número (s) 25

Figuras: Número (s) 12

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

3. ☒ Listado de Secuencias.

4. ☐ Traducción Al Español De Los Anexos Presentados Junto Con El Informe Del Examen Preliminar Internacional.

5. ☒ Extracto de publicación.

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

REPRESENTACION, RATIFICACION Y PODER

REPRESENTATION, RATIFICATION AND POWER-OF-ATTORNEY

15193
12203

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

AMGEN INC.

domiciliado (s) en/of

One Amgen Center Drive

Thousand Oaks, California 91320

United States of América

por el presente ratificamos las solicitudes de patente Nos. 06.014.624 y 06.047.666 presentadas por Emilio Ferrero

como agente oficioso ante Superintendencia de Industria y Comercio

en Bogotá

el 14 de febrero de 2006 y el 18 de mayo de 2006 respectivamente

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y DANIEL PEÑA, tpa. 65620 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

Hereby ratify the Patent Applications Nos. 06.014.624 and 06.047.666

filed without a Power of Attorney by Emilio Ferrero

before Patent Office

in Bogotá

on February 14, 2006 and May 18, 2006 respectively

and do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, in due compliance with the terms of Paragraph 1st. of Article 543 of the Commercial Code, 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 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 or 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

apoderados para que me (nòs) 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, enseñas, 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 o 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.

(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 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.

RE: Patent Application
PCTUS2004/022876

Dado y firmado hoy/Given and signed this 24 February 2006

Stuart L. Watt

en/in _____

por/by Stuart L. Watt, Vice President, Law

Signed in Thousand Oaks, Ventura County, CA, US

Firma

Signature

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 L. Holtke
3. acting in the capacity of Notary Public, State of California
4. bears the seal/stamp of L. Holtke, Notary Public,
State of California

CERTIFIED

5. At Sacramento, California
6. the 8th day of April 2006
7. by Deputy Secretary of State, State of California
8. No. 281687
9. Seal/Stamp:

10. Signature



Ernest M. Rhener

Secretary of State



CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of VENTURA

SS.

On 24 FEBRUARY 2006, before me,

Date

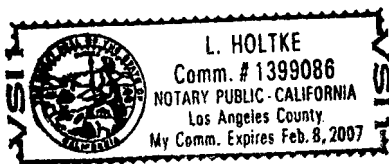
Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")

personally appeared

STUART L. WATT

Name(s) of Signer(s)

- ☒ personally known to me
☐ proved to me on the basis of satisfactory evidence



to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

WITNESS my hand and official seal.

Place Notary Seal Above

Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: REPRESENTATION, RATIFICATION & POWER OF ATTORNEY

Document Date: _____ Number of Pages: 2

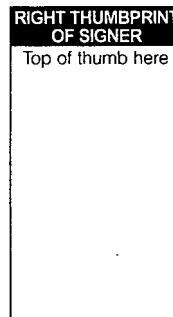
Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: STUART L. WATT

- ☐ Individual
☒ Corporate Officer — Title(s) Vice President, Law
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney in Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer Is Representing: AMGEN INC.



A-8606 (CO)

CORPORATE CERTIFICATE

State of California)
)
County of Ventura) SS:

I, Stuart L. Watt, am the person who signed the foregoing instrument as Vice President, Law, of Amgen Inc., and I hereby certify the following:

1. That Amgen is a corporation duly organized and legally existing under the laws of the State of Delaware and is domiciled at One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, California 91320-1799 USA.
2. That I am its legitimate Vice President in accordance with the appointment issued in the City of Los Angeles, California on June 27, 2000, by the Board of Directors of said corporation, which was duly elected by the General Meeting of Stockholders held in Los Angeles, California on May 11, 2000, as evidenced by the minutes, which I have seen, and I have the competence of representing same, including faculties to grant powers.
3. That I am duly authorized to sign the foregoing instrument in the name of said corporation in accordance with my above-mentioned position and/or with a resolution of the Board of Directors of said corporation, which I have seen, taken on June 27, 2000, in the City of Los Angeles, California.
4. That the purposes for which said instrument is granted are within the scope of the objects or activities of said corporation, in accordance with the Act of Incorporation issued in the City of Dover, Delaware and dated October 31, 1986, and/or the Amended and Restated By-Laws issued in the City of Thousand Oaks, California and dated April 11, 1996, both of which I have seen.

Karen Podgorny
Witness (Karen Podgorny)

Stuart L. Watt
Stuart L. Watt
Vice President, Law

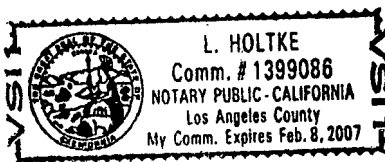
Debbie Merrill
Witness (Debbie Merrill)

State of California)
)
County of Ventura) SS:

On this 22 day of February, 2006, before me, L. HOLTKE, Notary Public, personally appeared Stuart L. Watt, Vice President, Law, and Associate General Counsel, personally known to me to be the person, whose name is subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he executed the same in his authorized capacity, and that by his signature on the instrument the person, or the entity upon behalf of which the person acted, executed the instrument.

Witness my hand and seal.

[Signature]
Notary Public



A-860 (CO)

TRADUCCIÓN OFICIAL 161/2006 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL DE ACUERDO CON EL CUAL **AMGEN INC.**, EMPRESA DOMICILIADA EN ONE AMGEN CENTER DRIVE THOUSAND OAKS, CALIFORNIA 91320 ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA RATIFICAN LAS SOLICITUDES DE PATENTE NOS. 06.014.624 Y 06.047.666 PRESENTADAS POR EMILIO FERRERO EL 14 DE FEBRERO DE 2006 Y EL 18 DE MAYO DE 2006 RESPECTIVAMENTE, COMO AGENTE OFICIOSO ANTE LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO EN BOGOTÁ Y OTORGA PODER A EMILIO FERRERO, TPA 31929, GONZALO PERDOMO, TPA 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, TPA 23555 Y A DANIEL PEÑA, TPA 65620.

EXPEDIDO Y FIRMADO HOY 24 DE FEBRERO DE 2006 POR STUART L. WATT, VICEPRESIDENTE ASUNTOS JURÍDICOS. FIRMADO EN THOUSAND OAKS, VENTURA COUNTY, CA, US.

RE: SOLICITUD DE PATENTE PCTUS2004/022876

RECONOCIMIENTO MULTIPROPÓSITO DE CALIFORNIA

ESTADO DE CALIFORNIA

CONDADO DE VENTURA

DECLARACIÓN JURADA

El 24 de febrero de 2006, ante mi L. HOLTKE, compareció personalmente STUART WATT, conocido personalmente por mí como la persona cuyo nombre aparece firmado en el documento adjunto y reconoció ante mi haber firmado el mismo en su calidad autorizada y que mediante su firma en el documento la persona o entidad a nombre de la cual la persona actuaba, firmó el documento.

Atestiguo mediante mi firma y sello oficial

Firma ilegible

DESCRIPCIÓN DEL DOCUMENTO ADJUNTO:

Tipo de documento o título: REPRESENTACIÓN, RATIFICACIÓN Y PODER.

CALIDAD RECLAMADA POR EL FIRMANTE:

NOMBRE DEL FIRMANTE:

STUART L. WATT, VICEPRESIDENTE ASUNTOS JURÍDICOS

EL FIRMANTE REPRESENTA A AMGEN, INC.

CERTIFICADO SOCIETARIO

ESTADO DE CALIFORNIA, CONDADO DE VENTURA

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, Stuart L. Watt, soy la persona que firmó el documento precedente en mi calidad de vicepresidente de asuntos jurídicos de Amgen Inc. y por la presente verifico lo siguiente:

1. Que Amgen es una sociedad debidamente constituida y legalmente existente de acuerdo con las leyes del estado de Delaware y se encuentra domiciliada en ONE AMGEN CENTER DRIVE, THOUSAND OAKS, CALIFORNIA 91320-1799, USA (Estados Unidos de América).
2. Que soy su vicepresidente legítimo de acuerdo con el nombramiento realizado en la ciudad de Los Angeles, California el 27 de junio de 2000 por la junta directiva de dicha empresa, que fue debidamente elegida por la reunión general de accionistas realizada en Los Angeles, California el 11 de mayo de 2000, tal como se evidencia por las actas que he visto y que tengo competencia para representarla, incluyendo con facultades para otorgar poderes.
3. Que estoy debidamente autorizado para firmar el documento precedente a nombre de dicha sociedad en concordancia con mi cargo arriba mencionado y/con una resolución de la junta directiva de dicha sociedad, que he visto, tomada el 27 de junio de 2000 en la ciudad de Los Angeles, California.
4. Que los objetos por los cuales se otorga dicho instrumento están bajo el alcance del objeto social de dicha empresa, en concordancia con el acta de constitución expedida en la ciudad de

Dover, Delaware y de fecha 31 de octubre de 1986 y con los estatutos reformados y reestructurados emitidos en la ciudad de Thousand Oaks, California y de fecha 11 de abril de 1986, los cuales ambos he visto.

FIRMADO: STUART L. WATT, vicepresidente asuntos jurídicos.

Firmado: dos testigos, Karen Podgorny y Debbie Merrill

ESTADO DE CALIFORNIA

CONDADO DE VENTURA

DECLARACION JURADA

Hoy 22 de febrero de 2006, ante mí, L HOCTKE, notario público, compareció personalmente STUART L. WATT, vicepresidente asuntos jurídicos, y abogado general asociado, de quien me consta es la persona cuyo nombre aparece escrito en el documento adjunto y reconoció ante mí haber firmado el mismo en su calidad autorizada, y que mediante su firma en el documento la persona o la entidad a nombre de la cual actuaba la persona, firmó el documento.

Atestiguo mediante mi firma y sello.

Firmado: (ilegible) notario público

SELLO: L HOLTKE, Nombramiento #139086, notario público, California. Condado de Los Angeles. Mi cargo vence el 8 de febrero de 2007.

ESTADO DE CALIFORNIA

SECRETARÍA DE ESTADO

APOSTILLA

(CONVENCIÓN DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Este documento público

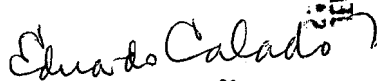
2. ha sido firmado por L. HOLTKE

- 3. quien actúa en su calidad de NOTARIO PÚBLICO, ESTADO DE CALIFORNIA
- 4. y lleva el sello/estampilla de L. HOLTKE, notario público, estado de California.

CERTIFICADO

- 5. en Sacramento, California 6. el 8 de abril de 2006
- 7. por el Secretario de estado suplente del estado de California
- 8. Certificado número 281687
- 9. Sello: EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE CALIFORNIA
- 10. Firma: (ILEGIBLE)

COLO- 15193-841-001-7
WPCL002G ID 7879
Bogotá, 22 de junio de 2006.



Eduardo Calado Noguera
"TRADUCTOR OFICIAL"
INGLES - ESPAÑOL INGLIS
Ros. 541 Febrero de 1976

SECRETARIA DE JUSTICIA
BOGOTA D.C.
2006 JUN 22 15:30

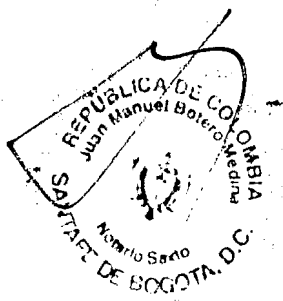
SECRETARIA DE JUSTICIA
BOGOTA D.C.
2006 JUN 22 15:30

SECRETARIA DE JUSTICIA
BOGOTA D.C.
2006 JUN 22 15:30

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) DE

Eduardo Calado Noquiere

RECIBIDA POR
23 JUN 2006



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 JUN 23 P 2:32

UCCB

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

Eduardo Calado
0711192

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES ASIGNADAS

14

CAVELIER

ABOGADOS

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

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

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

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Poderdante : AMGEN INC.

Poder conferido el : 24/02/2006

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.

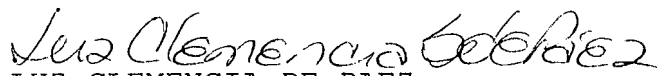


EMILIO FERRERO

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 BOGOTA

RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

Bogotá, D.C.

03 NOV 2009

Ante mí AMPARO QUINTERO ARTURO,

NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE

BOGOTÁ, D.C.

Compareció(eron)

Emilio Ferrero
W. Morrison
Luz Clemencia de Paerz

Quien(es) exhibi(eron) la(s) C.C.

C.C. 438.019.71431929
C.C. 35.456.3447123555

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 de Paerz



STI 15

76053
9854

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 Nancy Lares Glynn*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of Nancy Lares Glynn, Notary Public,
State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 19th day of February 2008*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 498392*
9. *Seal/Stamp:*

10. Signature



Jana Bowen
Secretary of State

BY *Karen L. Cites*

16

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of SANTA CLARA

On 1-16-2008 before me, NANCY LARES GLYNN, NOTARY PUBLIC,
Date Here Insert Name and Title of the Officer

personally appeared DIANA HAMLET-COX
Name(s) of Signer(s)

who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

Signature Nancy Lares Glynn
Signature of Notary/Public

Place Notary Seal Above



OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: Power of Attorney

Document Date: 1-16-2008 Number of Pages: 3

Signer(s) Other Than Named Above: NONE

Capacity(ies) Claimed by Signer(s)

Signer's Name: DIANA HAMLET-COX

- ☐ Individual
☒ Corporate Officer — Title(s): VP AND CHIEF PATENT COUNSEL
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney in Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer Is Representing: Medarex, Inc.

RIGHT THUMBPRINT
OF SIGNER
Top of thumb here

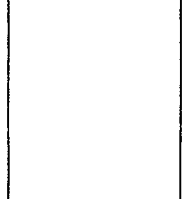


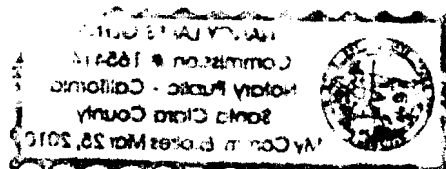
Signer's Name: _____

- ☐ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney in Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____

RIGHT THUMBPRINT
OF SIGNER
Top of thumb here





REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

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

MEDAREX, INC.

domiciliado (s) en/of 707 State Road,

Princeton, New Jersey 08540

United States of America

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y DANIEL PEÑA, tpa. 65.620, 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, enseñanzas, 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 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 EMILIO FERRERO, tpa. 31929; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and DANIEL PEÑA, tpa. 65620, 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 or 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 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 16TH DAY OF JANUARY 2008
en/in MLPTAS, CA LISA

por/by Diana Hamlet-Cox, VP and Chief Patent Counsel

Firma/Signature Diana Hamlet-Cox

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD)

A los _____ días del mes de _____
de 200 _____ compareció(eron) ante mí,

Quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documento en
representación de la Sociedad/compañía denominada _____

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que es una Sociedad/Compañía
legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes del
Estado de _____

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
707 State Road,
Princeton, New Jersey 08540,
United States of America

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.) _____

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

Ciudad _____

Estado _____

Hoy _____ de 200 _____

NOTARIAL CERTIFICATION (CORPORATION)

On this _____ day of _____
200 _____ appeared before me
Diana Hamlet-Cox

who(m) I know personally and who(m) signed this document as
representative(s) of the Corporation/Company named
MEDAREX, INC.

I certify:

1. That I have seen the following documents:*

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Medarex, Inc. is a Corporation/Company legally
constituted and in existence in accordance with the laws of the
State of New Jersey

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is
707 State Road,
Princeton, New Jersey 08540,
United States of America

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.) Diana Hamlet-Cox

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

City _____

State _____

This _____ day of _____ 200 _____

--- NOTARIO PÚBLICO O FUNCIONARIO AUTORIZADO --- NOTARY PUBLIC OR ATTESTING OFICIAL ---
(PUBLIC NOTARY SIGNATURE HERE)

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen * Documents must be identified with date and origin

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country:
This public document

2. has been signed by

3. acting in the capacity of

4. bears the seal/stamp of

Certified

5. at 6. the

7. by

8. No.

9. Seal/stamp 10. Signature

.....

.....

The Commonwealth of Massachusetts

William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by: Jacquelyn Saya Horne

3. acting in the capacity of: Notary Public

4. bears the seal/stamp of: the State of Massachusetts
whose commission expires on: December 7, 2012

Certified

5. at: Boston, Massachusetts

6. the: 12 March, 2008

7. by: the Secretary of the Commonwealth

8. No.: 1293070

9. Seal/stamp:

Great Seal of the Commonwealth

10. Signature:



William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth



25

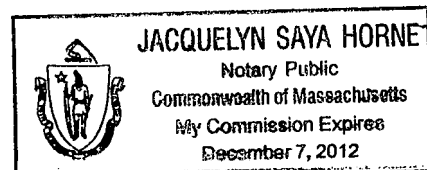
Columbian Application No.: 07.096.516, 07.095.882 and 07.096.538

I, Jeanne M. DiGiorgio, attorney for the applicant, hereby attest that the attached document is a true and exact copy of the Certification of Authority document. The Certification of Authority document has been executed by Diana Hamlet-Cox, VP and Chief Patent Council of Medarex, Inc.

United States of America)
Commonwealth of Massachusetts) ss.:
County of Suffolk)

On this 12 day of March, 2008 before me, the undersigned notary public, personally appeared Jeanne M. DiGiorgio (name of document signer), proved to me through satisfactory evidence of identification, which was that she is known to me personally, to be the person whose name is signed on the preceding or attached document in my presence.

Jay S. Han (official signature and seal of notary)



Jacquelyn Saya Horne
My commission expires December 7, 2012

CERTIFICATION OF AUTHORITY

1. I, DIANA HAMLET-COX, VP and Chief Patent Council of MEDAREX, INC. do hereby certify that:

1.1. DIANA HAMLET-COX, VP is the VP and Chief Patent Council of MEDAREX, INC. and that he/she is the authorized by MEDAREX, INC. to execute this Power of Attorney on its behalf.

1.2. That MEDAREX, INC is a corporation/company legally constituted and in existence in accordance with the laws of the state of Delaware, United States of America

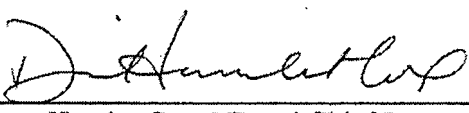
1.3. That the domicile of said corporation/company is
707 State Road,
Princeton,
New Jersey 08540,
United States of America

1.4. 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. For issuing this certification that I have seen the following documents:

2.1. The Articles of Incorporation of Medarex, Inc.,
dated June 9, 2003.

2.2. The Resolution of the Board of Directors and/or the By-Laws of Medarex, Inc., dated July 26, 2005.

Signature: 
Name: Diana Hamlet-Cox, VP and Chief Patent Council
Date: March 12, 2008

23

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 08/03.08 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 la sociedad **MEDAREX, INC.** domiciliada en 707 State Road, Princeton, New Jersey 08540, Estados Unidos de América, otorga poder a **EMILIO FERRERO, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Y DANIEL PEÑA.**

Dado y firmado el 16 de enero de 2008 en Milpitas, California E.U.A.
por Diana Hamlet-Cox, Vicepresidente y Asesor principal de patentes

RECONOCIMIENTO TODO EFECTO - CALIFORNIA

Estado de California)

Condado de Santa Clara) ss.

El **16 de enero de 2008**, ante mí, (nombre y cargo del funcionario) **Nancy Lares Glynn**, Notario Público, compareció personalmente Diana Hamlet-Cox,

Sello:

NANCY LARES GLYNN
Comisión # 1654146
Notario Público – California
Condado de Santa Clara

Mi comisión expira el 25 de marzo de 2010

quien con base en evidencia satisfactoria comprobó ser la persona cuyo nombre suscribe el instrumento adjunto y reconoció ante mí haber ejecutado el mismo en su capacidad autorizada y que con su firma la persona o entidad en nombre de quien actuó la persona, ejecutó el instrumento.

CERTIFICAN mi firma y sello oficial.
Firma *[Firmado]* Nancy Lares Glynn

-----OPCIONAL-----

Aunque la ley no exige la información que se solicita a continuación, puede resultar valiosa para las personas que dependen del documento y puede evitar que este formato se elimine y adjunte a otro

documento.

Descripción del documento anexo

Título o tipo de documento: Poder

Fecha del documento: 16 de enero de 2008

Número páginas: 3

Firmantes además del arriba mencionado: Ninguno

Capacidad del/de los firmante(s)

Nombre del firmante: DIANA HAMLET-COX

☐ Persona natural

☒ Funcionario de la compañía – cargo(s): V.P. y Asesor principal de patentes

☐ Socio ☐ limitado ☐ general

☐ Apoderado

☐ Fideicomisario

☐ Custodio o curador

☐ Otros: _____

El firmante representa a: Medarex, Inc.

HUELLA ÍNDICE
DERECHO

(Con huella)

**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 Nancy Lares Glynn*
3. *en su capacidad de Notario Público, Estado de California*
4. *lleva el sello/timbre de Nancy Lares Glynn, Notario Público, Estado de California*

CERTIFICADO

5. *en Sacramento, California*
6. *el 19 de febrero de 2008*

7. *por el Subsecretario de Estado, Estado de California*
8. **No. 498392**
9. **Sello/Timbre: EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE CALIFORNIA.**
10. Firma
(Firma ilegible)
Secretario de Estado
Por: [Firma ilegible]

COLO 16053-841-001-2

MAR 12/08

MMA\MMA\ID-121353\WPC16053

Maria S. Martelo
TRADUCCION No.: 08/03.08
 MARIA ELVIRA MARTELO
 Traductora e Interprete Oficial
 Inglés - Español - Inglés
 Res. No. 2879 Min. Justicia

1. The first step is to identify the problem. This involves understanding the symptoms and the context in which they are occurring.

7300

Black Market

[Faint, illegible handwritten notes]

2009 APR 13 A 11:37

SECRET

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 10/03.08 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.

EN LA OFICINA DE PATENTES DE COLOMBIA

Solicitante: Medarex, Inc.
Solicitud de Colombia No.: 07.096.516, 07.095.882 y 07.096.538

CERTIFICACIÓN

Yo, Jeanne M. DiGiorgio, apoderada del solicitante, por el presente certifico que el documento anexo es una copia fiel y exacta del documento de Certificación de Autoridad. El documento de Certificación de Autoridad ha sido ejecutado por Diana Hamlet-Cox, Vicepresidente y Asesora Principal de Patentes de Medarex, Inc.

[Firma ilegible]
Jeanne M. DiGiorgio
Registro No. 41,710
Apoderada del solicitante

* * *

Estados Unidos de América
Estado de Massachusetts
Condado de Suffolk

Hoy 12 de marzo de 2008 ante mí, el suscrito notario público, compareció personalmente Jeanne M. DiGiorgio (nombre de quien firma el documento), comprobó mediante evidencia satisfactoria de identificación, como es a quien conozco personalmente como la persona cuyo nombre firma el documento anexo en mi presencia.

[Firma ilegible] (firma oficial y sello del notario)

Jaqueline Saya Horne
Mi comisión expira el 7 de diciembre de 2012

JACQUELYN SAYA HORNE
Notario Público
Estado de Massachusetts
Mi comisión expira el
7 de diciembre de 2012

CERTIFICADO DE AUTORIDAD

1. Yo, DIANA HAMLET-COX, Vicepresidente y Asesora Principal de Patentes de MEDAREX, INC., por el presente certifico que:

1.1. DIANA HAMLET-COX, es Vicepresidente y Asesora Principal de Patentes de MEDAREX, INC. y que está autorizada por MEDAREX, INC. para ejecutar este poder en su nombre.

1.2. Que MEDAREX, INC. es una sociedad/compañía legalmente constituida y existe de conformidad con las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América.

1.3. Que el domicilio de dicha sociedad/compañía es

707 State Road
Princeton
New Jersey 08540
Estados Unidos de América

1.4. Que el objeto u objetos para el o los cuales se otorga este poder se encuentra dentro de los objetos indicados en los artículos de constitución de dicha sociedad/compañía.

2. Para expedir esta certificación, he visto lo siguientes documentos:

2.1. Artículos de constitución de Medarex, Inc.
de fecha 9 de junio de 2003

2.2. Resolución de la Junta Directiva y/o Estatutos de Mederex, Inc., de fecha 26 de julio de 2005.

Firma: [Firma ilegible]

Nombre: Diana Hamlet-Cox, Vicepresidente y Asesora Principal de Patentes

Fecha: 12 de marzo de 2008-03-13

Estado de Massachusetts

William Francis Galvin

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: Jacquelyn Saya Horne
- 3. Actuando en su capacidad de: Notario Público
- 4. Lleva el sello/timbre de: el Estado de Massachussets
- cuya comisión expira el: 7 de diciembre de 2012

CERTIFICADO

- 5. En: Boston, Massachusetts
- 6. el: 12 de marzo de 2008
- 7. Por: el Secretario de Estado.
- 8. No. 1293070
- 9. Sello/Timbre: El Gran Sello del Estado
- 10. Firma:
- [Firma]
- William Francis Galvin, Secretario de Estado.

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

COLO 16053-841-001-2
MAR 12/08
MMA\MMA\ID-121504\WPC16053

Maria E. Martelo
TRADUCCION No. 106308
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

NO ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO
2008 MAR 14 P 1:17
JEFE DE LEGALIZACIONES
, BOGOTÁ D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES
EXTERIORES
010452
Para el Sr. Pablo
DOCUMENTOS DE CARTELA
LAS FUNCIONES INCLUIDAS

29

CAVELIER

ABOGADOS

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

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

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

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Poderdante : MEDAREX, INC.

Poder conferido el : 16/01/2008

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:

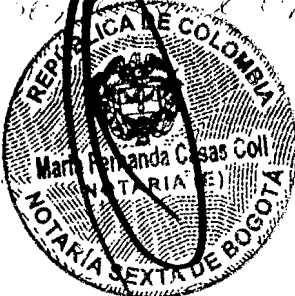


LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

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. 21 OCT 2009
Ante M^{te} MARIA FERNANDA CASAS COLL,
NOTARIA SEXTA (E) DEL CIRCULO DE
BOGOTÁ D.C.
Comparació (eron) *Emilio Ferrera*
Williamson y Leo Clemente
Exoner del Rce
Cidán(en) exhibió(aron) la(s) C.C.
CC 438019 TP 31929
CC 35456344 TP 23555
Y declaro(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 Ferrera
Williamson y Leo Clemente


ASSIGNMENT

Whereas AMGEN INC., a Delaware corporation having its principal place of business at One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, California, 91320-1799, is the assignee as recorded by the U.S. Patent Office at reel/frame 015382/0634 of an invention which is the subject of an application for Letters Patent of the United States ("Application") entitled "HUMAN ANTI-NGF NEUTRALIZING ANTIBODIES AS SELECTIVE NGF PATHWAY INHIBITORS," which is found in U.S. Application Serial No. 10/891,658, filed on July 15, 2004, which claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 60/487,431, filed on July 15, 2003.

Whereas MEDAREX, INC., a New Jersey corporation having its principal place of business at 707 State Road, Suite 206, Princeton, New Jersey 08540, wishes to acquire an undivided interest in all inventions disclosed in such Application:

Now, therefore, in consideration of the sum of one dollar (\$1.00) and other good and valuable consideration, the receipt of which is hereby acknowledged, AMGEN INC., its successors and assigns (collectively "AMGEN") hereby sells, assigns, transfers and sets over unto MEDAREX, INC., its successors and assigns (collectively "MEDAREX") an undivided interest in, to and under the Application, and any provisional application(s) from which Application is derived, and all priority rights to which the Application may be entitled, including all priority rights for other countries arising therefrom, all inventions therein disclosed, and any and all Letters Patent of the United States and of all other countries which may be granted for such inventions, or any of them, including divisional, continuation, and/or continuation-in-part applications based on the above-identified Application, all such inventions and all rights in such Application and Letters Patent to be held and enjoyed jointly by AMGEN and MEDAREX, each enjoying an equal, undivided interest.

AMGEN hereby authorizes and requests the Commissioner of Patents and Trademarks of the United States to issue any such Letters Patent which may be granted on the Application or any continuation or divisional applications based on the Application to AMGEN and MEDAREX as co-assignees of the entire right, title and interest therein and thereto.

In Witness Whereof I have executed this assignment on behalf of AMGEN on the

4th day of March, 2008.



Stuart L. Watt
Vice President, Law

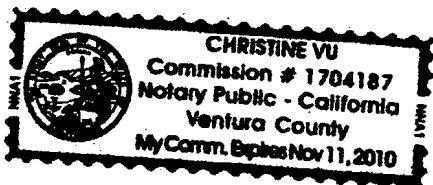
CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of Ventura

On March 4, 2008 before me, Christine Vu, Notary Public

personally appeared Stuart L. Watt, Vice President, Law



who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

Signature Christine Vu

Place Notary Seal Above

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: Assignment

Document Date: _____ Number of Pages: _____

Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer(s)

Signer's Name: Stuart L. Watt

- ☐ Individual
☒ Corporate Officer — Title(s): Vice President, Law
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney in Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____

Amgen

RIGHT THUMBPRINT
OF SIGNER
Top of thumb here

Signer's Name: _____

- ☐ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney in Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____

RIGHT THUMBPRINT
OF SIGNER
Top of thumb here

ASSIGNMENT

Case No.: 02-1240-F
 Inventors: Wild et al.
 Date of Execution
 of Application: 9/27/04; 9/30/04

Serial No.: 10/891,658
 Filing Date: July 15, 2004

In consideration of One Dollar (\$1.00) and other good and valuable considerations in hand paid, the receipt and sufficiency whereof are hereby acknowledged, the undersigned hereby assign to:

Amgen Inc., a corporation of the state of Delaware
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799

its successors and assigns, the entire right, title and interest in the invention or improvements of the undersigned disclosed in an application for Letters Patent of the United States, entitled:

Human Anti-NGF Neutralizing Antibodies as Selective NGF Pathway Inhibitors

and identified as:

Case No. 02-1240-F

in the offices of McDONNELL BOEHNNEN HULBERT & BERGHOFF and in said application and any and all other applications, both United States and foreign, which the undersigned may file, either solely or jointly with others, on said invention or improvements, and in any and all Letters Patent of the United States and foreign countries, which may be obtained on any of said applications, and in any reissue or extension of such patents, and further assigns to said assignee the priority right provided by the International Convention.

The undersigned hereby authorize and request the Commissioner of Patents and Trademarks to issue said Letters Patent to said assignee.

The undersigned hereby authorize and request the attorneys of record in said application to insert in this assignment the filing date and serial number of said application when officially known, and the date of execution of the application.

The undersigned warrant themselves to be the owners of the entire right, title and interest in said invention or improvements and to have the right to make this assignment, and further warrant that there are no outstanding prior assignments, licenses, or other encumbrances on the interest herein assigned.

For said considerations the undersigned hereby agree, upon the request and at the expense of said assignee, its successors and assigns, to execute any and all divisional, continuation and substitute applications for said invention or improvements, and any necessary oath, affidavit or declaration relating thereto, and any application for the reissue or extension of any Letters Patent that may be granted upon said application and any and all applications and other documents for Letters Patent in foreign countries on said invention or improvements, that said assignee, its successors or assigns may deem necessary or expedient, and for the said considerations the undersigned authorize said assignee to apply for patents for said invention or improvements in its own name in such countries where such procedure is proper and further agree, upon the request of said assignee, its successors and assigns, to cooperate to the best of the ability of the undersigned with said assignee, its successors and assigns, in any proceedings or transactions involving such applications or patents, including the preparation and execution of preliminary statements, giving and producing evidence, and performing any and all other acts necessary to obtain, maintain and

enforce said Letters Patent, both United States and foreign, and vest all rights therein hereby conveyed in the assignee, its successors and assigns, whereby said Letters Patent will be held and enjoyed by the said assignee, its successors and assigns, to the full end of the term for which said Letters Patent will be granted, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by the undersigned if this assignment had not been made.

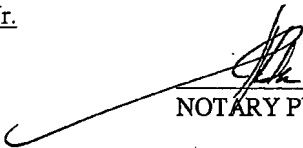
WITNESS my hand and seal this 27 day of September, 2004.

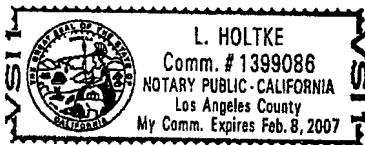

Kenneth D. Wild, Jr.

State of CALIFORNIA

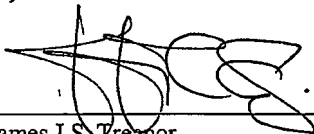
County of VENTURA

The foregoing instrument was acknowledged before me this 27 day of September, 2004 by Kenneth D. Wild, Jr.


NOTARY PUBLIC



WITNESS my hand and seal this 27 day of September, 2004.

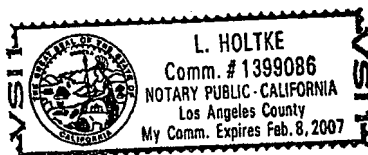

James J.S. Treanor

State of California

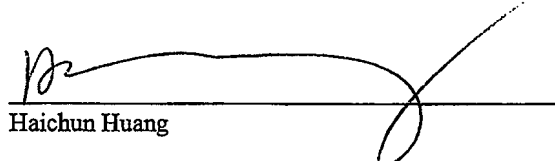
County of Ventura

The foregoing instrument was acknowledged before me this 27 day of
September, 2004 by James J.S. Treanor.


NOTARY PUBLIC

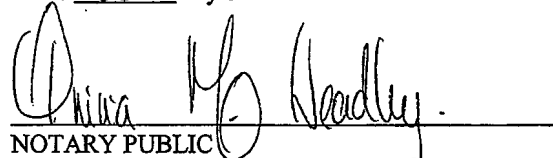


WITNESS my hand and seal this 30th day of September, 2004.


Haichun Huang

State of California
County of Santa Clara.

The foregoing instrument was acknowledged before me this 30th day of
September, 2004 by Haichun Huang.


NOTARY PUBLIC



WITNESS my hand and seal this 27 day of September, 2004.

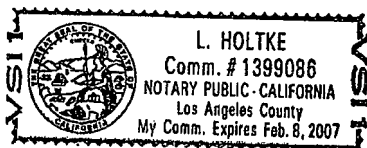
Heather Inoue
Heather Inoue

State of CALIFORNIA

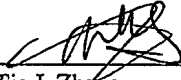
County of VENTURA

The foregoing instrument was acknowledged before me this 27 day of
September, 2004 by Heather Inoue.

[Signature]
NOTARY PUBLIC



WITNESS my hand and seal this 27 day of September 2004.

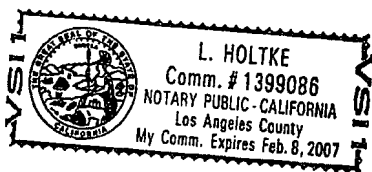

Tie J. Zhang

State of California

County of San Diego

The foregoing instrument was acknowledged before me this 27 day of
September 2004 by Tie J. Zhang.


NOTARY PUBLIC



WITNESS my hand and seal this 27 day of September, 2004.

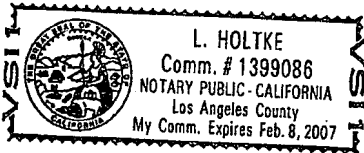
Frank Martin
Frank Martin

State of California

County of VENTURA

The foregoing instrument was acknowledged before me this 27 day of
September, 2004 by Frank Martin.

[Signature]
NOTARY PUBLIC



TRADUCCIÓN 194/2012 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS,
REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL
AUTORIZADO POR RESOLUCIÓN 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976 Y
DEBIDAMENTE INSCRITO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES DE COLOMBIA

A-860-US-NP

MEDX-0164 (US)

02-1240-F

CESIÓN

Considerando que AMGEN INC., una sociedad de Delaware con domicilio principal en ONE AMGEN CENTER DRIVE, THOUSAND OAKS, CALIFORNIA, 91320-1799 es el cesionario registrado por la Oficina de patentes de Estados Unidos en el carrete/cuadro 015382/0634 de un invento que es el tema de una solicitud de patente estadounidense (la solicitud) titulada "ANTICUERPOS ANTI-NGF HUMANOS NEUTRALIZANTES COMO INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA VIA DE NGF" que se encuentra en la solicitud estadounidense con número de serie 10/891,658, radicada el 15 de julio de 2004, la cual reivindica el beneficio de la solicitud estadounidense provisional No. 60/487,431, radicada el 15 de julio de 2003.

Considerando que MEDAREX, INC, una sociedad de Nueva Jersey con domicilio principal en 707 State Road, Suite 206, Princeton, Nueva Jersey 08540, desea adquirir el interés completo sobre todos los inventos revelados en dicha solicitud:

Ahora, por lo tanto, como compensación por la suma de un dólar y otras compensaciones adecuadas y valiosas, de las cuales por el presente se acusa recibo, AMGEN INC., sus sucesores y cesionarios (colectivamente, "AMGEN") por la presente vende, cede y transfiere a MEDAREX INC., sus sucesores y cesionarios (colectivamente "MEDAREX") todo el interés sobre la solicitud y cualquier solicitud(es) provisional(es) de la cual se derive la solicitud, así como todos los derechos de propiedad a que la solicitud tuviere derecho, incluyendo todos los derechos de propiedad para otros países que surgieren de ella(s), todos los inventos allí revelados, así como cualquiera patente estadounidense y todos los otros países que pueda ser otorgada por dichos inventos, o cualquiera de ellos, incluyendo solicitudes divisionales, continuaciones y solicitudes de continuaciones parciales con base en la solicitud arriba identificada, siendo todos dichos inventos y derechos sobre dichas solicitudes y patentes de posesión y goce conjunto de AMGEN y MEDAREX, cada uno de los cuales tiene una parte igual e indivisa sobre ellas.

AMGEN por la presente autoriza y solicita al comisionado de patentes y marcas de Estados Unidos que expida las patentes que puedan otorgarse sobre la solicitud o cualquier continuación o solicitud divisional basada en la solicitud a AMGEN y MEDAREX como co-cesionarios de todo el derecho, título o interés sobre las mismas.

En testimonio de lo cual, he firmado esta cesión a nombre de AMGEN el día 4 de marzo de 2008.

Firmado: STUART L. WATT, vicepresidente, asuntos jurídicos

A-860-US-NP

MEDX-0164(US)

02-1240-F

RECONOCIMIENTO MULTIPROPÓSITO DE CALIFORNIA

ESTADO DE CALIFORNIA

CONDADO DE VENTURA

El 4 de marzo de 2008, ante mí CHRISTINE VU, notario público, compareció personalmente STUART L. WATT, vicepresidente, asuntos jurídicos, quien demostró ante mí con base en evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre aparece escrito en el instrumento adjunto y reconoció ante mí haber firmado el mismo en su calidad autorizada, y que mediante su firma en el documento, la persona o entidad a cuyo nombre dicha persona actuaba, firmó el documento.

Certifico bajo la pena de perjurio de conformidad con las leyes del estado de California que el párrafo precedente es verídico y correcto. Atestiguo mediante mi firma y sello oficiales.

Firma: CHRISTINE VU, firma del notario público

SELLO: CHRISTINE VU, CARGO #1704187, NOTARIO PÚBLICO, CALIFORNIA. CONDADO VENTURA. MI CARGO VENCE EL 11 DE NOVIEMBRE DE 2010

OPCIONAL

Aunque la información siguiente no se requiere por ley, puede demostrar ser valiosa para las personas que confíen en el documento e impedir la remoción y refijación fraudulenta de esta forma a otro documento.

DESCRIPCIÓN DEL DOCUMENTO ADJUNTO

TÍTULO O TIPO DE DOCUMENTO: CESIÓN

NOMBRE DEL FIRMANTE: STUART L. WATT

FUNCIONARIO SOCIETARIO, TÍTULO VICEPRESIDENTE, ASUNTOS JURÍDICOS.

EL FIRMANTE REPRESENTA A AMGEN.

CESIÓN

CASO NÚMERO : 02-1240-F

INVENTORES: WILD Y OTROS

FECHA DE FIRMA DE LA SOLICITUD, 27 DE SEPTIEMBRE DE 2004 Y 30 DE SEPTIEMBRE DEL 2004.

NÚMERO DE SERIE 10/891,658

FECHA DE RADICACIÓN: 15 de julio de 2004

A cambio de un dólar y otras compensaciones adecuadas y valiosas pagadas personalmente, de las cuales por la presente se acusa recibo y se atestigua su suficiencia, el abajo firmante por la presente cede a

Amgen Inc., una sociedad del estado de Delaware

One Amgen Center Drive

Thousand Oaks, CA 91320-1799

Sus sucesores y cesionarios, todo el derecho, título e interés sobre el invento o mejoras reveladas por el abajo firmante en una solicitud de patente estadounidense titulada

"ANTICUERPOS ANTI-NGF HUMANOS NEUTRALIZANTES COMO INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA VIA DE NGF" e identificados como: **CASO NO. 02-1240-F** en las oficinas de MCDONNELL BOEHNNEN HULBERT & BERGHOFF y sobre dicha solicitud y cualquiera otra solicitud tanto extranjera como estadounidense que el abajo firmante pueda presentar, ya sea en forma única o conjunta con otros, sobre dicho invento o mejoras, y sobre cualquier patente estadounidense o extranjera que se pueda obtener con base en dichas solicitudes, así como sobre cualquier segunda publicación o ampliación de dichas patentes, y adicionalmente cede a dicho cesionario el derecho de prioridad estipulado por la Convención Internacional.

El abajo firmante por la presente autoriza y solicita al comisionado de patentes y marcas expedir dichas patentes en favor de dicho cesionario.

El abajo firmante por la presente autoriza y solicita al abogado registrado en dicha solicitud que inserte en la cesión la fecha de radicación y el número de serie de dicha solicitud tan pronto como se conozcan oficialmente, así como la fecha de firma de la solicitud.

Los abajo firmantes garantizan ser los propietarios de todo el derecho, título e interés sobre dicho invento o mejoras y tener el derecho a realizar esta cesión y además que no hay cesiones previas, licencias u otras afectaciones sobre el interés aquí cedido.

A cambio de las compensaciones mencionadas los abajo firmantes por la presente acuerdan, cuando lo soliciten y por

cuenta de dicho cesionario, sus sucesores y cesionarios, firmar todas y cada una de las solicitudes divisionales, continuaciones y solicitudes sustitutivas para dicho invento o mejoras, y cualquier juramento, declaración jurada o declaración relacionada con ellas, así como sobre cualquier solicitud de segunda publicación o ampliación de cualquier patente en el extranjero sobre dichos inventos o mejoras, que dicho cesionario, sus sucesores o cesionarios puedan considerar necesarias o convenientes, y a cambio de dichas compensaciones los abajo firmantes autorizan a dicho cesionario a solicitar patentes sobre dicho invento o mejoras a su propio nombre en los países donde dicho procedimiento fuere adecuado y además acuerdan, cuando lo solicite dicho cesionario, sus sucesores y cesionarios, cooperar a su leal hasta donde mejor lo permita la capacidad de los abajo firmantes con dicho cesionario, sus sucesores y cesionarios, en cualquier actuación o transacción que implique dichas solicitudes o patentes, incluyendo la preparación y firma de declaraciones preliminares, dando y entregando pruebas, y realizar todos los demás necesarios para obtener, mantener y hacer cumplir dichas patentes, tanto estadounidenses como extranjeras, y transferir todos los derechos aquí asignados al cesionario, sus sucesores y cesionarios, y dichas patentes serán de propiedad y para el goce de dicho cesionario, sus sucesores y cesionarios, hasta el final del período por el cual dicha patente sea otorgada, en forma tan completa e íntegra como si la misma hubiera sido de su propiedad y

disfrutada por los abajo firmantes, tal como si esta cesión no se hubiera realizado.

Atestiguo mediante mi firma y sello hoy 27 de septiembre de 2004.

Firmado: Kenneth D. Wild, Jr.

Estado de California

Condado de Ventura

El documento precedente fue reconocido ante mí hoy 27 de septiembre de 2004 por Kenneth D. Wild, Jr.

Firma ilegible, notario público

SELLO: L. HOLTKE. CARGO #1399086, NOTARIO PUBLICO, CALIFORNIA
CONDADO DE LOS ANGELES. MI CARGO VENCE EL 8 DE FEBRERO DE
2007.

Atestiguo mediante mi firma y sello hoy 27 de septiembre de 2004.

Firmado: James J. S. Treanor

Estado de California

Condado de Ventura

El documento precedente fue reconocido ante mí hoy 27 de septiembre de 2004 por James J.S. Treanor

Firma ilegible, notario público

SELLO: L. HOLTKE. CARGO #1399086, NOTARIO PUBLICO, CALIFORNIA
CONDADO DE LOS ANGELES. MI CARGO VENCE EL 8 DE FEBRERO DE
2007.

Atestiguo mediante mi firma y sello hoy 30 de septiembre de 2004.

Firmado: Haichun Huang

Estado de California

Condado de Santa Clara

El documento precedente fue reconocido ante mí hoy 30 de septiembre de 2004 por Haichun Huang

Firma ilegible, notario público

SELLO: TRICIA M. HEADLEY. CARGO #1424420, NOTARIO PUBLICO, CALIFORNIA

CONDADO DE SANTA CLARA. MI CARGO VENCE EL 14 DE JUNIO DE 2007.

Atestiguo mediante mi firma y sello hoy 27 de septiembre de 2004.

Firmado: Heather Inoue

Estado de California

Condado de Ventura

El documento precedente fue reconocido ante mí hoy 27 de septiembre de 2004 por Heather Inoue.

Firma ilegible, notario público

SELLO: L. HOLTKE. CARGO #1399086, NOTARIO PUBLICO, CALIFORNIA

CONDADO DE LOS ANGELES. MI CARGO VENCE EL 8 DE FEBRERO DE 2007.

Atestiguo mediante mi firma y sello hoy 27 de septiembre de 2004.

Firmado: Tie J. Zhang

Estado de California

Condado de Ventura

El documento precedente fue reconocido ante mí hoy 27 de septiembre de 2004 por Tie J. Zhang

Firma ilegible, notario público

SELLO: L. HOLTKE. CARGO #1399086, NOTARIO PUBLICO, CALIFORNIA
CONDADO DE LOS ANGELES. MI CARGO VENCE EL 8 DE FEBRERO DE
2007.

Atestiguo mediante mi firma y sello hoy 27 de septiembre de
2004.

Firmado: Frank Martin

Estado de California

Condado de Ventura

El documento precedente fue reconocido ante mí hoy 27 de
septiembre de 2004 por Frank Martin

Firma ilegible, notario público

SELLO: L. HOLTKE. CARGO #1399086, NOTARIO PUBLICO, CALIFORNIA
CONDADO DE LOS ANGELES. MI CARGO VENCE EL 8 DE FEBRERO DE
2007.

COLO-15708 841 002 0.

1625 palabras. 4 horas

ECN\ECN\ID-216684\WPC15708

Bogotá, 8 de mayo de 2012.

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
28 April 2011 (28.04.2011)

(10) International Publication Number
WO 2011/049758 A1

(51) International Patent Classification:

A61K 39/395 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) A61P 19/02 (2006.01)
C12N 15/68 (2006.01) A61P 29/02 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2010/051960

(22) International Filing Date:

8 October 2010 (08.10.2010)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

12/576,522 9 October 2009 (09.10.2009) US

(71) Applicants (for all designated States except US): **AM-GEN INC.** [US/US]; One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA 91320-1799 (US). **MEDAREX, INC.** [US/US]; Route 206 & Province Line Road, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **WILD, Kenneth, D.** [US/US]; 1604 Meander Drive, Simi Valley, CA 93065 (US). **TREANOR, James, J.s.** [GB/US]; 454 Upper Lake Road, Sherwood, CA 91361 (US). **HUANG, Haichun** [US/US]; 4329 Crestwood Street, Fremont, CA 94538 (US). **INOUE, Heather** [US/US]; 6733 Limonite Court, Carlsbad, CA 92009 (US). **ZHANG, Tie, J.** [US/US]; 5077 Via Camino, Thousand Oaks, CA 91320 (US). **MARTIN, Frank** [US/US]; 865 Fernhill Court, Newbury Park, CA 91320 (US).

(74) Agent: **MENSAH, Kwame, N.**; McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff LLP, 300 South Wacker Drive, Suite 3100, Chicago, IL 60606 (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, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, 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, RS, 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 information concerning one or more priority claims considered void (Rule 26bis.2(d))

(54) Title: HUMAN ANTI-NGF NEUTRALIZING ANTIBODIES AS SELECTIVE NGF PATHWAY INHIBITORS

(57) Abstract: This invention provides antibodies that interact with or bind to human nerve growth factor (NGF) and neutralize the function of NGF thereby. The invention also provides pharmaceutical compositions of said antibodies and methods for neutralizing NGF function, and particularly for treating NGF-related disorders (e.g., chronic pain) by administering a pharmaceutically effective amount of anti-NGF antibodies. Methods of detecting the amount of NGF in a sample using anti-NGF antibodies are also provided.

WO 2011/049758 A1

Anticuerpos Neutralizantes Anti-NGF Humanos como Inhibidores Selectivos de la Vía de NGF

Esta solicitud reclama prioridad con respecto a la solicitud de patente de los Estados Unidos Serial No. (U.S.S.N.) 12/576,522, presentada el 9 de octubre de 2009, la cual es una solicitud de continuación en parte de la solicitud de patente de los Estados Unidos Serial No. (U.S.S.N.) 12/277,919, presentada el 25 de noviembre de 2008, la cual es una solicitud de continuación de la solicitud de patente de los Estados Unidos Serial No. (U.S.S.N.) 10/891,658, presentada el 15 de julio de 2004, y reclama el beneficio de prioridad con respecto a la solicitud de provisional de los Estados Unidos Serial No. 60/487,431, presentada el 15 de julio de 2003. Esta solicitud se relaciona igualmente con la solicitud de patente de los Estados Unidos Serial No. 11/767,326, presentada el 22 de junio de 2007, la cual es una solicitud divisional de U.S.S.N. 10/891,658. Las divulgaciones de todas estas solicitudes se incorporan por referencia en esta especificación.

El listado de secuencias se presenta con la solicitud en formato electrónico únicamente y se incorpora por referencia en esta especificación. El archivo del texto del listado de secuencias "02-1240-F-CIP.SeqList.txt" se creó el 25 de noviembre de 2008, y tiene un tamaño de 79.116 bytes.

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se relaciona con anticuerpos monoclonales humanos que se unen al factor de crecimiento nervioso (NGF - *nerve growth factor*). Se describen asimismo composiciones y métodos para tratar el dolor y trastornos relacionados con el dolor.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Diariamente más de dos millones de personas en los Estados Unidos de América son incapacitadas por el dolor crónico (Jessell and Kelly, 1991, "Pain and Analgesia" in PRINCIPLES OF NEURAL SCIENCE, 3rd Ed., (Kandel, Schwartz, and Jessell, ed.), Elsevier, New York). Desafortunadamente, los tratamientos actuales para el dolor son tan sólo parcialmente efectivos, y muchos de estos tratamientos en sí mismos causan efectos secundarios debilitantes o peligrosos. Por ejemplo, aunque los medicamentos antiinflamatorios no esteroides ("AINE"),

46 22

ibuprofeno e indometacina son moderadamente efectivos contra el dolor inflamatorio, son también toxinas renales, y dosis elevadas tienden a causar irritación gastrointestinal, ulceración, sangrado y confusión mental. Frecuentemente los pacientes tratados con opioides experimentan también confusión, y el uso de opioides a largo plazo se asocia con tolerancia y dependencia. Anestésicos locales tales como lidocaína y mexiletina inhiben simultáneamente el dolor y causan pérdida de sensación normal.

El dolor es una percepción basada en señales recibidas del entorno y transmitidas e interpretadas por el sistema nervioso (para una revisión, véase Millan, 1999, *Prog. Neurobiol.* 57:1-164). Estímulos nocivos tales como el calor y el contacto hacen que los receptores sensoriales especializados en la piel envíen señales al sistema nervioso central ("SNC"). Este proceso se denomina nocicepción, y las neuronas sensoriales periféricas que lo median son nociceptores. Dependiendo de la fuerza de la señal del (de los) nociceptor(es) y la abstracción y elaboración de esa señal por el SNC, una persona puede o no experimentar un estímulo nocivo como doloroso. Cuando la percepción del dolor por una persona se calibra adecuadamente a la intensidad del estímulo, el dolor sirve a su función protectora prevista. Sin embargo, ciertos tipos de daño tisular causan un fenómeno conocido como hiperalgesia o pronocicepción, en la cual estímulos relativamente inocuos son percibidos como intensamente dolorosos, debido a que los umbrales de dolor de la persona se han disminuido. Tanto la inflamación como el daño nervioso pueden inducir hiperalgesia. Las personas afligidas con afecciones inflamatorias, tales como eritemas solares, osteoartritis, colitis, carditis, dermatitis, miositis, neuritis, collagenopatías vasculares (las cuales incluyen artritis reumatoide y lupus) y similares, experimentan a menudo sensaciones intensificadas de dolor. Análogamente, trauma, cirugía, amputación, absceso, causalgia, collagenopatías vasculares, enfermedades desmielinizantes, neuralgia del trigémino, cáncer, alcoholismo crónico, infarto, síndrome de dolor del tálamo, diabetes, infecciones por herpes, síndrome de la inmunodeficiencia adquirida ("SIDA"), toxinas y quimioterapia causan lesiones nerviosas y resultan en dolor excesivo.

A medida que se entienden mejor los mecanismos mediante los cuales los nociceptores transducen señales externas bajo condiciones normales e hiperalgésicas, pueden reconocerse los procesos implicados en la hiperalgesia para inhibir la reducción del umbral del dolor y, en esa forma, disminuir la cantidad

de dolor experimentado.

Se ha demostrado que los factores neurotróficos juegan papeles significativos en la transmisión de dolor fisiológico y patológico. El factor de crecimiento nervioso (NGF – *nerve growth factor*) parece ser particularmente importante (para una revisión, véase McMahon, 1996, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 351:431-40; y Apfel, 2000, *The Clinical Journal of Pain* 16:S7-S11). La administración tanto local como sistémica de NGF ha demostrado provocar hiperalgesia y alodinia (Lewin *et al.*, 1994, *Eur. J. Neurosci.* 6:1903-1912). La infusión intravenosa de NGF en humanos produce una mialgia de todo el cuerpo, mientras que la administración local suscita hiperalgesia y alodinia además de los efectos sistémicos (Apfel *et al.*, 1998, *Neurology* 51:695-702). Existe además un cuerpo considerable de evidencia que involucra al NGF en enfermedades en las cuales el dolor es un rasgo prominente. Por ejemplo, el NGF se regula por aumento en las células de Schwann de los ganglios radicales dorsales (DRG – *dorsal root ganglion*) durante por lo menos 2 meses luego de la lesión del nervio periférico, y se han divulgado niveles crecientes en las articulaciones de animales que sufren de una variedad de modelos de artritis (v.g., Aloe *et al.*, 1993, *Growth Factors* 9:149-155). En humanos, los niveles de NGF son elevados en el fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide y otros tipos de artritis (v.g., Aloe *et al.*, 1992, *Arthritis and Rheumatism* 35:351-355). Por lo demás, se ha demostrado que el antagonismo de la función NGF impide la hiperalgesia y la alodinia en modelos de dolor neuropático e inflamatorio crónico. Por ejemplo, en modelos animales de dolor neuropático (v.g. ligamiento del tronco nervioso o el nervio espinal), la inyección sistémica de anticuerpos neutralizantes de NGF impide tanto la alodinia como la hiperalgesia (Ramer *et al.*, 1999, *Eur. J. Neurosci.* 11:837-846; and Ro *et al.*, 1999, *Pain* 79:265-274). Ejemplos de anticuerpos anti-NGF conocidos en el arte incluyen, por ejemplo, las Publicaciones PCT No. WO 01/78698, WO 01/64247, WO 02/096458, y WO 2004/032870; las patentes de los Estados Unidos No. 5,844,092, 5,877,016, y 6,153,189; Hongo *et al.*, 2000, *Hybridoma* 19:215-227; Hongo *et al.*, 1993, *Cell. Mol Biol* 13:559-568; y los Nos. de Acceso de GenBank U39608, U39609, L17078, o L17077.

Claramente existe una necesidad de tratamientos novedosos, seguros y efectivos para el dolor, particularmente reconociendo mediadores de molécula pequeña o exacerbadores del dolor tales como NGF.

RESUMEN DE LA INVENCION

Esta invención proporciona novedosos anticuerpos monoclonales humanos que son terapéuticamente útiles para manejar dolor. Específicamente, la invención provee anticuerpos monoclonales que se unen al factor de crecimiento nervioso (NGF). Preferiblemente, los anticuerpos monoclonales son anticuerpos monoclonales humanos y neutralizan actividades biológicas de NGF y son útiles para mejorar los efectos de respuestas de dolor mediado por NGF. Se suministran también por la invención células que producen y, muy preferiblemente, secretan en el medio de cultivo celular los anticuerpos monoclonales de la invención. Además de su uso para tratar y manejar el dolor, los anticuerpos de la invención son útiles para tratar respuestas relacionadas con dolor neuropático e inflamatorio.

La invención provee además proteínas de fusión que incluyen la secuencia de la región Fc de un anticuerpo y una o más secuencias identificadas como SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, y SEQ ID NOs: 79-130. Tales moléculas pueden prepararse usando métodos tal como se describen, por ejemplo en la Solicitud de Patente Internacional, Publicación No. WO 00/24782, la cual se incorpora por referencia. Tales moléculas pueden expresarse, por ejemplo, en células de mamífero (vg. células de ovario de hámster chino) o células bacterianas (v.g. células de *E. coli*).

En ciertos aspectos, la invención proporciona anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales, muy preferiblemente anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos, que contienen una cadena pesada y una cadena liviana, en donde la cadena pesada incluye una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 6, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma y la región variable de la cadena pesada incluye una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 10, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma. Preferiblemente, la cadena pesada incluye una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 4.

En ciertos aspectos, la invención provee anticuerpos, preferiblemente anticuerpos humanos y, más preferiblemente, anticuerpos monoclonales, muy

preferiblemente, anticuerpos monoclonales humanos, que incluyen una cadena pesada y una cadena liviana, en donde la cadena pesada contiene una región constante de cadena pesada seleccionada el grupo conformado por las regiones constantes de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE, o cualquier variación alélica de las mismas (como se discute en Kabat *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), incluido en esta especificación por referencia, y la región variable de la cadena pesada contiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 10, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma. Preferiblemente, un anticuerpo de la invención contiene una secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada de IgG2 como se indica en SEQ ID NO: 4 o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

En ciertos aspectos, la invención proporciona anticuerpos, preferiblemente anticuerpos humanos y, más preferiblemente, anticuerpos monoclonales, muy preferiblemente, anticuerpos monoclonales humanos, que contienen una cadena pesada y una cadena liviana, en donde la cadena liviana contiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 8 o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma y la región variable de la cadena liviana contiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 12, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

En ciertos aspectos, anticuerpos de la invención contienen una cadena pesada y una cadena liviana, en donde la región variable de la cadena pesada contiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 10, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma. En otros aspectos, la región variable de la cadena liviana contiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 12, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma. En aspectos adicionales, la cadena pesada contiene una secuencia de aminoácidos como se indica en cualquiera de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina

inmunológicamente funcional de la misma. En todavía otros aspectos, la cadena liviana contiene una secuencia de aminoácidos como se indica en cualquiera de SEQ ID NO: 16, 20, 24, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

La invención provee igualmente anticuerpos que se unen específicamente a NGF, en donde la cadena pesada incluye una región variable que contiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 10, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma, y la cadena liviana incluye una región variable que contiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 12, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

La invención proporciona además anticuerpos humanos aislados que se unen específicamente a NGF, en donde los anticuerpos incluyen:

(a) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que contiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 79, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma, y una cadena liviana que tiene una región variable de cadena liviana que contiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 80, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma;

(b) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que contiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 81, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma, y una cadena liviana que tiene una región variable de cadena liviana que contiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 82, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma;

(c) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que contiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 83, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma, y una cadena liviana que tiene una

región variable de cadena liviana que contiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 84, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma; o

(d) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que contiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 86, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma, y una cadena liviana que tiene una región variable de cadena liviana que contiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 87 o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

En ciertos aspectos, la invención provee igualmente anticuerpos que contienen una cadena pesada y una cadena liviana, en donde la cadena pesada incluye una región variable de cadena pesada, y en donde la región variable de cadena pesada contiene una secuencia que tiene por lo menos 75%, preferiblemente 80%, más preferiblemente por lo menos 85%, aún más preferiblemente por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y, muy preferiblemente, alrededor de 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 10, y en donde la cadena liviana incluye una región variable de cadena liviana, y en donde la región variable de cadena liviana contiene una secuencia que tiene por lo menos 80%, preferiblemente por lo menos 85%, más preferiblemente, por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y, muy preferiblemente, alrededor de 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 12, en donde el anticuerpo se une específicamente a NGF.

La invención proporciona asimismo anticuerpos que se unen específicamente a NGF, en donde la cadena pesada contiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 14 o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma, y la cadena liviana contiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 16, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

En ciertos aspectos, la invención provee anticuerpos, que incluyen una cadena pesada y una cadena liviana, en donde la cadena pesada contiene una

región variable de cadena pesada, y en donde la región variable de cadena pesada contiene una secuencia que tiene por lo menos 75%, preferiblemente 80%, más preferiblemente por lo menos 85%, aún más preferiblemente por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y, muy preferiblemente, alrededor de 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos como se indica en cualquiera de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 22, y en donde la cadena liviana incluye una región variable de cadena liviana, y en donde la región variable de cadena liviana contiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, preferiblemente por lo menos 85%, más preferiblemente por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y, muy preferiblemente, alrededor de 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 16, en donde el anticuerpo se une específicamente a NGF.

La invención proporciona igualmente anticuerpos de cadena única, anticuerpos Fv de cadena única, anticuerpos F(ab), anticuerpos F(ab)' y anticuerpos (Fab')₂.

En aspectos particulares, la invención provee una cadena liviana que contiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 16, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

Adicionalmente, la invención provee una cadena pesada que contiene una secuencia de aminoácidos como se indica en cualquiera de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 22, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

La invención se refiere también a anticuerpos humanos aislados que se unen específicamente a NGF, en donde el anticuerpo comprende: (a) regiones base de cadena pesada humana, una región CDR1 de cadena pesada humana, una región CDR2 de cadena pesada humana y una región CDR3 de cadena pesada humana; y (b) regiones base de cadena liviana, una región CDR1 de cadena liviana humana, una región CDR2 de cadena liviana humana y una región CDR3 de cadena liviana humana. En ciertos aspectos, la región CDR1 de cadena pesada humana puede ser la región CDR1 de cadena pesada del anticuerpo monoclonal (mAb) designado 4D4, como se muestra en SEQ ID NO:22 y la región CDR1 de cadena liviana humana puede ser la región CDR1 de cadena liviana de

mAb 4D4 como se muestra en SEQ ID NO:24. En otros aspectos, la región CDR2 de cadena pesada humana puede ser la región CDR2 de cadena pesada de mAb 4D4 como se muestra en SEQ ID NO: 18 y la región CDR2 de cadena liviana humana puede ser la región CDR2 de cadena liviana de mAb 4D4 como se muestra en SEQ ID NO:20. En todavía otros aspectos, la región CDR3 de cadena pesada humana es la región CDR3 de cadena pesada de mAb 4D4 como se muestra en SEQ ID NO: 14, y la región CDR3 de cadena liviana humana es la región CDR3 de cadena liviana de mAb 4D4 como se muestra en SEQ ID NO: 16.

La invención proporciona asimismo anticuerpos humanos aislados que se unen específicamente al factor de crecimiento nervioso, que comprenden una cadena pesada y una cadena liviana, en donde la cadena pesada incluye una región variable de cadena pesada que contiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, o SEQ ID NO: 87, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

La invención provee además anticuerpos humanos aislados que específicamente se unen a NGF, que comprenden una cadena pesada y una cadena liviana, en donde la cadena liviana incluye una región variable de cadena liviana que contiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, o SEQ ID NO: 131, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la misma.

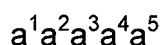
Los anticuerpos de la invención se caracterizan por la capacidad de antagonizar por lo menos una actividad *in vitro* y/o *in vivo* asociada con polipéptidos NGF. Preferiblemente, la invención proporciona anticuerpos humanos anti-NGF humano aislados ("*isolated anti-human NGF human antibodies*") con unión de alta afinidad a polipéptidos NGF, en donde los anticuerpos se unen a un polipéptido NGF humano y se disocian del polipéptido NGF humano con una constante de disociación (K_D) de alrededor de 50×10^{-12} M o menos, como se determina usando KinExA, o que inhiben la supervivencia inducida por NGF en un análisis de neutralización *in vitro* con una IC_{50} de aproximadamente 1×10^{-8} M o menos.

En una modalidad preferida, la invención proporciona un anticuerpo humano anti-NGF humano aislado, que tiene las siguientes características:

- a) inhibe la supervivencia inducida por NGF en un análisis de neutralización *in vitro* con una IC₅₀ de alrededor de 1×10^{-9} M o menos;
- b) tiene una CDR3 de cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; y
- c) tiene una CDR3 de cadena liviana que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16.

La invención provee además anticuerpos humanos aislados o un fragmento de unión de antígeno o fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional que se unen específicamente a NGF con alta afinidad, en donde los citados anticuerpos o fragmentos se disocian de un polipéptido NGF humano con una K_D de alrededor de 1×10^{-9} o menos y neutralizan la bioactividad del NGF humano en un análisis *in vitro* estándar con una IC₅₀ de alrededor de 1×10^{-8} M o menos, y en donde los anticuerpos o fragmentos comprenden una región variable de cadena pesada que incluye:

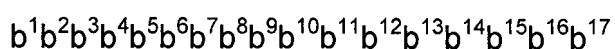
- a) una región CDR1 que contiene una secuencia de aminoácidos de la fórmula:



en donde:

a¹ es un residuo de aminoácido polar hidrófilo; a² es un residuo de aminoácido aromático; a³ es un residuo de aminoácido aromático, alifático, polar hidrófobo; a⁴ es un residuo de aminoácido neutro hidrófobo o alifático; y a⁵ es un residuo de aminoácido alifático o polar hidrófilo;

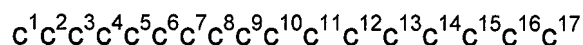
- b) una región CDR2 que contiene una secuencia de aminoácidos de la fórmula:



en donde:

b^1 es un residuo de aminoácido alifático, polar hidrófobo, o aromático; b^2 es un residuo de aminoácido alifático hidrófobo; b^3 es un residuo de aminoácido polar hidrófilo o aromático; b^4 es un residuo de aminoácido polar hidrófilo, hidrófobo, o aromático; b^5 - b^9 son independientemente residuos de aminoácido polar hidrófilo o alifático; b^{10} es un residuo de aminoácido polar hidrófilo, aromático, o alifático; b^{11} es un residuo de aminoácido aromático o hidrófobo; b^{12} es un residuo de aminoácido alifático hidrófobo o polar hidrófilo; b^{13} es un residuo de aminoácido alifático, hidrófobo o polar hidrófilo; b^{14} y b^{16} son independientemente residuos de aminoácido polar hidrófilo; b^{15} es un residuo de aminoácido alifático o aromático hidrófobo; y b^{17} es un residuo de aminoácido alifático ácido; y

c) es una región CDR3 que contiene una secuencia de aminoácidos de la fórmula:



en donde:

c^1 es ausente o un residuo de aminoácido alifático; c^2 es ausente o un residuo de aminoácido polar hidrófilo o aromático hidrófobo; c^3 y c^4 son independientemente ausentes o residuos de aminoácido polar hidrófilo, aromático hidrófobo, o alifático; c^5 es ausente o un residuo de aminoácido polar hidrófilo, alifático o aromático; c^6 es ausente o un residuo de aminoácido polar hidrófilo o alifático; c^7 es un residuo de aminoácido polar hidrófilo o alifático; c^8 es un residuo de aminoácido polar hidrófilo, hidrófobo o aromático; c^9 es un residuo de aminoácido polar hidrófilo, alifático o aromático hidrófobo; c^{10} es un residuo de aminoácido polar hidrófilo, aromático hidrófobo, o alifático hidrófobo; c^{11} - c^{13} son independientemente residuos de aminoácido polar hidrófilo o aromático hidrófobo; c^{14} es un residuo de aminoácido alifático o aromático hidrófobo; c^{15} es un residuo de aminoácido polar hidrófilo o neutro hidrófobo; c^{16} es ausente o un residuo de aminoácido polar hidrófilo; y c^{17} es un residuo de aminoácido aromático hidrófobo o alifático hidrófobo.

En un aspecto, a^1 es un residuo de aminoácido polar hidrófilo; a^2 es un residuo de aminoácido aromático hidrófobo; a^3 es un residuo de aminoácido alifático hidrófobo; a^4 es un residuo de aminoácido neutro hidrófobo; a^5 es un residuo de aminoácido polar hidrófilo; b^1 es un residuo de aminoácido alifático o aromático; b^2 es Ile; b^3 es un residuo de aminoácido polar hidrófilo; b^4 es un

residuo de aminoácido polar hidrófilo o aromático; b^5 - b^9 son independientemente residuos de aminoácido polar hidrófilo o alifático; b^{10} es un residuo de aminoácido alifático; b^{11} es Tyr; b^{12} es un residuo de aminoácido alifático hidrófobo; b^{13} es un residuo de aminoácido alifático o polar hidrófilo; b^{14} y b^{16} son independientemente residuos de aminoácido polar hidrófilo; y b^{15} es un residuo de aminoácido alifático hidrófobo; b^{17} es un residuo de aminoácido alifático ácido; c^1 es ausente o un residuo de aminoácido alifático; c^2 es ausente o un residuo de aminoácido polar hidrófilo o aromático hidrófobo; c^3 y c^4 son independientemente ausentes o residuos de aminoácido polar hidrófilo, aromático hidrófobo, o alifático amino; c^5 es ausente o un residuo de aminoácido polar hidrófilo; c^6 es ausente o un residuo de aminoácido polar hidrófilo o alifático; c^7 es un residuo de aminoácido polar hidrófilo o alifático; c^8 es un residuo de aminoácido polar hidrófilo, hidrófobo o aromático; c^9 es un residuo de aminoácido polar hidrófilo, alifático o aromático hidrófobo; c^{10} es un residuo de aminoácido polar hidrófilo, aromático hidrófobo, o alifático hidrófobo; c^{11} - c^{13} son independientemente residuos de aminoácido polar hidrófilo o aromático hidrófobo; c^{14} es un residuo de aminoácido alifático o aromático hidrófobo; c^{15} es un residuo de aminoácido polar hidrófilo o neutro hidrófobo; c^{16} es ausente o un residuo de aminoácido polar hidrófilo; y c^{17} es un residuo de aminoácido aromático hidrófobo o alifático hidrófobo.

En un aspecto particular, a^1 es Ser, Asp, o Thr; a^2 es Tyr; a^3 es Ala, Ser, Trp, o Gly; a^4 es Met o Ile; a^5 es His, Gly, o Asn; b^1 es Tyr, Gly, Ile, o Asp; b^2 es Ile; b^3 es Ser, Thr, Tyr, o Asn; b^4 es Trp, Arg, o Pro; b^5 es Ser, Asn, o Gly; b^6 es Ser, Arg, Asp, o Gly; b^7 es Ser, His, o Gly; b^8 es Ser, Ile, Asp, o Thr; b^9 es Leu, Ile, o Thr; b^{10} es Gly, Lys, o Phe; b^{11} es Tyr; b^{12} es Ala o Ser; b^{13} es Asp, Gly, o Pro; b^{14} es Ser; b^{15} es Val o Phe; b^{16} es Lys o Gln; b^{17} es Gly; c^1 es ausente o un residuo de aminoácido alifático amino; c^2 es ausente o Tyr; c^3 y c^4 son independientemente ausentes, Tyr, Asn, Val, o Glu; c^5 es ausente, Ser, Gly, o Trp; c^6 es ausente, Ser, Gly, Glu, o Leu; c^7 es Gly, Arg, o Asp; c^8 es Trp, Pro, Ser, o Thr; c^9 es His, Gly, o Tyr; c^{10} es Val, Tyr, o Arg; c^{11} - c^{13} son independientemente Ser, Phe, Tyr, Asp, o Asn; c^{14} es Phe, Val, o Gly; c^{15} es Met o Asp; c^{16} es ausente, Asp, o Asn; y c^{17} es Tyr o Val.

En otro aspecto particular, a^1 es Ser o Asp; a^2 es Tyr; a^3 es Ala o Ser; a^4 es Met o Ile; a^5 es His o Asn; b^1 es Tyr o Gly; b^2 es Ile; b^3 es Ser, Thr, Tyr, o Asn; b^4 es Trp, Arg, o Pro; b^5 es Ser o Asn; b^6 es Ser o Arg; b^7 es His o Gly; b^8 es Ile o Thr; b^9 es Leu, Ile, o Thr; b^{10} es Gly o Phe; b^{11} es Tyr; b^{12} es Ala o Ser; b^{13} es Asp

o Gly; b¹⁴ es Ser; b¹⁵ es Val o Phe; b¹⁶ es Lys o Gin; b¹⁷ es Gly; c¹ está ausente o Gly; c² es ausente o Tyr; c³ y c⁴ son independientemente ausentes, Tyr, Gly, o Val; c⁵ es ausente o Ser; c⁶ es Ser o Gly; c⁷ es Gly o Arg; c⁸ es Trp o Pro; c⁹ es His, Gly, o Tyr; c¹⁰ es Val o Tyr; c¹¹ - c¹³ son independientemente Ser, Tyr, Phe, o Asp; c¹⁴ es Phe o Val; c¹⁵ es Met o Asp; c¹⁶ es ausente o Asp; y c¹⁷ es Tyr o Val.

En otros aspectos particulares:

a) la CDR1 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 22, la CDR2 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 18, y la CDR3 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 14;

b) la CDR1 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 92, la CDR2 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 93, y la CDR3 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 94;

c) la CDR1 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 98, la CDR2 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 99, y la CDR3 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 100;

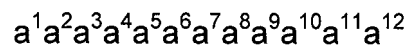
d) la CDR1 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 104, la CDR2 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos como indica SEQ ID NO: 105, y la CDR3 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 106;

e) la CDR1 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 110, la CDR2 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 111, y la CDR3 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 112; y

f) la CDR1 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 116, la CDR2 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 117, y la CDR3 de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 118.

La invención proporciona igualmente un anticuerpo humano aislado un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo que se une específicamente a NGF, en donde el anticuerpo o fragmento contiene una región variable de cadena liviana que incluye:

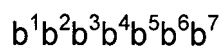
a) una región CDR1 que contiene una secuencia de aminoácidos de la fórmula:



en donde:

a^1 es un residuo de aminoácido polar hidrófilo; a^2 , a^{11} y a^{12} son independientemente residuos de aminoácido alifático o hidrófobo; a^3 , a^5 , a^7 y a^8 son independientemente residuos de aminoácido alifático, polar hidrófilo, o hidrófobo; a^4 es un residuo de aminoácido polar hidrófilo; a^6 es un residuo de aminoácido alifático o hidrófobo; a^9 es ausente, o un residuo de aminoácido alifático o polar hidrófilo; y a^{10} es un residuo de aminoácido alifático, aromático, o hidrófobo;

b) una región CDR2 que contiene una secuencia de aminoácidos de la fórmula:

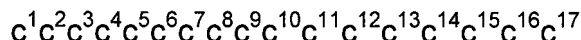


en donde:

b^1 es un residuo de aminoácido alifático, polar hidrófobo, o hidrófobo; b^2 es un residuo de aminoácido alifático o hidrófobo; b^3 y b^4 son independientemente residuos de aminoácido polar hidrófilo, alifático o hidrófobo; b^5 es un residuo de aminoácido polar hidrófilo o alifático hidrófobo; b^6 es un residuo de aminoácido polar hidrófilo o alifático hidrófobo; y b^7 es un residuo de aminoácido polar

hidrófilo; y

c) una región CDR3 que contiene una secuencia de aminoácidos de la fórmula:



en donde:

c^1 y c^2 son independientemente residuos de aminoácido polar hidrófilo; c^3 es un residuo de aminoácido polar hidrófilo, alifático o hidrófobo; c^4 , c^5 y c^6 son independientemente residuos de aminoácido alifático, polar hidrófilo, o hidrófobo; c^7 es ausente o un residuo de aminoácido polar hidrófilo o alifático hidrófobo; c^8 es un residuo de aminoácido polar hidrófilo o hidrófobo; y c^9 es un residuo de aminoácido polar hidrófilo, y en donde el citado anticuerpo o fragmento se disocia de a polipéptido NGF humano con una K_D de alrededor de 1×10^{-9} o menos y neutraliza la bioactividad del NGF humano en un análisis *in vitro* estándar con una IC_{50} de alrededor de 1×10^{-8} M o menos.

En un aspecto, a^1 , a^3 , a^4 , a^7 y a^8 son independientemente residuos de aminoácido polar hidrófilo; a^2 , a^6 , a^{11} y a^{12} son independientemente residuos de aminoácido alifático hidrófobo; a^5 es un residuo de aminoácido polar hidrófilo o alifático; a^9 es ausente, o un residuo de aminoácido alifático o polar hidrófilo; a^{10} es un residuo de aminoácido alifático o aromático; b^1 es un residuo de aminoácido alifático, polar hidrófobo, o hidrófobo; b^2 es un residuo de aminoácido alifático hidrófobo; b^3 , b^4 y b^7 son independientemente residuos de aminoácido polar hidrófilo; b^5 y b^6 son independientemente residuos de aminoácido polar hidrófilo o alifático hidrófobo; c^1 y c^2 son independientemente residuos de aminoácido polar hidrófilo; c^3 es un residuo de aminoácido polar hidrófilo, alifático o hidrófobo; c^4 , c^5 , y c^6 son independientemente residuos de aminoácido alifático, polar hidrófilo, o hidrófobo; c^7 es ausente o un residuo de aminoácido alifático hidrófobo; c^8 es un residuo de aminoácido hidrófobo; y c^9 es un residuo de aminoácido polar hidrófilo.

En un aspecto particular, a^1 , a^3 , a^4 , y a^7 son Arg, Ser, Gln, y Ser, respectivamente; a^2 es Ala; a^5 es Gly o Ser; a^8 es Ser o Ile; a^9 es ausente, Ser, o Gly; a^{10} es Ala, Tyr, Trp o Phe; b^1 es Asp, Gly, Ala, o Val; b^2 y b^3 son Ala y Ser, respectivamente; b^4 es Ser o Asn; b^5 es Leu o Arg; b^6 es Glu, Ala, o Gln; b^7 es Ser o Thr; c^1 y c^2 son Gln; c^3 es Phe, Tyr, Arg, o Ala; c^4 es Asn, Gly, o Ser; c^5 es Ser o

Asn; c⁶ es Tyr, Ser, Trp, o Phe; c⁷ es ausente, Pro, o His; c⁸ es Leu, Trp, Tyr, o Arg; y c⁹ es Thr.

En otro aspecto particular, a¹, a², a³, a⁴, y a⁷ son Arg, Ala, Ser, Gln, y Ser, respectivamente; a⁵ es Gly o Ser; a⁸ es Ser o Ile; a⁹ es ausente, Ser, o Gly; a¹⁰ es Ala o Tyr; b¹ es Asp o Gly; b² y b³ son Ala y Ser, respectivamente; b⁴ es Ser o Asn; b⁵ es Leu o Arg; b⁶ es Glu, Ala, o Gln; b⁷ es Ser o Thr; c¹ y c² son Gln; c³ es Phe, Tyr, Arg, o Ala; c⁴ es Asn, Gly, o Ser; c⁵ es Ser o Asn; c⁶ es Tyr, Ser, Trp, o Phe; c⁷ es ausente, Pro, o His; c⁸ es Leu, Trp, Tyr, o Arg; y c⁹ es Thr.

En otros aspectos particulares:

a) la CDR1 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 24, la CDR2 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 20, y la CDR3 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 16;

b) la CDR1 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 95, la CDR2 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 96, y la CDR3 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 97;

c) la CDR1 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 101, la CDR2 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 102, y la CDR3 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 103;

d) la CDR1 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 107, la CDR2 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 108, y la CDR3 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 109;

e) la CDR1 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se

indica en SEQ ID NO: 113, la CDR2 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 114, y la CDR3 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 115;

f) la CDR1 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 119, la CDR2 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 120, y la CDR3 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 121;

g) la CDR1 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 122, la CDR2 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 123, y la CDR3 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 124;

h) la CDR1 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 125, la CDR2 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 126, y la CDR3 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 127;

i) la CDR1 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 128, la CDR2 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 129, y la CDR3 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 130; y

j) la CDR1 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 132, la CDR2 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 133, y la CDR3 de cadena liviana tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 134.

También como parte de la invención se incluyen secuencias polinucleotídicas que codifican los novedosos anticuerpos humanos anti-NGF humano, vectores que comprenden las secuencias polinucleotídicas que codifican los anticuerpos humanos anti-NGF humano, células hospedadoras transformadas

con vectores que incorporan polinucleótidos que codifican los anticuerpos humanos anti-NGF humano, formulaciones que contienen anticuerpos humanos anti-NGF humano y métodos de elaborar y usar los mismos.

La invención facilita además métodos para detectar el nivel de NGF en una muestra biológica, métodos que incluyen el paso de contactar la mezcla con un anticuerpo de la invención o un fragmento de unión de antígeno del mismo. Un anticuerpo anti-NGF de la invención puede emplearse en cualquier método de análisis conocido, tal como análisis de unión competitiva, análisis sándwich directos e indirectos, análisis de inmunoprecipitación y análisis de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assays*) (véase, Sola, 1987, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, páginas 147-158, CRC Press, Inc.) para la detección y cuantificación de NGF. Los anticuerpos pueden unirse a NGF con una afinidad que es apropiada para el método de análisis que se está empleando.

Adicionalmente, la invención provee métodos para tratar una enfermedad asociada con una producción creciente de NGF, o una sensibilidad cada vez mayor a NGF, métodos que incluyen el paso de administrar una cantidad farmacéuticamente efectiva de una composición farmacéutica, que contiene por lo menos un anticuerpo de la invención un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo, a un individuo en necesidad de ello.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método de tratar una afección causada por una expresión incrementada del factor de crecimiento nervioso (NGF) o sensibilidad aumentada a NGF, método que incluye administrar a un paciente por vía oral, mediante inyección por vías intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intra-parenquimatosas), intracerebroventricular, intramuscular, intra-ocular, intraarterial, intraportal, intralesional o subcutánea, mediante sistemas de liberación sostenida o mediante dispositivos de implantación, una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo NGF, en donde la afección es dolor agudo, dolor dental, dolor proveniente de trauma, dolor quirúrgico, dolor resultante de amputación o absceso, causalgia, enfermedades desmielinizantes, neuralgia del trigémino, cáncer, alcoholismo crónico, infarto, síndrome de dolor del tálamo, diabetes, síndrome de inmunodeficiencia adquirida ("SIDA"), toxinas, quimioterapia, cefalea general, migraña, cefalea en racimos,

síndromes vasculares-mixtos y no vasculares, cefalea por tensión, inflamación general, artritis, enfermedades reumáticas, lupus, osteoartritis, fibromialgia, trastornos inflamatorios del colon y el recto, síndrome del intestino irritable, trastornos oculares inflamatorios, trastornos inflamatorios o trastornos de la vejiga inestable, psoriasis, dolencias de la piel con componentes inflamatorios, eritema solar, carditis, dermatitis, miositis, neuritis, collagenopatías vasculares, afecciones inflamatorias crónicas, dolor inflamatorio e hiperalgesia asociada y alodinia, dolor neuropático e hiperalgesia asociada o alodinia, dolor neuropático diabético, causalgia, distrofia simpática refleja ("*sympathetically maintained pain*"), síndromes de desaferenciación, asma, daño tisular epitelial o disfunción, herpes simple, alteraciones de la motilidad visceral en regiones respiratorias, genitourinarias, gastrointestinales o vasculares, heridas, quemaduras, reacciones cutáneas alérgicas, pruritis, vitiligo, trastornos gastrointestinales generales, colitis, ulceración gástrica, úlceras duodenales, rinitis vasomotora o alérgica, o trastornos bronquiales, dismenorrea, dispepsia, reflujo gastroesofágico, pancreatitis, o visceralgia.

En ciertas modalidades, los métodos incluyen una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo NGF y son útiles para tratar o prevenir dolor de la rodilla por osteoartritis. En ciertas modalidades la cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo NGF es desde alrededor de 3 mg a alrededor de 30 mg por inyección subcutánea. En ciertas modalidades la administración incluye inyecciones subcutáneas múltiples. En modalidades, la administración incluye una inyección subcutánea única. En ciertas modalidades, las composiciones y métodos de la invención comprenden un anticuerpo NGF que contiene una cadena liviana que incluye SEQ ID NO. 44. En ciertas modalidades, el anticuerpo NGF contiene una cadena pesada que incluye SEQ ID. NO. 40. En modalidades adicionales, el anticuerpo NGF contiene una cadena liviana que incluye SEQ ID NO. 44, y una cadena pesada que incluye SEQ ID. NO. 40.

Por consiguiente, de acuerdo con la descripción indicada anteriormente de la invención, en varios aspectos la invención se refiere a métodos y composiciones que contienen un anticuerpo NGF que comprende una cadena liviana que incluye SEQ ID NO: 44 y una cadena pesada que incluye SEQ ID NO: 40, en donde la cadena pesada y la cadena liviana del anticuerpo se conectan por un conector flexible para formar un anticuerpo de cadena única. En algunas modalidades de este aspecto, el anticuerpo NGF comprende un anticuerpo Fv de cadena única, un

anticuerpo Fab', un anticuerpo (Fab')₂, un anticuerpo completamente humano, y/o un anticuerpo humanizado. En algunas modalidades de este aspecto el anticuerpo NGF inhibe la señalización de NGF.

En ciertas modalidades de este aspecto, el anticuerpo NGF se disocia de polipéptido NGF humano con una K_D de alrededor de 1×10^{-9} o menos, alrededor de 1×10^{-10} o menos, o alrededor de 1×10^{-11} o menos. En ciertas modalidades de este aspecto, el anticuerpo NGF neutraliza la bioactividad del NGF humano en un análisis *in vitro* estándar con una IC_{50} de alrededor de 1×10^{-8} o menos, alrededor de 1×10^{-9} o menos, o alrededor de 0.2×10^{-9} o menos. En ciertas modalidades, el anticuerpo NGF se disocia de un polipéptido NGF humano con el (los) valor(es) K_D mencionado(s) y neutraliza la bioactividad del NGF humano en un análisis *in vitro* estándar con los valores IC_{50} ya mencionados.

Modalidades preferidas específicas de la invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción más detallada de ciertas modalidades preferidas y las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1 presenta gráficos que demuestran la neutralización de la actividad de NGF en un bioanálisis de neutralización a base de neuronas DRG por anticuerpos monoclonales 4D4, purificados del medio acondicionado con hibridoma.

Figura 2 ilustra gráficos que demuestran la expresión de VR1 estimulada por la actividad del NGF humano y la neutralización de la actividad de NGF en bioanálisis de neutralización a base de neuronas DRG por un anticuerpo monoclonal anti-NGF (4D4), purificado del medio acondicionado con hibridoma.

Figura 3 presenta gráficos que demuestran la neutralización de la actividad de NGF en bioanálisis de neutralización a base de neuronas DRG por anticuerpos monoclonales 4D4 anti-NGF recombinantes, transitoriamente expresados cuando se expresan como una IgG1 o IgG2 y en células cultivadas en un cultivo con botellas rotatorias (R) o en matraces de agitación (S).

Figura 4 presenta alineaciones de secuencias de neurotrofinas. La numeración y elementos de estructura secundaria encima de la secuencia se refieren a NGF humano maduro. Los residuos conservados se marcan con un asterisco, y las regiones con baja homología de secuencia están sombreadas. El NGF humano es SEQ ID NO: 135; el NGF de ratón es SEQ ID NO: 136; BDNF es SEQ ID NO: 137; NT3 es SEQ ID NO: 138.

Figura 5 muestra el alineamiento de cadena pesada CDR1 anti-NGF y la identidad porcentual para los anticuerpos 14D10 (SEQ ID NO: 98), 6H9 (SEQ ID NO: 104), 7H2 (SEQ ID NO: 110), 4G6 (SEQ ID NO: 116), 14D11 (SEQ ID NO: 92), y 4D4 (SEQ ID NO: 22).

Figura 6 muestra el alineamiento de cadena pesada CDR2 anti-NGF y la identidad porcentual para los anticuerpos 14D10 (SEQ ID NO: 99), 6H9 (SEQ ID NO: 105), 7H2 (SEQ ID NO: 111), 4G6 (SEQ ID NO: 117), 14D11 (SEQ ID NO: 93), y 4D4 (SEQ ID NO: 18).

Figura 7 muestra el alineamiento de cadena pesada CDR3 anti-NGF y la identidad porcentual para los anticuerpos 14D10 (SEQ ID NO: 100), 6H9 (SEQ ID NO: 106), 7H2 (SEQ ID NO: 112), 4G6 (SEQ ID NO: 118), 14D11 (SEQ ID NO: 94), y 4D4 (SEQ ID NO: 14).

Figura 8 muestra el alineamiento de cadena liviana CDR1 anti-NGF y la identidad porcentual para los anticuerpos 14D10 (SEQ ID NO: 95), 6H9 (SEQ ID NO: 107), 7H2 (SEQ ID NO: 113), 4G6a (SEQ ID NO: 119), 4G6b (SEQ ID NO: 122), 4G6c (SEQ ID NO: 125), 4G6d (SEQ ID NO: 128), 4G6e (SEQ ID NO: 132), 14D11 (SEQ ID NO: 95), y 4D4 (SEQ ID NO: 24) (4G6a se designa en varias Figuras como 20031028340; 4G6b se designa en varias Figuras como 20031028351; 4G6c se designa en varias Figuras como 20031071526; 4G6d se designa en varias Figuras como 20031028344; 4G6e se designa en varias Figuras como 20031000528).

Figura 9 muestra el alineamiento de cadena liviana CDR2 anti-NGF y la identidad porcentual para los anticuerpos 14D10 (SEQ ID NO: 96), 6H9 (SEQ ID NO: 108), 7H2 (SEQ ID NO: 114), 4G6a (SEQ ID NO: 120), 4G6b (SEQ ID NO: 123), 4G6c (SEQ ID NO: 126), 4G6d (SEQ ID NO: 129), 4G6e (SEQ ID NO: 133), 14D11 (SEQ ID NO: 96), y 4D4 (SEQ ID NO: 20) (4G6a se designa en varias

Figuras como 20031028340; 4G6b se designa en varias Figuras como 20031028351; 4G6c se designa en varias Figuras como 20031071526; 4G6d se designa en varias Figuras como 20031028344; 4G6e se designa en varias Figuras como 20031000528).

Figura 10 muestra el alineamiento de cadena liviana CDR3 anti-NGF y la identidad porcentual para los anticuerpos 14D10 (SEQ ID NO: 97), 6H9 (SEQ ID NO: 109), 7H2 (SEQ ID NO: 115), 4G6a (SEQ ID NO: 121), 4G6b (SEQ ID NO: 124), 4G6c (SEQ ID NO: 127), 4G6d (SEQ ID NO: 130), 4G6e (SEQ ID NO: 134), 14D11 (SEQ ID NO: 97), y 4D4 (SEQ ID NO: 16) (4G6a se designa en varias Figuras como 20031028340; 4G6b se designa en varias Figuras como 20031028351; 4G6c se designa en varias Figuras como 20031071526; 4G6d se designa en varias Figuras como 20031028344; 4G6e se designa en varias Figuras como 20031000528).

Figura 11 muestra el alineamiento de cadena liviana anti-NGF y la identidad porcentual para los anticuerpos 14D10 (SEQ ID NO: 82), 6H9 (SEQ ID NO: 84), 7H2 (SEQ ID NO: 86), 4G6a (SEQ ID NO: 88), 4G6b (SEQ ID NO: 89), 4G6c (SEQ ID NO: 90), 4G6d (SEQ ID NO: 91), 4G6e (SEQ ID NO: 131), 14D11 (SEQ ID NO: 80), y 4D4 (SEQ ID NO: 12) (4G6a se designa en varias Figuras como 20031028340; 4G6b se designa en varias Figuras como 20031028351; 4G6c se designa en varias Figuras como 20031071526; 4G6d se designa en varias Figuras como 20031028344; 4G6e se designa en varias Figuras como 20031000528).

Figura 12 muestra el alineamiento de cadena pesada anti-NGF y la identidad porcentual para los anticuerpos 4D4 (SEQ ID NO: 10), 4G6 (SEQ ID NO: 87), 14D10 (SEQ ID NO: 81), 14D11 (SEQ ID NO: 79), 7H2 (SEQ ID NO: 85), y 6H9 (SEQ ID NO: 83).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE CIERTAS MODALIDADES PREFERIDAS

Los encabezados de las secciones utilizados en esta especificación son para fines de organización únicamente y no tienen que interpretarse como limitantes del asunto descrito. Todas las referencias citadas en esta solicitud se incorporan expresamente por referencia en esta especificación para cualquier propósito.

Definiciones

Técnicas convencionales pueden usarse para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo y transformación de tejidos (v.g., electroporación, lipofección). Reacciones enzimáticas y técnicas de purificación pueden llevarse a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante, o como se realizan comúnmente en el arte, o como se describen en esta especificación. Las técnicas y procedimientos ya indicados pueden ejecutarse generalmente de acuerdo con métodos bien conocidos en el arte y como se describen en varias referencias generales y más específicas, que se citan y discuten a todo lo largo de la presente especificación. Véase v.g., Sambrook *et al.*, 2001, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., el cual se incorpora en esta especificación por referencia para cualquier propósito. A menos que se den definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en conexión con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética, y química médica y farmacéutica, descritos en esta especificación, son aquellos bien conocidos y comúnmente utilizados en el arte. De manera similar, pueden emplearse técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación, y administración, y tratamiento de pacientes.

Tal como se utiliza de acuerdo con la presente divulgación, deberá entenderse que los siguientes términos, salvo que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados: Las expresiones "propiedad biológica", "característica biológica", y el término "actividad" en referencia a un anticuerpo de la presente invención se usan indistintamente en esta especificación e incluyen, pero no se limitan a, afinidad y especificidad de epítopos (v.g., anticuerpo humano anti-NGF humano que se une a NGF humano), capacidad de antagonizar la actividad del polipéptido reconocido ("*the targeted polypeptide*") (v.g., actividad de NGF), la estabilidad *in vivo* del anticuerpo, y las propiedades inmunogénicas del anticuerpo. Otras propiedades biológicas identificables o características de un anticuerpo reconocidas en el arte incluyen, por ejemplo, reactividad cruzada, (es decir, con homólogos no humanos del polipéptido reconocido, o con otras proteínas o tejidos, generalmente), y la capacidad de preservar altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero. Las propiedades ya indicadas o características pueden observarse o medirse utilizando técnicas reconocidas en el arte incluyendo, pero

no limitadas, a ELISA, ELISA competitivo, análisis de resonancia de plasmón superficial, análisis de neutralización *in vitro* e *in vivo* (v.g., Ejemplo 2), e inmunohistoquímica con secciones de tejidos de diferentes fuentes, incluyendo humano, primate, o cualquier otra fuente, según se requiera. Actividades particulares y propiedades biológicas de anticuerpos humanos anti-NGF humano se describen con mayor detalle en los Ejemplos más adelante.

El término "polinucleótido aislado", tal como se emplea en esta especificación, significará un polinucleótido de origen genómico, ADNc, o sintético, o alguna combinación de los anteriores, en virtud de cuyo origen el polinucleótido aislado (1) no está asociado con todo o una porción de un polinucleótido, en el cual el polinucleótido aislado se encuentra en la naturaleza, (2) se conecta a un polinucleótido al cual no está conectado en la naturaleza, o (3) no ocurre en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

El término "proteína aislada", designada en esta especificación, significa que una proteína en cuestión (1) está libre de por lo menos algunas otras proteínas con las cuales se encontraría normalmente, (2) está esencialmente libre de otras proteínas de la misma fuente, v.g., de la misma especie, (3) se expresa por una célula de una especie diferente, (4) se ha separado de por lo menos alrededor de 50 por ciento de polinucleótidos, lípidos, carbohidratos, u otros materiales con los cuales está asociada en la naturaleza, (5) no está asociada (por interacción covalente o no covalente) con porciones de una proteína con la cual la "proteína aislada" está asociada en la naturaleza, (6) esta operacionalmente asociada (por interacción covalente o no covalente) con un polipéptido con el cual no está asociada en la naturaleza, o (7) no ocurre en la naturaleza. Tal proteína aislada puede codificarse por ADN genómico, ADNc, ARNm u otro ARN, de origen sintético, o cualquier combinación de los anteriores. Preferiblemente, la proteína aislada está sustancialmente libre de proteínas o polipéptidos u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural, los cuales interferirían con su uso (terapéutico, diagnóstico, profiláctico, investigativo o de otra clase).

Un "anticuerpo aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con usos diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En modalidades

preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más de 95% en peso del anticuerpo, como se determina por el método de Lowry y, muy preferiblemente, más del 99% en peso, (2) a un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o secuencia de aminoácidos interna mediante el uso de un secuenciador de vaso giratorio, o (3) a una homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras usando azul Coomassie o, preferiblemente, tintura de plata. Un anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en células recombinantes, puesto que por lo menos un componente del entrono natural del anticuerpo no estará presente.

Los términos "polipéptido" o "proteína" significan moléculas que tienen la secuencia de proteínas nativas, es decir, proteínas producidas por células de ocurrencia natural y, específicamente, células no recombinantes, o células genomanipuladas ("*genetically-engineered*") o recombinantes, e incluyen moléculas que tienen la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa, o moléculas que tienen deleciones de, adiciones a, y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de la secuencia nativa. Los términos "polipéptido" y "proteína" abarcan específicamente anticuerpos anti-NGF, o secuencias que tienen deleciones de, adiciones a, y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de un anticuerpo anti-NGF.

El término "fragmento de polipéptido" se refiere a un polipéptido que tiene una deleción amino-terminal, una deleción carboxilo-terminal, y/o una deleción interna. En ciertas modalidades, los fragmentos tienen por lo menos 5 a alrededor de 500 aminoácidos de longitud. Se entenderá que, en ciertas modalidades, los fragmentos tienen por lo menos 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400, o 450 aminoácidos de longitud. Fragmentos particularmente útiles comprenden dominios funcionales, incluyendo dominios de unión. En el caso de un anticuerpo anti-NGF, fragmentos útiles incluyen, pero no se limitan a, una región CDR, un dominio variable de una cadena pesada o liviana, una porción de una cadena de anticuerpo o solamente su región variable incluyendo dos CDRs, y similares.

El término "agente de unión específica" se refiere a una molécula natural o no natural, que se une específicamente a una diana. Ejemplos de agentes de unión específica incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, ácidos

nucleicos, carbohidratos, y lípidos. En ciertas modalidades, un agente de unión específica es un anticuerpo.

El término "agente de unión específica a NGF" se refiere a un agente de unión específica que une específicamente cualquier porción de NGF. En ciertas modalidades, un agente de unión específica a NGF es un anticuerpo que se une específicamente a NGF.

El término "fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional", tal como se emplea en esta especificación, se refiere a un fragmento de polipéptido que contiene por lo menos las CDRs de las cadenas pesadas y livianas de la inmunoglobulina. Un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la invención es capaz de unirse a un antígeno. En modalidades preferidas, el antígeno es un ligando que específicamente se une a un receptor. En estas modalidades, la unión de un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la invención impide la unión del ligando a su receptor, interrumpiendo la respuesta biológica resultante de la unión del ligando al receptor. Preferiblemente, un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la invención se une específicamente a NGF. Muy preferiblemente, el fragmento se une específicamente a NGF humano.

El término "de ocurrencia natural", tal como se emplea en esta especificación, y aplicado a un objeto, se refiere al hecho de que el objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, un polipéptido o secuencia polinucleotídica que está presente en un organismo (incluyendo virus), que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificado intencionalmente por el hombre, es de ocurrencia natural.

El término "conectado operacionalmente" significa que los componentes a los cuales se aplica el término están en una relación que les permite llevar a cabo sus funciones inherentes bajo condiciones apropiadas. Por ejemplo, una secuencia de control "conectada operacionalmente" a una secuencia codificante de una proteína se liga a ella de manera que la expresión de la secuencia codificante de la proteína se logra bajo condiciones compatibles con la actividad transcripcional de las secuencias de control.

El término "secuencia de control", tal como se emplea en esta especificación, se refiere a secuencias polinucleotídicas que pueden afectar la expresión, el procesamiento o la localización intracelular de secuencias codificantes, a las cuales están ligadas. La naturaleza de tales secuencias de control puede depender del organismo hospedador. En modalidades particulares, las secuencias de control para procariotas pueden incluir una secuencia promotora, un sitio de unión ribosómico, y una secuencia de terminación de transcripción. En otras modalidades particulares, las secuencias de control para eucariotas pueden incluir promotores que comprenden uno o una pluralidad de sitios de reconocimiento para factores de transcripción, secuencias potenciadoras de transcripción, secuencias de terminación de transcripción y secuencias de poliadenilación. En ciertas modalidades, "secuencias de control" pueden incluir secuencias líderes y/o secuencias compañeras de fusión.

El término "polinucleótido", tal como se designa en esta especificación, significa polímeros de ácido nucleico monocatenario o bicatenario de por lo menos 10 nucleótidos de longitud. En ciertas modalidades, los nucleótidos que comprenden el polinucleótido pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Las citadas modificaciones incluyen modificaciones de bases tales como bromuridina, modificaciones de ribosa tales como arabinósido y 2',3'-didesoxirribosa y modificaciones de conexión internucleótidos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforoanilodato y fosforoamidato. El término "polinucleótido" incluye específicamente formas monocatenarias y bicatenarias de ADN.

El término "oligonucleótido", designado en esta especificación, incluye oligonucleótidos de ocurrencia natural y modificados, conectados entre sí por conexiones de oligonucleótidos de ocurrencia natural y/o no ocurrencia natural. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que comprende miembros que son generalmente monocatenarios y tienen una longitud de 200 nucleótidos o menos. En ciertas modalidades, los oligonucleótidos tienen 10 a 60 nucleótidos de longitud. En ciertas modalidades, los oligonucleótidos tienen 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 a 40 nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, v.g. para uso en la construcción de un mutante genético. Los oligonucleótidos de la invención pueden ser oligonucleótidos codificantes o complementarios con referencia a una secuencia codificante de

72

proteína.

El término "nucleótidos de ocurrencia natural" incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados" incluye nucleótidos con grupos azúcar, modificados o sustituidos, y similares. El término "conexiones de oligonucleótidos" incluye conexiones de oligonucleótidos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforoanilodato, fosforoamidato, y similares. Véase, v.g., LaPlanche *et al.*, 1986, *Nucl. Acids Res.*, 14:9081; Stec *et al.*, 1984, *J. Am. Chem. Soc.*, 106:6077; Stein *et al.*, 1988, *Nucl. Acids Res.*, 16:3209; Zon *et al.*, 1991, *Anti-Cancer Drug Design*, 6:539; Zon *et al.*, 1991, OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH, páginas 87-108 (F. Eckstein, Ed.), Oxford University Press, Oxford England; Stec *et al.*, la Patente de los Estados Unidos No. 5,151,510; Uhlmann and Peyman, 1990, *Chemical Reviews*, 90:543, cuyas divulgaciones se incorporan aquí por referencia para cualquier propósito. Un oligonucleótido puede incluir una marca detectable ("*a detectable label*") para permitir la detección del oligonucleótido o hibridación del mismo.

El término "vector" incluye una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha conectado. Un tipo de vector es un "plásmido", el cual se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular, en el cual pueden ligarse segmentos de ADN adicional. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde segmentos de ADN adicional pueden ligarse en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la cual se introducen (v.g., vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (v.g., vectores de mamífero no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora luego de la introducción en la célula hospedadora y, en esa forma, se replican junto con el genoma del hospedador. Más aún, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales se enlazan operacionalmente. Tales vectores se designan aquí como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. No obstante, la invención tiene como finalidad incluir esas otras formas de

vectores de expresión, tales como vectores virales (v.g., retrovirus defectuosos en replicación, adenovirus y virus asociados con adeno), que prestan funciones equivalentes.

La locución "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora") incluye una célula en la cual se ha introducido un factor de expresión recombinante. Se entenderá por los expertos en el arte que tales términos tienen como finalidad referirse no sólo a la célula en cuestión particular sino a la progenie de tal célula. Puesto que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones sucesivas debido a mutación o a influencias ambientales, tal progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula progenitora, pero puede estar todavía incluida dentro del ámbito del término "célula hospedadora", tal como se emplea en esta especificación. Una amplia variedad de sistemas de expresión hospedadores pueden usarse para expresar los anticuerpos de la presente invención incluyendo sistemas de expresión bacterianos, levadura, baculovirus y de mamífero (así como sistemas de expresión de exposición en bacteriófagos). Un ejemplo de un vector de expresión bacteriano apropiado es pUC19. Para expresar un anticuerpo recombinantemente, una célula hospedadora se transfecta con uno o más vectores de expresión recombinantes que portan fragmentos de ADN que codifican las cadenas livianas y pesadas de inmunoglobulina del anticuerpo, de modo que se expresen las cadenas livianas y pesadas en la célula hospedadora y, preferiblemente, se secreten en el medio en el cual se están cultivando las células hospedadoras, medio del cual pueden recuperarse los anticuerpos. Metodologías estándar de ADN recombinante se usan para obtener genes de cadena pesada y cadena liviana de anticuerpos, incorporar estos genes en vectores de expresión recombinantes e introducir los vectores en células hospedadoras, tales como la descritas en Sambrook *et al.*, 2001, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratories, Ausubel, F.M. *et al.*, (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989) y en la Patente de los Estados Unidos No. 4,816,397 a Boss *et al.*

El término "célula hospedadora" se usa para referirse a una célula que se ha transformado, o es capaz de transformarse con una secuencia de ácido nucleico y, luego, de expresar un gen seleccionado de interés. El término incluye la progenie de la célula progenitora, tanto si la progenie es idéntica o no en morfología o en constitución genética a la progenitora original, siempre y cuando esté presente el gen seleccionado.

El término "transducción" se emplea para referirse a la transferencia de genes de una bacteria a otra, usualmente por un bacteriófago. "Transducción" se refiere igualmente a la adquisición y transferencia de secuencias celulares eucariotas por retrovirus.

El término "transfección" se utiliza para referirse a la absorción de ADN extraño o exógeno por una célula, y una célula se ha "transfectado" cuando el ADN exógeno se ha introducido dentro de la membrana celular. Numerosas técnicas de transfección son bien conocidas en el arte y se divulgan en esta especificación. Véase, v.g., Graham *et al.*, 1973, *Virology* 52:456; Sambrook *et al.*, 2001, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratories; Davis *et al.*, 1986, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Elsevier; y Chu *et al.*, 1981, *Gene* 13:197. Tales técnicas pueden usarse para introducir una o más fracciones de ADN exógeno en células hospedadoras apropiadas.

El término "transformación", tal como se emplea en esta especificación, se refiere a un cambio en las características genéticas de una célula, y una célula se ha transformado cuando se ha modificado para contener un nuevo ADN. Por ejemplo, una célula se transforma en el caso en que esté genéticamente modificada de su estado nativo. Luego de la transfección o transducción, el ADN transformante puede recombinarse con el de la célula integrándose en un cromosoma de la célula, o puede mantenerse transitoriamente como un elemento episómico sin replicarse, o puede replicarse independientemente como un plásmido. Se considera que una célula se ha transformado establemente cuando el ADN se replica con la división de la célula.

El término "de ocurrencia natural" o "nativo", cuando se emplea en conexión con materiales biológicos tales como moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, células hospedadoras, y similares, se refiere a materiales que se encuentran en la naturaleza y no están manipulados por el hombre. Análogamente, "de ocurrencia no natural" o "no nativo", tal como se emplea en esta especificación, se refiere a un material que no se encuentra en la naturaleza o que se ha modificado o sintetizado estructuralmente por el hombre.

El término "antígeno" se refiere a una molécula o una porción de una molécula capaz de ligarse por un agente de unión selectiva, tal como un anticuerpo y, adicionalmente, capaz de usarse en un animal para producir anticuerpos capaces de unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epítopos.

El término "identidad," como se conoce en el arte, se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más moléculas de polipéptido o dos o más moléculas de ácido nucleico, como se determina comparando las secuencias de las mismas. En el arte, "identidad" significa igualmente el grado de relación de secuencias entre moléculas de ácido nucleico o polipéptidos, según sea el caso, como se determina por la coincidencia entre cadenas de dos o más secuencias de nucleótidos o dos o más secuencias de aminoácidos. "Identidad" mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre la más pequeña de dos o más secuencias con alineamientos de espacio en blanco ("*gap alignments*") (si los hubiere) tratados con un modelo matemático particular o programa de computador (es decir, "algoritmos").

El término "similitud" se emplea en el arte con respecto a un concepto relacionado pero, en contraste con "identidad", "similitud" se refiere a una medida de relación, que incluye tanto coincidencias idénticas como coincidencias de sustituciones conservadoras. Si dos secuencias polipeptídicas tienen, por ejemplo, 10/20 aminoácidos idénticos, y los restantes son todos sustituciones no conservadoras, entonces el porcentaje de identidad y similitud serían ambos 50%. Si, en el mismo ejemplo, hay cinco posiciones más donde hay sustituciones conservadoras, entonces el porcentaje de identidad permanece 50%, pero la similitud porcentual sería 75% (15/20). Por consiguiente, en casos en los que hay sustituciones conservadoras, la similitud porcentual entre dos polipéptidos será más alta que la identidad porcentual entre esos dos polipéptidos.

La identidad y similitud de ácidos nucleicos y polipéptidos relacionados puede calcularse fácilmente por métodos conocidos. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, (Lesk, A.M., ed.), 1988, Oxford University Press, New York; BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS, (Smith, D.W., ed.), 1993, Academic Press, New York; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, Part 1, (Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds.), 1994, Humana Press, New Jersey; von Heinje, G.,

SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1987, Academic Press; SEQUENCE ANALYSIS PRIMER, (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, M. Stockton Press, New York; Carillo *et al.*, 1988, *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073; and Durbin *et al.*, 1998, BIOLOGICAL SEQUENCE ANALYSIS, Cambridge University Press.

Métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para dar la coincidencia más grande entre las secuencias analizadas. Métodos para determinar la identidad se describen en programas de computador disponibles públicamente. Métodos de programa de computador preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el programa de computador GCG, incluyendo GAP (Devereux *et al.*, 1984, *Nucl. Acid. Res.*, 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.*, 215:403-410). El programa BLASTX está disponible públicamente del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul *et al.*, NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul *et al.*, 1990, *supra*). El algoritmo de Smith Waterman bien conocido puede usarse igualmente para determinar identidad.

Ciertos esquemas de alineamiento para alinear dos secuencias de aminoácidos pueden resultar en el emparejamiento de tan sólo una región corta de las dos secuencias, y esta pequeña región alineada puede tener una identidad de secuencia muy alta, incluso si no hay una relación significativa entre las dos secuencias de longitud total. Por consiguiente, en ciertas modalidades, el método de alineamiento seleccionando (programa GAP) resultará en un alineamiento que cubre por lo menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido diana.

Por ejemplo, usando el algoritmo de computador GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), dos polipéptidos, para los cuales se va a determinar la identidad de secuencia porcentual, se alinean para emparejamiento óptimo de sus respectivos aminoácidos (el "rango de coincidencias", como se determina por el algoritmo). En ciertas modalidades, una penalización por espacio en blanco abierto (la cual se calcula como tres veces la diagonal promedia; donde la "diagonal promedia" es el promedio de la diagonal de la matriz de comparación que se está utilizando; la "diagonal" es el puntaje o número asignado a cada coincidencia perfecta de aminoácidos por la matriz de

comparación particular) y una penalización por extensión de espacio en blanco (la cual es usualmente un décimo de la penalización por espacio abierto), así como una matriz de comparación tal como PAM250 o BLOSUM 62 se usan conjuntamente con el algoritmo. En ciertas modalidades, una matriz de comparación estándar (véase Dayhoff *et al.*, 1978, *Atlas of Protein Sequence and Structure*, 5:345-352 para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89:10915-10919 para la matriz de comparación BLOSUM 62) se emplea igualmente por el algoritmo.

En ciertas modalidades, los parámetros para una comparación de secuencias polipeptídicas incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman *et al.*, 1970, *J. Mol Biol*, 48:443-453;

Matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff *et al.*, 1992, *supra*;

Penalización por espacio en blanco: 12

Penalización por longitud de espacio en blanco: 4

Umbral de similitud: 0

El programa GAP puede ser útil con los parámetros indicados anteriormente. En ciertas modalidades, los parámetros ya mencionados son los parámetros por defecto para comparaciones de polipéptidos (junto con ninguna penalización por espacio en blancos finales) usando el algoritmo GAP.

El término "homología" se refiere al grado de similitud entre secuencias de proteínas o ácidos nucleicos. La información de la homología es útil para entender la relación genética de ciertas especies de proteínas o ácidos nucleicos. La homología puede determinarse alineando y comparando secuencias. Normalmente, para determinar la homología de aminoácidos, una secuencia proteica se compara con una base de datos de secuencias proteicas conocidas. Secuencias homólogas comparten identidades funcionales comunes en algún punto a lo largo de sus secuencias. Un alto grado de similitud o identidad es usualmente indicativo de homología, aunque un bajo grado de similitud o identidad no indica necesariamente falta de homología.

Pueden usarse varios enfoques para comparar aminoácidos de una secuencia con aminoácidos de otra secuencia para determinar la homología. Generalmente, los enfoques caerán en dos categorías: (1) comparación de características físicas tales como polaridad, carga, y volumen de Van der Waals, para generar una matriz de similitud; y (2) comparación de sustitución probable de un aminoácido en una secuencia por otro aminoácido, la cual se basa en observación de muchas secuencias proteicas de proteínas homólogas conocidas y generar una Matriz de Mutaciones Puntuales Aceptadas (PAM - *Point Accepted Mutation*).

El porcentaje de identidad puede calcularse asimismo usando el programa needle (paquete EMBOSS) o stretcher (paquete EMBOSS) o el programa align X, como un módulo del paquete de software vector NTI suite 9.0.0, utilizando los parámetros por defecto (por ejemplo, GAP penalty 5, GAP opening penalty 15, GAP extension penalty 6.6).

Tal como se emplea en esta especificación, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase IMMUNOLOGY-A SYNTHESIS, 2nd Edition, (E. S. Golub and D. R. Gren, Eds.), Sinauer Associates: Sunderland, MA, 1991, incorporado en esta especificación por referencia para cualquier propósito. Estereoisómeros (v.g., D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales; aminoácidos no naturales tales como α -aminoácidos, α -aminoácidos disustituidos, N-alquilaminoácidos, ácido láctico, y otros aminoácidos no convencionales pueden ser también componentes apropiados para polipéptidos de la invención. Ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina, y otros aminoácidos similares e iminoácidos (v.g., 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptidos empleada en esta especificación, la dirección levógira es la dirección aminoterminal y la dirección dextrógira es la dirección carboxilo-terminal, de acuerdo con el uso y la convención estándar.

Residuos de ocurrencia natural pueden dividirse en clases basadas en propiedades comunes de cadena lateral:

- 1) hidrófobo: norleucina (Nor), Met, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Tyr, Pro;
- 2) polar hidrófilo: Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr;
- 3) alifático: Ala, Gly, Ile, Leu, Val, Pro;
- 4) alifático hidrófobo : Ala, Ile, Leu, Val, Pro;
- 5) neutro hidrófilo: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 6) ácido: Asp, Glu;
- 7) básico: His, Lys, Arg;
- 8) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- 9) aromático: His, Trp, Tyr, Phe; y
- 10) aromático hidrófobo: Phe, Trp, Tyr.

Sustituciones de aminoácidos conservadoras pueden involucrar intercambio de un miembro de una de estas clases con otros miembros de la misma clase. Sustituciones de aminoácidos conservadoras pueden abarcar residuos de aminoácidos de ocurrencia no natural, los cuales se incorporan típicamente por síntesis peptídica química en lugar de por síntesis en sistemas biológicos. Estos incluyen peptidomiméticos y otras formas reversadas o invertidas de fracciones de aminoácidos.

Sustituciones no conservadoras pueden involucrar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Tales residuos sustituidos pueden introducirse en regiones del anticuerpo humano que son homólogas con anticuerpos no humanos, o en las regiones no homólogas de la molécula.

Al hacer tales cambios, de acuerdo con ciertas modalidades, puede considerarse el índice hidropático de aminoácidos. A cada aminoácido se ha asignado un índice hidropático sobre la base de su hidrofobicidad y las características de carga. Estos son: isoleucina (+4.5); valina (+4.2); leucina (+3.8);

fenilalanina (+2.8); cisteína/cistina (+2.5); metionina (+1.9); alanina (+1.8); glicina (-0.4); treonina (-0.7); serina (-0.8); triptófano (-0.9); tirosina (-1.3); prolina (-1.6); histidina (-3.2); glutamato (-3.5); glutamina (-3.5); aspartato (-3.5); asparagina (-3.5); lisina (-3.9); y arginina (-4.5).

La importancia del índice de aminoácido hidropático en conferir función biológica interactiva a una proteína se entiende en el arte (*véase, por ejemplo, Kyte et al., 1982, J. Mol. Biol. 157:105-131*). Se sabe que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice hidropático similar o puntaje y conservan aún una actividad biológica similar. Al hacer cambios basados en el índice hidropático, en ciertas modalidades, se encuentra incluida la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 . En ciertas modalidades, se encuentran incluidos aquellos que están dentro de ± 1 y, en ciertas modalidades, se encuentran incluidos aquellos que están dentro de ± 0.5 .

Se entiende igualmente en el arte que la sustitución de aminoácidos similares puede hacerse efectivamente sobre la base de la hidrofobicidad, particularmente donde la proteína biológicamente funcional o péptido así creados se prevén para uso en modalidades inmunológicas, como se divulga en esta especificación. En ciertas modalidades, la hidrofobicidad promedio local máxima de una proteína, como se rige por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

Los siguientes valores de hidrofiliidad se han asignado a estos residuos de aminoácidos: arginina (+3.0); lisina (+3.0); aspartato (+3.0 ± 1); glutamato (+3.0 ± 1); serina (+0.3); asparagina (+0.2); glutamina (+0.2); glicina (0); treonina (-0.4); prolina (-0.5 ± 1); alanina (-0.5); histidina (-0.5); cisteína (-1.0); metionina (-1.3); valina (-1.5); leucina (-1.8); isoleucina (-1.8); tirosina (-2.3); fenilalanina (-2.5) y triptófano (-3.4). Al hacer cambios basados en valores de hidrofiliidad similares, en ciertas modalidades, está incluida la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad se encuentran dentro de ± 2 , en ciertas modalidades, están incluidos aquellos que se encuentran dentro de ± 1 y, en ciertas modalidades, están incluidos aquellos que se encuentran dentro de ± 0.5 . Se pueden identificar asimismo epítomos de secuencias de aminoácidos primarios sobre la base de la hidrofiliidad. Estas regiones se designan también como "regiones núcleo

81 ft

epitópicas."

Sustituciones de aminoácidos ejemplares se indican en Tabla 1.

Tabla 1

Sustituciones de Aminoácidos

Residuos Originales	Sustituciones Ejemplares	Substituciones Preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Ácido 1,4-diaminobutírico, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

Un artesano experto estará en capacidad de determinar variantes apropiadas del polipéptido, como se indica en esta especificación, usando técnicas bien conocidas. En ciertas modalidades, un experto en el arte puede identificar áreas apropiadas de la molécula que pueden cambiarse sin destruir la actividad, reconociendo regiones ("*by targeting regions*") que no se consideran importantes

para la actividad. En otras modalidades, el artesano experto puede identificar residuos y porciones de las moléculas que están conservadas entre polipéptidos similares. En modalidades adicionales, incluso áreas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden someterse a sustituciones de aminoácidos conservadoras sin destruir la actividad biológica o sin afectar negativamente la estructura del polipéptido.

Adicionalmente, un experto en el arte puede revisar estudios de estructura-función identificando residuos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o la estructura. En vista de tal comparación, el artesano experto puede predecir la importancia de residuos de aminoácidos en una proteína que corresponden a residuos de aminoácidos importantes para la actividad o la estructura en proteínas similares. Un experto en el arte puede optar por sustituciones de aminoácidos químicamente similares para tales residuos de aminoácidos importantes predichos.

Un experto en el arte puede analizar igualmente la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con esa estructura en polipéptidos similares. En vista de tal información, un experto en el arte puede predecir el alineamiento de residuos de aminoácidos de un anticuerpo con respecto a su estructura tridimensional. En ciertas modalidades, un experto en el arte puede elegir no introducir cambios radicales a residuos de aminoácidos predichos para estar presentes en la superficie de la proteína, puesto que tales residuos pueden estar involucrados en interacciones importantes con otras moléculas. Más aún, un experto en el arte puede generar variantes de prueba que contienen una sola sustitución de aminoácido en cada residuo de aminoácido deseado. Las variantes pueden detectarse selectivamente empleando análisis de actividad conocidos por los expertos en el arte. Tales variantes podrían usarse para reunir información sobre variantes apropiadas. Por ejemplo, si se descubrió que un cambio a un residuo de aminoácido particular resultó en una actividad destruida, reducida indeseablemente, o inapropiada, pueden evitarse las variantes con tal cambio. En otras palabras, basándose en la información recolectada de tales experimentos rutinarios, un experto en el arte puede determinar fácilmente los aminoácidos en los cuales deben evitarse sustituciones adicionales, solas o en combinación con otras mutaciones.

Numerosas publicaciones científicas se han dedicado a la predicción de la estructura secundaria. Véase Moulton, 1996, *Curr. Op. in Biotech.* 7:422-427; Chou *et al.*, 1974, *Biochemistry* 13:222-245; Chou *et al.*, 1974, *Biochemistry* 113:211-222; Chou *et al.*, 1978, *Adv. Enzymol Relat. Areas Mol Biol* 47:45-148; Chou *et al.*, 1979, *Ann. Rev. Biochem.* 47:251-276; and Chou *et al.*, 1979, *Biophys. J.* 26:367-384. Más aún, actualmente se dispone de programas de computador para ayudar a predecir la estructura secundaria. Un método de predecir la estructura secundaria se basa en modelado de homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas que tienen una identidad de secuencia de más de 30%, o una similitud mayor que 40% poseen a menudo topologías estructurales similares. El reciente crecimiento de la base de datos de estructuras de proteínas (PDB – *protein structural database*) ha proporcionado una predecibilidad mejorada de la estructura secundaria, incluyendo el número potencial de pliegues en la estructura de un polipéptido o una proteína. Véase Holm *et al.*, 1999, *Nucl Acid. Res.* 27:244-247. Se ha sugerido (Brenner *et al.*, 1997, *Curr. Op. Struct. Biol.* 7:369-376) que hay un número limitado de pliegues en un polipéptido o proteína dados y que, una vez se ha resuelto un número crítico de estructuras, la predicción estructural se hará dramáticamente más exacta.

Métodos adicionales de predecir una estructura secundaria incluyen mapear una secuencia dada a una estructura dada - "threading" (Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:377-87; Sippl *et al.*, 1996, *Structure* 4:15-19), "profile analysis" (Bowie *et al.*, 1991, *Science* 253:164-170; Gribskov *et al.*, 1990, *Meth. Enzym.* 183:146-159; Gribskov *et al.*, 1987, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84:4355-4358), y "vinculación evolutiva" - "evolutionary linkage" (véase Holm, 1999, *supra*; y Brenner, 1997, *supra*).

En ciertas modalidades, variantes del anticuerpo incluyen glicosilación, en la que el número y/o el tipo del sitio de glicosilación se han alterado, comparados con las secuencias de aminoácidos del polipéptido progenitor. En ciertas modalidades, variantes de la proteína comprenden un número mayor o menor de sitios de glicosilación N-enlazados que la proteína nativa. Un sitio de glicosilación N-enlazado se caracteriza por la secuencia: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en donde el residuo de aminoácido designado como X puede ser cualquier residuo de aminoácido, excepto prolina. La sustitución de residuos de aminoácido para crear esta secuencia ofrece un sitio nuevo potencial para la adición de una cadena de carbohidratos N-enlazados. Alternativamente, sustituciones que eliminan esta

secuencia eliminarán una cadena de carbohidratos N-enlazados existente. Se provee asimismo un reordenamiento de cadenas de carbohidratos N-enlazados en las que uno o más sitios de glicosilación N-enlazados (normalmente aquellos que son de ocurrencia natural) se eliminan y se crean uno o más sitios nuevos N-enlazados. Variantes adicionales preferidas del anticuerpo incluyen variantes de cisteína en donde uno o más residuos cisteína se delecionan de, o se sustituyen por, otro aminoácido (v.g., serina), comparados con la secuencia de aminoácidos progenitora. Las variantes de cisteína pueden ser útiles cuando tienen que volverse a plegar anticuerpos en una conformación biológicamente activa, tal como después del aislamiento de cuerpos de inclusión insolubles. Generalmente las variantes de cisteína tienen menos residuos de cisteína que la proteína nativa y, típicamente, tienen un número par para minimizar las interacciones resultantes de cisteínas no emparejadas.

En modalidades adicionales, las variantes del anticuerpo pueden incluir anticuerpos que contienen un fragmento Fc modificado o una región constante de cadena pesada modificada. Un fragmento Fc, que significa "fragmento que cristaliza," o una región constante de cadena pesada puede modificarse por mutación para conferir a un anticuerpo características de unión alteradas. Véase, por ejemplo, Burton and Woof, 1992, *Advances in Immunology* 51: 1-84; Ravetch and Bolland, 2001, *Annu. Rev. Immunol* 19: 275-90; Shields *et al.*, 2001, *Journal of Biol. Chem* 276: 6591-6604; Telleman and Junghans, 2000, *Immunology* 100: 245-251; Medesan *et al.*, 1998, *Eur. J. Immunol.* 28: 2092-2100; todos los cuales se incorporan en esta especificación por referencia). Tales mutaciones pueden incluir sustituciones, adiciones, delecciones, o cualquier combinación de las anteriores, y se producen típicamente por mutagenesis de sitio dirigido, usando uno o más oligonucleótido(s) mutagénico(s) de acuerdo con métodos descritos en esta especificación, así como de acuerdo con métodos conocidos en el arte (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3rd Ed., 2001, Cold Spring Harbor, N.Y. and Berger and Kimmel, METHODS IN ENZYMOLOGY, Volume 152, Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, Inc., San Diego, CA., los cuales se incorporan en esta especificación por referencia).

De acuerdo con ciertas modalidades, sustituciones de aminoácidos son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar

complejos de proteínas, (4) alteran las afinidades de unión, y/o (5) confieren o modifican otras propiedades físico-químicas o funcionales en tales polipéptidos. De acuerdo con ciertas modalidades, sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples (en ciertas modalidades, sustituciones de aminoácidos conservadoras) pueden hacerse en la secuencia de ocurrencia natural (en ciertas modalidades, en la porción del polipéptido fuera del (de los) dominio(s) que forma(n) contactos intermoleculares). En modalidades preferidas, una sustitución de aminoácidos conservadora por lo general no cambia sustancialmente las características estructurales de la secuencia progenitora (v.g., un aminoácido de reemplazo no debe tender a romper una hélice que ocurra en la secuencia progenitora, o a desestabilizar otros tipos de estructura secundaria, que caracterizan la secuencia progenitora). Ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptido reconocidas en el arte se describen en *PROTEINS, STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES*, (Creighton, Ed.), 1984, W. H. Freeman and Company, New York; *INTRODUCTION TO PROTEIN STRUCTURE* (C. Branden and J. Tooze, eds.), 1991, Garland Publishing, New York, N.Y.; and Thornton *et al.*, 1991, *Nature* 354:105, cada uno de los cuales se incorpora en esta especificación por referencia.

Análogos de péptidos se usan comúnmente en la industria farmacéutica como medicamentos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido molde. Estos tipos de compuesto no peptídico se denominan "miméticos peptídicos" o "peptidomiméticos". Véase Fauchere, 1986, *Adv. Drug Res.* 15:29; Veber & Freidinger, 1985, *TINS* p.392; and Evans *et al.*, 1987, *J. Med. Chem.* 30:1229, los cuales se incorporan en esta especificación por referencia para cualquier propósito. Tales compuestos se desarrollan a menudo con la ayuda de modelado molecular computarizado. Los peptidomiméticos que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles pueden usarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico similar. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un péptido paradigmático (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), tal como un anticuerpo humano, pero tienen una o más conexiones peptídicas reemplazadas opcionalmente por una conexión seleccionada de: -CH₂-NH-, -CH₂-S-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH-(*cis* y *trans*), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂-, y -CH₂SO-, por métodos bien conocidos en el arte. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (v.g., D-lisina en lugar de L-lisina) puede usarse en

ciertas modalidades para generar péptidos más estables. Adicionalmente, péptidos restringidos, que comprenden una secuencia de consenso o una variación de secuencia de consenso sustancialmente idéntica, pueden generarse por métodos conocidos en el arte (Rizo & Gierasch, 1992, *Ann. Rev. Biochem.* (61):387, incorporado en esta especificación por referencia para cualquier propósito); *por ejemplo*, agregando residuos de cisteína internos capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que producen la ciclación del péptido.

"Anticuerpo" o " péptido(s) de anticuerpo" se refieren a un anticuerpo intacto, o un fragmento de unión del mismo que compite con el anticuerpo intacto para unión específica. En ciertas modalidades, fragmentos de unión se producen por técnicas de ADN recombinante. En modalidades adicionales, fragmentos de unión se producen por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Fragmentos de unión incluyen, pero no se limitan a, F(ab), F(ab'), F(ab')₂, Fv, y anticuerpos de cadena única.

El término "cadena pesada" incluye cualquier polipéptido de inmunoglobulina que tiene una secuencia de región variable suficiente para conferir especificidad para NGF. El término "cadena liviana" incluye cualquier polipéptido de inmunoglobulina que tiene una secuencia de región variable suficiente para conferir especificidad para NGF. Una cadena pesada de longitud total incluye un dominio de región variable, V_H, y tres dominios de región constante, C_H1, C_H2, y C_H3. El dominio V_H está en el extremo amino del polipéptido, y el dominio C_H3 está en el extremo carboxilo. El término "cadena pesada", tal como se emplea en esta especificación, abarca una cadena pesada de longitud total y fragmentos de la misma. Una cadena liviana de longitud total incluye un dominio de región variable, V_L, y un dominio de región constante, C_L. Al igual que la cadena pesada, el dominio de región variable de la cadena liviana está en el extremo amino del polipéptido. El término "cadena liviana", tal como se emplea en esta especificación, abarca una cadena liviana de longitud total y fragmentos de la misma. Un fragmento F(ab) se compone de una cadena liviana y el C_H1 y regiones variables de cadena pesada. La cadena pesada de una molécula F(ab) no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada. Un fragmento F(ab') contiene una cadena liviana y una cadena pesada que contiene más de la región constante, entre los dominios C_H1 y C_H2, de modo que un enlace disulfuro intercadena puede formarse entre dos cadenas pesadas para formar una molécula F(ab')₂. La región Fv comprende las regiones variables

de las cadenas pesadas y livianas, pero carece de las regiones constantes. Anticuerpos de cadena única son moléculas Fv en las cuales las regiones variables de cadena pesada y cadena liviana se han conectado por un conector flexible para formar una cadena polipeptídica única, la cual forma una región de unión de antígeno. Anticuerpos de cadena única se discuten en detalle en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 88/01649 y las Patentes de los Estados Unidos No. 4,946,778 y 5,260,203.

En ciertas modalidades, se entiende que un anticuerpo bivalente distinto de un anticuerpo "multiespecífico" o "multifuncional" comprende sitios de unión que tienen especificidad antigénica idéntica.

Al evaluar la unión y la especificidad del anticuerpo de acuerdo con la invención, un anticuerpo inhibe sustancialmente la adhesión de un ligando a un receptor cuando un exceso de anticuerpo reduce la cantidad de ligando unido al receptor en por lo menos alrededor de 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, o más (como se mide, *inter alia*, usando un análisis de unión competitiva *in vitro*).

Por "anticuerpo neutralizante" se da a entender una molécula de anticuerpo que es capaz de bloquear o reducir sustancialmente una función efectora de un antígeno diana al cual se une. En consecuencia, un anticuerpo anti-NGF "neutralizante" es capaz de bloquear o reducir sustancialmente una función efectora, tal como la unión de receptor y/o provocación de una respuesta celular, de NGF. "Reducir sustancialmente" tiene como finalidad significar por lo menos alrededor de 60%, preferiblemente por lo menos alrededor de 70%, más preferiblemente por lo menos alrededor de 75%, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 80%, todavía más preferiblemente por lo menos alrededor de 85%, muy preferiblemente por lo menos alrededor de 90% de reducción de una función efectora del antígeno diana (v.g., NGF humano).

El término "epítipo" incluye cualquier determinante, preferiblemente un determinante de un polipéptido, capaz de unión específica a una inmunoglobulina o receptor de linfocitos T. En ciertas modalidades, los determinantes de un epítipo incluyen agrupaciones de superficie químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo, o grupos sulfonilo y, en ciertas modalidades, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. Un epítipo

es una región de un antígeno que es unida por un anticuerpo. En ciertas modalidades, se dice que un anticuerpo une específicamente un antígeno cuando preferencialmente reconoce su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. En modalidades preferidas, se dice que un anticuerpo une específicamente un antígeno cuando la constante de disociación de equilibrio es $\leq 10^{-8}$ M, más preferiblemente cuando la constante de disociación de equilibrio es $\leq 10^{-9}$ M y, muy preferiblemente, cuando la constante de disociación es $\leq 10^{-10}$ M.

Un anticuerpo une "esencialmente el mismo epítipo" como un anticuerpo de referencia, cuando los dos anticuerpos reconocen epítopos idénticos o estéricamente superpuestos. Los métodos más ampliamente utilizados y rápidos para determinar si dos anticuerpos se unen a epítopos idénticos o estéricamente superpuestos son análisis de competición, los cuales pueden configurarse en todo número de formatos diferentes, empleando un antígeno marcado o un anticuerpo marcado. Usualmente, el antígeno se inmoviliza en un sustrato, y se mide la capacidad de anticuerpos no marcados de bloquear la unión de anticuerpos marcados usando marcas radioactivas o enzimáticas.

El término "agente" se emplea en esta especificación para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto elaborado de materiales biológicos.

Tal como se emplea en esta especificación, los términos "marca" o "marcado" se refieren a la incorporación de un marcador detectable, v.g., mediante incorporación de un aminoácido radiomarcado o fijación a un polipéptido de fracciones de biotina que pueden detectarse por avidina marcada (v.g., estreptavidina que incluye preferiblemente un marcador detectable tal como un marcador fluorescente, un marcador quimioluminescente o una actividad enzimática que puede detectarse por métodos ópticos o colorimétricos). En ciertas modalidades, la marca puede ser también terapéutica. Varios métodos de marcar polipéptidos y glucoproteínas son conocidos en el arte y pueden usarse ventajosamente en los métodos divulgados en esta especificación. Ejemplos de marcas para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (v.g., ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), marcas fluorescentes (v.g., isotiocianato de fluoresceína o FITC, rodamina, o fósforos de lantánido), marcas enzimáticas (v.g., peroxidasa de rábano, β -

galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcas quimioluminiscentes, marcas de hapteno tales como grupos biotínico, y epítopos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un reportero secundario (v.g., secuencias de par de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión de metal, o etiquetas de epítipo). En ciertas modalidades, las marcas se fijan por brazos espaciadores (tales como $(CH_2)_n$, donde $n < \text{alrededor de } 20$) de varias longitudes para reducir el impedimento estérico potencial.

El término "muestra biológica", tal como se emplea en esta especificación, incluye, pero no se limita a, cualquier cantidad de sustancia de un organismo vivo o un organismo anteriormente vivo. Tales organismos vivos incluyen, pero no se limitan a, humanos, ratones, monos, ratas, conejos, y otros animales. Tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, sangre, suero, orina, células, órganos, tejidos, hueso, médula ósea, ganglios linfáticos, y piel.

El término "agente farmacéutico o medicamento", tal como se emplea en esta especificación, se refiere a un compuesto químico o composición capaz de inducir un efecto terapéutico deseado, cuando se administra adecuadamente a un paciente. Se entiende que la expresión "cantidad farmacéuticamente efectiva", en referencia a una composición farmacéutica que contiene uno o una pluralidad de los anticuerpos de la invención, significa, de acuerdo con la invención, una cantidad de la citada composición farmacéutica que es capaz de abolir, en el paciente considerado, la disminución en el umbral de sensibilidad a estímulos externos con un retorno de este umbral de sensibilidad a un nivel comparable al observado en sujetos sanos.

Un "trastorno" es cualquier enfermedad que se beneficiaría del tratamiento de acuerdo con la presente invención. "Trastorno" y "enfermedad" se usan indistintamente en esta especificación e incluyen trastornos crónicos y agudos mediados por NGF o enfermedades mediadas por NGF, incluyendo aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

Los términos "enfermedad mediada por NGF" y "afección mediada por NGF" abarcan cualquier enfermedad o trastorno asociados con niveles crecientes de NGF o sensibilidad cada vez mayor a NGF incluyendo, pero no limitados a, dolor agudo, dolor dental, dolor proveniente de trauma, dolor quirúrgico, dolor resultante de amputación o absceso, causalgia, enfermedades desmielinizantes,

neuralgia del trigémino, cáncer, alcoholismo crónico, infarto, síndrome de dolor del tálamo, diabetes, síndrome de inmunodeficiencia adquirida ("SIDA"), toxinas, quimioterapia, cefalea general, migraña, cefalea en racimos, síndromes vasculares-mixtos y no vasculares, cefalea por tensión, inflamación general, artritis, enfermedades reumáticas, lupus, osteoartritis, fibromialgia, trastornos inflamatorios del colon y el recto, síndrome del intestino irritable, trastornos oculares inflamatorios, trastornos inflamatorios o trastornos de la vejiga inestable, psoriasis, dolencias de la piel con componentes inflamatorios, eritema solar, carditis, dermatitis, miositis, neuritis, collagenopatías vasculares, afecciones inflamatorias crónicas, dolor inflamatorio e hiperalgesia asociada y alodinia, dolor neuropático e hiperalgesia asociada o alodinia, dolor neuropático diabético, causalgia, distrofia simpática refleja, síndromes de desaferenciación, asma, daño tisular epitelial o disfunción, herpes simple, alteraciones de la motilidad visceral en regiones respiratorias, genitourinarias, gastrointestinales o vasculares, heridas, quemaduras, reacciones cutáneas alérgicas, pruritis, vitíligo, trastornos gastrointestinales generales, colitis, ulceración gástrica, úlceras duodenales, rinitis vasomotora o alérgica, o trastornos bronquiales, dismenorrea, dispepsia, reflujo gastroesofágico, pancreatitis, o visceralgia.

Tal como se emplea en esta especificación, los términos "cantidad efectiva" y "cantidad terapéuticamente efectiva", cuando se usan con referencia a un vehículo o una composición farmacéutica que contiene uno o más anticuerpos humanos anti-NGF humano, se refieren a una cantidad o dosificación suficiente para producir un resultado deseado (es decir, donde para la terapia con el vehículo o anticuerpos humanos anti-NGF humano de la presente invención el resultado deseado es la reducción deseada en la inflamación y/o dolor, por ejemplo) o para apoyar una disminución observable en el nivel de una o más actividades biológicas de NGF. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad del (de los) anticuerpo(s) humano(s) anti-NGF humano suficiente para inhibir, durante algún período de tiempo, uno o más de los procesos patológicos definidos clínicamente, asociados con la afección en discusión, v.g., inflamación o dolor, en un sujeto tratado *in vivo* con el agente. En la presente invención, una "cantidad efectiva" de un anticuerpo anti-NGF puede prevenir, detener, controlar, o reducir la percepción de dolor asociado con cualquier enfermedad dolorosa. En los métodos de la presente invención, el término "control" y sus variantes gramaticales se emplean para referirse a la

prevención, inhibición parcial o completa, reducción, retraso o desaceleración de un episodio indeseado, v.g., dolor. La cantidad efectiva puede variar dependiendo del (de los) anticuerpo(s) humano(s) anti-NGF humano o vehículo específico seleccionado(s), y depende además de una variedad de factores y condiciones relacionadas con el sujeto por tratar y la gravedad del trastorno. Por ejemplo, si el (los) anticuerpo(s) humano(s) anti-NGF humano o vehículo se va(n) a administrar *in vivo*, estarían entre los considerados factores tales como la edad, peso y salud del paciente, así como las curvas de respuesta a la dosis y los datos de toxicidad obtenidos en trabajo preclínico en animales. Si el agente tiene que contactarse con las células *in vitro*, se diseñaría también una variedad de estudios preclínicos *in vitro* para evaluar tales parámetros como absorción, semivida, dosis, toxicidad, etc. La determinación de una cantidad efectiva o una cantidad terapéuticamente efectiva para un agente dado se encuentra perfectamente dentro de la capacidad de los expertos en el arte.

Tal como se emplea en esta especificación, los términos "factor de crecimiento nervioso" y "NGF" se definen como toda especie mamífera de NGF de secuencia nativa, incluyendo el NFG-120 humano recombinante, como se indica en SEQ ID NO:30.

Tal como se emplea en esta especificación, "sustancialmente puro" o "sustancialmente purificado" significa un compuesto o especie que es la especie predominante presente (*es decir*, sobre una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición). En ciertas modalidades, una fracción sustancialmente purificada es una composición en la cual la especie incluye por lo menos alrededor de 50 por ciento (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En ciertas modalidades, una composición sustancialmente pura incluirá más de alrededor de 80%, 85%, 90%, 95%, o 99% de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. En ciertas modalidades, la especie se purifica a una homogeneidad esencial (especies contaminantes no pueden detectarse en la composición por métodos de detección convencionales) en donde la composición consiste esencialmente de una especie macromolecular única.

El término "paciente" incluye sujetos humanos y animales.

"Tratamiento" o "tratar" se refieren tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Los sujetos necesitados de tratamiento incluyen aquellos que ya padecen el trastorno, así como aquellos propensos a sufrir el trastorno o aquellos en los cuales tiene que prevenirse el trastorno.

A menos que se requiera en otra forma por el contexto, los términos del singular incluirán pluralidades y los términos del plural incluirán el singular.

De acuerdo con ciertas modalidades de la invención, anticuerpos dirigidos a NGF pueden usarse para tratar dolor neuropático e inflamatorio y enfermedades mediadas por NGF, incluyendo pero sin limitarse a, las mencionadas anteriormente.

En un aspecto de la invención se proporcionan anticuerpos monoclonales completamente humanos desarrollados contra el NGF humano y que poseen especificidad biológica e inmunológica para unirse a él. En otro aspecto la invención provee ácidos nucleicos que comprenden secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de aminoácidos para moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada y liviana, particularmente secuencias que corresponden a las regiones variables de las mismas. Modalidades particulares de este aspecto de la invención son secuencias correspondientes a regiones determinantes de complementariedad (CDRs - *complementarity determining regions*), específicamente desde CDR1 a CDR3, de las cadenas pesadas y livianas provistas por la invención. En todavía otro aspecto la invención provee células de hibridoma y líneas de células que expresan las moléculas de inmunoglobulina y anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales de la invención. La invención proporciona además preparados biológica e inmunológicamente purificados de anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales desarrollados contra NGF humano, o que poseen especificidad biológica e inmunológica para unirse a él.

La capacidad de clonar y reconstruir *loci* humanos con tamaño de megabases en cromosomas artificiales de levadura (YACs - *yeast artificial chromosomes*) y de introducirlos en la línea germinal de ratón posibilita una

metodología ventajosa para elucidar los componentes funcionales de loci muy grandes o mapeados de un modo muy general, así como para generar modelos útiles de enfermedad humana. Más aún, la utilización de tal tecnología para la sustitución de loci de ratón con sus equivalentes humanos permite conocimientos únicos en la expresión y regulación de productos génicos humanos durante el desarrollo, su comunicación con otros sistemas, y su implicación en la inducción o evolución de la enfermedad.

Una aplicación práctica importante de tal estrategia es la "humanización" del sistema inmunitario humoral del ratón. La introducción de loci de inmunoglobulina (Ig) humana en ratones, en los cuales se han inactivado los genes de la Ig endógena, ofrece la oportunidad de estudiar mecanismos que subyacen a la expresión programada y ensamblado de anticuerpos, así como su papel en el desarrollo de linfocitos B. Por lo demás, tal estrategia proporciona una fuente para la producción de anticuerpos monoclonales (MAbs - *monoclonal antibodies*) completamente humanos.

El término "anticuerpo humano" incluye anticuerpos que tienen regiones constantes y variables que corresponden sustancialmente a secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertas modalidades, anticuerpos humanos se producen en mamíferos no humanos, incluyendo, pero no limitados a, roedores, tales como ratones y ratas, y lagomorfos, tales como conejos. En ciertas modalidades, anticuerpos humanos se producen en células de hibridoma. En ciertas modalidades, anticuerpos humanos se producen recombinantemente.

El término "recombinante" en referencia a un anticuerpo incluye anticuerpos que se preparan, expresan, crean y aíslan por medios recombinantes. Ejemplos representativos incluyen anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora, anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos, combinatorios, recombinantes, aislados de un animal (v.g., un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase por ejemplo, Taylor, L.D., *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295, (1992); o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier medio que involucre empalme ("*splicing*") de secuencias de genes de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones constantes y variables derivadas de secuencias de

inmunoglobulina de la línea germinal humana.

Anticuerpos humanos tienen por lo menos tres ventajas sobre los anticuerpos no humanos y quiméricos para uso en terapia humana:

1) debido a que la porción efectora del anticuerpo es humana, puede interactuar mejor con las demás partes del sistema inmunitario humano (v.g., destruir las células diana más eficientemente por citotoxicidad dependiente de complemento (CDC - *complement-dependent cytotoxicity*) o citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC - *antibody-dependent cellular cytotoxicity*));

2) el sistema inmunitario humano no debe reconocer el anticuerpo humano como extraño y, por consiguiente, la respuesta del anticuerpo contra tal anticuerpo inyectado debe ser menor que contra un anticuerpo no humano totalmente extraño o un anticuerpo quimérico parcialmente extraño;

3) se ha informado que anticuerpos no humanos inyectados tienen una semivida en la circulación humana mucho más corta que la semivida de los anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanos inyectados tendrán una semivida esencialmente idéntica a los anticuerpos humanos de ocurrencia natural, permitiendo administrar dosis más pequeñas y menos frecuentes.

Por lo tanto, se espera que los anticuerpos completamente humanos minimicen las respuestas inmunogénicas y alérgicas intrínsecas a MAbs de ratón o derivados de ratón y, en esa forma, incrementen la eficacia y seguridad de los anticuerpos administrados. En consecuencia, anticuerpos completamente humanos de la invención pueden usarse en el tratamiento de dolor crónico y recurrente, cuyo tratamiento requiere una administración repetida de anticuerpos. Por consiguiente, una ventaja particular de los anticuerpos anti-NGF de la invención es que los anticuerpos son completamente humanos y pueden administrarse a pacientes en una manera no aguda, minimizando al mismo tiempo las reacciones adversas, asociadas comúnmente con anticuerpos anti-ratón humanos u otros anticuerpos no completamente humanos, descritos anteriormente, de especies no humanas.

Un experto en el arte puede diseñar cepas de ratón, deficientes en producción de anticuerpos de ratón, con grandes fragmentos de los loci de Ig

humana, de manera que tales ratones produzcan anticuerpos humanos en la ausencia de anticuerpos de ratón. Grandes fragmentos de Ig humana pueden preservar la enorme diversidad de genes variables, así como la adecuada regulación de la producción y expresión de anticuerpos. Aprovechando la maquinaria celular del ratón para la diversificación y selección de anticuerpos y la falta de tolerancia inmunológica a proteínas humanas, el repertorio de anticuerpos humanos reproducidos en estas cepas de ratón proporciona anticuerpos de alta afinidad contra cualquier antígeno de interés, incluyendo antígenos humanos. Usando la tecnología del hibridoma, pueden producirse y seleccionarse Mabs humanos específicos del antígeno con la especificidad deseada.

Pueden emplearse animales transgénicos (v.g., ratones) que son capaces, luego de la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en la ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. La transferencia del arreglo de genes de la inmunoglobulina de la línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos luego de la prueba de provocación con antígeno (véase, v.g., Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551-2555, (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362:255-258, (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immun, 7:33 (1993); Nature 148:1547-1553 (1994), Nature Biotechnology 14:826 (1996); Gross, J.A., *et al.*, Nature, 404:995-999 (2000); y las Patentes de los Estados Unidos No. 5,877,397, 5,874,299, 5,814,318, 5,789,650, 5,770,429, 5,661,016, 5,633,425, 5,625,126, 5,569,825, y 5,545,806 (cada una de las cuales se incorpora en esta especificación por referencia en su totalidad para todos los propósitos)). Anticuerpos humanos pueden producirse igualmente en bibliotecas de exposición en bacteriófagos (Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol, 227:381 (1992); Marks *et al.*, J. Mol. Biol, 222:581 (1991)). Las técnicas de Cole *et al.*, y Boerner *et al.*, se encuentran igualmente disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therap, Alan R. Liss, p. 77 (1985) and Boerner *et al.*, J. Immunol, 147(1):86-95 (1991)).

Anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse asimismo a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagenesis somática *in vivo*) y, por consiguiente, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de las relacionadas con las secuencias V_H y V_L

de la línea germinal humana, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio *in vivo* de línea germinal de anticuerpos humanos.

En ciertas modalidades, el artesano experto puede usar regiones constantes de especies distintas de humanas junto con la (las) región (regiones) variable(s) humana(s) en tales ratones para producir anticuerpos quiméricos.

Estructura de Anticuerpos de Ocurrencia Natural

Las unidades estructurales de anticuerpos de ocurrencia natural incluyen típicamente un tetrámero. Cada tetrámero similar se compone normalmente de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "liviana" de longitud total (que posee típicamente un peso molecular de alrededor de 25 kDa) y una cadena "pesada" de longitud total (que posee típicamente un peso molecular de alrededor de 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena liviana y pesada incluye por lo general una región variable de alrededor de 100 a 110 o más aminoácidos, la cual es normalmente responsable del reconocimiento de antígeno. La porción carboxilo-terminal de cada cadena define generalmente una región constante responsable de la función efectora. Las cadenas livianas humanas se clasifican por lo general como cadenas livianas kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican típicamente como mu, delta, gamma, alfa, o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente. IgG tiene varias subclases, incluyendo pero no limitadas a, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. IgM tiene subclases, incluyendo pero no limitadas a, IgM1 e IgM2. IgA se divide análogamente en subclases incluyendo, pero no limitadas a, IgA1 e IgA2. Dentro de las cadenas livianas y pesadas de longitud total, por lo general, las regiones constantes y variables se unen por una región "J" de alrededor de 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada además una región "D" de alrededor de 10 o más aminoácidos. Véase, *v.g.*, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, Ch. 7, 2nd ed., (Paul, W., ed.), 1989, Raven Press, N.Y. (incorporado por referencia en su totalidad para todos los propósitos). Las regiones variables de cada par de cadena liviana/pesada forman típicamente el sitio de unión de antígeno.

Normalmente, las regiones variables exhiben la misma estructura general de las regiones base (FR – *framework regions*) relativamente conservadas, unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de

complementariedad o CDRs. Las CDRs de las dos cadenas de cada par se alinean típicamente por las regiones base, las cuales pueden permitir la unión a un epítipo específico. Del extremo N-terminal al extremo C-terminal, las dos regiones variables de cadena liviana y pesada incluyen por lo general los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está típicamente de acuerdo con las definiciones de Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (1987 and 1991, National Institutes of Health, Bethesda, Md.), o Chothia & Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia *et al.*, 1989, *Nature* 342:878-883.

Anticuerpos Biespecíficos o Bifuncionales

Un anticuerpo biespecífico bifuncional es típicamente un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares diferentes de cadena pesada/cadena liviana y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse por una variedad de métodos incluyendo, pero no limitados a, fusión de hibridomas o conexión de fragmentos F(ab'). Véase, *v.g.*, Songsivilai & Lachmann, 1990, *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321; Kostelny *et al.*, 1992, *J. Immunol.* 148:1547-1553.

Preparación de Anticuerpos

La invención provee anticuerpos que se unen al NGF humano. Estos anticuerpos pueden producirse por inmunización con el NGF de longitud total o fragmentos del mismo. Los anticuerpos de la invención pueden ser policlonales o monoclonales, y/o pueden ser anticuerpos recombinantes. En modalidades preferidas, los anticuerpos de la invención son anticuerpos humanos preparados, por ejemplo, por inmunización de animales transgénicos capaces de producir anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Internacional, Publicación WO 93/12227).

Las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de las regiones variables de cadena liviana y cadena pesada de los anticuerpos anti-NGF de la invención pueden injertarse en las regiones base (FRs) de la misma especie, o diferente. En ciertas modalidades, las CDRs de las regiones variables de cadena liviana y cadena pesada del anticuerpo anti-NGF pueden injertarse a FRs humanas de consenso. Para crear FRs humanas de consenso, FRs de varias secuencias de aminoácidos de cadena pesada o cadena liviana humanas se

alinean para identificar una secuencia de aminoácidos de consenso. Las FRs de la cadena pesada o la cadena liviana del anticuerpo anti-NGF pueden reemplazarse con las FRs de una cadena pesada o una cadena liviana diferente. Aminoácidos raros en las FRs de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo anti-NGF típicamente no se reemplazan, mientras que el resto de los aminoácidos de las FRs pueden reemplazarse. Aminoácidos raros son aminoácidos específicos que están en posiciones en las cuales no se encuentran usualmente en FRs. Las regiones variables injertadas de anticuerpos anti-NGF de la invención pueden usarse con una región constante que es diferente de la región constante del anticuerpo anti-NGF. Alternativamente, las regiones variables injertadas son parte de un anticuerpo Fv de cadena única. El injertado de CDR se describe, v.g., en las Patentes de los Estados Unidos No. 6,180,370, 5,693,762, 5,693,761, 5,585,089, y 5,530,101, las cuales se incorporan por referencia para cualquier propósito.

Los anticuerpos de la invención se preparan preferiblemente usando ratones transgénicos que tienen una porción sustancial del locus, que produce el anticuerpo humano, insertada en células productoras del anticuerpo de los ratones, y que se manipulan posteriormente para ser deficientes en producir anticuerpos murinos, endógenos. Tales ratones son capaces de producir moléculas de inmunoglobulina humana y anticuerpos, y no producen o producen cantidades sustancialmente reducidas de moléculas de inmunoglobulina murina y anticuerpos. Tecnologías utilizadas para obtener este resultado se divulgan en las patentes, solicitudes, y referencias divulgadas en la presente especificación. En modalidades preferidas, el trabajador experto puede emplear métodos como los divulgados en la Solicitud de Patente Internacional, Publicación No. WO 98/24893, la cual se incorpora aquí por referencia para cualquier propósito. Véase además Mendez *et al.*, 1997, *Nature Genetics* 15:146-156, el cual se incorpora aquí por referencia para cualquier propósito.

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) de la invención se pueden producir por una variedad de técnicas, incluyendo la metodología convencional de anticuerpos monoclonales, v.g., la técnica estándar de hibridación de células somáticas de Kohler and Milstein (1975, *Nature* 256:495). Aunque se prefieren procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, pueden emplearse otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, v.g., transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

91 85

El sistema animal preferido para preparar hibridomas es el ratón. La producción de hibridomas en el ratón está muy bien establecida, y protocolos y técnicas de inmunización para aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión son perfectamente conocidos en el arte. Compañeros de fusión (v.g., células de mieloma murino) y procedimientos de fusión son igualmente conocidos.

En una modalidad preferida, anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra NGF pueden generarse usando ratones transgénicos que portan partes del sistema inmunitario en lugar del sistema del ratón. Estos ratones transgénicos, designados en esta especificación como ratones "HuMab", contienen un minilocus del gen de la inmunoglobulina humana que codifica las secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada (μ y γ) y cadena liviana κ humana no reacomodadas, junto con mutaciones focalizadas ("*targeted mutations*") que inactivan los loci de cadena μ y κ endógenos (Lonberg *et al.*, 1994, *Nature* 368:856-859). Por consiguiente, los ratones exhiben una expresión reducida de la IgM de ratón o κ y en respuesta a la inmunización, los transgenes introducidos de la cadena pesada y la cadena liviana humana experimentan un cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG κ humana de alta afinidad (Lonberg *et al.*, *supra.*; Lonberg and Huszar, 1995, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93; Harding and Lonberg, 1995, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). La preparación de ratones HuMab se describe en detalle en Taylor *et al.*, 1992, *Nucleic Acids Res.* 20:6287-6295; Chen *et al.*, 1993, *International Immunology* 5:647-656; Tuailon *et al.*, 1994, *J. Immunol.* 152:2912-2920; Lonberg *et al.*, 1994, *Nature* 368:856-859; Lonberg, 1994, *Handbook of Exp. Pharmacology* 113:49-101; Taylor *et al.*, 1994, *International Immunology* 6:579-591; Lonberg & Huszar, 1995, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93; Harding & Lonberg, 1995, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546; Fishwild *et al.*, 1996, *Nature Biotechnology* 14:845-851, cuyos contenidos se incorporan todos aquí por referencia en su integridad. Véase además las Patentes de los Estados Unidos No. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; y 5,770,429; todas a Lonberg and Kay, así como la Patente de los Estados Unidos No. 5,545,807 a Surani *et al.*; Solicitudes de Patente Internacional, Publicaciones No. WO 93/1227, publicada el 24 de junio de 1993; WO 92/22646, publicada el 23 de diciembre de 1992; y WO 92/03918, publicada el 19 de marzo de 1992, cuyas divulgaciones todas se incorporan aquí por referencia en su integridad. Alternativamente, las cepas de ratones transgénicos HCo7, HCo12, y KM descritas en los Ejemplos más adelante pueden usarse para generar anticuerpos

anti-NGF humanos.

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales humanos que son específicos para polipéptidos NGF humanos bioactivos y los neutralizan. Se proporcionan asimismo secuencias de aminoácidos de cadena pesada y liviana de anticuerpos que son altamente específicas para polipéptidos NGF y neutralizarlos, cuando se unen a ellos. Esta alta especificidad permite que los anticuerpos humanos anti-NGF humano, y anticuerpos monoclonales humanos con especificidad similar, sean una inmunoterapia efectiva para enfermedades asociadas con NGF.

En un aspecto, la invención provee anticuerpos humanos aislados que unen el mismo o esencialmente el mismo epítipo que el anticuerpo 4D4, provisto en esta especificación.

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos humanos aislados que comprenden por lo menos una de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NOS: 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, y 79-130 que une un epítipo de polipéptido NGF con alta afinidad y tiene la capacidad de antagonizar la actividad de polipéptido NGF. Preferiblemente, estos anticuerpos unen el mismo, o esencialmente el mismo, epítipo que el anticuerpo 4D4, provisto en esta especificación.

En modalidades preferidas, los anticuerpos humanos aislados se unen a un polipéptido NGF con una constante de disociación (K_D) de 1×10^{-9} M o menos e inhiben la supervivencia inducida por NGF en un análisis de neutralización *in vitro* con una IC_{50} de 1×10^{-7} M o menos. En modalidades más preferidas, los anticuerpos humanos aislados se unen a un polipéptido NGF con una constante de disociación (K_D) de 1×10^{-10} M o menos, e inhiben la supervivencia inducida por NGF en un análisis de neutralización *in vitro* con una IC_{50} de 1×10^{-8} M o menos. En una modalidad aún más preferida, los anticuerpos humanos anti-NGF aislados se unen a un polipéptido NGF humano con una constante de disociación (K_D) de 1×10^{-11} M o menos e inhiben la supervivencia inducida por NGF en un análisis *in vitro* con una IC_{50} de 1×10^{-9} M o menos. Ejemplos de anticuerpos humanos anti-NGF humano que satisfacen los criterios de unión y neutralización anteriormente mencionados se proveen en esta especificación.

El anticuerpo humano anti-NGF humano más preferido de la presente invención se designa en esta especificación como 4D4 y tiene secuencias polipeptídicas V_L y V_H como se muestra en SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 10, respectivamente. La secuencia polinucleotídica que codifica la V_L y V_H de 4D4 se muestra en SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 9, respectivamente. Las propiedades de los anticuerpos humanos anti-NGF humano de la presente invención se divulgan específicamente en los Ejemplos. Particularmente notable es la alta afinidad para el polipéptido NGF y la elevada capacidad de antagonizar la actividad de polipéptido NGF demostrada en esta especificación.

La constante de disociación (K_D) de un anticuerpo humano anti-NGF humano puede determinarse por resonancia de plasmón superficial como se describe generalmente en Ejemplo 9. Por lo general, el análisis de resonancia de plasmón superficial mide las interacciones de unión en tiempo real entre el ligando (polipéptido NGF recombinante inmovilizado en una matriz biosensora) y el analito (anticuerpos en solución) por resonancia de plasmón superficial (SPR - *surface plasmon resonance*) usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). El análisis de plasmón superficial puede llevarse a cabo igualmente inmovilizando el analito (anticuerpos en una matriz biosensora) y presentando el ligando (V recombinante en solución). La constante de disociación (K_D) de un anticuerpo humano anti-NGF humano puede determinarse además empleando la metodología KinExA. En ciertas modalidades de la invención, los anticuerpos se unen a NGF con una K_D de entre aproximadamente 10^{-8} M y 10^{-12} M. El término " K_D ", tal como se emplea en esta especificación, tiene como finalidad referirse a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Para propósitos de la presente invención, K_D se determinó como se muestra en Ejemplo 9.

En modalidades preferidas, los anticuerpos de la invención son del isotipo IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. Preferiblemente, los anticuerpos son del isotipo IgG3. Más preferiblemente, los anticuerpos son del isotipo IgG1. Muy preferiblemente, los anticuerpos son del isotipo IgG2. En otras modalidades, los anticuerpos de la invención son del isotipo IgM, IgA, IgE, o IgD. En modalidades preferidas de la invención, los anticuerpos incluyen una cadena liviana kappa humana y una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 humana. La expresión de anticuerpos de la invención que incluyen una región constante de cadena pesada de IgG1 o IgG2 se describe en los Ejemplos más adelante. En modalidades particulares, las

regiones variables de los anticuerpos se ligan a una región constante distinta de la región constante para el isotipo IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. En ciertas modalidades, los anticuerpos de la invención se han clonado para expresión en células de mamífero.

En ciertas modalidades, modificaciones conservadoras a las cadenas pesadas y a las cadenas livianas de anticuerpos anti-NGF (y modificaciones correspondientes a los nucleótidos codificantes) producirán anticuerpos anti-NGF que tienen características químicas y funcionales similares a las de los anticuerpos anti-NGF divulgados en esta especificación. En contraste, modificaciones sustanciales en las características químicas y/o funcionales de los anticuerpos anti-NGF pueden realizarse seleccionando sustituciones en la secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas y livianas que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del esqueleto molecular en el área de la sustitución, por ejemplo, como una hoja o conformación helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el grueso de la cadena lateral.

Por ejemplo, una "sustitución de aminoácidos conservadora" puede involucrar una sustitución de un residuo de aminoácido nativo con un residuo no nativo, de manera que haya poco o ningún efecto sobre la polaridad o carga del residuo de aminoácido en esa posición. Más aún, cualquier residuo nativo en el polipéptido puede sustituirse igualmente con alanina, como se ha descrito previamente para "mutagénesis de rastreo de alanina."

Sustituciones de aminoácidos deseadas (conservadoras o no conservadoras) pueden determinarse por los expertos en el arte en el momento en que se desean tales sustituciones. En ciertas modalidades, sustituciones de aminoácidos pueden usarse para identificar residuos importantes de un anticuerpo anti-NGF, o para aumentar o disminuir la afinidad de los anticuerpos anti-NGF descritos en esta especificación.

Como es bien conocido, cambios menores en una secuencia de aminoácidos tales como delección, adición o sustitución de uno, unos pocos o incluso varios aminoácidos puede llevar a una forma alélica de la proteína original que tiene propiedades sustancialmente idénticas. Por consiguiente, además de los anticuerpos específicamente descritos aquí, otros anticuerpos "sustancialmente homólogos" pueden diseñarse y fabricarse fácilmente utilizando varias técnicas de

103⁹
8X

ADN recombinante, bien conocidas por los expertos en el arte. En general, modificaciones de los genes pueden realizarse fácilmente por una variedad de técnicas bien conocidas, tales como mutagénesis de sitio dirigido. En consecuencia, la presente invención contempla anticuerpos humanos anti-NGF "variantes" o "mutantes", que tienen características sustancialmente similares a los anticuerpos humanos anti-NGF divulgados en esta especificación (Véase, por ejemplo, WO 00/56772, toda la cual se incorpora aquí por referencia). Por lo tanto, mediante el término "variante" o "mutante", en referencia a un anticuerpo humano anti-NGF, se da a entender cualquier molécula de unión (molécula X) (i) en la cual las regiones hipervariables CDR1, CDR2, y CDR3 de la cadena pesada o las regiones hipervariables CDR1, CDR2, y CDR3 de la cadena liviana, tomadas como un todo, son por lo menos 80% homólogas, preferiblemente por lo menos 90% homólogas, más preferiblemente por lo menos 95% homólogas a las regiones hipervariables como se muestra en SEQ ID NOS: 14, 18, y 22 o SEQ ID NOS: 16, 20, y 24, respectivamente, y (ii) en donde la variante o mutante es capaz de inhibir la actividad del NGF humano en la misma magnitud que un anticuerpo humano anti-NGF de referencia, que tiene regiones base idénticas a las de la molécula X.

Normalmente, una variante de un anticuerpo humano anti-NGF tendrá CDRs de cadena liviana y/o pesada, cuando se toman como un todo, que tienen por lo menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, preferiblemente por lo menos alrededor de 85% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 90% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 91% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 92% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 93% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 94% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 95% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 96% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 97% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 98% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NOS: 14, 18, y 22 y/o SEQ ID NOS: 16, 20, y 24, respectivamente.

Más preferiblemente, una variante de anticuerpo humano anti-NGF tendrá una región variable de cadena liviana, cuando se toma como un todo, que tiene por lo menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 81% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 82% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 83% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 84% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 85% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 86% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 87% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 88% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 89% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 90% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 91% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 92% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 93% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 94% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 95% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 96% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 97% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 98% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NOS: 12, 80, 82, 84, 86, 88, 89, 90, o 91 y/o una región variable de cadena pesada, cuando se toma como un todo, que tiene por lo menos alrededor de 70% de identidad de secuencia de aminoácidos, preferiblemente por lo menos alrededor de 75% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 80% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 81% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 82% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 83% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 84% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 85% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 86% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 87% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo

menos alrededor de 88% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 89% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 90% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 91% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 92% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 93% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 94% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 95% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 96% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 97% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 98% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NOS:10, 81, 83, 85, u 87.

Una "variante", en referencia a un polinucleótido, tiene como finalidad referirse a una molécula de ácido nucleico que posee por lo menos alrededor de 75% de identidad de secuencia de ácido nucleico con una secuencia polinucleotídica de la presente invención. De ordinario, una variante polinucleotídica tendrá por lo menos alrededor de 75% de identidad de secuencia de ácido nucleico, más preferiblemente por lo menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de ácido nucleico, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 81% de identidad de secuencia de ácido nucleico, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 82% de identidad de secuencia de ácido nucleico, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 83% de identidad de secuencia de ácido nucleico, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 84% de identidad de secuencia de ácido nucleico, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 85% de identidad de secuencia de ácido nucleico, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 86% de identidad de secuencia de ácido nucleico, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 87% de identidad de secuencia de ácido nucleico, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 88% de identidad de secuencia de ácido nucleico, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 89% de identidad de secuencia de ácido nucleico, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 90% de identidad de secuencia de ácido nucleico, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 91% de identidad de secuencia de ácido nucleico, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 92% de

identidad de secuencia de ácido nucleico, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 93% de identidad de secuencia de ácido nucleico, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 94% de identidad de secuencia de ácido nucleico, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 95% de identidad de secuencia de ácido nucleico, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 96% de identidad de secuencia de ácido nucleico, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 97% de identidad de secuencia de ácido nucleico, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 98% de identidad de secuencia de ácido nucleico, aún más preferiblemente por lo menos alrededor de 99% de identidad de secuencia de ácido nucleico con una novedosa secuencia de ácido nucleico divulgada en esta especificación.

En modalidades particulares, la invención provee anticuerpos que tienen un porcentaje de identidad con un anticuerpo de la invención, o un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada, una región variable de cadena liviana, una región CDR1, CDR2, o CDR3 que posee un porcentaje de identidad con una región variable de cadena pesada, una región variable de cadena liviana, una región CDR1, CDR2, o CDR3 de la invención, como se muestra en Ejemplo 10 en esta especificación y Figuras 5-10.

En ciertas modalidades, la invención provee un anticuerpo humano aislado, que específicamente une el factor de crecimiento nervioso y comprende una cadena pesada y una cadena liviana, en donde la cadena pesada incluye una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es: por lo menos 70% o 75% idéntica a la secuencia de aminoácidos, como se establece en SEQ ID NO: 10, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70%, 80%, 85%, o 95% homólogos con la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 81, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70%, 80%, 85%, o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 83, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 75%, 80%, u 85% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 85, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos, 70%, 75%, u 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 87, o un fragmento de unión de

antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 56% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 79, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.

En ciertas modalidades, la invención provee un anticuerpo humano aislado que específicamente une el factor de crecimiento nervioso y comprende una cadena pesada y una cadena liviana, en donde la cadena liviana incluye una región variable de cadena liviana que contiene una secuencia de aminoácidos que es: por lo menos 70%, 75%, 80%, o 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 12 o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70%, 85%, o 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 80, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70%, 74%, 90%, o 94% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 88, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70%, 80%, 85%, u 87% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 89, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70%, 85%, 90%, o 94% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 90, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70%, 85%, 90%, 95%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 91, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70%, 80%, 90%, 95%, o 96% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 82, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 84, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; o por lo menos 70%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 86, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.

En ciertas otras modalidades, la invención proporciona un anticuerpo humano aislado que específicamente une el factor de crecimiento nervioso y comprende una CDR1 de cadena pesada humana, en donde la CDR1 de cadena pesada es una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 40% o 60% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 110, o SEQ ID NO: 22, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.

En otras modalidades, la invención provee un anticuerpo humano aislado que une específicamente el factor de crecimiento nervioso y comprende una CDR2 de cadena pesada humana, en donde la CDR2 de cadena pesada es una secuencia de aminoácidos que es: por lo menos 70%, 82%, o 94% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 99, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70% o 76% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 106, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 59% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 18, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 117, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; o por lo menos 70%, 75% u 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 111, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.

En todavía otras modalidades, la invención provee un anticuerpo humano aislado que une específicamente el factor de crecimiento nervioso y comprende una CDR1 de cadena liviana humana, en donde la CDR1 es una secuencia de aminoácidos que es: por lo menos 70% u 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 101, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70%, 75%, 80% o 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 95, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del

mismo; por lo menos 75%, 80%, o 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 119, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 75%, 80%, o 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 122, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 125, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 75%, 80%, o 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 24, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70% u 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 107, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; o por lo menos 70% u 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 113, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.

En modalidades adicionales, la invención proporciona un anticuerpo humano aislado que une específicamente el factor de crecimiento nervioso y comprende una CDR2 de cadena liviana CDR2, en donde la CDR2 es una secuencia de aminoácidos que es: por lo menos 70% u 85% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 102, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 96, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 120, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 123, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70% u 85% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 126, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70% u 85% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 129, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina

inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 20, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70% u 85% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 108, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 133, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; o por lo menos 70% u 85% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 114, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.

En otras modalidades, la invención provee un anticuerpo humano aislado que une específicamente el factor de crecimiento nervioso y comprende una CDR3 de cadena liviana humana, en donde la CDR3 es una secuencia de aminoácidos que es: por lo menos 70% u 85% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 103, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70% u 85% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 97, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70% o 78% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 121, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70% o 78% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 127, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70% o 78% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 130, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70% o 78% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 16, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 70% u 85% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 109, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; por lo menos 78% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 134, o un fragmento de unión de

antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo; o por lo menos 85% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 115, o un fragmento de unión de antígeno o un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional del mismo.

Las secuencias de las regiones variables de cadena pesada y cadena liviana del anticuerpo 4D4 se muestran en SEQ ID NOS: 10 y 12, respectivamente. Sin embargo, muchos de los residuos de contacto-CDR potenciales son susceptibles de sustitución por otros aminoácidos y permiten todavía que el anticuerpo conserve afinidad sustancial para el antígeno. Análogamente, muchos de los residuos base ("*framework residues*") no en contacto con las CDRs en las cadenas pesadas y livianas pueden acomodar sustituciones de aminoácidos de las correspondientes posiciones de otros anticuerpos humanos, por aminoácidos de consenso humanos, o de otros anticuerpos de ratón, sin pérdida significativa de la afinidad o no inmunogenicidad del anticuerpo humano. La selección de varios aminoácidos alternativos puede usarse para producir versiones de los anticuerpos anti-NGF divulgados y fragmentos de los mismos, que tienen combinaciones variables de afinidad, especificidad, no inmunogenicidad, facilidad de fabricación, y otras propiedades deseables.

En modalidades alternativas, anticuerpos de la invención pueden expresarse en líneas de células distintas de líneas de células de hibridoma. En estas modalidades, secuencias que codifican anticuerpos particulares pueden usarse para la transformación de una célula hospedadora apropiada de mamífero. De acuerdo con estas modalidades, la transformación puede efectuarse usando cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula hospedadora, incluyendo, por ejemplo empacar el polinucleótido en un virus (o en un vector viral) y transducir una célula hospedadora con el virus (o vector), o mediante procedimientos de transfección conocidos en el arte, como se ejemplifica por las Patentes de los Estados Unidos No. 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461, y 4,959,455 (todas las cuales se incorporan aquí por referencia para cualquier propósito). Generalmente, el procedimiento de transformación utilizado puede depender del hospedador que se va a transformar. Métodos para introducir polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son bien conocidos en el arte e incluyen, pero no se limitan a, transfección mediada por dextrano, precipitación de fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos,

electroporación, encapsulación del polinucleótido(s) en liposomas, y microinyección directa del ADN en núcleos.

Una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada, una región variable de cadena pesada, una región constante de cadena liviana, o una región variable de cadena liviana de un anticuerpo NGF de la invención se inserta en un vector de expresión apropiado usando técnicas de ligación estándar. En una modalidad preferida, la región constante de cadena pesada o cadena liviana del anticuerpo anti-NGF se agrega al término C de la región variable apropiada y se liga en un vector de expresión. Típicamente el vector se selecciona para que sea funcional en la célula hospedadora particular empleada (*es decir*, el vector es compatible con la maquinaria de la célula hospedadora, de manera que pueda ocurrir la amplificación del gen y/o la expresión del gen). Para una revisión de vectores de expresión, véase METH. ENZ. 185 (Goeddel, ed.), 1990, Academic Press.

Típicamente, vectores de expresión usados en cualquiera de las células hospedadoras contendrán secuencias para mantenimiento del plásmido y para clonación y expresión de secuencias nucleotídicas exógenas. Tales secuencias, designadas colectivamente como "secuencias flanqueantes" en ciertas modalidades incluirán normalmente una o más de las siguientes secuencias nucleotídicas: un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación transcripcional, una secuencia intrón completa que contiene un sitio de empalme donador y aceptor, una secuencia que codifica una secuencia líder para secreción de polipéptidos, un sitio de unión ribosómica, una secuencia de poliadenilación, una región poli-conectora para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido que se va a expresar, y un elemento marcador seleccionable. Cada una de estas secuencias se discute más adelante.

Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia que codifica una "etiqueta", *es decir*, una molécula de oligonucleótido localizada en el extremo 5' o 3' de la secuencia codificante del polipéptido del anticuerpo anti-NGF; la secuencia oligonucleotídica codifica polyHis (tal como hexaHis), u otra "etiqueta" tal como FLAG, HA (hemaglutinina del virus de la gripe), o *myc* para la cual existen anticuerpos disponibles en el comercio. Esta etiqueta se fusiona típicamente al polipéptido luego de la expresión del polipéptido, y puede servir como un medio

para purificación por afinidad o detección del anticuerpo NGF de la célula hospedadora. La purificación por afinidad puede llevarse a cabo, por ejemplo, por cromatografía de columna usando anticuerpos contra la etiqueta como una matriz de afinidad. Opcionalmente, la etiqueta puede retirarse posteriormente de polipéptido del anticuerpo anti-NGF purificado por varios medios tales como usando ciertas peptidasas para escisión.

Las secuencias flanqueantes pueden ser homólogas (*es decir*, de la misma especie y/o cepa que la célula hospedadora), heterólogas (*es decir*, de una especie distinta de la especie o cepa de la célula hospedadora), híbridas (*es decir*, una combinación de secuencias flanqueantes de más de una fuente), sintéticas o nativas. Como tal, la fuente de una secuencia flanqueante puede ser cualquier organismo procariota o eucariota, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o cualquier planta, siempre y cuando la secuencia flanqueante sea funcional en la maquinaria de la célula hospedadora y pueda ser activada por ella.

Secuencias flanqueantes útiles en los vectores de esta invención pueden obtenerse por cualquiera de varios métodos bien conocidos en el arte. Típicamente, secuencias flanqueantes útiles en esta especificación se habrán identificado previamente mediante mapeo y/o mediante digestión con endonucleasas de restricción y, en consecuencia, pueden aislarse de la fuente de tejido apropiado usando las endonucleasas de restricción adecuadas. En algunos casos, la secuencia nucleotídica completa de una secuencia flanqueante puede ser conocida. Aquí, la secuencia flanqueante puede sintetizarse usando los métodos descritos en esta especificación para síntesis de ácidos nucleicos o clonación.

Si toda o sólo una porción de la secuencia flanqueante es conocida, puede obtenerse usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR - *polymerase chain reaction*) y/o detectando selectivamente una genoteca con una sonda apropiada tal como un oligonucleótido y/o fragmento de una secuencia flanqueante de la misma especie, o diferente. Donde la secuencia flanqueante no es conocida, un fragmento de ADN que contiene una secuencia flanqueante puede aislarse de un segmento más grande de ADN que pueda contener, por ejemplo, una secuencia codificante o incluso otro gen o genes. El aislamiento puede llevarse a cabo mediante digestión con endonucleasas de restricción para producir el fragmento de ADN apropiado, seguido por aislamiento usando purificación en gel de agarosa,

cromatografía de columna Qiagen® (Chatsworth, CA), u otros métodos conocidos por el artesano experto. La selección de enzimas apropiadas para realizar este propósito será fácilmente evidente a una persona de habilidad ordinaria en el arte.

Un origen de replicación es normalmente una parte de aquellos vectores de expresión procarióticos adquiridos en el comercio, y el origen ayuda en la amplificación del vector en una célula hospedadora. Si el vector de elección no contiene un origen de sitio de replicación, se puede sintetizar químicamente basándose en una secuencia conocida, y ligarse en el vector. Por ejemplo, el origen de replicación del plásmido pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) es apropiado para la mayoría de las bacterias gram-negativas, y varios orígenes virales (v.g., SV40, poliovirus, adenovirus, virus de la estomatitis (VSV - *vesicular stomatitis virus*), o papilomavirus tales como HPV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamífero. Generalmente, el componente del origen de replicación no se necesita para vectores de expresión de mamífero (por ejemplo, el origen SV40 se usa a menudo únicamente porque contiene también el promotor temprano del virus).

Una secuencia de terminación de transcripción se localiza típicamente 3' al extremo de una región codificante de un polipéptido y sirve para terminar la transcripción. Usualmente, una secuencia de terminación de transcripción en células procariotas es un fragmento rico en G-C, seguido por una secuencia poly-T. Aunque la secuencia se clona fácilmente de una biblioteca o incluso se adquiere en el comercio como parte de un vector, puede también sintetizarse fácilmente usando métodos para síntesis de ácido nucleico tales como los descritos en esta especificación.

Un gen marcador seleccionable codifica una proteína necesaria para la supervivencia y el crecimiento de una célula hospedadora cultivada en un medio de cultivo selectivo. Genes marcadores de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, v.g., ampicilina, tetraciclina, o kanamicina para células hospedadoras procariotas; (b) complementan deficiencias auxotróficas de la célula; o (c) aportan nutrientes críticos no disponibles del complejo o medio definido. Marcadores seleccionables preferidos son el gen de la resistencia a la kanamicina, el gen de la resistencia a la ampicilina, y el gen de la resistencia a la tetraciclina. Ventajosamente, un gen de la resistencia a la neomicina puede usarse además para selección en células

hospedadoras tanto procariotas como eucariotas.

Otros genes seleccionables pueden usarse para amplificar el gen que se expresará. La amplificación es el proceso en el que los genes que se requieren para producción de una proteína crítica para el crecimiento o supervivencia de la célula se reiteran en tándem dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Ejemplos de marcadores seleccionables apropiados para células de mamífero incluyen dihidrofolato reductasa (DHFR) y genes de timidina cinasa sin promotores. Transformantes de células de mamífero se ponen bajo presión de selección en donde únicamente los transformantes se adaptan exclusivamente para sobrevivir en virtud del gen seleccionable presente en el vector. Presión de selección se impone cultivando las células transformadas bajo condiciones en las cuales la concentración del agente de selección en el medio se incrementa sucesivamente, llevando en esa forma a la amplificación tanto del gen seleccionable como el ADN que codifica otro gen, tal como un anticuerpo que se une al polipéptido NGF. Como resultado, se sintetizan del ADN amplificado cantidades crecientes de un polipéptido tal como un anticuerpo anti-NGF.

Usualmente un sitio de unión ribosómica es necesario para la iniciación de la traducción de ARNm y se caracteriza por una secuencia de Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia de Kozak (eucariotas). El elemento se localiza normalmente 3' al promotor y 5' a la secuencia codificante del polipéptido que se va a expresar.

En algunos casos, tales como donde se desea glicosilación en un sistema de expresión de células hospedadoras eucariotas, se pueden manipular las diferentes pre- o pro-secuencias para mejorar la glicosilación o el rendimiento. Por ejemplo, se puede alterar el sitio de escisión de la peptidasa de un péptido señal particular, o agregar pro-secuencias, las cuales pueden afectar igualmente la glicosilación. El producto proteico final puede tener, en la posición -1 (relativa al primer aminoácido de la proteína madura) uno o más aminoácidos adicionales incidentes a la expresión, que pueden no haberse removido totalmente. Por ejemplo, el producto proteico final puede tener uno o dos residuos de aminoácidos encontrados en el sitio de escisión con peptidasa, unidos al término amino. Alternativamente, el uso de algunos sitios de escisión con enzimas puede resultar

en una forma ligeramente truncada del polipéptido deseado, si la enzima corta en tal área dentro del polipéptido maduro.

Vectores de expresión y clonación de la invención contendrán por lo general un promotor que es reconocido por el organismo hospedador y se conecta operacionalmente a la molécula que codifica el anticuerpo anti-NGF. Los promotores son secuencias no transcritas, localizadas corriente arriba (*es decir*, 5') del codón de iniciación de un gen estructural (generalmente dentro de alrededor de 100 a 1000 bp), que controlan la transcripción del gen estructural. Los promotores se agrupan convencionalmente en una de las dos clases: promotores inducibles y promotores constitutivos. Los promotores inducibles inician niveles crecientes de transcripción de ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, tales como la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. Los promotores constitutivos, por el otro lado, transcriben uniformemente genes a los cuales están operacionalmente conectados, es decir, con poco o ningún control sobre la expresión del gen. Un gran número de promotores, reconocidos por una variedad de células hospedadoras potenciales, son bien conocidos. Un promotor apropiado está operacionamente conectado al ADN que codifica la cadena pesada o la cadena liviana que componen un anticuerpo anti-NGF de la invención eliminando el promotor del ADN fuente por digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia promotora deseada en el vector.

Promotores apropiados para uso con hospedadores de levadura son igualmente bien conocidos en el arte. Potenciadores de levadura se usan ventajosamente con promotores de levadura. Promotores apropiados para uso con células hospedadoras de mamífero son bien conocidos e incluyen, pero no se limitan a, los obtenidos de los genomas de virus tal como poliomavirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, retrovirus, virus de la hepatitis B y, muy preferiblemente, virus del simio 40 (SV40 - *Simian Virus 40*). Otros promotores de mamífero apropiados incluyen promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, promotores de choque térmico y su promotor de actina.

Promotores adicionales que pueden ser de interés incluyen, pero no se limitan a: promotor temprano del SV40 (Bernoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-10); promotor del CMV (Thomsen *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. USA*

81:659-663); el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto, *et al.*, 1980, *Cell* 22:787-97); el promotor de la timidina cinasa del herpes (Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-45); secuencias promotoras y reguladoras del gen de la metalotionina (Brinster *et al.*, 1982, *Nature* 296:39-42); y promotores procariotas tales como el promotor de la beta-lactamasa (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 75:3727-31); o el promotor tac (DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 80:21-25). También de interés son las siguientes regiones de control transcripcional animal, las cuales exhiben especificidad tisular y se han utilizado en animales transgénicos: la región de control del gen de la elastasa I que es activa en células acinares pancreáticas (Swift *et al.*, 1984, *Cell* 38:639-46; Ornitz *et al.*, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol* 50:399-409 (1986); MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); la región de control del gen de la insulina que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-22); la región de control del gen de la inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl *et al.*, 1984, *Cell* 38:647-58; Adames *et al.*, 1985, *Nature* 318:533-38; Alexander *et al.*, 1987, *Mol Cell. Biol*, 7:1436-44); la región de control del virus de tumor mamario de ratón que es activa en células testiculares, de la mama, linfoides y mastocitos (Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45:485-95); la región de control del gen de la albúmina que es activa en el hígado (Pinkert *et al.*, 1987, *Genes and Devel* 1:268-76); la región de control del gen de la alfa-feto-proteína que es activa en el hígado (Krumlauf *et al.*, 1985, *Mol. Cell. Biol*, 5:1639-48; Hammer *et al.*, 1987, *Science* 235:53-58); la región de control del gen de la alfa 1-antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey *et al.*, 1987, *Genes and Devel*. 1:161-71); la región de control del gen de la beta-globina que es activa en células mieloides (Mogam *et al.*, 1985, *Nature* 315:338-40; Kollias *et al.*, 1986, *Cell* 46:89-94); la región de control del gen de la proteína básica mielina que es activa en células oligodendrocíticas en el cerebro (Readhead *et al.*, 1987, *Cell* 48:703-12); la región de control del gen de la cadena liviana 2 de la miosina que es activa en el músculo esquelético (Sani, 1985, *Nature* 314:283-86); y la región de control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica que es activa en el hipotálamo (Mason *et al.*, 1986, *Science* 234:1372-78).

Una secuencia potenciadora puede insertarse en el vector para incrementar la transcripción de ADN que codifica la cadena liviana o la cadena pesada que componen un anticuerpo anti-NGF de la invención por eucariotas superiores. Los potenciadores son elementos cis-actantes de ADN, usualmente de alrededor de

110
108

10-300 bp de longitud, que actúan sobre el promotor para aumentar la transcripción. Los potenciadores son relativamente independientes de la orientación y la posición, habiéndose encontrado en posiciones tanto 5' como 3' a la unidad de transcripción. Se conocen varias secuencias potenciadoras disponibles de genes de mamífero (v.g., globina, elastasa, albúmina, alfa-feto-proteína e insulina). Típicamente, sin embargo, se usa un potenciador de un virus. El potenciador de SV40, el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del poliovirus, y los potenciadores de adenovirus conocidos en el arte son elementos potenciadores ejemplares para la activación de promotores eucariotas. Aunque un potenciador puede posicionarse en el vector 5' o 3' a una secuencia codificante, se localiza típicamente en un sitio 5' desde el promotor.

Vectores de expresión de la invención pueden construirse de un vector de partida tal como un vector disponible en el comercio. Tales vectores pueden contener o no la totalidad de las secuencias flanqueantes deseadas. Donde una o más de las secuencias flanqueantes, descritas en esta especificación, no están ya presentes en el vector, pueden obtenerse individualmente y ligarse en el vector. Métodos usados para obtener cada una de las secuencias flanqueantes son bien conocidos por un experto en el arte.

Luego de que el vector se ha construido y una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena liviana, una cadena pesada, o una cadena liviana y una cadena pesada que componen un anticuerpo anti-NGF se han insertado en el sitio adecuado del vector, el vector completado puede insertarse en una célula hospedadora apropiada para amplificación y/o expresión del polipéptido. La transformación de un vector de expresión para un anticuerpo anti-NGF en una célula hospedadora seleccionada puede llevarse a cabo por métodos bien conocidos, incluyendo transfección, infección, co-precipitación de fosfato de calcio, electroporación, microinyección, lipofección, transfección mediada por DEAE-dextrano, u otras técnicas conocidas. El método seleccionado será en parte una función del tipo de célula hospedadora que se va a usar. Estos métodos y otros métodos apropiados son bien conocidos por el artesano experto, y se exponen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, *supra*.

Una célula hospedadora, cuando se cultiva bajo condiciones apropiadas, sintetiza un anticuerpo anti-NGF el cual puede recolectarse posteriormente del

medio de cultivo (si la célula hospedadora lo secreta en el medio) o directamente de la célula hospedadora que lo produce (si no se secreta). La selección de una célula hospedadora apropiada dependerá de varios factores, tales como niveles de expresión deseados, modificaciones de polipéptidos que son deseables o necesarios para actividad (tal como glicosilación o fosforilación) y facilidad de plegarse en una molécula biológicamente activa.

Líneas celulares de mamífero disponibles como hospedadoras para expresión son bien conocidas en el arte e incluyen, pero no se limitan a, líneas de células inmortalizadas disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC), incluyendo, pero no limitadas a, células de ovario de hámster chino (CHO - *chinese hamster ovary*), células HeLa, células renales de hámster recién nacido (BHK - *baby hamster kidney*), células renales de mono (COS - *monkey kidney cells*), células de carcinoma hepatocelular humano (v.g., Hep G2), y un número de otras estirpes celulares. En ciertas modalidades, pueden seleccionarse determinando cuáles células tienen altos niveles de expresión y producen constitutivamente anticuerpos con propiedades de unión de NGF. En otra modalidad, puede seleccionarse una línea celular del linaje de los linfocitos B, que no elabora su propio anticuerpo, pero tiene una capacidad de elaborar y secretar un anticuerpo heterólogo.

Anticuerpos de la invención son útiles para detectar NGF en muestras biológicas e identificación de células o tejidos que producen proteína NGF. Anticuerpos de la invención que específicamente se unen a NGF pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades mediadas por NGF. Los citados anticuerpos pueden usarse en análisis de unión para detectar NGF y para inhibir NGF de formar un complejo con receptores NGF. Los citados anticuerpos, que se unen a NGF y bloquean la interacción con otros compuestos de unión, pueden tener uso terapéutico en modular enfermedades mediadas por NGF. En modalidades preferidas, anticuerpos contra NGF pueden bloquear la unión de NGF a su receptor, lo cual puede resultar en la alteración de la cascada de transducción de señales inducida por NGF.

La presente invención se refiere asimismo al uso de uno o más de los anticuerpos de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno doloroso o afección, causados por la expresión incrementada de NGF o sensibilidad creciente a NGF en un paciente, tal como

uno cualquiera de los trastornos o enfermedades divulgados en esta especificación.

En modalidades preferidas, la invención provee composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o una pluralidad de los anticuerpos de la invención junto con un diluyente, portador, solubilizante, emulsionante, preservante y/o coadyuvante farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente, materiales de formulación aceptables son no tóxicos a los destinatarios en las dosificaciones y concentraciones empleadas. En modalidades preferidas, se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad terapéuticamente efectiva de anticuerpos anti-NGF.

En ciertas modalidades, materiales de formulación aceptables son preferiblemente no tóxicos a los destinatarios en las dosificaciones y concentraciones empleadas.

En ciertas modalidades, la composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o preservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la claridad, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o la liberación, la adsorción o la penetración de la composición. En tales modalidades, materiales de formulación apropiados incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o sulfito hidrogenado de sodio); amortiguadores de pH (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos); agentes formadores de masa (tales como manitol o glicina); agentes quelantes (tales como ácido etilendiamina tetraacético (EDTA)); agentes acomplejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); rellenos; monosacáridos; disacáridos; y otros carbohidratos (tales como glucosa, mannososa o dextrinas); proteínas (tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes, saborizantes y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; iones contrarios formadores de sales (tales como sodio); preservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilen glicol o polietilen glicol);

alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (tales como pluronics, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbato tales como polisorbato 20, polysorbato 80, tritón, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes potenciadores de estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como halogenuros de metal alcalino, preferiblemente cloruro de sodio o potasio, manitol, sorbitol); vehículos de administración; diluyentes; excipientes y/o coadyuvantes farmacéuticos. Véase REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A.R. Gennaro, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

En ciertas modalidades, la composición farmacéutica óptima se determinará por un experto en el arte dependiendo de, por ejemplo, la vía prevista de administración, el formato de administración y la dosificación deseada. Véase, *por ejemplo*, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, *supra*. En ciertas modalidades, tales composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de depuración *in vivo* de los anticuerpos de la invención.

En ciertas modalidades, el vehículo primario o portador en una composición farmacéutica puede ser acuoso o no acuoso por naturaleza. Por ejemplo, un vehículo o portador apropiado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o fluido cerebroespinal artificial, posiblemente suplementado con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral. Solución salina amortiguada neutra o solución salina mezclada con albúmina sérica son además vehículos ejemplares. En modalidades preferidas, composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen un amortiguador Tris de alrededor de pH 7.0-8.5, o un amortiguador acetato de alrededor de pH 4.0-5.5, y pueden incluir además sorbitol, sacarosa, Tween-20 y/o un sustituto apropiado. En ciertas modalidades de la invención, composiciones de anticuerpos anti-NGF pueden prepararse para almacenamiento mezclando la composición seleccionada, que tiene el grado deseado de pureza, con agentes de formulación opcionales (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, *supra*) en la forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Además, en ciertas modalidades, el producto de anticuerpo anti-NGF puede formularse como un liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden seleccionarse para administración parenteral. Alternativamente, las composiciones pueden seleccionarse para inhalación o para administración a través del tracto digestivo, tal como oralmente. La preparación de tales composiciones farmacéuticamente aceptables se encuentra dentro de las habilidades del arte.

Los componentes de la formulación están presentes preferiblemente en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. En ciertas modalidades, se usan amortiguadores para mantener la composición con un pH fisiológico o con un pH ligeramente menor, típicamente dentro de un rango de pH de desde alrededor de 5 a alrededor de 8.

Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para uso en esta invención pueden proveerse en la forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, libre de pirógenos, que contiene el anticuerpo anti-NGF deseado en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente apropiado para inyección parenteral es agua destilada, esterilizada, en la cual el anticuerpo anti-NGF se formula como una solución isotónica estéril, apropiadamente preservada. En ciertas modalidades, la preparación puede involucrar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bio-erosionables, compuestos poliméricos (tales como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), microperlas o liposomas, que pueden proporcionar liberación controlada o sostenida del producto que puede administrarse *vía* inyección de liberación lenta. En ciertas modalidades, puede usarse igualmente ácido hialurónico, que tenga el efecto de promover duración sostenida en la circulación. En ciertas modalidades, dispositivos de administración de medicamento implantables pueden usarse para introducir la molécula de anticuerpo deseada.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para inhalación. En estas modalidades, anticuerpos anti-NGF se formulan ventajosamente como un polvo seco inhalable. En modalidades preferidas, soluciones de inhalación de anticuerpos anti-NGF pueden formularse igualmente con un gas propulsor para administración de aerosol. En ciertas modalidades, las soluciones pueden nebulizarse. La administración pulmonar y métodos de formulación se describen igualmente en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US94/001875, la cual se incorpora por referencia y describe la administración

pulmonar de proteínas químicamente modificadas.

Se contempla asimismo que las formulaciones puedan administrarse oralmente. Anticuerpos anti-NGF que se administran de esta manera pueden formularse con o sin portadores usados habitualmente en la composición de presentaciones farmacéuticas sólidas tales como comprimidos y cápsulas. En ciertas modalidades, puede diseñarse una cápsula para liberar la porción activa de la formulación en el punto en el tubo digestivo cuando la biodisponibilidad se maximiza y se minimiza la degradación pre-sistémica. Pueden incluirse agentes adicionales para facilitar la absorción del anticuerpo anti-NGF. Pueden emplearse igualmente diluyentes, saborizantes, ceras con bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes desagregantes de comprimidos, y aglomerantes.

Una composición farmacéutica de la invención se provee preferiblemente para incluir una cantidad efectiva de uno o una pluralidad de anticuerpos anti-NGF en una mezcla con excipientes no tóxicos, que son apropiados para la fabricación de comprimidos. Disolviendo los comprimidos en agua esterilizada, u otro vehículo apropiado, pueden prepararse soluciones en forma de dosis unitaria. Excipientes apropiados incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato o bicarbonato de sodio, lactosa, o fosfato de calcio; o agentes aglomerantes, tales como almidón, gelatina, o acacia; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, o talco.

Composiciones farmacéuticas adicionales serán evidentes a los expertos en el arte, incluyendo formulaciones que incorporan anticuerpos anti-NGF en formulaciones de administración sostenida o controlada. Técnicas para formular una variedad de otros medios de administración sostenida o controlada, tales como portadores liposómicos, micropartículas bio-erosionables o microperlas e inyecciones de liberación lenta, son también conocidas por los expertos en el arte. Véase, *por ejemplo*, Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US93/00829, la cual se incorpora por referencia y describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para administración de composiciones farmacéuticas. Preparaciones de liberación sostenida pueden incluir matrices poliméricas semipermeables en la forma de artículos moldeados, v.g. películas, o microcápsulas. Matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, poliláctidos (como se divulga en la Patente de los Estados Unidos No.

3,773,919 y la Solicitud de Patente Europea, Publicación No. EP 058481, cada una de las cuales se incorpora por referencia), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, 1983, *Biopolymers* 22:547-556), poli-(2-hidroxietil-metacrilato) (Langer *et al.*, 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 and Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), etilenvinil acetato (Langer *et al.*, *supra*) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (Solicitud de Patente Europea, Publicación No. EP 133,988). Composiciones de liberación sostenida pueden incluir asimismo liposomas, los cuales pueden prepararse por cualquiera de varios métodos conocidos en el arte. Véase *v.g.*, Eppstein *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688-3692; Solicitudes de Patente Europea, Publicaciones No. EP 036,676; EP 088,046 y EP 143,949, incorporadas por referencia.

Composiciones farmacéuticas usadas para administración *in vivo* se proveen típicamente como preparaciones estériles. La esterilización puede llevarse a cabo por filtración a través de membranas de filtración. Cuando la composición es liofilizada, la esterilización utilizando este método puede conducirse antes o después de la liofilización y la reconstitución. Composiciones para administración parenteral pueden almacenarse en forma liofilizada o en una solución. Generalmente las composiciones parenterales se ponen en un envase que tenga un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o frasco que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Una vez la composición farmacéutica se ha formulado, esta puede almacenarse en frascos estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido, o como un polvo deshidratado o liofilizado. Tales formulaciones pueden almacenarse en forma lista para usar o en una forma (*v.g.*, liofilizada) que se reconstituye antes de la administración.

La invención provee igualmente kits para producir una unidad de administración de dosis única. Los kits de la invención pueden contener cada uno un primer envase que contiene una proteína seca y un segundo envase que contiene una formulación acuosa. En ciertas modalidades de esta invención, se proveen kits que contienen jeringas precargadas de cámara única y cámaras múltiples (*v.g.*, jeringas con líquido y liojeringas).

La cantidad efectiva de una composición farmacéutica, que contiene el anticuerpo anti-NGF que se va a emplear terapéuticamente, depende, por ejemplo, del contexto y los objetivos terapéuticos. Un experto en el arte observará que los niveles de dosificación apropiados para tratamiento variarán dependiendo, en parte, de la molécula administrada, la indicación para la cual se está usando el anticuerpo anti-NGF, la vía de administración, y la talla (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y/o el estado del paciente (la edad y salud general) del paciente. En ciertas modalidades, el especialista clínico puede determinar la dosificación y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación típica puede variar desde alrededor de 0.1 µg/kg a hasta alrededor de 30 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En modalidades preferidas, la dosificación puede variar desde 0.1 µg/kg hasta alrededor de 30 mg/kg; más preferiblemente desde 1 µg/kg hasta alrededor de 30 mg/kg; o, aún más preferiblemente, desde 5 µg/kg hasta alrededor de 30 mg/kg.

En ciertas modalidades, las composiciones pueden administrarse por inyección subcutánea. Como se anotó más arriba, la cantidad de dosificación puede determinarse por un especialista clínico; no obstante, en ciertas modalidades, la cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo NGF en la composición que se va a administrar por inyección subcutánea es desde alrededor de 0.1 µg/kg hasta alrededor de 30 mg/kg. En ciertas modalidades, la cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo NGF es desde alrededor de 3 mg a alrededor de 30 mg por inyección subcutánea. En ciertas modalidades la administración incluye múltiples inyecciones subcutáneas. En todavía otras modalidades, la administración comprende una única inyección subcutánea.

La frecuencia de la dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos del anticuerpo anti-NGF particular en la formulación usada. Normalmente, un especialista clínico administra la composición hasta alcanzar una dosificación que consiga el efecto deseado. Por lo tanto, la composición puede administrarse como una dosis única, o como dos o más dosis (las cuales pueden contener o no la misma cantidad de la molécula deseada) en el transcurso del tiempo, o como una infusión continua mediante un dispositivo de implantación o catéter. Un refinamiento adicional de la dosificación apropiada se hace rutinariamente por los expertos en el arte y está dentro del ámbito de tareas realizadas por ellos. Dosificaciones apropiadas pueden constatarse por el uso de

datos apropiados de respuesta a la dosis. En ciertas modalidades, los anticuerpos de la invención pueden administrarse a pacientes a lo largo de un período de tiempo extendido. La administración crónica de un anticuerpo de la invención minimiza la respuesta inmunitaria o alérgica adversa, comúnmente asociada con anticuerpos que se desarrollan contra un antígeno humano en un animal no humano, por ejemplo, un anticuerpo no completamente humano producido en una especie no humana.

La vía de administración de la composición farmacéutica está de acuerdo con métodos conocidos, v.g. oralmente, mediante inyección por vías intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intra-parenquimatosas), intracerebroventricular, intramuscular, intra-ocular, intraarterial, intraportal, o intralesional; mediante sistemas de liberación sostenida o mediante dispositivos de implantación. En ciertas modalidades, las composiciones pueden administrarse mediante inyección intravenosa rápida o continuamente mediante infusión, o mediante un dispositivo de implantación.

De igual manera, la composición puede administrarse localmente mediante implantación de una membrana, esponja u otro material apropiado, en el cual se ha absorbido o encapsulado la molécula deseada. En ciertas modalidades, donde se usa un dispositivo de implantación, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano apropiado, y la administración de la molécula deseada puede ser *mediante* difusión, inyección intravenosa rápida de liberación cronometrada, o administración continua.

En ciertas modalidades, la invención se refiere a un método de tratar una afección causada por una expresión incrementada del factor de crecimiento nervioso (NGF) o sensibilidad creciente a NGF, método que incluye administrar a un paciente oralmente, mediante inyección por vías intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intra-parenquimatosas), intracerebroventricular, intramuscular, intra-ocular, intraarterial, intraportal, intralesional o subcutánea, mediante sistemas de liberación sostenida o mediante dispositivos de implantación, una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo NGF, en donde la afección es dolor agudo, dolor dental, dolor proveniente de trauma, dolor quirúrgico, dolor resultante de amputación o absceso, causalgia, enfermedades desmielinizantes, neuralgia del trigémino, cáncer, alcoholismo crónico, infarto, síndrome de dolor del tálamo, diabetes, síndrome de inmunodeficiencia adquirida ("SIDA"), toxinas,

quimioterapia, cefalea general, migraña, cefalea en racimos, síndromes vasculares-mixtos y no vasculares, cefalea por tensión, inflamación general, artritis, enfermedades reumáticas, lupus, osteoartritis, fibromialgia, trastornos inflamatorios del colon y el recto, síndrome del intestino irritable, trastornos oculares inflamatorios, trastornos inflamatorios o trastornos de la vejiga inestable, psoriasis, dolencias de la piel con componentes inflamatorios, eritema solar, carditis, dermatitis, miositis, neuritis, collagenopatías vasculares, afecciones inflamatorias crónicas, dolor inflamatorio e hiperalgesia asociada y alodinia, dolor neuropático e hiperalgesia asociada o alodinia, dolor neuropático diabético, causalgia, distrofia simpática refleja, síndromes de desaferenciación, asma, daño tisular epitelial o disfunción, herpes simple, alteraciones de la motilidad visceral en regiones respiratorias, genitourinarias, gastrointestinales o vasculares, heridas, quemaduras, reacciones cutáneas alérgicas, pruritis, vitiligo, trastornos gastrointestinales generales, colitis, ulceración gástrica, úlceras duodenales, rinitis vasomotora o alérgica, o trastornos bronquiales, dismenorrea, dispepsia, reflujo gastroesofágico, pancreatitis, o visceralgia.

En ciertas modalidades, los métodos incluyen una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo NGF y son útiles para tratar o prevenir dolor de rodilla por osteoartritis. En ciertas modalidades la cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo NGF es desde alrededor de 3 mg a alrededor de 30 mg por inyección subcutánea. En ciertas modalidades la administración incluye múltiples inyecciones subcutáneas. En modalidades, la administración incluye una inyección subcutánea única. En ciertas modalidades, las composiciones y métodos de la invención contienen un anticuerpo NGF que comprende una cadena liviana que incluye SEQ ID NO. 44. En ciertas modalidades, el anticuerpo NGF comprende una cadena pesada que incluye SEQ ID. NO. 40. En modalidades adicionales, el anticuerpo NGF comprende una cadena liviana que incluye SEQ ID NO. 44, y una cadena pesada que incluye SEQ ID. NO. 40.

Por consiguiente, de acuerdo con la anterior descripción de la invención, en varios aspectos la invención se refiere a métodos y composiciones que contienen un anticuerpo NGF que comprende una cadena ligera que incluye SEQ ID NO: 44 y una cadena pesada que incluye SEQ ID NO: 40, en donde la cadena pesada y la cadena liviana del anticuerpo están conectadas por un conector flexible para formar un anticuerpo de cadena única. En algunas modalidades de este aspecto,

el anticuerpo NGF comprende un anticuerpo Fv de cadena única, un anticuerpo Fab', un anticuerpo (Fab')₂, un anticuerpo completamente humano, y/o un anticuerpo humanizado. En algunas modalidades de este aspecto el anticuerpo NGF inhibe la señalización de NGF.

En ciertas modalidades de este aspecto, el anticuerpo NGF se disocia de un polipéptido NGF humano con una K_D de alrededor de 1×10^{-9} o menos, alrededor de 1×10^{-10} o menos, o alrededor de 1×10^{-11} o menos. En ciertas modalidades de este aspecto, el anticuerpo NGF neutraliza la bioactividad del NGF humano en un análisis *in vitro* estándar con una IC_{50} de alrededor de 1×10^{-8} o menos, alrededor de 1×10^{-9} o menos, o alrededor de 0.2×10^{-9} o menos. En ciertas modalidades, el anticuerpo NGF se disocia de un polipéptido NGF humano con el (los) valor(es) K_D ya mencionado(s) y neutraliza la bioactividad del NGF humano en un análisis *in vitro* estándar con los valores IC_{50} indicados anteriormente.

Puede ser asimismo deseable usar composiciones farmacéuticas de anticuerpos anti-NGF de acuerdo con la invención *ex vivo*. En tales instancias, células, tejidos u órganos que se han extraído del paciente se exponen a composiciones farmacéuticas de anticuerpos anti-NGF, luego de lo cual las células, tejidos y/u órganos se reimplantan posteriormente al paciente.

En particular, anticuerpos anti-NGF pueden administrarse implantando ciertas células, que se han genomanipulado, usando métodos tales como los descritos en esta especificación, para expresar y secretar el polipéptido. En ciertas modalidades, tales células pueden ser células humanas o animales, y pueden ser autólogas, heterólogas, o xenogeneicas. En ciertas modalidades, las células pueden inmortalizarse. En otras modalidades, con el fin de disminuir la posibilidad de una respuesta inmunológica, las células pueden encapsularse para evitar la infiltración de tejidos circundantes. En modalidades adicionales, los materiales de encapsulación son generalmente envolturas o membranas poliméricas biocompatibles, semi-permeables que permiten la liberación del (de los) producto(s) proteico(s) pero impiden la destrucción de las células por el sistema inmunitario del paciente o por otros factores perjudiciales de los tejidos circundantes.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos conducidos y los resultados obtenidos se proveen para propósitos ilustrativos únicamente y no tienen que interpretarse como limitantes de la invención.

Ejemplo 1

Generación de proteína NGF humana de células de *E. coli*

Clonación de rHu-NGF (1-120)

La secuencia nucleotídica que codifica el NGF humano se amplificó de ADNc usando los cebadores oligonucleotídicos con las secuencias mostradas en SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:28 y la tecnología PCR estándar. El cebador 5' crea un sitio de restricción *NdeI* y un codón de iniciación de metionina que precede inmediatamente el codón 1 (serina) de la secuencia madura. El cebador 3' crea un sitio de restricción *BamHI* que sigue inmediatamente al codón de terminación. El producto PCR resultante se purificó en gel, se digirió con endonucleasas de restricción *NdeI* y *BamHI*, y luego se ligó en el vector pCFM1656, digerido igualmente con *NdeI* y *BamHI*. El ADN ligado se transformó en células hospedadoras competentes de la cepa 657 de *E. coli*. Los clones se detectaron selectivamente con respecto a la capacidad de producir el producto de proteína recombinante y poseer un plásmido que tiene la secuencia nucleotídica correcta (es decir, SEQ ID NO:29). La secuencia de aminoácidos del NGF 1-120 humano recombinante se muestra como SEQ ID NO:30:

El vector de expresión pCFM1656 (ATCC #69576) se derivó del sistema de vector de expresión descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 4,710,473. El plásmido pCFM1656 puede derivarse del plásmido pCFM836 descrito (Patente No. 4,710,473): (a) destruyendo los dos sitios de restricción *NdeI* endógenos mediante rellenado final ("*end filling*") con la enzima polimerasa T4, seguida por ligamiento de extremos romos; (b) reemplazando la secuencia de ADN entre los sitios de restricción *AatII* y *Clal* únicos, que contienen el promotor P_L sintético, con un fragmento similar obtenido de pCFM636 (Patente No. 4,710,473) que contiene el promotor P_L y luego (c) sustituyendo la pequeña secuencia de ADN entre los sitios de restricción *Clal* y *KpnI* únicos con el oligonucleótido resultante de hibridar

dos sondas que tienen las secuencias nucleotídicas mostradas en SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO:32.

La cepa hospedadora K12 de *E. coli* (cepa 657 Amgen) es un derivado de W1485 de *E. coli* (una cepa K12), obtenida del *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University, New Haven, CT (cepa 6159 CGSC).

Expresión de rHu-NGF(1-120)

Células de *E. coli* que contenían el constructo de expresión NGF (como se describe anteriormente) se fermentaron en medio enriquecido en modo lote alimentado ("*fed-batch mode*"). Las células se cultivaron a 30°C a una densidad óptica (OD) a 600 nm de 49, y luego se indujeron por cambio de temperatura a 42°C. Las células se cosecharon mediante centrifugación en cuatro horas pos-inducción. La OD final fue 75. Se determinó que el rendimiento de expresión era aproximadamente 0.15 g/L.

Replegamiento y purificación de rHu-NGF(1-120)

Pasta de células se desintegró por medio de lisinas en un Microfluidizer, se centrifugó a 10,000 X g durante 30 minutos, el sedimento celular se lavó con ácido deoxicólico al 1%, se centrifugó como se indicó anteriormente, y el sedimento celular resultante se lavó entonces con agua fría y se centrifugó nuevamente. El sedimento celular resultante (WIBs – cuerpos de inclusion lavados - *washed inclusion bodies*) se resuspendió en desnaturalizante, 8M de HCl de guanidina, 50mM Tris pH 8.5, que contenía 10mM DTT, y se solubilizó a temperatura ambiente por 1 hora, se centrifugó a 10.000 x g durante 30 minutos, y el sobrenadante se decantó cuidadosamente y luego se diluyó 25 veces en un amortiguador de pH acuoso que contenía un agente oxidante y reductor ("*a redox couple*") a 4°C, durante 5 días. El repliegue resultante se valoró volumétricamente a pH 3.0, se filtró a través de un filtro de 0.45uM. El repliegue se purificó usando una columna de flujo rápido de Sp-Sepharose empleando un gradiente NaCl estándar. El pool de la columna de intercambio catiónico se concentró posteriormente y alícuotas se congelaron a -80°C. Se evaluó la pureza de la proteína por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) y se analizó por colorante de azul Coomassie. La proteína purificada fue mayor que 90% en la calle principal mediante este método.

Ejemplo 2

Producción de Anticuerpos Monoclonales Humanos contra el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF)

Ratones HuMab y KM Transgénicos

Anticuerpos monoclonales completamente humanos contra NGF se prepararon usando cepas HCo7, HCo12, HCo7+HCo12, y KM de ratones transgénicos, cada una de las cuales expresa genes de anticuerpos humanos. En cada una de estas cepas de ratón, el gen de cadena liviana kappa de ratón endógena se alteró homocigóticamente como se describe en Chen *et al.*, (1993, *EMBO J.* 12:811-820), y el gen de cadena pesada de ratón endógena se alteró homocigóticamente como se describe en Ejemplo 1 de la Solicitud de Patente Internacional, Publicación No. WO 01/09187 (incorporada por referencia). Cada una de estas cepas de ratón porta un transgén de cadena liviana kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild *et al.*, (1996, *Nature Biotechnology* 14:845-851). La cepa HCo7 porta el transgén de cadena pesada humana HCo7 como se describe en las Patentes de los Estados Unidos No. 5,545,806, 5,625,825, y 5,545,807 (incorporada por referencia). La cepa HCo12 porta el transgén de la cadena pesada humana HCo12 como se describe en Ejemplo 2 de la Solicitud de Patente Internacional, Publicación No. WO 01/09187 (incorporada por referencia). La cepa HCo7+HCo12 porta los dos transgenes de cadena pesada HCo7 y HCo12 y es hemiciigótica para cada transgén. Los ratones KM comprenden el transgén de cadena pesada SC20 como se describe en Tomizuka *et al.*, (1997, *Nature Genet.* 16, 133-143 and 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 722-727). Este transgén no está integrado en un cromosoma de ratón, sino, en su lugar, se propaga como un fragmento de cromosoma independiente. El fragmento incluye aproximadamente 15 MB del cromosoma humano 14. Contiene el locus de cadena pesada humana entera incluyendo todos los segmentos génicos V_H, D y J_H y todos los isotipos de la región constante de cadena pesada. Todas estas cepas se designan en esta especificación como ratones HuMab.

Inmunizaciones HuMab:

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos contra NGF, se inmunizaron ratones HuMab con NGF recombinante purificado, derivado

de células de *E. coli* como antígeno (Ejemplo 1). Esquemas de inmunización general para ratones HuMab se describen en Lonberg *et al.*, (1994, *Nature* 368:856-859; Fishwild *et al.*, *supra.*, y la Solicitud de Patente Internacional, Publicación No. WO 98/24884, cuyas enseñanzas individuales se incorporan por referencia). Los ratones tenían 6-16 semanas de edad luego de la primera infusión de antígeno. Un preparado recombinante purificado (25-100 µg) de antígeno NGF se utilizó para inmunizar los ratones HuMab intraperitonealmente (IP) o subcutáneamente (SC).

Las inmunizaciones de ratones transgénicos HuMab se lograron usando antígeno en coadyuvante completo de Freund y dos inyecciones, seguidas por 2-4 semanas de inmunización IP (hasta un total de 9 inmunizaciones) con el antígeno en coadyuvante incompleto de Freund. Varias docenas de ratones se inmunizaron para cada antígeno. Un total de 118 ratones de las cepas HCo7, HCo12, HCo7+HCo12, y KM se inmunizaron con antígeno NGF. La respuesta inmunitaria se monitoreó mediante sangrados retroorbitales.

Para seleccionar ratones HuMab que producen anticuerpos que se unen al NGF humano, sueros de ratones inmunizados se analizaron mediante ELISA como se describe por Fishwild *et al.*, *supra.* En pocas palabras, placas de microtitulación se recubrieron con NGF recombinante purificado de *E. coli* (Ejemplo 1) a 1-2 µg/mL en PBS y 50 µL/pocillo, incubadas a 4°C de un día para otro, luego se bloquearon con 200 µL/pocillo de suero de pollo al 5% en PBS/Tween (0.05%). Diluciones de plasma de ratones inmunizados con NGF se agregaron a cada pocillo y se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween y luego se incubaron con reactivo policlonal específico de Fc de anti-IgG humana en cabra ("*a goat-anti-human IgG Fc-specific polyclonal reagent*"), conjugado a peroxidasa de rábano (HRP - *horseradish peroxidase*) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween y se incubaron con reactivo policlonal específico de Fc de anti-IgG humana en cabra, conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de lavar, las placas se desarrollaron con sustrato ABTS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Catálogo No. A-1888, 0.22 mg/mL) y se analizaron espectrofotométricamente determinando la densidad óptica (OD - *optical density*) en longitudes de onda desde 415-495 nm. Los ratones con suficientes concentraciones de inmunoglobulina humana anti-NGF se usaron para producir anticuerpos monoclonales, como se describe a

continuación.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos contra NGF

Los ratones se prepararon para la producción de anticuerpos monoclonales reforzando con antígeno por vía intravenosa 2 días antes del sacrificio, y acto seguido se extirparon los bazo. Los esplenocitos de ratón se aislaron de los ratones HuMab y se fusionaron con PEG a una línea de células de mieloma de ratón usando protocolos estándar. Típicamente, se realizaron 10-20 fusiones para cada antígeno.

En síntesis, suspensiones celulares individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados se fusionaron a $\frac{1}{4}$ el número de células de mieloma de ratón no secretoras P3X63-Ag8.653 (ATCC, No. de Acceso CRL 1580) con 50% PEG (Sigma). Las células se esparcieron a aproximadamente 1×10^5 /pocillo en placas de microtitulación de fondo plano, seguidas por alrededor de una incubación de dos semanas en medio selectivo que contenía de suero fetal bovino al 10%, 10% P388D1- (ATCC, No. de Acceso CRL TIB-63) medio acondicionado, 3-5% origen (IGEN) en DMEM (Mediatech, Catálogo No. CRL 10013, con alto contenido de glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio) más 5 mM HEPES, 0.055 mM 2-mercaptoetanol, 50 mg/mL gentamicina y 1x HAT (Sigma, Catálogo No. CRL P-7185). Luego de 1-2 semanas, las células se cultivaron en un medio en el cual el HAT se reemplazó con HT.

Los hibridomas resultantes se detectaron selectivamente en cuanto a la producción de anticuerpos específicos del antígeno. Pocillos individuales se detectaron selectivamente mediante ELISA (descrito anteriormente) para detectar anticuerpos IgG monoclonales anti-NGF humanos. Una vez ocurrió un crecimiento extensivo de hibridomas, se monitoreó el medio usualmente después de 10-14 días. Hibridomas secretores de anticuerpos se esparcieron de nuevo sobre placas, se detectaron selectivamente de nuevo y, si eran aún positivos por IgG humana, anticuerpos monoclonales anti-NGF se subclonaron por lo menos dos veces limitando la dilución. Los subclones estables se cultivaron entonces *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo tisular para caracterización.

Selección de Anticuerpos Monoclonales Humanos que se Unen a NGF

Se utilizó un análisis ELISA, como se describe anteriormente, para detectar selectivamente hibridomas que mostraron reactividad positiva con inmunógeno NGF. Hibridomas que secretaban un anticuerpo monoclonal que se unía con gran avidez a NGF se subclonaron y caracterizaron posteriormente. Un clon de cada hibridoma, que conservaba la reactividad de las células progenitoras (como se determinó por ELISA), se escogió para elaborar un banco de células de 5-10 frasquitos almacenados en nitrógeno líquido.

Se realizó un ELISA específico del isotipo para determinar el isotipo de los anticuerpos monoclonales producidos como se divulga en esta especificación. En estos experimentos, pocillos de placas de microtitulación se recubrieron con 50 µL/pocillo en una solución de 1 µg/mL de cadena liviana kappa anti-humana de ratón en PBS y se incubaron a 4°C de un día para otro. Luego de bloquear con suero de pollo al 5%, las placas se hicieron reaccionar con sobrenadante de cada anticuerpo monoclonal analizado y un control isotipo purificado. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1-2 horas. Los pocillos se hicieron reaccionar entonces con varios antisueros policlonales anti-humanos en cabra, conjugados a peroxidasa de rábano, específicos de IgG humana, y las placas se desarrollaron y analizaron como se describe anteriormente.

Anticuerpos monoclonales purificados de los sobrenadantes de hibridoma que mostraron una unión significativa a NGF, como se detectó mediante ELISA, se examinaron posteriormente con respecto a su actividad biológica usando una variedad de bioanálisis, como se describe a continuación.

Ejemplo 3

Selección y Clonación de Anticuerpos anti-NGF con Potente Actividad Neutralizadora de NGF

Se evaluó la efectividad de los anticuerpos identificados inicialmente en Ejemplo 2 como inhibidores de la actividad de NGF (es decir, "neutralización" de NGF) midiendo la capacidad de cada péptido modificado de bloquear la inducción de NGF de la expresión del receptor-1 vaniloide (VR1).

Cultivos Neuronales de Ganglios Radiculares Dorsales

Ganglios radiculares dorsales (DRG) se diseccionaron uno por uno bajo condiciones asépticas de todos los segmentos espinales de ratas embrionicas de 19 días de edad (E19), que se extirparon quirúrgicamente del útero de ratas Sprague-Dawley terminalmente anestesiadas, con gestación programada (Charles River, Wilmington, MA). Se recolectaron DRG en medio L-15 congelado (GibcoBRL, Grand Island, NY), que contenía suero equino inactivado por calor al 5% (GibcoBRL), y se extirparon vasos sanguíneos y cualquier tejido conectivo suelto. Los DRG se lavaron dos veces en solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} (DPBS - *Dulbecco's phosphate buffered saline*), pH 7.4 (GibcoBRL). Los DRG se disociaron entonces en suspensión de células individuales utilizando un sistema de disociación con papaína (Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ). En síntesis, DRG se incubaron en una solución de digestión que contenía 20 U/ml de papaína en Solución Salina Balanceada de Earle (EBSS - *Earle's Balanced Salt Solution*) a 37°C durante cincuenta minutos. Las células se disociaron mediante trituración a través de pipetas Pasteur pulidas al fuego en un medio de disociación compuesto por MEM/Ham's F12, 1:1, 1 mg/ml de inhibidor ovomucoide y 1 mg/ml ovalbúmina, y 0.005% desoxirribonucleasa I (DNasa).

Las células disociadas se sedimentaron a 200 x g durante cinco minutos y se re-suspendieron en EBSS que contenía 1 mg/ml de inhibidor ovomucoide, 1 mg/ml de ovalbúmina y 0.005% DNasa. La suspensión de las células se centrifugó a través de una solución de gradiente que contenía 10 mg/ml de inhibidor ovomucoide, 10 mg/ml ovalbúmina a 200 x g durante seis minutos para extraer los residuos celulares, y luego se filtró a través de una malla de nylon de 88- μm (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) para eliminar posibles aglomerados. Se determinó el número de células con un hemocitómetro, y las células se sembraron en poli-ornitina 100 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma, St. Louis, MO) y placas de 96 pocillos recubiertas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de laminina de ratón (GibcoBRL) a 10×10^3 células/pocillo en medio completo. El medio completo se componía de medio esencial mínimo (MEM - *minimal essential medium*) y Ham's F12, 1:1, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$), y suero equino inactivado con calor al 10% (GibcoBRL). Los cultivos se mantuvieron a 37°C, 5% CO_2 y 100% de humedad. Para controlar el crecimiento de células no neuronales, 5-fluoro-2'-deoxiuridina (75 μM) y uridina (180 μM) se incluyeron en el medio.

Tratamiento con NGF y anti-NGF

Dos horas después de sembrar las placas, las células se trataron con β -NGF (Amgen) humano recombinante o β -NGF de rata recombinante (R&D Systems, Minneapolis, MN) en una concentración de 10 ng/ml (0.38 nM). Controles positivos que incluían anticuerpo anti-NGF diluido en serie (R&D Systems) se aplicaron a cada placa de cultivo. Se agregaron anticuerpos de prueba en diez concentraciones usando diluciones en serie 3.16 veces. Todas las muestras se diluyeron en medio completo antes de agregarse a los cultivos. El tiempo de incubación fue de 40 horas antes de la medición de la expresión de VR1.

Medición de la Expresión de VR1 en Neuronas DRG

Los cultivos se fijaron con paraformaldehído al 4% en solución salina balanceada de Hank durante quince minutos, se bloquearon con Superblock (Pierce, Rockford, IL), y se permeabilizaron con 0.25% Nonidet P-40 (Sigma) en solución salina amortiguada con Tris-HCl (Sigma) (TBS) durante una hora a temperatura ambiente. Los cultivos se lavaron una vez con TBS que contenía 0.1% Tween 20 (Sigma) y se incubaron con IgG anti-VR1 de conejo durante una y media hora a temperatura ambiente, seguidas por incubación del segundo anticuerpo anti-conejo marcado con europio (Wallac Oy, Turku, Finlandia) durante una hora a temperatura ambiente. Se aplicaron lavados con TBS (3 x cinco minutos con agitación lenta) después de cada incubación de anticuerpos. Solución Enhance (150 μ l/pocillo, Wallac Oy) se agregó a los cultivos. Seguidamente se midió la señal de fluorescencia en un fluorómetro con resolución en escalas de tiempo ("*a time-resolved fluorometer*") (Wallac Oy). La expresión de VR1 en muestras tratadas con los péptidos modificados se determinó comparando una curva estándar de análisis volumétrico con una curva estándar de análisis volumétrico de NGF de 0-1000 ng/ml. La inhibición porcentual (comparada con la inhibición máxima posible) del efecto de NGF sobre la expresión de VR1 en neuronas DRG se determinó comparando con controles que no se trataron con NGF. Los resultados se dan en Tablas 2 y 5.

Las líneas de células se marcaron #110-#129. Anticuerpos de líneas de células #119, #124, y #125 demostraron una actividad de neutralización de NGF

137
13

extremadamente potente (Figura 1). La línea de células #124 era una línea de células progenitoras, designada asimismo como 4D4. Las líneas de células #119 y #125 eran subclones del progenitor 4D4. Una muestra adicional del frasquito original que contenía hibridoma 124 (4D4) se cultivó y marcó #167 (4D4).

Anticuerpos generados por hibridoma #167 (4D4) se sometieron al mismo análisis de neutralización de NGF basado en neuronas DRG que las muestras previas. Anticuerpo #167 (4D4) demostró fuerte actividad anti-NGF con una IC₅₀ de 0.50 nM (Figura 2), la cual era consistente con la actividad de las muestras #119, #124, y #125. Las actividades de las 4 muestras se indican en Tabla 2.

Tabla 2

Actividad anti-hNGF en células DRG usando 0.38 nM hNGF	
Código #	IC ₅₀
119 (de 124)	< 1.2 nM
124 (progenitor)	< 0.57 nM
125 (de 124)	< 0.3 nM
167 (de la misma muestra que 124)*	0.50 nM

Secuenciamiento N-Terminal y Espectrometría de Masas

Se prepararon muestras de anticuerpos de hibridomas anti-NGF purificados para secuenciamiento de proteínas y análisis LC/MS. Los anticuerpos se purificaron de medio acondicionado concentrando el medio usando Amicon centriprep-30 hasta que el volumen fue menor que 15 ml. Un lote de resina rProA (Pharmacia) se lavó 4x con PBS y una suspensión al 50% hecha en PBS luego del último lavado. Una cantidad apropiada de resina rProA (aproximadamente 5ug anticuerpo/ul de resina pero usando no más que 50 ul de resina) se agregó a la muestra de anticuerpo y se incubó de un día para otro a 4°C. La mezcla de resina-anticuerpo se centrifugó y se recogió la fracción no unida. Luego de la adición de 0.5 ml PBS y transferencia a un tubo 0.45um Spin-X (CoStar), la muestra se centrifugó a 10.000 rpm durante 3 min. A continuación la resina se lavó por lo menos 3 veces con 0.5 ml PBS y luego de 0.1M glicina (pH 2.7) se agregó a 1.5x volumen de resina y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguida por otra centrifugación durante 3 minutos a 10.000 rpm, recogiendo el

sobrenadante. Este paso de elución se repitió dos veces más y luego el sobrenadante combinado se neutralizó con 1/25 volumen de 1.0 M tris (pH 9.2).

Luego de un paso de filtración final a través de un nuevo tubo Spin-x (0.2 μ m) se cuantificó el anticuerpo usando un análisis Bradford estándar utilizando IgG humana como el estándar o, alternativamente, absorbencia a 280 para muestras más grandes. Se corrió asimismo un gel usando 2 μ g de cada muestra junto con 2 μ g IgG humana, k (Sigma). Para la espectrometría de masas, se desglicosilaron cuatro microgramos de las muestras, se redujeron, y se cargaron en una HPLC (HP 1090) en línea conectada a un espectrómetro de masas Finigan LCQ. La cadena liviana se separó de la cadena pesada mediante HPCL de fase reversa. Las cadenas livianas y las cadenas pesadas se recogieron igualmente para análisis de secuenciamiento de proteína N-terminal.

Las dos secuencias N-terminales de la cadena liviana y la cadena pesada de la muestra del anticuerpo anti-NGF #167 (4D4) coincidieron ambas con las secuencias N-terminales de la muestra de anticuerpo anti-NGF #119 (4D4). Además, la masa medida de los anticuerpos indicó que los anticuerpos aislados de los hibridomas #167 y #119 eran los mismos. La masa medida, desenrollada, (23096) de la cadena liviana de anti-NGF #167 coincidió con la masa medida (23096) de la cadena liviana de anti-NGF Ab #119.

Clonación de las Cadenas Pesada y Liviana del Anticuerpo anti-NGF

El hibridoma que expresa el anticuerpo monoclonal de unión a NGF más potente, 4D4.D7, se usó como fuente para aislar ARN total usando el reactivo TRIzol® (Invitrogen). La primera hebra de ADNc se sintetizó utilizando un cebador aleatorio con un adaptador de extensión (5'-GGC CGG ATA GGC CTC CAN NNN NNT-3') (SEQ ID NO: 33) y se realizó un análisis preparativo 5' RACE (amplificación rápida de extremos de ADNc - *rapid amplification of cDNA ends*) usando el Kit GeneRacer™ (Invitrogen) de acuerdo con instrucciones del fabricante. Para preparar ADNc que codifica la cadena liviana completa, el cebador directo fue el cebador anidado GeneRacer™, y el cebador inverso fue 5'-GGG GTC AGG CTG GAA CTG AGG-3' (SEQ ID NO: 34). Para preparar ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada, el cebador directo fue el cebador anidado GeneRacer™ y el cebador inverso fue 5'-TGA GGA CGC TGA CCA CAC G-3' (SEQ ID NO 35). Productos RACE se clonaron en pCR4-TOPO

(Invitrogen) y se determinaron las secuencias. Se utilizaron secuencias de consenso para diseñar cebadores para amplificación PCR de la cadena de anticuerpo de longitud total.

Para preparar ADNc que codifica la cadena liviana 4D4.D7 kappa anti-NGF, el cebador 5' PCR codificó el término amino de la secuencia señal, un sitio de enzima de restricción *Xba*I, y una secuencia de Kozak optimizada (5'-CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GGA CAT GAG GGT GCC CGC TCA GCT CCT GGG-3'; SEQ ID NO: 36). El cebador 3' codificó el término carboxilo y el codón de terminación, así como un sitio de restricción *Sal*I (5'-CTT GTC GAC TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT C-3'; SEQ ID NO: 37). El fragmento del producto PCR resultante se purificó, se digirió con *Xba*I y *Sal*I, y luego se aisló en gel y se ligó en el vector de expresión de mamífero pDSRα20 (véase Solicitud de Patente International, Publicación No. WO 90/14363, la cual se incorpora en esta especificación por referencia para cualquier propósito. Se produjo pDSRα20 cambiando el nucleótido 2563 en pDSRα19 de una "Guanosina" a una "Adenosina" por mutagénesis de sitio dirigido).

Para preparar ADNc que codifica la cadena liviana kappa 4D4.D7 anti-NGF, el cebador 5' PCR codificó el término amino de la secuencia señal, un sitio de enzima de restricción *Xba*I, y una secuencia de Kozak optimizada (5'-CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GGA GTT GGG GCT GTG CTG GGT TTT CCT TGT T-3'; SEQ ID NO: 38). El cebador 3' codificó el término carboxilo y el codón de terminación, así como un sitio de restricción *Sal*I (5'-GCA TGT CGA CTC ATT TAC CCG GAG ACA GGG AGA G-3'; SEQ ID NO: 39). El producto resultante se purificó, se digirió con *Xba*I y *Sal*I, se aisló en gel y se ligó en el vector pDSRα20.

La masa calculada (23099), como se determinó traduciendo la secuencia nucleotídica en los aminoácidos predichos y sumando los pesos moleculares de los aminoácidos, de la secuencia de ADN de la cadena liviana del clon del Ab (anticuerpo) 4D4 anti-NGF coincidió con la masa medida, como se determinó mediante espectrometría de masas. La masa desenrollada, medida, (49479) de la cadena pesada del Ab #167 anti-NGF coincidió con la masa medida (49484) de la cadena pesada del Ab #119 anti-NGF y coincidió igualmente con la masa teórica (49484) de la secuencia de ADN de la cadena pesada del clon del Ab 4D4 anti-NGF (Tabla 3) dentro de una desviación instrumental.

Los datos de la secuencia proteica N-terminal y LC/MS confirmaron que el hibridoma #119 expresó el mismo anticuerpo que el hibridoma #167. Adicionalmente, la masa calculada de los anticuerpos basada en la secuencia confirmó aún más la observación.

Tabla 3 – Resumen de los Resultados de la Espectrometría de Masas

Ab anti-NGF	Masa medida de Ab#167	Masa medida de Ab#119	Masa teórica derivada de la secuencia de ADN de Ab 4D4
Cadena liviana	23096	23096	23099
Cadena pesada	49479	49484	49484

Ejemplo 4

Expresión de Anticuerpos Anti-NGF en Células de Ovario de Hámster Chino (CHO)

Se logró una expresión estable del mAb anti-NGF 4D4 mediante co-transfección de plásmidos 4D4-cadena pesada/pDSRα19 IgG2 o 4D4-cadena liviana/pDSRα19 IgG1 y NGF-kappa/pDSRα9 en células de ovario de hámster chino (CHO) adaptadas, libres de suero, deficientes en dihidrofolato reductasa (DHFR⁻), usando un método de fosfato de calcio. Células transfectadas se seleccionaron en medio que contenía suero dializado pero que no contenía hipoxantina-timidina para garantizar el crecimiento de células que expresan la enzima DHFR. Los clones transfectados se identificaron selectivamente usando análisis como ELISA, con el fin de detectar la expresión del mAb anti-NGF 4D4 en el medio acondicionado. Los clones con expresión máxima se sometieron a concentraciones cada vez mayores de metotrexato (MTX) para amplificación de DHFR. Los clones amplificados con MTX se identificaron selectivamente usando análisis tales como ELISA, con el fin de detectar la expresión más alta de mAb anti-NGF 4D4 en el medio acondicionado. Los clones con expresión máxima se sometieron a subclonación para obtener una población homogénea y creación de bancos de células.

Anticuerpos anti-NGF recombinantes de la invención pueden generarse en células de ovario de hámster chino, deficientes en DHFR, usando el mismo protocolo al descrito anteriormente para el anticuerpo monoclonal anti-NGF. Las

secuencias de ADN que codifican la cadena pesada o la cadena liviana completas de cada anticuerpo anti-NGF de la invención se clonan en vectores de expresión. Células CHO se co-transfectan con un vector de expresión capaz de expresar una cadena pesada completa y un vector de expresión que expresa la cadena liviana completa del anticuerpo anti-NGF apropiado. Por ejemplo, para generar el anticuerpo anti-NGF, las células se co-transfectan con un vector capaz de expresar una cadena pesada completa que incluye la secuencia de aminoácidos, como se indica en SEQ ID NO: 40, y un vector capaz de expresar una cadena liviana completa que incluye la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 44. Tabla 4 resume las cadenas pesada y liviana completas para los anticuerpos 4D4 que tienen varias regiones constantes de cadena pesada de IgG.

Tabla 4

Anticuerpo	Región variable de cadena pesada + Región constante de cadena pesada	Cadena Pesada Completa
4D4(IgG2)	SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 40
4D4(IgG1)	SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 41
4D4(IgG4)	SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 42
4D4(IgG3)	SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 43
Anticuerpo	Región variable de cadena liviana + Región Constante de Cadena Liviana	Cadena Liviana Completa
4D4	SEQ ID NO: 12 + SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 44

Ejemplo 5

Caracterización de la Actividad de Anticuerpos 4D4 anti-NGF 4D4

Anticuerpos 4D4 anti-NGF expresados transitoriamente, generados en células cultivadas bajo condiciones de matraces de agitación (S) o botellas rotatorias (R) se analizaron para confirmar su capacidad de neutralizar NGF en un

bioanálisis de neutralización de NGF a base de neuronas DRG, realizado como se describe anteriormente (Ejemplo 3).

Los anticuerpos NGF se expresaron transitoriamente en células 293T adaptadas en suspensión libre de suero. Las transfecciones se efectuaron como cultivos de 500 mL o 1L. En pocas palabras, el inóculo de células (5.0×10^5 células/mL X volumen de cultivo) se centrifugó a 2.500 RPM durante 10 minutos a 4°C para extraer el medio acondicionado. Las células se re-suspendieron en DMEM libre de suero y se centrifugaron de nuevo a 2.500 RPM durante 10 minutos a 4°C. Luego de aspirar la solución de lavado, las células se re-suspendieron en medio de cultivo [DMEM/F12 (3:1) + 1X Suplemento de Insulina-Transferrina-Selenio + 1X Pen Strep Glut + 2mM L-Glutamina + 20 mM HEPES + 0.01% Pluronic F68] en un cultivo con matraces de agitación de 1L o 3L. El cultivo con matraz de agitación se mantuvo sobre una placa de agitación magnética a 125 RPM, la cual se puso en un incubador humidificado mantenido a 37°C y 5% CO₂. El ADN plasmídico se acomplejó al reactivo de transfección en un tubo cónico de 50 mL. El complejo ADN-reactivo de transfección se preparó en 5% del volumen de cultivo final en DMEM libre de suero. 1 µg de ADN plasmídico/mL de cultivo se agregó primeramente al DMEM libre de suero, seguido por 1µl X-TremeGene RO-1539/mL de cultivo. Los complejos se incubaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos y luego se agregaron a las células en el matraz de agitación. La transfección/expresión se efectuó durante 7 días, luego de los cuales el medio acondicionado se cosechó mediante centrifugación a 4.000 RPM durante 60 minutos a 4°C.

Para las trasfecciones transitorias en botellas rotatorias, usamos células adherentes 293T cultivadas y mantenidas en DMEM suplementado con 5% FBS + 1X Aminoácidos No Esenciales + 1X Pen Strep Glut + 1X Piruvato de Sodio. Aproximadamente, $4-5 \times 10^7$ células 293T se sembraron en botellas rotatorias de 850 cm² de un día para otro. Las células previamente sembradas se transfectaron entonces el día siguiente utilizando el reactivo de transfección FuGene6. La mezcla de ADN-reactivo de transfección se preparó en aproximadamente 6.75 mL de DMEM libre de suero. Primeramente se agregaron 675 µl de reactivo de transfección FuGene6, seguido por 112.5 µg de ADN plasmídico. El complejo se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla completa se agregó entonces a una botella rotatoria. La botella rotatoria se gasificó con una mezcla de gas CO₂ al 5%, se tapó herméticamente y se puso en un incubador a

37°C en un bastidor de botellas rotatoria que giraba a 0.35 RPM. La transfección se efectuó durante 24 horas, luego de las cuales el medio se reemplazó con 100 mL DMEM + 1X Suplemento de Insulina-Transferrina-Selenio + 1X Pen Strep Glu + 1X Aminoácidos No Esenciales + 1X Piruvato de Sodio. Típicamente, se obtuvieron dos cosechas de 100ml en 48 horas de cada botella rotatoria. El medio acondicionado libre de suero cosechado se agrupó y se centrifugó a 4.000 RPM durante 30 minutos a 4°C.

Los dos 4D4.IgG1 y 4D4.IgG2 mostraron potente actividad con valores IC₅₀ de alrededor de 0.14 nM a alrededor de 0.2 nM contra NGF humano (Figura 2). Los resultados del análisis de actividad se resumen en Tabla 5. Los anticuerpos mostraron poca actividad contra NGF de rata (Figura 3). Los resultados semejan la actividad de los anticuerpos examinados directamente de los hibridomas descritos anteriormente.

TABLA 5

Ab	IC50@ hNGF (nM)	IC50@ rNGF (nM)
4D4.IgG1.R	0.1488	>34 nM
4D4.IgG1.S	0.1587	>45 nM
4D4.IgG2.R	0.2047	>59 nM
4D4.IgG2.S	0.2063	>37 nM

hNGF = NGF humano, rNGF = NGF de rata, R = Cultivo en Botellas Rotatorias, S = Cultivos con Agitación Centrífuga

Ejemplo 6

Producción de Anticuerpo anti-NGF

El anticuerpo anti-NGF se produce por expresión en una línea clonal de células CHO. Para cada ciclo de producción, células de un frasquito individual se descongelaron en medio de cultivo de células libre de suero. Las células se cultivan inicialmente en una botella de cultivo de Thiele, seguida por botellas con agitación centrífuga y luego se cultivaron en reactores de acero inoxidable de escala creciente hasta un biorreactor de 2.000L. La producción se lleva a cabo en un biorreactor de 2.000L usando un cultivo de lote alimentado, en el cual una

alimentación de nutriente que contiene componentes de medio concentrado se agrega para mantener el crecimiento de las células y la viabilidad del cultivo. La producción dura aproximadamente dos semanas, tiempo durante el cual se produce constitutivamente anticuerpo anti-NGF por las células y se secreta en el medio de cultivo de las células.

El reactor de producción se controla a un pH predeterminado, temperatura, y nivel de oxígeno disuelto: el pH se controla por la adición de gas dióxido de carbono y carbonato de sodio; el oxígeno disuelto se controla por flujos de aire, nitrógeno, y gas oxígeno.

Al final de la producción, el caldo de células se alimenta a una centrífuga de discos y el sobrenadante del cultivo se separa de las células. El concentrado se clarifica posteriormente mediante un filtro de fondo, seguido por un filtro de 0.2 μm . El medio acondicionado clarificado se concentra entonces por ultrafiltración de flujo tangencial. El medio acondicionado se concentra 15 a 30 veces. El medio acondicionado concentrado resultante se procesa a continuación mediante purificación o se congela para purificación en una fecha posterior.

Ejemplo 7

Reactividad Cruzada con Otras Neurotrofinas

Los anticuerpos 4D4 se examinaron con respecto a su reactividad cruzada contra NT3 humano o BDNF humano en diferentes bioanálisis, incluyendo el análisis de supervivencia de neuronas DRG para NT3 humano y el análisis de captación de DA en neuronas DA cultivadas para BDNF humano.

Tratamiento de cultivos DRG con NT3, anticuerpos anti-NT3 y anti-NGF

Dos horas después de la siembra de las placas, células DRG (procedimiento de aislamiento descrito anteriormente en Ejemplo 3) se trataron 100 ng/ml (3.8 nM) de hNT-3 recombinante. Anticuerpo anti-hNT3 diluido serialmente (R&D) se utilizó como control positivo. Incógnitas (muestras de Ab anti-NGF) se agregaron en varias concentraciones con diluciones seriales de 10 puntos, 3.16 veces. La totalidad de las muestras se diluyeron en medio completo, antes de agregarse a los cultivos.

Cuantificación de la expresión de MAP2 en Neuronas DRG

Los cultivos se fijaron con paraformaldehído al 4% en solución salina balanceada de Hank durante 15 min, se bloquearon con Superb lock (Pierce) durante 1 hora y se permeabilizaron con 0.25% Nonidet P-40 (Sigma) en Tris-HCl (Sigma)-salina amortiguada (TBS) durante 1 hora a temperatura ambiente (RT – *room temperature*). Los cultivos se lavaron una vez con TBS que contenía 0.1% Tween20 (Sigma) y se incubaron con IgG anti-MAP2 de ratón (Chemicon, Temecula, CA) durante 1.5 hora a temperatura ambiente, seguida por incubación de anticuerpo secundario anti-ratón marcado con europio (Wallac Oy, Turku, Finlandia) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se aplicaron lavados con TBS (3 x 5 min con agitación suave) después de cada incubación de anticuerpo. Solución Enhance (150 ml/pocillo, Wallac Oy) se agregó a los cultivos y, a continuación, se midió la señal de fluorescencia en un fluorómetro con resolución en escalas de tiempo (Wallac Oy).

Cultivo Mesencefálico Embrionario

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley embrionarias de 19 días de edad (E19) (Jackson Labs). Se extirpó el tejido del mesencéfalo ventral enriquecido para neuronas dopaminérgicas y se transfirió a solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco (DPBS - *Dulbecco's phosphate buffered saline*), fría, pH 7.4, sin Ca^{++} y Mg^{++} (Gibco). Los fragmentos de tejido se disociaron en suspensión de células individuales usando un sistema de disociación con papaína (Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ). En pocas palabras, fragmentos de tejido se incubaron en una solución de digestión que contenía 20 unidades/ml papaína en Solución Salina Balanceada de Earle (EBSS - *Earle's Balanced Salt Solution*) a 37°C durante 50 min. Las células se disociaron por trituration a través de pipetas de Pasteur pulidas al fuego en un medio de disociación compuesto de MEM/Ham's F12 1:1, 1 mg/ml inhibidor ovomucoide y 1 mg/ml ovalbúmina y 0.005% desoxirribonucleasa I (DNasa). Las células disociadas se sedimentaron a 200 x g durante 5 min y se resuspendieron en EBSS que contenía 1 mg/ml inhibidor ovomucoide, 1 mg/ml ovalbúmina y 0.005% DNasa. La suspensión de las células se centrifugó a través de una solución de gradiente que contenía 10 mg/ml inhibidor ovomucoide, 10 mg/ml ovalbúmina a 200 x g durante 6 min para extraer los residuos de las células; y se filtró a través de una malla de nylon Nitex de 25

146
152

µg (Tetko, Inc.) para extraer los aglomerados. Las células disociadas se sembraron en placas de cultivo de tejido con una densidad de 100.000/cm². Las placas se pre-recubrieron con 100 µg/ml de poli-ornitina (Sigma) y 1 µg/ml de laminina de ratón (Gibco BRL), como se describe previamente (Louis JC *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992; 262:1274-1283.). El medio de cultivo se componía de medio esencial mínimo (MEM - *minimal essential medium*)/F12 de Ham, 1:1, suero equino al 12% (Gibco), 100 µg/ml de transferrina y 2.5 µg/ml de insulina (Sigma). Los cultivos se mantuvieron a 37°C, 5% CO₂ y 100% de humedad durante 6 días.

Tratamiento de Cultivos Mesencefálicos con BDNF y anti-BDNF o anti-NGF

BDNF a 10 ng/ml se agregó a las células 2 horas después de la siembra en las placas, seguido por concentraciones seriales de muestras de Ab anti-NGF. Se usó como control positivo el anticuerpo anti-BDNF (generado en Amgen).

Captación de DA en Neuronas Mesencefálicas

Se llevaron a cabo análisis de captación de dopamina como se describe previamente (Friedman, L. and Mytilineou, C, *Neuroscience Letters* 1987; 79:65-72). El día 6, los cultivos se lavaron una vez con amortiguador de fosfato de Krebs-Ringer pre-calentado (pH 7.4) que contenía 5.6 mM de glucosa, 1.3 mM de EDTA y 0.5 mM de pargilina, un inhibidor de monoamina oxidasa. Los cultivos se incubaron en amortiguador de captación que contenía 50 nM [³H]DA (NEN) durante 60 minutos a 37°C. Se suspendió la captación retirando el amortiguador de captación, y los cultivos se lavaron tres veces con amortiguador de fosfato de Krebs-Ringer. Las células se desintegraron por medio de lisinas para liberar [³H]DA agregando un cóctel de centelleo líquido, opticphase supermix (Wallac), directamente a los cultivos. Los lisados de células se contaron entonces en cuanto a radioactividad en un contador de centelleo líquido microbeta-plus (Wallac, Inc.). Se evaluó la captación DA de baja afinidad agregando 0.5 mM GBR12909, un inhibidor específico de los sitios de captación DA de alta afinidad (Heikkila RE and Mazino L, *European Journal of Pharmacology* 1984; 103:241-8), al amortiguador de captación, y se sustrajo de la cantidad de captación total para obtener el valor de captación DA de alta afinidad.

147
X33

Tabla 6

Anticuerpo	IC ₅₀ @ hNT-3 (nM)	IC ₅₀ @ hBDNF (nM)
4D4 (IgG2)	> 13.75	> 13.75

Ejemplo 8

Identificación de un Epítopo para Anticuerpos anti-NGF

Mapeo de Epítopos por Proteólisis Limitada

Cinco microgramos (µg) de NGF se incubaron con 4D4 (11 µg) durante 30 minutos a 4°C en 0.1M de amortiguador Tris, pH 7.5. El complejo se digirió entonces con proteasa (subtilisina) 1 µg a 37°C durante 1 y 2 horas. Mapas de péptidos HPLC se compararon entre sí para encontrar los péptidos que fueron protegidos por los anticuerpos 4D4. La proteólisis limitada de NGF indicó que varios péptidos principales se liberaron inicialmente de NGF. De interés particular, los péptidos S18.3, S18.5, y S34.4 se generaron y protegieron con anticuerpo de la proteólisis. Otros picos no se formaron o protegieron significativamente. Los péptidos protegidos de dos experimentos (digestión de 1 hora y 2 horas) se muestran en Tabla 7.

Tabla 7

			% de protección	
			Digestión 1 hora	Digestión 2 horas
S16.1	QAA (96-98)	C-terminal	—	57
S18.3	FFETK (53-57) (SEQ ID NO:45)	Región bucle	40	45
S18.5	SSSHPIFHR (1-9) (SEQ ID NO:46) (HWNSY)* (SEQ ID NO:47)	N-terminal	40	50
S34.4	NSVEKQYFFETK (46-57) (SEQ ID NO:48)	Región bucle	69	38

El porcentaje de protección se calculó de la altura del pico del péptido. S18.5 contenía dos péptidos, pero solo un péptido (SSSHPIFHR; SEQ ID NO: 46) estaba protegido con el anticuerpo 4D4, puesto que el otro pico del péptido (HWNSY; SEQ ID NO: 47) no se modificó por la adición de anticuerpos 4D4, como

se detectó a 280 nm de absorbencia. El péptido S18.3 era una parte C-terminal de S34.4, ambos de la misma región de bucle. Regiones de bucle, centrales y N-terminales, eran también posibles epítomos.

Separación Microcon de Péptidos Digeridos

El material digerido con subtilisina (3 µg cada uno) se incubó con anticuerpos 4D4 activos y un anticuerpo monoclonal inactivo (#162) (8 µg) durante 30 minutos a 4°C en 0.1 M de amortiguador Tris, pH 7.5. Los péptidos unidos/no unidos se separaron por Microcon 10 (Millipore Corp., Bedford, Mass) y las dos fracciones (unida y no unida) se analizaron por HPLC para encontrar péptidos unidos a anticuerpos. Se recuperaron dos picos agotados identificados por comparación HPLC de las fracciones no unidas después del tratamiento con anticuerpos 4D4 y #162 y por separación Microcon, indicando péptidos unidos por anticuerpos. Los péptidos unidos por 4D4 fueron:

S1 (4.4) ---- SRKAVRR (113-119) (SEQ ID NO: 49), C-terminal; y

S2 (28.3) ---- EVMVL (35-39) (SEQ ID NO: 50), región de bucle.

Una muestra NGF se digirió alternativamente con Lys-C (K) durante 24 horas. Residuos de cisteína se redujeron y carboximetilaron con desnaturizante. La muestra se incubó con anticuerpos monoclonales 4D4 y AMG162, seguidos por separación Microcon 100. Las fracciones unidas y no unidas se analizaron mediante HPCL de fase reversa. Únicamente dos péptidos se identificaron como anticuerpo que une péptidos K, como se indica más adelante. La masa calculada para los péptidos, determinada por análisis de secuencias, y la espectrometría de masas de los péptidos fueron consistentes. Los péptidos, como se indica a continuación, se mapearon a la región N-terminal y C-terminal.

K1(37.6) ---- SSSHPIFHRGEFSVCDSSVWVGDK (SEQ ID NO: 51)

Masa calculada = 2821; masa observada = 2828.2; N-terminal

K2(39.5) ---- QAAWRFIRIDTACVCVLSRK (SEQ ID NO: 52)

Masa calculada = 2452; masa observada = 2459.5; C-terminal

Los experimentos precedentes de mapeo de epítomos indicaron que por lo menos tres regiones eran posibles epítomos para los anticuerpos 4D4, incluyendo las regiones N-terminales (1-9), internas (46-57), y C-terminales (96-98).

149 135

Adicionalmente, una digestión por AspN reveló que un fragmento peptídico compuesto por ---SSHPIFHRGEFSVC--- (SEQ ID NO: 53) fue protegido por el anticuerpo 4D4, mientras que una digestión con tripsina mostró que un fragmento peptídico compuesto por ---SSHPIFHR---- (SEQ ID NO: 54) no fue protegido por el anticuerpo 4D4. Por consiguiente, en el término N, la secuencia de GEFSVC (SEQ ID NO: 55) es muy importante para unirse a anticuerpos 4D4.

Con el fin de definir más claramente el epítopo para el anticuerpo anti-NGF 4D4.IgG1, se generaron sintéticamente un total de 23 péptidos usando técnicas estándar basadas en la secuencia entera del NGF madura humana (hNGF) (Tabla 8). Los péptidos tenían 15 aminoácidos de longitud, superpuestos por 10 aminoácidos, y con cola de cisteína en los términos C para permitir la conjugación a una matriz. El Ab 4D4.IgG1 anti-hNGF humano descrito más arriba se utilizó para el experimento de mapeo.

Tabla 8

Péptido #	Secuencia	SEQ ID NO
33582-27-01	SSSHPIFHRGEFSVC (1-15)	56
33582-27-02	IFHRGEFSVADSVSVC (6-20)	57
33582-27-03	EFSVADSVSVWVGDKC (11-25)	58
33582-27-04	DSVSVWVGDKTTATDC (16-30)	59
33582-27-05	WVGDKTTATDIKGKEC (21-35)	60
33582-27-06	TTATDIKGKEVMVLGC (26-40)	61
33582-27-07	IKGKEVMVLGEVNIN (31-45)	62
33582-27-08	VMVLGEVNINNSVFKC (36-50)	63
33582-27-09	EVNINNSVFKQYFFEC (41-55)	64
33582-27-10	NSVFKQYFFETKARDC (46-60)	65
33582-27-11	QYFFETKARDPNPVDC (51-65)	66
33582-27-12	TKARDPNPVDSGARDC (56-70)	67
33582-27-13	PNPVDSGARDIDSKHC (61-75)	68
33582-27-14	SGARDIDSKHWNSYC (66-80)	69
33582-27-15	IDSKHWNSYATTTHTC (71-85)	70
33582-27-16	WNSYATTTHTFVKALC (76-90)	71
33582-27-17	TTTHTFVKALTMDGKC (81-95)	72
33582-27-18	FVKALTMDGKQAAWRC (86-100)	73
33582-27-19	TMDGKQAAWRFIRIDC (91-105)	74
33582-27-20	QAAWRFIRIDTAAVC (96-110)	75
33582-27-21	FIRIDTAAVAVLSRKC (101-115)	76

Péptido #	Secuencia	SEQ ID NO
33582-27-22	TAAVAVLSRKAVRRAC (106-120)	77
33582-27-23	CAAVAVLSRKAVRRA (107-120)	78

Los fragmentos peptídicos de NGF humano se diluyeron en PBS con DMSO al 5%, 1 mM EDTA, pH 6.23. La concentración peptídica final se normalizó a la misma concentración molar a 55 µM (alrededor de 100 µg/ml). Los péptidos se incubaron en placas de microtitulación de 96 pocillos, activadas con maleimida Reacti-Bind (Pierce Cat. # 15150), 100 µl/pocillo, a temperatura ambiente durante 2 horas y luego a 4°C de un día para otro con agitación. NGF humano (100 µg/ml) se utilizó como control positivo. Las placas se lavaron con amortiguador acuoso (KPL) y se bloquearon con leche en polvo descremada al 0.2% (en amortiguador PBS-EDTA, pH 6.23) durante 2 horas a temperatura ambiente y luego se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 5% durante 1 hora. Las placas se incubaron entonces con el anticuerpo anti-NGF humano en varias concentraciones (0, 3, 10, 30 µg/ml), seguido por anti-hFc Ab-HRP (KPL) en cabra durante 2 horas. Se desarrolló una señal con el sustrato TMB y se leyó a 450 nm, luego de la adición de la solución de terminación (KPL).

A través de los 23 péptidos de NGF humano, se observaron por lo menos 4 picos principales, indicando unión de 4D4. Estos picos correspondían a los siguientes péptidos: Péptido # 1 (SEQ ID NO: 56), SSSHPIFHRGEFSVC (1-15); Péptido # 10 (SEQ ID NO: 65), NSVFKQYFFETKARD (46-60); Péptidos # 16 - 17 (SEQ ID NO: 71-SEQ ID NO: 72), WNSYATTTHTFVKAL--- (76-95); y Péptidos # 18-21 (SEQ ID NO: 73 -SEQ ID NO: 76), TTTHT--- LSRKC (100-115).

Los cuatro picos de unión de 4D4 se mapearon al término N, al término C, a los dominios internos, así como a los bucles L2 y L4 en NGF, como se describe en Weismann *et al.*, (1999, *Nature* 401:184-8). Estos resultados se recopilan en Tabla 9.

Tabla 9

Epítomos hNGF	Término N	L2	Internos	L4	Internos	Términos C
Péptido #	Péptido # 1 (SEQ ID NO: 56), SSSHPI---, 1-15	Péptido # 10 (SEQ ID NO: 65), NSVFKQ---, 46-60	Péptido # 16 (SEQ ID NO: 71), WNSYA---, 76-90	Péptido # 17 (SEQ ID NO: 72), TMDGKQ---, 81-95	Péptido # 19 (SEQ ID NO: 74), TMDGK---, 91-105	Péptidos # 20-21 (SEQ ID NO: 75- SEQ ID NO:76), QAAWR---, 96- 115
Señal de unión de Ab	+++	+	++	++	+++	++

Wiesmann *et al.*, resolvieron la estructura cristalina de hNGF unido al receptor trkA, mostrando que el término N (residuos 2-9) era importante para la unión de receptor (Wiesmann *et al.*, 1999, *Nature* 401:184-8). Los residuos de este segmento en NGF fueron también importantes para la especificidad para trkA sobre los receptores trkB o trkC. El anticuerpo 4D4 es selectivo para el NGF humano sobre el NGF de ratón/rata, así como BDNF y NT-3 muy probablemente en razón de diferencias N-terminales entre el NGF humano y otras neurotrofinas.

El anticuerpo 4D4 se une al péptido #10 (SEQ ID NO: 65) (NSVFK---, 46-60) y al péptido #17 (SEQ ID NO: 72) (TTTHTFVKALTMDGKC, 81-95), correspondientes respectivamente a los bucles L2 y L4, que representan dos de siete regiones distintas con una diversidad de secuencia más alta que el promedio entre las neurotrofinas. Experimentos de intercambio entre NGF y BDNF de estas siete regiones mostraron que L2 y L4 fueron importantes para la actividad biológica de NGF. Por lo demás, la sustitución de cinco residuos NT3 en los bucles L2 y L4 con los de NGF introdujo actividad tipo NGF manteniendo al mismo tiempo la actividad NT3. Por consiguiente, L2 y L4 son regiones probables en las que el anticuerpo 4D4 se une selectivamente a NGF más que a BDNF o NT-3.

El anticuerpo 4D4 se une igualmente al péptido #16 (SEQ ID NO: 71) (WNSYATTTHTFVKAL, 76-90), coincidiendo con un dominio interno de la estructura cristalina de NGF. Esta región es 100% homóloga entre el NGF humano y el NGF de ratón, pero distinta de otras neurotrofinas. 4D4 mostró una actividad mucho más débil contra NGF de rata/ratón, comparada con su actividad contra NGF humano. Por consiguiente, la unión a esta parte del NGF es muy probablemente no crítica para especificidad de especies, pero es importante para selectividad entre neurotrofinas.

El anticuerpo 4D4 se une asimismo a la región C-terminal de NGF (péptidos # 19-21 (SEQ ID NO: 74 - SEQ ID NO: 76) TMDGK---LSRKC, 91-115), la cual es una de las regiones del NGF humano que distingue NGF de otras neurotrofinas (BDNF y NT3). La unión a esta región ayuda a explicar por qué 4D4 no es activo contra otras neurotrofinas. Por lo demás, existe una diferencia de un solo aminoácido entre el NGF humano y el NGF de ratón en el término C, sugiriendo que este solo aminoácido puede ser una de las razones por las que 4D4 es selectivo para el NGF humano sobre el NGF de rata/ratón,

similar al término N donde se observan diferencias de especie.

Por último, el 4D4 interactúa igualmente con un dominio interno descrito por el péptido #10 (SEQ ID NO: 65) (---KARDC, 50-60) del NGF humano, que es una región importante para la unión de NGF preferencialmente a trkA, más que a trkB o trkC, explicando además su actividad de neutralización selectiva contra el NGF humano.

Ejemplo 9

Cuantificación de la Afinidad de Anticuerpos Monoclonales por KinExA

La unión de Ab 4D4 (38859-80) a huNGF (29714-91) se analizó en KinExA. En resumen, Reacti-Gel 6x (Pierce) se pre-cubrieron con huNGF y bloquearon con BSA. Se incubaron 10 pM y 30 pM de muestras de Ab 4D4 en varias concentraciones de huNGF (Amgen) a temperatura ambiente durante 8 horas antes de correrse a través de las microperlas recubiertas con huNGF. La cantidad de anticuerpo unido a la microperla se cuantificó mediante anticuerpo anti-IgG humana en cabra, marcada con fluorescencia (Cy5) (Jackson Immuno Research). La señal de unión fue proporcional a la concentración del anticuerpo libre en equilibrio. Se obtuvo la constante de equilibrio de disociación (K_D) de la regresión no lineal de las curvas de competición, usando un modelo de unión homogénea de un sitio con curva dual (software KinEx™). La K_D fue alrededor de 4 pM para la unión del Ab 4D4 a huNGF.

Ejemplo 10

Identificación de anticuerpos anti-NGF adicionales

Anticuerpos anti-NGF adicionales (designados 14D10, 6G9, 7H2, 14F11, y 4G6), generados e identificados como se describe en Ejemplos 2 y 3 más arriba, se seleccionaron para estudio posterior. En pocas palabras, se analizó medio acondicionado con respecto a la actividad de unión. Anticuerpos del medio se purificaron y secuenciaron. La masa predicha se comparó con datos de espectrometría de masas de anticuerpos del medio acondicionado. Los anticuerpos se clonaron. Dos de los clones se expresaron en células CHO y se analizaron con respecto a su actividad, como se describe anteriormente. Los

153 p39

resultados se muestran en Tabla 10.

Tabla 10

Clon	IC50@ hNGF (nM)	IC50@ rNGF (nM)	Notas	Clon Molecular	IC50@ hNGF (nM)	IC50@ rNGF (nM)
7H2	3.294	1.748	clonado	7H2-rFc	0.963	0.792
6H9	3.172	1.699	clonado	6H9-rFc	13.93	0.653
14D10	0.3918	> 13	clonado			
14D11	0.2803	> 20	clonado			
4G6	0.414	> 10	clonado			

Las secuencias de las regiones variables de cadena liviana y cadena pesada de estos anticuerpos se compararon entonces con la secuencia del anticuerpo 4D4, como entre sí (Figuras 5 y 6). Las homologías porcentuales de las regiones variables de cadena pesada, como se identifica a partir de estas comparaciones, se muestran en Tabla 11. Las homologías porcentuales de las regiones variables de cadena liviana se muestran en Tabla 12. Adicionalmente, las homologías porcentuales de las regiones CDR de los diferentes anticuerpos se muestran en Figuras 5-10.

Tabla 11

	4D4VH	14D10VH	6H9VH	7H2VH	14D11 VH	4G6VH
4D4VH	100%	70.9%	70.1%	75.6%	47.2.%	73.4%
14D10VH		100%	95.3%	85%	54.3%	81.1%
6H9VH			100%	86.6%	54.3%	81.1%
7H2VH				100%	51.2%	79.8%
14D11 VH					100%	56.8%
4G6VH						100%

Tabla 12

	V4D4 VK	14D11 LC	4G6a LC	4G6b LC	4G6c LC	14D10 LC	6H9LC	4G6d LC	7H2LC	4G6e
V4D4 VK	100%	89%	91%	72%	74%	69%	71%	71%	70%	73%
14D11 LC		100%	94%	68%	71%	67%	68%	68%	68%	70%
4G6a LC			100%	69%	74%	68%	70%	70%	69%	71%
4G6b LC				100%	87%	83%	86%	86%	86%	96%
4G6c LC					100%	91%	94%	94%	94%	91%

154 40

14D10 LC						100%	91%	94%	94%	86%
6H9 LC							100%	99%	98%	89%
4G6d LC								100%	99%	89%
7H2 LC									100%	
4G6e										100%

Ejemplo 11

Seguridad y tolerabilidad del anticuerpo NGF subcutáneo en humanos

Los objetivos de este estudio eran evaluar la seguridad y tolerabilidad de dosis subcutáneas (SC) múltiples de anticuerpos al factor de crecimiento nervioso (anticuerpo NGF) en sujetos con dolor de rodilla por osteoartritis (OA) y examinar la farmacocinética sérica (PK - *pharmacokinetics*) de anticuerpos NGF, luego de la administración de dosis SC múltiples de los anticuerpos NGF a sujetos con dolor de rodilla por OA. Se evaluaron los beneficios clínicos de dosis SC múltiples mediante el Índice de Artritis de la Universidades Western Ontario y McMaster [WOMAC™3.1].

Se condujo un estudio con escalamiento de dosis, con dosis múltiples, controlado por placebo, doble ciego, aleatorizado, secuencial, de fase I, en sujetos con dolor de rodilla por OA. El diseño del estudio incluía 4 cohortes de sujetos con 8 sujetos en cada cohorte (n=32). Se usaron tres niveles de dosis (3 mg, 10 mg, 20 mg) de anticuerpos NGF. Los anticuerpos NGF utilizados en este estudio fueron anticuerpos monoclonales completamente humanos elaborados en forma similar a los procedimientos indicados (¿en esta especificación? - ¿queremos confirmar/aclarar los métodos de producción de estos mAbs de fase I?).

Aunque la variabilidad de los datos de eficacia era enorme y el estudio no se inició para evaluar la significación estadística de las mediciones de eficacia, los efectos del tratamiento relacionado con el dolor fueron evidentes. Puntajes WOMAC totales medios, puntajes de subcategoría WOMAC medios, evaluación media de enfermedad global por el paciente, y evaluaciones medias de enfermedad global por el médico mostraron una tendencia general de la mejora en el primer punto de tiempo, luego de la primera dosificación en los grupos de

tratamiento con efectos mantenidos de principio a fin del período de dosificación. Estas tendencias no fueron tan evidentes en el grupo con placebo. Luego de la dosis final del anticuerpo NGF, los efectos del tratamiento tendieron hacia los valores de referencia con el transcurso del tiempo.

Luego de la administración de dosis SC únicas o múltiples a sujetos con dolor de rodilla por OA, la exposición al anticuerpo NGF pareció aumentar aproximadamente en proporción a la dosis en el rango posológico de 3 mg a 20 mg. El T_{max} mediano varió desde 7.5 a 11.5 días. Se reportaron acontecimientos adversos (AEs - *adverse events*) como relacionados con el tratamiento para 10 sujetos (56%) en los grupos de tratamiento y para 2 sujetos (33%) en el grupo con placebo. Ninguno de los sujetos discontinuó el estudio anticipadamente debido a los AEs. Sin embargo, debido a AEs neurosensoriales Grado 2, la regla de detención especificada por el protocolo se hizo aplicable, de modo que 5 sujetos en una cohorte (2 con placebo, 3 tratados) no recibieron la dosis cuarta y final del producto de investigación. Los AEs neurosensoriales parecieron ser dependientes de la dosis.

En sujetos con OA masculinos y femeninos entre las edades de 36 y 63 años, una dosificación SC múltiple pareció ser bien tolerada con las dosis administradas en este estudio, excepto para posibles acontecimientos neurosensoriales dependientes de la dosis, emergentes del tratamiento (benignos o moderados en gravedad), reportados para 4 de 6 sujetos que recibieron 20 mg del anticuerpo. La exposición al anticuerpo NGF pareció aumentar aproximadamente en proporción a la dosis en el rango posológico de 3 mg a 20 mg. La semi-vida de fase terminal ($t_{1/2, z}$) varió desde 20.3 a 26.4 días.

Debe entenderse que la divulgación que antecede enfatiza ciertas modalidades específicas de la invención y que todas las modificaciones o alternativas equivalentes a ella se encuentran dentro del espíritu y el ámbito de la invención como se expone en las reivindicaciones anexas.

Reivindicamos:

1. Un método de tratar una afección causada por la expresión incrementada del factor de crecimiento nervioso (NGF) o sensibilidad cada vez mayor a NGF, método que incluye administrar a un paciente oralmente, mediante inyección por vías intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimatosa), intracerebroventricular, intramuscular, intra-ocular, intraarterial, intraportal, intralesional o subcutánea, mediante sistemas de liberación sostenida o mediante dispositivos de implantación, una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo NGF.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la inyección es una inyección subcutánea.
3. El método de la reivindicación 2, en donde la cantidad farmacéuticamente efectiva del anticuerpo NGF es desde alrededor de 3 mg a alrededor de 30 mg por inyección subcutánea.
4. El método de la reivindicación 2, en donde la inyección subcutánea comprende múltiples inyecciones subcutáneas.
5. El método de la reivindicación 1, en donde la afección es dolor agudo, dolor dental, dolor proveniente de trauma, dolor quirúrgico, dolor resultante de amputación o absceso, causalgia, enfermedades desmielinizantes, neuralgia del trigémino, cáncer, alcoholismo crónico, infarto, síndrome de dolor del tálamo, diabetes, síndrome de inmunodeficiencia adquirida ("SIDA"), toxinas, quimioterapia, cefalea general, migraña, cefalea en racimos, síndromes vasculares-mixtos y no vasculares, cefalea por tensión, inflamación general, artritis, enfermedades reumáticas, lupus, osteoartritis, fibromialgia, trastornos inflamatorios del colon y el recto, síndrome del intestino irritable, trastornos oculares inflamatorios, trastornos inflamatorios o trastornos de la vejiga inestable, psoriasis, dolencias de la piel con componentes inflamatorios, eritema solar, carditis, dermatitis, miositis, neuritis, collagenopatías vasculares, afecciones inflamatorias crónicas, dolor inflamatorio e hiperalgesia asociada y alodinia, dolor neuropático e hiperalgesia asociada o alodinia, dolor neuropático diabético, causalgia, distrofia simpática refleja, síndromes de desaferenciación, asma, daño

tisular epitelial o disfunción, herpes simple, alteraciones de la motilidad visceral en regiones respiratorias, genitourinarias, gastrointestinales o vasculares, heridas, quemaduras, reacciones cutáneas alérgicas, pruritis, vitíligo, trastornos gastrointestinales generales, colitis, ulceración gástrica, úlceras duodenales, rinitis vasomotora o alérgica, o trastornos bronquiales, dismenorrea, dispepsia, reflujo gastroesofágico, pancreatitis, o visceralgia.

6. El método de la reivindicación 5, en donde la osteoartritis es dolor de rodilla por osteoartritis.
7. El método de la reivindicación 6, en donde la inyección es una inyección subcutánea.
8. El método de la reivindicación 7, en donde la cantidad farmacéuticamente efectiva del anticuerpo NGF es desde alrededor de 3 mg a alrededor de 30 mg por inyección subcutánea.
9. El método de la reivindicación 1, que incluye administrar una composición farmacéutica que contiene un portador farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo aislado, en donde el anticuerpo comprende una cadena liviana que incluye SEQ ID NO. 44 y una cadena pesada que incluye SEQ ID. NO. 40.
10. El método de la reivindicación 9, en donde la cadena pesada y la cadena liviana del anticuerpo se conectan por un conector flexible para formar un anticuerpo de cadena única.
11. El método de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo NGF es un anticuerpo Fab'.
12. El método de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo NGF es un anticuerpo (Fab')₂.
13. El método de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo NGF es completamente humano.
14. El método de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo NGF es humanizado.
15. El método de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo NGF inhibe la

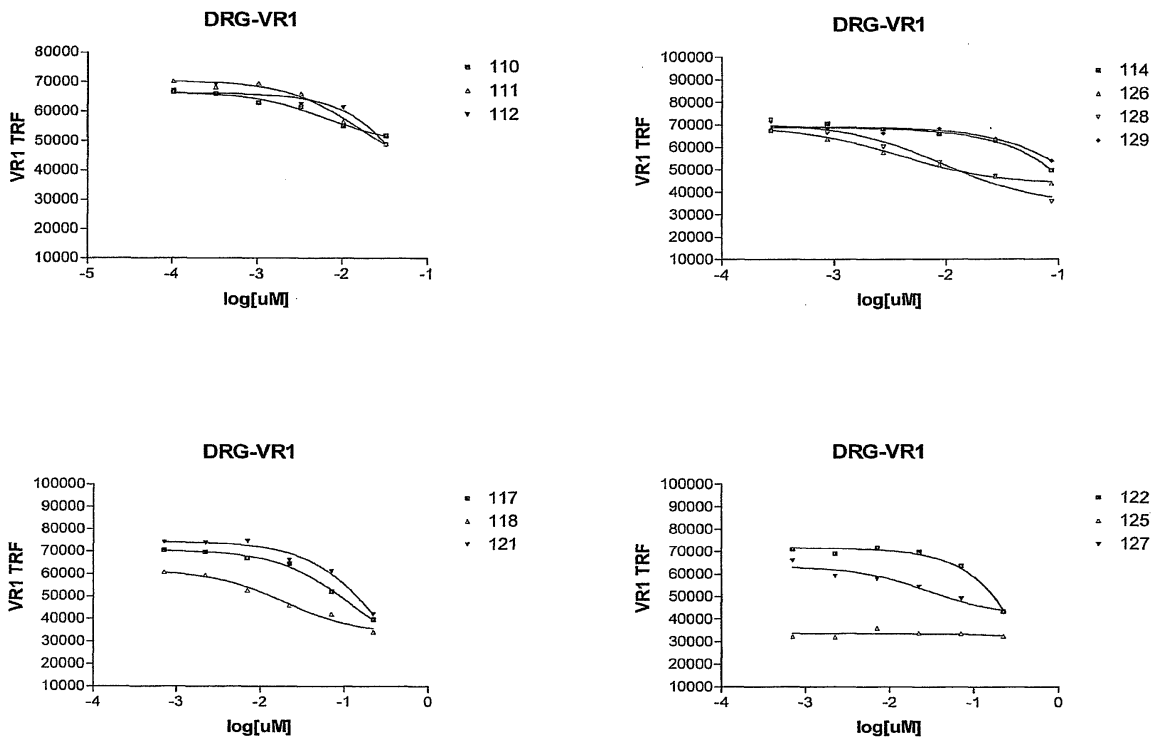
señalización de NGF.

16. El método de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo NGF comprende una cadena liviana que incluye SEQ ID NO: 44 y una cadena pesada que incluye SEQ ID NO: 40 y la cadena pesada y la cadena liviana del anticuerpo se conectan por un conector flexible para formar un anticuerpo de cadena única.
17. El método de la reivindicación 16, en donde el anticuerpo NGF es un anticuerpo Fv de cadena única.
18. El método de la reivindicación 16, en donde el anticuerpo NGF es un anticuerpo Fab'.
19. El método de la reivindicación 16, en donde el anticuerpo NGF es un anticuerpo (Fab')₂.
20. El método de la reivindicación 16, en donde el anticuerpo NGF es completamente humano.
21. El método de la reivindicación 16, en donde el anticuerpo NGF es humanizado.
22. El método de la reivindicación 16, en donde el anticuerpo NGF inhibe la señalización de NGF.
23. El método de la reivindicación 16, en donde el anticuerpo NGF se disocia de un polipéptido NGF humano con una K_D de alrededor de 1×10^{-9} o menos y neutraliza la bioactividad del NGF humano en un análisis *in vitro* estándar con una IC₅₀ de alrededor de 1×10^{-8} o menos.
24. El método de la reivindicación 16, en donde el anticuerpo NGF se disocia de un polipéptido NGF humano con una K_D de alrededor de 1×10^{-10} o menos y neutraliza la bioactividad del NGF humano en un análisis *in vitro* estándar con una IC₅₀ de alrededor de 1×10^{-9} o menos.
25. El método de la reivindicación 16, en donde el anticuerpo NGF se disocia de un polipéptido NGF humano con una K_D de alrededor de 1×10^{-11} o menos y neutraliza la bioactividad del NGF humano en un análisis *in vitro* estándar con una IC₅₀ de alrededor de 0.2×10^{-9} o menos.

RESUMEN

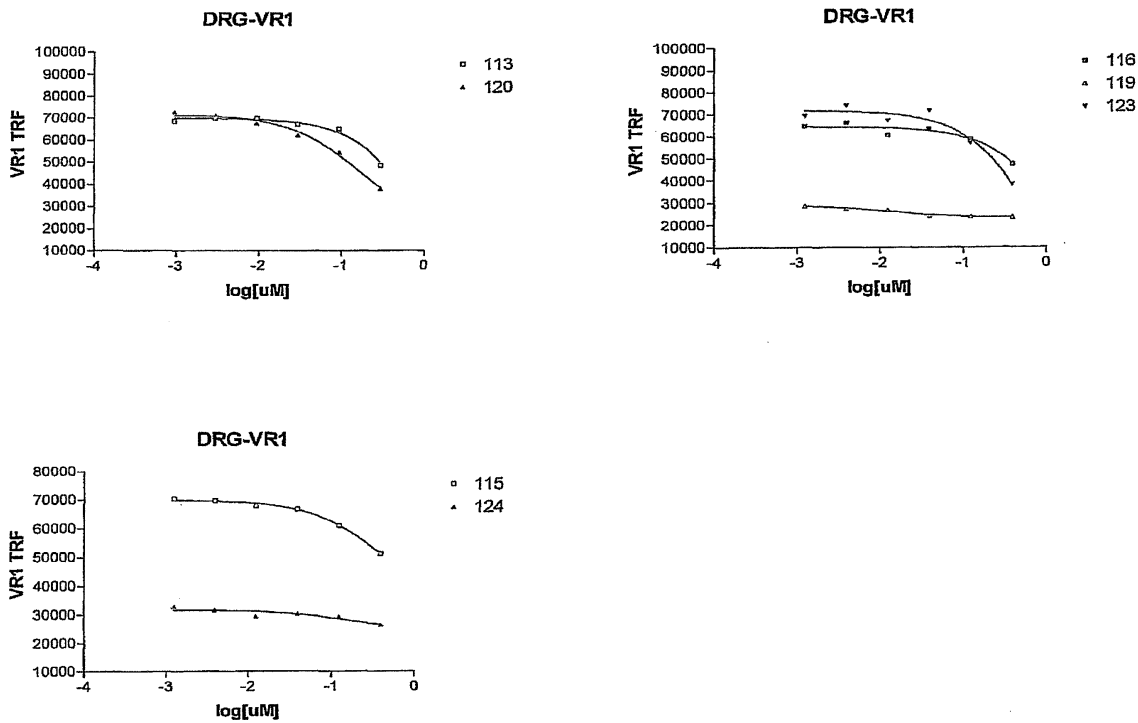
Esta invención provee anticuerpos que interactúan con el factor de crecimiento nervioso (NGF – *nerve growth factor*) humano o se unen a él y, por consiguiente, neutralizan la función del NGF. La invención proporciona además composiciones farmacéuticas de los citados anticuerpos y métodos para neutralizar la función NGF y, particularmente, para tratar trastornos relacionados con NGF (v.g., dolor crónico) administrando una cantidad farmacéuticamente efectiva de anticuerpos anti-NGF. Se ofrecen asimismo métodos de detectar la cantidad de NGF en una muestra usando anticuerpos anti-NGF.

FIGURA 1 (a)



160
4/6

FIGURA 1 (b)



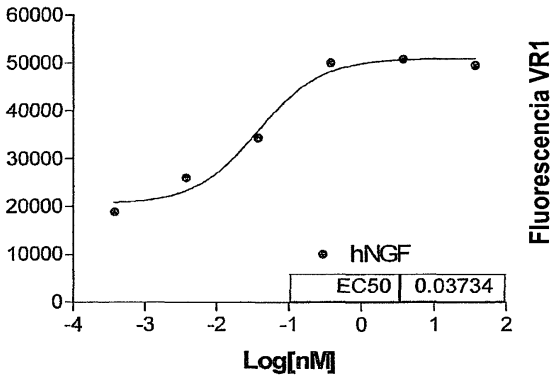
HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

101

16248

FIGURA 2

hNGF en la Expresión de VR1



hAnti-NGF (vs. hNGF 0.38 nM)

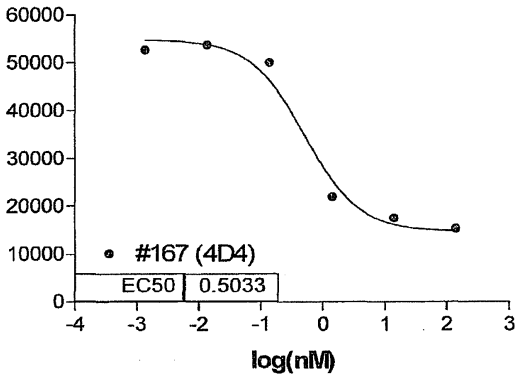
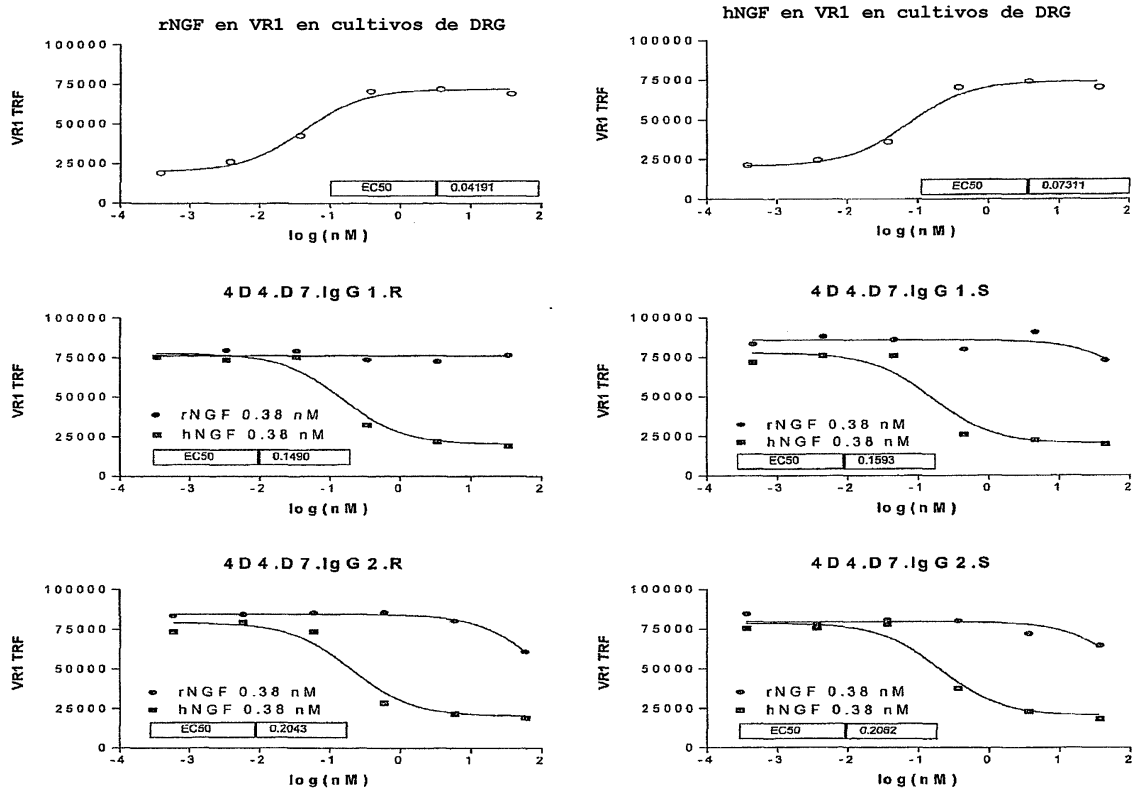
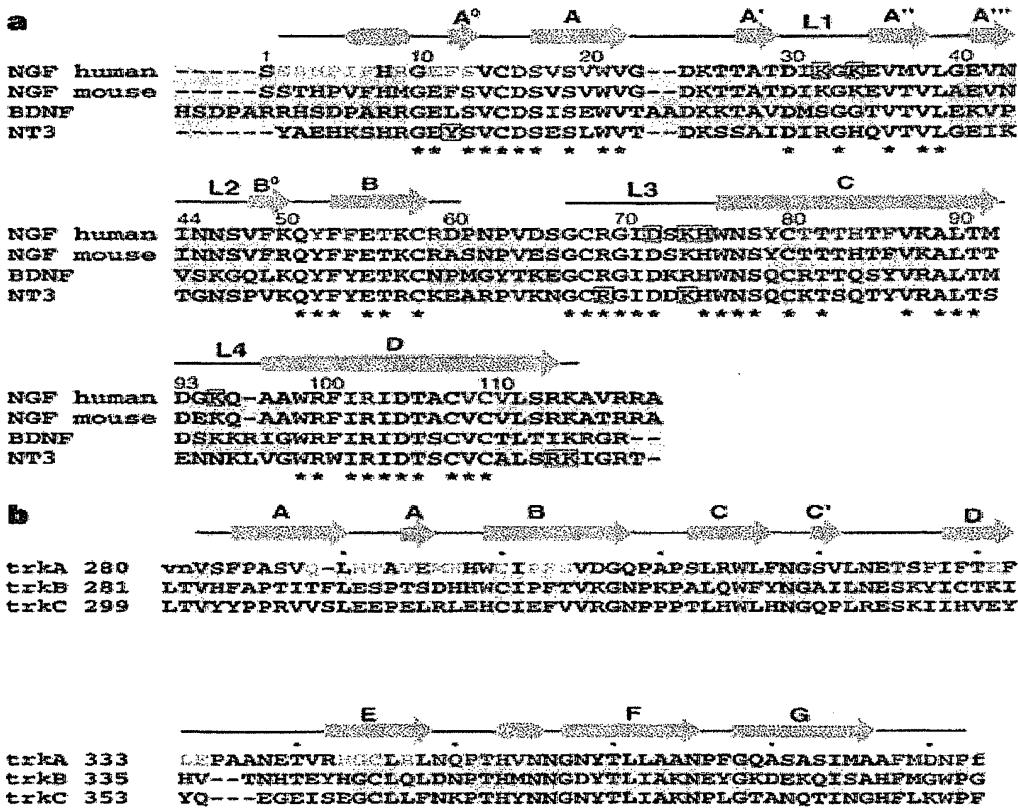


FIGURA 3



HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

FIGURA 4



14

FIGURA 5

Alineamientos de cadena pesada CDR1 de NGF/ % de identidad

(1) 1 5
14D10 HC CDR1 (1) DYAMH
6H9 HC CDR1 (1) DYAMH
7H2 HC CDR1 (1) DYAMH
4G6 HC CDR1 (1) DYGMN
14D11 HC CDR1 (1) TYWIG
4D4 HC CDR1 (1) SYSMN

	14D10 HC CDR1	6H9 HC CDR1	7H2 HC CDR1	4G6 HC CDR1	14D11 HC CDR1	4D4 HC CDR1
14D10 HC CDR1	100	100	100	60	20	40
6H9 HC CDR1		100	100	60	20	40
7H2 HC CDR1			100	60	20	40
4G6 HC CDR1				100	20	60
14D11 HC CDR1					100	20
4D4 HC CDR1						100

FIGURA 6

Alineamientos de cadena pesada CDR2 de NGF/ % de identidad

(1) 1 17
14D10 HC CDR2 (1) GISWNRGIIGYADSVRG
6H9 HC CDR2 (1) GISWNRGIIGYAGSVRG
7H2 HC CDR2 (1) GITWNSGILGYADSVRG
4G6 HC CDR2 (1) DINWNGGSTGYADSVRG
4D4 HC CDR2 (1) YISRSSHTIFYADSVRG
14D11 HC CDR2 (1) IIYPGDSDTKYSPSFQG

	14D10 HC CDR2	6H9 HC CDR2	14D11 HC CDR2	4D4 HC CDR2	4G6 HC CDR2	7H2 HC CDR2
14D10 HC CDR2	100	94	24	59	70	82
6H9 HC CDR2		100	24	53	65	76
14D11 HC CDR2			100	24	29	24
4D4 HC CDR2				100	47	53
4G6 HC CDR2					100	70
7H2 HC CDR2						100

FIGURA 7

Alineamientos de cadena pesada CDR3 de NGF/ %
de identidad

	(1)	1	17
14D10 HC CDR3	(1)	GYVGSGRPGYFYYVMDV	
6H9 HC CDR3	(1)	GYVGSGRPGYFYYVMDV	
14D11 HC CDR3	(1)	-NYVGSGTYNYFYGMNV	
4G6 HC CDR3	(1)	--EQWLDEYYNYGMDV	
4D4 HC CDR3	(1)	-VYS-SGWHVSDY-FDY	
7H2 HC CDR3	(1)	---EGSGR---YYNFDY	

	14D10 HC CDR3	6H9 HC CDR3	14D11 HC CDR3	4G6 HC CDR3	4D4 HC CDR3	7H2 HC CDR3
14D10 HC CDR3	100	100	35	41	18	18
6H9 HC CDR3		100	35	41	18	18
14D11 HC CDR3			100	53	29	35
4G6 HC CDR3				100	18	29
4D4 HC CDR3					100	41
7H2 HC CDR3						100

FIGURA 8

Alineamientos de cadena liviana CDR1 de NGF/ % de identidad

(1) 1

12

14D11 LC CDR1 (1) RASQGI8IWIA-

4G6 LC CDR1 20031028340 (1) RASQGI8SWIA-

4D4 LC CDR1 (1) RASQGI8SALA-

4G6 LC CDR1 20031028351 (1) RASQGV8SYLA-

14D10 LC CDR1 (1) RASQSV8SGFLA

4G6 LC CDR1 20031000528 (1) RASQSV8SYLA-

4G6 LC CDR1 20031071526 (1) RASQSV8SSSYLA

6H9 LC CDR1 (1) RASQSV8SSSYLA

7H2 LC CDR1 (1) RASQSV8SSSYLA

NGF 4G6 LC CDR1 20031028344 (1) RASQSV8SSSYLA

	14D11 LC CDR1	4G6 LC CDR1 20031028340	4D4 LC CDR1	4G6 LC CDR1 20031028351	14D10 LC CDR1	4G6 LC CDR1 20031000528	4G6 LC CDR1 20031071526	6H9 LC CDR1
14D11 LC CDR1	100	92	83	75	42	67	42	42
4G6 LC CDR1 20031028340		100	92	83	50	75	50	50
4D4 LC CDR1			100	83	50	75	50	50
4G6 LC CDR1 20031028351				100	58	92	58	58
14D10 LC CDR1					100	67	83	83
4G6 LC CDR1 20031000528						100	67	67
4G6 LC CDR1 20031071526							100	100
6H9 LC CDR1								100
7H2 LC CDR1								
NGF 4G6 LC CDR1 20031028344								

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

FIGURA 9

Alineamientos de cadena liviana CDR2 de NGF/ %
de identidad

(1) 1 7
14D11 LC CDR2 (1) ~~DASSI~~ ~~CS~~
4G6 LC CDR2 20031028340 (1) ~~DASSI~~ ~~CS~~
4D4 LC CDR2 (1) ~~DASSI~~ ~~CS~~
4G6 LC CDR2 20031000528 (1) ~~DASNRAT~~
4G6 LC CDR2 20031028351 (1) ~~DASNRAT~~
6H9 LC CDR2 (1) ~~VASSRAT~~
14D10 LC CDR2 (1) ~~EASSRAT~~
4G6 LC CDR2 20031071526 (1) ~~EASSRAT~~
7H2 LC CDR2 (1) ~~EASSRAT~~
NGF 4G6 LC CDR2 20031028344 (1) ~~EASSRAT~~

	14D11 LC CDR2	4G6 LC CDR2 20031028340	4D4 LC CDR2	4G6 LC CDR2 20031000528	4G6 LC CDR2 20031028351	6H9 LC CDR2	14D10 LC CDR2	4G6 LC CDR2 20031071526	7H2 LC CDR2	NGF 4G6 LC CDR2 20031028344
14D11 LC CDR2	100	100	71	28	28	43	43	43	43	43
4G6 LC CDR2 20031028340		100	71	28	28	43	43	43	43	43
4D4 LC CDR2			100	43	43	43	43	43	43	43
4G6 LC CDR2 20031000528				100	100	71	71	71	71	71
4G6 LC CDR2 20031028351					100	71	71	71	71	71
6H9 LC CDR2						100	86	86	86	86
14D10 LC CDR2							100	100	100	100
4G6 LC CDR2 20031071526								100	100	100
7H2 LC CDR2									100	100
NGF 4G6 LC CDR2 20031028344										100

FIGURA 10

Alineamientos de cadena liviana CDR3 de NGF/ % de identidad

(1) 1 9
14D10 LC CDR3 (1) QQYGSSEPYT
7H2 LC CDR3 (1) QQYGSSE-YT
6H9 LC CDR3 (1) QQYGSSEPYT
4G6 LC CDR3 20031000528 (1) QQRSNWPEWT
4G6 LC CDR3 20031028351 (1) QQRSNWHRTE
14D11 LC CDR3 (1) QQANSFPEWT
4D4 LC CDR3 (1) QQFNSEYPLT
4G6 LC CDR3 20031028340 (1) QQYNSEYPEWT
4G6 LC CDR3 20031071526 (1) QQYNSEYPEWT
NGF 4G6 LC CDR3 20031028344 (1) QQYGSSEPYT

	14D10 LC CDR3	7H2 LC CDR3	6H9 LC CDR3	4G6 LC CDR3 20031000528	4G6 LC CDR3 20031028351	14D11 LC CDR3	4D4 LC CDR3	4G6 LC CDR3 20031028340	4G6 LC CDR3 20031071526	NGF 4G6 LC CDR3 20031028344
14D10 LC CDR3	100	89	100	44	33	56	56	67	67	100
7H2 LC CDR3		100	89	33	33	44	44	56	56	89
6H9 LC CDR3			100	44	33	56	56	67	67	100
4G6 LC CDR3 20031000528				100	78	56	44	56	56	44
4G6 LC CDR3 20031028351					100	33	33	33	33	33
14D11 LC CDR3						100	67	78	78	56
4D4 LC CDR3							100	78	78	56
4G6 LC CDR3 20031028340								100	100	67
4G6 LC CDR3 20031071526									100	67
NGF 4G6 LC CDR3 20031028344										100

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

170

FIGURA 11

Alineamiento de regiones variables de cadena liviana
de mAbs 4G6, 7H2, 14D10, 14D11, 4G6, 4D4

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

Sección 1									
	(1)	10	20	30	40	50	67		
4D4 VK	(1)	AIQLTQSPSSLSASVGD	RVTTTCRASQGISS	-ALAWYQKPKGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSG					
NGF 4G6 kappa 20031071526 rc V region	(1)	EIVLTQSPGTLISLSPGERAT	CDR 1	QSVSSSYLAWYQKPGQAP	CDR 2	ASSRATGIPDRFSGSG			
NGF 4G6 LC 20031028344rv region	(1)	EIVLTQSPGTLISLSPGERAT	LSCRASQSVSSSYLAWYQKPGQAP	RLLIYDASSRATGIPDRFSGSG					
NGF 4G6 LC 20031028340rv region	(1)	DIQMTQSPSSLSASVGD	RVTTTCRASQGISS	-WLAWYQKPKGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSG					
NGF 4G6 LC 20031028351rv region	(1)	EIVLTQSPATLSLSPGERAT	LSCRASQGVSS-YLAWYQKPGQAP	RLLIYDASN	RATGIPARFSGSG				
NGF LC 4G6 GR5' pCR4 20031000528V region#2	(1)	EIVLTQSPATLSLSPGERAT	LSCRASQSVSS-YLAWYQKPGQAP	RLLIYDASN	RATGIPARFSGSG				
NGF 14D10 LC 20031028386 rc v region	(1)	EIVLTQSPGTLISLSPGERAT	LSCRASQSVSSGFLLAWFQKPGQAP	RLLIYDASSRAT	AIPDRFSGSG				
NGF 14D11 lc 20031028405 rc v region	(1)	DIQMTQSPSSVSASVGD	RVTTTCRASQGISS-YLAWYQKPKGKAP	RLLIYDASSLQSGVPSRFSGSG					
NGF 6H9 Hu kappa V region no sp 2002120980	(1)	EIVLTQSPGTLISLSPGERAT	LSCRASQSVSSSYLAWYQKPGQAP	RLLIYDASSRAT	GIPDRFSGSG				
NGF 7H2 Hu kappa 2002120984 V region no sp	(1)	EIVLTQSPGTLISLSPGERAT	LSCRASQSVSSSYLAWYQKPGQAP	RLLIYDASSRAT	GIPDRFSGSG				
Sección 2									
	(68)	68	80	CDR 3	108				
4D4 VK	(67)	SGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QYNSYPM	TFGGGTKVEIK					
NGF 4G6 kappa 20031071526 rc V region	(68)	SGTGFTLTISLQPEDFATYYC	QYNSYPM	TFPGQGTKVEIK					
NGF 4G6 LC 20031028344rv region	(68)	SGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QYQGSSEY	TFPGQGTKLEIK					
NGF 4G6 LC 20031028340rv region	(67)	SGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QYNSYPM	TFPGQGTKVEIK					
NGF 4G6 LC 20031028351rv region	(67)	PGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQRSNM	TFPGQGTKVEIK					
NGF LC 4G6 GR5' pCR4 20031000528V region#2	(67)	SGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQRSNM	TFPGQGTKVEIK					
NGF 14D10 LC 20031028386 rc v region	(68)	SGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QYQGSSEY	TFPGQGTKLEIK					
NGF 14D11 lc 20031028405 rc v region	(67)	SGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQANSYPM	TFPGQGTKVEIK					
NGF 6H9 Hu kappa V region no sp 2002120980	(68)	SGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QYQGSSEY	TFPGQGTKLEIK					
NGF 7H2 Hu kappa 2002120984 V region no sp	(68)	SGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QYQGSSEY	TFPGQGTKLEIK					

12 / 13

PCT/US2010/051960

171 18

WO 2011/049758

FIGURA 12

Alineamiento de regiones variables de cadena pesada de mAbs 4D4, 4G6, 14D10, 14D11, 7H2, 6H9

	(1)	1	10	20	30	CDR1	40	50	CDR2	66
4D4 VH	(1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTLR	SYSMNWVRQAPGKGLEWVS	YISRS	SHTIPYADSVKG				
NGF 14D10 HC 20031071581 v region	(1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CTASGFTLR	SYAMHWVRQAPGKGLEWVS	GISWNR	GIIGYADSVKG				
NGF 6H9 HC Hu-Rat 2002120864 final V region	(1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTLR	SYAMHWVRQAPGKGLEWVS	GISWNR	GIIGYAGSVKG				
NGF 7H2 Hu-Rat IgG2b.b 2002118141 final V region	(1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTLR	SYAMHWVRQAPGKGLEWVS	GITWNS	GILGYADSVKG				
NGF 14D11 HC race 20031028394 rc V region	(1)	EVQLVQSGAEVKKPGESLR	ISCKSGYNFT	TYWIGWVRQMPGKGLEWVS	GIIYPG	SDTKYSPSFQG				
NGF 4G6 HC pCR4TOPO 20031028328r V region	(1)	EVQLVESGGGVVRPGGSLRLS	CAASGFTLR	DYGMNWVRQAPGKGLEWVS	DINWNG	GSTGYADSVKG				
					CDR3					
	(67)	67	80	90	100	110	127			
4D4 VH	(67)	RFTISRDNARNSLYLQMDSLR	DEDTAMYYCAR	--	VYSSGWHVSDYFD	-YWGQ	GILTVSS			
NGF 14D10 HC 20031071581 v region	(67)	RFTISRDNARNSLYLQMN	SLRAEDTALYYCARE	GYGSGRPGYFYVMD	YWGQ	TTVTVSS				
NGF 6H9 HC Hu-Rat 2002120864 final V region	(67)	RFTISRDNARNSLYLQMN	SLRAEDTALYYCVKE	GYGSGRPGYFYVMD	YWGQ	TTVTVSS				
NGF 7H2 Hu-Rat IgG2b.b 2002118141 final V region	(67)	RFTISRDNARNSLYLQMN	SLRAEDTALYYCARE	----	EGSGRYYNFD	-YWGQ	TLTVSS			
NGF 14D11 HC race 20031028394 rc V region	(67)	QVTISADKSI	STAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	--	NYGSGTYYYYYG	MNVWGQ	TTVTVSS			
NGF 4G6 HC pCR4TOPO 20031028328r V region	(67)	RFTISRDNARNSLYLQMN	SLRAEDTALYYCAR	--	EQWLDPYYYYYG	MDYWGQ	TTVTVSS			

HOJA DE REEMPLAZO (REGLA 26)

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Kenneth, Wild
Treanor, James
Huang, Haichun
Inoue, Heather
Zhang, Tie J.
Martin, Frank

<120> Anticuerpos Neutralizantes Anti-NGF Humanos como Inhibidores Selectivos de la Vía de NGF

<130> 02-1240

<150> US 60/487,431

<151> 2003-07-15

<160> 138

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 990

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 360
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcttcgacc aggactggct gaatggcaag 600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc cgggatgag 720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg 840
ctggactccg acggctcctt ctctctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

<210> 2
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50	55	60													
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85						90					95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
	115						120					125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130					135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
			165						170					175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
	195						200					205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	210					215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
225					230					235					240
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245						250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
		260						265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
	275						280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295					300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305					310					315					320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
			325						330						

<210> 3
 <211> 978
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
 agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg 120
 tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtcctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc 240
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 300
 aaatgttgtg tcgagtgtccc accgtgtcca gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc 360
 ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 420
 gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc 480
 gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 540
 gtggtcagcg tcctcacgtg tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 600
 aaggtctcca acaaaggcct ccagccccc atcgagaaaa ccatctcaa aaccaaaggg 660
 cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 720
 caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg 780
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac 840
 ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 900
 gtcttctcat gtcctgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 960
 tccctgtctc cgggtaaa 978

<210> 4
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	1	5	10	15
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	20	25	30	
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	35	40	45	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	50	55	60	
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	65	70	75	80
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95	
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	100	105	110	
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	115	120	125	
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	130	135	140	
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	145	150	155	160
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	165	170	175	
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	180	185	190	
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	195	200	205	
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	210	215	220	
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	225	230	235	240
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	245	250	255	
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	260	265	270	

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 5

<211> 981

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

gccagcacca aggggccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60

agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120

tggaactcag gcgccttgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180

ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 300

aaatatggtc ccccatgccc atcatgcca gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 360

ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 420

tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600

tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660

gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 720

aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc 840

gacggctcct tcttctcteta cagcaggcta accgtgraca agagcaggtg gcaggagggg 900

aatgtcttct catgctccgt gakgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960
ctctccctgt ctctgggtaa a 981

<210> 6
<211> 327
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 7

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60

ggaactgcct ctgttggtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120

tggaagggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180

agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240

aaacacaaaag tctacgcttg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaaag 300

agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 8

<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

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

<210> 9
<211> 369
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9

gaggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	ttggtacagc	ctgggggggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggctt	caccttaaga	agttatagca	tgaactgggt	tcgccaggct	120
ccaggggaagg	ggctggagtg	ggtttcatac	attagtcgta	gtagtcatac	catattctac	180
gcagactctg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	atgccaagaa	ttcactgtat	240
ctgcaaattg	acagcctgag	agacgaggac	acggctatgt	attactgtgc	gagagtatat	300
agcagtggct	ggcacgtctc	tgattatttt	gactactggg	gccagggaat	cctgggtcacc	360

gtttcctca 369

<210> 10
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Arg Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Arg Ser Ser His Thr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Tyr Ser Ser Gly Trp His Val Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 11
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 gccatccagt tgaccacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc agtgctttag cctgggtatca gcagaaacca 120

gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt acccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 12
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
Ala Ile Gln Leu 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 Gly Ile Ser Ser Ala
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu 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 Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 13
<211> 42
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 13
gtatatagca gtggctggca cgtctctgat tattttgact ac 42

<210> 14
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Val Tyr Ser Ser Gly Trp His Val Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 15
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
caacagttta atagttaccc gctcact 27

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5
<210> 17
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 17
tacattagtc gtagtagtca taccatattc tacgcagact ctgtgaaggg c 51

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Tyr Ile Ser Arg Ser Ser His Thr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19
gatgcctcca gtttggaag t 21

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 21
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 21
agttatagca tgaac 15

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Ser Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 23
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 23
cgggcaagtc agggcattag cagtgcttta gcc 33

<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 25

<211> 1131

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

gcctccacca	agggcccatc	ggtcttcccc	ctggcgccct	gctccaggag	cacctctggg	60
ggcacagcgg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggt	gacgggtgtcg	120
tggaactcag	gcgccctgac	cagcggcgtg	cacaccttcc	cggctgtcct	acagtcctca	180
ggactctact	ccctcagcag	cgtgggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	cacccagacc	240
tacacctgca	acgtgaatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagag	agttgagctc	300
aaaaccccac	ttggtgacac	aactcacaca	tgcccacggt	gccagagacc	caaatcttgt	360
gacacacctc	ccccgtgccc	acggtgccc	gagcccaa	attgtgacac	acctcccccg	420
tgcccacggt	gccagagacc	caaatcttgt	gacacacctc	cccatgccc	acggtgccc	480
gcacctgaac	tcctgggagg	accgtcagtc	ttcctcttcc	cccaaaaacc	caaggatacc	540
cttatgat	cccgacccc	tgaggtcacg	tgcggtggtg	tggacgtgag	ccacgaagac	600
cccgaggtcc	agttcaagt	gtacgtggac	ggcggtgagg	tgcataatgc	caagacaaag	660
ccgcgggagg	agcagttcaa	cagcacgttc	cgtgtggtca	gcgtcctcac	cgtcctgcac	720
caggactggc	tgaacggcaa	ggagtacaag	tgcaaggctc	ccaacaaagc	cctcccagcc	780
cccatcgaga	aaaccatctc	caaaaccaa	ggacagcccc	gagaaccaca	ggtgtacacc	840
ctgcccccat	cccgaggagga	gatgaccaag	aaccaggtca	gcctgacctg	cctgggtcaaa	900
ggcttctacc	ccagcgacat	cgccgtggag	tgggagagca	gcgggcagcc	ggagaacaac	960
tacaacacca	cgctcccat	gctggactcc	gacggctcct	tcttctctta	cagcaagctc	1020
accgtggaca	agagcagggtg	gcagcagggg	aacatcttct	catgctccgt	gatgcatgag	1080
gctctgcaca	accgcttcac	gcagaagagc	ctctccctgt	ctccgggttaa	a	1131

<210> 26
 <211> 376
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

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

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
370 375

<210> 27

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador PCR para NGF humano

<400> 27
acaccacata tgatcatcatc ccatcccat

<210> 28

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador PCR para NGF humano

<400> 28
accacaggat cctccttatg cacgacgcac agctttacgg 40

<210> 29

<211> 375

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia nucleotídica que codifica met-NGF humano recombinante

<400> 29
catatgtcat catcccatcc catcttccac aggggcgaat tctcgggtgtg tgacagtgtc 60
agcgtgtggg ttggggataa gaccaccgcc acagacatca agggcaagga ggtgatgggtg 120
ttgggagagg tgaacattaa caacagtgtg ttcaaacagt acttttttga gaccaagtgc 180
cgggacccaa atcccgttga cagcgggtgc cggggcattg actcaaagca ctggaactca 240
tattgtacca cgactcacac ctttgtcaag gcgctgacca tggatggcaa gcaggctgcc 300
tggcgggttta tccggataga tacggcctgt gtgtgtgtgc tcagccgtaa agctgtgcgt 360
cgtgcataag gatcc 375

<210> 30

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de met-NGF humano recombinante (1-120)

<400> 30

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

<210> 31

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de cebador 5' para generar el vector de expresión
pCFM1656 (ATCC #
69576

<400> 31
cgatttgatt ctagaaggag gaataacata tggttaacgc gttggaattc ggtac 55

<210> 32

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de cebador 3' para generar el vector de expresión
pCFM1656 (ATCC #
69576

<400> 32
taaactaaga tcttcctcct tattgtatac caattgcgca accttaagc

49

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador PCR

<220>

<221> Dudoso

<222> (18)..(23)

<223> n is a, c, t, or g

<400> 33
ggccggatag gcctccannn nnnt

24

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador PCR

<400> 34
ggggtcaggc tggaactgag g 21

<210> 35

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador PCR

<400> 35
tgaggacgct gaccacacg 19

<210> 36

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador PCR

<400> 36
cagcagaagc ttctagacca ccatggacat gagggtgccc gtcagctcc tggg 54

<210> 37

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador PCR

<400> 37
cttgtcgact caacactctc ccctgttgaa gctc 34

<210> 38

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador PCR

<400> 38
cagcagaagc ttctagacca ccatggagtt ggggctgtgc tgggttttcc ttggt 55

<210> 39

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador PCR

<400> 39
gcatgtcgac tcatttacct ggagacaggg agag 34

<210> 40

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Glu 1	Val	Gln	Leu 5	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly 10	Leu	Val	Gln	Pro	Gly 15	Gly
Ser	Leu	Arg	Leu 20	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser 25	Gly	Phe	Thr	Leu	Arg 30	Ser	Tyr
Ser	Met	Asn 35	Trp	Val	Arg	Gln	Ala 40	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu 45	Glu	Trp	Val
Ser	Tyr 50	Ile	Ser	Arg	Ser	Ser 55	His	Thr	Ile	Phe	Tyr 60	Ala	Asp	Ser	Val
Lys 65	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile 70	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala 75	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr 80
Leu	Gln	Met	Asp	Ser 85	Leu	Arg	Asp	Glu	Asp 90	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr 95	Cys
Ala	Arg	Val	Tyr 100	Ser	Ser	Gly	Trp	His 105	Val	Ser	Asp	Tyr	Phe 110	Asp	Tyr
Trp	Gly	Gln 115	Gly	Ile	Leu	Val	Thr 120	Val	Ser	Ser	Ala	Ser 125	Thr	Lys	Gly
Pro 130	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala 135	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser 140	Thr	Ser	Glu	Ser
Thr 145	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys 150	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr 155	Phe	Pro	Glu	Pro	Val 160
Thr	Val	Ser	Trp	Asn 165	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr 170	Ser	Gly	Val	His	Thr 175	Phe
Pro	Ala	Val	Leu 180	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu 185	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser 190	Val	Val
Thr	Val	Pro 195	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly 200	Thr	Gln	Thr	Tyr 205	Thr	Cys	Asn	Val
Asp 210	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr 215	Lys	Val	Asp	Lys	Thr 220	Val	Glu	Arg	Lys
Cys 225	Cys	Val	Glu	Cys	Pro 230	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro 235	Pro	Val	Ala	Gly	Pro 240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe 245	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys 250	Asp	Thr	Leu	Met	Ile 255	Ser
Arg	Thr	Pro	Glu 260	Val	Thr	Cys	Val	Val 265	Val	Asp	Val	Ser	His 270	Glu	Asp
Pro	Glu	Val 275	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr 280	Val	Asp	Gly	Val	Glu 285	Val	His	Asn

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

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg 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 Met Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln 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 Pro Gly
 435 440 445

Lys

- <210> 41
- <211> 453
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 41

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

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

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

Ser	Tyr	Ile	Ser	Arg	Ser	Ser	His	Thr	Ile	Phe	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asp	Ser	Leu	Arg	Asp	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Val	Tyr	Ser	Ser	Gly	Trp	His	Val	Ser	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	100	105	110	
Trp	Gly	Gln	Gly	Ile	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	115	120	125	
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	130	135	140	
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	145	150	155	160
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	165	170	175	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	180	185	190	
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	195	200	205	
Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	210	215	220	
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	225	230	235	240
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	245	250	255	
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	260	265	270	
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	275	280	285	
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	290	295	300	
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	305	310	315	320
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	325	330	335	

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

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

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

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

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

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

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

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 42

<211> 450

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Arg Ser Ser His Thr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala	Arg	Val	Tyr	Ser	Ser	Gly	Trp	His	Val	Ser	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	100	105	110
Trp	Gly	Gln	Gly	Ile	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	115	120	125
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	130	135	140
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	145	150	155
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	165	170	175
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	180	185	190
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	195	200	205
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	210	215	220
Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	225	230	235
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	245	250	255
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	260	265	270
Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	275	280	285
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	290	295	300
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	305	310	315
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	325	330	335
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	340	345	350
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	355	360	365
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	370	375	380

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

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 43

<211> 499

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Arg Ser Ser His Thr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Val Tyr Ser Ser Gly Trp His Val Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	145	150	155	160
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	165	170	175	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	180	185	190	
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	195	200	205	
Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Leu	Lys	210	215	220	
Thr	Pro	Leu	Gly	Asp	Thr	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	Glu	Pro	225	230	235	240
Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	Glu	Pro	Lys	245	250	255	
Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	260	265	270	
Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	275	280	285	
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	290	295	300	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	305	310	315	320
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Lys	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	325	330	335	
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	340	345	350	
Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	355	360	365	
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	370	375	380	
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	385	390	395	400
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	405	410	415	
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	420	425	430	

Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro
 435 440 445
 Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 450 455 460
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val
 465 470 475 480
 Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 485 490 495
 Ser Pro Gly

<210> 44

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Ala Ile Gln Leu 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 Gly Ile Ser Ser Ala
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu 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 Phe Asn Ser Tyr 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

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> 45

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Phe Phe Glu Thr Lys
1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg
1 5

<210> 47

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

His Trp Asn Ser Tyr
1 5

<210> 48

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Asn Ser Val Glu Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys
1 5 10

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg
1 5

<210> 50

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Glu Val Met Val Leu
1 5

<210> 51

<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51
Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp
1 5 10 15
Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp Lys
20 25

<210> 52
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52
Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val
1 5 10 15
Leu Ser Arg Lys
20

<210> 53
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53
Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys
1 5 10
<210> 54
<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg
1 5

<210> 55

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Gly Glu Phe Ser Val Cys
1 5

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys
1 5 10 15

<210> 57

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Ala Asp Ser Val Ser Val Cys

1 5 10 15

<210> 58

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Glu Phe Ser Val Ala Asp Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp Lys Cys
1 5 10 15

<210> 59

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Asp Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Cys
1 5 10 15

<210> 60

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Trp Val Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Cys
1 5 10 15

<210> 61

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Thr	Thr	Ala	Thr	Asp	Ile	Lys	Gly	Lys	Glu	Val	Met	Val	Leu	Gly	Cys
1				5					10					15	

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Ile	Lys	Gly	Lys	Glu	Val	Met	Val	Leu	Gly	Glu	Val	Asn	Ile	Asn
1				5					10					15

<210> 63

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Val	Met	Val	Leu	Gly	Glu	Val	Asn	Ile	Asn	Asn	Ser	Val	Phe	Lys	Cys
1				5					10					15	

<210> 64

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Glu	Val	Asn	Ile	Asn	Asn	Ser	Val	Phe	Lys	Gln	Tyr	Phe	Phe	Glu	Cys
1				5					10					15	

<210> 65
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65
Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Ala Arg Asp Cys
1 5 10 15

<210> 66
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66
Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Ala Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Cys
1 5 10 15

<210> 67
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67
Thr Lys Ala Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Ser Gly Ala Arg Asp Cys
1 5 10 15

<210> 68
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68

Pro Asn Pro Val Asp Ser Gly Ala Arg Asp Ile Asp Ser Lys His Cys
1 5 10 15

<210> 69

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Ser Gly Ala Arg Asp Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys
1 5 10 15

<210> 70

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Ala Thr Thr Thr His Thr Cys
1 5 10 15

<210> 71

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Trp Asn Ser Tyr Ala Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys Ala Leu Cys
1 5 10 15

<210> 72

<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72
Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Cys
1 5 10 15

<210> 73
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 73
Phe Val Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala Trp Arg Cys
1 5 10 15

<210> 74
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 74
Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Cys
1 5 10 15

<210> 75
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75

Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Ala Val Cys
1 5 10 15

<210> 76

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Ala Val Ala Val Leu Ser Arg Lys Cys
1 5 10 15

<210> 77

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Thr Ala Ala Val Ala Val Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg Ala Cys
1 5 10 15

<210> 78

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Cys Ala Ala Val Ala Val Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg Ala
1 5 10 15

<210> 79

<211> 125

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 79

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

<210> 80

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 80

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ile	Trp
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	His	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
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp				
	85		90	
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys				
	100		105	

<210> 81

<211> 127

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 81

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

<210> 82

<211> 108

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 82

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

<210> 83

<211> 127

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 83

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

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

Val Lys Glu Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Arg Pro Gly Tyr Phe Tyr Tyr
100 105 110

Val Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 84

<211> 108

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 84

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Val Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 85

<211> 121

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 85

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

<210> 86
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 86

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 87

<211> 124

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 87

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Glu Gln Trp Leu Asp Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 88

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 88

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 Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser 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 Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 89
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 89
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Pro Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp His Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 90

<211> 108
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 90

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

<210> 91
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 91

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				

221 207
20

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 92
<211> 5
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 92
Thr Tyr Trp Ile Gly
1 5
<210> 93
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 93
Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 94
<211> 16
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 94

Asn Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asn Val
1 5 10 15

- <210> 95
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> homo sapiens

<400> 95

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ile Trp Leu Ala
1 5 10

- <210> 96
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> homo sapiens

<400> 96

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

- <210> 97
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> homo sapiens

<400> 97

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp Thr
1 5

- <210> 98
- <211> 5

<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 98
Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 99
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 99
Gly Ile Ser Trp Asn Arg Gly Ile Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 100
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 100
Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Arg Pro Gly Tyr Phe Tyr Tyr Val Met Asp
1 5 10 15
Val

<210> 101
<211> 12
<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 101

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Gly Phe Leu Ala
1 5 10

<210> 102

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 102

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 103

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 104

<211> 5

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 104

Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 105
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 105
Gly Ile Ser Trp Asn Arg Gly Ile Ile Gly Tyr Ala Gly Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 106
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 106
Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Arg Pro Gly Tyr Phe Tyr Tyr Val Met Asp
1 5 10 15
Val

<210> 107
<211> 12
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 107
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10
<210> 108

<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 108
Val Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 109
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 109
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 110
<211> 5
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 110
Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 111
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 111

Gly Ile Thr Trp Asn Ser Gly Ile Leu Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

- <210> 112
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> homo sapiens

<400> 112

Glu Gly Ser Gly Arg Tyr Tyr Asn Phe Asp Tyr
1 5 10

- <210> 113
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> homo sapiens

<400> 113

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

- <210> 114
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> homo sapiens

<400> 114

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

- <210> 115

<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 115
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr Thr
1 5

<210> 116
<211> 5
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 116
Asp Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 117
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 117
Asp Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly
<210> 118
<211> 15
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 118

Glu Gln Trp Leu Asp Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 119

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 120

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 120

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 121

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 121

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 122

<211> 11
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 122
Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 123
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 123
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 124
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 124
Gln Gln Arg Ser Asn Trp His Arg Thr
1 5

<210> 125
<211> 12
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 125

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 126
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 126

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 127
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 127

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 128
<211> 11
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 128

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 129
<211> 7

<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 129
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 130
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 130
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp Thr
1 5

<210> 131
<211> 108
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 131
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

				85					90						95
Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

- <210> 132
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> homo sapiens

<400> 132

Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala
1				5					10	

- <210> 133
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> homo sapiens

<400> 133

Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr
1				5		

- <210> 134
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> homo sapiens

<400> 134

Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro	Tyr	Thr
1				5				

- <210> 135
- <211> 120

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 135

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

<210> 136

<211> 120

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 136

Ser	Ser	Thr	His	Pro	Val	Phe	His	Met	Gly	Glu	Phe	Ser	Val	Cys	Asp
1				5					10					15	
Ser	Val	Ser	Val	Trp	Val	Gly	Asp	Lys	Thr	Thr	Ala	Thr	Asp	Ile	Lys
			20					25					30		
Gly	Lys	Glu	Val	Thr	Val	Leu	Ala	Glu	Val	Asn	Ile	Asn	Asn	Ser	Val
		35					40					45			
Phe	Arg	Gln	Tyr	Phe	Phe	Glu	Thr	Lys	Cys	Arg	Ala	Ser	Asn	Pro	Val

50						55						60				
Glu	Ser	Gly	Cys	Arg	Gly	Ile	Asp	Ser	Lys	His	Trp	Asn	Ser	Tyr	Cys	
65					70					75					80	
Thr	Thr	Thr	His	Thr	Phe	Val	Lys	Ala	Leu	Thr	Thr	Asp	Glu	Lys	Gln	
			85						90					95		
Ala	Ala	Trp	Arg	Phe	Ile	Arg	Ile	Asp	Thr	Ala	Cys	Val	Cys	Val	Leu	
			100					105					110			
Ser	Arg	Lys	Ala	Thr	Arg	Arg	Ala									
		115					120									

<210> 137
<211> 126
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 137

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

<210> 138
<211> 119

<213> homo sapiens

[illegible]

237

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/051960

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	A61K39/395 C07K16/22 G01N33/53 C12N15/68 C12N5/10	
	A61P25/00 A61P35/00 A61P19/02 A61P29/02	
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/019266 A2 (AMGEN INC [US]; WILD KENNETH D [US]; TREANOR JAMES J S [US]; HUANG HAI) 3 March 2005 (2005-03-03) page 72, line 13 - page 73, line 19 claims 1,19-50,58-66,86-94 sequences 40,44 table 4	1,5,9-25
X	WO 2006/110883 A2 (RINAL NEUROSCIENCE CORP [US]; ROSENTHAL ARNON [US]; SHELTON DAVID L [U] 19 October 2006 (2006-10-19) paragraph [0265] - paragraph [0270] paragraph [0324] - paragraph [0334] example 9 claims 1-67	1-8, 11-15
	----- -/-	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
"E" earlier document but published on or after the international filing date		
"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)		
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"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		
"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		
"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.		
"Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
17 February 2011		07/03/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Ulbrecht, Matthias

238 24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/051960

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Lane N. et al.: "Tanezumab relieves moderate to severe pain due to osteoarthritis (OA) of the knee: a phase 2 trial", American college of rheumatology 2008 annual scientific meeting , 2008, XP007916873, Retrieved from the Internet: URL:http://acr.confex.com/acr/2008/webprogram/Paper3546.html [retrieved on 2011-01-25] the whole document	1-8, 11-15
A	----- DATABASE Clinical Trials [Online] NIH; 11 March 2010 (2010-03-11), "Efficacy and safety of tanezumab subcutaneous administration in osteoarthritis . a subcutaneous/intravenous bridging study", XP007916935, retrieved from http://clinicaltrials.gov Database accession no. NCT01089725	1-25
L	-& DATABASE Clinical Trials [Online] NIH; 22 July 2010 (2010-07-22), "History of the study", XP007916934, retrieved from http://clinicaltrials.gov Database accession no. NCT01089725 the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2010/051960

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005019266 A2	03-03-2005	AR 045056 A1	12-10-2005
		AU 2004267030 A1	03-03-2005
		AU 2010202177 A1	17-06-2010
		BR PI0412567 A	19-09-2006
		CA 2534585 A1	03-03-2005
		CN 1849138 A	18-10-2006
		EA 200600254 A1	29-12-2006
		EA 201000245 A1	30-12-2010
		EP 1648509 A2	26-04-2006
		HR 20060033 A2	30-04-2007
		JP 4489077 B2	23-06-2010
		JP 2007537703 T	27-12-2007
		JP 2010006812 A	14-01-2010
		JP 2010162028 A	29-07-2010
		MX PA06000583 A	30-03-2006
		NZ 544751 A	31-05-2009
		US 2009155274 A1	18-06-2009
		US 2008033157 A1	07-02-2008
		US 2005074821 A1	07-04-2005
		ZA 200600847 A	31-01-2007

WO 2006110883 A2	19-10-2006	AR 055323 A1	15-08-2007
		AU 2006235559 A1	19-10-2006
		BR PI0610463 A2	22-06-2010
		CA 2604443 A1	19-10-2006
		CN 101217978 A	09-07-2008
		EP 1871416 A2	02-01-2008
		JP 2008535929 T	04-09-2008
		KR 20070119748 A	20-12-2007
		KR 20100135336 A	24-12-2010
		NZ 562229 A	30-04-2010
		US 2011033447 A1	10-02-2011
		ZA 200708362 A	30-12-2009

228
240

PATENT COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)
(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 02-1240-F-CIP-WO	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/PEA/416																								
International application No. PCT/US2010/051960	International filing date (<i>day/month/year</i>) 08.10.2010	Priority date (<i>day/month/year</i>) 09.10.2009																									
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. A61K39/395																											
Applicant Amgen Inc.																											
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ (<i>sent to the applicant and to the International Bureau</i>) a total of <u>2</u> sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority, unless those sheets were superseded or cancelled, and any accompanying letters (see Rules 46.5, 66.8, 70.16, 91.2, and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets containing rectifications, where the decision was made by this Authority not to take them into account because they were not authorized by or notified to this Authority at the time when this Authority began to draw up this report, and any accompanying letters (Rules 66.4bis, 70.2(e), 70.16 and 91.2). ☐ superseded sheets and any accompanying letters, where this Authority either considers that the superseding sheets contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, or the superseding sheets were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box (see Rule 70.16(b)). b. ☐ (<i>sent to the International Bureau only</i>) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3bis of Annex C of the Administrative Instructions).																											
4. This report contains indications relating to the following items: <table style="width: 100%; border: none;"><tr><td style="width: 10%;">☒</td><td style="width: 10%;">Box No. I</td><td>Basis of the report</td></tr><tr><td>☐</td><td>Box No. II</td><td>Priority</td></tr><tr><td>☐</td><td>Box No. III</td><td>Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</td></tr><tr><td>☐</td><td>Box No. IV</td><td>Lack of unity of invention</td></tr><tr><td>☒</td><td>Box No. V</td><td>Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</td></tr><tr><td>☐</td><td>Box No. VI</td><td>Certain documents cited</td></tr><tr><td>☐</td><td>Box No. VII</td><td>Certain defects in the international application</td></tr><tr><td>☒</td><td>Box No. VIII</td><td>Certain observations on the international application</td></tr></table>				☒	Box No. I	Basis of the report	☐	Box No. II	Priority	☐	Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability	☐	Box No. IV	Lack of unity of invention	☒	Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement	☐	Box No. VI	Certain documents cited	☐	Box No. VII	Certain defects in the international application	☒	Box No. VIII	Certain observations on the international application
☒	Box No. I	Basis of the report																									
☐	Box No. II	Priority																									
☐	Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability																									
☐	Box No. IV	Lack of unity of invention																									
☒	Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement																									
☐	Box No. VI	Certain documents cited																									
☐	Box No. VII	Certain defects in the international application																									
☒	Box No. VIII	Certain observations on the international application																									
Date of submission of the demand		Date of completion of this report																									
09.06.2011		22.09.2011																									
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:		Authorized officer																									
European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465		Ulbrecht, Matthias Telephone No. +49 89 2399-7710																									

227
247

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/US2010/051960

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
- ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a) and (b))
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):*

Description, Pages

1-97, 99 as originally filed
98 filed with telefax on 02-08-2011

Sequence listings, SEQ ID NO

1-138 as originally filed

Claims, Numbers

1-25 as originally filed

Drawings, Sheets

1/13-13/13 as originally filed

- ☒ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing *(specify):*
 - ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify):*
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)):
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing *(specify):*

228
242

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US2010/051960

5. ☐ This report has been established:
- ☐ taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.1(d-bis) and 70.2(e)).
 - ☐ without taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91(Rules 66.4bis and 70.2(e)).
6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) has/have been received and taken into account in establishing this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>3, 4, 7, 8, 10, 16-25</u>
	No: Claims	<u>1, 2, 5, 6, 9, 11-15</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-25</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-25</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/US2010/051960

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☐ in the international application as filed
 - ☒ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
 - ☐ to this Authority as an amendment on
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:
 - * *If item 4 in Box No. I applies, the sequence listing, which forms part of the basis of the report, may be marked "superseded."*

Re item V.

1 *Cited documents:*

- D1 WO 2005/019266 A2 (AMGEN INC [US]; WILD KENNETH D [US]; TREANOR JAMES J S [US]; HUANG HAI) 3 March 2005 (2005-03-03)
- D2 WO 2006/110883 A2 (RINAL NEUROSCIENCE CORP [US]; ROSENTHAL ARNON [US]; SHELTON DAVID L [U]) 19 October 2006 (2006-10-19)
- D3 Lane N. et al.: "Tanezumab relieves moderate to severe pain due to osteoarthritis (OA) of the knee: a phase 2 trial", American college of rheumatology 2008 annual scientific meeting, 2008, XP007916873, Retrieved from the Internet: URL:<http://acr.confex.com/acr/2008/webprogram/Paper3546.html> [retrieved on 2011-01-25]

2 *Novelty (Art. 33(2) PCT):*

- 2.1 D1 teaches neutralising anti-NGF antibodies (which can be Fab' or (Fab')₂ fragments as well as human or humanised), including the human mAb 4D4 (IgG1) comprising a light chain comprising SEQ ID No. 44 and a heavy chain comprising SEQ ID No. 40 for use in the treatment of a condition caused by increased expression of or sensitivity to NGF, including pain caused inter alia by osteoarthritis. The antibody is delivered in the form of a pharmaceutical compositions orally, intravenously, intraperitoneally, intracerebrally, intracerebroventricularly, intramuscularly, intro-ocularly, intraarterially, intraportally or intralesionally, by sustained release systems or by implantation devices (p. 72, l. 13 - p. 73, l. 19; claims 1, 19-50, 58-66 and 86-94; SEQ ID Nos. 40 and 44; Tab. 4). Hence, claims 1, 5, 9 and 11-15 lack novelty over D1.
- 2.2 D2 teaches neutralising anti-NGF antibodies which may be Fab' and (Fab')₂ fragments as well as humanised or human in the treatment of conditions caused by increased expression of or sensitivity to NGF, namely of pain caused by osteoarthritis of the knee. The antibodies are administered by different routes including subcutaneously (para. [0265] - [0270]; para. [0324] - [0334]; Example 9; claims 1-67; Table 4). Hence, D2 anticipates claims 1, 2, 5, 6 and 11-15.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2010/051960

- 2.3 D3 (whole document) discloses a treatment of osteoarthritis of the knee by intravenous administration of the neutralising humanised anti- NGF mAb tanezumab. Hence, claims 1, 5, 6, 14 and 15 lacks novelty over D3.
- 2.4 The combinations of features suggested by claims 3, 4, 7, 8, 10 and 16-25 are not disclosed in the art. These claims are thus novel.

3 *Inventive step (Art. 33(3) PCT):*

- 3.1 Claims 3 and 4 relate to dosage regimens falling within the skilled person's routine which, given the teaching of D2, he/she would choose in according to circumstances without the need of an inventive activity if, as in the present case, they are not associated with any surprising technical effect.
- 3.2 The considerations under V.3.1 apply *mutatis mutandis* to claims 7 and 8 in view of D2 or D3.
- 3.3 Claims 10 and 16 propose a flexible linker between the heavy and light chains according to SEQ ID Nos. 40 and 44, respectively. This modification of the antibody providing a single chain antibody is a matter of the skilled person's routine and is proposed in generic terms in D1 (supra). Hence, as no surprising technical effect is associated therewith and inventive step is denied for claims 10 and 16.
- 3.4 The additional features according to claims 17-25 are either inherent to the SEQ ID Nos. 40 and 44 or disclosed by D1 (supra) and therefore unsuitable to establish an inventive step.

4 *Industrial applicability (Art. 33(4) PCT):*

Industrial applicability of the subject-matter of claims 1-25 is acknowledged.

Re item VIII.

- 1 Claims 1-25 are drawn to methods of treatment by therapy of the human/animal body. These claims thus relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of R. 39.1 (iv) / 67.1 (iv) PCT. The patentability can be dependent upon the formulation of such claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

232
24c

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2010/051960

- 2 Claim 1 refers to conditions that are functionally defined as being caused by an increased expression of or sensitivity to NGF. It is not determinable which conditions, in addition to those referred to in claim 5, are covered by this definition thereby obscuring the claim's scope (Art. 6 PCT).
- 3 Claims 3 and 8 refer to doses defined in absolute amounts and not in relation to a body weight. Without such a reference these claims also cover embodiments which contrary to the requirement of Art. 5 PCT do not achieve a therapeutic effect in the diseases to which the claimed second medical use refers to.
- 4 Claim 5 covers a treatment of diseases as such and not of the pain caused thereby. The application fails to support a treatment of said diseases per se and thus the corresponding second medical uses lack enablement contrary to the requirement of Art. 5 PCT.
- 5 SEQ ID Nos. 40 and 44 define a human antibody and joining these sequences by a flexible linker will generate, as stated in claim 16, a single chain antibody, namely an scFv antibody. Therefore, the features proposed for the antibody in general by claims 18-19 and 21 are either inconsistent with those of their independent claim 16 which is limited to an scFv antibody or inherent to said antibody (Art. 6 PCT).
- 6 Claims 23-25 refer to claim 16 defining an antibody in terms of the sequence of its heavy and light chains, respectively, thereby structurally defining its specificity and affinity which give rise to a specific K_D and IC_{50} . Thus, it is not conceivable how these defined properties can be extended by the open end functional definitions according to claims 23-25, inconsistent with the said claims' dependency on claim 16 (Art. 6 PCT). Notwithstanding this issue, the said open end definitions define antibodies having properties that are not realisable by the teaching of the application (Art. 5 PCT).

IN THE EUROPEAN PATENT OFFICE
(Attorney Docket No. 02-1240-F-CIP-WO)

PATENT

In re Application of: Wild *et al.*)
Serial No.: PCT/US10/51960)
Filed: October 8, 2010)
For: Human Anti-NGF Neutralizing)
Antibodies as Selective NGF)
Pathway Inhibitors)

European Patent Office
80298 Munich
Germany

STATEMENT UNDER PCT ARTICLE 34

Sir:

Pursuant to PCT Article 34 and PCT Rules 66.8(a) and (b), Applicants submit an amendment to the specification. A "Replacement Sheet" containing the amendment is attached herewith.

Applicants draw the International Preliminary Examining Authority's attention to the differences between the replaced sheet and the replacement sheet. Lines 16 and 17 have been deleted from page 98 of the specification. These lines have been deleted to correct a typographical error.

If the International Preliminary Examining Authority believes it to be helpful, a representative is invited to contact the undersigned representative by telephone at 312-913-0001.

Respectfully submitted,
McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff LLP

Dated: August 2, 2011

By: 
Kwame N. Mensah, Ph.D., Esq.
U.S. Reg. No. 60,768

259
248

REPLACEMENT SHEET
- 98 -

LC										
14D10 LC						100%	91%	94%	94%	86%
6H9 LC							100%	99%	98%	89%
4G6d LC								100%	99%	89%
7H2 LC									100%	
4G6e										100%

Example 11

Safety and tolerability of subcutaneous NGF antibody in humans

5 The objectives of this study were to evaluate the safety and tolerability of multiple subcutaneous (SC) doses of antibodies to nerve growth factor (NGF antibody) in subjects with osteoarthritis (OA) knee pain and to examine the serum pharmacokinetics (PK) of NGF antibodies following administration of multiple SC doses of the NGF antibodies to subjects with OA knee pain. Clinical benefits of multiple SC doses were assessed by the Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index [WOMACTM3.1].

10 A phase I, sequential randomized, double-blind placebo-controlled, multiple dose, dose escalation study in subjects with OA knee pain was conducted. The study design included 4 cohorts of subjects with 8 subjects in each cohort (n=32). Three dose levels (3 mg, 10 mg, 20 mg) of NGF antibodies were used. The NGF antibodies used in this study were fully human monoclonal antibodies made similar to the procedures set forth.

15 Although variability of the efficacy data was large and the study was not powered to evaluate the statistical significance of the efficacy measures, pain-related treatment effects seemed apparent. Mean total WOMAC scores, mean WOMAC subcategory scores, mean patient global disease assessment, and mean physician global disease assessments showed a general trend of improvement at the first time point after the first dosing in the treatment groups with
20 effects maintained throughout the dosing period. These trends were not as apparent in the placebo group. After the final dose of the NGF antibody, treatment effects trended towards baseline over time.

235
249

LC										
14D10 LC						100%	91%	94%	94%	86%
6H9 LC							100%	99%	98%	89%
4G6d LC								100%	99%	89%
7H2 LC									100%	
4G6e										100%

Ejemplo 11

Seguridad y tolerabilidad del anticuerpo NGF subcutáneo en humanos

Los objetivos de este estudio eran evaluar la seguridad y tolerabilidad de dosis subcutáneas (SC) múltiples de anticuerpos al factor de crecimiento nervioso (anticuerpo NGF) en sujetos con dolor de rodilla por osteoartritis (OA) y examinar la farmacocinética sérica (PK - *pharmacokinetics*) de anticuerpos NGF, luego de la administración de dosis SC múltiples de los anticuerpos NGF a sujetos con dolor de rodilla por OA. Se evaluaron los beneficios clínicos de dosis SC múltiples mediante el Índice de Artritis de la Universidades Western Ontario y McMaster [WOMAC™3.1].

Se condujo un estudio con escalamiento de dosis, con dosis múltiples, controlado por placebo, doble ciego, aleatorizado, secuencial, de fase I, en sujetos con dolor de rodilla por OA. El diseño del estudio incluía 4 cohortes de sujetos con 8 sujetos en cada cohorte (n=32). Se usaron tres niveles de dosis (3 mg, 10 mg, 20 mg) de anticuerpos NGF. Los anticuerpos NGF utilizados en este estudio fueron anticuerpos monoclonales completamente humanos elaborados en forma similar a los procedimientos indicados.

Aunque la variabilidad de los datos de eficacia era enorme y el estudio no se inició para evaluar la significación estadística de las mediciones de eficacia, los efectos del tratamiento relacionado con el dolor fueron evidentes. Puntajes WOMAC totales medios, puntajes de subcategoría WOMAC medios, evaluación media de enfermedad global por el paciente, y evaluaciones medias de enfermedad global por el médico mostraron una tendencia general de la mejora en el primer punto de tiempo, luego de la primera dosificación en los grupos de tratamiento con efectos mantenidos de principio a fin del período de dosificación. Estas tendencias no fueron tan evidentes en el grupo con placebo. Luego de la dosis final del anticuerpo NGF, los efectos del tratamiento tendieron hacia los valores de referencia con el transcurso del tiempo.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) Prioridad (32) Fecha (33) País 12/576,522 09/10/2009 US		(51) Int Cl: A61K 039/395 (71) Solicitante(s) AMGEN INC. y MEDAREX, INC (72) Inventor(es) KENNETH D. WILD Y OTROS (74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 10/05/2012 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 08/10/2010 No. de solicitud PCT/US2010/051960		(87) Publicación internacional Fecha: 28/04/2011 N° publicación: WO 2011/049758	
(54) Titulo: ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES ANTI-NGF HUMANOS COMO INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA VÍA DE NGF			

Resumen:

Esta invención provee anticuerpos que interactúan con el factor de crecimiento nervioso (NGF – *nerve growth factor*) humano o se unen a él y, por consiguiente, neutralizan la función del NGF. La invención proporciona además composiciones farmacéuticas de los citados anticuerpos y métodos para neutralizar la función NGF y, particularmente, para tratar trastornos relacionados con NGF (v.g., dolor crónico) administrando una cantidad farmacéuticamente efectiva de anticuerpos anti-NGF. Se ofrecen asimismo métodos de detectar la cantidad de NGF en una muestra usando anticuerpos anti-NGF.

251

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0041883

Bogotá D.C., Abril 27 de 2012 - 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	157713625	27/04/2012	24.875.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
				\$590.000.00
			=====	

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-075923- -00000-0000

Fecha: 2012-05-09 11:42:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 252

Colo. 15708 - 841 - 002 - 0

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

Abril 27 de 2012 - 16:59:38

252

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0045607

Bogotá D.C., Mayo 09 de 2012 - 11:39:53

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	32595	02/04/2012		5.000.00
RECIBO DE CA	999999999	32596	02/04/2012		5.000.00
RECIBO DE CA	999999999	36506	16/04/2012		30.000.00
RECIBO DE CA	999999999	39277	23/04/2012		410.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
15 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	450.000.00
			\$450.000.00

=====

SON: **CUATROCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-075923- -00000-G000

Fecha: 2012-05-09 11:42:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 252

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

Mayo 9 de 2012 - 11:39:54



No. 12-075923- -00000-0000

Fecha: 2012-05-09 11:42:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 252

PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIL. ... ☐

☐
☐
☐
☐
☐

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 ☐