

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 954**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12N 15/68 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04778409 .5**

96 Fecha de presentación: **15.07.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1648509**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.04.2006**

54 Título: **Anticuerpos neutralizantes anti-NGF humanos como inhibidores selectivos de la ruta de NGF**

30 Prioridad:

15.07.2003 US 487431 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

17.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

17.12.2012

73 Titular/es:

AMGEN INC. (50.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US y
MEDAREX, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

WILD, KENNETH, D., JR.;
TREANOR, JAMES, J., S.;
HUANG, HAICHUN;
INOUE, HEATHER;
ZHANG, TIE, J. y
MARTIN, FRANK

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 392 954 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos neutralizantes anti-NGF humanos como inhibidores selectivos de la ruta de NGF

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a anticuerpos monoclonales humanos que se unen al factor de crecimiento nervioso (NGF). También se describen composiciones y métodos para tratar el dolor y trastornos relacionados con el dolor.

Antecedentes de la invención

- 10 Cada día, más de dos millones de personas en los Estados Unidos quedan incapacitados por dolor crónico (Jessell y Kelly, 1991, "Pain and Analgesia" en PRINCIPLES OF NEURAL SCIENCE, 3ª Ed., (Kandel, Schwartz, y Jessell, ed.), Elsevier, Nueva York). Desgraciadamente, los tratamientos actuales para el dolor sólo son parcialmente eficaces, y muchos de estos tratamientos por sí mismos producen efectos secundarios debilitantes o peligrosos. Por ejemplo, aunque los fármacos antiinflamatorios no esteroideos ("NSAID") tales como la aspirina, el ibuprofeno y la indometacina son moderadamente eficaces frente al dolor inflamatorio, también son toxinas renales y las dosis altas tienden a producir irritación gastrointestinal, ulceración, hemorragias y confusión mental. Los pacientes tratados con opioides también experimentan frecuentemente confusión, y el uso de opioides a largo plazo está asociado con tolerancia y dependencia. Los anestésicos locales tales como la lidocaína y la mexiletina inhiben simultáneamente el dolor y producen pérdida de sensibilidad normal.

- 15 El dolor es una percepción basada en señales recibidas del entorno y transmitidas e interpretadas por el sistema nervioso (para revisión, véase Millan, 1999, Prog. Neurobiol. 57: 1-164). Estímulos nocivos tales como el calor y el tacto producen receptores sensoriales especializados en la piel para enviar señales al sistema nervioso central ("SNC"). Este proceso se denomina nocicepción, y las neuronas sensoriales periféricas que lo median son los nociceptores.

- 20 Dependiendo de la fuerza de la señal procedente del/de los nociceptor(es) y de la abstracción y la elaboración de esa señal por el SNC, una persona puede experimentar o no un estímulo nocivo como doloroso. Cuando la percepción de dolor de una persona se calibra apropiadamente para la intensidad del estímulo, el dolor cumple su función protectora deseada. Sin embargo, ciertos tipos de daño tisular producen un fenómeno, conocido como hiperalgesia o pronocicepción, en el que estímulos relativamente inocuos se perciben 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 aquejadas de estados inflamatorios, tales como quemadura solar, osteoartritis, colitis, carditis, dermatitis, miositis, neuritis, enfermedades vasculares del colágeno (que incluyen artritis reumatoide y lupus) y similares, a menudo experimentan sensaciones de dolor potenciadas. De manera similar, el traumatismo, cirugía, amputación, absceso, causalgia, enfermedades vasculares del colágeno, enfermedades desmielinizantes, neuralgia del trigémino, cáncer, alcoholismo crónico, accidente cerebrovascular, síndrome de dolor talámico, diabetes, infecciones por herpes, síndrome de inmunodeficiencia adquirida ("SIDA"), toxinas y quimioterapia producen lesiones nerviosas que dan como resultado dolor excesivo.

- 35 A medida que se entienden mejor los mecanismos por los que los nociceptores transducen las señales externas en condiciones normales e hiperalgésicas, pueden seleccionarse como diana los procesos implicados en la hiperalgesia para inhibir la disminución del umbral de dolor y reducir por tanto la cantidad de dolor experimentado.

- 40 Se ha demostrado que los factores neurotróficos desempeñan papeles significativos en la transmisión de dolor fisiológico y patológico. El factor de crecimiento nervioso (NGF) parece ser particularmente importante (para revisión, véase McMahon, 1996, Plaid. Trans. R. Soc. Lond. 351: 431-40; y Apfel, 2000, The Clinical Journal of Pain 16: S7-S11). Se ha demostrado que tanto la administración local como la sistémica de NGF provocan hiperalgesia y alodinia (Lewin *et al.*, 1994, Eur. J Neurosci. 6: 1903-1912). La infusión intravenosa de NGF en seres humanos produce una mialgia en todo el cuerpo mientras que la administración local provoca hiperalgesia y alodinia en el sitio de inyección además de los efectos sistémicos (Apfel *et al.*, 1998, Neurology 51: 695-702). También hay un considerable conjunto de evidencias que implican al NGF endógeno en estados en los que el dolor es una característica prominente. Por ejemplo, el NGF se regula por incremento en las células de Schwann del ganglio de la raíz dorsal (DRG) durante al menos 2 meses tras la lesión de los nervios periféricos y se han notificado niveles aumentados en las articulaciones de animales que padecen una variedad de modelos de artritis (por ejemplo, Aloe *et al.*, 1993, Growth Factors 9: 149-155). En seres humanos, los niveles de NGF están elevados en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide o de otros tipos (por ejemplo, Aloe *et al.*, 1992, Arthritis and Rheumatism 35: 351-355). Además, se ha demostrado que el antagonismo de la función del NGF evita la hiperalgesia y la alodinia en modelos de dolor inflamatorio crónico y neuropático. Por ejemplo, en modelos animales de dolor neuropático (por ejemplo ligamiento del tronco nervioso o el nervio espinal), la inyección sistémica de anticuerpos neutralizantes frente a NGF evita tanto la alodinia como la hiperalgesia (Ramer *et al.*, 1999, Eur. J. Neurosci. 11: 837-846; y Ro *et al.*, 1999, Pain 79: 265-274). Ejemplos de anticuerpos anti-NGF conocidos en la técnica incluyen, por ejemplo, las publicaciones PCT N.^{os} WO 01/78698, WO 01/64247, WO 02/096458 y WO 2004/032870; las patentes estadounidenses N.^{os} 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 números de registro de GenBank U39608, U39609, L17078 o L17077.

Claramente, existe la necesidad de nuevos tratamientos seguros y eficaces para el dolor, particularmente seleccionando como diana mediadores de moléculas pequeñas o factores de exacerbación del dolor tales como el NGF.

Sumario de la invención

5 Esta invención se refiere a anticuerpos monoclonales humanos novedosos que son terapéuticamente útiles para tratar el dolor. Específicamente, la invención se refiere a anticuerpos monoclonales que se unen al factor de crecimiento nervioso (NGF). Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos monoclonales humanos y neutralizan las actividades biológicas del NGF y son útiles para aliviar los efectos de las respuestas del dolor mediadas por el NGF. La invención también se refiere a células que producen, y lo más preferiblemente, secretan a medios de cultivo celular los anticuerpos monoclonales de la invención. Además de su uso para tratar y controlar el dolor, los anticuerpos de la invención son útiles para tratar las respuestas relacionadas con el dolor inflamatorio y neuropático.

La invención se define por las reivindicaciones.

Los aspectos de la invención son:

- 15 1. Un anticuerpo humano aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a NGF, que comprende:
 - a) regiones de entramado de cadena pesada humana, una región variable de cadena pesada humana que comprende CDR1 (SEQ ID NO: 22), CDR2 (SEQ ID NO: 18) y CDR3 (SEQ ID NO: 14) de SEQ ID NO: 10; y
 - b) regiones de entramado de cadena ligera humana, una región variable de cadena ligera humana que comprende CDR1 (SEQ ID NO: 24), CDR2 (SEQ ID NO: 20) y CDR3 (SEQ ID NO: 16) de SEQ ID NO: 12.
- 20 2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según el punto 1, en el que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 10, y la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 12.
3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según el punto 1, en el que la cadena pesada comprende una región variable y una región constante, en el que la región variable comprende SEQ ID NO: 10.
- 25 4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según el punto 1, en el que la cadena ligera comprende una región variable y una región constante, en el que la región variable comprende SEQ ID NO: 12.
5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según el punto 1, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 44.
- 30 6. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según el punto 1, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 43.
7. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según el punto 1, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 44 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 43.
- 35 8. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según el punto 7, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 44 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 40.
9. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de los puntos 1-8, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se disocia de un polipéptido del NGF humano con una K_D de 4×10^{-12} M.
- 40 10. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de los puntos 1-8, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno neutraliza la inducción por el NGF humano de la expresión del receptor vaniloide-1 (VR1) en neuronas de DRG con una CI_{50} de $0,5 \times 10^{-9}$ M.
11. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según uno cualquiera de los puntos 1 a 10, en el que la cadena pesada y la cadena ligera se conectan mediante un ligador flexible para formar un anticuerpo de cadena sencilla.
- 45 12. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según el punto 11, que es un anticuerpo Fv de cadena sencilla.
13. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según uno cualquiera de los puntos 1 a 10, que es
 - a) un anticuerpo Fab;
 - b) un anticuerpo Fab'; o

c) un anticuerpo (Fab')₂.

14. Una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según uno cualquiera de los puntos 1 a 13.

5 15. Un método para detectar NGF en una muestra biológica que comprende:

a) poner la muestra en contacto con el anticuerpo según uno cualquiera de los puntos 1 a 13, en condiciones que permiten la unión del anticuerpo a NGF; y

b) medir el nivel de anticuerpo unido en la muestra.

10 16. Una molécula de ácido nucleico que codifica para el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según uno cualquiera de los puntos 1 a 13.

17. La molécula de ácido nucleico según el punto 16, comprendiendo la molécula de ácido nucleico:

(a) SEQ ID NO: 9; y SEQ ID NO: 11; o

(b) SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 13; y SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 15.

18. Una célula huésped aislada que comprende el ácido nucleico según el punto 16 ó 17.

15 19. Una línea celular aislada que produce el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según uno cualquiera de los puntos 1 a 13.

20 20. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según uno cualquiera de los puntos 1 a 13, o sales farmacéuticamente aceptables del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de un trastorno o estado doloroso provocado por la expresión aumentada del NGF o sensibilidad aumentada al NGF, en el que el trastorno o el estado es dolor agudo, dolor dental, dolor a partir de traumatismo, dolor quirúrgico o dolor resultante de: amputación o absceso, causalgia, enfermedades desmielinizantes, neuralgia del trigémino, cáncer, alcoholismo crónico, accidente cerebrovascular, síndrome talámico, diabetes, síndrome de inmunodeficiencia adquirida ("SIDA"), toxinas, quimioterapia, cefalea general, migraña, cefalea histamínica, síndromes vasculares o no vasculares mixtos, cefalea tensional, inflamación general, artritis, enfermedades reumáticas, lupus, osteoartritis, fibromialgia, trastornos inflamatorios del intestino, síndrome del intestino irritable, trastornos inflamatorios del ojo, trastornos inflamatorios de la vejiga o vejiga inestable, psoriasis, dolencias cutáneas con componentes inflamatorios, quemaduras solares, carditis, dermatitis, miositis, neuritis, enfermedades vasculares del colágeno, estados inflamatorios crónicos, inflamación e hiperalgesia y alodinia asociadas, neuropatía e hiperalgesia o alodinia asociadas, neuropatía diabética, síndromes de desaferenciación, asma, disfunción o lesión del tejido epitelial, herpes simple, alteraciones de motilidad visceral en regiones respiratorias, genitourinarias, gastrointestinales o vasculares, heridas, quemaduras, reacciones cutáneas alérgicas, prurito, vitiligo, trastornos gastrointestinales generales, colitis, ulceración gástrica, úlceras duodenales, rinitis alérgica o vasomotora, o trastornos bronquiales, dismenorrea, dispepsia, reflujo gastroesofágico, pancreatitis o visceralgia.

35 21. Uso de una cantidad farmacéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según uno cualquiera de los puntos 1 a 13, para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno o estado doloroso provocado por la expresión aumentada del NGF o sensibilidad aumentada al NGF, en el que el trastorno o estado es dolor agudo, dolor dental, dolor a partir de traumatismo, dolor quirúrgico o dolor resultante de: amputación o absceso, causalgia, enfermedades desmielinizantes, neuralgia del trigémino, cáncer, alcoholismo crónico, accidente cerebrovascular, síndrome talámico, diabetes, síndrome de inmunodeficiencia adquirida ("SIDA"), toxinas, quimioterapia, cefalea general, migraña, cefalea histamínica, síndromes vasculares o no vasculares mixtos, cefalea tensional, inflamación general, artritis, enfermedades reumáticas, lupus, osteoartritis, fibromialgia, trastornos inflamatorios del intestino, síndrome del intestino irritable, trastornos inflamatorios del ojo, trastornos inflamatorios de la vejiga o vejiga inestable, psoriasis, dolencias cutáneas con componentes inflamatorios, quemaduras solares, carditis, dermatitis, miositis, neuritis, enfermedades vasculares del colágeno, estados inflamatorios crónicos, inflamación e hiperalgesia y alodinia asociadas, neuropatía e hiperalgesia o alodinia asociadas, neuropatía diabética, síndromes de desaferenciación, asma, disfunción o lesión del tejido epitelial, herpes simple, alteraciones de motilidad visceral en regiones respiratorias, genitourinarias, gastrointestinales o vasculares, heridas, quemaduras, reacciones cutáneas alérgicas, prurito, vitiligo, trastornos gastrointestinales generales, colitis, ulceración gástrica, úlceras duodenales, rinitis alérgica o vasomotora, o trastornos bronquiales, dismenorrea, dispepsia, reflujo gastroesofágico, pancreatitis o visceralgia.

55 La invención proporciona además proteínas de fusión que comprenden la secuencia de una región Fc de 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. Tales moléculas pueden prepararse usando métodos tal como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional, publicación n.º WO 00/24782. Tales moléculas pueden expresarse, por ejemplo, en células de mamífero (por ejemplo células de ovario de hámster chino) o células

bacterianas (por ejemplo células de *E. coli*).

En ciertos aspectos, los anticuerpos de la invención, preferiblemente anticuerpos monoclonales, lo más preferiblemente anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos, comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de la misma y la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 10, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de la misma. Preferiblemente, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 4.

En ciertos aspectos, los anticuerpos de la invención, preferiblemente anticuerpos humanos y más preferiblemente anticuerpos monoclonales, lo más preferiblemente anticuerpos monoclonales humanos, comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la cadena pesada comprende una región constante de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las regiones constantes de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA y IgE o cualquier variación alélica de las mismas (tal como se trata en Kabat *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación del NIH N.º 91-3242), y la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 10, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de la misma. Preferiblemente, un anticuerpo de la invención comprende una secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada de IgG2 tal como se expone en SEQ ID NO: 4 o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional del mismo.

En ciertos aspectos, los anticuerpos de la invención, preferiblemente anticuerpos humanos y más preferiblemente anticuerpos monoclonales, lo más preferiblemente anticuerpos monoclonales humanos, comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 8 o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de la misma y la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 12, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de la misma.

En ciertos aspectos, anticuerpos de la invención comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 10, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de la misma y la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 12, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de la misma. En aspectos adicionales, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 22, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de la misma. Todavía en aspectos adicionales, la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 16, 20, 24, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de la misma.

La invención también proporciona anticuerpos que se unen específicamente a NGF, en los que la cadena pesada comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 10, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de la misma, y la cadena ligera comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 12, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de la misma.

En el presente documento se describen adicionalmente anticuerpos humanos aislados que se unen específicamente a NGF, comprendiendo los anticuerpos:

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

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

(c) una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 83, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de la misma, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 84, o un fragmento de

inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de la misma; o

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

En el presente documento también se describen anticuerpos, que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, comprendiendo la cadena pesada una región variable de cadena pesada, y comprendiendo la región variable de cadena pesada una secuencia que tiene al menos una identidad del 75%, preferiblemente del 80%, más preferiblemente de al menos el 85%, incluso más preferiblemente de al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, y lo más preferiblemente de aproximadamente el 99%, con la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 10, y comprendiendo la cadena ligera una región variable de cadena ligera, y comprendiendo la región variable de cadena ligera una secuencia que tiene al menos una identidad del 80%, preferiblemente de al menos el 85%, más preferiblemente de al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, y lo más preferiblemente de aproximadamente el 99%, con la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 12, uniéndose el anticuerpo específicamente a NGF.

En el presente documento también se describen anticuerpos, que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada, y comprendiendo la región variable de cadena pesada una secuencia que tiene al menos una identidad del 75%, preferiblemente del 80%, más preferiblemente al menos del 85%, incluso más preferiblemente al menos del 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, y lo más preferiblemente de aproximadamente el 99%, con la secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 22, y en los que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera, y comprendiendo la región variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad del 80%, preferiblemente al menos del 85%, más preferiblemente al menos del 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, y lo más preferiblemente de aproximadamente el 99%, con la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 16, en los que el anticuerpo se une específicamente a NGF.

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

En aspectos particulares, la invención proporciona una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 16, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de la misma.

Además, la invención proporciona una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 22, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional de la misma.

La invención también se refiere a anticuerpos humanos aislados que se unen específicamente a NGF, comprendiendo el anticuerpo: (a) regiones de entramado 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 de entramado de cadena ligera humana, una región CDR1 de cadena ligera humana, una región CDR2 de cadena ligera humana y una región CDR3 de cadena ligera humana. En ciertos aspectos, la región CDR1 de cadena pesada humana puede ser la región CDR1 de cadena pesada del anticuerpo monoclonal (AcM) designado 4D4 tal como se muestra en SEQ ID NO: 22 y la región CDR1 de cadena ligera humana puede ser la región CDR1 de cadena ligera del AcM 4D4 tal 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 del AcM 4D4 tal como se muestra en SEQ ID NO: 18 y la región CDR2 de cadena ligera humana puede ser la región CDR2 de cadena ligera del AcM 4D4 tal como se muestra en SEQ ID NO: 20. Todavía en otros aspectos, la región CDR3 de cadena pesada humana es la región CDR3 de cadena pesada del AcM 4D4 tal como se muestra en SEQ ID NO: 14, y la región CDR3 de cadena ligera humana de la región CDR3 de cadena ligera del AcM 4D4 tal como se muestra en SEQ ID NO: 16.

En el presente documento también se describen anticuerpos humanos aislados que se unen específicamente al factor de crecimiento nervioso, que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85 o SEQ ID NO: 87, o fragmentos de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcionales de la misma.

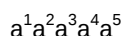
En el presente documento se describen adicionalmente anticuerpos humanos aislados que se unen específicamente a NGF, que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en los que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en 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 fragmentos de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcionales de la

misma.

Los anticuerpos de la invenciones caracterizan por la capacidad de antagonizar con al menos una actividad *in vitro* y/o *in vivo* asociada con polipéptidos de NGF. Preferiblemente, la invención proporciona anticuerpos humanos aislados anti-NGF humano con alta unión de afinidad a polipéptidos de NGF, uniéndose los anticuerpos a un polipéptido de NGF humano y disociándose del polipéptido de NGF humano con una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 50×10^{-12} M o menos, tal como se determina usando KinExA, o que inhiben la supervivencia inducida por NGF en un ensayo de neutralización *in vitro* con una CI_{50} de aproximadamente 1×10^{-8} M o menos.

En el presente documento también se describen anticuerpos humanos aislados o fragmentos de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcionales de los mismos que se unen específicamente a NGF con alta afinidad, disociándose dichos anticuerpos o fragmentos de un polipéptido de NGF humano con una K_D de aproximadamente 1×10^{-9} o menos y neutralizando la bioactividad del NGF humano en un ensayo *in vitro* convencional con una CI_{50} de aproximadamente 1×10^{-8} M o menos, y comprendiendo los anticuerpos o fragmentos una región variable de cadena pesada que comprende:

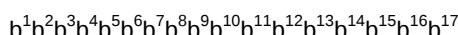
a) una región CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula:



en la que:

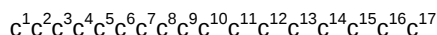
a^1 es un residuo de aminoácido hidrófilo polar; a^2 es un residuo de aminoácido aromático; a^3 es un residuo de aminoácido aromático, hidrófobo polar, alifático; a^4 es un residuo de aminoácido alifático o hidrófobo neutro; y a^5 es un residuo de aminoácido hidrófilo polar o alifático;

b) una región CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula:



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

c) una región CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula:



en la que:

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

En un aspecto, a^1 es un residuo de aminoácido hidrófilo polar; a^2 es un residuo de aminoácido hidrófobo aromático; a^3 es un residuo de aminoácido hidrófobo alifático; a^4 es un hidrófobo neutro; a^5 es un residuo de aminoácido hidrófilo polar; b^1 es un residuo de aminoácido aromático o alifático; b^2 es Ile; b^3 es un residuo de aminoácido hidrófilo polar; b^4 es un residuo de aminoácido aromático o hidrófilo polar; b^5 - b^9 son independientemente residuos de aminoácido alifáticos o hidrófilos polares; b^{10} es un residuo de aminoácido alifático; b^{11} es Tyr; b^{12} es un residuo de aminoácido hidrófobo alifático; b^{13} es un residuo de aminoácido hidrófilo polar o alifático; b^{14} y b^{16} son independientemente residuos de aminoácido hidrófilos polares; y b^{15} es un residuo de aminoácido hidrófobo alifático; b^{17} es un residuo de aminoácido ácido alifático; c^1 está ausente o es un residuo de aminoácido alifático; c^2 está ausente o es un residuo de aminoácido hidrófobo aromático o hidrófilo polar; c^3 y c^4 están independientemente ausentes o son residuos de aminoácido alifáticos, hidrófobos aromáticos o hidrófilos polares; c^5 está ausente o es un residuo de aminoácido hidrófilo polar; c^6 está ausente o es un residuo de aminoácido alifático o hidrófilo polar; c^7 es un residuo de aminoácido alifático o hidrófilo polar; c^8 es un residuo de aminoácido aromático, hidrófobo o hidrófilo;

c⁹ es un residuo de aminoácido hidrófobo aromático, alifático o hidrófilo polar; c¹⁰ es un residuo de aminoácido hidrófobo alifático, hidrófobo aromático o hidrófilo polar; c¹¹-c¹³ son independientemente residuos de aminoácido hidrófobos aromáticos o hidrófilos polares; c¹⁴ es un residuo de aminoácido hidrófobo aromático o alifático; c¹⁵ es un residuo de aminoácido hidrófobo neutro o hidrófilo polar; c¹⁶ está ausente o es un residuo de aminoácido hidrófilo polar; y c¹⁷ es un residuo de aminoácido hidrófobo alifático o hidrófobo aromático.

En un aspecto particular, a¹ es Ser, Asp o Thr; a² es Tyr; a³ es Ala, Ser, Trp o Gly; a⁴ es Met o Ile; a⁵ es His, Gly o Asn; b¹ es Tyr, Gly, Ile o Asp; b² es Ile; b³ es Ser, Thr, Tyr o Asn; b⁴ es Trp, Arg o Pro; b⁵ es Ser, Asn o Gly; b⁶ es Ser, Arg, Asp o Gly; b⁷ es Ser, His o Gly; b⁸ es Ser, Ile, Asp o Thr; b⁹ es Leu, Ile, o Thr; b¹⁰ es Gly, Lys o Phe; b¹¹ es Tyr; b¹² es Ala o Ser; b¹³ es Asp, Gly o Pro; b¹⁴ es Ser; b¹⁵ es Val o Phe; b¹⁶ es Lys o Gln; b¹⁷ es Gly; c¹ está ausente o es un residuo de aminoácido alifático; c² está ausente o es Tyr; c³ y c⁴ están independientemente ausentes, son Tyr, Asn, Val o Glu; c⁵ está ausente, es Ser, Gly o Trp; c⁶ está ausente, es Ser, Gly, Glu o Leu; c⁷ es Gly, Arg o Asp; c⁸ es Trp, Pro, Ser o Thr; c⁹ es His, Gly o Tyr; c¹⁰ es Val, Tyr o Arg; c¹¹ - c¹³ son independientemente Ser, Phe, Tyr, Asp o Asn; c¹⁴ es Phe, Val o Gly; c¹⁵ es Met o Asp; c¹⁶ está ausente, es Asp, o Asn; y c¹⁷ es Tyr o Val.

En otro aspecto particular, a¹ es Ser o Asp; a² es Tyr; a³ es Ala o Ser; a⁴ es Met o Ile; a⁵ es His o Asn; b¹ es Tyr o Gly; b² es Ile; b³ es Ser, Thr, Tyr o Asn; b⁴ es Trp, Arg o Pro; b⁵ es Ser o Asn; b⁶ es Ser o Arg; b⁷ es His o Gly; b⁸ es Ile o Thr; b⁹ es Leu, Ile o Thr; b¹⁰ es Gly o Phe; b¹¹ es Tyr; b¹² es Ala o Ser; b¹³ es Asp o Gly; b¹⁴ es Ser; b¹⁵ es Val o Phe; b¹⁶ es Lys o Gln; b¹⁷ es Gly; c¹ está ausente o es Gly; c² está ausente o es Tyr; c³ y c⁴ están independientemente ausentes, son Tyr, Gly o Val; c⁵ está ausente o es 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 está ausente o es Asp; y c¹⁷ es Tyr o Val.

En otros aspectos particulares:

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

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

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

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

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

En el presente documento también se describe un anticuerpo humano aislado o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional del mismo que se une específicamente a NGF, comprendiendo el anticuerpo o fragmento una región variable de cadena ligera que comprende:

a) una región CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula:

$$a^1a^2a^3a^4a^5a^6a^7a^8a^9a^{10}a^{11}a^{12}$$

en la que:

a¹ es un residuo de aminoácido hidrófilo polar; a², a¹¹ y a¹² son independientemente residuos de aminoácido hidrófobos o alifáticos; a³, a⁵, a⁷ y a⁸ son independientemente residuos de aminoácido hidrófobos, hidrófilos polares o alifáticos; a⁴ es un residuo de aminoácido hidrófilo polar; a⁶ es un residuo de aminoácido hidrófobo o alifático; a⁹ está ausente, o es un residuo de aminoácido hidrófilo polar o alifático; y a¹⁰ es un residuo de aminoácido hidrófobo, aromático o alifático;

b) una región CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula:

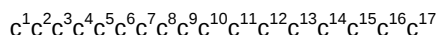
$$b^1b^2b^3b^4b^5b^6b^7$$

en la que:

b¹ es un residuo de aminoácido hidrófobo, hidrófobo polar o alifático; b² es un residuo de aminoácido hidrófobo o alifático; b³ y b⁴ son independientemente residuos de aminoácido hidrófobos, alifáticos o hidrófilos polares; b⁵ es un

residuo de aminoácido hidrófobo alifático o hidrófilo polar; b^6 es un residuo de aminoácido hidrófobo, alifático o hidrófilo polar; y b^7 es un residuo de aminoácido hidrófilo polar; y

c) una región CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula:



5 en la que:

c^1 y c^2 son independientemente residuos de aminoácido hidrófilos polares; c^3 es un residuo de aminoácido hidrófobo, alifático o hidrófilo polar; c^4 , c^5 y c^6 son independientemente residuos de aminoácido hidrófobos, hidrófilos polares o alifáticos; c^7 está ausente o es un residuo de aminoácido hidrófobo alifático o hidrófilo polar; c^8 es un residuo de aminoácido hidrófobo o hidrófilo polar; y c^9 es un residuo de aminoácido hidrófilo polar, y disociándose dicho anticuerpo o fragmento de un polipéptido de NGF humano con una K_D de aproximadamente 1×10^{-9} o menos y neutralizando la bioactividad del NGF humano en un ensayo *in vitro* convencional con una CI_{50} de aproximadamente 1×10^{-8} M o menos.

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

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 está ausente, es 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; c^6 es Tyr, Ser, Trp o Phe; c^7 está ausente, es Pro o His; c^8 es Leu, Trp, Tyr o Arg; y c^9 es Thr.

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

En otros aspectos particulares:

a) la CDR1 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 95, la CDR2 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 96 y la CDR3 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 97;

b) la CDR1 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 101, la CDR2 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 102 y la CDR3 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 103;

c) la CDR1 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 107, la CDR2 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 108 y la CDR3 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 109;

d) la CDR1 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 113, la CDR2 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 114 y la CDR3 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 115;

e) la CDR1 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 119, la CDR2 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 120 y la CDR3 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 121;

f) la CDR1 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 122, la CDR2 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 123 y la CDR3 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 124;

g) la CDR1 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 125, la CDR2 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 126 y la CDR3 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 127;

h) la CDR1 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 128, la CDR2 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 129 y la CDR3 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 130; y

5 i) la CDR1 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 132, la CDR2 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 133 y la CDR3 de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 134.

10 También forman parte de la invención secuencias de polinucleótido que codifican para los anticuerpos humanos anti-NGF humano novedosos, vectores que comprenden las secuencias de polinucleótido que codifican para anticuerpos humanos anti-NGF humano, células huésped transformadas con vectores que incorporan polinucleótidos que codifican para los anticuerpos humanos anti-NGF humano, formulaciones que comprenden anticuerpos humanos anti-NGF humano y métodos de obtención y uso de los mismos.

15 La invención también proporciona métodos para detectar el nivel de NGF en una muestra biológica, que comprenden la etapa de poner la muestra en contacto con un anticuerpo de la invención o fragmento de unión a antígeno del mismo. Un anticuerpo anti-NGF de la invención puede emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de intercalación ("sandwich") directos e indirectos, ensayos de inmunoprecipitación y ensayos de inmunoabsorción unidos a enzimas (ELISA) (Véase, Sola, 1987, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, págs. 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 ensayo que está empleándose.

20 Además, la invención proporciona el tratamiento de una enfermedad asociada con la producción aumentada de NGF, o la sensibilidad aumentada frente a NGF que comprenden la etapa de administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo de la invención o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional del mismo a un individuo que la necesita.

25 Las realizaciones preferidas específicas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción más detallada de determinadas realizaciones preferidas y las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1 representa gráficos que demuestran neutralización de la actividad de NGF en el bioensayo de neutralización basándose en la neurona de DRG mediante anticuerpos monoclonales 4D4 purificados a partir de los medios condicionados de hibridoma.

La figura 2 representa gráficos que demuestran la expresión de VR1 estimulada por la actividad del NGF humano y la neutralización de la actividad de NGF en la neurona de DRG basándose en bioensayos de neutralización mediante un anticuerpo monoclonal anti-NGF (4D4) purificado a partir de los medios condicionados de hibridoma.

35 La figura 3 representa gráficos que demuestran la neutralización de la actividad de NGF en la neurona de DRG basándose en bioensayos de neutralización mediante anticuerpos monoclonales anti-NGF 4D4 recombinantes expresados de manera transitoria cuando se expresan o bien como IgG1 o bien como IgG2 y en células crecidas o bien en un cultivo en frascos rotativos (R) o bien en frascos centrifugadores (S).

40 La figura 4 representa alineaciones de secuencia de neurotrofinas. La numeración y los elementos de estructura secundaria por encima de la secuencia se refieren al NGF humano maduro. Los residuos conservados están marcados con una estrella, y las regiones con baja homología de secuencia están sombreadas. El NGF humano es de SEQ ID NO: 135; el NGF de ratón es de SEQ ID NO: 136; el BDNF es de SEQ ID NO: 137; la NT3 es de SEQ ID NO: 138.

45 La figura 5 muestra la alineación de CDR1 de cadena pesada anti-NGF y la identidad en porcentaje 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).

La figura 6 muestra la alineación de CDR2 de cadena pesada anti-NGF y la identidad en porcentaje 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).

50 La figura 7 muestra la alineación de CDR3 de cadena pesada anti-NGF y la identidad en porcentaje 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).

La figura 8 muestra la alineación de CDR1 de cadena ligera anti-NGF CDR1 y la identidad en porcentaje 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: 96), 4D4 (SEQ ID NO: 15).

95) y 4D4 (SEQ ID NO: 24) (4G6a se denomina en diversas figuras 20031028340; 4G6b se denomina en diversas figuras 20031028351; 4G6c se denomina en diversas figuras 20031071526; 4G6d se denomina en diversas figuras 20031028344; 4G6e se denomina en diversas figuras 20031000528).

La figura 9 muestra la alineación de CDR2 de cadena ligera anti-NGF y la identidad en porcentaje 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 denomina en diversas figuras 20031028340; 4G6b se denomina en diversas figuras 20031028351; 4G6c se denomina en diversas figuras 20031071526; 4G6d se denomina en diversas figuras 20031028344; 4G6e se denomina en diversas figuras 20031000528).

La figura 10 muestra la alineación de CDR3 de cadena ligera anti-NGF CDR3 y la identidad en porcentaje 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 denomina en diversas figuras 20031028340; 4G6b se denomina en diversas figuras 20031028351; 4G6c se denomina en diversas figuras 20031071526; 4G6d se denomina en diversas figuras 20031028344; 4G6e se denomina en diversas figuras 20031000528).

La figura 11 muestra la alineación de cadenas ligeras anti-NGF y la identidad en porcentaje 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 denomina en diversas figuras 20031028340; 4G6b se denomina en diversas figuras 20031028351; 4G6c se denomina en diversas figuras 20031071526; 4G6d se denomina en diversas figuras 20031028344; 4G6e se denomina en diversas figuras 20031000528).

La figura 12 muestra la alineación de cadenas pesadas anti-NGF y la identidad en porcentaje 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 determinadas realizaciones preferidas

Los títulos de sección usados en el presente documento son únicamente para fines de organización y no deben considerarse limitativos del contenido descrito.

Definiciones

Pueden usarse técnicas convencionales para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación tisular (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación pueden realizarse según las especificaciones del fabricante o tal como se llevan a cabo comúnmente en la técnica o tal como se describe en el presente documento. Las técnicas y los procedimientos anteriores pueden realizarse generalmente según métodos bien conocidos en la técnica y tal como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y comentan a lo largo de toda la presente memoria descriptiva. Véase por ejemplo, Sambrook *et al.*, 2001, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos y las técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritos en el presente documento se conocen bien y se usan comúnmente en la técnica. De manera similar, pueden usarse técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y administración farmacéutica, y tratamiento de pacientes.

Tal como se utiliza según la presente descripción, los siguientes términos, a menos que se indique otra cosa, debe entenderse que 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 de manera intercambiable en el presente documento e incluyen, pero no se limitan a, afinidad y especificidad de epítopo (por ejemplo, anticuerpo humano anti-NGF humano que se une a NGF humano), capacidad para antagonizar con la actividad del polipéptido seleccionado como diana (por ejemplo, actividad de NGF), la estabilidad *in vivo* del anticuerpo y las propiedades inmunogénicas del anticuerpo. Otras propiedades o características biológicas identificables de un anticuerpo reconocidas en la técnica incluyen, por ejemplo, reactividad cruzada, (es decir, con homólogos no humanos del polipéptido seleccionado como diana, o con otras proteínas o tejidos, generalmente), y la capacidad para conservar altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero. Las propiedades o características mencionadas anteriormente pueden observarse o medirse usando técnicas reconocidas en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a ELISA, ELISA competitivo, análisis de resonancia de plasmón superficial, ensayos de neutralización *in vitro* e *in vivo* (por ejemplo, ejemplo 2) e inmunohistoquímica con cortes de tejido procedentes de diferentes fuentes incluyendo de ser humano, primate o cualquier otra fuente según las necesidades. Las actividades y propiedades biológicas particulares de los anticuerpos humanos anti-NGF humano se describen en mayor detalle en los ejemplos más adelante.

El término "polinucleótido aislado" tal como se usa en el presente documento pretende significar un polinucleótido de origen genómico, ADNc o sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen, el polinucleótido

aislado (1) no está asociado con la totalidad o una parte de un polinucleótido en el que el polinucleótido aislado se encuentra en la naturaleza, (2) está unido a un polinucleótido al que no se une en la naturaleza, o (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia más larga.

El término "proteína aislada" mencionado en el presente documento significa que una proteína objeto (1) está libre de al menos algunas otras proteínas con las que se encontraría normalmente, (2) está esencialmente libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, de la misma especie, (3) se expresa por una célula de una especie diferente, (4) se ha separado de al menos aproximadamente el 50 por ciento de los polinucleótidos, lípidos, hidratos de carbono u otros materiales con los que se asocia en la naturaleza, (5) no está asociada (mediante interacción covalente o no covalente) con partes de una proteína con las que se asocia la "proteína aislada" en la naturaleza, (6) está asociada operativamente (mediante interacción covalente o no covalente) con un polipéptido con el que no se asocia en la naturaleza, o (7) no se produce en la naturaleza. Una proteína aislada de este tipo puede codificarse por ADN genómico, ADNc, ARNm u otro ARN, de origen sintético, o cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente, la proteína aislada está sustancialmente libre de proteínas o polipéptidos u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que interferirían con su uso (terapéutico, diagnóstico, profiláctico, investigación u otros).

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 proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más del 95% en peso del anticuerpo tal como se determina mediante el método de Lowry, y lo más preferiblemente más del 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos interna o N-terminal mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria ("*spinning cup sequenator*"), o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes puesto que al menos no estará presente un componente del entorno natural del anticuerpo.

Los términos "polipéptido" o "proteína" significan moléculas que tienen la secuencia de las proteínas nativas, es decir, proteínas producidas por células que se producen de manera natural y específicamente no recombinantes, o células modificadas por ingeniería genética o recombinantes, y comprenden moléculas que tienen la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa, o moléculas que tienen delecciones de, adiciones a y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de la secuencia nativa. Los términos "polipéptido" y "proteína" engloban específicamente anticuerpos anti-NGF, o secuencias que tienen delecciones 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 delección amino-terminal, una delección carboxilo-terminal y/o una delección interna. En determinadas realizaciones, los fragmentos tienen al menos de 5 a aproximadamente 500 aminoácidos de largo. Se apreciará que en determinadas realizaciones, los fragmentos tienen al menos 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 ó 450 aminoácidos de largo. Los fragmentos de polipéptidos particularmente útiles incluyen dominios funcionales, incluyendo dominios de unión. En el caso de un anticuerpo anti-NGF, los fragmentos útiles incluyen pero no se limitan a una región CDR, un dominio variable de una cadena pesada o ligera, una parte de una cadena de anticuerpo o sólo su región variable incluyendo dos CDR, y similares.

El término "agente de unión específica" se refiere a una molécula natural o no natural que se une específicamente a una diana. Los ejemplos de agente de unión específica incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono y lípidos. En determinadas realizaciones, 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 se une específicamente a cualquier parte de NGF. En determinadas realizaciones, 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 usa en el presente documento se refiere a un fragmento de polipéptido que contiene al menos las CDR de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina. Un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la invención puede unirse a un antígeno. En realizaciones preferidas, el antígeno es un ligando que se une específicamente a un receptor. En estas realizaciones, la unión de un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la invención impide la unión del ligando a su receptor, interrumpiendo la respuesta biológica que resulta de la unión del ligando al receptor. Preferiblemente, un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la invención se une específicamente a NGF. Lo más preferiblemente, el fragmento se une específicamente a NGF humano.

El término "que se produce de manera natural" tal como se usa en el presente documento y aplicado a un objeto se refiere al hecho de que el objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o polinucleótido que está presente en un organismo (incluyendo los virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado de manera intencionada por el hombre, se produce de manera natural.

El término "unido operativamente" significa que los componentes a los que se aplica el término están en una relación que permite que lleven a cabo sus funciones inherentes en condiciones adecuadas. Por ejemplo, una secuencia control "unida operativamente" a una secuencia codificante de proteínas está ligada a la misma de manera que se logra la expresión de la secuencia codificante de proteínas en condiciones compatibles con la actividad de transcripción de las secuencias control.

El término "secuencia control" tal como se usa en el presente documento se refiere a secuencias de polinucleótido que pueden afectar a la expresión, procesamiento o ubicación intracelular de secuencias codificantes a las que se ligan. La naturaleza de tales secuencias control puede depender del organismo huésped. En realizaciones particulares, las secuencias control para procariotas pueden incluir un promotor, un sitio de unión a ribosomas y una secuencia de terminación de la transcripción. En otras realizaciones particulares, las secuencias control para eucariotas pueden incluir promotores que comprenden uno o una pluralidad de sitios de reconocimiento para factores de transcripción, secuencias de potenciación de la transcripción, secuencias de terminación de la transcripción y secuencias de poliadenilación. En determinadas realizaciones, las "secuencias control" pueden incluir secuencias líder y/o secuencias de parejas de fusión.

El término "polinucleótido" tal como se menciona en el presente documento significa polímeros de ácido nucleico mono y bicatenarios de al menos 10 nucleótidos de longitud. En determinadas realizaciones, los nucleótidos que comprenden el polinucleótido pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Dichas modificaciones incluyen modificaciones de bases tales como bromouridina, modificaciones de ribosa tales como arabinósido y 2',3'-didesoxirribosa y modificaciones de enlace internucleotídico tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforoaniladato y fosforoamidato. El término "polinucleótido" incluye específicamente formas mono y bicatenarias del ADN.

El término "oligonucleótido" mencionado en el presente documento incluye nucleótidos que se producen de manera natural y modificados unidos entre sí mediante enlaces oligonucleotídicos que se producen de manera natural y/o que no se producen de manera natural. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que comprende miembros que generalmente son monocatenarios y tienen una longitud de 200 nucleótidos o inferior. En determinadas realizaciones, los oligonucleótidos tienen de 10 a 60 nucleótidos de longitud. En determinadas realizaciones, los oligonucleótidos tienen de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 a 40 nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos pueden ser mono o bicatenarios, por ejemplo para su uso en la construcción de un mutante genético. Los oligonucleótidos de la invención pueden ser oligonucleótidos sentido o antisentido con referencia a una secuencia codificante de proteínas.

El término "oligonucleótidos que se producen de manera natural" incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados" incluye nucleótidos con grupos de azúcar modificados o sustituidos y similares. El término "enlaces oligonucleotídicos" incluye enlaces oligonucleotídicos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforoaniladato, fosforoamidato y similares. Véanse, por ejemplo, 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, págs. 87- 108 (F. Eckstein, Ed.), Oxford University Press, Oxford Inglaterra; Stec *et al.*, patente estadounidense N.º 5.151.510; Uhlmann y Peyman, 1990, Chemical Reviews, 90: 543. Un oligonucleótido puede incluir un marcador detectable para permitir la detección del oligonucleótido o la hibridación del mismo.

El término "vector" incluye una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden unirse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Determinados vectores pueden realizar replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Pueden integrarse otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) en el genoma de una célula huésped tras su introducción en la célula huésped y de ese modo se replican junto con el genoma del huésped. Además, determinados vectores pueden dirigir la expresión de genes a los que se unen operativamente. Tales vectores se mencionan en el presente documento "vectores de expresión recombinante" (o simplemente "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse de manera intercambiable ya que el plásmido es la forma más comúnmente usada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, virus adenoasociados, adenovirus y retrovirus con replicación defectuosa), que sirven para funciones equivalentes.

La expresión "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped") incluye una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Los expertos en la técnica entenderán que tales términos pretenden referirse no sólo a la célula objeto particular, sino a la progenie de una célula de este tipo. Dado que pueden producirse determinadas modificaciones en generaciones subsiguientes debido a o bien mutación o bien influencias medioambientales, tal progenie puede no ser idéntica, de hecho, a la célula original, pero todavía se incluye dentro del alcance del término "célula huésped" tal como se usa en el presente documento. Puede usarse

una amplia variedad de sistemas de expresión en huésped para expresar los anticuerpos de la presente invención incluyendo sistemas de expresión de bacterias, levaduras, baculovirus y mamíferos (así como sistema de expresión de presentación en fago). Un ejemplo de un vector de expresión bacteriano adecuado es pUC19. Para expresar un anticuerpo de manera recombinante, se transfecta una célula huésped con uno o más vectores de expresión recombinante que portan fragmentos de ADN que codifican para las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina del anticuerpo de manera que las cadenas ligeras y pesadas se expresan en la célula huésped y, preferiblemente, se secretan al medio en el que se cultivan las células huésped, medio del que pueden recuperarse los anticuerpos. Se usan metodologías de ADN recombinante convencionales para obtener los genes de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos, incorporar estos genes en vectores de expresión recombinante e introducir los vectores en células huésped, tales como las 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 estadounidense N.º 4.816.397 concedida a Boss *et al.*

El término “célula huésped” se usa para referirse a una célula que se ha transformado, o que puede transformarse con una secuencia de ácido nucleico y luego expresar un gen seleccionado de interés. El término incluye la progenie de la célula original, ya sea o no la progenie idéntica en morfología o en composición genética a la célula original, siempre que esté presente el gen seleccionado.

El término “transducción” se usa para referirse a la transferencia de genes de una bacteria a otra, habitualmente mediante un fago. “Transducción” también se refiere a la adquisición y transferencia de secuencias celulares eucariotas mediante retrovirus.

El término “transfección” se usa para referirse a la captación de ADN foráneo o exógeno por una célula, y una célula se ha “transfectado” cuando el ADN exógeno se ha introducido dentro de la membrana celular. Varias técnicas de transfección se conocen bien en la técnica y se dan a conocer en el presente documento. Véase, por ejemplo, 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 uno o más restos de ADN exógeno en células huésped adecuadas.

El término “transformación” tal como se usa en el presente documento 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 ADN nuevo. Por ejemplo, una célula se transforma cuando se modifica genéticamente con respecto a su estado nativo. Tras la transfección o transducción, el ADN transformante puede recombinarse con el de la célula mediante integración física en un cromosoma de la célula, o puede mantenerse de manera transitoria como un elemento episomal sin replicarse, o puede replicarse independientemente como un plásmido. Se considera que una célula se ha transformado de manera estable cuando el ADN se replica con la división de la célula.

El término “que se produce de manera natural” o “nativo” cuando se usa en relación con materiales biológicos tales como moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, células huésped y similares, se refiere a materiales que se encuentran en la naturaleza y no se han manipulado por el hombre. De manera similar, “que no se produce de manera natural” o “no nativo” tal como se usa en el presente documento se refiere a un material que no se encuentra en la naturaleza o que se ha modificado estructuralmente o sintetizado por el hombre.

El término “antígeno” se refiere a una molécula o una parte de una molécula a la que puede unirse un agente de unión selectivo, tal como un anticuerpo, y que puede usarse adicionalmente en un animal para producir anticuerpos que pueden unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epítopos.

El término “identidad”, tal como se conoce en la técnica, se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más moléculas de polipéptido o dos o más moléculas de ácido nucleico, tal como se determina comparando las secuencias de las mismas. En la técnica, “identidad” también significa el grado de parentesco de secuencia entre moléculas de ácido nucleico o polipéptidos, según sea el caso, tal como se determina por la coincidencia entre sucesiones de dos o más nucleótidos o dos o más secuencias de aminoácidos. La “identidad” mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre la menor de dos o más secuencias con alineaciones de huecos (si los hay) realizadas por un modelo matemático o programa informático particular (es decir, “algoritmos”).

El término “similitud” se usa en la técnica con respecto a un concepto relacionado, pero en contraposición a “identidad”, “similitud” se refiere a una medida del parentesco, que incluye tanto coincidencias idénticas como coincidencias de sustitución conservativa. Si dos secuencias de polipéptido tienen, por ejemplo, 10/20 aminoácidos idénticos, y el resto son todas sustituciones no conservativas, entonces el porcentaje de similitud e identidad serían del 50%. Si en el mismo ejemplo hay cinco posiciones más en las que hay sustituciones conservativas, entonces el porcentaje de identidad permanece en el 50%, pero el porcentaje de similitud sería del 75% (15/20). Por tanto, en casos en los que hay sustituciones conservativas, el porcentaje de similitud entre dos polipéptidos será mayor que el porcentaje de identidad entre esos dos polipéptidos.

La identidad y similitud de ácidos nucleicos y polipéptidos relacionados puede calcularse fácilmente mediante métodos conocidos. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en COMPUTATIONAL MOLECULAR

BIOLOGY, (Lesk, A. M., ed.), 1988, Oxford University Press, Nueva York; BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS, (Smith, D. W., ed.), 1993, Academic Press, Nueva York; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, Parte 1, (Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds.), 1994, Humana Press, Nueva Jersey; von Heinje, G., SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1987, Academic Press; SEQUENCE ANALYSIS PRIMER, (Gribskov, M. y Devereux, J., eds.), 1991, M. Stockton Press, Nueva York; Carillo *et al.*, 1988, SIAM J. Applied Math., 48: 1073; y Durbin *et al.*, 1998, BIOLOGICAL SEQUENCE ANALYSIS, Cambridge University Press.

Los métodos preferidos para determinar la identidad están diseñados para obtener la mayor coincidencia entre las secuencias sometidas a prueba. Se describen métodos para determinar la identidad en programas informáticos disponibles públicamente. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programa GCG, incluyendo GAP (Devereux *et al.*, 1984, Nucl. Acid. Res., 12: 387; Genetics Computer Group, Universidad de 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, citado anteriormente). También puede usarse el algoritmo de Smith Waterman bien conocido para determinar la identidad.

Determinados esquemas de alineación para alinear dos secuencias de aminoácidos pueden dar como resultado la coincidencia de sólo una corta región de las dos secuencias, y esta pequeña región alineada puede tener una identidad de secuencia muy alta aunque no haya una relación significativa entre las dos secuencias de longitud completa. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, el método de alineación seleccionado (programa GAP) dará como resultado una alineación que abarca al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido diana.

Por ejemplo, usando el algoritmo informático GAP (Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, WI), se alinean dos polipéptidos para los que va a determinarse el porcentaje de identidad de secuencia para la coincidencia óptima de sus aminoácidos respectivos (la "extensión de coincidencia", tal como se determina mediante el algoritmo). En determinadas realizaciones, se usan conjuntamente con el algoritmo una penalización por apertura de hueco (que se calcula como tres veces la diagonal promedio; donde la "diagonal promedio" es el promedio de la diagonal de la matriz de comparación que está usándose; la "diagonal" es la puntuación o el número asignado a cada coincidencia de aminoácidos perfecta asignada por la matriz de comparación particular) y una penalización por extensión de hueco (que es habitualmente una décima parte de la penalización por apertura de hueco), así como una matriz de comparación tal como PAM250 o BLOSUM 62. En determinadas realizaciones, el algoritmo también usa una matriz de comparación convencional (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).

En determinadas realizaciones, los parámetros para la comparación de secuencias de polipéptido incluyen los siguientes:

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

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

Penalización por hueco: 12

Penalización por longitud de hueco: 4

Umbral de similitud: 0

El programa GAP puede ser útil con los parámetros anteriores. En determinadas realizaciones, los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para comparaciones de polipéptidos (junto con ausencia de penalización para huecos de extremo) usando el algoritmo GAP.

El término "homología" se refiere al grado de similitud entre secuencias de proteínas o ácidos nucleicos. La información de homología es útil para la comprensión del parentesco genético de determinadas especies de proteínas o ácidos nucleicos. La homología puede determinarse alineando y comparando secuencias. Normalmente, para determinar la homología de aminoácidos, se compara una secuencia de proteína con una base de datos de secuencias de proteínas conocidas. Las secuencias homólogas comparten identidades funcionales comunes en algún punto a lo largo de sus secuencias. Un alto grado de similitud o identidad es indicativo habitualmente 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 se encuentran dentro de 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 cualquier otro aminoácido, que se basa en la observación de muchas secuencias de proteínas de proteínas homólogas conocidas y generar una matriz de mutación puntual aceptada (PAM).

El porcentaje de identidad también puede calcularse usando el programa Needle (paquete EMBOSS) o Stretcher (paquete EMBOSS) o el programa align X, como módulo del paquete de software vector NTI suite 9.0.0, usando los parámetros por defecto (por ejemplo, penalización por hueco de 5, penalización por apertura de hueco de 15, penalización por extensión de hueco de 6,6).

- 5 Tal como se usa en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase IMMUNOLOGY--A SYNTHESIS, 2ª edición, (E. S. Golub y D. R. Gren, Eds.), Sinauer Associates: Sunderland, MA, 1991. Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales; aminoácidos no naturales tales como aminoácidos α,α -disustituidos, N-alquilaminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para los 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-hidroxisilisina, σ -N-metilarginina y otros aminoácidos similares e iminoácidos (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptidos usada en el presente documento, la dirección hacia la izquierda es la dirección amino terminal y la dirección hacia la derecha es la dirección carboxilo terminal, según el uso y el convenio convencional.
- 10
- 15 Los residuos que se producen de manera natural pueden dividirse en clases basándose en propiedades de la cadena lateral comunes:
- 1) hidrófobos: norleucina (Nor), Met, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Tyr, Pro;
 - 2) hidrófilos polares: Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr;
 - 3) alifáticos: Ala, Gly, Ile, Leu, Val, Pro;
 - 20 4) hidrófobos alifáticos: Ala, Ile, Leu, Val, Pro;
 - 5) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
 - 6) ácidos: Asp, Glu;
 - 7) básicos: His, Lys, Arg;
 - 8) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
 - 25 9) aromáticos: His, Trp, Tyr, Phe; y
 - 10) hidrófobos aromáticos: Phe, Trp, Tyr.

Las sustituciones de aminoácidos conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por otro miembro de la misma clase. Las sustituciones de aminoácidos conservativas pueden englobar residuos de aminoácido que no se producen de manera natural, que normalmente se incorporan mediante síntesis química de péptidos en lugar de mediante síntesis en sistemas biológicos. Estos incluyen peptidomiméticos y otras formas revertidas o invertidas de restos de aminoácidos.

30

Las sustituciones no conservativas pueden implicar 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.

35 Al realizar tales cambios, según determinadas realizaciones, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático partiendo de la base de su hidrofobicidad y características de carga. 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).

40

La importancia del índice hidropático de los aminoácidos en conferir una función biológica interactiva en una proteína se entiende en la técnica (véase, por ejemplo, Kyte *et al.*, 1982, J. Mol. Biol. 157: 105-131). Se sabe que determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen una puntuación o índice hidropático similar y todavía conservan una actividad biológica similar. Al realizar los cambios basándose en el índice hidropático, en determinadas realizaciones, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 . En determinadas realizaciones, se incluyen los que están dentro de ± 1 , y en determinadas realizaciones, los que están dentro de $\pm 0,5$.

45

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse eficazmente partiendo de la base de la hidrofiliidad, particularmente cuando se pretende que el péptido o la proteína biológicamente funcional creado de ese modo se use en realizaciones inmunológicas, tal como se describe en el presente documento. En determinadas realizaciones, la mayor hidrofiliidad promedio local de una proteína, tal como se rige por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y

50

antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

Los siguientes valores de hidrofiliidad se han asignado a estos residuos de aminoácido: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 $\pm$ 1); glutamato (+3,0 $\pm$ 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 $\pm$ 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 realizar cambios basados en valores de hidrofiliidad similares, en determinadas realizaciones, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de ± 2 , en determinadas realizaciones, se incluyen los que están dentro de ± 1 , y en determinadas realizaciones, se incluyen los que están dentro de $\pm 0,5$. También pueden identificarse epítomos a partir de secuencias primarias de aminoácidos partiendo de la base de la hidrofiliidad. Estas regiones también se denominan "regiones núcleo epitópicas".

En la tabla 1 se exponen sustituciones de aminoácidos a modo de ejemplo.

Tabla 1

Sustituciones de aminoácidos

Residuos originales	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones 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	Leu
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 experto podrá determinar variantes adecuadas del polipéptido tal como se expone en el presente documento usando técnicas bien conocidas. En determinadas realizaciones, un experto en la técnica puede identificar zonas adecuadas de la molécula que puede cambiarse sin destruir la actividad de las regiones seleccionadas como diana que no se cree que son importantes para la actividad. En otras realizaciones, el experto puede identificar residuos y partes de las moléculas que están conservadas entre polipéptidos similares. En realizaciones adicionales, incluso las zonas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden someterse a sustituciones de aminoácidos conservativas sin destruir la actividad biológica o sin afectar adversamente a la estructura del polipéptido.

Adicionalmente, un experto en la técnica puede revisar estudios de estructura-función que identifican residuos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o la estructura. En vista de una comparación de este tipo, el experto puede predecir la importancia de los residuos de aminoácido en una proteína que se corresponden con residuos de aminoácido importantes para la actividad o la estructura en proteínas similares. Un experto en la técnica puede optar por sustituciones de aminoácidos químicamente similares para tales residuos de aminoácido importantes predichos.

Un experto en la técnica también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con esa estructura en polipéptidos similares. En vista de tal información, un experto en la técnica puede predecir la alineación de residuos de aminoácido de un anticuerpo con respecto a su estructura tridimensional. En determinadas realizaciones, un experto en la técnica puede elegir no realizar cambios radicales en residuos de aminoácido que se predice que están en la superficie de la proteína, puesto que tales residuos pueden estar implicados en interacciones importantes con otras moléculas. Además, un experto en la técnica puede generar variantes de prueba que contienen una única sustitución de aminoácido en cada residuo de aminoácido deseado. Tales variantes pueden seleccionarse entonces usando ensayos de actividad conocidos por los expertos en la técnica. Tales variantes podrían usarse para reunir información acerca de variantes adecuadas. Por ejemplo, si se

descubre que un cambio en un residuo de aminoácido particular amino da como resultado actividad destruida, reducida de manera indeseable o no adecuada, pueden evitarse variantes con un cambio de este tipo. En otras palabras, basándose en la información reunida de tales experimentos de rutina, un experto en la técnica puede determinar fácilmente los aminoácidos en los que deben evitarse sustituciones adicionales o bien solas o bien en combinación con otras mutaciones.

Varias publicaciones científicas se han dedicado a la predicción de la estructura secundaria. Véanse 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; y Chou *et al.*, 1979, Biophys. J. 26: 367-384. Además, actualmente se dispone de programas informáticos para ayudar a predecir la estructura secundaria. Un método para predecir la estructura secundaria se basa en modelado por homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas que tienen una identidad de secuencia superior al 30%, o de manera similar superior al 40% a menudo tienen topologías estructurales similares. El reciente crecimiento de la base de datos estructural de proteínas (PDB) ha proporcionado una capacidad de predicción potenciada de estructuras secundarias, incluyendo el número posible de plegamientos dentro de una estructura de polipéptido o 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 plegamientos en un polipéptido o proteína dados y que una vez que se han resuelto un número crítico de estructuras, la predicción estructural se volverá espectacularmente más precisa.

Los métodos adicionales de predicción de la estructura secundaria incluyen "threading" (coincidencia de estructura secundaria (Jones, 1997, Curr. Opin. Struct. Biol 7: 377-87; Sippl *et al.*, 1996, Structure 4: 15-19), "análisis de perfil" (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 "unión evolutiva" (véase Holm, 1999, citado anteriormente; y Brenner, 1997, citado anteriormente).

En determinadas realizaciones, las variantes de anticuerpo incluyen variantes de glicosilación en las que el número y/o el tipo de sitio de glicosilación se han alterado en comparación con las secuencias de aminoácidos del polipéptido original. En determinadas realizaciones, las variantes de proteína comprenden un número mayor o menor de sitios de glicosilación unidos a N que la proteína nativa. Un sitio de glicosilación unido a N se caracteriza por la secuencia: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en las que 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 proporciona un posible nuevo sitio para la adición de una cadena de hidratos de carbono unidos a N. Alternativamente, las sustituciones que eliminan esta secuencia eliminarán una cadena de hidratos de carbono unidos a N existente. También se proporciona una redistribución de cadenas de hidratos de carbono unidos a N en la que se eliminan uno o más sitios de glicosilación unidos a N (normalmente los que se producen de manera natural) y se crean uno o más nuevos sitios unidos a N. Las variantes de anticuerpos preferidas adicionales incluyen variantes de cisteína en las que se delecionan uno o más residuos de cisteína o se sustituyen por otro aminoácido (por ejemplo, serina) en comparación con la secuencia de aminoácidos original. Las variantes de cisteína pueden ser útiles cuando los anticuerpos deben volver a plegarse en una conformación biológicamente activa tal como tras el aislamiento de cuerpos de inclusión insolubles. Las variantes de cisteína tienen generalmente menos residuos de cisteína que la proteína nativa, y tienen normalmente un número par para minimizar las interacciones que resultan de cisteínas no apareadas.

En realizaciones adicionales, las variantes de anticuerpo pueden incluir anticuerpos que comprenden 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 pueden modificarse mediante mutación para conferir sobre un anticuerpo características de unión alteradas. Véanse, por ejemplo, Burton y Woof, 1992, Advances in Immunology 51: 1-84; Ravetch y Bolland, 2001, Annu. Rev. Immunol. 19: 275-90; Shields *et al.*, 2001, Journal of Biol. Chem 276: 6591-6604; Telleman y Junghans, 2000, Immunology 100: 245-251; Medesan *et al.*, 1998, Eur. J. Immunol. 28: 2092-2100). Tales mutaciones pueden incluir sustituciones, adiciones, delecciones o cualquier combinación de las mismas, y normalmente se producen mediante mutagénesis dirigida al sitio usando uno o más oligonucleótido(s) mutagénico(s) según métodos descritos en el presente documento, así como según métodos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3ª ed., 2001, Cold Spring Harbor, N. Y. y Berger y Kimmel, METHODS IN ENZYMOLOGY, volumen 152, Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, Inc., San Diego, CA).

Según determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son aquellas que: (1) reducen la propensión a proteólisis, (2) reducen la propensión a oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos proteicos, (4) alteran afinidades de unión y/o (5) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales en tales polipéptidos. Según determinadas realizaciones, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples (en determinadas realizaciones, sustituciones de aminoácidos conservativas) en la secuencia que se produce de manera natural (en determinadas realizaciones, en la parte del polipéptido fuera del/de los dominio(s) que forman(n) contactos intermoleculares). En realizaciones preferidas, una sustitución de aminoácido conservativa normalmente no cambia sustancialmente las características estructurales de la secuencia original (por ejemplo, un aminoácido de sustitución no tenderá a romper una hélice que se produce en la secuencia original, o alterar otros tipos de estructura secundaria que caracteriza a la secuencia original). Ejemplos de estructuras secundarias y

terciarias de polipéptidos reconocidas en la técnica se describen en PROTEINS, STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES, (Creighton, Ed.), 1984, W. H. Freeman and Company, Nueva York; INTRODUCTION TO PROTEIN STRUCTURE (C. Branden y J. Tooze, eds.), 1991, Garland Publishing, Nueva York, N. Y.; y Thornton *et al.*, 1991, Nature 354: 105.

Se usan comúnmente análogos de péptidos en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido molde. Estos tipos de compuesto no peptídico se denominan "miméticos de péptidos" o "peptidomiméticos". Véase Fauchere, 1986, Adv. Drug Res. 15: 29; Veber & Freidinger, 1985, TINS pág. 392; y Evans *et al.*, 1987, J. Med. Chem. 30: 1229. Tales compuestos se desarrollan a menudo con la ayuda de modelado molecular informatizado. Los miméticos de péptidos que son estructuralmente similares a péptidos útiles terapéuticamente pueden usarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico similar. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), tal como un anticuerpo humano, pero tienen uno o más enlaces peptídicos sustituidos opcionalmente por un enlace seleccionado de: $\text{-CH}_2\text{-NH-}$, $\text{-CH}_2\text{-S-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, -CH=CH- (cis y trans), $\text{-COCH}_2\text{-}$, $\text{-CH(OH)CH}_2\text{-}$ y $\text{-CH}_2\text{SO-}$, mediante métodos bien conocidos en la técnica. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso por un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) puede usarse en determinadas realizaciones para generar péptidos más estables. Además, pueden generarse péptidos limitados que comprenden una secuencia consenso o una variación de secuencia consenso sustancialmente idéntica mediante métodos conocidos en la técnica (Rizo & Gierasch, 1992, Ann. Rev. Biochem. 61: 387); por ejemplo, mediante la adición de residuos de cisteína internos que pueden formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

"Anticuerpo" o "péptido(s) de anticuerpo" se refiere(n) a un anticuerpo intacto o un fragmento de unión del mismo que compite con el anticuerpo intacto para la unión específica. En determinadas realizaciones, fragmentos de unión se producen mediante técnicas de ADN recombinante. En realizaciones adicionales, fragmentos de unión se producen mediante escisión química o enzimática de anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen, pero no se limitan a, F(ab) , F(ab') , F(ab')_2 , Fv y anticuerpos de cadena sencilla.

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 ligera" incluye cualquier polipéptido de inmunoglobulina que tiene una secuencia de región variable suficiente para conferir especificidad para NGF. Una cadena pesada de longitud completa incluye un dominio de región variable, V_H , y tres dominios de región constante, $\text{C}_\text{H}1$, $\text{C}_\text{H}2$ y $\text{C}_\text{H}3$. El dominio V_H está en el extremo amino terminal del polipéptido y el dominio $\text{C}_\text{H}3$ está en el extremo carboxilo terminal. El término "cadena pesada", tal como se usa en el presente documento, abarca una cadena pesada de longitud completa y fragmentos de la misma. Una cadena ligera de longitud completa incluye un dominio de región variable, V_L , y un dominio de región constante, C_L . Como la cadena pesada, el dominio de región variable de la cadena ligera está en el extremo amino terminal del polipéptido. El término "cadena ligera", tal como se usa en el presente documento, abarca una cadena ligera de longitud completa y fragmentos de la misma. Un fragmento F(ab) está compuesto por una cadena ligera y las regiones variables y $\text{C}_\text{H}1$ de una 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 ligera y una cadena pesada que contiene más de la región constante, entre los dominios $\text{C}_\text{H}1$ y $\text{C}_\text{H}2$, de modo que un enlace disulfuro intercatenario puede formarse entre dos cadenas pesadas para formar una molécula F(ab')_2 . La región Fv comprende las regiones variables tanto de las cadenas pesadas como ligeras, pero carece de las regiones constantes. Los anticuerpos de cadena sencilla son moléculas Fv en las que las regiones variables de cadena pesada y ligera se han conectado mediante un ligador flexible para formar una cadena polipeptídica individual, que forma una región de unión a antígeno. Los anticuerpos de cadena sencilla se tratan en detalle en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 88/01649 y patentes estadounidenses n.ºs 4.946.778 y 5.260.203.

Un anticuerpo bivalente distinto de un anticuerpo "multiespecífico" o "multifuncional", en determinadas realizaciones, se entiende que comprende sitios de unión que tienen especificidad antigénica idéntica.

Al evaluar la especificidad y la unión de anticuerpos según 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 por al menos aproximadamente el 20%, el 40%, el 60%, el 80%, el 85%, o más (tal como se mide, entre otros, usando un ensayo de unión competitivo *in vitro*).

Por "anticuerpo neutralizante" quiere decirse una molécula de anticuerpo que puede bloquear o reducir sustancialmente una función efectora de un antígeno diana al cual se une. Por consiguiente, un anticuerpo anti-NGF "neutralizante" puede bloquear o reducir sustancialmente una función efectora, tal como producción y/o unión a receptor de una respuesta celular, de NGF. "Reducir sustancialmente" pretende significar al menos aproximadamente el 60%, preferiblemente al menos aproximadamente el 70%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 75%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente el 80%, todavía más preferiblemente al menos aproximadamente el 85%, lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 90% de reducción de una función efectora del antígeno diana (por ejemplo, NGF humano).

El término "epítipo" incluye cualquier determinante, preferiblemente un determinante de polipéptido, que puede

unirse de manera específica a una inmunoglobulina o receptor de células T. En determinadas realizaciones, los determinantes de epítipo incluyen agrupamientos de superficie químicamente activa de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o grupos sulfonilo, y, en determinadas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específica. Un epítipo es una región de un antígeno que se une por un anticuerpo. En determinadas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferiblemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. En realizaciones preferidas, se dice que un anticuerpo se une específicamente a 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 lo más preferiblemente cuando la constante de disociación es $\leq 10^{-10}$ M.

Un anticuerpo se une "esencialmente al mismo epítipo" como anticuerpo de referencia, cuando los dos anticuerpos reconocen epítipos estéricamente solapantes o idénticos. Los métodos más usados ampliamente y rápidos para determinar si dos anticuerpos se unen a epítipos estéricamente solapantes o idénticos son ensayos de competición, que pueden configurarse en cualquier número de formatos diferentes, usando o bien un antígeno marcado o bien un anticuerpo marcado. Habitualmente, el antígeno se inmoviliza sobre un sustrato, y la capacidad de anticuerpos no marcados de bloquear la unión de anticuerpos marcados se mide usando marcadores enzimáticos o radiactivos.

El término "agente" se usa en el presente documento para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto preparado de materiales biológicos.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "marca" o "marcado" se refiere a incorporación de un marcador detectable, por ejemplo, mediante la incorporación de un aminoácido radiomarcado o unido a un polipéptido de restos de biotina que pueden detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina preferiblemente que comprende un marcador detectable tal como un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente o una actividad enzimática que puede detectarse mediante métodos colorimétricos u ópticos). En determinadas realizaciones, el marcador también puede ser terapéutico. Se conocen en la técnica diversos métodos de marcar polipéptidos y glicoproteínas y pueden usarse de manera ventajosa en los métodos dados a conocer en el presente documento. Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, lo siguiente: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), marcadores fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína o FITC, rodamina o fósforos de lantánido), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, marcadores de hapteno tales como grupos biotinilo, y epítipos de polipéptido predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal o etiquetas de epítipo). En determinadas realizaciones, se unen los marcadores mediante brazos espaciadores (tales como $(\text{CH}_2)_n$, en el que $n < \text{aproximadamente } 20$) de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico.

El término "muestra biológica", tal como se usa en el presente documento, incluye, pero no se limita a, cualquier cantidad de una sustancia de un ser vivo o ser anteriormente vivo. Tales seres vivos incluyen, pero no se limitan a, seres 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 "fármaco o agente farmacéutico" tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto químico o composición que puede inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra de manera apropiada a un paciente. La expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz" en referencia a una composición farmacéutica que comprende una o una pluralidad de los anticuerpos de la invención se entiende que significa, según la invención, una cantidad de dicha composición farmacéutica que puede detener, en el paciente considerado, la disminución en el umbral de sensibilidad a estímulos externos con un regreso de este umbral de sensibilidad a un nivel comparable a lo observado en sujetos sanos.

Un "trastorno" es cualquier estado que sería beneficioso del tratamiento según la presente invención. "Trastorno" y "estado" se usan de manera intercambiable en el presente documento e incluyen enfermedades mediadas por NGF o trastornos mediados por NGF agudos o crónicos, incluyendo los estados patológicos que predisponen el mamífero al trastorno en cuestión.

Los términos "enfermedad mediada por NGF" y "estado mediado por NGF" abarca cualquier trastorno o estado médico asociado con niveles aumentados de NGF o sensibilidad aumentada frente a NGF incluyendo, pero sin limitarse a, dolor agudo, dolor dental, dolor a partir de traumatismo, dolor quirúrgico, dolor resultante de amputación o absceso, causalgia, enfermedades desmielinizantes, neuralgia del trigémino, cáncer, alcoholismo crónico, accidente cerebrovascular, síndrome de dolor talámico, diabetes, síndrome de inmunodeficiencia adquirida ("SIDA"), toxinas y quimioterapia, cefalea general, migraña, cefalea histamínica, síndromes vasculares y no vasculares mixtos, cefalea tensional, inflamación general, artritis, enfermedades reumáticas, lupus, osteoartritis, trastornos inflamatorios del intestino, síndrome del intestino irritable, trastornos inflamatorios del ojo, trastornos inflamatorios de la vejiga o vejiga inestable, psoriasis, dolencias cutáneas con componentes inflamatorios, quemaduras solares, carditis, dermatitis, miositis, neuritis, enfermedades vasculares del colágeno, estados inflamatorios crónicos, dolor inflamatorio e hiperalgesia y alodinia asociadas, dolor neuropático e hiperalgesia y alodinia asociadas, dolor por

neuropatía diabética, causalgia, dolor mantenido por el sistema simpático, síndromes de desaferenciación, asma, disfunción o lesión del tejido epitelial, herpes simple, alteraciones de motilidad visceral en regiones respiratorias, genitourinarias, gastrointestinales o vasculares, heridas, quemaduras, reacciones cutáneas alérgicas, prurito, vitíligo, trastornos gastrointestinales generales, colitis, ulceración gástrica, úlceras duodenales, rinitis alérgica o vasomotora, o trastornos bronquiales, dismenorrea, dispepsia, reflujo gastroesofágico, pancreatitis y visceralgia.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “cantidad eficaz” y “cantidad terapéuticamente eficaz” cuando se usan con referencia a un vehículo o una composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos humanos anti-NGF humano se refieren a una cantidad o dosificación suficiente para producir un resultado deseado (es decir, en el que para la terapia con el vehículo o anticuerpos humanos anti-NGF humano de la presente invención el resultado deseado es la reducción deseada en inflamación y/o dolor, por ejemplo) o para soportar una disminución observable en el nivel de una o más actividades biológicas de NGF. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad del/de los anticuerpo(s) humano(s) anti-NGF humano suficiente para inhibir, durante algún periodo de tiempo, uno o más de los procesos patológicos clínicamente definidos asociados con el estado en cuestión, por ejemplo, inflamación o dolor, en un sujeto tratado *in vivo* con el agente. En la presente invención, una “cantidad eficaz” de un anticuerpo anti-NGF puede prevenir, detener, controlar o reducir la percepción de dolor asociado con cualquier estado médico doloroso. En los métodos de la presente invención, el término “controlar” y variantes gramaticales del mismo, se usan para referirse a la prevención, inhibición parcial o completa, reducción, retraso o ralentización de un acontecimiento no deseado, por ejemplo, dolor. La cantidad eficaz puede variar dependiendo del vehículo específico o anticuerpo(s) humano(s) anti-NGF humano seleccionado(s), y también es dependiente de una variedad de factores y estados relacionados con el sujeto que va a tratarse y la gravedad del trastorno. Por ejemplo, si el vehículo o anticuerpo(s) humano(s) anti-NGF humano va a administrarse *in vivo*, los factores tales como la edad, peso y salud del paciente así como curvas de respuesta a la dosis y datos de toxicidad obtenidos en el trabajo con animales preclínicos estaría entre los considerados. Si el agente va a ponerse en contacto con las células *in vitro*, también se diseñaría una variedad de estudios *in vitro* preclínicos para evaluar tales parámetros como captación, semivida, dosis, toxicidad, etc. La determinación de una cantidad eficaz o una cantidad terapéuticamente eficaz para un agente dado está bien dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “factor de crecimiento nervioso” y “NGF” se definen como todas las especies de mamíferos de NGF de secuencia nativa, incluyendo NGF 1-120 humano recombinante, mostrado como en SEQ ID NO: 30.

Tal como se usa en el presente documento, “sustancialmente puro” o “sustancialmente purificado” significa un compuesto o especie que es la especie predominante presente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición). En determinadas realizaciones, una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie comprende al menos aproximadamente el 50 por ciento (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En determinadas realizaciones, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente el 80%, el 85%, el 90%, el 95% o el 99% de todas las especies macromolares presentes en la composición. En determinadas realizaciones, se purifica la especie hasta homogeneidad esencial (la especie contaminante no puede detectarse en la composición mediante métodos de detección convencional) consistiendo la composición esencialmente en una especie macromolecular individual.

El término “paciente” incluye sujetos humanos y animales.

“Tratamiento” o “tratar” se refiere tanto a tratamiento terapéutico como medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos ya con el trastorno así como aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en los que el trastorno va a prevenirse.

A menos que se requiera lo contrario por el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular.

Según determinadas realizaciones de la invención, anticuerpos dirigidos a NGF pueden usarse para tratar dolor inflamatorio y neuropático y enfermedades mediadas por NGF, incluyendo pero sin limitarse a, los mencionados anteriormente.

En un aspecto de la invención se proporcionan anticuerpos monoclonales completamente humanos generados contra y que tienen especificidad biológica e inmunológica para unirse a NGF humano. En otro aspecto la invención proporciona ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican para secuencias de aminoácidos para moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera, particularmente secuencias que corresponden a las regiones variables de las mismas. Realizaciones particulares de este aspecto de la invención son secuencias correspondientes a regiones determinantes de complementariedad (CDR), específicamente de CDR1 a CDR3, de las cadenas pesadas y ligeras proporcionadas por la invención. Aún en otro aspecto la invención proporciona células de hibridoma y líneas celulares que expresan las moléculas de inmunoglobulina y anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales de la invención. La invención también proporciona preparaciones biológica e inmunológicamente purificadas de anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales generados contra y que tienen especificidad biológica e inmunológica para unirse a NGF humano.

La capacidad para clonar y reconstruir locus humanos de tamaño de megabases en cromosomas artificiales de levaduras (YAC) y para introducirlos en la línea germinal de ratón proporciona un enfoque ventajoso para aclarar los componentes funcionales de locus muy grandes o groseramente mapeados así como generar modelos útiles de enfermedad humana. Además, la utilización de tal tecnología para la sustitución de locus de ratón con sus equivalentes humanos proporciona conocimientos únicos en la expresión y regulación de productos génicos humanos durante el desarrollo, su comunicación con otros sistemas, y su participación en la progresión e inducción de enfermedad.

Una aplicación práctica importante de una estrategia de este tipo es la "humanización" del sistema inmunitario humoral de ratón. La introducción de locus de inmunoglobulina (Ig) humana en ratones en los que los genes de Ig endógenos se han inactivado ofrece la oportunidad de estudiar mecanismos que subyacen la expresión programada y conjunto de anticuerpos así como su papel en el desarrollo de células B. Además, una estrategia de este tipo proporciona una fuente para la producción de anticuerpos monoclonales completamente humanos (AcM).

El término "anticuerpo humano" incluye anticuerpos que tienen regiones constantes y variables que corresponden sustancialmente a secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En determinadas realizaciones, se producen anticuerpos humanos en mamíferos no humanos, incluyendo, pero sin limitarse a, roedores, tales como ratones y ratas, y lagomorfos, tales como conejos. En determinadas realizaciones, se producen anticuerpos humanos en células de hibridoma. En determinadas realizaciones, se producen anticuerpos humanos de manera recombinante.

El término "recombinante" en referencia a un anticuerpo incluye anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes. Los ejemplos representativos incluyen anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpo humano recombinante, combinatoria, anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, 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 mediante cualquier medio que implica corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones constantes y variables derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana.

Los anticuerpos humanos tienen al menos tres ventajas sobre anticuerpos quiméricos y no humanos para su uso en la terapia humana:

1) debido a que la parte efectora del anticuerpo es humana, puede interactuar mejor con las otras partes del sistema inmunitario humano (por ejemplo, destruye las células diana de manera más eficaz mediante citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC));

2) el sistema inmunitario humano no debe reconocer el anticuerpo humano como foráneo, y, por tanto la respuesta de anticuerpo contra un anticuerpo inyectado de este tipo debe ser menos que contra un anticuerpo no humano totalmente foráneo o un anticuerpo quimérico parcialmente foráneo;

3) se han notificado que anticuerpos no humanos inyectados tienen una semivida en la circulación humana mucho más corta que la semivida de anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanos inyectados tendrán una semivida esencialmente idéntica a los anticuerpos humanos que se producen de manera natural, permitiendo que se administren dosis menos frecuentes y menores.

Por tanto, se espera que los anticuerpos completamente humanos minimicen las respuestas alérgicas e inmunogénicas intrínsecas a ratón o AcM derivatizados de ratón, y aumenten de ese modo la eficacia y seguridad de los anticuerpos administrados. Por tanto, los anticuerpos completamente humanos de la invención, pueden usarse en el tratamiento de dolor recurrente y crónico, el tratamiento del mismo requiriendo la administración de anticuerpo repetido. Por tanto, una ventaja particular de los anticuerpos anti-NGF de la invención es que los anticuerpos son completamente humanos y pueden administrarse a pacientes de una manera no aguda mientras que se minimizan las reacciones adversas comúnmente asociadas con anticuerpos anti-ratón humanos u otros anticuerpos no completamente humanos descritos anteriormente de especies no humanas.

Un experto en la técnica puede diseñar mediante ingeniería cepas de ratón deficientes en producción de anticuerpos de ratón con grandes fragmentos de los locus de Ig humana de modo que tales ratones produzcan anticuerpos humanos en ausencia de anticuerpos de ratón. Grandes fragmentos de Ig humana pueden conservar la gran diversidad génica variable así como la regulación apropiada de producción y expresión de anticuerpos. Aprovechando la maquinaria celular de ratón para la diversificación y selección de anticuerpos y la carencia de tolerancia inmunológica a proteínas humanas, el repertorio de anticuerpos humanos reproducido en estas cepas de ratón produce anticuerpos de alta afinidad contra cualquier antígeno de interés, incluyendo antígenos humanos. Usando la tecnología de hibridoma, pueden producirse y seleccionarse AcM humanos específicos de antígeno con la especificidad deseada.

Pueden emplearse animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que pueden, tras la inmunización, producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. La

transferencia de una serie de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición de antígeno (véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551-2555, (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362: 255-258, (1993); Bruggemann *et al.*, Year en 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 estadounidenses n.^{os} 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). Los anticuerpos humanos también pueden producirse en bibliotecas de presentación en fago (Hoogenboom y 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.* también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, Monoclonal antibodies and Cancer Therap, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner *et al.*, J. Immunol., 147 (1) : 86-95 (1991)).

Los anticuerpos humanos recombinantes también pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para las secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan de las relacionadas con secuencias de V_H y V_L de línea germinal humana, no pueden existir naturalmente dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpo humano *in vivo*.

En determinadas realizaciones, el experto puede usar regiones constantes de especies distintas de ser humano junto con la(s) región/regiones variable(s) humana(s) en tales ratones para producir anticuerpos quiméricos.

Estructura de anticuerpo que se produce de manera natural

Las unidades estructurales de anticuerpo que se producen de manera natural comprenden normalmente un tetrámero. Cada tetrámero de este tipo normalmente está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" de longitud completa (que tiene normalmente un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" de longitud completa (que tiene normalmente un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). La parte amino terminal de cada cadena pesada y ligera incluye normalmente una región variable aproximadamente de 100 a 110 o más aminoácidos que normalmente es responsable del reconocimiento de antígeno. La parte carboxilo terminal de cada cadena define normalmente una región constante responsable de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican normalmente como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican normalmente como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isótopo de anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. IgG tiene varias subclases, incluyendo, pero sin limitarse a, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. IgM tiene subclases incluyendo, pero sin limitarse a, IgM1 e IgM2. IgA se subdivide de manera similar en subclases incluyendo, pero sin limitarse a, IgA1 e IgA2. Dentro de las cadenas ligera y pesada de longitud completa, normalmente, las regiones constantes y variables se unen por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, con la cadena pesada incluyendo también una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase, por ejemplo, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, Ch. 7, 2^a ed., (Paul, W., ed.), 1989, Raven Press, N. Y. Las regiones variables de cada par de cadena pesada/ligera forman normalmente el sitio de unión a antígeno.

Las regiones variables presentan normalmente la misma estructura general de regiones de entramado (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par se alinean normalmente por las regiones de entramado, que pueden permitir la unión a un epítipo específico. Desde el extremo N terminal hasta el extremo C terminal, tanto las regiones variables de cadena pesada y ligera comprenden normalmente los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es normalmente según las definiciones de Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (1987 y 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 o bifuncional es normalmente un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadena pesada/cadena ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante una variedad de métodos incluyendo, pero sin limitarse a, fusión de hibridomas o unión de fragmentos F(ab'). Véase, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321; Kostelny *et al.*, 1992, J. Immunol 148: 1547-1553.

Preparación de anticuerpos

La invención proporciona anticuerpos que se unen a NGF humano. Estos anticuerpos pueden producirse mediante inmunización con NGF de longitud completa o fragmentos del mismo. Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales, y/o pueden ser recombinantes. En realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención son anticuerpos humanos preparados, por ejemplo, mediante inmunización de animales transgénicos que pueden producir anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional WO 93/12227).

Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las regiones variables de cadena pesada y cadena

ligera de anticuerpos anti-NGF de la invención pueden injertarse a regiones de entramado (FR) a partir de las mismas u otras especies. En determinadas realizaciones, las CDR de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpo anti-NGF pueden injertarse a las FR humanas consenso. Para crear las FR humanas consenso, se alinean FR de varias secuencias de aminoácidos de cadena pesada o cadena ligera humana para identificar una secuencia de aminoácido consenso. Las FR de la cadena pesada o cadena ligera del anticuerpo anti-NGF pueden reemplazarse con las FR de una cadena pesada o cadena ligera diferente. Los aminoácidos poco comunes en las FR de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-NGF normalmente no se reemplazan, aunque pueden reemplazarse el resto de los aminoácidos de FR. Los aminoácidos poco comunes son aminoácidos específicos que están en posiciones en las que no se encuentran habitualmente en FR. 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 de Fv de cadena sencilla. El injerto de CDR se describe, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.^{os} 6.180.370, 5.693.762, 5.693.761, 5.585.089 y 5.530.101.

Los anticuerpos de la invención se preparan preferiblemente usando ratones transgénicos que tienen una parte sustancial del anticuerpo humano que produce locus insertado en células que producen anticuerpos de los ratones, y que se diseñan por ingeniería para ser deficientes en la producción de anticuerpos murinos, endógenos. Tales ratones pueden producir anticuerpos y moléculas de inmunoglobulina humana y no producen o producen cantidades sustancialmente reducidas de anticuerpos y moléculas de inmunoglobulina murina. Las tecnologías utilizadas para lograr este resultado se dan a conocer en las patentes, solicitudes y referencias dadas a conocer en la memoria descriptiva en el presente documento. En realizaciones preferidas, el experto puede emplear métodos tal como se da a conocer en la publicación de solicitud de patente internacional n.^o WO 98/24893, que se incorpora al presente documento como referencia para cualquier fin. Véase también Mendez *et al.*, 1997, *Nature Genetics* 15: 146-156.

Los anticuerpos monoclonales (AcM) de la invención pueden producirse mediante una variedad de técnicas, incluyendo metodología de anticuerpo monoclonal convencional, por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas convencional de Kohler y Milstein (1975, *Nature* 256: 495). Aunque se prefieren los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, pueden emplearse otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

El sistema animal preferido para preparar hibridomas es el ratón. La producción de hibridomas en el ratón está muy bien establecida, y se conocen bien en la técnica protocolos de inmunización y técnicas para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión. También se conocen componentes de fusión (por ejemplo, células de mieloma murinas) y procedimientos de fusión.

En una realización preferida, los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra NGF pueden generarse usando ratones transgénicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos, denominados en el presente documento ratones "HuAcm", contienen un minilocus de gen de inmunoglobulina humana que codifica para secuencias de inmunoglobulina de cadena ligera κ y pesada (μ y γ) humanas reorganizadas, junto con mutaciones seleccionadas como diana que inactivan los locus de cadena μ y κ endógenos (Lonberg *et al.*, 1994, *Nature* 368: 856-859). Por consiguiente, los ratones presentan expresión reducida de IgM o κ de ratón y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y cadena ligera humanas introducidos experimentan el cambio de clase y la mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG κ humanos de alta afinidad (Lonberg *et al.*, citado anteriormente.; Lonberg y Huszar, 1995, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93; Harding y Lonberg, 1995, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764: 536-546). La preparación de ratones HuAcm 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. Véase además las patentes estadounidenses n.^{os} 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 concedidas a Lonberg y Kay, así como la patente estadounidense n.^o 5.545.807 concedida a Surani *et al.*; publicación de solicitud de patente internacional n.^o WO 93/1227, publicada el 24 de junio de 1993; documento WO 92/22646, publicado el 23 de diciembre de 1992; y documento WO 92/03918, publicado el 19 de marzo de 1992. Alternativamente, las cepas de ratones transgénicos HCo7, HCo12 y KM descritas en los ejemplos a continuación pueden usarse para generar anticuerpos anti-NGF humano.

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales humanos que son específicos para y neutralizan los polipéptidos de NGF humanos bioactivos. También se proporcionan secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera de anticuerpos que son altamente específicas para y neutralizan los polipéptidos de NGF 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 eficaz para enfermedades asociadas con NGF.

En el presente documento se describen anticuerpos humanos aislados que se unen al mismo o esencialmente el mismo epítipo como el anticuerpo 4D4 proporcionado en el presente documento.

En el presente documento se describen anticuerpos humanos aislados que comprenden al menos una de las

secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NOs: 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 y 79-130 que se une a un epítipo de polipéptido de NGF con alta afinidad y tiene la capacidad de antagonizar la actividad polipeptídica de NGF. Estos anticuerpos se unen al mismo o esencialmente el mismo epítipo como el anticuerpo 4D4 proporcionado en el presente documento.

En el presente documento también se describen anticuerpos humanos aislados que se unen a polipéptido de NGF con una constante de disociación (K_D) de 1×10^{-9} M o menos y que inhibe la supervivencia inducida por NGF en un ensayo de neutralización *in vitro* con una CI_{50} de 1×10^{-7} M o menos. En determinados aspectos los anticuerpos humanos aislados se unen a polipéptido de NGF con una constante de disociación (K_D) de 1×10^{-10} M o menos e inhibe la supervivencia inducida por NGF en un ensayo de neutralización *in vitro* con una CI_{50} de 1×10^{-8} M o menos.

En determinados aspectos, los anticuerpos humanos anti-NGF aislados se unen a polipéptido de NGF humano con una constante de disociación (K_D) de 1×10^{-11} M o menos e inhibe la supervivencia inducida por NGF en un ensayo *in vitro* con una CI_{50} de 1×10^{-9} M o menos. En el presente documento se describen ejemplos de anticuerpos humanos anti-NGF humano que cumplen los criterios de neutralización y unión mencionados anteriormente.

El anticuerpo humano anti-NGF humano de la presente invención se denomina en el presente documento 4D4 y tiene secuencias de polipéptido de V_L y V_H tal como se muestra en SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 10, respectivamente. La secuencia de polinucleótido que codifica para 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 dan a conocer específicamente en los ejemplos. Particularmente notable es la alta afinidad para el polipéptido de NGF y la alta capacidad de antagonizar la actividad del polipéptido de NGF demostrada en el presente documento.

La constante de disociación (K_D) de un anticuerpo humano anti-NGF humano puede determinarse mediante resonancia de plasmón superficial tal como se describe generalmente en el ejemplo 9. Generalmente, el análisis de resonancia de plasmón superficial mide las interacciones de unión en tiempo real entre el ligando (polipéptido de NGF recombinante inmovilizado en una matriz de biosensor) y analito (anticuerpos en disolución) mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). También puede realizarse el análisis de plasmón superficial inmovilizando el analito (anticuerpos en una matriz de biosensor) y presentando el ligando (recombinante V en disolución). La constante de disociación (K_D) de un anticuerpo humano anti-NGF humano también puede determinarse usando metodología de KinExA. En determinadas realizaciones 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 usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Para los fines de la presente invención se determinó K_D tal como se muestra en el ejemplo 9.

En realizaciones 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. Lo más preferiblemente, los anticuerpos son del isotipo IgG2. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención son del isotipo IgM, IgA, IgE o IgD. En realizaciones preferidas de la invención, los anticuerpos comprenden una cadena ligera kappa humana y una cadena pesada IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana. La expresión de anticuerpos de la invención que comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 o IgG2 se describe en los ejemplos a continuación. En realizaciones 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 determinadas realizaciones, se han clonado los anticuerpos de la invención para la expresión en células de mamífero.

En determinadas realizaciones, las modificaciones conservadoras en las cadenas pesadas y cadenas ligeras de anticuerpos anti-NGF (y modificaciones correspondientes en los nucleótidos codificantes) producirán anticuerpos anti-NGF que tienen características funcionales y químicas similares a las de los anticuerpos anti-NGF dados a conocer en el presente documento. En cambio, las modificaciones sustanciales en las características funcionales y/o químicas de anticuerpos anti-NGF pueden realizarse seleccionando sustituciones en la secuencia de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera que difieren de manera significativa en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto principal molecular en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o de hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la masa de la cadena lateral.

Por ejemplo, una "sustitución de aminoácido conservadora" puede implicar una sustitución de un residuo de aminoácido nativo con un residuo no nativo de modo que existe poco o ningún efecto sobre la polaridad o carga del residuo de aminoácido en esta posición. Además, cualquier residuo nativo en el polipéptido también puede estar sustituido con alanina, como se ha descrito anteriormente para "mutagénesis de exploración de alanina".

Los expertos en la técnica pueden determinar las sustituciones de aminoácido deseadas (si es conservadora o no conservadora) en el momento en que se desean tales sustituciones. En determinadas realizaciones, pueden usarse sustituciones de aminoácido para identificar residuos importantes de anticuerpo anti-NGF, o para aumentar o disminuir la afinidad de los anticuerpos anti-NGF descritos en el presente documento.

Tal como se conoce bien, los menores cambios en una secuencia de aminoácidos tales como delección, adición o sustitución de uno, pocos o incluso varios aminoácidos pueden conducir a una forma alélica de la proteína original

que tiene propiedades sustancialmente idénticas. Por tanto, además de los anticuerpos descritos específicamente en el presente documento, otros anticuerpos "sustancialmente homólogos" pueden diseñarse fácilmente y fabricarse utilizando diversas técnicas de ADN recombinante bien conocidas por los expertos en la técnica. En general, las modificaciones de los genes pueden realizarse fácilmente por una variedad de técnicas bien conocidas, tales como mutagénesis dirigida al sitio. Por tanto, la presente invención contempla anticuerpos humanos anti-NGF "variante" o "mutante" que tienen características sustancialmente similares con respecto a los anticuerpos humanos anti-NGF dados a conocer en el presente documento (Véase, por ejemplo, el documento WO 00/56772). Por tanto, por el término "variante" o "mutante" en referencia a un anticuerpo humano anti-NGF quiere decirse cualquier molécula de unión (molécula X) (i) en la que las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada o las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera tomada como un todo son al menos el 80% homólogas, preferiblemente al menos el 90% homólogas, más preferiblemente al menos el 95% homólogas con respecto a las regiones hipervariables tal como se muestra en SEQ ID NOS: 14, 18 y 22 o SEQ ID NOS: 16, 20 y 24, respectivamente, y (ii) en la que la variante o mutante puede inhibir la actividad de NGF humano al mismo grado que un anticuerpo humano anti-NGF de referencia que tiene regiones de entramado idénticas a las de la molécula X.

De manera habitual, una variante de anticuerpo humano anti-NGF tendrá CDR de cadena pesada y/o ligera, cuando tomadas como un todo, que tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 80%, preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 85%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 90%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 91%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 92%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 93%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 94%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 95%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 96%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 97%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 98%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en las SEQ ID NOS: 14, 18 y 22 y/o las SEQ ID NOS: 16, 20 y 24, respectivamente.

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

aproximadamente el 98%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 99% con la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en las SEQ ID NOs: 10, 81, 83, 85 ó 87.

Una "variante" en referencia a un polinucleótido pretende referirse a una molécula de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 75% con una secuencia de polinucleótido de la presente invención. De manera habitual, una variante de polinucleótido tendrá una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 75%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 80%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 81%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 82%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 83%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 84%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 85%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 86%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 87%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 88%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 89%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 90%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 91%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 92%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 93%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 94%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 95%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 96%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 97%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 98%, aún más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 99% con una secuencia de ácido nucleico novedosa dada a conocer en el presente documento.

En el presente documento se describen 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 ligera, una región CDR1, CDR2 o CDR3 que tiene un porcentaje de identidad con una región variable de cadena pesada, una región variable de cadena ligera, una región CDR1, CDR2 o CDR3 de la invención, tal como se muestra en el ejemplo 10 en el presente documento y las figuras 5-10.

En el presente documento se describe un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al factor de crecimiento nervioso y comprende una cadena pesada y una cadena ligera, comprendiendo la cadena pesada una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es: idéntica en al menos un 70% o un 75% a la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 10, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o uno inmunológicamente funcional de la misma; homóloga en al menos un 70%, un 80%, un 85% o un 95% a la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 81, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o uno inmunológicamente funcional de la misma; idéntica en al menos un 70%, un 80%, un 85% o un 95% a la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 83, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o uno inmunológicamente funcional de la misma; idéntica en al menos un 75%, un 80%, un 85% a la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 85, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o uno inmunológicamente funcional de la misma; idéntica en al menos un 70%, un 75% o un 80% a la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 87, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o uno inmunológicamente funcional de la misma; idéntica en al menos un 56% a la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 79, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o uno inmunológicamente funcional de la misma.

En el presente documento se describe un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al factor de crecimiento nervioso y comprende una cadena pesada y una cadena ligera, comprendiendo la cadena ligera una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es: idéntica en al menos un 70%, un 75%, un 80% o un 90% a la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 12 o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o uno inmunológicamente funcional de la misma; idéntica en al menos un 70%, un 85% o un 90% a la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 80, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o uno inmunológicamente funcional de la misma; idéntica en al menos un 70%, un 74%, un 90% o un 94% a la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 88, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o uno inmunológicamente funcional de la misma; idéntica en al menos un 70%, un 80%, un 85% o un 87% a la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 89, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o uno inmunológicamente funcional de la misma; idéntica en al menos un 70%, un 85%, un 90% o un 94% a la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 90, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o uno inmunológicamente funcional de la misma; idéntica en al menos un 70%, un 85%, un 90%, un 95% o un 99% a la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 91, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o uno inmunológicamente funcional de la misma;

5

10

15

25

45

En el presente documento se describe un anticuerpo humano aislado que se une específicamente al factor de crecimiento nervioso y comprende una CDR3 de cadena ligera humana, siendo la CDR3 una secuencia de aminoácidos que es: idéntica en al menos un 70% o un 85% a la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 103, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o uno inmunológicamente funcional de la misma; idéntica en al menos un 70% o un 85% a la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 97, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o uno inmunológicamente funcional de la misma; idéntica en al menos un 70% o un 78% a la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 121, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o uno inmunológicamente funcional de la misma; idéntica en al menos un 70% o un 78% a la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 127, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o uno inmunológicamente funcional de la misma; idéntica en al menos un 70% o un 78% a la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 130, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o uno inmunológicamente funcional de la misma; idéntica en al menos un 70% o un 78% a la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 16, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o uno inmunológicamente funcional de la misma; idéntica en al menos un 70% o un 85% a la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 109, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o uno inmunológicamente funcional de la misma; idéntica en al menos un 78% a la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 134, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o uno inmunológicamente funcional de la misma; o idéntica en al menos un 85% a la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 115, o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o uno inmunológicamente funcional de la misma.

Las secuencias de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo 4D4 se muestran en las SEQ ID NOs: 10 y 12, respectivamente. Sin embargo, muchos de los posibles residuos de contacto con CDR son susceptibles de una sustitución por otros aminoácidos y permitir todavía que el anticuerpo conserve una afinidad sustancial al antígeno. De la misma manera, muchos de los residuos de entramado que no están en contacto con las CDRs en las cadenas pesada y ligera pueden dar cabida a sustituciones de aminoácidos de las posiciones correspondientes de otros anticuerpos humanos, por aminoácidos consenso humanos, o de otros anticuerpos de ratón, sin pérdida significativa de la afinidad o la no inmunogenicidad del anticuerpo humano. Puede usarse una selección de diversos aminoácidos alternativos para producir versiones de los anticuerpos anti-NGF dados a conocer y fragmentos de los mismos que tienen combinaciones de variables de afinidad, especificidad, no inmunogenicidad, facilidad de fabricación y otras propiedades deseables.

En realizaciones alternativas, pueden expresarse anticuerpos de la invención en líneas celulares distintas de líneas celulares de hibridoma. En estas realizaciones, pueden usarse secuencias que codifican para anticuerpos particulares para la transformación de una célula huésped de mamífero adecuada. Según estas realizaciones, puede conseguirse una transformación usando cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped, incluyendo, por ejemplo empaquetar el polinucleótido en un virus (o en un vector viral) y transducir una célula huésped con el virus (o vector) o mediante procedimientos de transfección conocidos en la técnica, tal como se muestra a modo de ejemplo mediante las patentes estadounidenses n.^{os} 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455. Generalmente, el procedimiento de transformación usado puede depender del huésped que deba transformarse. En la técnica se conocen bien métodos para introducir polinucleótidos heterólogos en células de mamífero e incluyen, pero no se limitan a, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del/de los polinucleótido(s) en liposomas y microinyección directa del ADN en núcleos.

Una molécula de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada, una región variable de cadena pesada, una región constante de cadena ligera o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-NGF de la invención se inserta en un vector de expresión apropiado usando técnicas de ligación convencionales. En una realización preferida, la región constante de cadena pesada o cadena ligera del anticuerpo anti-NGF se agrega al extremo C terminal de la región variable apropiada y se liga en un vector de expresión. El vector se selecciona normalmente para que sea funcional en la célula huésped particular empleada (es decir, el vector es compatible con la maquinaria de la célula huésped de modo que puede producirse 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.

Normalmente, los vectores de expresión usados en cualquiera de las células huésped contendrán secuencias para el mantenimiento de plásmidos y para la clonación y expresión de secuencias de nucleótidos exógenas. Tales secuencias, denominadas colectivamente "secuencias flanqueantes" en determinadas realizaciones incluirán normalmente una o más de las siguientes secuencias de nucleótidos: un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación transcripcional, una secuencia de intrones completa que contiene un sitio de corte y empalme donador y aceptor, una secuencia que codifica para una secuencia líder para la secreción de polipéptidos, un sitio de unión a ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región de poliligador para insertar el ácido nucleico que codifica para el polipéptido que debe expresarse, y un elemento marcador seleccionable. Cada una de estas secuencias se comenta más adelante.

Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia que codifica para una "etiqueta", es decir, una molécula de oligonucleótido ubicada en el extremo 5' o 3' de la secuencia que codifica para polipéptido del anticuerpo anti-NGF;

la secuencia de oligonucleótidos codifica para poliHis (tal como hexaHis), u otra "etiqueta" tal como FLAG, HA (hemaglutinina del virus influenza) o *myc* para los que existen anticuerpos disponibles comercialmente. Esta etiqueta se fusiona normalmente al polipéptido tras la expresión del polipéptido, y puede servir como medio para la purificación o detección de afinidad del anticuerpo anti-NGF a partir de la célula huésped. La purificación de afinidad puede realizarse, por ejemplo, mediante cromatografía en columna usando anticuerpos frente a la etiqueta como matriz de afinidad. Opcionalmente, la etiqueta puede eliminarse posteriormente del polipéptido del anticuerpo anti-NGF purificado mediante diversos medios tal como usando determinadas peptidasas para la escisión.

Las secuencias flanqueantes pueden ser homólogas (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula huésped), heterólogas (es decir, de una especie distinta de la especie o cepa de la célula huésped), 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 que la secuencia flanqueante sea funcional en, y pueda activarse mediante, la maquinaria de la célula huésped.

Las secuencias flanqueantes útiles en los vectores de esta invención pueden obtenerse mediante cualquiera de varios métodos bien conocidos en la técnica. Normalmente, las secuencias flanqueantes útiles en el presente documento se habrán identificado previamente mediante mapeo y/o mediante digestión de endonucleasas de restricción y por tanto pueden aislarse de la fuente de tejido apropiada usando las endonucleasas de restricción apropiadas. En algunos casos, puede conocerse la secuencia de nucleótidos completa de una secuencia flanqueante. En este caso, la secuencia flanqueante puede sintetizarse usando los métodos descritos en el presente documento para la clonación o la síntesis de ácido nucleico.

Ya se conozca toda o sólo una parte de la secuencia flanqueante, puede obtenerse usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o examinando una biblioteca genómica con una sonda adecuada tal como un fragmento de secuencia flanqueante y/o oligonucleótido de la misma especie o de otra. Cuando no se conoce la secuencia flanqueante, puede aislarse un fragmento de ADN que contiene una secuencia flanqueante de una parte más grande de ADN que puede contener, por ejemplo, una secuencia codificante o incluso otro gen o genes. El aislamiento puede realizarse mediante digestión de endonucleasas de restricción para producir el fragmento de ADN apropiado seguido de aislamiento usando purificación en gel de agarosa, cromatografía en columna Qiagen® (Chatsworth, CA), u otros métodos conocidos por el experto en la técnica. La selección de enzimas adecuadas para realizar este propósito resultará fácilmente evidente para un experto habitual en la técnica.

Un origen de replicación es normalmente una parte de aquellos vectores de expresión procariotas adquiridos comercialmente, y el origen ayuda en la amplificación del vector en una célula huésped. Si el vector de elección no contiene un sitio de origen de replicación, puede sintetizarse químicamente uno basándose en una secuencia conocida, y ligarse al vector. Por ejemplo, el origen de replicación del plásmido pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) es adecuado para la mayoría de las bacterias gram negativas, y diversos orígenes virales (por ejemplo, SV40, polioma, adenovirus, virus de la estomatitis vesicular (VEV), o papilomavirus tales como VPH o VPB) son útiles para clonar vectores en células de mamífero. Generalmente, el componente de origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamífero (por ejemplo, el origen de SV40 se usa a menudo sólo porque también contiene el promotor temprano del virus).

Una secuencia de terminación de transcripción está ubicada normalmente en 3' con respecto al extremo de una región que codifica para polipéptido y sirve para terminar la transcripción. Habitualmente, una secuencia de terminación de transcripción en células procariotas es un fragmento rico en G-C seguido de una secuencia de poli-T. Aunque la secuencia se clona fácilmente a partir de una biblioteca o incluso se adquiere comercialmente como parte de un vector, también puede sintetizarse fácilmente usando métodos para la síntesis de ácido nucleico tales como los descritos en el presente documento.

Un gen marcador seleccionable codifica para una proteína necesaria para la supervivencia y el crecimiento de una célula huésped que se ha hecho crecer en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos codifican para proteínas que (a) confieren resistencia a los antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, tetraciclina o kanamicina para células huésped procariotas; (b) complementan las deficiencias auxotróficas de la célula; o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de un complejo o medios definidos. Los marcadores seleccionables preferidos son el gen de resistencia a la kanamicina, el gen de resistencia a la ampicilina y el gen de resistencia a la tetraciclina. De manera ventajosa, también puede usarse un gen de resistencia a la neomicina para la selección en células huésped tanto procariotas como eucariotas.

Pueden usarse otros genes seleccionables para amplificar el gen que se expresará. La amplificación es el proceso en el que los genes que se requieren para la producción de una proteína crítica para el crecimiento o la supervivencia celular se repiten en tándem dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Los ejemplos de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero incluyen dihidrofolato reductasa (DHFR) y genes de timidina cinasa sin promotor. Se colocan transformantes de células de mamífero a presión de selección, estando sólo adaptados de manera única los transformantes para sobrevivir en virtud del gen seleccionable presente en el vector. La presión de selección se impone cultivando las células transformadas en condiciones en las que se aumenta sucesivamente la concentración del agente de selección en el

medio, conduciendo de este modo a la amplificación tanto del gen seleccionable como del ADN que codifica para otro gen, tal como un anticuerpo que se une al polipéptido de NGF. Como resultado, se sintetizan cantidades aumentadas de un polipéptido tal como un anticuerpo anti-NGF a partir del ADN amplificado.

Habitualmente es necesario un sitio de unión a ribosoma para iniciar la traducción de ARNm y se caracteriza por una secuencia de Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia de Kozak (eucariotas). El elemento está ubicado normalmente en 3' con respecto al promotor y en 5' con respecto a la secuencia codificante del polipéptido que debe expresarse.

En algunos casos, tales como en los que se desea la glicosilación en un sistema de expresión de célula huésped eucariota, pueden manipularse las diversas pre o prosecuencias para mejorar la glicosilación o el rendimiento. Por ejemplo, puede alterarse el sitio de escisión mediante peptidasa de un péptido señal particular, o añadirse prosecuencias, lo que también afecta a la glicosilación. El producto de proteína final puede tener, en la posición 1 (con respecto al primer aminoácido de la proteína madura) uno o más aminoácidos adicionales que inciden sobre la expresión, que pueden no haberse eliminado totalmente. Por ejemplo, el producto de proteína final puede tener uno o dos residuos de aminoácido hallados en el sitio de escisión mediante peptidasa, unidos al extremo amino terminal. Alternativamente, el uso de algunos sitios de escisión enzimática puede dar como resultado una forma ligeramente truncada del polipéptido deseado, si la enzima corta en tal zona dentro del polipéptido maduro.

Los vectores de expresión y clonación de la invención contendrán normalmente un promotor que se reconozca por el organismo huésped y ligado operativamente a la molécula que codifica para el anticuerpo anti-NGF. Los promotores son secuencias no transcritas ubicadas aguas arriba (es decir, en el sentido de 5') con respecto al codón de iniciación de un gen estructural (generalmente dentro de aproximadamente 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción del gen estructural. Los promotores se agrupan convencionalmente en una de dos clases: promotores inducibles y promotores constitutivos. Los promotores inducibles inician niveles aumentados de transcripción a partir de ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, tal como la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. Por otro lado, los promotores constitutivos transcriben de manera uniforme el gen al que están ligados operativamente, es decir, con poco o ningún control sobre la expresión génica. Se conocen ampliamente un gran número de promotores, reconocidos por una variedad de posibles células huésped. Un promotor adecuado se liga operativamente al ADN que codifica para la cadena pesada o cadena ligera que comprende un anticuerpo anti-NGF de la invención retirando el promotor del ADN de la fuente mediante digestión con enzima de restricción e insertando la secuencia de promotor deseada en el vector.

También se conocen bien en la técnica promotores adecuados para su uso con huéspedes de levadura. De manera ventajosa se usan potenciadores de levadura con promotores de levadura. Los promotores adecuados para su uso con células huésped de mamífero se conocen ampliamente e incluyen, pero no se limitan a, los obtenidos de los genomas de virus tales como poliomavirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, retrovirus, virus de la hepatitis B y lo más preferiblemente virus del simio 40 (SV40). Otros promotores de mamífero adecuados incluyen promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, promotores de choque térmico y el promotor de actina.

Los promotores adicionales que pueden ser de interés incluyen, pero no se limitan a: promotor temprano de SV40 (Bernoist y Chambon, 1981, *Nature* 290: 304-10); promotor de CMV (Thomsen *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. USA* 81: 659-663); el promotor contenido en la repetición terminal larga en 3' de virus de sarcoma de Rous (Yamamoto, *et al.*, 1980, *Cell* 22: 787-97); promotor de timidina cinasa de herpes (Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 1444-45); promotor y secuencias reguladoras del gen de metalotionina (Brinster *et al.*, 1982, *Nature* 296: 39-42); y promotores procariotas tales como el promotor de 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 son de interés las siguientes regiones de control transcripcional animales, que presentan especificidad de tejido y se han utilizado en animales transgénicos: la región de control del gen de elastasa I que está activa en las 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 está activa en las células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, *Nature* 315: 115-22); la región de control del gen de la inmunoglobulina que está 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 de mama de ratón que está activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45: 485-95); la región de control del gen de la albúmina que está activa en el hígado (Pinkert *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1: 268-76); la región de control del gen de alfa-feto-proteína que está 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 alfa-1-antitripsina que está 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 está 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 de la mielina que está activa en los oligodendrocitos en el cerebro (Readhead *et al.*, 1987, *Cell* 48: 703-12); la región de control del gen de la cadena ligera de miosina 2 que está activa en el músculo esquelético (Sani, 1985, *Nature* 314: 283-86); y la región de control del gen de la hormona de liberación gonadotrófica que está activa en el hipotálamo (Mason *et al.*, 1986, *Science* 234: 1372-78).

Puede insertarse una secuencia potenciadora en el vector para aumentar la transcripción de ADN que codifica para la cadena ligera o cadena pesada que comprende un anticuerpo anti-NGF de la invención mediante eucariotas superiores. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, de manera habitual de aproximadamente 10-300 bp de longitud, que actúan sobre el promotor para aumentar la transcripción. Los potenciadores son relativamente independientes de la orientación y posición, habiéndose encontrado en posiciones tanto en 5' como en 3' con respecto a la unidad de transcripción. Se conocen varias secuencias potenciadoras disponibles de genes de mamífero (por ejemplo, globina, elastasa, albúmina, alfa-feto-proteína e insulina). Sin embargo, normalmente se usa un potenciador de un virus. El potenciador de SV40, el potenciador de promotor de expresión temprana de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus y los potenciadores de adenovirus conocidos en la técnica son elementos potenciales a modo de ejemplo para la activación de promotores eucariotas. Aunque un potenciador puede colocarse en el vector o bien en 5' o bien en 3' con respecto a una secuencia codificante, normalmente está ubicado en un sitio en 5' con respecto al promotor.

Los vectores de expresión de la invención pueden construirse a partir de un vector de partida tal como un vector disponible comercialmente. Tales vectores pueden contener o no todas las secuencias flanqueantes deseadas. Cuando una o más de las secuencias flanqueantes descritas en el presente documento ya no estén presentes en el vector, pueden obtenerse individualmente y ligarse al vector. Los métodos usados para obtener cada una de las secuencias flanqueantes son bien conocidos para un experto en la técnica.

Tras haber construido el vector y haberse insertado una molécula de ácido nucleico que codifica para una cadena ligera, una cadena pesada, o una cadena ligera y una cadena pesada que comprende un anticuerpo anti-NGF en el sitio apropiado del vector, puede insertarse el vector completado en una célula huésped adecuada para su amplificación y/o la expresión de polipéptido. La transformación de un vector de expresión para un anticuerpo anti-NGF en una célula huésped seleccionada puede realizarse mediante métodos bien conocidos incluyendo transfección, infección, coprecipitación con fosfato de calcio, electroporación, microinyección, lipofección, transfección mediada mediante DEAE-dextrano u otras técnicas conocidas. El método seleccionado será en parte en función del tipo de célula huésped que va a usarse. Estos métodos y otros métodos adecuados se conocen ampliamente por el experto en la técnica, y se exponen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, citado anteriormente.

Una célula huésped, cuando se cultiva en las condiciones apropiadas, sintetiza un anticuerpo anti-NGF que puede recogerse posteriormente del medio de cultivo (si la célula huésped lo secreta al medio) o directamente de la célula huésped que lo produce (si no se secreta). La selección de una célula huésped apropiada dependerá de diversos factores, tales como niveles de expresión deseados, modificaciones de polipéptidos que son deseables o necesarias para la actividad (tal como glicosilación o fosforilación) y facilidad de plegarla en una molécula biológicamente activa.

Las líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión se conocen bien en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), incluyendo, pero sin limitarse a células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster recién nacido (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2) y varias otras líneas celulares. En determinadas realizaciones, pueden seleccionarse líneas celulares determinando qué líneas celulares tienen niveles de expresión altos y producen de manera constitutiva anticuerpos con propiedades de unión a NGF. En otra realización, puede seleccionarse una línea celular del linaje de células B que no produce su propio anticuerpo pero tiene la capacidad para producir y secretar un anticuerpo heterólogo.

Los anticuerpos de la invención son útiles para la detección del NGF en muestras biológicas y la identificación de células o tejidos que producen la proteína de NGF. Los anticuerpos de la invención que se unen específicamente al NGF pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades mediadas por NGF. Dichos anticuerpos pueden usarse en ensayos de unión para detectar el NGF y para inhibir que el NGF forme un complejo con receptores de NGF. Dichos anticuerpos que se unen a NGF y bloquean la interacción con otros compuestos de unión pueden tener un uso terapéutico en la modulación de enfermedades mediadas por NGF. En realizaciones preferidas, los anticuerpos frente a NGF pueden bloquear la unión de NGF a su receptor, lo que puede dar como resultado la alteración de la cascada de transducción de señales inducida por NGF.

La presente invención también se refiere 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 o estado doloroso provocado por la expresión aumentada de NGF o la sensibilidad aumentada frente a NGF en un paciente, tal como uno cualquiera de los trastornos o estados dados a conocer en el presente documento.

En realizaciones preferidas, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o una pluralidad de los anticuerpos de la invención junto con un diluyente, portador, solubilizante, emulsionante, conservante y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, los materiales de formulación aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. En realizaciones preferidas, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpos anti-NGF.

En determinadas realizaciones, los materiales de formulación aceptables preferiblemente no son tóxicos para los

receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas.

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, osmolaridad, viscosidad, claridad, color, isotonicidad, olor, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución o liberación, adsorción o penetración de la composición. En tales realizaciones, los materiales de formulación adecuados incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos (tal como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); agentes antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrogenosulfito de sodio); tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos inorgánicos); agentes de carga (tales como manitol o glicina); agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)); agentes complejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monosacáridos; disacáridos; y otros hidratos de carbono (tales como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes, aromatizantes y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sales (tales como sodio); conservantes (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, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (tales como Pluronic, PEG, ésteres de sorbitano, polisorbatos tales como polisorbato 20, polisorbato 80, Triton, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes potenciadores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos, preferiblemente cloruro de sodio o potasio, manitol, sorbitol); vehículos de suministro; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. Véase REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª edición, (A. R. Gennaro, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

En determinadas realizaciones, un experto en la técnica determinará la composición farmacéutica óptima dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración pretendida, el formato de suministro y la dosificación deseada. Véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, citado anteriormente. En determinadas realizaciones, tales composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la tasa de liberación *in vivo* y la tasa de aclaramiento *in vivo* de los anticuerpos de la invención.

En determinadas realizaciones, el vehículo o portador primario en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza o bien acuosa o bien no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o portador adecuados puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral. Solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina sérica son vehículos a modo de ejemplo adicionales. En realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5, o tampón acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, y pueden incluir además sorbitol, sacarosa, Tween-20 y/o un sustituto adecuado para los mismos. En determinadas realizaciones de la invención, las composiciones de anticuerpo anti-NGF pueden prepararse para su almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, citado anteriormente) en forma de una torta liofilizada o en disolución acuosa. Además, en determinadas realizaciones, el producto de anticuerpo anti-NGF puede formularse como liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden seleccionarse para la administración parenteral. Alternativamente, las composiciones pueden seleccionarse para inhalación o para administración a través del tubo digestivo, tal como por vía oral. La preparación de tales composiciones farmacéuticamente aceptables es conocida por los expertos en la técnica.

Los componentes de formulación están presentes preferiblemente en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. En determinadas realizaciones, se usan tampones para mantener la composición a pH fisiológico o a una pH ligeramente inferior, normalmente dentro de un intervalo de pH de desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 8.

Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para su uso en esta invención pueden proporcionarse en forma de una disolución acuosa aceptable por vía parenteral, libre de pirógenos, que comprende el anticuerpo anti-NGF deseado en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para inyección parenteral es el agua destilada estéril en la que el anticuerpo anti-NGF se formula como una disolución isotónica, estéril, conservada apropiadamente. En determinadas realizaciones, la preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (tales como poli(ácido láctico) o poli(ácido glicólico)), perlas o liposomas, que pueden proporcionar una liberación controlada o sostenida del producto que puede administrarse por medio de inyección prolongada. En determinadas realizaciones, también puede usarse ácido hialurónico, teniendo el efecto de promover la duración sostenida en la circulación. En determinadas realizaciones, pueden usarse dispositivos de administración de fármacos implantables para introducir la molécula de anticuerpo deseada.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para inhalación. En estas realizaciones, los

anticuerpos anti-NGF se formulan de manera ventajosa como un polvo inhalable seco. En realizaciones preferidas, también pueden formularse disolución de inhalación de anticuerpo anti-NGF con un propelente para la administración mediante aerosol. En determinadas realizaciones, las disoluciones pueden nebulizarse. Por tanto, métodos de administración y formulación pulmonar se describen adicionalmente en la solicitud de patente internacional WO94/20069, que describe la administración pulmonar de proteínas modificadas químicamente.

También se contempla que las formulaciones puedan administrarse por vía oral. Los anticuerpos anti-NGF que se administra de este modo pueden formularse con o sin portadores usados habitualmente en la combinación de formas farmacéuticas sólidas tales como comprimidos y cápsulas. En determinadas realizaciones, puede diseñarse una cápsula para que libere la parte activa de la formulación en el punto en el tubo gastrointestinal en el que la biodisponibilidad esté maximizada y la degradación presistémica esté minimizada. Pueden incluirse agentes adicionales para facilitar la absorción del anticuerpo anti-NGF. También pueden emplearse diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes de disgregación de comprimidos y aglutinantes.

Se proporciona preferiblemente una composición farmacéutica de la invención para que comprenda una cantidad eficaz de uno o una pluralidad de anticuerpos anti-NGF en una mezcla con excipientes no tóxicos que sean adecuados para la fabricación de comprimidos. Disolviendo los comprimidos en agua estéril, u otro vehículo apropiado, pueden prepararse disoluciones en forma de dosis unitaria. Los excipientes adecuados 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 aglutinantes, tales como almidón, gelatina o goma arábiga; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Composiciones farmacéuticas adicionales resultarán evidentes para los expertos en la técnica, incluyendo formulaciones que implican anticuerpos anti-NGF en formulaciones de suministro sostenido o controlado. Los expertos en la técnica también conocen técnicas para formular una variedad de otros medios de suministro sostenido o controlado, tales como portadores de liposomas, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones prolongadas. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 93/15722, que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para el suministro de composiciones farmacéuticas. Las preparaciones de liberación sostenida pueden incluir matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas (tal como se dan a conocer en la patente estadounidense n.º 3.773.919 y la publicación de solicitud de patente europea n.º EP 058481), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de gamma-etilo (Sidman *et al.*, 1983, Biopolymers 22: 547-556), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer *et al.*, 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 y Langer, 1982, Chem. Tech. 12: 98-105), acetato de etilenvinilo (Langer *et al.*, citado anteriormente) o poli(ácido D(-)-3-hidroxibutírico) (publicación de solicitud de patente europea n.º EP 133.988). Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas que pueden prepararse mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véase por ejemplo, Eppstein *et al.*, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688-3692; publicación de solicitud de patente europea n.º EP 036.676; EP 088.046 y EP 143.949.

Las composiciones farmacéuticas usadas para la administración *in vivo* se proporcionan normalmente como preparaciones estériles. La esterilización puede realizarse mediante filtración a través de membranas de filtración estéril. Cuando la composición está liofilizada, la esterilización usando este método puede realizarse o bien antes de o bien tras la liofilización y reconstitución. Las composiciones para administración parenteral pueden almacenarse en forma liofilizada o en una disolución. Las composiciones parenterales generalmente se colocan en un recipiente que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón que puede perforarse mediante una aguja de inyección hipodérmica.

Una vez formulada la composición farmacéutica, puede almacenarse en viales estériles como una disolución, suspensión, gel, emulsión, sólido o como polvo deshidratado o liofilizado. Tales formulaciones pueden almacenarse o bien en una forma lista para usar o bien en una forma (por ejemplo, liofilizada) que se reconstituye antes de la administración.

La invención también proporciona kits para producir una unidad de administración de dosis única. Los kits de la invención pueden contener cada uno tanto un primer recipiente que tiene una proteína seca como un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa. En determinadas realizaciones de esta invención, se proporcionan kits que contienen jeringas precargadas de una sola cámara y de múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas de líquido y jeringas de liofilizado).

La cantidad eficaz de una composición farmacéutica que contiene anticuerpo anti-NGF que va a emplearse farmacéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto y los objetivos terapéuticos. Un experto en la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variarán dependiendo, en parte, de la molécula administrada, la indicación para la que está usándose el anticuerpo anti-NGF, la vía de administración, y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño de órganos) y/o el estado (la edad y salud general) del paciente. En determinadas realizaciones, el médico puede titular la dosificación y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación típica puede oscilar entre aproximadamente 0,1 µg/kg y aproximadamente 30 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En realizaciones

preferidas, la dosificación puede oscilar entre 0,1 µg/kg y aproximadamente 30 mg/kg; más preferiblemente entre 1 µg/kg y aproximadamente 30 mg/kg; o incluso más preferiblemente entre 5 µg/kg y aproximadamente 30 mg/kg.

La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos del anticuerpo anti-NGF particular en la formulación usada. Normalmente, un médico administra la composición hasta que se alcanza una dosificación que logra el efecto deseado. Por tanto la composición puede administrarse como una dosis única, o como dos o más dosis (que pueden contener o no la misma cantidad de la molécula deseada) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua por medio de un catéter o dispositivo de implante. La mejora adicional de la dosificación apropiada se realiza de manera rutinaria por los expertos habituales en la técnica y está dentro del ámbito de las tareas realizadas de manera rutinaria por los mismos. Las dosificaciones apropiadas pueden determinarse mediante el uso de datos de respuesta a la dosis. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden administrarse a pacientes a lo largo de un periodo de tiempo prolongado. La administración crónica de un anticuerpo de la invención minimiza la respuesta alérgica o inmunitaria adversa asociada comúnmente con anticuerpos que se generan 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 es de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo por vía oral, a través de inyección por vías intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimatosa), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal o intralesional; mediante sistemas de liberación sostenida o mediante dispositivos de implante. En determinadas realizaciones, las composiciones pueden administrarse mediante inyección por bolo o de manera continua mediante infusión, o mediante un dispositivo de implante.

La composición también puede administrar localmente por medio del implante de una membrana, esponja u otro material apropiado en el que se ha absorbido o encapsulado la molécula deseada. En determinadas realizaciones, en las que se usa un dispositivo de implante, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y el suministro de la molécula deseada puede ser por medio de difusión, bolo de liberación temporizada o administración continua.

También puede ser deseable usar composiciones farmacéuticas de anticuerpo anti-NGF según la invención *ex vivo*. En tales casos, células, tejidos u órganos que se han extraído del paciente se exponen a composiciones farmacéuticas de anticuerpo anti-NGF tras lo cual las células, tejidos y/u órganos se implantan posteriormente de vuelta en el paciente.

En particular, los anticuerpos anti-NGF puede suministrarse implantando determinadas células que se han modificado mediante ingeniería genética, usando métodos tales como los descritos en el presente documento, para expresar y secretar el polipéptido. En determinadas realizaciones, tales células pueden ser células de animal o humanas, y pueden ser autólogas, heterólogas o xenogénicas. En determinadas realizaciones, las células pueden estar inmortalizadas. En otras realizaciones, con el fin de reducir la posibilidad de una respuesta inmunológica, pueden encapsularse las células para evitar la infiltración de tejidos circundantes. En realizaciones adicionales, los materiales de encapsulación son normalmente membranas o recubrimientos poliméricos, semipermeables, biocompatibles, que permiten la liberación del/de los producto(s) de proteína pero impiden la destrucción de las células mediante el sistema inmunitario del paciente o mediante otros factores perjudiciales de los tejidos circundantes.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos realizados y los resultados logrados se proporcionan sólo para fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitativos de la invención.

Ejemplo 1

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

Clonación de rHu-NGF (1-120)

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

Se derivó el vector de expresión pCFM1656 (n.º de la ATCC 69576) del sistema de vector de expresión descrito en

la patente estadounidense n.º 4.710.473. El plásmido pCFM1656 puede derivarse del plásmido pCFM836 descrito (patente n.º 4.710.473): (a) destruyendo los dos sitios de restricción *NdeI* endógenos mediante relleno de extremos con la enzima polimerasa de T4 seguido por ligación 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 por un fragmento similar obtenido de pCFM636 (patente n.º 4.710.473) que contiene el promotor P_L y luego (c) sustituyendo la secuencia de ADN pequeña entre los sitios de restricción *Clal* y *KpnI* únicos por un oligonucleótido que resulta del apareamiento de dos sondas que tienen las secuencias de nucleótidos mostradas en SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32.

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

Expresión de rHu-NGF (1-120)

Se sometieron a fermentación células de *E. coli* que contenían el constructo de expresión de NGF (tal como se describió anteriormente) en medio rico en modo de alimentación discontinua. Se hicieron crecer las células 30°C hasta una DO a 600 nm de 49, y luego se indujeron mediante desplazamiento de temperatura hasta 42°C. Se recogieron las células mediante centrifugación a las cuatro horas tras la inducción. La DO final fue de 75. Se determinó que el rendimiento de expresión era de aproximadamente 0,15 g/l.

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

Se lisó la pasta celular en un microfluidizador, se centrifugó a 10.000 X g durante 30 minutos, se lavó el sedimento con ácido desoxicolico al 1%, se centrifugó como anteriormente y entonces se lavó el sedimento resultante con agua fría y volvió a centrifugarse. Se resuspendió el sedimento resultante (WIB-cuerpos de inclusión lavados ("washed inclusion bodies")) en desnaturalizante, guanidina HCl 8 M, Tris 50 mM pH 8,5, que contenía DTT 10 mM, y se solubilizó a temperatura ambiente durante 1 hora, se centrifugó a 10.000 x g durante 30 minutos y se decantó el sobrenadante cuidadosamente y entonces se diluyó 25 veces en un tampón acuoso que contenía una pareja redox a 4°C, durante 5 días. Se tituló entonces el replegado resultante hasta pH 3,0, se filtró a través de un filtro de 0,45 µm. Se purificó el replegado usando una columna de flujo rápido de Sp-Sepharose usando un gradiente de NaCl convencional. Se concentró posteriormente la agrupación de la columna de intercambio catiónico y se congelaron alícuotas a -80°C. Se evaluó la pureza de la proteína mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) y se analizó mediante tinción con azul de Coomassie. La proteína purificada era más del 90% de la banda principal mediante este método.

Ejemplo 2

Producción de anticuerpos monoclonales humanos contra el factor de crecimiento nervioso (NGF)

Ratones KM y HuMab transgénicos

Se prepararon anticuerpos monoclonales completamente humanos frente a NGF usando las 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 ratones, se ha alterado de manera homocigota el gen de cadena ligera kappa de ratón endógeno tal como se describe en Chen *et al.* (1993, EMBO J. 12: 811-820), y se ha alterado de manera homocigota el gen de cadena pesada de ratón endógeno tal como se describe en el ejemplo 1 de la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 01/09187. Cada una de estas cepas de ratones porta un transgén de cadena ligera kappa humana, KCo5, tal como se describe en Fishwild *et al.* (1996, Nature Biotechnology 14: 845-851). La cepa HCo7 porta el transgén de cadena pesada humana de HCo7 tal como se describe en las patentes estadounidenses n.ºs 5.545.806, 5.625.825 y 5.545.807. La cepa HCo12 porta el transgén de cadena pesada humana de HCo12 tal como se describe en el ejemplo 2 de la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 01/09187. La cepa HCo7+HCo12 porta los transgenes de cadena pesada tanto de HCo7 como de HCo 12 y es homocigota para cada transgén. Los ratones KM comprenden el transgén de cadena pesada de SC20 tal como se describe en Tomizuka *et al.* (1997, Nature Genet. 16,133-143 y 2000, Proc. Natl. Acad. Sci, 97,722-727). Este transgén no está integrado en un cromosoma de ratón, sino que en su lugar se propaga como un fragmento cromosómico independiente. El fragmento incluye aproximadamente 15 MB del cromosoma humano 14. Contiene el locus de cadena pesada humana completo incluyendo todos los segmentos génicos VH, D y JH y todos los isotipos de región constante de cadena pesada. Todas estas cepas se denominan en el presente documento ratones HuMab.

Inmunizaciones de HUMab

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos frente a NGF, se inmunizaron ratones HuMab con NGF recombinante purificado derivado de células de *E. coli* como antígeno (ejemplo 1). Se describen esquemas de inmunización generales para ratones HuMab en Lonberg *et al.* (1994, Nature 368: 856-859; Fishwild *et al.*, citado anteriormente, y la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 98/24884). Los ratones tenían 6-16 semanas de edad tras la primera infusión de antígeno. Se usó una preparación recombinante purificada (25-100 µg) de antígeno de NGF para inmunizar los ratones HuMab por vía intraperitoneal (i.p.) o por vía subcutánea (s.c.).

Se lograron las inmunizaciones de ratones transgénicos HuMab usando antígeno en adyuvante completo de Freund

y dos inyecciones, seguido por 2-4 semanas de inmunización i.p. (hasta un total de 9 inmunizaciones) con el antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Se inmunizaron varias docenas de ratones para cada antígeno. Se inmunizaron un total de 118 ratones de las cepas HCo7, HCo12, HCo7+HCo12 y KM con antígeno de NGF. Se monitorizó la respuesta inmunitaria mediante sangrías retroorbitales.

- 5 Para seleccionar ratones HuMaB que producen anticuerpos que se unen a NGF humano, se sometieron a prueba sueros de ratones inmunizados mediante ELISA tal como se describe por Fishwild *et al.* citado anteriormente. En resumen, se recubrieron placas de microtitulación con NGF recombinante purificado a partir de *E. coli* (ejemplo 1) a 1-2 µg/ml en PBS y 50 µl/pocillo y se incubaron a 4°C durante la noche, luego se bloquearon con 200 µl/pocillo de suero de pollo al 5% en PBS/Tween (0,05%). Se añadieron diluciones de plasma de ratones inmunizados con NGF a cada pocillo y se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron las placas con PBS/Tween y luego se incubaron con un reactivo policlonal específico de Fc anti-IgG humana de cabra conjugado con peroxidasa del rábano (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas con PBS/Tween y se incubaron con un reactivo policlonal específico de Fc anti-IgG humana de cabra conjugado con peroxidasa del rábano (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar, se revelaron las placas con sustrato ABTS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, n.º de catálogo A-1888, 0,22 mg/ml) y se analizaron de manera espectrofotométrica determinando la densidad óptica (DO) a longitudes de onda de desde 415-495 nm. Se usaron ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-NGF para producir anticuerpos monoclonales tal como se describe a continuación.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos frente a NGF

- 20 Se prepararon ratones para la producción de anticuerpos monoclonales mediante refuerzo con antígeno por vía intravenosa 2 días antes del sacrificio, y se extirparon los bazo después de eso. Se aislaron los esplenocitos de ratón de los ratones HuMaB y se fusionaron con PEG frente a una línea celular de mieloma de ratón usando protocolos convencionales. Normalmente, se realizaron 10-20 fusiones para cada antígeno

- 25 En resumen, se fusionaron suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con un cuarto del número de células de mieloma de ratón no secretantes P3X63-Ag8.653 (ATCC, n.º de registro CRL 1580) con PEG al 50% (Sigma). Se sembraron en placa las células a aproximadamente 1×10^5 /pocillo en placas de microtitulación de fondo plano, seguido por aproximadamente una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene suero bovino fetal al 10%, medio condicionado con P388D1 al 10% (ATCC, n.º de registro CRL TIB-63), origen al 3-5% (IGEN) en DMEM (Mediatech, n.º de catálogo CRL 10013, con alta concentración de glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio) más HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, gentamicina 50 mg/ml y 1x HAT (Sigma, n.º de catálogo CRL P-7185). Tras 1-2 semanas, se cultivaron las células en medio en el que se reemplazó HAT por HT.

- 35 Se examinaron los hibridomas resultantes para determinar la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Se examinaron pocillos individuales mediante ELISA (descrito anteriormente) para anticuerpos de IgG monoclonales anti-NGF. Una vez que se produjo crecimiento de hibridomas extenso, se monitorizó el medio habitualmente tras 10-14 días. Se volvieron a sembrar en placa hibridomas que secretan anticuerpos, se examinaron de nuevo y, si todavía eran positivos para IgG humana, se subclonaron anticuerpos monoclonales anti-NGF al menos dos veces mediante dilución limitante. Entonces se cultivaron los subclones estables *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo tisular para la caracterización.

Selección de anticuerpos monoclonales humanos que se unen a NGF

- 40 Se usó un ensayo de ELISA tal como se describió anteriormente para seleccionar hibridomas que mostraban reactividad positiva con inmunógeno de NGF. Se subclonaron hibridomas que secretan un anticuerpo monoclonal que se une con alta avidéz a NGF y se caracterizaron adicionalmente. Se eligió un clon de cada hibridoma, que conservaba la reactividad de las células originales (tal como se determina mediante ELISA), para preparar un banco de células en 5-10 viales almacenados en nitrógeno líquido.

- 45 Se realizó un ELISA específico de isotipo para determinar el isotipo de los anticuerpos monoclonales producidos tal como se da a conocer en el presente documento. En estos experimentos, se recubrieron pocillos de placas de microtitulación con 50 µl/pocillo de una disolución de 1 µg/ml de anticuerpo anti-cadena ligera kappa humana de ratón en PBS y se incubaron a 4°C durante la noche. Tras bloquear con suero de pollo al 5%, se hicieron reaccionar las placas con sobrenadante de cada anticuerpo monoclonal sometido a prueba y un control de isotipo purificado. Se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 1-2 horas. Entonces se hicieron reaccionar los pocillos con diversos antisueros policlonales anti-ser humano de cabra conjugados con peroxidasa del rábano específicos de IgG humana y se revelaron y se analizaron las placas tal como se describió anteriormente.

- 55 Se sometieron a prueba adicionalmente mediante ELISA anticuerpos monoclonales purificados a partir de los sobrenadantes de hibridoma que mostraban unión significativa a NGF para determinar la actividad biológica usando una variedad de bioensayos tal como se describe a continuación.

Ejemplo 3

Selección y clonación de anticuerpos anti-NGF con actividad neutralizante de NGF potente

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

Cultivos neuronales de ganglios de la raíz dorsal

- 5 Se disecaron ganglios de la raíz dorsal (DRG) uno a uno en condiciones asépticas a partir de todos los segmentos medulares de ratas embrionarias de 19 días de edad (E19) que se extrajeron quirúrgicamente del útero de ratas Sprague-Dawley (Charles River, Wilmington, MA) anestesiadas de manera terminal, preñadas de manera programada. Se recogieron los DRG en medio L-15 enfriado con hielo (GibcoBRL, Grand Island, NY) que contenía suero de caballo inactivado con calor al 5% (GibcoBRL), y se eliminaron cualquier vaso sanguíneo y tejido conjuntivo
- 10 suelto. En enjuagaron los DRG dos veces en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} (DPBS), pH 7,4 (GibcoBRL). Entonces se disociaron los DRG para dar una suspensión de células individuales usando un sistema de disociación con papaína (Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ). En resumen, se incubaron los DRG en una disolución de digestión que contenía 20 U/ml de papaína en disolución salina equilibrada de Earle (EBSS) a 37°C durante cincuenta minutos. Se disociaron las células mediante trituración a través de
- 15 pipetas Pasteur pulidas al fuego en un medio de disociación que consistía en MEM/F12 de Ham, 1:1, inhibidor ovomucoide 1 mg/ml y ovoalbúmina 1 mg/ml, y desoxirribonucleasa I (ADNasa) al 0,005%.

- Se sedimentaron las células disociadas a 200 x g durante cinco minutos y se resuspendieron en EBSS que contenía inhibidor ovomucoide 1 mg/ml, ovoalbúmina 1 mg/ml y ADNasa al 0,005%. Se centrifugó la suspensión de células a través de una disolución en gradiente que contenía inhibidor ovomucoide 10 mg/ml, ovoalbúmina 10 mg/ml a 200 x g
- 20 durante seis minutos para eliminar los desechos celulares, y luego se filtró a través de una malla de nailon de 88 μm (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) para eliminar cualquier grumo. Se determinó el número de células con un hemocitómetro, y se sembraron las células en placas de 96 pocillos recubiertas con poliornitina 100 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma, St. Louis, MO) y laminina de ratón 1 $\mu\text{g/ml}$ (GibcoBRL) a 10×10^3 células/pocillo en medio completo. El medio completo consistía en medio esencial mínimo (MEM) y F12 de Ham, 1:1, penicilina (100 U/ml), estreptomina (100 $\mu\text{g/ml}$) y suero de caballo inactivado con calor al 10% (GibcoBRL). Se mantuvieron los cultivos a 37°C, CO_2 al 5% y 100% de humedad. Para controlar el crecimiento de células no neuronales, se incluyeron en el medio 5-fluoro-2'-desoxiuridina (75 μM) y uridina (180 μM).
- 25

Tratamiento con NGF y anticuerpo anti-NGF

- 30 Dos horas tras la siembra en placa, se trataron las células con β -NGF humano recombinante (Amgen) o β -NGF de rata recombinante (R & D Systems, Minneapolis, MN) a una concentración de 10 ng/ml (0,38 nM). Se aplicaron controles positivos que comprendían anticuerpo anti-NGF diluido en serie (R & D Systems) a cada placa de cultivo. Se añadieron anticuerpos de prueba a diez concentraciones usando diluciones en serie de 3,16 veces. Se diluyeron todas las muestras en medio completo antes de añadirse a los cultivos. El tiempo de incubación fue de 40 horas antes de la medición de la expresión de VR1.

35 *Medición de la expresión de VRI en neuronas de DRG*

- Se fijaron los cultivos con paraformaldehído al 4% en disolución salina equilibrada de Hank durante quince minutos, se bloquearon con Superblock (Pierce, Rockford, IL) y se permeabilizaron con Nonidet P-40 al 0,25% (Sigma) en solución salina tamponada con Tris-HCl (Sigma) (TBS) durante una hora a temperatura ambiente. Se enjuagaron los cultivos una vez con TBS que contenía Tween 20 al 0,1% (Sigma) y se incubaron con IgG de conejo anti-VRI
- 40 durante una hora y media a temperatura ambiente, seguido por incubación de anticuerpo secundario anti-conejo marcado con Eu (Wallac Oy, Turku, Finlandia) durante una hora a temperatura ambiente. Se aplicaron lavados con TBS (3 x cinco minutos con agitación lenta) tras cada incubación con anticuerpo. Se añadió disolución de potenciación (150 $\mu\text{l/pocillo}$, Wallac Oy) a los cultivos. Entonces se midió la señal de fluorescencia en un fluorómetro de resolución temporal (Wallac Oy). Se determinó la expresión de VR1 en muestras tratadas con los péptidos modificados mediante comparación con una curva patrón de la titulación de NGF a partir de 0-1000 ng/ml. Se determinó el porcentaje de inhibición (en comparación con la inhibición máxima posible) del efecto de NGF sobre la expresión de VR1 en neuronas de DRG comparando con controles que no estaban tratados con NGF. Los resultados se facilitan en las tablas 2 y 5.
- 45

- Se marcaron las líneas celulares como n.º 110-n.º 129. Los anticuerpos de las líneas celulares n.º 119, n.º 124 y n.º 125 demostraron una actividad de neutralización de NGF extremadamente potente (figura 1). La línea celular n.º 124 era una línea celular original, también denominada 4D4. Las líneas celulares n.º 119 y n.º 125 eran subclones de la 4D4 original. Se hizo crecer una muestra adicional del vial original que comprendía el hibridoma n.º 124 (4D4) y se marcó como n.º 167 (4D4).
- 50

- Se sometieron los anticuerpos generados por el hibridoma n.º 167 (4D4) al mismo ensayo de neutralización de NGF basado en neuronas de DRG que las muestras previas. El anticuerpo n.º 167 (4D4) demostró una fuerte actividad anti-NGF con una CI_{50} de 0,50 nM (figura 2), lo que concordaba con la actividad de las muestras n.º 119, n.º 124 y n.º 125. Las actividades de las 4 muestras se muestran en la tabla 2.
- 55

Tabla 2

Actividad anti-NGFh en células de DRG usando NGFh 0,38 nM	
N.º de código	CI50
119 (a partir de 124)	< 1,2 nM
124 (original)	< 0,57 nM
125 (a partir de 124)	< 0,3 nM
167 (a partir de la misma muestra que 124)*	0,50 nM

Secuenciación N-terminal y espectrometría de masas

Se prepararon muestras de anticuerpos anti-hibridoma de NGF purificadas para la secuenciación de proteínas y análisis de CL/EM. Se purificaron los anticuerpos a partir de medios condicionados mediante concentración de los medios usando Amicon centrifrep-30 hasta que el volumen era inferior a 15 ml. Se lavó un lote de resina rProA (Pharmacia) 4x con PBS y se preparó una suspensión al 50% en PBS tras el último lavado. Se añadió una cantidad apropiada de resina rProA (aproximadamente 5 µg de anticuerpo/µl de resina pero se usan no menos de 50 µl de resina) a la muestra de anticuerpos y se incubó durante la noche a 4°C. Se centrifugó la mezcla de Ac-resina y se recogió la fracción no unida. Tras la adición de 0,5 ml de PBS y la transferencia a un tubo Spin-X (CoStar) de 0,45 µm, se centrifugó la muestra a 10000 rpm durante 3 min. A continuación se lavó la resina al menos 3 veces con 0,5 ml de PBS y luego se añadió glicina 0,1 M (pH 2,7) a 1,5x volúmenes de resina y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente seguido por otra centrifugación durante 3 minutos a 10000 rpm, recogiendo el sobrenadante. Se repitió esta etapa de elución dos veces más y entonces se neutralizó el sobrenadante combinado con 1/25ª parte del volumen de tris 1,0 M (pH 9,2).

Tras una etapa de filtración final a través de un tubo Spin-x nuevo (0,2 µm), se cuantificó el anticuerpo usando un ensayo de Bradford convencional usando IgG humana como patrón o alternativamente absorbancia a 280 para muestras más grandes. También se ejecutó un gel usando 2 µg de cada muestra junto con 2 µg IgG1,k humana (Sigma). Para la espectrometría de masas, se desglicosilaron cuatro microgramos de las muestras, se redujeron y se cargaron sobre una HPLC (HP1090) en línea unido a un espectrómetro de masas Finigan LCQ. Se separó la cadena ligera de la cadena pesada mediante HPLC de fase inversa. Se recogieron también las cadenas ligeras y las cadenas pesadas para el análisis de secuenciación de proteína N-terminal.

Las secuencias N-terminales tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada de la muestra de anticuerpo anti-NGF n.º 167 (4D4) coincidían con ambas secuencias N-terminales de la muestra de anticuerpo anti-NGF n.º 119 (4D4). Además, la masa medida de los anticuerpos indicaba que los anticuerpos aislados de los hibridomas n.º 167 y n.º 119 eran iguales. La masa medida, deconvoluta (23096) de la cadena ligera del anticuerpo anti-NGF n.º 167 coincidía con la masa medida (23096) de la cadena ligera del Ac anti-NGF n.º 119.

Clonación de las cadenas pesada y ligera de anticuerpos anti-NGF

Se usó el hibridoma que expresaba el anticuerpo monoclonal de unión a NGF más potente, 4D4.D7, como fuente para aislar ARN total usando reactivo TRIzol® (Invitrogen). Se sintetizó ADNc de la primera hebra usando un cebador al azar con un adaptador de extensión (5'-GGC CGG ATA GGC CTC CAN NNN NNT-3') (SEQ ID NO: 33) y se realizó un ensayo preparativo 5' RACE (amplificación rápida de extremos de ADNc) usando el kit GeneRacer™ (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Para preparar ADNc que codifica para la cadena ligera completa, el cebador directo era el cebador anidado de GeneRacer™, y el cebador inverso era 5'-GGG GTC AGG CTG GAA CTG AGG-3' (SEQ ID NO: 34). Para preparar ADNc que codifica para la región variable de la cadena pesada, el cebador directo era el cebador anidado de GeneRacer™ y el cebador inverso era 5'-TGA GGA CGC TGA CCA CAC G-3' (SEQ ID NO 35). Se clonaron los productos de RACE en pCR4-TOPO (Invitrogen) y se determinaron las secuencias. Se usaron las secuencias consenso para diseñar cebadores para la amplificación por PCR de la cadena de anticuerpo de longitud completa.

Para preparar ADNc que codifica para la cadena ligera kappa de 4D4.D7 anti-NGF, el cebador de PCR 5' codificaba para el extremo amino terminal de la secuencia señal, un sitio de enzima de restricción XbaI y una secuencia 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' codificaba para el extremo carboxilo terminal y el codón de terminación, así como un sitio de restricción Sall (5'-CTT GTC GAC TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT C-3'; SEQ ID NO: 37). Se purificó el fragmento de producto de PCR resultante, se digirió con XbaI y Sall, y entonces se aisló en gel y se ligó en el vector de expresión de mamífero pDSRα20 (véase la publicación de solicitud internacional n.º WO 90/14363. Se produjo pDSRα20 cambiando el nucleótido 2563 en pDSRa19 de una "guanósina" a una "adenósina" mediante mutagénesis dirigida al sitio).

Para preparar ADNc que codifica para la cadena pesada de 4D4.D7 anti-NGF, el cebador de PCR 5' codificaba para el extremo amino terminal de la secuencia señal, un sitio de enzima de restricción XbaI y una secuencia 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' codificaba para el extremo carboxilo terminal y el codón de terminación, así como un sitio de restricción *SalI* (5'-GCA TGT CGA CTC ATT TAC CCG GAG ACA GGG AGA G-3'; SEQ ID NO: 39). Se purificó el producto resultante, se digirió con *XbaI* y *SalI*, se aisló en gel y se ligó en el vector pDSR α 20.

La masa calculada (23099), tal como se determina traduciendo la secuencia de nucleótidos a aminoácidos pronosticados y añadiendo juntos los pesos moleculares de los aminoácidos, de la secuencia de ADN de la cadena ligera del clon de Ac 4D4 anti-NGF coincidía con la masa medida tal como se determina mediante espectrometría de masas. La masa medida, deconvoluta (49479) de la cadena pesada del Ac anti-NGF n.º 167 coincidía con la masa medida (49484) de la cadena pesada del Ac n.º 119 anti-NGF y también coincidía con la masa teórica (49484) de la secuencia de ADN de la cadena pesada del clon de Ac 4D4 anti-NGF (tabla 3) dentro de la desviación instrumental.

Los datos de la secuencia de proteína N-terminal y CL/EM confirmaron que el hibridoma n.º 119 expresaba el mismo anticuerpo que el hibridoma n.º 167. Además, la masa calculada de los anticuerpos basados en la secuencia confirmó adicionalmente la observación.

Tabla 3 – Resumen de hallazgos de espectrometría de masas

Ac anti-NGF	Masa medida del Ac n.º 167	Masa medida del Ac n.º 119	Masa teórica derivada de la secuencia de ADN del Ac 4D4
Cadena ligera	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 la expresión estable del AcM anti-NGF 4D4 mediante cotransfección de plásmidos de cadena pesada de 4D4/cadena pesada de 4D4 o IgG2 pDSR α 19/IgG1 pDSR α 19 y NGF-kappa/pDSR α 19 en células de ovario de hámster chino (CHO) adaptadas a medio libre de suero deficientes en dihidrofolato reductasa (DHFR) usando un método de fosfato de calcio. Se seleccionaron las células transfectadas en medio que contenía suero dializado pero que no contenía hipoxantina-timidina para garantizar el crecimiento de células que expresan la enzima DHFR. Se seleccionaron los clones transfectados usando ensayos tales como ELISA con el fin de detectar la expresión de AcM anti-NGF 4D4 en el medio condicionado. Se sometieron los clones de máxima expresión a concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) para la amplificación de DHFR. Se seleccionaron los clones amplificados con MTX usando ensayos tales como ELISA con el fin de detectar una expresión superior de AcM anti-NGF 4D4 en el medio condicionado. Se sometieron los clones de máxima expresión a subclonación para obtener una población homogénea y la creación de bancos de células.

Pueden generarse anticuerpos anti-NGF recombinantes de la invención en células de ovario de hámster chino deficientes en DHFR usando el mismo protocolo que se describió anteriormente para el anticuerpo monoclonal anti-NGF. Se clonan las secuencias de ADN que codifican para la cadena ligera o cadena pesada completa de cada anticuerpo anti-NGF de la invención en vectores de expresión. Se cotransfectan células CHO con un vector de expresión que puede expresar una cadena pesada completa y un vector de expresión que expresa la cadena ligera completa del anticuerpo anti-NGF apropiado. Por ejemplo, para generar el anticuerpo anti-NGF, se cotransfectan células con un vector que puede expresar una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 40 y un vector que puede expresar una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 44. La tabla 4 resume las cadenas ligeras completas y pesadas completas para los anticuerpos 4D4 que tienen diversas 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
Anticuerpo	Región variable de cadena pesada + región constante de cadena pesada	Cadena pesada completa
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 ligera + región constante de cadena ligera	Cadena ligera 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**

Se sometieron a prueba anticuerpos 4D4 anti-NGF expresados de manera transitoria, generados en células hechas crecer en condiciones de frasco centrifugador (S) o frasco rotatorio (R) para confirmar su capacidad para neutralizar NGF en un bioensayo de neutralización de NGF basado en neuronas de DRG, realizado tal como se describió anteriormente (ejemplo 3).

Se expresaron de manera transitoria los anticuerpos anti-NGF en células 293T adaptadas a suspensión libre de suero. Se realizaron las transfecciones como cultivos de o bien 500 ml o bien 1 l. En resumen, se centrifugó el inóculo celular ($5,0 \times 10^5$ células/ml X volumen de cultivo) a 2.500 rpm durante 10 minutos a 4°C para eliminar el medio condicionado. Se resuspendieron las células en DMEM libre de suero y se centrifugaron de nuevo a 2.500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Tras aspirar la disolución de lavado, se resuspendieron las células en medio de crecimiento [DMEM/F12 (3:1) + 1X complemento de insulina-transferrina-selenio + 1X pen. estrept. glut. + L-glutamina 2 mM + HEPES 20 mM + Pluronic F68 al 0,01%] en un cultivo en frasco centrifugador de 1 l o 3 l. Se mantuvo el cultivo en frasco centrifugador sobre una placa de agitación magnética a 125 rpm que se colocó en un incubador humidificado mantenido a 37°C y CO₂ al 5%. Se complejó el ADN de plásmido con el reactivo de transfección en un tubo cónico de 50 ml. Se preparó el complejo de ADN-reactivo de transfección en un 5% del volumen de cultivo final en DMEM libre de suero. Se añadió en primer lugar 1 µg de ADN de plásmido/ml de cultivo a DMEM libre de suero, seguido por 1 µl de X-TremeGene RO-1539/ml de cultivo. Se incubaron los complejos a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos y luego se añadieron a las células en el frasco centrifugador. Se realizó la transfección/expresión durante 7 días, tras lo cual se recogió el medio condicionado mediante centrifugación a 4.000 rpm durante 60 minutos a 4°C.

Para transfecciones transitorias en frascos rotatorios, se usaron células adherentes 293T hechas crecer y mantenidas en DMEM complementado con FBS al 5% + 1X aminoácidos no esenciales + 1X pen. estrept. glut. + 1X piruvato de sodio. Aproximadamente, se sembraron $4-5 \times 10^7$ células 293T en un frasco rotatorio de 850 cm² durante la noche. Entonces se transfectaron las células sembradas anteriormente el siguiente día usando el reactivo de transfección FuGene6. Se preparó la mezcla de ADN-reactivo de transfección en aproximadamente 6,75 ml de DMEM libre de suero. Se añadieron en primer lugar 675 µl de reactivo de transfección FuGene6, seguido por 112,5 µg de ADN de plásmido. Se incubó el complejo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Entonces se añadió toda la mezcla a un frasco rotatorio. Se gasificó el frasco rotatorio con una mezcla de gas de CO₂ al 5 % se tapó herméticamente y se colocó en un incubador a 37°C sobre un soporte rotatorio que rota a 0,35 rpm. Se realizó la transfección durante 24 horas tras lo cual se reemplazó el medio por 100 ml de DMEM + 1X complemento de insulina-transferrina-selenio + 1X pen. estrept. glut. + 1X aminoácidos no esenciales + 1X piruvato de sodio. Normalmente, se obtuvieron dos cosechas de 48 horas de 100 ml a partir de cada frasco rotatorio. Se agrupó el medio condicionado libre de suero recogido y se centrifugó a 4.000 rpm durante 30 minutos a 4°C.

Tanto 4D4.IgG1 como 4D4.IgG2 mostraron una potente actividad con valores de CI₅₀ de aproximadamente 0,14 nM a aproximadamente 0,2 nM contra NGF humano (figura 2). Los resultados del ensayo de actividad se resumen en la tabla 5. Los anticuerpos mostraban poca actividad contra NGF de rata (figura 3). Los resultados se asemejan a la actividad de los anticuerpos sometidos a prueba directamente a partir de los hibridomas descritos anteriormente.

TABLA 5

Ac	CI ₅₀ frente a NGFh (nM)	CI ₅₀ frente a NGFr (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

NGFh = NGF humano, NGFr = NGF de rata, R = cultivo rotatorio, S = cultivo centrifugador

Ejemplo 6**Producción de anticuerpo anti-NGF**

Se produce anticuerpo anti-NGF mediante expresión en una línea clonal de células CHO. Para cada ronda de producción, se descongelan las células de un vial individual en medios de cultivo celular libres de suero. Las células se hacen crecer inicialmente en un frasco T seguido por frascos centrifugadores y luego se hacen crecer en reactores de acero inoxidable de aumento a escala creciente hasta un biorreactor de 2000 l. La producción se lleva a cabo en un biorreactor de 2000 l usando un cultivo de alimentación discontinua, en el que se añade una alimentación de nutrientes que contiene componentes de medios concentrados para mantener el crecimiento celular y la viabilidad del cultivo. La producción dura aproximadamente dos semanas, tiempo durante el cual se produce de manera constitutiva anticuerpo anti-NGF por las células y se secreta a los medios de cultivo celular.

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

Al final de la producción, el caldo celular se alimenta a una centrífuga de soporte de discos y se separa el sobrenadante de cultivo de las células. Se clarifica adicionalmente el concentrado a través de un filtro de profundidad seguido por un filtro de 0,2 µm. Se concentran entonces los medios condicionados clarificados mediante ultrafiltración de flujo tangencial. Se concentran los medios condicionados de 15 a 30 veces. Los medios condicionados concentrados resultantes o bien se procesan entonces a través de purificación o bien se congelan para su purificación en una fecha posterior.

Ejemplo 7

Reactividad cruzada con otras neurotrofinas

Se sometieron a prueba los anticuerpos 4D4 para determinar su reactividad cruzada contra NT3 humano o BDNF humano en diferentes bioensayos, incluyendo el ensayo de supervivencia de neuronas de DRG para NT3 humano y el ensayo de captación de DA en neuronas con DA cultivadas para BDNF humano.

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

Dos horas tras la siembra en placa, se trataron células de DRG (procedimiento de aislamiento descrito anteriormente en el ejemplo 3) con hNT-3 recombinante 100 ng/ml (3,8 nM). Se usó anticuerpo anti-hNT3 (R & D) diluido en serie como control positivo. Se añadieron muestras desconocidas (muestras de Ac anti-NGF) a diversas concentraciones con diluciones en serie de 10 puntos, 3,16 veces. Se diluyeron todas las muestras en medio completo antes de añadirse a los cultivos.

Medición de la expresión de MAP2 en neuronas de DRG

Se fijaron los cultivos con paraformaldehído al 4% en disolución salina equilibrada de Hanks durante 15 min., se bloquearon con Superblock (Pierce) durante 1 hora y se permeabilizaron con Nonidet P-40 (Sigma) al 0,25% en solución salina tamponada con Tris-HCl (Sigma) (TBS) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Se enjuagaron los cultivos una vez con TBS que contenía Tween20 (Sigma) al 0,1% y se incubaron con IgG de ratón anti-MAP2 (Chemicon, Temecula, CA) durante 1,5 horas a temperatura ambiente, seguido por incubación de anticuerpo secundario anti-ratón marcado con Eu (Wallac Oy, Turku, Finlandia) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se aplicaron lavados con TBS (3 x 5 min. con agitación suave) tras cada incubación con anticuerpo. Se añadió disolución de potenciación (150 ml/pocillo, Wallac Oy) a los cultivos y entonces se midió la señal de fluorescencia en un fluorómetro de resolución temporal (Wallac Oy).

Cultivo mesencefálico embrionario

Se usaron ratas Sprague-Dawley embrionarias de 19 días de edad (E19) (Jackson Labs). Se extirpó tejido de mesencéfalo ventral enriquecido en neuronas dopaminérgicas y se transfirió a solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS), pH 7,4, sin Ca^{++} y Mg^{++} (Gibco). Se disociaron los fragmentos de tejido para dar una suspensión de células individuales usando un sistema de disociación con papaína (Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ). En resumen, se incubaron fragmentos de tejido en una disolución de digestión que contenía 20 unidades/ml de papaína en disolución salina equilibrada de Earle (EBSS) a 37°C durante 50 min. Se disociaron las células mediante trituración a través de pipetas Pasteur pulidas al fuego en un medio de disociación que consistía en MEM/F12 de Ham 1:1, inhibidor ovomucoide 1 mg/ml y ovoalbúmina 1 mg/ml y desoxirribonucleasa I (ADNasa) al 0,005%. Se sedimentaron las células disociadas a 200 x g durante 5 min. y se resuspendieron en EBSS que contenía inhibidor ovomucoide 1 mg/ml, ovoalbúmina 1 mg/ml y ADNasa al 0,005%. Se centrifugó la suspensión celular a través de una disolución en gradiente que contenía inhibidor ovomucoide 10 mg/ml, ovoalbúmina 10 mg/ml a 200 x g durante 6 min. para eliminar los residuos celulares; y se filtró a través de una malla de nailon Nitex de 25 µg (Tetko, Inc.) para eliminar las agregaciones. Se sembraron en placa las células disociadas en placas de cultivo tisular a una densidad de 100.000/cm². Se recubrieron previamente las placas con poliornitina 100 µg/ml (Sigma) y laminina de ratón 1 µg/ml (Gibco BRL) tal como se describió anteriormente (Louis JC *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 1992; 262: 1274-1283). El medio de cultivo consistía en medio esencial mínimo (MEM)/F12 de HAM, 1:1, suero de caballo al 12% (Gibco), transferrina 100 µg/ml e insulina 2,5 µg/ml (Sigma). Se mantuvieron los cultivos a 37°C, 5% de CO₂ y 100% de humedad durante 6 días.

Tratamiento de cultivos mesencefálicos con BDNF y anticuerpo anti-BDNF o anti-NGF

Se añadió BDNF a 10 ng/ml a las células 2 horas tras la siembra en placa, seguido por concentraciones en serie de muestras de Ac anti-NGF. Se usó anticuerpo anti-BDNF (generado en Amgen) como control positivo.

Captación de DA en neuronas mesencefálicas

Se llevó a cabo el ensayo de captación de dopamina tal como se describió anteriormente (Friedman, L. y Mytilineou,

C., *Neuroscience Letters* 1987; 79: 65-72). En el día 6, se lavaron los cultivos una vez con tampón fosfato de Krebs-Ringer (pH 7,4) que contenía glucosa 5,6 mM, EDTA 1,3 mM y pargilina 0,5 mM, un inhibidor de monoaminooxidasa. Se incubaron los cultivos en tampón de captación que contenía [³H]DA (NEN) 50 nM durante 60 minutos a 37°C. Se detuvo la captación retirando el tampón de captación, y se lavaron los cultivos tres veces con tampón fosfato de Krebs-Ringer. Se lisaron las células para liberar [³H]DA añadiendo un cóctel de centelleo líquido, optiphase supermix (Wallac), directamente a los cultivos. Entonces se contaron los lisados celulares para determinar la radiactividad en un contador de centelleo líquido microbeta-plus (Wallac, Inc.). Se evaluó la captación de DA de baja afinidad añadiendo GBR12909 0,5 mM, un inhibidor específico de los sitios de captación de DA de alta afinidad (Heikkilä RE y Mazino L, *European Journal of Pharmacology* 1984; 103: 241-8), al tampón de captación, y se restó de la cantidad de captación total para obtener el valor de captación de DA de alta afinidad.

Tabla 6

Anticuerpo	CI50 con respecto a hNT-3 (nM)	CI50 con respecto a hBDNF (nM)
4D4 (IgG2)	>13,75	>13,75

Ejemplo 8

Identificación de un epítopo para anticuerpos anti-NGF**Mapeo de epítopos mediante proteólisis limitada**

Se incubaron cinco microgramos (µg) de NGF con 4D4 (11 µg) durante 30 minutos a 4°C en tampón Tris 0,1 M, pH 7,5. Entonces se digirió el complejo con 1 µg de proteasa (subtilisina) a 37°C durante 1 y 2 horas. Se compararon los mapas de péptidos por HPLC entre sí para encontrar los péptidos que estaban protegidos por los anticuerpos 4D4. La proteólisis limitada de NGF indicó que varios péptidos principales se liberaban inicialmente de NGF. De particular interés, se generaron los péptidos S18.3, S18.5 y S34.4 y estaban protegidos con anticuerpos de la proteólisis. Otros picos no se formaban o no estaban protegidos significativamente. Se muestran los péptidos protegidos de dos experimentos (digestión de 1 hora y 2 horas) en la tabla 7.

Tabla 7

			% de protección	
			Digestión de 1 hora	Digestión de 2 horas
S16.1	QAA (96-98)	C-terminal	--	57
S18.3	FFETK (53-57) (SEQ ID NO: 45)	Región de 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 de bucle	69	38

Se calculó el porcentaje de protección a partir de la altura de pico de péptido. S18.5 contenía dos péptidos, pero sólo un péptido (SSSHPIFHR; SEQ ID NO: 46) estaba protegido con el anticuerpo 4D4, puesto que el otro pico de péptido (HWNSY; SEQ ID NO: 47) no cambiaba mediante la adición de anticuerpos 4D4, tal como se detecta a absorbancia a 280 nm. El péptido S18.3 era una parte C-terminal de S34.4, ambos de la misma región de bucle. Las regiones de bucle central y N-terminal eran también posibles epítopos.

Separación en Microcon de péptidos digeridos

Se incubó el material digerido con subtilisina (3 µg cada uno) con anticuerpos 4D4 activos y un anticuerpo monoclonal inactivo (n.º 162) (8 µg) durante 30 minutos a 4°C en tampón Tris 0,1 M, pH 7,5. Se separaron los péptidos unidos/no unidos mediante Microcon 10 (Millipore Corp., Bedford, Mass.) y se analizaron ambas fracciones (unida y no unida) mediante HPLC para encontrar péptidos unidos a anticuerpos. Se recuperaron los dos picos agotados identificados mediante comparación por HPLC de las fracciones no unidas tras tratamiento con anticuerpos 4D4 y n.º 162 y separación con Microcon, lo que indica los péptidos unidos a anticuerpo. Los péptidos unidos a 4D4 eran:

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.

Se digirió alternativamente una muestra de NGF con Lys-C (K) durante 24 horas. Se redujeron los residuos de cisteína y se carboximetilaron sin desnaturizante. Se incubó la muestra con los anticuerpos monoclonales 4D4 y

AMG162, seguido por separación con Microcon 100. Se analizaron las fracciones unida y no unida mediante HPLC. de fase inversa. Sólo se identificaron dos péptidos como péptidos K de unión a anticuerpos tal como se indica a continuación. La masa calculada para los péptidos determinados mediante análisis de secuencia y la espectrometría de masas de los péptidos concordaban. Los péptidos, tal como se indica a continuación, se mapeaban en la región N-terminal y C-terminal.

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

Masa calculada = 2821; masa observada = 2828,2; N-terminal

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

Masa calculada = 2452; masa observada = 2459,5; C-terminal

Los experimentos de mapeo de epítomos precedentes indicaron que en al menos tres regiones eran posibles epítomos para los anticuerpos 4D4, incluyendo las regiones de extremo N-terminal (1-9), interna (46-57) y C-terminal (96-98). Además, una digestión con AspN reveló que un fragmento de péptido que consistía en ---SSSHPIFHRGEFSVC--- (SEQ ID NO: 53) estaba protegido mediante el anticuerpo 4D4, mientras que una digestión con tripsina mostró que un fragmento de péptido que consistía en ---SSHPIFHR---- (SEQ ID NO: 54) no estaba protegido mediante el anticuerpo 4D4. Por tanto, en el extremo N-terminal, la secuencia de GEFSVC (SEQ ID NO: 55) es la más importante para la unión a anticuerpos 4D4.

Con el fin de definir más claramente el epítomo para el anticuerpo anti-NGF 4D4.IgG1, se generaron un total de 23 péptidos de manera sintética usando técnicas convencionales basadas en la secuencia de NGF maduro humano completa (hNGF) (tabla 8). Los péptidos tenían 15 aminoácidos de longitud, solapándose en 10 aminoácidos, y con colas de cisteína en el extremo C-terminal para permitir la conjugación a una matriz. Se usó el Ac anti-hNGF humano 4D4.IgG1 descrito anteriormente para el experimento de mapeo.

Tabla 8

N.º de 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	TTHTFVKALTMDGKC (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
33582-27-22	TAAVAVLSRKAVRRAC (106-120)	77
33582-27-23	CAAVAVLSRKAVRRA (107-120)	78

Se diluyeron los fragmentos de péptido de NGF humano en PBS con DMSO al 5%, EDTA 1 mM, pH 6,23. Se normalizó la concentración de péptido final a la misma concentración molar a 55 μ M (aproximadamente 100 μ g/ml). Se incubaron los péptidos en placas de microtitulación de 96 pocillos activadas con Reacti-Bind Maleimida (n.º de cat. de Pierce 15150), 100 μ l/pocillo, a temperatura ambiente durante 2 horas y luego a 4°C durante la noche con agitación. Se usó NGF humano (100 μ g/ml) como control positivo. Se lavaron las placas con tampón de lavado (KPL) y se bloquearon con leche en polvo desnatada al 0,2% (en tampón PBS-EDTA, pH 6,23) durante 2 horas a temperatura ambiente y luego se bloquearon adicionalmente con BSA al 5% durante 1 hora. Entonces se incubaron las placas con el anticuerpo humano anti-NGF a diversas concentraciones (0, 3, 10, 30 μ g/ml), seguido por Ac-HRP anti-hFc (KPL) durante 2 horas. Se reveló la señal con sustrato TMB y se leyó a 450 nm tras la adición de disolución de detención (KPL).

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

Los cuatro picos de unión de 4D4 se mapearon en los dominios de extremo N-terminal, extremo C-terminal, interno, así como los bucles L2 y L4 en NGF tal como se describe en Weismann *et al.* (1999, Nature 401: 184-8). Estos resultados se resumen en la tabla 9.

Tabla 9

Epítomos de hNGF	Extremo N-terminal	L2	Interno	L4	Interno	Extremo C terminal
N.º de péptido	Péptido n.º 1 (SEQ ID NO: 56), SSSHPI---, 1-15	Péptido n.º 10 (SEQ ID NO: 65), NSVFKQ---, 46-60	Péptido n.º 16 (SEQ ID NO: 71), WNSYA---, 76-90	Péptido n.º 17 (SEQ ID NO: 72), TMDGKQ---, 81-95	Péptido n.º 19 (SEQ ID NO: 74), TMDGK---, 91-105	Péptidos n.º 20-21 (SEQ ID NO: 75 - SEQ ID NO: 76), QAAWR---, 96-115
Señal de unión a Ac	+++	+	++	++	+++	++

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

El anticuerpo 4D4 se une al péptido n.º 10 (SEQ ID NO: 65) (NSVFK---, 46-60) y el péptido n.º 17 (SEQ ID NO: 72) (TTTHTFVKALTMKGK, 81-95), que corresponden selectivamente a los bucles L2 y L4, que representan dos de siete regiones distintas con diversidad de secuencia superior al promedio entre las neurotrofinas. Experimentos de intercambio entre NGF y BDNF de estas siete regiones mostraron que L2 y L4 eran importantes para la actividad biológica de NGF. Además, la sustitución de cinco residuos de NT3 en los bucles L2 y L4 por los de NGF introdujo actividad similar a NGF mientras que se mantenía la actividad de NT3. Por tanto, L2 y L4 son probablemente regiones en las que el anticuerpo 4D4 se une selectivamente a NGF en vez de a BDNF o NT-3.

El anticuerpo 4D4 también se une al péptido n.º 16 (SEQ ID NO: 71) (WNSYATTTHTFVKAL, 76-90), que coincide con un dominio interno de la estructura cristalina de NGF. Esta región es homóloga en un 100% entre NGF humano y NGF de ratón, pero distinta de otras neurotrofinas. 4D4 mostró una actividad mucho más débil contra NGF de rata/ratón en comparación con su actividad contra NGF humano. Por tanto, la unión a esta parte de NGF lo más probablemente no es crítica para la especificidad de especie pero es importante para la selectividad entre neurotrofinas.

El anticuerpo 4D4 también se une a la región C-terminal de NGF (péptidos n.º 19-21 (SEQ ID NO: 74-SEQ ID NO: 76) TMDGK---LSRKC, 91-115), que es una de las regiones de NGF humano que distinguen al NGF de otras neurotrofinas (BDNF y NT3). La unión a esta región ayuda a explicar por qué 4D4 no es activo contra otras

neurotrofinas. Además, hay una diferencia de un único aminoácido entre NGF humano y NGF de ratón en el extremo C-terminal, lo que sugiere que este único aminoácido puede ser uno de los motivos por los que 4D4 es selectivo para NGF humano con respecto a NGF de rata/ratón, de manera similar al extremo N-terminal en el que se observan diferencias de especie.

- 5 Por último, 4D4 también interacciona con un dominio interno descrito mediante el péptido n.º 10 (SEQ ID NO: 65) (---KARDC, 50-60) de NGF humano, que es una región importante para la unión de NGF preferentemente a trkA, en vez de a trkB o trkC, lo que explica adicionalmente su actividad de neutralización selectiva contra NGF humano.

Ejemplo 9

Medición de la afinidad de anticuerpos monoclonales mediante KinExA

- 10 Se sometió a prueba la unión del Ac 4D4 (38859-80) a NGFhu (29714-91) en KinExA. En resumen, se recubrió previamente Reacti-Gel 6x (Pierce) con NGFhu y se bloqueó con BSA. Se incubaron 10 pM y 30 pM de muestras de Ac 4D4 con diversas concentraciones de NGFhu (Amgen) a temperatura ambiente durante 8 horas antes del procesamiento a través de las perlas recubiertas con NGFhu. Se cuantificó la cantidad de anticuerpo unido a perlas mediante anticuerpo de cabra anti-IgG humana marcado de manera fluorescente (Cy5) (Jackson Immuno Research). La señal de unión era proporcional a la concentración de anticuerpo libre en equilibrio. Se obtuvo la constante de equilibrio de disociación (K_D) a partir de regresión no lineal de las curvas de competición usando un modelo de unión homogénea de un sitio de curva doble (software KinExTM).

La K_D era de aproximadamente 4 pM para la unión del Ac 4D4 a NGFhu.

Ejemplo 10

Identificación de anticuerpos anti-NGF adicionales

- 20 Se seleccionaron para su estudio adicional anticuerpos anti-NGF adicionales (denominados 14D10, 6G9, 7H2, 14F11 y 4G6), generados e identificados tal como se describe en los ejemplos 2 y 3 anteriormente. En resumen, se sometieron a prueba medios condicionados para determinar la actividad de unión. Se purificaron anticuerpos de los medios y se secuenciaron. Se comparó la masa pronosticada con los datos de espectrometría de masas de anticuerpos de los medios condicionados. Se clonaron los anticuerpos. Se expresaron dos de los clones en células CHO y se sometieron a prueba para determinar su actividad tal como se describió anteriormente. Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10

Clon	CI50 con respecto a hNGF (nM)	CI50 con respecto a rNGF (nM)	Notas	Clon molecular	CI50 con respecto a hNGF (nM)	CI50 con respecto a 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			

- 30 Se compararon entonces las secuencias de las regiones variables de cadena pesada y ligera de estos anticuerpos con la secuencia del anticuerpo 4D4, así como entre sí (figuras 5 y 6). Se muestran en la tabla 11 las homologías en porcentaje de las regiones variables de cadena pesada tal como se identifican a partir de estas comparaciones. Se muestran en la tabla 12 las homologías en porcentaje de las regiones variables de cadena ligera. Además, se muestran en las figuras 5-10 las homologías en porcentaje de las regiones CDR de los diversos anticuerpos.

Tabla 11

	4D4 VH	14D10 VH	6H9 VH	7H2 VH	14D11 VH	4G6 VH
4D4 VH	100%	70,9%	70,1%	75,6%	47,2%	73,4%
14D10 VH		100%	95,3%	85%	54,3%	81,1%
6H9 VH			100%	86,6%	54,3%	81,1%
7H2 VH				100%	51,2%	79,8%
14D11 VH					100%	56,8%
4G6 VH						100%

Tabla 12

	V4D4	14D11	4G6a	4G6b	4G6c	14D10	6H9	4G6d	7H2	4G6e
--	------	-------	------	------	------	-------	-----	------	-----	------

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

Lista 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 ruta de NGF

<130> 02-1240

<150> Documento US 60/487.431

<151> 15-07-2003

<160> 138

<170> PatentIn versión 3.0

<210> 1

<211> 990

<212> ADN

<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 cacatgcccc ccgtgcccag 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 gtgtgggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag	600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag	720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg	840
ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa	990

- 5 <210> 2
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

10 <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

- 5 <210> 3
<211> 978
<212> ADN
<213> *Homo Sapiens*

<400> 3

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag	60
agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg	120
tggaactcag gcgctctgac cagcggcgctg cacaccttcc cagctgtcct acagtcctca	180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc	240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc	300
aaatgttggtg tcgagtgtccc accgtgtccc gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc	360
ctcttcccc caaaaccaa ggacacctc atgatctccc ggacccctga ggtcacgtgc	420
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc	480
gtggagggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt	540
gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc	600
aaggtctcca acaaaggcct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaagg	660
cagccccgag aaccacaggt gtacacctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac	720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg	780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac	840
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac	900
gtcttctcat gtcctgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	960
tcctgtctc cgggtaaa	978

<210> 4

5 <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

5 <212> ADN

<213> *Homo Sapiens*

<400> 5

```
gccagcacca aggggccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag      60
agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg      120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca      180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc      240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc      300
aaatatggtc ccccatgccc atcatgccc gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc      360
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg      420
tgcgtgggtg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat      480
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac      540
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag      600
tgcaagggtc ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa      660
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag      720
aaccagggtc gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag      780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc      840
gacggctcct tcttctctta cagcaggcta accgtgraca agagcaggtg gcaggagggg      900
aatgtcttct catgtccgtg gakgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc      960
ctctccctgt ctctgggtaa a                                          981
```

10 <210> 6

<211> 327

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

15 <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> ADN

5 <213> *Homo Sapiens*

<400> 7

```
cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccgcat ctgatgagca gttgaaatct      60
ggaactgcct ctgttggtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag      120
tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac      180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag      240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag      300
agcttcaaca ggggagagtg t                                     321
```

<210> 8

<211> 107

5 <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
```

10 <210> 9

<211> 369

<212> ADN

<213> *Homo Sapiens*

15 <400> 9

```
gagggtgcagc 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
 ctgcaaatgg acagcctgag agacgaggac acggctatgt attactgtgc gagagtatat 300
 agcagtggct ggcacgtctc tgattatttt gactactggg gccagggaat cctgggtcacc 360
 gtttcctca 369

<210> 10

<211> 123

<212> PRT

5 <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

10 <210> 11

<211> 321

<212> ADN

<213> *Homo Sapiens*

15 <400> 11

gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc agtgcttttag 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

5 <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

10

<210> 13

<211> 42

<212> ADN

<213> *Homo Sapiens*

15

<400> 13

gtatatagca gtggctggca cgtctctgat tattttgact ac 42

<210> 14

20 <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

5

<210> 15

<211> 27

<212> ADN

<213> *Homo Sapiens*

10

<400> 15

caacagtttta atagttaccc gctcact

27

<210> 16

<211> 9

15

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 16

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

20

<210> 17

<211> 51

<212> ADN

<213> *Homo Sapiens*

25

<400> 17

tacattagtc gtagtagtca taccatattc tacgcagact ctgtgaaggg c

51

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

30

<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

35

<211> 21

<212> ADN

<213> *Homo Sapiens*

	<400> 19		
	gatgcctcca gtttggaag t		21
	<210> 20		
	<211> 7		
5	<212> PRT		
	<213> <i>Homo Sapiens</i>		
	<400> 20		
	Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser		
	1 5		
10	<210> 21		
	<211> 15		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo Sapiens</i>		
15	<400> 21		
	agttatagca tgaac		15
	<210> 22		
	<211> 5		
	<212> PRT		
20	<213> <i>Homo Sapiens</i>		
	<400> 22		
	Ser Tyr Ser Met Asn		
	1 5		
	<210> 23		
25	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo Sapiens</i>		
	<400> 23		
30	cgggcaagtc agggcattag cagtgcctta gcc		33
	<210> 24		
	<211> 11		
	<212> PRT		
	<213> <i>Homo Sapiens</i>		
35	<400> 24		
	Arg Ala ser Gln Gly Ile Ser ser Ala Leu Ala		
	1 5 10		
	<210> 25		

<211> 1131

<212> ADN

<213> *Homo Sapiens*

5 <400> 25

```

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctctggg    60
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg    120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtcttcct acagtcctca    180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc    240
tacacctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagctc    300
aaaacccac ttggtgacac aactcacaca tgcccacggt gccagagcc caaatcttgt    360
gacacacctc ccccggtgcc acggtgcca gagcccaaat cttgtgacac acctcccccg    420
tgcccacggt gccagagcc caaatcttgt gacacacctc ccccatgccc acggtgcccc    480
gcacctgaac tcctgggagg accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggatacc    540
cttatgattt cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac    600
cccgaggtcc agttcaagtg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag    660
ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgttc cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac    720
caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaagggtct ccaacaaagc cctcccagcc    780
cccatcgaga aaaccatctc caaaaccaa ggacagcccc gagaaccaca ggtgtacacc    840
ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag aaccagggtc gcctgacctg cctggtcaaa    900
ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca gcgggcagcc ggagaacaac    960
tacaacacca cgctcccat gctggactcc gacggctcct tcttctcta cagcaagctc   1020
accgtggaca agagcagggt gcagcagggg aacatcttct catgctccgt gatgcatgag   1080
gctctgcaca accgcttcac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a           1131

```

<210> 26

<211> 376

<212> PRT

10 <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> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR para NGF humano

10 <400> 27

acaccacata tgtcatcatc ccatcccat

29

<210> 28

<211> 40

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR para NGF humano

20 <400> 28

accacaggat cctccttatg cacgacgcac agctttacgg

40

<210> 29

<211> 375

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos que codifica para met-NGF humano recombinante

30 <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 tccgгатaga tacggcctgt gtgtgtgtgc tcagccgtaa agctgtgcgt

360

cgtgcataag gatcc

375

<210> 30

<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial

5 <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

10 <210> 31
<211> 55
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> Secuencia de cebador en 5' para generar el vector de expresión pCFM1656 (n.º de ATCC 69576)

<400> 31
cgatttgatt ctagaaggag gaataacata tgggtaacgc gttggaattc ggtac 55

20 <210> 32
<211> 49
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> Secuencia de cebador en 3' para generar el vector de expresión pCFM1656 (n.º de ATCC 69576)

	<400> 32		
	taaactaaga tcttcctcct tattgtatac caattgcgca accttaagc	49	
	<210> 33		
5	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
10	<223> Cebador de PCR		
	<220>		
	<221> no seguro		
	<222> (18) .. (23)		
	<223> n es a, c, t o g		
15	<400> 33		
	ggccggatag gcctccannn nnnt	24	
	<210> 34		
	<211> 21		
20	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador de PCR		
25	<400> 34		
	ggggtcaggc tggaactgag g	21	
	<210> 35		
30	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> cebador de PCR		
	<400> 35		
	tgaggacgct gaccacacg	19	
	<210> 36		
40	<211> 54		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		

<220>

<223> cebador de PCR

5 <400> 36

cagcagaagc ttctagacca ccatggacat gagggtgccc gtcagctcc tggg

54

<210> 37

<211> 34

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> cebador de PCR

15 <400> 37

cttgtcgact caacactctc ccctgttgaa gctc

34

<210> 38

<211> 55

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> cebador de PCR

25 <400> 38

cagcagaagc ttctagacca ccatggagtt ggggctgtgc tgggttttcc ttggt

55

<210> 39

<211> 34

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> cebador de PCR

35 <400> 39

gcatgtcgac tcatttacct ggagacaggg agag

34

<210> 40

<211> 449

<212> PRT

40 <213> *Homo Sapiens*

<400> 40

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
 145 150 155 160
 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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 195 200 205
 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys
 210 215 220

Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr 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

5 <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

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

5 <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
 145 150 155 160
 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 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
 225 230 235 240
 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 Val Val Val 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
 305 310 315 320
 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

5 <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
465					470	Gln
						Gly
						Asn
						Ile
						475
						Phe
						Ser
						Cys
						Ser
						Val
						480
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
				485		Arg
						Phe
						Thr
						490
						Gln
						Lys
						Ser
						Leu
						Ser
						495
						Leu
Ser	Pro	Gly				

<210> 44

<211> 214

5 <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

5 <212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 45

Phe Phe Glu Thr Lys
1 5

10

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 46

5 Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg
1 5

<210> 47

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

10

<400> 47

His Trp Asn Ser Tyr
1 5

<210> 48

<211> 12

15

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 48

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

20

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

25

<400> 49

Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg
1 5

<210> 50

<211> 5

<212> PRT

30

<213> *Homo Sapiens*

<400> 50

Glu Val Met Val Leu
1 5

35

<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

5 <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

10 <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

15 - - -
<210> 58

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

20 <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

25 <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

30 <210> 60

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

35 <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

5 <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

10 <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

15

<210> 63

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

20

<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

25 <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

30

<210> 65

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

35

<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

5 <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

10 <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

15 <210> 68

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

20 <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

25 <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

30 <210> 70

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

35 <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

5 <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

10 <210> 72

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

15 <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

20 <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

25 <210> 74

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

30 <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> 16

<212> PRT

35 <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

5 <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

10 <210> 77

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

15 <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

20 <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

25 <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

5 <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 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

10

<210> 81
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

5

<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 80
 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

10 <210> 82
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

15 <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

5 <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

10 <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

5 <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

10

<210> 86

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

5 <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

10 <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

5 <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

10 <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

5 <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

10

<210> 91

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

15

<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
 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

5 <212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 92

Thr Tyr Trp Ile Gly
 1 5

10 <210> 93

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

15 <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

20 <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*

5

<400> 95

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

<210> 96

<211> 7

10

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 96

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

15

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

20

<400> 97

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 98

<211> 5

<212> PRT

25

<213> *Homo Sapiens*

<400> 98

Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 99

30

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 99

35

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

5 <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

10 <211> 12

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 101

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Gly Phe Leu Ala
1 5 10

15

<210> 102

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

20

<400> 102

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 103

<211> 9

25 <212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 103

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

30

<210> 104

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 104

Asp Tyr Ala Met His
1 5

5 <210> 105

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

10 <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

15 <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

20 <211> 12

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 107

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

25

<210> 108

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

30

<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

$\langle 210 \rangle$ 110

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

10

$\langle 400 \rangle$ 110

Asp Tyr Ala Met His
1 5

$\langle 210 \rangle$ 111

15 <211> 17

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

$\langle 400 \rangle$ 111

Gly Ile Thr Trp Asn Ser Gly Ile Leu Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

20 Gly

$\langle 210 \rangle$ 112

$\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

25

<400> 112

Glu Gly Ser Gly Arg Tyr Tyr Asn Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 113

<211> 12

30 <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

5 <213> *Homo Sapiens*

<400> 114

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 115

10 <211> 8

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 115

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr Thr
1 5

15

<210> 116

<211> 5

<212> PRT

20 <213> *Homo Sapiens*

<400> 116

Asp Tyr Gly Met Asn
1 5

25 <210> 117

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

30 <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

$\langle 210 \rangle$ 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

$\langle 211 \rangle$ 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

5 <213> *Homo Sapiens*

<400> 123

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 124

10 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 124

Gln Gln Arg Ser Asn Trp His Arg Thr
1 5

15

<210> 125

<211> 12

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

20

<400> 125

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 126

<211> 7

25 <212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 126

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

30

<210> 127

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 127

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5

5

<210> 128

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

10

<400> 128

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 129

15

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 129

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

20

<210> 130

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

25

<400> 130

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp Thr
1 5

<210> 131

<211> 108

30

<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

5 <212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 132

Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

10 <210> 133

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

15 <400> 133

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 134

<211> 9

<212> PRT

20 <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*

5 <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

10 <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

5 <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

10 <210> 138

<211> 119

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

15 <400> 138

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

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo humano aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a NGF, que comprende:

5 a) regiones de entramado de cadena pesada humana, una región variable de cadena pesada humana que comprende CDR1 (SEQ ID NO: 22), CDR2 (SEQ ID NO: 18) y CDR3 (SEQ ID NO: 14) de SEQ ID NO: 10; y

b) regiones de entramado de cadena ligera humana, una región variable de cadena ligera humana que comprende CDR1 (SEQ ID NO: 24), CDR2 (SEQ ID NO: 20) y CDR3 (SEQ ID NO: 16) de SEQ ID NO: 12.
2. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, en el que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 10, y la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 12.
10
3. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, en el que la cadena pesada comprende una región variable y una región constante, en el que la región variable comprende SEQ ID NO: 10.
4. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, en el que la cadena ligera comprende una región variable y una región constante, en el que la región variable comprende SEQ ID NO: 12.
15
5. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 44.
6. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 43.
20
7. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 44 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 43.
8. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 7, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 44 y una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 40.
25
9. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, disociándose el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un polipéptido del NGF humano con una K_D de 4×10^{-12} M.
30
10. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, neutralizando el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno la inducción por el NGF humano de la expresión del receptor vaniloide-1 (VR1) en neuronas de DRG con una CI_{50} de $0,5 \times 10^{-9}$ M.
11. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la cadena pesada y la cadena ligera se conectan mediante un ligador flexible para formar un anticuerpo de cadena sencilla.
35
12. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 11, que es un anticuerpo Fv de cadena sencilla.
13. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que es
40 a) un anticuerpo Fab;
b) un anticuerpo Fab'; o
c) un anticuerpo (Fab')₂.
14. Composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
45
15. Método para detectar NGF en una muestra biológica que comprende:

a) poner la muestra en contacto con el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en condiciones que permiten la unión del anticuerpo a NGF; y

b) medir el nivel de anticuerpo unido en la muestra.

16. Molécula de ácido nucleico que codifica para el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

17. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 16, comprendiendo la molécula de ácido nucleico:

- 5 (a) SEQ ID NO: 9; y SEQ ID NO: 11; o
(b) SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 13; y SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 15.

18. Célula huésped aislada que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 16 ó 17.

19. Línea celular aislada que produce el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

10 20. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, o sales farmacéuticamente aceptables del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de un trastorno o estado doloroso provocado por la expresión aumentada del NGF o sensibilidad aumentada al NGF, en el que el trastorno o el estado es dolor agudo, dolor dental, dolor a partir de traumatismo, dolor quirúrgico o dolor resultante de: amputación o absceso, causalgia, enfermedades desmielinizantes, neuralgia del trigémino, cáncer, alcoholismo crónico, accidente cerebrovascular, síndrome talámico, diabetes, síndrome de inmunodeficiencia adquirida ("SIDA"), toxinas, quimioterapia, cefalea general, migraña, cefalea histamínica, síndromes vasculares o no vasculares mixtos, cefalea tensional, inflamación general, artritis, enfermedades reumáticas, lupus, osteoartritis, fibromialgia, trastornos inflamatorios del intestino, síndrome del intestino irritable, trastornos inflamatorios del ojo, trastornos inflamatorios de la vejiga o vejiga inestable, psoriasis, dolencias cutáneas con componentes inflamatorios, quemaduras solares, carditis, dermatitis, miositis, neuritis, enfermedades vasculares del colágeno, estados inflamatorios crónicos, inflamación e hiperalgesia y alodinia asociadas, neuropatía e hiperalgesia o alodinia asociadas, neuropatía diabética, síndromes de desaferenciación, asma, disfunción o lesión del tejido epitelial, herpes simple, alteraciones de motilidad visceral en regiones respiratorias, genitourinarias, gastrointestinales o vasculares, heridas, quemaduras, reacciones cutáneas alérgicas, prurito, vitíligo, trastornos gastrointestinales generales, colitis, ulceración gástrica, úlceras duodenales, rinitis alérgica o vasomotora, o trastornos bronquiales, dismenorrea, dispepsia, reflujo gastroesofágico, pancreatitis o visceralgia.

15
20
25

30 21. Uso de una cantidad farmacéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno o estado doloroso provocado por la expresión aumentada del NGF o sensibilidad aumentada al NGF, en el que el trastorno o estado es dolor agudo, dolor dental, dolor a partir de traumatismo, dolor quirúrgico, o dolor resultante de: amputación o absceso, causalgia, enfermedades desmielinizantes, neuralgia del trigémino, cáncer, alcoholismo crónico, accidente cerebrovascular, síndrome talámico, diabetes, síndrome de inmunodeficiencia adquirida ("SIDA"), toxinas, quimioterapia, cefalea general, migraña, cefalea histamínica, síndromes vasculares o no vasculares mixtos, cefalea tensional, inflamación general, artritis, enfermedades reumáticas, lupus, osteoartritis, fibromialgia, trastornos inflamatorios del intestino, síndrome del intestino irritable, trastornos inflamatorios del ojo, trastornos inflamatorios de la vejiga o vejiga inestable, psoriasis, dolencias cutáneas con componentes inflamatorios, quemaduras solares, carditis, dermatitis, miositis, neuritis, enfermedades vasculares del colágeno, estados inflamatorios crónicos, inflamación e hiperalgesia y alodinia asociadas, neuropatía e hiperalgesia o alodinia asociadas, neuropatía diabética, síndromes de desaferenciación, asma, disfunción o lesión del tejido epitelial, herpes simple, alteraciones de motilidad visceral en regiones respiratorias, genitourinarias, gastrointestinales o vasculares, heridas, quemaduras, reacciones cutáneas alérgicas, prurito, vitíligo, trastornos gastrointestinales generales, colitis, ulceración gástrica, úlceras duodenales, rinitis alérgica o vasomotora, o trastornos bronquiales, dismenorrea, dispepsia, reflujo gastroesofágico, pancreatitis o visceralgia.

35
40
45

FIGURA 1

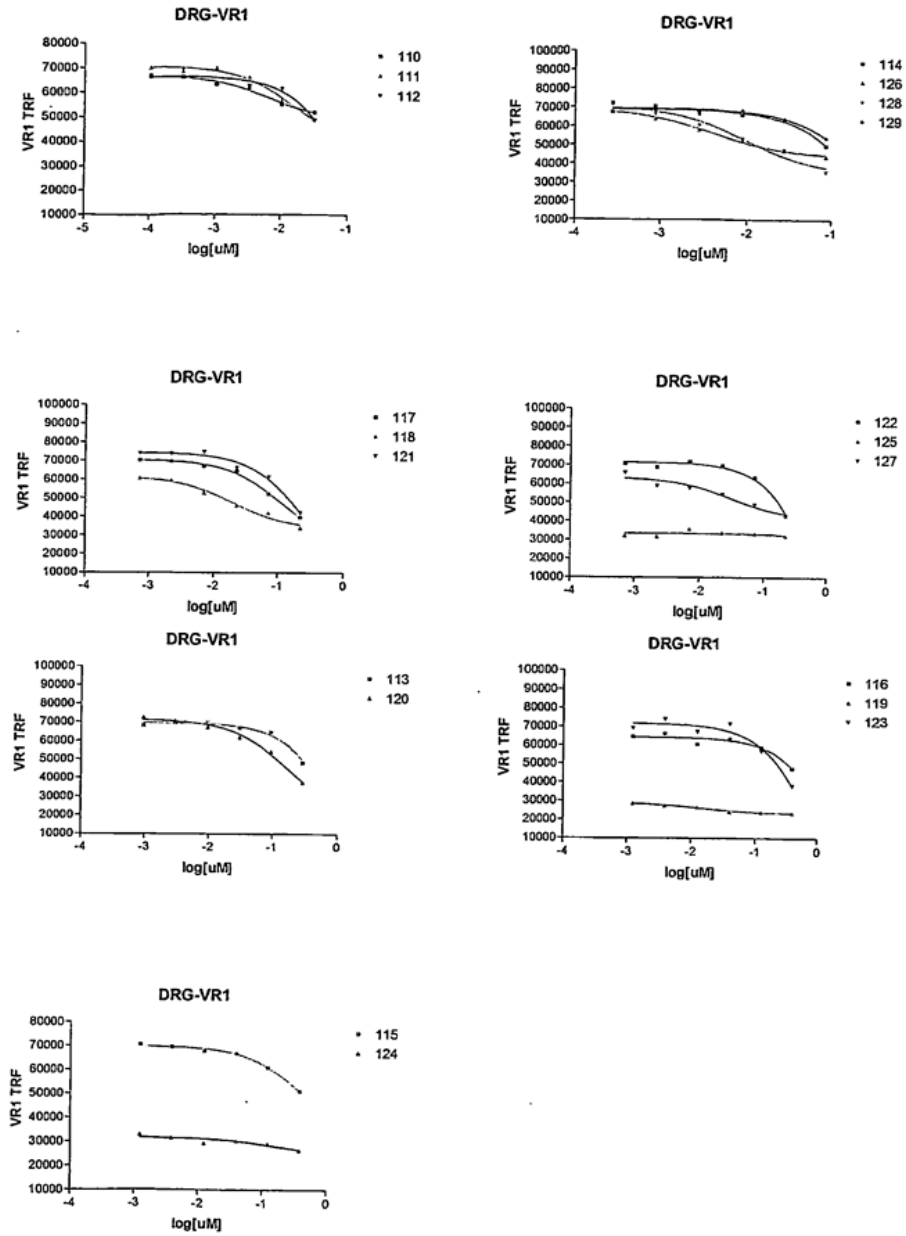


FIGURA 2

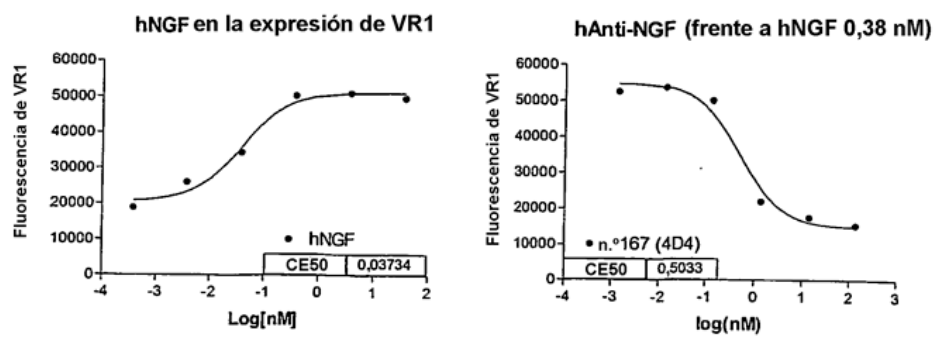


FIGURA 3

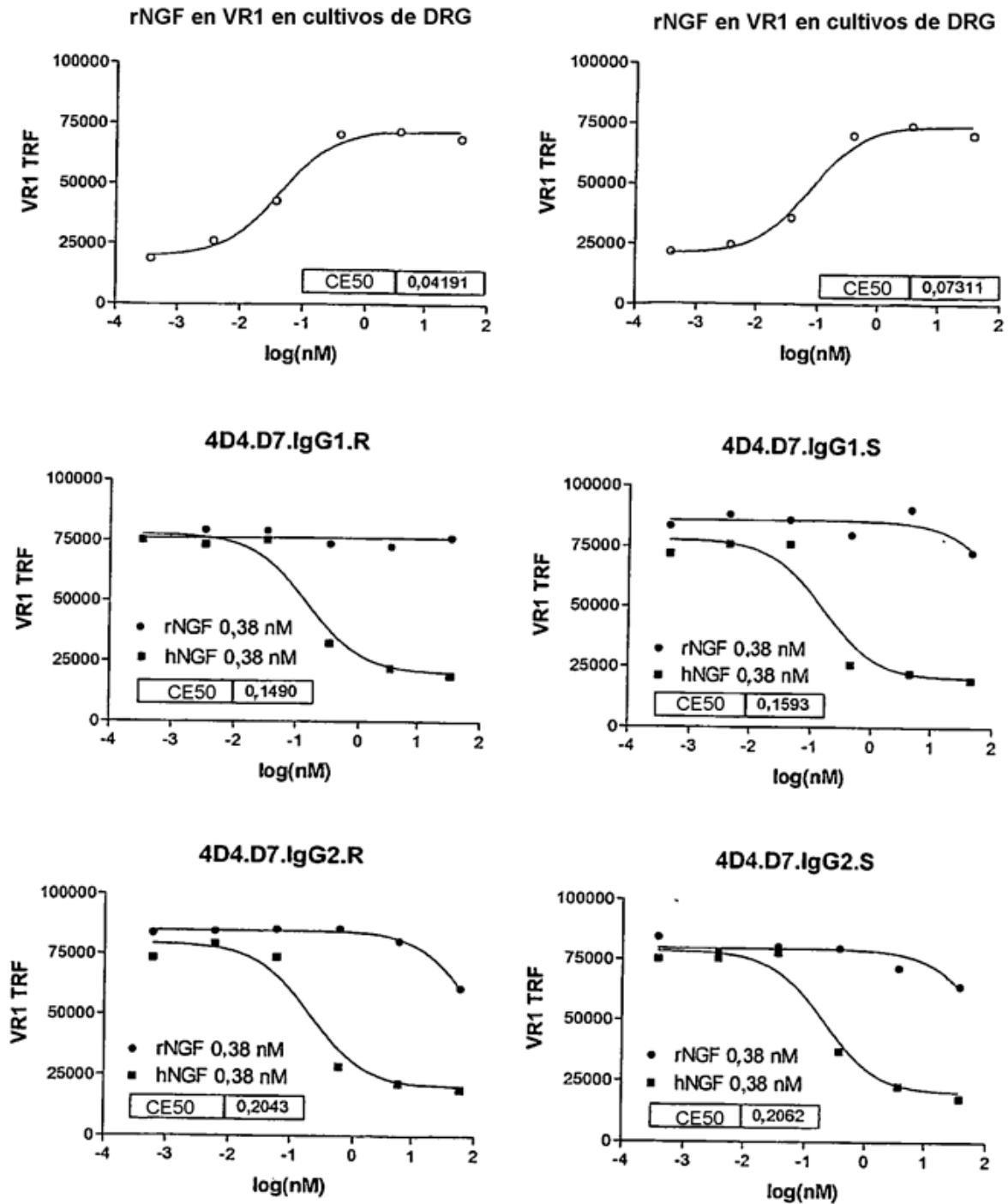


FIGURA 4

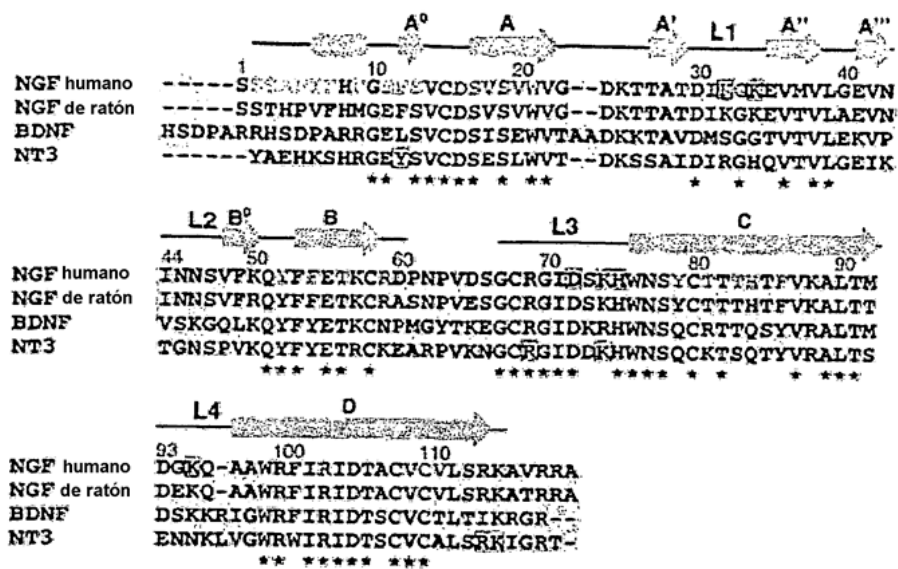


FIGURA 5

Alineaciones de CDR1 de cadena pesada anti-NGF / identidad en %

(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) TYWTG
 4D4 HC CDR1 (1) SYGMN

	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

Alineaciones de CDR2 de cadena pesada anti-NGF / identidad en %

	(1)	1	17
14D10 HC CDR2	(1)	GISWNRGIIGYADSVKG	
6H9 HC CDR2	(1)	GISWNRGIIGYAGSVKG	
7H2 HC CDR2	(1)	GI T WNRGIIGYADSVKG	
4G6 HC CDR2	(1)	DINWNGGSTGYADSVKG	
4D4 HC CDR2	(1)	YISRSSHTIFYADSVKG	
14D11 HC CDR2	(1)	IIYPGDSDTKY S PSFQG	

	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

Alineaciones de CDR3 de cadena pesada anti-NGF / identidad en %

	(1)	1	17
14D10 HC CDR3	(1)	GYYGSGRPGYFYVMDV	
6H9 HC CDR3	(1)	GYYGSGRPGYFYVMDV	
14D11 HC CDR3	(1)	-NYYGSGTYYYYYGMNV	
4G6 HC CDR3	(1)	--EQWLDPYY ¹² YYGMDV	
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

Alineaciones de CDR1 de cadena ligera anti-NGF / identidad en %

	(1)	12
14D11 LC CDR1	(1) RASQGTSIWLA-	
4G6 LC CDR1 20031028340	(1) RASQGTSIWLA-	
4D4 LC CDR1	(1) RASQGTSWLA-	
4G6 LC CDR1 20031028351	(1) RASQGVSSVLA-	
14D10 LC CDR1	(1) RASQSVSSVLA	
4G6 LC CDR1 20031000528	(1) RASQSVSSVLA-	
4G6 LC CDR1 20031071526	(1) RASQSVSSVLA	
6H9 LC CDR1	(1) RASQSVSSVLA	
7H2 LC CDR1	(1) RASQSVSSVLA	
NGF 4G6 LC CDR1 20031028344	(1) RASQSVSSVLA	

	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								100
NGF 4G6 LC CDR1 20031028344								

FIGURA 9

Alineaciones de CDR2 de cadena ligera anti-NGF / identidad en %

(1) 1 7
 14D11 LC CDR2 (1) ~~AASSLQSS~~
 4G6 LC CDR2 20031028340 (1) ~~AASSLQSS~~
 4D4 LC CDR2 (1) ~~DACSLQSS~~
 4G6 LC CDR2 20031000528 (1) ~~DASHRAAT~~
 4G6 LC CDR2 20031028351 (1) ~~DASHRAAT~~
 6H9 LC CDR2 (1) ~~VASSRAAT~~
 14D10 LC CDR2 (1) ~~GAASSRAAT~~
 4G6 LC CDR2 20031071526 (1) ~~GAASSRAAT~~
 7H2 LC CDR2 (1) ~~GAASSRAAT~~
 NGF 4G6 LC CDR2 20031028344 (1) ~~GAASSRAAT~~

	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

Alineaciones de CDR3 de cadena ligera anti-NGF / identidad en %

(1) $\frac{1}{9}$

14D10 LC CDR3 (1) QQYGGSPYT
 7H2 LC CDR3 (1) QQYGGSPYT
 6H9 LC CDR3 (1) QQYGGSPYT
 4G6 LC CDR3 20031000528 (1) QQRSHWPT
 4G6 LC CDR3 20031028351 (1) QQRSHWPT
 14D11 LC CDR3 (1) QQANSEPT
 4D4 LC CDR3 (1) QQYNSYPT
 4G6 LC CDR3 20031028340 (1) QQYNSYPT
 4G6 LC CDR3 20031071526 (1) QQYNSYPT
 NGF 4G6 LC CDR3 20031028344 (1) QQYGGSPYT

	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

FIGURA 11

Alineación de regiones variables de cadena ligera de AcM
4G6, 7H2, 14D10, 14D11, 4G6, 4D4

	(1)	10	20	30	40	50	67
	CDR 1					CDR 2	
	Sección 1						
4D4 VK	(1)	AIQLTQSPSSLSASVGD	RVITTCRASQGISS-AL	AYQKPGKAPKLLIY	DASSLE	SVPSRPSGSG	
NGF 4G6 kappa 20031071526 rc V region	(1)	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA	AYQKPGQAPRLIY	GASSRAT	SIPDRPSGSG	
NGF 4G6 LC 20031028344rv region	(1)	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA	AYQKPGQAPRLIY	GASSRAT	SIPDRPSGSG	
NGF 4G6 LC 20031028340rv region	(1)	DIQHTQSPSSLSASVGD	RVITTCRASQGISS-WLA	AYQKPGKAPKLLIY	DASSLE	SVPSRPSGSG	
NGF 4G6 LC 20031028351rv region	(1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS- YLA	AYQKPGQAPRLIY	DASSRAT	SIPARPSGSG		
NGF LC 4G6 GR5' pCR4 20031000528V region#2	(1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS- YLA	AYQKPGQAPRLIY	DASSRAT	SIPARPSGSG		
NGF 14D10 LC 20031028386 rc v region	(1)	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA	AYQKPGQAPRLIY	GASSRAT	SIPDRPSGSG	
NGF 14D11 lc 20031028405 rc v region	(1)	DIQHTQSPSSLSASVGD	RVITTCRASQGISS-WLA	AYQKPGKAPKLLIY	DASSLE	SVPSRPSGSG	
NGF 6H9 Hu kappa V region no sp 2002120980	(1)	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA	AYQKPGQAPRLIY	GASSRAT	SIPDRPSGSG	
NGF 7H2 Hu kappa 2002120984 V region no sp	(1)	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA	AYQKPGQAPRLIY	GASSRAT	SIPDRPSGSG	
	(68)	68	80	100	108	Sección 2	
	CDR 3						
4D4 VK	(67)	SGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYQ	QCFNSYPLT	FGGTFV	VEIK	
NGF 4G6 kappa 20031071526 rc V region	(68)	SGTGFTLTIS	SLLEPEDFAVYYQ	QQYNSTPHT	FGGTFV	VEIK	
NGF 4G6 LC 20031028344rv region	(68)	SGTDFTLTIS	SLLEPEDFAVYYQ	QQYGSSTPHT	FGGTFV	VEIK	
NGF 4G6 LC 20031028340rv region	(67)	SGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYQ	QCFNSYPLT	FGGTFV	VEIK	
NGF 4G6 LC 20031028351rv region	(67)	SGTDFTLTIS	SLLEPEDFAVYYQ	QQRSNWHRT	FGGTFV	VEIK	
NGF LC 4G6 GR5' pCR4 20031000528V region#2	(67)	SGTDFTLTIS	SLLEPEDFAVYYQ	QQRSNWHRT	FGGTFV	VEIK	
NGF 14D10 LC 20031028386 rc v region	(68)	SGTDFTLTIS	SLLEPEDFAVYYQ	QQYGSSTPHT	FGGTFV	VEIK	
NGF 14D11 lc 20031028405 rc v region	(67)	SGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYQ	QCFNSYPLT	FGGTFV	VEIK	
NGF 6H9 Hu kappa V region no sp 2002120980	(68)	SGTDFTLTIS	SLLEPEDFAVYYQ	QQYGSSTPHT	FGGTFV	VEIK	
NGF 7H2 Hu kappa 2002120984 V region no sp	(68)	SGTDFTLTIS	SLLEPEDFAVYYQ	QQYGSSTPHT	FGGTFV	VEIK	

FIGURA 12

Alineación de regiones variables de cadena pesada de AcM4D4,
4G6, 14D10, 14D11, 7H2, 6H9

	(1)	10	20	30	40	50	60	CDR1	60	70	80	90	100	110	120	CDR2	Sección 1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
4D4 VH	(1)	EV	LV	ES	GG	GL	VQ	PG	GG	SL	RL	CA	AS	GF	TL	Y	Y	GH	W	VR	QA	PG	RG	LE	N	V	Y	S	RS	SH	TF	IF	Y	AD	S	V	K	G																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
NGF 14D10 HC 20031071581 v region	(1)	EV	LV	ES	GG	GL	VQ	PG	GG	SL	RL	CA	AS	GF	TL	Y	Y	GH	W	VR	QA	PG	RG	LE	N	V	Y	S	RS	SH	TF	IF	Y	AD	S	V	K	G																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
NGF 6H9 HC Hu-Rat 2002120864 final V region	(1)	EV	LV	ES	GG	GL	VQ	PG	GG	SL	RL	CA	AS	GF	TL	Y	Y	GH	W	VR	QA	PG	RG	LE	N	V	Y	S	RS	SH	TF	IF	Y	AD	S	V	K	G																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
NGF 7H2 Hu-Rat IgG2b.b.2002118141 final V region	(1)	EV	LV	ES	GG	GL	VQ	PG	GG	SL	RL	CA	AS	GF	TL	Y	Y	GH	W	VR	QA	PG	RG	LE	N	V	Y	S	RS	SH	TF	IF	Y	AD	S	V	K	G																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
NGF 14D11 HC race 20031028394rc V region	(1)	EV	LV	ES	GG	GL	VQ	PG	GG	SL	RL	CA	AS	GF	TL	Y	Y	GH	W	VR	QA	PG	RG	LE	N	V	Y	S	RS	SH	TF	IF	Y	AD	S	V	K	G																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
NGF 4G6 HC pCRATOPO 20031028328v V region	(1)	EV	LV	ES	GG	GL	VQ	PG	GG	SL	RL	CA	AS	GF	TL	Y	Y	GH	W	VR	QA	PG	RG	LE	N	V	Y	S	RS	SH	TF	IF	Y	AD	S	V	K	G																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
4D4 VH	(57)	67	80	90	100	110	127	CDR3	110	127	Sección 2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
NGF 14D10 HC 20031071581 v region	(57)	RPTISRDNAKNSLYLQMSLRDEDTAMYYCAR	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----